



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0098451
(43) 공개일자 2008년11월07일

- (51) Int. Cl.
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 31/7105* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2008-7026019(분할)
- (22) 출원일자 2008년10월23일
 심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2005-7014142
 원출원일자 2005년07월30일
 심사청구일자 2005년10월20일
 번역문제출일자 2008년10월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2004/001023
 국제출원일자 2004년02월02일
- (87) 국제공개번호 WO 2004/069268
 국제공개일자 2004년08월19일
- (30) 우선권주장
 JP-P-2003-026353 2003년02월03일 일본(JP)
- (71) 출원인
 도쿠리쓰교세이호징 가가쿠 기주쓰 신쿄 기쿄
 일본 사이타마켄 가와구치시 혼쵸 4쵸메 1반 8고
- (72) 발명자
 후루카와 다카히사
 일본 오사카후 스이타시 후루에다이 6쵸메 2방 4
 고 재단법인 오오사카 바이오사이エン스 젠큐쇼 나
 이
- (74) 대리인
 특허법인코리아나

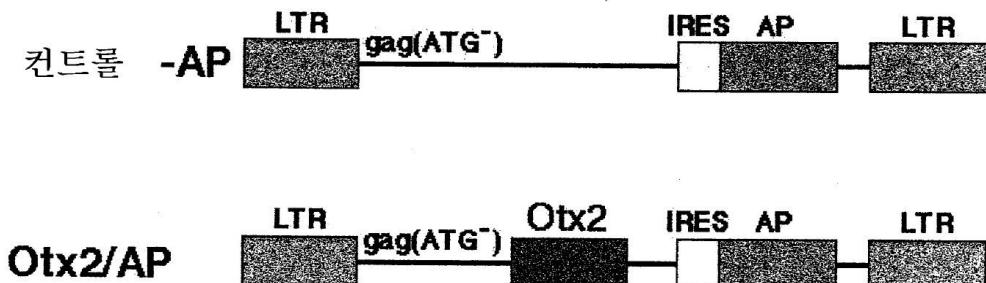
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) *Otx2* 유전자를 사용한 망막 시각세포의 재생과 신생

(57) 요약

본 발명은 (a) *Otx2* 단백질 또는 그 부분 펩티드 또는 그들의 염, 또는 (b) *Otx2* 단백질 또는 그 부분 펩티드를 인코딩하는 DNA 또는 RNA를 포함하는 의약을 제공한다. 본 발명의 의약은 망막 변성을 포함하는 망막 질환의 예방·치료·진행 억제제로서 유용하다. 이외에, 본 발명의 의약은 예를 들어, 망막 질환을 앓고 있는 환자의 망막 등에 대한 이식에 바람직한 망막 시각세포의 분화 유도제로서 유용하다.

대 표 도



특허청구의 범위

청구항 1

Otx2 단백질 또는 그들의 염에 대한 항체를 함유하는, 당뇨병에 기인하는 망막의 혈관 장애 또는 망막의 염증성 또는 변성 병변, 미숙아 망막증, 망막 색소 변성 및 황반 변성으로 이루어진 군으로부터 선택되는 망막 질환의 진단제.

청구항 2

(a) Otx2 단백질을 인코딩하는 DNA 또는 RNA, 또는 (b) 상기 DNA 또는 RNA의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 함유하는 앤티센스 폴리뉴클레오티드를 함유하는, 당뇨병에 기인하는 망막의 혈관 장애 또는 망막의 염증성 또는 변성 병변, 미숙아 망막증, 망막 색소 변성 및 황반 변성으로 이루어진 군으로부터 선택되는 망막 질환의 진단제.

청구항 3

Otx2 단백질의 발현 또는 발현량의 증가를 지표로 사용하는 것을 포함하는, 당뇨병에 기인하는 망막의 혈관 장애 또는 망막의 염증성 또는 변성 병변, 미숙아 망막증, 망막 색소 변성 및 황반 변성으로 이루어진 군으로부터 선택되는 망막 질환을 예방 또는 치료하기 위한 제제의 스크리닝 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 서열 번호: 1, 서열 번호: 3 또는 서열 번호: 5로 표시되는 아미노산 서열을 인코딩하는 DNA를 함유하고 Otx2 단백질을 발현하는 능력을 갖는 세포가 사용되는 스크리닝 방법.

청구항 5

서열 번호: 1, 서열 번호: 3 또는 서열 번호: 5로 표시되는 아미노산 서열을 인코딩하는 DNA를 함유하고 Otx2 단백질을 발현하는 능력을 갖는 세포를 함유하는, 당뇨병에 기인하는 망막의 혈관 장애 또는 망막의 염증성 또는 변성 병변, 미숙아 망막증, 망막 색소 변성 및 황반 변성으로 이루어진 군으로부터 선택되는 망막 질환을 예방 또는 치료하기 위한 제제의 스크리닝용 키트.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

<1>

본 발명은, Otx2 단백질 또는 Otx2 단백질을 인코딩하는 유전자를 함유하는 망막 시각세포로의 분화 유도제, 망막 질환의 예방·치료·진행 억제제 및 망막 질환의 진단제 등에 관한 것이다.

배경기술

<2>

망막 시각세포는, 포유 동물에 있어서 유일한 광센서로, 종래부터 생리학적, 생화학적, 해부학적 및 임상학적 으로 집중적으로 연구되어 왔다(일본 공개특허공보 2002-325571호). 그러나, 망막 시각세포로의 분화 및 발생 매카니즘은 전혀 공지되어 있지 않았다. 망막 시각세포의 이상에 기인하는 병인 인간 유전적 망막 변성증의 원인 유전자 부위로서 적어도 145 유전자 부위가 알려져 있지만, 해당 질환에 대한 확립된 치료 방법은 아직까지도 존재하지 않아, 환자는 중증의 시력 장애에 고통받고 있다. 그러므로, 설명 또는 중증 시력 장애를 가져오는 망막 변성증의 원인 해명과 치료 방법의 확립이 요구되어지고 있다. 또한, 망막 색소 변성증뿐만 아니라, 당뇨병성 망막증 또는 황반부 변성증 등의 많은 망막 질환에서 망막 시각세포의 변성 또는 장애가 보이기 때문에, 망막 시각세포의 재생 또는 신생을 가능하게 하기 위해 망막 시각세포의 발생과 분화의 분자 매카니즘의 해명은 매우 중요하다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<3> 발명의 개시

본 발명은, 망막 변성증을 포함한 망막 질환의 예방, 치료 또는 진행 억제제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

또한, 상기 의약으로서 유용한 화합물의 스크리닝 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또, 본 발명은, 망막 질환의 진단제 또는 진단 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그리고, 본 발명은, 망막 질환을 앓고 있는 환자의 망막 등에 대한 이식에 바람직한 망막 시각세포로의 분화 유도 방법 또는 분화 유도제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

<5> 본 발명자는, 망막 시각세포로의 분화의 열쇠를 된다고 하여 지금까지 해석되어 온 전사 인자 Crx 와 동일한 유전자 패밀리(family)에 속하는 Otx2 단백질에 주목하여, Otx2 단백질의 망막 시각세포의 운명 결정에 있어서의 역할을 해석하였다. 마우스의 생체 레벨에서의 해석 결과로서, 본 발명자는 Otx2 단백질이 망막 시각세포의 운명 결정에 대단히 중요하다는 것을 알아내었다. 즉, Otx2 유전자를 바이러스 벡터에 조합하고, 당해 재조합 벡터를 마우스의 미분화 망막 줄기 세포에 감염시켜서 마우스의 미분화 망막 줄기 세포에 있어서 Otx2 단백질을 발현시킨 결과, 대개의 미분화 망막 줄기 세포는 망막 시각세포로 분화되었다. 이러한 발견에 기초하여 더욱 검토를 거듭하여, 본 발명을 완성하였다.

<6> 즉, 본 발명은,

(1) Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드 또는 그들의 염을 함유하는 망막 질환의 예방, 치료 또는 진행 억제제,

<8> (2) Otx2 단백질이, 서열 번호: 1, 서열 번호: 3 또는 서열 번호: 5로 표시되는 아미노산 서열과 동일하거나 또는 상기 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 함유하는 단백질인 상기 (1)에 기재된 제(agent),

<9> (3) Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드를 인코딩하는 DNA 또는 RNA 를 함유하는 망막 질환의 예방, 치료 또는 진행 억제제,

<10> (4) DNA 가, 서열 번호: 2, 서열 번호: 4 또는 서열 번호: 6으로 표시되는 뉴클레오티드 서열 또는 상기 서열과 고도의 염격한 조건하에서 하이브리다이즈하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 상기 (3)에 기재된 제,

<11> (5) Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드를 인코딩하는 DNA 또는 RNA 를 함유하는 재조합 벡터를 함유하는 상기 (3)에 기재된 제,

<12> (6) Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드 또는 그들의 염을 함유하는 망막 시각세포로의 분화 유도제,

<13> (7) Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드를 인코딩하는 DNA 또는 RNA 를 함유하는 망막 시각세포로의 분화 유도제,

<14> (8) Otx2 단백질을 발현시키거나, 또는 Otx2 단백질의 발현량을 증가시키는 것을 포함하는 망막 시각세포로의 분화 유도 방법,

<15> (9) 안구 조직 유래 세포, 배아 줄기 세포, 신경 줄기 세포 또는 신경 전구 세포에 있어서, Otx2 단백질을 발현시키거나, 또는 Otx2 단백질의 발현량을 상승시키는 것을 특징으로 하는 상기 (8)에 따른 망막 시각세포로의 분화 유도 방법,

<16> (10) 안구 조직 유래 세포, 배아 줄기 세포, 신경 줄기 세포 또는 신경 전구 세포에, Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드를 인코딩하는 DNA 또는 RNA를 도입하여, 얻어진 세포를 배양하는 상기 (8)에 기재된 망막 시각세포로의 분화 유도 방법,

<17> (11) Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드 또는 그들의 염의 유효량을 포유 동물에 투여하는 것을 포함하는 망막 질환의 예방, 치료 또는 진행 억제 방법,

<18> (12) Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드를 인코딩하는 DNA 또는 RNA 의 유효량을 포유 동물에 투여하는 것을 포함하는 망막 질환의 예방, 치료 또는 진행 억제 방법,

<19> (13) Otx2 단백질에 의해 분화 유도된 망막 시각세포 또는 그 전구 세포를 망막에 이식하는 것을 포함하는 망막의 재생 방법,

<20> (14) 막 질환의 예방, 치료 또는 진행 억제제의 제조를 위한 Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드 또는 그들의 염

의 용도,

- <21> (15) 망막 질환의 예방, 치료 또는 진행 억제제의 제조를 위한 Otx2 단백질 또는 그 부분 펩티드를 인코딩하는 DNA 또는 RNA의 용도,
- <22> (16) Otx2 단백질 또는 그 부분 펩티드 또는 그들의 염에 대한 항체를 함유하는 망막 질환의 진단제,
- <23> (17) Otx2 단백질 또는 그 부분 펩티드 또는 그들의 염에 대한 항체를 사용하는 것을 포함하는 망막 질환의 진단 방법,
- <24> (18) Otx2 단백질, 그 부분 펩티드의 발현량 또는 변이를 검출하는 것을 포함하는 망막 질환의 진단 방법,
- <25> (19) (a) Otx2 단백질 또는 그 부분 펩티드를 인코딩하는 DNA 또는 RNA, 또는 (b) 상기 DNA 또는 RNA의 뉴클레오티드 서열에 상보적이거나 또는 실질적으로 상보적인 뉴클레오티드 서열을 함유하는 안티센스·폴리뉴클레오티드를 함유하는 망막 질환의 진단제,
- <26> (20) (a) Otx2 단백질 또는 그 부분 펩티드를 인코딩하는 DNA 또는 RNA, 또는 (b) 상기 DNA 또는 RNA의 뉴클레오티드 서열에 상보적이거나 또는 실질적으로 상보적인 뉴클레오티드 서열을 함유하는 안티센스·폴리뉴클레오티드를 사용하는 것을 포함하는 망막 질환의 진단 방법,
- <27> (21) Otx2 단백질 또는 그 부분 펩티드의 발현 또는 발현량의 상승을 지표로 하는 것을 포함하는 망막 시각세포로의 분화 유도 작용을 갖는 화합물 또는 그 염의 스크리닝 방법,
- <28> (22) Otx2 단백질 또는 그 부분 펩티드를 발현하는 능력을 갖는 세포를 사용하는 것을 포함하는 상기 (21)에 따른 스크리닝 방법,
- <29> (23) Otx2 단백질 또는 그 부분 펩티드를 발현하는 능력을 갖는 세포를 함유하는 것을 특징으로 하는 망막 시각세포로의 분화 유도 작용을 갖는 화합물 또는 그 염의 스크리닝용 키트,
- <30> (24) 상기 (21) 또는 (22)에 기재된 스크리닝 방법, 또는 상기 (23)에 기재된 스크리닝용 키트를 사용하여 얻을 수 있는, 망막 시각세포로의 분화 유도 작용을 갖는 화합물 또는 그 염,
- <31> (25) 상기 (24)에 기재된 화합물 또는 그 염을 함유하는 의약,
- <32>에 관한 것이다.

<33> 본 발명의 단백질 등 또는 본 발명의 DNA 등을 사용하면, 안구 조직 유래 세포, 배아 줄기 세포, 신경 줄기 세포 또는 신경 전구 세포를 망막 시각세포로 분화시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 단백질 등 또는 본 발명의 DNA 등을 사용하여 망막 시각세포를 재생 또는 신생함으로써, 예를 들어 망막 색소 변성, 가령(加齡) 황반변성, 당뇨병성 망막증, 망막 박리, 녹내장 또는 망막 혈관 폐색증 등 망막 질환을 예방, 치료 또는 진행 억제 할 수 있다. 또, Otx2 유전자의 이상에 의하여 망막 시각세포는 구조적 또는 기능적 이상을 초래하기 때문에, Otx2 유전자의 이상 또는 Otx2 단백질의 변성 또는 발현 저하를 검출함으로써, 상기 망막 질환의 진단도 할 수 있다.

34> 발명을 실시하기 위한 최선의 형태

<35> 본 발명에서 사용하는 Otx2 단백질로는, 서열 번호: 1, 3 또는 5로 표시되는 아미노산 서열과 동일하거나 또는 상기 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 함유하는 단백질을 들 수 있다. 본 발명에서는, 서열 번호: 1, 3으로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 인간 유래의 Otx2 단백질 또는 서열 번호: 5로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 마우스 유래의 Otx2 단백질에 한정되지 않고, 다른 동물, 특히 온혈 동물(예를 들어 기니 피그, 마우스, 닭, 토끼, 돼지, 양, 소, 원숭이 등) 유래의 아미노산 서열 또는 그 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다.

<36> "서열 번호: 1, 3 또는 5로 표시되는 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열"의 예로는, 예를 들어 서열 번호: 1, 3 또는 5로 표시되는 아미노산 서열과 약 50% 이상, 바람직하게는 약 60% 이상, 보다 바람직하게는 약 70% 이상, 더욱 바람직하게는 약 80% 이상, 특히 바람직하게는 약 90% 이상, 가장 바람직하게는 약 95% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열 등을 들 수 있다. 본 발명의 서열 번호: 1, 3 또는 5로 표시되는 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 함유하는 단백질로는, 예를 들어 서열 번호: 1, 3 또는 5로 표시되는 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 함유하고, 망막 시각세포로의 분화 유도 작용을 갖는 단백질 등이 바람직하다. 그 중에서도, 전사 활성이거나 망막 시각세포로의 분화 유도 작용이 서열

번호: 1, 3 또는 5로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질과 동등 (예, 약 0.01~100 배, 바람직하게는 약 0.5~20 배, 보다 바람직하게는 약 0.5~2 배) 한 것이 바람직하지만, 이들 활성의 정도나 단백질의 분자량 등과 같은 양적 요소가 다를 수 있다. 망막 시각세포로의 분화 유도 작용은 공지된 방법에 준하여 측정할 수 있지만, 예를 들어 후술하는 스크리닝 방법에 따라서 측정할 수 있다. 전사 활성을 공지된 방법, 예를 들어 리포터(reporter) 분석이나, RT-PCR 등 방법을 사용하여 측정할 수 있다.

<37> 구체적으로, 본 발명에서 사용하는 Otx2 단백질로는, (a) 서열 번호: 1, 3 또는 5로 표시되는 아미노산 서열 중의 1 또는 2개 이상 (바람직하게는 1~30개 정도, 보다 바람직하게는 1~40개 정도, 더욱 바람직하게는 수개 (1~5개))의 아미노산이 결실된 아미노산 서열, (b) 서열 번호: 1, 3 또는 5로 표시되는 아미노산 서열에 1 또는 2개 이상 (바람직하게는 약 1~30개, 보다 바람직하게는 약 1~10개, 더욱 바람직하게는 수개 (1~5개))의 아미노산이 부가된 아미노산 서열, (c) 서열 번호: 1, 3 또는 5로 표시되는 아미노산 서열 중의 1 또는 2개 이상 (바람직하게는 약 1~30개, 보다 바람직하게는 약 1~10개, 더욱 바람직하게는 수개 (1~5개))의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 아미노산 서열, 또는 (d) 그들을 조합한 아미노산 서열을 함유하는 단백질 등이 사용된다. 상기 (b)에 있어서 부가되는 아미노산, 상기 (c)에 있어서 치환되는 아미노산은, 유전자에 의해 인코드되는 20종류의 아미노산 이외의 비천연 아미노산일 수도 있다. 상기 (a)~(d)에 기재된 단백질은, 망막 시각세포로의 분화 유도 작용을 갖는 것이 보다 바람직하다.

<38> 본 발명의 Otx2 단백질에 있어서는, C 말단이 카르복실기 (-COOH), 카르복시레이트 (-COO⁻), 아미드 (-CONH₂) 및 에스테르 (-COOR) 중 임의의 것이 될 수 있다. 여기서 에스테르기내의 R로는, C_{1~6} 알킬기, 예컨대, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필 또는 n-부틸; C_{3~8} 시클로알킬기, 예컨대, 시클로펜틸 및 시클로헥실; C_{6~12} 아릴기 예컨대 페닐 및 α-나프틸; 및 C_{7~14} 아랄킬기 예컨대, 페닐-C_{1~2} 알킬기(예를 들어, 벤질, 웬에틸) 및 α-나프틸-C_{1~2}알킬기(예를 들어, α-나프틸메틸); 및 추가로 경구용 에스테르로서 범용되는 피발로일옥시메틸기 등이 사용된다. 본 발명에 있어서의 Otx2 단백질이 C 말단 이외에 카르복실기 (또는 카르복시레이트)를 갖고 있는 경우, 카르복실기가 아미드화 또는 에스테르화되어 있는 것도 본 발명에 있어서의 Otx2 단백질에 포함된다. 이 경우의 에스테르로는, 예를 들어 상기한 C 말단의 에스테르가 사용된다. 또, 본 발명에 있어서의 Otx2 단백질에는, 상기한 단백질에 있어서, N 말단의 메티오닌 잔기의 아미노기가 보호기 (예를 들어 포르밀기, 아세틸 등의 C_{2~6} 알카노일기 등의 C_{1~6} 아실기 등)로 보호되어 있는 것, N 말단측이 생체 내에서 절단되어 생성된 글루타밀기가 피로글루타민산화된 것, 분자 내의 아미노산의 측쇄 상의 치환기 (예를 들어 -OH, -SH, 아미노기, 이미다졸기, 인돌기, 구아니딘기 등)가 적당한 보호기 (예를 들어 포르밀기, 아세틸 등의 C_{2~6} 알카노일기 등의 C_{1~6} 아실기 등)로 보호되어 있는 것, 또는 당쇄가 결합한 이른바 당단백질 등의 복합 단백질 등도 포함된다.

<39> 본 발명에서 사용하는 Otx2 단백질의 부분 펩티드 (이하, 부분 펩티드라고 약기하는 경우가 있다)에서는, 상기한 Otx2 단백질의 부분 펩티드이면 모두 가능하다. 본 발명에 있어서의 부분 펩티드의 아미노산의 수는, 상기한 Otx2 단백질의 구성 아미노산 서열 중 적어도 약 20개 이상, 바람직하게는 약 50개 이상, 보다 바람직하게는 약 100개 이상의 아미노산 서열을 함유하는 펩티드 등이 바람직하다.

<40> 본 발명의 부분 펩티드에 있어서는, C 말단이 카르복실기 (-COOH), 카르복시레이트 (-COO⁻), 아미드 (-CONH₂) 및 에스테르 (-COOR) 중 임의 하나가 될 수 있다. 또, 본 발명의 부분 펩티드에는, 상기한 본 발명의 Otx2 단백질과 마찬가지로, N 말단의 메티오닌 잔기의 아미노기가 보호기로 보호되어 있는 것, N 단측이 생체 내에서 절단되어 생성된 Gln이 피로글루타민산화된 것, 분자 내의 아미노산의 측쇄 상의 치환기가 적당한 보호기로 보호되어 있는 것, 또는 당쇄가 결합한 이른바 당펩티드 등의 복합 펩티드 등도 포함된다.

<41> 본 발명의 Otx2 단백질 또는 그 부분 펩티드의 염으로는, 산 또는 염기와의 생리학적으로 허용되는 염을 들 수 있고, 특히 생리학적으로 허용되는 산부가염이 바람직하다. 이러한 염으로는, 예를 들어 무기산 (예를 들어 염산, 인산, 브롬화수소산, 황산) 과의 염, 또는 유기산 (예를 들어 아세트산, 포름산, 프로피온산, 푸마르산, 말레산, 숙신산, 타르타르산, 시트르산, 말산, 옥살산, 벤조산, 메탄설휠산, 벤젠설휠산) 과의 염 등을 들 수 있다.

<42> 본 발명에 있어서의 Otx2 단백질 또는 그 염은, 동물, 바람직하게는 온혈 동물, 보다 바람직하게는 인간 또는 래트, 더욱 바람직하게는 인간의 세포 또는 조직, 특히 바람직하게는 인간 뇌의 뉴런, 눈의 망막 색소 상피 세

포 또는 망막 시각세포로부터 공지된 단백질의 정제 방법에 의해 제조할 수도 있고, 후술하는 본 발명의 Otx2 단백질을 인코딩하는 DNA 또는 RNA를 함유하는 형질 전환체를 배양하는 것에 의해서도 제조할 수 있다. 또한, 후술하는 단백질 합성법 또는 동일하거나 유사한 방법으로 제조할 수도 있다. 상기 단백질이 동물의 조직 또는 세포로부터 제조되는 경우, 동물의 조직 또는 세포를 균질화한 후, 산 등으로 추출하고, 그 추출액을 역상 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피 등의 크로마토그래피를 조합함으로써 정제 단리할 수 있다.

<43> 본 발명에 있어서의 Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드 또는 그들의 염 또는 그들의 아미드체의 합성에는, 상용되는 단백질 합성용 수지를 일반적으로 사용할 수 있다. 그와 같은 수지로는, 예를 들어 클로로메틸 수지, 히드록시메틸 수지, 벤즈히드릴아민 수지, 아미노메틸 수지, 4-벤질옥시벤질알코올 수지, 4-메틸벤즈히드릴아민 수지, PAM 수지, 4-히드록시메틸메틸페닐아세트아미드메틸 수지, 폴리아크릴아미드 수지, 4-(2',4'-디메톡시페닐-히드록시메틸)페녹시 수지, 4-(2',4'-디메톡시페닐-Fmoc-아미노에틸)페녹시 수지 등을 들 수 있다. 이러한 수지를 사용하여, α -아미노기와 측쇄 작용기를 적당히 보호한 아미노산을, 목적으로 하는 단백질의 서열대로 공지의 각종 축합 방법에 따라서 수지 상에서 축합시킨다. 반응의 마지막에 수지로부터 단백질을 잘라냄과 동시에 각종 보호기를 제거하고, 또한 고회석 용액 중에서 분자 내 디슬피드 결합 형성 반응을 실시하여, 원하는 단백질 또는 그 아미드체를 취득한다. 상기한 보호 아미노산의 축합에 관해서는 단백질 합성에 사용할 수 있는 각종 활성화 시약을 사용할 수 있지만, 활성화 시약으로는 특히 카르보디이미드류가 좋다. 카르보디이미드류로는, DCC, N,N'-디이소프로필카르보디이미드, N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 등이 사용된다. 이들에 의한 활성화에는 라세미화 억제 첨가제 (예를 들어 HOBt, HOOBt) 와 함께 보호 아미노산을 직접 수지에 첨가하거나, 또는 보호 아미노산을 대칭 산무수물 또는 HOBt 에스테르 또는 HOOBt 에스테르로 변환함으로써 미리 보호 아미노산의 활성화를 실시한 후에 수지에 첨가할 수 있다.

<44> 보호 아미노산의 활성화나 수지와의 축합에 사용되는 용매로는, 단백질 축합 반응에 사용할 수 있음이 공지된 용매로부터 적절히 선택될 수 있다. 상기 용매는 예를 들어, 산아미드, 예컨대, N,N-디메틸포름아미드, N,N-디메틸아세트아미드, N-메틸피롤리돈; 할로겐화탄화수소, 예컨대, 염화메틸렌, 클로로포름; 알코올 예컨대, 트리플루오로에탄올; 술폭시드, 예컨대, 디메틸술폭시드; 에테르, 예컨대, 피리딘, 디옥산, 테트라하이드로푸란; 니트릴, 예컨대, 아세토니트릴, 프로피오니트릴; 에스테르, 예컨대, 아세트산메틸, 아세트산에틸 또는 이들의 적절한 혼합물 등이 사용된다. 반응 온도는 단백질 결합 형성 반응에 사용될 수 있음이 공지된 범위로부터 적절히 선택되고, 통상 약 -20°C ~ 50°C 의 범위에서 적절히 선택된다. 활성화된 아미노산 유도체는 통상 1.5~4 배 과량으로 사용된다. 니히드린 반응을 사용한 시험의 결과, 축합이 불충분한 경우에는 보호기를 탈리하지 않고 축합 반응을 반복함으로써 충분한 축합을 할 수 있다. 반응을 반복하더라도 충분한 축합이 얻어지지 않을 때에는, 무수아세트산 또는 아세틸이미다졸을 사용하여 미반응 아미노산을 아세틸화할 수 있다.

<45> 원료인 아미노기의 보호기로는, 예를 들어 Z, Boc, t-페닐옥시카르보닐, 이소보르닐옥시카르보닐, 4-메톡시벤질옥시카르보닐, Cl-Z, Br-Z, 아다만틸옥시카르보닐, 트리플루오로아세틸, 프탈로일, 포르밀, 2-니트로페닐술페닐, 디페닐포스피노티오일, Fmoc 등이 사용된다. 카르복실기는, 예를 들어 알킬에스테르화 (예를 들어 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, t-부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵틸, 시클로옥틸, 2-아다만틸 등의 직쇄상, 분지상 또는 고리형 알킬에스테르화), 아랄킬에스테르화 (예를 들어 벤질에스테르, 4-니트로벤질에스테르, 4-메톡시벤질에스테르, 4-클로로벤질에스테르, 벤즈히드릴에스테르화), 펜아실에스테르화, 벤질옥시카르보닐히드라지드화, t-부톡시카르보닐히드라지드화, 트리틸히드라지드화 등에 의해 보호할 수 있다. 세린의 수산기는, 예를 들어 에스테르화 또는 에테르화에 의하여 보호할 수 있다. 이 에스테르화에 적합한 기로는, 예를 들어 아세틸기와 같은 저급 알카노일기, 벤조일기와 같은 알로일기, 벤질옥시카르보닐기, 에톡시카르보닐기 등의 탄산으로부터 유도되는 기 등이 사용된다. 또한, 에테르화에 적합한 기로는, 예를 들어 벤질기, 테트라하이드로페라닐기, t-부틸기 등이다. 티로신의 폐놀성 수산기의 보호기로는, 예를 들어 Bz1, Cl₂-Bz1, 2-니트로벤질, Br-Z, 또는 t-부틸 등이 사용된다. 히스티딘의 이미다졸의 보호기로는, 예를 들어 Tos, 4-메톡시-2,3,6-트리메틸벤젠술포닐, DNP, 벤질옥시메틸, Bum, Boc, Trt, 및 Fmoc 등이 사용된다.

<46> 원료인 카르복실기의 활성화된 것으로는, 예를 들어 대응하는 산무수물, 아지드, 활성 에스테르 [알코올 (예를 들어 펜타클로로페놀, 2,4,5-트리클로로페놀, 2,4-디니트로페놀, 시아노메틸알코올, p-니트로페놀, HONB, N-히드록시숙시미드, N-히드록시프탈이미드, HOBt) 과의 에스테르] 등이 사용된다. 원료인 아미노기의 활성화된 것으로는, 예를 들어 대응하는 인산아미드가 사용된다. 보호기의 제거(해제) 방법으로는, 예를 들어 (a) Pd-블랙 또는 Pd-탄소와 같은 촉매 존재하에서 수소 기류 중에서의 접촉 환원, (b) 무수불화수소, 메탄설휠산, 트리플루오로메탄설휠산, 트리플루오로아세트산 또는 이들의 혼합액 등에 의한 산 처리, (c) 디이소프로필에틸

아민, 트리에틸아민, 피페리딘, 또는 피페라진 등에 의한 염기 처리, 또는 (d) 액체 암모니아 중 나트륨에 의한 환원 등도 사용된다. 상기 산 처리에 의한 탈리 반응은, 일반적으로 약 -20°C ~ 40°C 의 온도에서 실시되지만, 산 처리에 있어서는, 예를 들어 아니솔, 폐놀, 티오아니솔, m -크레졸, p -크레졸, 디메틸슬피드, 1,4-부탄디티올, 및 1,2-에탄디티올과 같은 양이온 포착제의 첨가가 유효하다. 또한, 허스티딘의 이미다졸 보호기로서 사용되는 2,4-디니트로페닐기는 티오페놀 처리에 의해 제거된다. 트립토판의 인돌 보호기로서 사용되는 포르밀기는 상기한 1,2-에탄디티올, 또는 1,4-부탄디티올 등의 존재하에서의 산 처리에 의한 해제 이외에, 희(希)수산화나트륨 용액, 희암모니아 등에 의한 알칼리 처리에 의해서도 제거된다.

<47> 원료의 반응에 관여할 수 없는 작용기의 보호 그리고 보호기, 및 그 보호기의 해제, 반응에 관여하는 작용기의 활성화 등은 공지된 기 또는 공지된 수단으로부터 적절히 선택할 수 있다. 단백질의 아미드체를 얻는 별도 방법으로는, 예를 들어 우선, 카르복시 말단 아미노산의 α -카르복실기를 먼저 아미드화하여 보호한 후, 아미노기측에 웨티드 (단백질) 사슬을 원하는 사슬 길이까지 연장한 다음, 그 웨티드 사슬의 N 말단의 α -아미노기의 보호기만을 제거한 단백질과 C 말단의 카르복실기의 보호기만을 제거한 단백질을 제조하고, 이 양 단백질을 상기한 바와 같은 혼합 용매 중에서 축합시킨다. 축합 반응의 상세한 내용에 관해서는 상기와 동일하다. 축합에 의해 얻어진 보호 단백질을 정제한 후, 상기 방법에 의해 모든 보호기를 제거하여, 원하는 조(粗)단백질을 얻을 수 있다. 이 조단백질은 공지된 다양한 방법을 이용하여 정제하고, 주요 분획을 동결 건조시킴으로써 원하는 단백질의 아미드체를 얻을 수 있다. 단백질의 에스테르체를 얻기 위해서는, 예를 들어 카르복시 말단 아미노산의 α -카르복실기를 원하는 알코올류와 축합하여 아미노산에스테르로 한 후, 단백질의 아미드체와 동일한 방법으로 원하는 단백질의 에스테르체를 얻을 수 있다. 상기 방법에 의해 얻어지는 단백질이 유리화합물인 경우, 공지된 방법에 의해서 적당한 염으로 변환할 수 있고, 반대로 염으로 얻어진 경우에는, 공지된 방법에 의해 유리화합물로 변환할 수 있다.

<48> 본 발명에 있어서의 0tx2 단백질의 부분 펩티드 또는 그 염은, 공지된 펩티드의 합성법에 따라서, 또는 본 발명에 있어서의 0tx2 단백질을 적당한 펩티다아제에 의해 절단함으로써 제조할 수 있다. 펩티드의 합성법으로는, 예를 들어 고상 합성법, 액상 합성법 중 임의 것이 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 0tx2 단백질을 구성할 수 있는 부분 펩티드 또는 아미노산과 잔여 부분을 축합시키고, 생성물이 보호기를 갖는 경우에는 보호기를 제거시킴으로써 원하는 펩티드를 제조할 수 있다. 공지된 축합 방법이나 보호기의 탈리로는, 예를 들어 이하의 (a)~(e)에 기재된 방법을 들 수 있다:

<49> (a) M.Bodanszky 및 M.A.Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966년), (b) Schroeder 및 Luebke, The Peptide, Academic Press, New York (1965년), (c) 이즈미야 시노부 외, 펩티드 합성의 기초와 실험, 마루젠 (주) (1975년), (d) 야지마 하루아키 및 사카키바라 준페이, 생화학 실험 강좌 1, 단백질의 화학 IV, 205, (1977년), (e) 야지마 하루아키 감수, 속(續)의약품의 개발 제 14 권 펩티드 합성 히로카와쇼텐.

<50> 또한, 반응 후는 통상의 정제 방법, 예를 들어 용매 추출·증류·컬럼 크로마토그래피·액체 크로마토그래피·재결정 등을 조합하여 본 발명의 부분 웹티드를 정제 단리할 수 있다. 상기 방법으로 얻어지는 부분 웹티드가 유리 화합물인 경우에는 공지된 방법에 의해서 적당한 염으로 변환할 수 있고, 반대로 염으로 얻어진 경우에는 공지된 방법에 의해서 유리 화합물로 변환할 수 있다.

<51> 본 발명에서 사용하는 Otx2 단백질을 인코딩하는 DNA로는, 게놈 DNA, 게놈 DNA 라이브러리, 상기한 세포·조직 유래의 cDNA, 상기한 세포·조직 유래의 cDNA 라이브러리, 합성 DNA 중 임의 하나가 사용될 수 있다. 라이브러리에 사용하는 벡터는, 박테리오파지, 플라스미드, 코스미드, 파지미드 중 임의 하나가 사용될 수 있다. 또, 상기한 세포·조직으로부터 총 RNA 또는 mRNA 분획을 조제한 것을 사용하여 직접 역전사효소 중합효소연쇄반응(Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)(이하, RT-PCR 법으로 약칭한다)에 의해 증폭할 수도 있다. 구체적으로는, Otx2 단백질을 인코딩하는 DNA로는, 예를 들어 (a) 서열 번호: 2, 4 또는 6으로 표시되는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 DNA, 또는 (b) 서열 번호: 2, 4 또는 6으로 표시되는 뉴클레오티드 서열과 고도의 염격한 조건하에서 하이브리다이즈하는 뉴클레오티드 서열을 갖고, 본 발명의 Otx2 단백질과 실질적으로 동질의 활성(예, 전사 활성이나 망막 시각세포 분화 유도 작용 등)을 갖는 Otx2 단백질을 인코딩하는 DNA 등을 들 수 있다. 또, 서열 번호: 2 및 4는, 인간의 Otx2 단백질을 인코딩하는 DNA(Kastury, K. 등, "Chromosome locations of human EMX and OTX genes", Genomics 22 (1), 41-45 (1994))이고, 서열 번호: 6은, 마우스의 Otx2 단백질을 인코딩하는 DNA(Simeone, A., 등, "Nested expression domains of four homeobox genes in developing rostral brain", Nature 358 (6388), 687-690 (1992))이다. 서열 번호: 2, 4 또는 6으로 표시되는 뉴클레오티드 서열과 하이브리다이즈할 수 있는 DNA로는, 예를 들어 서열 번호: 2, 4 또는 6

으로 표시되는 뉴클레오티드 서열과 약 70% 이상, 바람직하게는 약 80% 이상, 보다 바람직하게는 약 90% 이상, 가장 바람직하게는 약 95% 이상의 상동성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 DNA 등이 사용된다. 하이브리다이제이션은, 공지된 방법 또는 이에 유사한 방법, 예를 들어 [Molecular Cloning 2nd J. Sambrook 등, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989]에 기재된 방법 등에 따라서 실시할 수 있다. 또한, 시판되는 라이브러리를 사용하는 경우, 첨부된 사용 설명서에 기재된 방법에 따라서 실시할 수 있다. 보다 바람직하게는, 고도의 엄격한 조건에 따라서 실시할 수 있다. 그 고도의 엄격한 조건이란, 예를 들어 나트륨 농도가 약 19~40mM, 바람직하게는 약 19~20mM이고, 온도가 약 50~70°C, 바람직하게는 약 60~65°C의 조건을 나타낸다. 특히, 나트륨 농도가 약 19mM이고 온도가 약 65°C인 경우가 가장 바람직하다.

<52>

본 발명에서 사용하는 부분 펩티드를 인코딩하는 DNA로는, 상기한 본 발명의 부분 펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 임의 DNA가 사용될 수 있다. 또한, 게놈 DNA, 게놈 DNA 라이브러리, 상기한 세포·조직 유래의 cDNA, 상기한 세포·조직 유래의 cDNA 라이브러리, 합성 DNA 중 임의 것이 사용될 수 있다. 라이브러리에 사용하는 벡터는, 박테리오파지, 플라스미드, 코스미드, 파지미드 중 임의 것이 될 수 있다. 또, 상기한 세포·조직으로부터 mRNA 분획을 조제한 것을 사용하여 직접 역전사효소 중합효소연쇄반응(이하, RT-PCR 법으로 약칭한다)에 의해 증폭할 수도 있다. 구체적으로는, 본 발명의 부분 펩티드를 인코딩하는 DNA로는, 예를 들어 (a) 서열 번호: 2, 4 또는 6으로 표시되는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 DNA의 부분 뉴클레오티드 서열을 함유하는 DNA, 또는 (b) 서열 번호: 2, 4 또는 6으로 표시되는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 DNA와 고도의 엄격한 조건하에서 하이브리다이즈하는 뉴클레오티드 서열을 함유하고, 본 발명의 Otx2 단백질과 실질적으로 동질의 활성(예, 전사 활성이나 망막 시작세포 분화 유도 작용 등)을 갖는 단백질을 인코딩하는 DNA, 이상 (a) 또는 (b)의 부분 뉴클레오티드 서열을 함유하는 DNA 등이 사용된다.

<53>

본 발명에서 사용하는 Otx2 단백질 또는 부분 펩티드를 인코딩하는 RNA도, 역전사 효소에 의해 Otx2 단백질 또는 부분 펩티드를 발현할 수 있는 것이면 특별히 한정되지 않고, 공지된 수단에 의해 얻을 수 있다.

<54>

본 발명에 있어서의 Otx2 단백질 또는 그 부분 펩티드(이하, 본 발명의 단백질로 약기하는 경우가 있다)를 완전히 인코딩하는 DNA의 클로닝의 수단으로는, 본 발명의 단백질의 부분 뉴클레오티드 서열을 함유하는 합성 DNA 프라이머를 사용하여 PCR 법에 의해서 증폭하거나, 또는 적당한 벡터에 삽입한 DNA 중에서, 표지된 본 발명의 단백질의 일부 또는 전체 영역을 인코딩하는 DNA 단편 또는 합성 DNA를 사용하여 하이브리다이제이션시킴으로써 선별할 수 있다. 하이브리다이제이션 방법은, 예를 들어 [Molecular Cloning 2nd J. Sambrook 등, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989]에 기재된 방법 등에 따라서 실시할 수 있다. 또한, 시판되는 라이브러리를 사용하는 경우, 첨부의 사용 설명서에 기재된 방법에 따라서 실시할 수 있다.

<55>

DNA의 뉴클레오티드 서열의 치환은, PCR이나 공지된 키트, 예를 들어 MutanTM-superExpress Km(다까라슈조), 또는 MutanTM-K(다까라슈조) 등을 사용하여, ODA-LA PCR 법, gapped duplex 법, Kunkel 법 등의 공지된 방법 또는 그것들에 준하는 방법에 따라서 실시할 수 있다. 클론화된 본 발명의 단백질을 인코딩하는 DNA는 목적에 의해 그대로, 또는 원한다면 제한 효소로 분해하거나, 링커를 부가하거나 하여 사용할 수 있다. 그 DNA는 그 5' 말단측에 번역 개시 코돈으로서의 ATG를 갖고, 또한 3' 말단측에는 번역 종지 코돈으로서의 TAA, TGA 또는 TAG를 갖는다. 이들의 번역 개시 코돈이나 번역 종지 코돈은, 적당한 합성 DNA 어댑터를 사용하여 부가될 수도 있다.

<56>

본 발명의 단백질을 인코딩하는 DNA 또는 RNA(이하, 본 발명의 DNA 등으로 약기하는 경우가 있다)는, 다음과 같은 방침에 기초하여 수식될 수도 있다. 즉, 세포 내에서의 본 발명의 DNA 등을 보다 안정적인 것으로 하고, 본 발명의 DNA 등의 세포 투과성을 보다 높이며, 그리고 혹시 독성이 있으면 본 발명의 DNA 등의 독성을 보다 작은 것으로 한다. 이러한 수식은 당해 분야에서 많이 알려져 있고, 예를 들어 [J. Kawakami 등, Pharm Tech Japan, Vol.8, pp.247, 1992; Vol.8, pp.395, 1992; S. T. Crooke 등 ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993] 등에 개시되어 있다. 본 발명의 DNA 등은, 리포솜 또는 마이크로스피어 등에 내포된 특수한 형태로 사용해도 된다. 또, 본 발명의 DNA 등은, 염기 이외의 다른 물질이 부가된 것일 수 있다. 상기 다른 물질로는, 당; 산 또는 염기; 인산기 골격의 전하를 중화하도록 작용하는 폴리리신과 같은 폴리 양이온체; 또는, 세포막과의 상호 작용을 높이거나, 핵산의 도입을 증대시키거나 하는 지질(예를 들어 포스포리피드, 콜레스테롤 등)과 같은 소수성의 것을 들 수 있다. 부가하기에 바람직한 지질로는, 콜레스테롤이나 그 유도체(예를 들어 콜레스테릴클로로포르메이트, 콜산 등)을 들 수 있다. 상기 다른 물질은, 핵산의 3' 단 또는 5' 단에 부착시키는 수 있어, 염기, 당, 분자 내 뉴클레오시드 결합을 통하여 부착

시킬 수 있다. 본 발명의 DNA 등은, 그 말단이 화학 수식된 것이어도 된다. 말단의 수식기로는, 핵산의 3' 단 또는 5' 단에 특이적으로 배치된 캡용의 기로, 엑소뉴클레아제, RNase 등의 뉴클레아제에 의한 분해를 저지하기 위한 것을 들 수 있다. 이러한 캡용의 기로는, 폴리에틸렌글리콜, 테트라에틸렌글리콜 등의 글리콜을 비롯한 당해 분야에서 알려진 수산기의 보호기를 들 수 있지만, 여기에 한정되는 것은 아니다.

<57> 본 발명에서 사용하는 Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드를 인코딩하는 DNA 또는 RNA 를 함유하는 재조합 벡터로는, Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드를 발현할 수 있는 발현 벡터가 바람직하다.

<58> 본 발명의 단백질의 발현 벡터는, 예를 들어 (i) 본 발명의 단백질을 인코딩하는 DNA 를 함유하는 DNA 단편을 예를 들어 cDNA로부터 잘라내고, (ii) 그 DNA 단편을 적당한 발현 벡터 중의 프로모터의 하류에 연결함으로써 제조할 수 있다.

<59> 상기 발현 벡터로는, 대장균 유래의 플라스미드 (예, pCR4, pCR2.1, pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), 고초균 유래의 플라스미드 (예, pUB110, pTP5, pC194), 효모 유래 플라스미드 (예, pSH19, pSH15), λ 파지 등의 박테리오파지, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 렌치바이러스, 백시니아바이러스, 및 베큐로바이러스 (baculovirus) 등과 같은 바이러스 등 외에, pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neo 등이 사용된다. 그 중에서도, 본 발명에서 사용하는 벡터로는, 바이러스가 바람직하고, 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 렌치바이러스가 보다 바람직하다.

<60> 상기 프로모터로는, 유전자의 발현에 사용되는 숙주에 대응한 적절한 프로모터이면 모두 사용할 수 있다. 예를 들어, 동물 세포를 숙주로서 사용하는 경우에는, SRα 프로모터, SV40 프로모터, LTR 프로모터, CMV 프로모터, 및 HSV-TK 프로모터를 포함한다. 이들 중, LTR 프로모터, CMV 프로모터, SRα 프로모터 등을 사용하는 것이 바람직하다. 숙주가 이케리치아균 (Escherichia)인 경우에는, trp 프로모터, lac 프로모터, recA 프로모터, λP_L 프로모터, lpp 프로모터가 바람직하다. 숙주가 바실러스균 (Bacillus)인 경우에는, SP01 프로모터, SP02 프로모터, penP 프로모터가 바람직하다. 숙주가 효모인 경우에는, PH05 프로모터, PGK 프로모터, GAP 프로모터, ADH 프로모터가 바람직하다. 숙주가 곤충 세포인 경우에는, 폴리헤드린 프로모터, 및 P10 프로모터가 바람직하다.

<61> 발현 벡터에는, 이상의 것 외에, 원한다면 인핸서, 스플라이싱 시그널, 폴리 A 부가 시그널, 캡 구조, 단백질 합성 개시 시그널, 선택 마커, 표지 마커, 및 SV40 복제 오리진 등을 함유하고 있는 것이 사용될 수 있다.

<62> 선택 마커로는, 예를 들어 디히드로엽산 환원 효소 (이하, dhfr로 약칭하는 경우가 있다) 유전자 [메소트렉세이트 (Methotrexate: MTX) 내성], 앰피실린 내성 유전자 (이하, Amp^r로 약칭하는 경우가 있다), 네오마이신 내성 유전자 (이하, Neo^r로 약칭하는 경우가 있다, G418 내성) 등을 들 수 있다. 특히, dhfr 유전자 결손 차이니즈 햄스터 세포 CHO 를 사용하고 dhfr 유전자를 선택 마커로서 사용하는 경우, 목적유전자를, 티미딘을 함유하지 않은 배지에 의해서도 선택할 수 있다.

<63> 표지 마커로는, 알칼리 포스파타아제 (이하, AP로 약칭하는 경우가 있다.) 유전자, 녹색 형광 단백질 (GFP) 유전자 등을 바람직하게 사용할 수 있다.

<64> 또한, 원한다면, 숙주에게 맞는 시그널 서열을 발현 벡터에 부가해도 된다. 숙주가 이케리치아속균인 경우에는, PhoA · 시그널 서열, OmpA · 시그널 서열 등이, 숙주가 바실러스균인 경우에는, α-아밀라제 · 시그널 서열, 및 서브티리딘 · 시그널 서열등이, 숙주가 효모인 경우에는, MFα · 시그널 서열, SUC2 · 시그널 서열이 이용될 수 있다. 숙주가 동물 세포인 경우에는, 인슐린 · 시그널 서열, α-인터페론 · 시그널 서열, 항체 분자 · 시그널 서열 등을 각각 이용할 수 있다.

<65> 또한, 벡터로서 바이러스를 사용하는 경우에는, 번역 매카니즘을 증강하기 위해 단백질 합성 개시 시그널로서 IRES (내부 리보솜 결합 사이트) 서열을 배열하는 것이 바람직하다.

<66> 이렇게 해서 구축된 본 발명의 단백질을 인코딩하는 DNA 를 함유하는 발현 벡터를 숙주에 도입함으로써, 형질전환체를 제조할 수 있다.

<67> 숙주로는, 예를 들어 이케리치아속균, 바실러스균, 효모, 곤충 세포, 곤충, 동물 세포 등이 사용된다. 이케리치아속균의 구체예로는, 이케리치아 콜리 (*Escherichia coli*) K12 · DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60 권, 160 (1968)], JM103 [Nucleic Acids Research, 9 권, 309 (1981)], JA221 [Journal of Molecular

Biology, 120 권, 517 (1978)], HB101 [Journal of Molecular Biology, 41 권, 459 (1969)], C600 [Genetics, 39 권, 440 (1954)], DH5a [Inoue, H., Nojima, H. 및 Okayama, H., Gene, 96, 23-28 (1990)], DH10B [Proc. NAtl. Acad. Sci. USA, 87 권, 4645-4649 (1990)] 등이 사용된다. 바실러스균으로는, 예를 들어 바실러스·서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) MI114 [Gene, 24 권, 255 (1983)], 207-21 [Journal of Biochemistry, 95 권, 87 (1984)] 등이 사용된다. 효모로는, 예를 들어 맥주 효모균 (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, 스키조사카로마이세스 품베 (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036, 퍼키아 파스토리스 (*Pichia Pastoris*) 등이 사용된다.

<68>

*곤충 세포로는, 예를 들어 바이러스가 AcNPV 인 경우에는, 밤도독나방의 유충 유래 주화 세포 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf 세포), *Trichoplusia ni* 의 중장 유래의 MG1 세포, *Trichoplusia ni* 의 난(卵) 유래의 High FiveTM 세포, *Mamestrabrevis* 유래의 세포 또는 *Estigmene acrea* 유래의 세포 등이 사용된다. 바이러스가 BmNPV 인 경우에는, 누에 유래 주화 세포 (*Bombyx mori* N; BmN 세포) 등이 사용된다. 그 Sf 세포로는, 예를 들어 Sf9 세포 (ATCC CRL1711), Sf21 세포 (이상, Vaughn, J. L. 등, In Vivo, 13, 213-217, (1977)) 등이 사용된다. 곤충으로는, 예를 들어 누에의 유충 등이 사용된다 [마에다 외, Nature, 315 권, 592 (1985)]. 동물 세포로는, 예를 들어 원숭이 세포 COS-7, Vero, 차이니즈 햄스터 세포 CHO (이하, CHO 세포로 약기), dhfr 유전자 결손 차이니즈 햄스터 세포 CHO (이하, CHO(dhfr⁻) 세포로 약기), 마우스 L 세포, 마우스 AtT-20, 마우스 미엘로마 세포, 래트 GH3, 인간 FL 세포 등이 사용된다.

<69>

이케리치아속균을 형질 전환하기 위해서는, 예를 들어 [Proc. NAtl. Acad. Sci. USA, 69 권, 2110 (1972)] 또는 [Gene, 17 권, 107 (1982)] 등에 기재된 방법에 따라서 실시할 수 있다. 바실러스균을 형질 전환하기 위해서는, 예를 들어 [Molecular & General Genetics, 168 권, 111 (1979)] 등에 기재된 방법에 따라서 실시할 수 있다. 효모를 형질 전환하기 위해서는, 예를 들어 [Methods in Enzymology, 194 권, 182-187 (1991)], [Proc. NAtl. Acad. Sci. USA, 75 권, 1929 (1978)] 등에 기재된 방법에 따라서 실시할 수 있다. 곤충 세포 또는 곤충을 형질 전환하기 위해서는, 예를 들어 바이오/테크놀로지 (Bio/Technology), 6 권, 47-55 (1988) 등에 기재된 방법에 따라서 실시할 수 있다. 동물 세포를 형질 전환하기 위해서는, 예를 들어 [세포공학 별책 8 신세포 공학 실험 프로토콜, 263-267 (1995) (Shujunsha 발행)], [Virology, 52 권, 456 (1973)]에 기재된 방법에 따라서 실시할 수 있다. 이렇게 해서, 본 발명의 단백질을 인코딩하는 DNA 를 함유하는 발현 벡터에서 형질 전환된 형질 전환체가 얻어진다. 숙주가 이케리치아속균 또는 바실러스균인 형질 전환체를 배양할 때, 배양에 사용되는 배지로는 액체 배지가 적당하고, 그 중에는 그 형질 전환체의 생육에 필요한 탄소원, 질소원, 무기물 기타가 함유된다. 탄소원으로는, 예를 들어 글루코스, 텍스트린, 가용성 전분, 수크로오스 등, 질소원으로는, 예를 들어 암모늄염류, 질산염류, 콘스티프·리커, 펩톤, 카세인, 고기 추출물, 소이빈 밀 (Soybean meal), 감자 추출액 등의 무기 또는 유기 물질, 무기 물로는, 예를 들어 염화칼슘, 인산2수소나트륨, 염화마그네슘 등을 들 수 있다. 또한, 효모 엑기스, 비타민류, 성장 촉진 인자 등을 첨가해도 된다. 배지의 pH 는 약 5~8 이 바람직하다.

<70>

이케리치아속균을 배양할 때의 배지로는, 예를 들어 글루코스, 카사미노산(casamino acids) 을 함유하는 M9 배지 [밀러 (Miller), Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, NewYork, 1972] 가 바람직하다. 여기에 필요에 따라 프로모터를 효율적으로 기능시키기 위해서, 예를 들어 3 β -인돌릴아크릴산과 같은 약제를 첨가할 수 있다. 숙주가 이케리치아속균인 경우, 배양은 통상 약 15~43°C에서 약 3~24 시간 실시하고, 필요에 따라 통기나 교반을 추가할 수도 있다. 숙주가 바실러스균인 경우, 배양은 통상 약 30~40°C에서 6~24 시간 실시하고, 필요에 따라 통기나 교반을 추가할 수도 있다. 숙주가 효모인 형질 전환체를 배양할 때, 배지로는, 예를 들어 버크홀더 (Burkholder) 최소 배지 [Bostian, K.L. 외, Proc. NAtl. Acad. Sci. USA, 77 권, 4505 (1980)] 나 0.5% 카사미노산을 함유하는 SD 배지 [Bitter, G. A. 외, Proc. NAtl. Acad. Sci. USA, 81 권, 5330 (1984)] 를 들 수 있다. 배지의 pH 는 약 5~8 로 조정하는 것이 바람직하다. 배양은 통상 약 20°C~35°C에서 약 24~72 시간 실시하고, 필요에 따라 통기나 교반을 추가한다.

<71>

숙주가 곤충 세포 또는 곤충인 형질 전환체를 배양할 때, 배지로는, Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., Nature, 195 권, 788 (1962))에 비동화한 10% 소혈청 등의 첨가물을 적절히 첨가한 것 등이 사용된다. 배지의 pH 는 약 6.2~6.4 로 조정하는 것이 바람직하다. 배양은 통상 약 27°C에서 약 3~5 일간 실시하고, 필요에 따라 통기나 교반을 추가한다. 숙주가 동물 세포인 형질 전환체를 배양할 때, 배지로는, 예를 들어 약 5~20% 의 테아 소혈청을 함유하는 MEM 배지 [Science, 122 권, 501 (1952)], DMEM 배지 [Virology, 8 권,

396 (1959)], RPMI 1640 배지 [The Journal of the American Medical Association, 199 권, 519 (1967)], 199 배지 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73 권, 1 (1950)] 등이 사용된다. pH 는 약 6~8 인 것이 바람직하다. 배양은 통상 약 30°C~40°C 에서 약 15~60 시간 실시하고, 필요에 따라 통기나 교반을 추가한다. 이상과 같이 하여, 형질 전환체의 세포 내, 세포막 또는 세포 외에 본 발명의 단백질을 생성시킬 수 있다.

<72>

상기 배양물로부터 본 발명의 단백질을 분리 정제하기 위해서는, 예를 들어 하기 방법에 의해 실시할 수 있다.

본 발명의 단백질을 배양균체 또는 세포로부터 추출함에 있어서는, 배양 후, 공지된 방법으로 균체 또는 세포를 모으고, 이것을 적당한 완충액에 혼탁하여, 초음파, 리소자임 및/또는 동결 용해 등에 의해서 균체 또는 세포를 파괴한 후, 원심분리나 여과에 의해 단백질의 조(粗)추출액을 얻는 방법 등이 적절히 사용된다. 완충액 중에 우레아나 염산구아닌 등의 단백질 변성제나, Triton X-100™ 등의 계면활성제가 함유될 수 있다.

배양액 중에 단백질이 분비되는 경우에는, 배양 종료 후, 공지된 방법으로 균체 또는 세포와 배양 상등액을 분리하고, 배양 상등액을 모은다. 이렇게 해서 얻어진 추출액 또는 배양 상등액 중에 함유되는 단백질의 정제는, 공지된 분리·정제 방법을 적절히 조합하여 실시할 수 있다. 이를 공지된 분리, 정제 방법으로는, 염석이나 용매 침전법 등의 용해도를 이용하는 방법; 투석법, 한와 여과법, 겔 여과법, 및 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기 영동법 등의 주로 분자량의 차를 이용하는 방법; 이온 교환 크로마토그래피 등의 하전의 차를 이용하는 방법; 친화성-크로마토그래피 등의 특이적 친화성을 이용하는 방법; 역상 고속 액체 크로마토그래피 등의 소수성의 차를 이용하는 방법; 등전점 전기 영동법 등의 등전점의 차를 이용하는 방법 등이 사용된다.

<73>

이렇게 해서 얻어지는 단백질이 유리체로 얻어진 경우에는, 공지된 방법 또는 유사한 방법에 의해 염으로 변환할 수 있고, 반대로 염으로 얻어진 경우에는 공지된 방법 또는 유사한 방법에 의해, 유리체 또는 다른 염으로 변환할 수 있다. 또, 형질 전환체가 생성하는 단백질을, 정제 전 또는 정제 후에 적당한 단백질 수식 효소를 작용시킴으로써 임의로 수식을 가하거나, 폴리펩티드를 부분적으로 제거하거나 할 수도 있다. 단백질 수식 효소로는, 예를 들어 트립신, 키모트립신, 아르기닐엔도펩티다아제, 프로틴 키나아제, 글리코시다아제 등이 사용된다.

<74>

Otx2 단백질을 발현시키거나, 또는 Otx2 단백질의 발현량을 증가시킴으로써 망막 시각세포로의 분화 유도를 야기할 수 있다. 구체적으로는, 예를 들어 안구 조직 유래 세포, 배아 줄기 세포, 신경 줄기 세포 또는 신경 전구 세포에 있어서, Otx2 단백질을 발현시키거나 또는 Otx2 단백질의 발현량을 상승시키는 것에 의해, 상기 세포를 망막 시각세포로 분화 유도할 수 있다. 상기 이유 때문에, (a) Otx2 단백질 또는 그 부분 펩티드 또는 그들의 염, 또는 (b) Otx2 단백질 또는 그 부분 펩티드를 인코딩하는 DNA 또는 RNA 는 망막 시각세포로의 분화 유도제로서 사용할 수 있다.

<75>

상기 "망막 시각세포로의 분화 유도"는, 생체 내에서 일어날 수도 있고, 생체 외에서 일어날 수도 있다. 즉, 본 발명에 관련된 망막 시각세포로의 분화 유도제를 생체에 투여하여, 생체 내에서 망막 시각세포로의 분화 유도를 야기시켜도 된다. 다른 방법으로는, 생체 외에서 예를 들어 안구 조직 유래 세포, 배아 줄기 세포, 신경 줄기 세포 또는 신경 전구 세포에 대하여 본 발명에 관련된 망막 시각세포로의 분화 유도제를 적용하여, 상기 세포를 망막 시각세포로 분화 유도시킬 수 있다. 보다 구체적으로는, 안구 조직 유래 세포, 배아 줄기 세포, 신경 줄기 세포 또는 신경 전구 세포에 본 발명의 DNA 등을 도입하고, 얻어진 세포를 배양함으로써 상기 세포를 망막 시각세포로 분화 유도할 수 있다. 본 발명의 DNA 등을 도입할 때에, 다른 유전자도 함께 도입될 수 있다. 다른 유전자로는, 예를 들어 망막 특이적 호메오 유전자 (homeo gene) 등을 들 수 있다. 망막 특이적 호메오 유전자로는, 발생 과정에서 눈(眼)의 영역에서의 특이적인 발현 양식을 갖고, 또한 영역 특이적인 형태 형성을 제어하는 유전자, 분화 형질의 발현에 관여하는 유전자를 들 수 있다. 구체적인 예로는, Crx, Chx10, Pax6, 및 Rax 가 포함된다.

<76>

상기 「안구 조직」으로는, 눈 배(胚)내 충조직 등을 바람직한 예로서 들 수 있다. 또한, 이러한 조직은, 성체 유래이거나, 태생기의 개체 유래이어도 된다. 「안구 조직 유래 세포」로는, 예를 들어 태아 신경망막, 모양체 색소 상피 세포 등의 모양체 세포 또는 망막 색소 상피 세포, 모양체 상피 세포, 홍채 세포를 포함한다.

<77>

상기 안구 조직 유래 세포는, 예를 들어 적절한 수단으로 적출한 조직을, 디스파아제(Dispase) 또는 EDTA 등으로 처리하고, 이어서 트립신 처리하여 단일 세포까지 분리하여, 다시 적절한 배지에서 컨플루언트될 때까지 배양하고, 얻어진 세포를 트립신 처리 및 콜라겐나아제 처리함으로써 채취할 수 있다. 여기서, 세포의 채취에 있어서, 배양하는 경우, 염기성 섬유아세포 증식 인자를 함유한 배지, 표피 세포 성장 인자를 함유한 배지, ILF

(백혈구 유주 저지 인자) 를 함유한 배지 등의 배지를 사용할 수 있다. 상기 염기성 섬유아세포 증식 인자 (bFGF) 를 함유한 배지로는, 예를 들어 bFGF 를 함유한 무혈청 배지를 들 수 있고, 보다 구체적으로는, N₂ 보충제를 함유한 DMEM/F12 등을 들 수 있다. 이러한 배지에서의 상기 bFGF 의 함유량은, 약 10ng/ml 이상, 바람직하게는 약 20ng/ml 이상, 보다 바람직하게는 약 40ng/ml 이상인 것이 바람직하다. 또한, N₂ 보충제로는, 인슐린의 약 5 μ g/ml, 트랜스페린의 약 100 μ g/ml, 프로게스터론의 약 20nM, 컨플루언트 하기에 적합한 배지내의 배양세포의 약 100 μ M, 셀렌산나트륨 30nM 정도를 들 수 있다. 또, 배양에 있어서의 온도, 산소 농도, 이산화탄소 농도 등의 조건은, 세포에 따라서 적절히 설정할 수 있다.

<78> 신경 줄기 세포 또는 신경 전구 세포는, 안구 조직 유래 세포 유래될 수 있고, 배아 줄기 세포 유래될 수 있고, 다른 세포나 조직 유래될 수 있다. 구체적으로는, 태아 망막 유래 신경 줄기 세포, 성체 모양체 유래 망막 줄기 세포, 홍채 유래 망막 줄기 세포, 뇌 유래 신경 줄기 세포, 망막 전구 세포, 홍채 유래 신경 전구 세포가 포함된다.

<79> 안구 조직 유래 세포 또는 배아 줄기 세포 또는 다른 세포나 조직으로부터 신경 줄기 세포나 신경 전구 세포를 유도하는 방법은, 공지된 방법에 따르면 된다. 예를 들어 배아 줄기 세포로부터, 신경 줄기 세포 또는 신경 전구 세포로 유도하는 방법으로는, 예를 들어 가와사키, 사사이 등의 문헌 [Kawasaki, H., Sasai Y., Neuron., 2000 Oct; 28(1): 31-40] 등에 기재된 방법을 포함한다. 또, 배아 줄기 세포의 배양, 유지 등의 조건은, 예를 들어 「분자 생물학 프로토콜」 (난꼬도우 발행) 등을 참조할 수 있다. 상기 신경 줄기 세포 또는 신경 전구 세포는 이것을 함유하는 신경 구(neural sphere)로서 얻어지는 경우가 있고, 본 발명에 있어서는, 이러한 신경 구를 하기의 과정을 시킨다.

<80> 안구 조직 유래 세포, 배아 줄기 세포, 신경 줄기 세포 또는 신경 전구 세포, 바람직하게는 상기 신경 줄기 세포 또는 신경 전구 세포에, 본 발명의 DNA 등 및 원한다면 다른 유전자를 도입하는 방법으로는 특별히 한정되지 않고, 공지된 방법을 사용하면 되지만, 예를 들어 아데노바이러스 벡터를 사용하는 유전자 도입 방법, 레트로바이러스 벡터를 사용하는 유전자 도입 방법, 아데노 수반 바이러스를 사용하는 유전자 도입 방법, 리포택션, 일렉트로포레이션 등을 들 수 있다. 도입 효율의 관점에서, 바람직하게는 아데노바이러스 벡터를 사용하는 유전자 도입 방법 및 레트로바이러스 벡터를 사용하는 유전자 도입 방법이 바람직하다.

<81> 유전자 도입된 세포를 망막 시각세포로의 분화에 적합한 분화 유도 조건하에 배양한다. 분화 유도 조건으로는, 유전자 도입된 세포의 종류 등에 따라 다르기 때문에 일률적으로는 말할 수 없고, 적절히 선택할 수 있다. 예를 들어 상기 분화 유도 조건으로는, 레티노산 (retinoic acid) 과 혈청의 존재하에서의 배양 등을 들 수 있다. 여기서, 배양에 사용될 수 있는 배지로는, 상기 서술한 N₂ 보충제를 함유한 DMEM/F12 배지 등을 들 수 있다. 상기 레티노산의 사용량은, 약 0.1 μ M 이상이고, 바람직하게는, 약 0.5 μ M 이상인 것이 바람직하고, 약 10 μ M 이하이고, 바람직하게는, 약 5 μ M 이하인 것이 바람직하다. 또한, 상기 혈청의 사용량은, 분화 유도시에는 약 1% 정도인 것이 바람직하다. 그리고, 배양시의 온도, 산소 농도, 이산화탄소 농도 등의 조건은, 유전자 도입된 세포에 따라서 적절히 설정할 수 있다.

<82> 이상과 같은 본 발명의 분화 유도 방법에 의해 얻어진 망막 시각세포는, 예를 들어 망막 색소 변성, 가령 황반변성, 망막 박리, 녹내장 또는 망막 혈관 폐색증 등의 망막 변성 질환 환자에 대한 이식용 세포로서 응용할 수 있다. 또한, 상기 이식용 세포로는, 망막 시각세포로 완전히 분화되어 있는 것뿐만 아니라, 망막 시각세포로 분화되기 전의 전구 세포여도 된다.

<83> Otx2 단백질 또는 그 부분 펩티드 또는 그들의 염, 또는 Otx2 단백질 또는 그 부분 펩티드를 인코딩하는 DNA 또는 RNA 는 망막 질환의 예방, 치료 또는 진행 억제제 등의 의약으로서 사용할 수 있다. 상기 「망막 질환」으로는, 당뇨병, 고혈압증, 동맥 경화증, 빈혈증, 백혈병, 전신성 홍반성 낭창 (systemic lupus erythematosus) 이나 공피증 (scleroderma) 등의 결합 조직 질환, 및 테이-삭스 (Tay-Sacks) 병이나 보크트슈필마이야 (Vogt-Spielmeyer) 병 등의 선천 대사 이상 등과 같은, 전신 질환에 기인하는 망막의 혈관 장애나 염증성 및 변성 병변, 및 미숙아 망막증, 망막 정맥 폐색증, 망막 동맥 폐색증, 망막 정맥 주위염 (retinal periphlebitis) 등의 망막 혈관 장애, 망막 박리나 외상에 유래하는 망막의 염증이나 변성, 노인성 원반형 황반변성증 등의 가령에 수반되는 망막의 변성 질환, 및 선천적인 망막 변성 질환 등과 같은, 망막 국소의 질환 등을 들 수 있다. 특히, 본 발명에 관련된 망막 질환의 예방, 치료 또는 진행 억제제는, 선천적인 망막 변성 질환, 망막 색소 변성, 황반 변성, 당뇨병성 망막증, 망막 박리, 녹내장 또는 망막 혈관 폐색증 등에 특히 유효하게 사용할 수 있다.

- <84> 본 발명의 단백질을 상기 망막 질환의 예방·치료·진행 억제제로서 사용하는 경우에는, 통상적인 수단에 따라서 제제화할 수 있다. 한편, 본 발명의 DNA 등을 상기 망막 질환의 예방·치료·진행 억제제로서 사용하는 경우에는, 본 발명의 DNA 등을 단독 또는 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 렌치바이러스 벡터 또는 아데노바이러스 연관 바이러스 벡터 등의 적당한 벡터에 삽입한 후, 통상적인 수단에 따라서 제제화할 수 있다. 본 발명의 DNA 등은, 그대로 또는 섭취 촉진을 위한 보조제와 함께, 유전자 총(gun)이나 하이드로겔 카테터와 같은 카테터에 의해 투여할 수도 있다.
- <85> 예를 들어 본 발명의 단백질 또는 본 발명의 DNA 등은, 필요에 따라 당으로 코팅된 정제, 캡슐제, 엘리실제, 마이크로캡슐제 등으로서 경구적으로 투여할 수도 있고, 또는 물 또는 그 이외의 약학적으로 허용될 수 있는 액과의 무균성 용액 또는 혼탁액제 등과 같은 주사제 형태로 비경구적으로 투여할 수도 있다. 본 발명의 제제는, 예를 들어 본 발명의 단백질 또는 본 발명의 DNA 등을 생리학적으로 인정되는 공지된 담체, 향미제, 부형제, 운반체, 방부제, 안정제 또는 결합제 등과 함께 혼합함으로써 제조할 수 있다.
- <86> 정제, 캡슐제 등에 있어서 혼합할 수 있는 첨가제로는, 예를 들어 젤라틴, 옥수수 전분, 트라간트, 아라비아 고무와 같은 결합제; 결정성 셀룰로오스와 같은 부형제; 옥수수 전분, 젤라틴, 알긴산과 같은 팽화제; 스테아르산 마그네슘과 같은 윤활제; 수크로오스, 락토오스 또는 사카린과 같은 감미제; 페퍼민트, 아카모노유 또는 체리와 같은 향미제 등을 들 수 있다. 캡슐제의 경우에는, 추가로 유지와 같은 액상 담체를 함유할 수 있다. 주사를 위한 무균 조성물은 주사용 수성액 또는 유성액에 유효 성분을 용해 또는 혼탁시키는 등의 통상적인 제제 실시에 따라서 처방할 수 있다. 주사용 수성액으로는, 예를 들어 생리식염수, 포도당이나 그 밖의 보조약을 함유하는 등장액 (예를 들어 D-소르비톨, D-만니톨, 염화나트륨 등) 등이 사용되고, 적당한 용해 보조제, 예를 들어 알코올 (예, 에탄올), 폴리알코올 (예, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜), 비이온성 계면활성제 (예, Polysorbate 80TM (상표) HCO-50) 등을 병용해도 된다. 유성액으로는, 예를 들어 참기름, 대두유 등이 사용되고, 용해 보조제인 벤조산벤질, 벤질알코올 등을 병용해도 된다. 또, 상기 무균 조성물에는, 예를 들어 완충제 (예를 들어 인산염 완충액, 아세트산나트륨 완충액), 무통화제 (예를 들어 염화벤잘코늄, 염산프로카인 등), 안정제 (예를 들어 인간 혈청 알부민, 폴리에틸렌글리콜 등), 보존제 (예를 들어 벤질알코올, 페놀 등), 산화 방지제 등이 배합될 수 있다. 조제된 무균 조성물은 통상, 적당한 앰플에 충전되어 주사제로서 공급된다.
- <87> 이렇게 해서 얻어지는 제제는 안전하고 저독성이기 때문에, 예를 들어 포유 동물 (예를 들어 인간, 래트, 마우스, 토끼, 양, 돼지, 소, 고양이, 개, 원숭이 등)에 대하여 투여할 수 있다. 본 발명의 단백질 또는 본 발명의 DNA 등의 투여량은, 투여 대상, 대상 장기, 증상, 투여 방법 등에 따라 다르기 때문에 일률적으로는 말할 수 없지만, 비경구 투여의 경우, 하루에 약 0.01~10mg/kg 이고, 바람직하게는 약 0.05~5mg/kg 이다.
- <88> 본 발명에 관련된 망막 질환의 예방·치료·진행 억제제는, 눈에 국소적으로 투여하는 것이 바람직하다. 이러한 눈 국소 투여용 제제의 제형으로는, 예를 들어 점안제, 안연고제, 산제, 파림제, 정제, 캡슐제, 및 주사제를 포함하고, 특히 점안제 (예를 들어 수성 점안제, 수성 혼탁 점안제, 비수성 점안제 또는 비수성 혼탁 점안제 등), 안연고제 및 주사제의 형태인 것이 바람직하다. 이러한 제제는, 통상적인 방법에 따라서 조제할 수 있다.
- <89> 점안제의 조제에 있어서 사용되는 수성의 용액제 또는 혼탁제용 희석제로는, 중류수, 생리식염수 등을 들 수 있다. 또한, 비수성의 용액제 또는 혼탁제용 희석제로는, 식물유, 유동 파라핀, 광물유, 프로필렌글리콜, p-옥틸도데칸을 등을 들 수 있다. 그리고, 본 발명의 점안제에는, 통상 점안제에 배합될 수 있는 완충제, 등장화제, 보존제, 증점제, 안정화제, 항산화제, pH 조정제 또는 퀼레이트제 등의 각종 첨가제를 적절히 배합할 수 있다. 점안제는 무균 조작법에 의해 실시하거나, 또는 적당한 단계에서 멸균 처리를 실시함으로써 조제된다.
- <90> 상기 완충제는, pH 를 예를 들어 약 5.0~8.0 정도로 일정하게 유지하는 것을 목적으로 하여 첨가되고, 예를 들어 붕산염 완충액, 시트르산염 완충액, 타르타르산염 완충액, 인산염 완충액, 아세테이트 완충액 등이 사용된다. 이들 완충제의 첨가량은, 당해 완충제의 첨가 목적, 즉 pH 를 예를 들어 상기의 범위로 일정하게 유지할 수 있는 범위에서 첨가된다. 상기 등장화제는 누액과 등장으로 하는 것을 목적으로 하여 첨가되고, 예를 들어 포도당, 만니톨, 소르비톨 등의 당류; 글리세린, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 등의 다가 알코올류; 염화나트륨, 시트르산나트륨 등의 염류 등을 들 수 있다. 이들 등장화제의 첨가량은, 점안제의 삼투압이 누액과 동일해지는 양으로 첨가된다. 또 상기 보존제로는, 예를 들어 염화벤잘코늄, 파라벤류, 클로로부탄올 등이 사용된다. 상기 증점제로는, 예를 들어 글리세린, 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시비닐 폴리

며 등을 들 수 있고, 상기 안정화제로는, 예를 들어 아황산나트륨, 프로필렌글리콜 등을 들 수 있으며, 상기 항산화제로는, 예를 들어 아스코르브산, 아스코르브산나트륨, 토코페롤, 티오휙산나트륨 등을 들 수 있고, 상기 pH 조정제로는, 예를 들어 염산, 시트르산, 인산, 아세트산, 타르타르산, 수산화나트륨, 수산화칼륨, 탄산나트륨, 탄산수소나트륨 등을 들 수 있어, 상기 킬레이트제로는, 예를 들어 에데트산(edetic acid)나트륨, 시트르산나트륨 등을 들 수 있다. 또한, 상기 점안제는, 사용시에 주사용 중류수 등으로 용해하여 사용되는 형태로 동결 건조시킬 수 있다.

<91> 안연고는, 통상 사용되는 안연고용 기제 중에 유효 성분을 혼합하고, 통상적인 방법에 따라서 제제화함으로써 멀균 조건하에서 조제할 수 있다. 안연고용의 기제로는, 바셀린, 셀렌 50, 플라스틱 베이스, 마크로꼴(Macrogol)을 포함하고, 또한 친수성을 높이는 것을 목적으로 하여 계면활성제가 첨가될 수 있다. 또한, 안연고에 관해서도 필요에 따라 상기한 예를 들어 보존제 등의 첨가제가 배합될 수도 있다.

<92> 또, 눈국소 투여용 제제는, 눈 안에서 Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드, 또는 그들을 인코딩하는 DNA 등의 방출을 제어할 수 있는 방출 제어 물질과 함께 서방성 제제, DDS(약물 전달(Drug delivery)) 제제, 안내 매립형 제제로 제형될 수 있다. 그 방출 제어 물질로는, 폴리- α -시아노아크릴산에스테르, 폴리아미노산(예, 폴리- γ -벤질-L-글루타민산 등), 무수말레산계 공중합체(예, 스티렌-말레산 공중합체 등) 등의 생분해성 고분자 물질뿐 아니라 자체 공지된 예를 들어 α -히드록시카르복시산(예, 글리콜산, 락트산, 히드록시부티르산 등), 히드록시디카르복실산(예, 말산 등), 히드록시트리카르복시산(예, 시트르산 등) 등의 1종 이상에서 무촉매 탈수 중축합에 의해 합성된 중합체, 공중합체 또는 이들의 혼합물을 포함한다.

<93> 본 발명의 눈 국소 투여용 제제의 투여량 및 투여 회수는, 투여 대상, 증상, 투여 형태, 처치 기간 등에 따라 다르기 때문에 일률적으로는 말할 수 없지만, 통상, 점안제의 경우, 본 발명의 단백질 등 또는 본 발명의 DNA 등을 0.001~10.0w/v%, 바람직하게는 0.01~1.0w/v% 함유하는 제제를, 성인에 대하여 하루 한쪽 눈 당 수회, 바람직하게는 1~6회, 1회 여러 방울, 바람직하게는 1~4방울 투여할 수 있다. 또한, 안연고제의 경우, 본 발명의 단백질 등 또는 본 발명의 DNA 등을 0.001~10.0w/v%, 바람직하게는 0.01~1.0w/v% 함유하는 제제를, 성인에 대하여 하루 수회, 바람직하게는 1~6회 도포할 수 있다.

<94> 본 발명에 있어서는, 피검액 중의 Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드 또는 그들의 염(이하, 본 발명의 단백질 등으로 약기하는 경우가 있다)을 검출하거나, 또는 그 양을 측정함으로써 망막 질환을 진단할 수 있다. 예를 들어 본 발명의 단백질 등의 농도 감소가 검출된 경우에는, 예를 들어 망막 질환을 앓고 있을 가능성이 높거나 또는 장래에 그럴 가능성이 높다고 진단할 수 있다. Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드 또는 이들의 염에 대한 항체(이하, 본 발명의 항체로 약칭하는 경우가 있다)는, 본 발명의 단백질 등을 특이적으로 인식할 수 있기 때문에, 피검액 중의 본 발명의 단백질 등의 검출 및 정량 등에 사용할 수 있다. 요컨대, 본 발명의 항체는 망막 질환의 진단제로서 사용할 수 있다. 상기 진단제에 있어서는, 항체 분자 그 자체를 사용해도 되고, 항체 분자의 $F(ab'), Fab' , 또는 Fab 분획을 사용해도 된다. 또, 피검액 중의 본 발명의 단백질 등은, 조직 염색 등에 의해서도 검출할 수 있다.$

<95> 본 발명의 항체는, 본 발명의 단백질 등을 인식할 수 있는 항체이면, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 중 임의의 것이 될 수 있다. 본 발명의 항체는, 본 발명의 단백질 등을 항원으로서 사용하고, 공지된 항체 또는 항혈청의 제조 방법에 따라서 제조할 수 있다.

<96> 본 발명의 단백질 등에 대한 모노클로날 항체의 제작 방법의 일례를 이하에 말한다.

<97> (i) 우선, 모노클로날 항체 생성 세포의 제작에 관해서 서술한다. 본 발명의 단백질 등은, 포유 동물에 대하여 투여에 의해 항체 생성이 가능한 부위에 그 자체 또는 담체, 희석제와 동시에 투여된다. 투여에 있어서 항체 생성능을 높이기 위해, 완전 프로인트 아쥬반트(Freund's adjuvant)나 불완전 프로인트 아쥬반트를 투여해도 된다. 투여는 통상 2~6주마다 1회씩, 합계 2~10회 정도 실시된다. 사용되는 포유 동물로는, 예를 들어 원숭이, 토끼, 개, 기니피그, 마우스, 래트, 양 또는 염소를 들 수 있지만, 마우스 또는 래트가 바람직하게 사용된다. 모노클로날 항체 생성 세포의 제작에 있어서는, 항원을 면역된 온혈 동물, 예를 들어 마우스로부터 항체가 인정된 개체를 선택하여 최종 면역의 2~5일 후에 비장(脾臟) 또는 림프절을 채취하고 거기에 함유되는 항체 생성 세포를 골수종 세포와 융합시킴으로써, 모노클로날 항체 생성 하이브리도마를 조제할 수 있다. 항혈청 중의 항체는, 예를 들어 후기하는 표지화 단백질 등과 항혈청을 반응시킨 후, 항체에 결합한 표지제의 활성을 측정함으로써 측정할 수 있다. 융합 조작은 기지 방법, 예를 들어 케일러와 밀스타인의 방법(Nature, 26권, 495페이지(1975년))에 따라서 실시할 수 있다. 융합 촉진제로는, 예를 들어 폴리에틸렌글리콜(PEG)이나 센다이(Sendi) 바이러스를 포함하지만, 바람직하게는 PEG이 사용된다. 골수종 세

포로는, 예를 들어 NS-1, P3U1, SP2/0 을 포함하고, P3U1 이 바람직하게 사용된다. 사용되는 항체 생성 세포 (비장 세포) 수와 골수종 세포수의 바람직한 비율은 1:1~20:1 정도이고, PEG (바람직하게는, PEG 1000~PEG 6000) 가 10~80% 정도의 농도로 첨가되고, 약 20~40°C, 바람직하게는 약 30~37°C 에서 약 1~10 분간 인큐베이트함으로써 효율적으로 세포 융합을 제작할 수 있다.

<98> 모노클로날 항체 생성 하이브리도마의 스크리닝에는 각종 방법을 사용할 수 있지만, 예를 들어 (a) 본 발명의 단백질 등의 항원을 직접 또는 담체와 동시에 흡착시킨 고상 (예, 마이크로플레이트)에 하이브리도마 배양 상등액을 첨가하고, 다음으로 방사성 물질이나 효소 등으로 표지한 항(抗)면역 글로불린 항체 (세포 융합에 사용되는 세포가 마우스인 경우, 항마우스 면역 글로불린 항체가 사용된다) 또는 단백질 A 를 첨가하여, 고상에 결합한 모노클로날 항체를 검출하는 방법, (b) 항면역 글로불린 항체 또는 단백질 A 를 흡착시킨 고상에 하이브리도마 배양 상등액을 첨가하고, 방사성 물질이나 효소 등으로 표지한 본 발명의 단백질 등을 첨가하여, 고상에 결합한 모노클로날 항체를 검출하는 방법을 포함한다. 모노클로날 항체의 선별은, 공지 또는 유사한 방법에 따라서 실시할 수 있지만, 통상은 HAT (히포크산틴, 아미노프테린, 티미딘) 를 첨가한 동물 세포용 배지 등에서 실시할 수 있다. 선별 및 육종용 배지로는, 하이브리도마가 생육될 수 있는 것이면 어떠한 배지를 사용해도 된다. 예를 들어 약 1~20%, 바람직하게는 약 10~20% 의 소태아 혈청을 함유하는 RPMI 1640 배지, 약 1~10% 의 소태아 혈청을 함유하는 GIT 배지 (와코준야쿠공업주식회사 제조) 또는 하이브리도마 배양용 무혈청 배지 (SFM-101, 닉스이제약주식회사 제조) 등을 사용할 수 있다. 배양 온도는, 통상 20~40°C 정도, 바람직하게는 약 37°C 이다. 배양 시간은, 통상 약 5 일~3 주, 바람직하게는 약 1 주~2 주이다. 배양은, 통상 5% 탄산 가스하에서 실시할 수 있다. 하이브리도마 배양 상등액의 항체는, 상기한 항혈청 중의 항체의 측정과 동일한 방법으로 측정할 수 있다.

<99> (ii) 이어서, 모노클로날 항체를 분리 정제한다. 모노클로날 항체의 분리 정제는, 통상적인 폴리클로날 항체의 분리 정제와 동일하게 면역 글로불린의 분리 정제 방법 [예, 염석법, 알코올 침전법, 등전점 침전법, 전기 영동법, 이온 교환체 (예, DEAE) 에 의한 흡탈착법, 초원심법, 젤 여과법, 항원 결합 고상 또는 단백질 A 또는 단백질 G 등의 활성 흡착제에 의해 항체만을 채취하여, 결합을 해리시켜서 항체를 얻는 특이적 정제법]에 따라서 실시할 수 있다.

<100> 본 발명의 단백질 등에 대한 폴리클로날 항체 (이하, 「본 발명의 폴리클로날 항체」로 약칭하는 경우가 있다.) 의 제작 방법의 일례를 이하에 서술한다.

<101> 본 발명의 폴리클로날 항체는, 공지 또는 거기에 준하는 방법에 따라서 제조할 수 있다. 예를 들어 면역 항원 (본 발명의 단백질 등) 과 캐리어 단백질의 복합체를 만들고, 상기한 모노클로날 항체의 제조 방법과 동일하게 포유 동물에 면역을 실시하여, 그 면역 동물로부터 본 발명의 단백질 등에 대한 항체 함유물을 채취하여 항체를 분리 정제함으로써 제조할 수 있다. 포유 동물을 면역하기 위해서 사용되는 면역 항원과 캐리어 단백질의 복합체에 관하여, 캐리어 단백질의 종류 및 캐리어와 핫텐(hapten)의 혼합비는, 캐리어에 가교시켜 면역한 핫텐에 대하여 항체가 양호한 효율로 생성되면 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어 소혈청 일부만, 소 티로글로불린(thyroglobulin), 키홀·린펫·헤모시아닌 등을 중량비로 사용된 핫텐에 대하여 약 0.1~20, 바람직하게는 약 1~5 의 비율로 커플링시키는 방법이 사용된다. 또한, 핫텐과 캐리어의 커플링에는 여러 가지 축합체를 사용할 수 있지만, 글루탈알데히드나 카르보디이미드, 말레이이미드 활성 에스테르 또는 티올기 또는 디티오피리딜기를 함유하는 활성 에스테르 시약 등이 사용된다. 핫텐과 캐리어의 축합 생성물은, 온혈 동물에 대하여 항체 생성이 가능한 부위에 그 자체 또는 담체, 희석제와 함께 투여된다. 투여에 있어서 항체 생성능을 높이기 위해, 완전 프로인트 아쥬반트나 불완전 프로인트 아쥬반트가 투여될 수 있다. 투여는, 통상 약 2~6 주마다 1 회씩, 합계 약 3~10 회 정도 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는, 상기한 방법으로 면역된 포유 동물의 혈액 또는 복수(腹水) 등, 바람직하게는 혈액으로부터 채취할 수 있다. 항혈청 중의 폴리클로날 항체는 항혈청 중의 항체의 측정과 동일한 방법으로 측정할 수 있다. 폴리클로날 항체의 분리 정제는, 상기한 모노클로날 항체의 분리 정제와 동일한 면역 글로불린의 분리 정제 방법에 따라서 실시할 수 있다.

<102> 본 발명의 항체를 사용하여 본 발명의 단백질 등을 정량하는 방법은, 특별히 제한되지 않고, 예를 들어 피검액 중의 항원량 (본 발명의 단백질 등의 양) 에 대응한 항체, 항원 또는 항체-항원 복합체의 양을 화학적 또는 물리적 수단에 의해 검출하고, 검출된 값으로부터 기지량의 항원을 함유하는 표준액을 사용하여 제작한 표준 곡선에 기초하여 피검액 중의 항원량을 산출하는 방법 등을 들 수 있다. 예를 들어 네프로메트리(nephrometry), 경합법, 면역계량법 및 샌드위치법이 바람직하게 사용되지만, 감도 및 특이성의 면에서 후술하는 샌드위치법을 사용하는 것이 특히 바람직하다. 표지 물질을 사용하는 정량 방법에 사용되는 표지제로는, 예를 들어 방사

성 동위 원소, 효소, 형광 물질, 발광 물질 등이 사용된다. 상기 방사성 동위 원소로는, 예를 들어 [¹²⁵I], [¹³¹I], [³H], [¹⁴C] 등이 사용된다. 상기 효소로는, 안정적이고 비(比)활성의 큰 것이 바람직하며, 예를 들어 β -갈락토시다아제, β -글루코시다아제, 알칼리 포스파타제, 페옥시다아제, 말산 탈수소 효소 등이 사용된다. 상기 형광 물질로는, 예를 들어 플루오레스 카민, 플루오레센 이소티오시아네이트 등이 사용된다. 상기 발광 물질로는, 예를 들어 루미놀, 루미놀 유도체, 루시페린, 루시게닌 등이 사용된다. 또, 항체 또는 항원과 표지제의 결합에 비오틴-아비딘계를 사용할 수도 있다.

<103> 상기 서술한 정량 방법에 있어서 항원 또는 항체를 불용화함에 있어서는 물리 흡착을 사용해도 되고, 또한 통상 단백질 또는 효소 등을 불용화·고정화하는 데에 사용되는 화학 결합을 사용해도 된다. 담체로는, 예를 들어 아갈로스, 텍스트란, 셀룰로오스 등의 불용성 다당류; 폴리스티렌, 폴리아크릴아미드, 규소 등의 합성 수지; 또는 유리 등이 사용된다. 샌드위치법에 있어서는 불용화된 본 발명의 모노클로날 항체에 피검액을 반응시키고 (1 차 반응), 또 표지화된 본 발명의 모노클로날 항체를 반응 (2 차 반응) 시킨 후, 불용화 담체 상의 표지제의 활성을 측정함으로써 피검액 중의 본 발명의 단백질량을 정량할 수 있다. 1 차 반응과 2 차 반응은 반대 순서로 실시해도 되고, 또한 동시에 실시해도 된다. 표지화제 및 불용화 방법은 상기와 동일하다. 또한, 샌드위치법에 의한 면역 정량 방법에 있어서, 고상용 항체 또는 표지용 항체에 사용되는 항체는 반드시 1 종류일 필요는 없고, 측정 감도를 향상시키는 등의 목적으로 2 종류 이상의 항체의 혼합물을 사용해도 된다. 샌드위치법에 의한 본 발명의 단백질 등의 정량 방법에 있어서는, 1 차 반응과 2 차 반응에 사용되는 본 발명의 모노클로날 항체는 본 발명의 단백질 등과의 결합 부위가 상이한 항체가 바람직하게 사용된다. 즉, 1 차 반응 및 2 차 반응에 사용되는 항체는, 예를 들어 2 차 반응에서 사용되는 항체가, 본 발명의 단백질 등의 C 단부를 인식하는 경우, 1 차 반응에서 사용되는 항체는, 바람직하게는 C 단부 외에 예를 들어 N 단부를 인식하는 항체가 사용된다.

<104> 본 발명의 모노클로날 항체를 샌드위치법 이외의 정량 방법, 예를 들어 경합법, 면역계량법 또는 네프로메트리 등에 사용할 수도 있다. 경합법에서는, 피검액 중의 항원과 표지 항원을 항체에 대하여 경합적으로 반응시킨 후, 미반응의 표지 항원 (F) 과 항체와 결합한 표지 항원 (B) 을 분리시키고 (B/F 분리), B 또는 F 중 어느 하나의 표지량을 측정하여, 피검액 중의 항원량을 정량한다. 본 방법으로서 구체적으로는, (a) 항체로서 가용성 항체를 사용하고, B/F 분리를 폴리에틸렌글리콜, 상기 항체에 대한 제 2 항체 등을 사용하는 액상법, 및, (b) 제 1 항체로서 고상화 항체를 사용하거나, 또는, 제 1 항체는 가용성의 것을 사용하고 제 2 항체로는 고상화 항체를 사용하는 고상화법 등을 들 수 있다. 면역계량법에서는, 피검액 중의 항원과 고상화 항원을 일정량의 표지화 항체에 대하여 경합 반응시킨 후 고상과 액상을 분리하거나, 또는 피검액 중의 항원과 과량의 표지화 항체를 반응시키고, 다음에 고상화 항원을 첨가하여 미반응의 표지화 항체를 고상에 결합시킨 후, 고상과 액상을 분리한다. 다음으로, 임의의 하나의 상(相)의 표지화 항체량을 측정하여 피검액 중의 항원량을 정량한다. 또한, 네프로메트리에서는, 젤 내 또는 용액 중에서의 항원 항체 반응의 결과, 발생한 불용성 침강물의 양을 측정한다. 피검액 중의 항원량이 미소하고, 소량의 침강물밖에 얻어지지 않은 경우에는 레이저의 산란을 이용하는 레이저-네프로메트리 등이 바람직하게 사용된다.

<105> 이들 개개의 면역학적 정량 방법을 본 발명에 있어서 적용할 때에는, 각각의 방법에서의 통상의 조건에 따라서, 조작법에 당업자의 통상적인 기술적 고려사항을 부가하면 된다. 이들 일반적인 기술 수단의 상세한 내용에 관해서는, 총설, 성서(成書) 등을 참조할 수 있다 [예를 들어 이리에 히로시 편 「Radioimmuno assay」(고단샤, 소화 49년 발행), 이리에 히로시 편 「Radioimmuno assay」(제 2 판) (고단샤, 소화 54년 발행), 이시카와 에이지 외 편 「Enzyme Immunoassay(효소 면역 측정법)」(이가쿠쇼인, 소화 53년 발행), 이시카와 에이지 외 편 「Enzyme Immunoassay(효소 면역 측정법)」(제 2 판) (이가쿠쇼인, 소화 57년 발행), 이시카와 에이지 외 편 「Enzyme Immunoassay(효소 면역 측정법)」(제 3 판) (이가쿠쇼인, 소화 62년 발행), 「Methods in ENZYMOLOGY」 Vol.70 (Immunochemical Techniques (Part A)), 동서 Vol.73 (Immunochemical Techniques (Part B)), 동서 Vol.74 (Immunochemical Techniques (Part C)), 동서 Vol.84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays)), 동서 Vol.92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)), 동서 Vol.121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (이상, 아카데믹프레스사 발행) 등 참조].

<106> 본 발명의 항체는, 본 발명의 단백질 등을 정제하기 위해 사용하는 항체 칼럼의 제작, 정제시의 각 분획 중의 본 발명의 단백질 등의 검출, 피검 세포 내에서의 본 발명의 단백질 거동의 분석 등을 위해 사용할 수도 있다.

<107> 본 발명의 DNA 등, 또는 본 발명의 DNA 등의 뉴클레오티드 서열에 상보적 또는 실질적으로 상보적인 뉴클레오티

드 서열을 함유하는 안티센스·폴리뉴클레오티드는, 프로브로서 사용함으로써, 생체 내, 특히 포유 동물 (예를 들어 인간, 래트, 마우스, 토끼, 양, 돼지, 소, 고양이, 개, 원숭이 등)의 생체 내에서의 본 발명의 단백질 또는 그 부분 웨티드를 인코딩하는 DNA 또는 mRNA의 이상 (유전자 이상)을 검출할 수 있기 때문에, 예를 들어 그 DNA 또는 mRNA의 손상, 돌연 변이 또는 발현 저하 등의 유전자 진단제로서 유용하다. 본 발명의 DNA 등 또는 안티센스·폴리뉴클레오티드를 사용하는 상기한 유전자 진단은, 예를 들어 공지된 노던 하이브리다이제이션이나 PCR-SSCP 법 (Genomics, 제 5 권, 874~879 페이지 (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 제 86 권, 2766~2770 페이지 (1989)) 등에 의해 실시할 수 있다. 예를 들어 노던 하이브리다이제이션에 의해 본 발명의 단백질 또는 그 부분 웨티드를 인코딩하는 mRNA의 발현 저하가 검출된 경우에는, 망막 질환을 앓고 있을 가능성이 높거나 또는 장래에 그럴 가능성이 높은 것으로 진단할 수 있다.

<108>

상기 「안티센스·폴리뉴클레오티드」는, 본 발명의 DNA 등의 뉴클레오티드 서열과 상보적인 뉴클레오티드 서열을 적어도 일부에 갖고, 본 발명의 DNA 등과 하이브리다이즈할 수 있는 폴리뉴클레오티드이면 된다. 때문에, 안티센스·폴리뉴클레오티드는, 본 발명의 DNA 등의 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 함유할 뿐만 아니라, 실질적으로 상보적인 뉴클레오티드 서열을 함유하는 것이어야 된다. 예를 들어 본 발명의 DNA 등과 고도의 엄격한 조건하에서 하이브리다이즈하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 것 등을 들 수 있다. 안티센스·폴리뉴클레오티드는, 2-데옥시-D-리보오스를 함유하고 있는 폴리데옥시뉴클레오티드, D-리보오스를 함유하고 있는 폴리뉴클레오티드, 퓨린 또는 피리미딘 염기의 N-글리코시드를 함유하고 있는 것과 같은 상기 이외의 다른 타입의 폴리뉴클레오티드, 또는 비뉴클레오티드 골격을 갖는 기타 중합체 (예를 들어 시판되는 단백질 핵산 및 합성 서열 특이적인 핵산 중합체) 또는 특수한 결합을 함유하는 기타 중합체 (단, 그 중합체는 DNA나 RNA 중에 발견되는 염기의 페어링이나 염기의 부착을 허용하는 배치를 갖는 뉴클레오티드를 함유한다) 등을 들 수 있다. 이들은, 이중 가닥 DNA, 단일 가닥 DNA, 이중 가닥 RNA, 단일 가닥 RNA, 또 DNA:RNA 하이브리드일 수 있고, 또한 비수식 폴리뉴클레오티드 (또는 비수식 올리고뉴클레오티드) 이거나, 공지된 수식이 부가된 수식 폴리뉴클레오티드 (또는 비수식 올리고뉴클레오티드) 여도 된다. 수식 폴리뉴클레오티드로는, 예를 들어 당해 분야에서 알려진 표지가 있는 것, 캡이 부착된 것, 메틸화된 것, 1개 이상의 천연 뉴클레오티드를 유연(類緣)물로 치환한 것, 분자 내 뉴클레오티드 수식의 것, 비하전 결합 (예를 들어 메틸포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미레이트, 카르바메이트 등)을 갖는 것, 전하를 갖는 결합 또는 황합유 결합 (예를 들어 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)을 갖는 것, 단백질 (뉴클레아제, 뉴클레아제·억제제, 톡신, 항체, 시그널 웨티드, 폴리-L-리신 등)이나 당 (예를 들어 단당류 등) 등의 측쇄기를 가지고 있는 것, 인터커런트 화합물 (예를 들어 아크리딘, 솔라렌(solarene) 등)을 갖는 것, 퀼레이트 화합물 (예를 들어 금속, 방사 활성을 갖는 금속, 봉소, 산화성의 금속 등)을 함유하는 것, 알킬화제를 함유하는 것, 수식된 결합을 갖는 것 (예를 들어 α아노머형의 핵산 등) 등을 들 수 있다. 여기서 「뉴클레오시드」, 「뉴클레오티드」 및 「핵산」은, 퓨린 및 피리미딘 염기를 함유할 뿐만 아니라, 수식된 기타 복소환형 염기를 갖는 것을 함유하고 있어도 된다. 이러한 수식물은, 메틸화된 퓨린 및 피리미딘, 아실화된 퓨린 및 피리미딘, 또는 그 밖의 복소환이 함유될 수 있다. 당을 측쇄기로서 갖는 수식 폴리뉴클레오티드는, 측쇄의 당부분이 추가로 수식되어 있어도 되고, 예를 들어 당의 1개 이상의 수산기가 할로겐 또는 지방족기 등으로 치환되어 있거나, 또는 에테르 또는 아민 등의 작용기로 변환되어 있거나 해도 된다.

<109>

요컨대, 본 발명의 안티센스·폴리뉴클레오티드는, RNA, DNA, 또는 수식된 핵산 (RNA, DNA)이다. 수식된 핵산의 구체예로는 핵산의 황 유도체나 티오포스페이트 유도체, 및 폴리뉴클레오시드아미드나 올리고뉴클레오시드아미드의 분해에 내성을 갖는 것을 들 수 있지만, 거기에 한정되는 것은 아니다.

<110>

Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드의 발현 또는 발현량의 상승을 지표로 하여, 망막 시각세포로의 분화 유도 작용을 갖는 화합물 또는 그 염을 스크리닝될 수 있다. 상기 스크리닝은, 예를 들어 Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드를 발현하는 능력을 갖는 세포를 사용하여 실시할 수 있다.

<111>

구체적으로는, Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드를 발현하는 능력을 갖는 세포를 시험 화합물의 존재하에 배양하고, Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드의 발현을 검출하거나, 또는 그들의 발현량을 측정하는 것을 특징으로 하는, 망막 시각세포로의 분화 유도 작용을 갖는 화합물 또는 그 염의 스크리닝 방법을 들 수 있다. 상기 「Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드를 발현하는 능력을 갖는 세포」로는, 상기 서술한 본 발명의 DNA 등을 갖는 형질 전환 세포를 들 수 있다. 또한, 유전자 재조합 기술에 의하지 않고, 원래 Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드를 발현하는 능력을 갖는 세포여도 된다. 본 발명의 단백질의 발현량은, 배양된 세포로부터 상기 서술한 방법에 의해 본 발명의 단백질을 분리 정제하고, 상기 서술한 본 발명의 단백질의 정량 방법을 사용하여 측정할 수 있다.

- <112> 또한, 본 발명의 스크리닝 방법의 다른 측면의 방법으로, Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드를 발현하는 능력을 갖는 세포를 시험 화합물의 존재하에 배양하고, 본 발명의 단백질을 인코딩하는 DNA 또는 그 상보 DNA 또는 그들의 부분 DNA를 사용하여 Otx2 단백질을 인코딩하는 mRNA (이하, Otx2 mRNA로 약칭하는 경우가 있다.)의 양을 측정하는 것을 특징으로 하는, 망막 시각세포로의 분화 유도 작용을 갖는 화합물 또는 그 염의 스크리닝 방법을 포함한다. 보다 구체적으로는, (a) Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드를 발현하는 능력을 갖는 세포를 배양한 경우의 Otx2 mRNA의 발현량과, (b) Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드를 발현하는 능력을 갖는 세포를 시험 화합물의 존재하에 배양한 경우의 Otx2 mRNA의 양을 비교하는 것을 특징으로 하는, 망막 시각세포로의 분화 유도 작용을 갖는 화합물 또는 그 염의 스크리닝 방법을 제공한다.
- <113> mRNA의 발현량을 비교할 때에 하이브리다이제이션법에 의해 비교하기 위해서는, 공지된 방법 또는 유사한 방법, 예를 들어 [Molecular Cloning 2nd (J. Sambrook 등, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)]에 기재된 방법 등에 따라서 실시할 수 있다. 구체적으로는, Otx2 단백질을 인코딩하는 mRNA 양의 측정은, 공지된 방법에 따라서 세포로부터 추출한 mRNA와 본 발명의 단백질을 인코딩하는 DNA 또는 그 상보 DNA 또는 그들의 부분 DNA를 접촉시키고, 본 발명의 단백질을 인코딩하는 DNA 또는 그 상보 DNA 또는 그들의 부분 DNA에 결합한 mRNA의 양을 측정함으로써 이루어진다. 본 발명의 단백질을 인코딩하는 DNA 또는 그 상보 DNA 또는 그들의 부분 DNA를, 예를 들어 방사성 동위 원소 또는 색소 등으로 표지함으로써, 본 발명의 단백질을 인코딩하는 DNA 또는 그 상보 DNA 또는 그들의 부분 DNA에 결합된 Otx2 mRNA의 양을 용이하게 측정할 수 있다. 방사성 동위 원소로는, 예를 들어 ^{32}P 또는 ^{3}H 등이 사용되고, 색소로는, 예를 들어 플루오로세인(fluorescein), FAM (PE Biosystems사 제조), JOE (PE Biosystems사 제조), TAMRA (PE Biosystems사 제조), ROX (PE Biosystems사 제조), Cy5 (Amersham사 제조) 또는 Cy3 (Amersham사 제조) 등의 형광 색소가 사용된다. 또한, Otx2 mRNA의 양은, 세포로부터 추출한 RNA를 역전사 효소에 의해 cDNA로 변환한 후, 본 발명의 단백질을 인코딩하는 DNA 또는 그 상보 DNA 또는 그들의 부분 DNA를 프라이머로서 사용하는 PCR에 의해서, 증폭되는 cDNA의 양을 측정하는 것에 의해서도 실시할 수 있다.
- <114> Otx2 단백질을 인코딩하는 DNA의 공지 프로모터나 인핸서 영역을 계놈 DNA로부터 클로닝하고, 적당한 리포터 유전자의 상류에 연결시킨 재조합 DNA에서 형질 전환한 세포를 시험 화합물의 존재하에 배양하여, Otx2 단백질의 발현을 대신하여 리포터 유전자의 발현을 검출하는 것을 특징으로 하는, Otx2 단백질을 인코딩하는 DNA의 프로모터 또는 인핸서의 활성을 제어하는 작용을 갖는 화합물 또는 그 염의 스크리닝 방법, 나아가서는 망막 시각세포로의 분화 유도 작용을 갖는 화합물 또는 그 염의 스크리닝 방법을 제공한다. 리포터 유전자로는, 예를 들어 lacZ (β -갈اكتоз다이제 유전자) 등의 염색 마커 유전자 등이 사용된다. 리포터 유전자 산물(예, mRNA, 단백질)의 양을 공지된 방법을 사용하여 측정함으로써, 리포터 유전자 산물의 양을 증가시키는 시험 화합물을 Otx2 유전자의 프로모터 또는 인핸서의 활성을 촉진시키는 작용을 갖는 화합물, 즉 Otx2 단백질 또는 그 부분 웨티드의 발현을 촉진시키는 활성을 갖는 화합물로서 선택할 수 있다.
- <115> 이상 서술한 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서 시험 화합물로는, 예를 들어 웨티드, 단백질, 비웨티드성 화합물, 합성 화합물, 발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액, 동물 조직 추출액 등을 들 수 있고, 이들 화합물은 신규 화합물이어도 되고, 공지된 화합물이어도 된다.
- <116> 본 발명의 스크리닝용 키트에는 상기 스크리닝 방법을 실시하기 위해, 예를 들어 (a) Otx2 단백질, 그 부분 웨티드를 발현하는 능력을 갖는 세포, (b) 본 발명의 단백질을 인코딩하는 DNA 또는 그 상보 DNA 또는 그들의 부분 DNA, 또는 (c) Otx2 단백질을 인코딩하는 DNA의 프로모터 또는 인핸서를 리포터 유전자에게 연결시킨 DNA에서 형질 전환한 세포 등을 함유하는 것이다.
- <117> 본 발명의 스크리닝 방법 또는 스크리닝용 키트를 사용하여 얻어지는 화합물 또는 그 염은, 상기 서술한 망막 질환의 예방, 치료 또는 진행 억제제나, 망막 시각세포로의 분화 유도제 등의 의약으로서 유용하다. 그 화합물 또는 그 염, 그들을 함유하는 망막 질환의 예방, 치료 또는 진행 억제제, 또는 그들을 함유하는 망막 시각세포로의 분화 유도제는, 상기한 본 발명의 단백질 또는 DNA 등과 동일하게 하여 실시할 수 있다.

효과

- <118> 본 발명의 단백질 등 또는 본 발명의 DNA 등은, 예를 들어 망막 색소 변성, 가령 황반 변성, 당뇨병성 망막증, 망막 박리, 녹내장 또는 망막 혈관 폐색증 등 망막 질환의 예방, 치료 또는 진행 억제를 목적으로 하는 의약에 이용할 수 있다. 또, Otx2 유전자의 이상에 의해 망막 시각세포는 구조적 또는 기능적 이상을 초래하기 때문에, Otx2 유전자의 이상 또는 Otx2 단백질의 변성 또는 발현 저하를 검출함으로써 상기 망막 질환의 진단에

이용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<119> 도 1에 나타내는 바와 같이, 마우스의 Otx2 cDNA를 레트로바이러스 벡터인 LIA 벡터에 삽입하였다. LIA 벡터(컨트롤 바이러스 벡터)에는 인간 태반 유래의 알칼리 포스파타아제 유전자를 삽입시켰고, 이 벡터 유래의 바이러스에 감염된 세포는 알칼리 포스파타아제를 마커로 하여 발현된다. Otx2 유전자를 삽입된 LIA 벡터(Otx2 바이러스 벡터) 유래의 바이러스에 감염된 세포는, Otx2 단백질을 발현하고, 동시에 알칼리 포스파타아제를 마커로 하여 함께 발현되었다.

<120> 레트로바이러스 생성용 배양 세포(파닉스 세포주(Phoenix cell line))를 사용하여, 컨트롤 바이러스 벡터와 Otx2 바이러스 벡터를 각각 제작하고, 얻어진 바이러스를 초원심(스윙로터, 21,000rpm, 4°C, 2시간)에 의해 농축하여, 1×10^7 pfu(플라그 형성단위(plaque forming unit))/ml의 감염 효율을 갖는 바이러스액을 각각 제조하였다.

<121> 다음으로, 도 2에 나타내는 바와 같이, 출생 직후(생후 0일)의 어린 래트에 저온 마취를 실시하여 안부를 덮는 피부를 수술용 가위로 절개하였다. 차일드 래트의 망막하에 인젝션 니들(Hamilton 사 제조)을 사용하여, 상기 컨트롤 바이러스 벡터 또는 Otx2 바이러스 벡터의 바이러스액을 $5\mu\text{l}$ 주입하였다. 주입 후, 어린 래트를 37°C에서 20분 정도 따뜻하게 하여 체온을 회복시킨 후, 모(母) 래트의 사육 케이지로 되돌려 계속해서 4~6주간 사육하였다.

<122> 성체로 자란 래트에 펜토바르비탈 Na를 투여하여 안락사시켰다. 래트로부터 눈을 적출하고, 이어서 망막을 추출하였다. 망막을, 4% 파라포름알데히드 용액을 사용하여 하룻밤 4°C에서 고정하였다. 4% 파라포름알데히드 용액을 PBS(인산 완충액 염수(Phosphate Buffer Saline))로 교환하여, 고정시킨 망막을 세정하였다. 이 고정·세정 조작을 3회 반복하였다. 다음으로, 4% 파라포름알데히드 용액으로 고정한 망막을 65°C에서 열처리하여, 내재성 알칼리 포스파타아제를 불활화시켰다. 열처리한 망막을 알칼리 포스파타아제 염색액으로 염색하고(실온, 3시간), 상기 바이러스에 감염된 망막 세포만을 청자색으로 염색하였다. 이 염색된 망막을 4% 파라포름알데히드 용액에서 하룻밤 재고정한 후, PBS로 세정하고, 이어서 30% 수크로오스(Sucrose)/PBS 용액에 하룻밤 침지한 후, OTS 화합물(Sakura Finetek 사)액 중으로 옮겨 드라이아이스 상에서 망막의 동결 블록을 제작하였다. 동결 절편 제작 장치(Karlzeis 사)를 사용하여 동결 블록으로부터 약 $30\mu\text{m}$ 의 동결 절편을 제작하고, 광학 현미경(Karlzeis 사)하에 관찰하였다.

<123> 망막의 각 세포의 종류를, 그 형태와 위치에 따라 동정하였다(도 3 참조). 이것을 독립된 시험으로 3회 실시하였다. 1시야 내에 보이는 전체 세포수에 대한 각각의 세포의 존재율을 도 4에 나타낸다. Otx2 바이러스 벡터를 망막 줄기 세포(또는 망막 전구 세포)에 도입한 경우, 망막 시각세포수는 컨트롤 바이러스 벡터를 도입한 경우와 비교하여 약 10% 증가하였다. 이것으로부터, Otx2 유전자의 발현에 의해 망막 줄기 세포로부터 쌍극 세포, 무축삭 세포 및 릴러 신경아교 세포로의 분화가 강하게 억제되고, 망막 줄기 세포는 거의 망막 시각세포로 분화되는 것을 알 수 있었다.

<124> 이상의 결과로부터, Otx2 유전자를 미분화의 망막 줄기 세포에 도입하고, 그 세포 내에서 Otx2 유전자를 발현 시킴으로써, 래트의 미분화 망막 줄기 세포를 망막 시각세포로 유효하게 분화시키는 것이 가능함이 확인되었다.

도면의 간단한 설명

<125> 도 1은 컨트롤 바이러스 벡터와 Otx2 바이러스 벡터의 구조를 나타내는 도면이다. 도면 중, AP는 인간 태반 유래의 알칼리 포스파타아제 유전자를, LTR은 바이러스의 프로모터를 나타낸다. Otx2 바이러스 벡터에 있어서, Otx2 와 AP 사이에 IRES 서열을 가질 때, 그 벡터는 양 유전자(Otx2 와 AP)의 공(共)발현이 가능해진다. 또, IRES 서열은 바이러스 유래의 유전자이다.

<126> 도 2는 바이러스 감염 실험의 개요를 나타내는 도면이다. 도면 중, "Retina"는 망막, "Pigment Epithelium"은 망막 색소 상피, "virus"는 바이러스가 감염되는 범위, "Remove Retina"는 망막 적출, "Fix and Stain"은 조직의 고정과 염색, "Section and Analyse Clones"는 동결 절편(切片)과 이의 분석을 나타낸다.

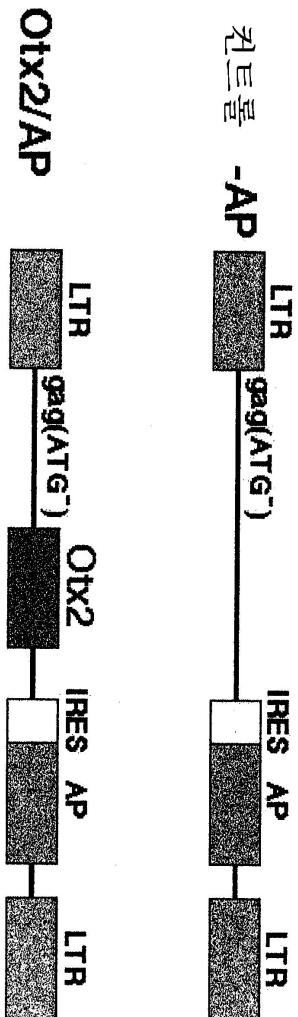
<127> 도 3은 알칼리 포스파타아제 염색 후의 망막 동결 절편 이미지의 예를 나타내는 도면이다. 도면 중, "Bi"

는 쌍극 세포, "A"는 무축삭 세포 (amacrine cell), "R"은 망막 시각세포, "M"은 뮬러 신경아교세포 (Muller glia cell), "R+Bi"는 망막 시각세포와 신경 세포, "A+Bi"는 무축삭 세포와 쌍극 세포를 나타낸다.

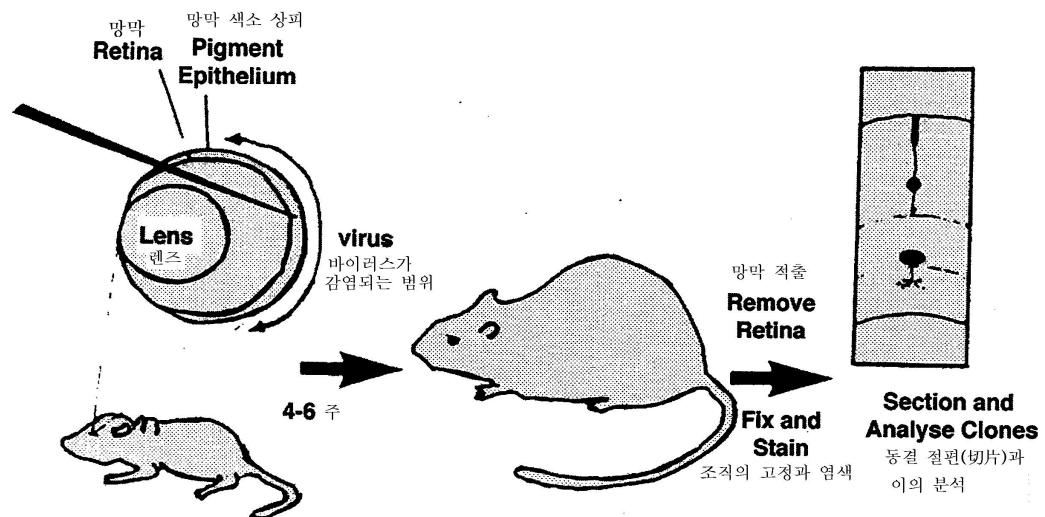
<128> 도 4는 컨트롤 바이러스 벡터 (LIA) 또는 Otx2 바이러스 벡터 (Otx2/LIA) 가 감염된 망막 줄기 세포로부터 분화된 세포 각각의, 현미경 하나의 시야에 있어서의 전체 세포수에 대한 존재율을 나타내는 도면이다.

도면

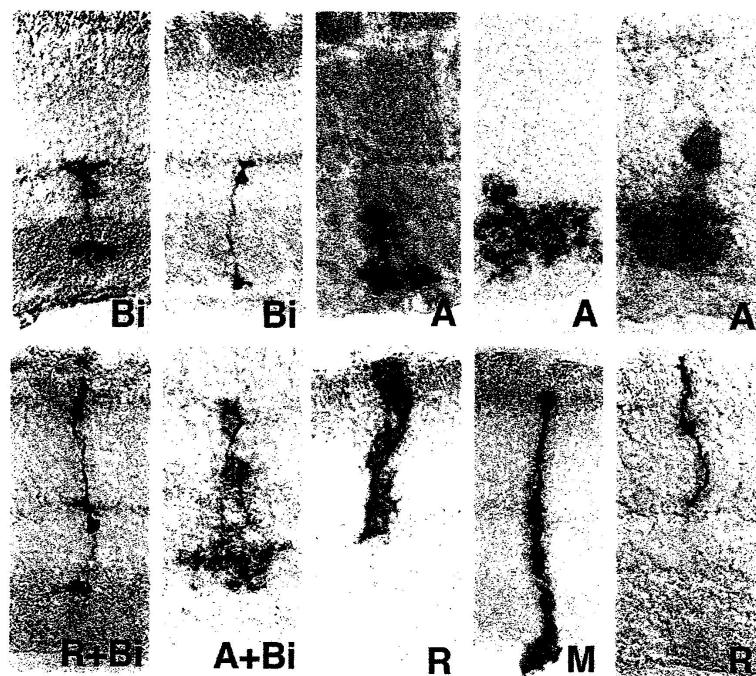
도면1



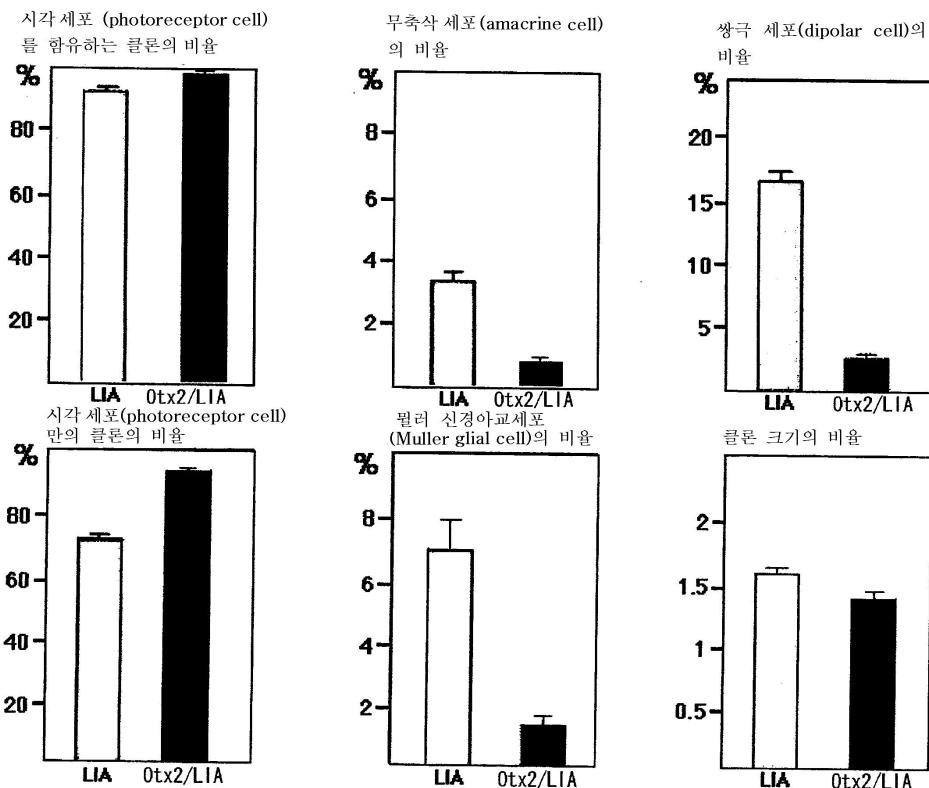
도면2



도면3



도면4



서 열 목록

<110> Japan Science and Technology Agency
Osaka Bioscience Institute
<120> Regeneration and neogenesis of retinal photoreceptor cell using
0tx2 homeobox gene

<130> 008F1292

<160> 6

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
<211> 297
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
Met Met Ser Tyr Leu Lys Gln Pro Pro Tyr Ala Val Asn Gly Leu Ser

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

Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Thr Gln Gly Tyr Gly Ala Ser Ser Leu
245 250 255

Gly Phe Asn Ser Thr Thr Asp Cys Leu Asp Tyr Lys Asp Gln Thr Ala
260 265 270

Ser Trp Lys Leu Asn Phe Asn Ala Asp Cys Leu Asp Tyr Lys Asp Gln
275 280 285

Thr Ser Ser Trp Lys Phe Gln Val Leu
290 295

<210> 2
<211> 2209
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
gagagcggga ccggccttag ctccaacaca gcctccactg tgattaaaaa taaaaattgc 60

tagagcagcc ctcactcgcc acatctactt tgatagctgg ctatggaa tttaaaggat 120

atttgacttt ttctaacctc ccatgaggct gtaagttcca ctgctccaaa cccacccacc 180

aaggactctg aacctgtcca cccgggcgc atcaagatct tccagctggg taccggat 240

ttggccgac ttgcaccc caaacaacct tagcatgatg tcttatctt agcaaccgcc 300

ttacgcagtc aatggctga gtctgaccac ttgggtatg gacttgc accccctcg 360

ggcttacccg gggccctggg cttcttgtcc cgcagccacc cccggaaac agcggcggga 420

gaggacgacg ttcaactcggt cgcaagctaga tgtgtggaa gcactgttg ccaagacccg 480

gtacccagac atttcatgc gagaggaggt ggcactgaaa atcaacttgc ccgagtcgag 540

ggtcaggta tggtaaga atcgaagagc taagtgcgc caacaacagc aacaacagca 600

gaatggaggt caaaacaaag tgagacctgc caaaaagaag acatctccag ctcggaaagt 660

| | |
|---|------|
| gagttcagag agtggAACAA gtggCCAATT cactcccccc tctagcacct cagtccgac | 720 |
| cattGCCAGC agcagtGCTC ctgtgtCTAT ctggAGCCCA gcttccatCT ccccaCTgtC | 780 |
| agatCCCTTG tccacCTCT cttcCTGcat gcagaggTCC tatCCcatGA cctataCTCA | 840 |
| ggcttcAGGT tatAGtcaAG gatATGCTGG ctcaACTTCC tactttgggg gcatggactg | 900 |
| tggatcatAT ttgaccCTA tgcATCACCA gcttCCGGA ccaggGGCCA cactcAGTCC | 960 |
| catggTacc aatgcAGTCA ccagccATCT caatcAGTCC ccagCTtCTC tttccACCCA | 1020 |
| gggatATGGA gcttcaAGCT tgggtttAA ctcaACCACT gattGCTTGG attataAGGA | 1080 |
| ccaaACTGCC tcctggAAAGC ttaACTTCA tgcTGACTGC ttggattATA aagatcAGAC | 1140 |
| atcctcGTgg aaattccagg ttttGTgaag acctgtAGAA cctcttttG tgggtgattt | 1200 |
| ttaaatatac tggcTggac attccAGTT tagccaggCA ttggTTaaaa gagttAGATG | 1260 |
| ggatgatGCT cagactcATC tGATCAAAGT tccgAGAGGC atagaAGGAA aaacGAAGGG | 1320 |
| ccttagAGGG gcctacAAAC cagcaACATG aaatGGACAA accaATCTG ttaAGATCCT | 1380 |
| gtcataGTTT tagatCATTG gttatCCiGA ttGCAAGT gatCAAAGC attCTAGCCA | 1440 |
| tgtGCAACCA aacaccACCA aaaataAAAT caaacAAAC taagtTGTGA aggaAGGGAG | 1500 |
| ggaaggTcat agcTTCTTA agcAGAGGTG ttccATTGTT ttagccAATC cttGTTGAA | 1560 |
| tcttagGAAT gaacAGTGTc tcaAGTCAT tcacGTTCA tgaccaACTG gtatTTGCA | 1620 |
| ctgaaaaAAAC tttcAGGGC tGtGTGAATT gtGTGACTGA ttGTCCTAGA tgcACTACTT | 1680 |
| tatTTaaaaA ataATGTTCA taaggAGTCA atATGTAgtt taAGAGACAA tcAGTGTGTG | 1740 |
| tcttataAAAT ggtacATCTG tggTTTTAA tctGTGCTAG acttcaAAAC tGtGATCTCC | 1800 |
| tgttattGTA tgcaACCTTG aactCCACCT ctgcAGGGT tcttCTGTGA ttaaatAGGT | 1860 |

| | |
|---|------|
| tataattata agcaaaattc agagcaactg agtactgatc taaaaagatt accttggct | 1920 |
| ggaggtgagc tgcactgaaa cttacgaca aaatgtctt ggacaagag agtcagagaa | 1980 |
| gagaagcaaa aggacactaa ttcatctgtt atttactgtt ggtaaggcta gcagtaaaga | 2040 |
| gacattggtc aattgctctg accctgatga attattaac tgagatcatt gtcgttatg | 2100 |
| cttgcagatg ttaaatggaa aagttatata tgcataaacc tttcttcct ggatttggca | 2160 |
| gatatgtata attatattaa aatggttcta gcacaaaaaa aaaaaaaaaa | 2209 |

<210> 3
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Met Met Ser Tyr Leu Lys Gln Pro Pro Tyr Ala Val Asn Gly Leu Ser
 1 5 10 15

Leu Thr Thr Ser Gly Met Asp Leu Leu His Pro Ser Val Gly Tyr Pro
 20 25 30

Ala Thr Pro Arg Lys Gln Arg Arg Glu Arg Thr Thr Phe Thr Arg Ala
 35 40 45

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

Ile Phe Met Arg Glu Glu Val Ala Leu Lys Ile Asn Leu Pro Glu Ser
 65 70 75 80

Arg Val Gln Val Trp Phe Lys Asn Arg Arg Ala Lys Cys Arg Gln Gln
 85 90 95

Gln Gln Gln Gln Asn Gly Gly Gln Asn Lys Val Arg Pro Ala Lys
 100 105 110

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

115

120

125

Gly Gln Phe Thr Pro Pro Ser Ser Thr Ser Val Pro Thr Ile Ala Ser
 130 135 140

Ser Ser Ala Pro Val Ser Ile Trp Ser Pro Ala Ser Ile Ser Pro Leu
 145 150 155 160

Ser Asp Pro Leu Ser Thr Ser Ser Cys Met Gln Arg Ser Tyr Pro
 165 170 175

Met Thr Tyr Thr Gln Ala Ser Gly Tyr Ser Gln Gly Tyr Ala Gly Ser
 180 185 190

Thr Ser Tyr Phe Gly Gly Met Asp Cys Gly Ser Tyr Leu Thr Pro Met
 195 200 205

His His Gln Leu Pro Gly Pro Gly Ala Thr Leu Ser Pro Met Gly Thr
 210 215 220

Asn Ala Val Thr Ser His Leu Asn Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Thr
 225 230 235 240

Gln Gly Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gly Phe Asn Ser Thr Thr Asp Cys
 245 250 255

Leu Asp Tyr Lys Asp Gln Thr Ala Ser Trp Lys Leu Asn Phe Asn Ala
 260 265 270

Asp Cys Leu Asp Tyr Lys Asp Gln Thr Ser Ser Trp Lys Phe Gln Val
 275 280 285

Leu

<210> 4
 <211> 2082
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 cctccgaagc agtaaaccag cccctctgtt tgtttgttgc cttgcctt agttccactg 60

| | |
|---|------|
| ctccaaaccc acccaccaag gactctgaac ctgtccaccc cgggcgcac | 120 |
| agctgggtac ccccgattt ggcgcactt gcaccccaa acaacccat | 180 |
| tatcttaagc aaccgccta cgcaat gggctgagtc tgaccactc gggtatggac | 240 |
| ttgctgcacc cctccgtgg ctacccggcc acccccgga aacagcgccg ggagaggacg | 300 |
| acgttcactc gggcgagct agatgtgctg gaagcactgt ttgccaagac ccggtaacca | 360 |
| gacatcttca tgcgagagga ggtggactg aaaatcaact tgcccgagtc gagggtgtag | 420 |
| gtatggttta agaatcgaag agctaagtgc cgccaaac agcaacaaca gcagaatgga | 480 |
| ggtcaaaaca aagttagacc tgccaaaaag aagacatctc cagctggga agttagttca | 540 |
| gagagtggaa caagtggcca attcactccc ccctctagca cctcagatccc gaccattgcc | 600 |
| agcagcagtg ctccgtgtc tatctggagc ccagttcca tctcccaact gtcagatccc | 660 |
| ttgtccacct cctttctgtc catgcagagg tcctatccca tgacctatac tcaggctca | 720 |
| gttatagtc aaggatatgc tggctcaact tcctacttg gggcatgga ctgtggatca | 780 |
| tatttgaccc ctatgcata ccagctccc ggaccagggg ccacactcag tcccatgggt | 840 |
| accaatgcag tcaccagcca tctcaatcag tccccagctt ctctttccac ccagggatat | 900 |
| ggagcttcaa gcttgggttt taactcaacc actgattgct tggattataa ggaccaaact | 960 |
| gcctccgtga agcttaactt caatgctgac tgcttggatt ataaagatca gacatcctcg | 1020 |
| tggaaattcc aggtttgtg aagacctgta gaacctttt ttgtgggtga ttttaata | 1080 |
| tactggcgtg gacattccag ttttagccag gcattggta aaagagttt atggatgtat | 1140 |
| gctcagactc atctgatcaa agttccgaga ggcataagaag gaaaaacgaa gggcctttaga | 1200 |
| ggggcctaca aaccagcaac atgaaatgga caaacaatc tgcttaagat cctgtcatag | 1260 |

| | |
|--|------|
| tttttagatca ttggttatcc tgatttgaa agtgatcaa agcattctag ccatgtcaa | 1320 |
| ccaaacacca ccaaaaataa aatcaaacaa aactaagtig tgaaggaagg gagggaaagg | 1380 |
| catagccttc ttaaggcagag gtgttccatt gtttagcca atccttggtt gaatcttagg | 1440 |
| aatgaacagt gtctcaagct cattcacgtt tcatgaccaa ctggtagttt gcactgaaaa | 1500 |
| aactttcag ggctgtgtga attgtgtgac tgattgtcct agatgcacta ctttattaa | 1560 |
| aaaataatgt tcataaggag tcaatatgta gtttaagaga caatcagtgt gtgtcttata | 1620 |
| aatggtacat ctgtggttt taatctgtgc tagacttcaa aactgtgatc tcctgttatt | 1680 |
| gtatgcaacc ttgaactcca cctctgcagg ggttcttcg tgattaaata ggttataatt | 1740 |
| ataagcaaaa ttcaagagcaa ctgagttactg atctaaaaag attaccttg gctggagggt | 1800 |
| agctgcactg aaactttacg acaaaaatgtc tctggacaaa gagagtcaaa gaagagaagc | 1860 |
| aaaaggacac taattcatct gtaatttact gttggtaagc ctagcagtaa agagacattg | 1920 |
| gtcaattgct ctgaccctga tgaatttata aactgagatc attgtcggtt atgcttgcag | 1980 |
| atgttaaatg gaaaagttat atatgcataa acctttctt cctggatttg gcagatatgt | 2040 |
| ataattatata taaaatggtt ctagcacaaa aaaaaaaaaa aa | 2082 |

<210> 5
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 5
 Met Met Ser Tyr Leu Lys Gln Pro Pro Tyr Ala Val Asn Gly Leu Ser
 1 5 10 15

Leu Thr Thr Ser Gly Met Asp Leu Leu His Pro Ser Val Gly Tyr Pro

20 25 30

Ala Thr Pro Arg Lys Gln Arg Arg Glu Arg Thr Thr Phe Thr Arg Ala
 35 40 45

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

Ile Phe Met Arg Glu Glu Val Ala Leu Lys Ile Asn Leu Pro Glu Ser
 65 70 75 80

Arg Val Gln Val Trp Phe Lys Asn Arg Arg Ala Lys Cys Arg Gln Gln
 85 90 95

Gln Gln Gln Gln Asn Gly Gly Gln Asn Lys Val Arg Pro Ala Lys
 100 105 110

Lys Lys Ser Ser Pro Ala Arg Glu Val Ser Ser Glu Ser Gly Thr Ser
 115 120 125

Gly Gln Phe Ser Pro Pro Ser Ser Thr Ser Val Pro Thr Ile Ala Ser
 130 135 140

Ser Ser Ala Pro Val Ser Ile Trp Ser Pro Ala Ser Ile Ser Pro Leu
 145 150 155 160

Ser Asp Pro Leu Ser Thr Ser Ser Cys Met Gln Arg Ser Tyr Pro
 165 170 175

Met Thr Tyr Thr Gln Ala Ser Gly Tyr Ser Gln Gly Tyr Ala Gly Ser
 180 185 190

Thr Ser Tyr Phe Gly Gly Met Asp Cys Gly Ser Tyr Leu Thr Pro Met
 195 200 205

His His Gln Leu Pro Gly Pro Gly Ala Thr Leu Ser Pro Met Gly Thr
 210 215 220

Asn Ala Val Thr Ser His Leu Asn Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Thr
 225 230 235 240

Gln Gly Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gly Phe Asn Ser Thr Thr Asp Cys
 245 250 255

Leu Asp Tyr Lys Asp Gln Thr Ala Ser Trp Lys Leu Asn Phe Asn Ala
260 265 270

Asp Cys Leu Asp Tyr Lys Asp Gln Thr Ser Ser Trp Lys Phe Gln Val
275 280 285

Leu

<210> 6
<211> 1737
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 6
caggttatac tggctcaact ccatcccctc tagtttgga gctgctgggg ggtgggggg 60

acggcgaaaa tgggggacgc atctgcaact cctttaaaag cctgtgccca gcgtctcccg 120

ggttctttt agtttgtct ggaacgtgga ggaagctgct ccctccgaag cagtaaacca 180

gcattctgt ttgtttgtt gcttgcct tagtccgtc actccaaatc taccaccaa 240

ggaccctgac cctgtccact ccaggcgaat cgagaccgtc cggtgggtc ccccaattt 300

ggcccgactt tgccctcca aacaaccta gcatgtatgtc ttatctaaag caaccgcctt 360

acgcagtcaa tggctgagt ctgaccactt cggatgtgga ctgtgtcat ccctccgtgg 420

gctaccccgca caccggggaa aacagcgaa gggagaggac gacatttact agggcacagc 480

tcgacgttct ggaagctctg ttgtccaaga cccggatccc agacatctc atgagggaag 540

agggtggact gaaaatcaac ttgccagaat ccagggtgca ggtatgttt aagaatcgaa 600

gagctaagtcc cgccaaacag cagcagcagc agcagaatgg aggtcagaac aaagtggc 660

ctgccaagaa gaagagctct ccagctcggt aagttagttc agagatgtt acaagtggcc 720

agttcagttcc cccctctgtt acctcagttcc caaccattgc cagcagcagt gtcgtgtt 780

| | |
|--|------|
| ctatctggag cccagcgtcc atctccccac tgtctgaccc ctgtccact tcctccctct | 840 |
| gcatgcagag gtcctatccc atgacctata ctcaggcttc agttatagt caaggctatg | 900 |
| ctggctcaac ttcttacttt gggggcatgg actgtggatc ttatggacc cctatgcac | 960 |
| accagcttcc tggaccaggg gccacactca gtcccatggg taccatgtc gttaccagcc | 1020 |
| atctcaatca gtccccagct tcttttcca cccagggata tggagctca agcttgggtt | 1080 |
| ttaactcaac cactgattgc ttggattata aggaccaaac tgcccttgg aagcttaact | 1140 |
| tcaatgtga ctgcttggat tataaagatc agacgtcctc atggaaattc caggtttgt | 1200 |
| gaagacctgt agaagctatt ttgtgggtg attttaat atgctggct gaacattcca | 1260 |
| gttttagcca ggcattgggtt aaaaaagtta gatggaacga tgctctcaga ctcctgatca | 1320 |
| aagttaccga gaggcataga aggaaaaagg aaggggcctt agaagggtcc atcaaccagc | 1380 |
| aacctgaaat ggacaaacca atctacttaa gattctgtta tagttctaga tcattggttt | 1440 |
| cctgatttgc aaatgattga tcaaataat tctagcgaca tgcaacccaa taccactcaa | 1500 |
| aacaaaaatc cagcaaaact gagttgtgag ggaaggagg gaaggtcatg gccttcaaag | 1560 |
| cagaggtgat ccgggtttt agccaatctt tggttgaatc ttaggaatgg acaatgtccc | 1620 |
| aggctcattc acgttcatg accaacaggt agttggact gaaaaacttt tcagggctgt | 1680 |
| gtggattgtg cgactgattg tcctagatgc actactttat taaaaaaaaaaa aaaaaaaaa | 1737 |