(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 31 892 T2** 2004.07.22

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 750 628 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 31 892.6**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/02950**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 912 829.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/024414**
(86) PCT-Anmeldetag: **08.03.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **14.09.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.01.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **08.10.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.07.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C07H 21/00**
A61K 38/18, C07K 14/50

(30) Unionspriorität:
207412 **08.03.1994** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Human Genome Sciences, Inc., Rockville, Md., US

(72) Erfinder:
HU, Jing-Shan, Gaithersburg, US; GOCAYNE, D., Jeannine, Silver Spring, US

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: **FIBROBLASTEN-WACHSTUMSFAKTOR 10**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung betrifft neu identifizierte Polynucleotide, Polypeptide, die durch solche Polynucleotide codiert werden, die Verwendung solcher Polynucleotide und Polypeptide sowie die Herstellung solcher Polynucleotide und Polypeptide. Insbesondere handelt es sich bei den Polypeptiden der vorliegenden Erfindung um den Fibroblasten-Wachstumsfaktor 10/Heparin bindenden Wachstumsfaktor 10, der hierin nachstehend als "FGF-10" bezeichnet wird. Die Erfindung betrifft auch die Hemmung der Wirkung solcher Polypeptide.

[0002] Fibroblasten-Wachstumsfaktoren sind eine Proteinfamilie mit dem Charakteristikum, dass sie an Heparin binden, und sie werden daher auch Heparin bindende Wachstumsfaktoren (HBGF) genannt. Die Expression der verschiedenen Mitglieder dieser Proteine findet in zahlreichen Geweben statt und erfolgt unter einer besonderen zeitlichen und räumlichen Kontrolle. Diese Proteine sind potente Mitogene für eine Vielzahl von Zellen mesodermalen, ectodermalen und endodermalen Ursprungs, einschließlich Fibroblasten, Hornhaut- und Gefäß- Endothelzellen, Granulocyten, adrenalen Konexzellen, Knorpelzellen, Myoblasten, vaskulären glatten Muskelzellen, Linsen-Epithelzellen, Melanocyten, Keratinocyten, Oligodendrocyten, Astrocyten, Osteoblasten und hämatopoietischen Zellen.

[0003] Jedes Mitglied hat Funktionen, die mit denen anderer Mitglieder überlappen, und besitzt auch sein einzigartiges Funktionsspektrum. Neben der Fähigkeit, die Proliferation von Gefäß-Endothelzellen zu stimulieren, sind sowohl FGF-1 als auch FGF-2 für Endothelzellen chemotaktisch, und es wurde gezeigt, dass FGF-2 es Endothelzellen ermöglicht, die Basalmembran zu durchdringen. In Übereinstimmung mit diesen Eigenschaften besitzen sowohl FGF-1 als auch FGF-2 die Kapazität, die Angiogenese zu stimulieren. Eine weitere wichtige Eigenschaft dieser Wachstumsfaktoren ist ihre Fähigkeit, die Wundheilung zu fördern. Viele andere Mitglieder der FGF-Familie haben ähnliche Aktivitäten mit FGF-1 und FGF-2 gemeinsam, wie z. B. die Förderung der Angiogenese und der Wundheilung. Von einigen Mitgliedern der FGF-Genfamilie wurde gezeigt, dass sie die Bildung des Mesoderms induzieren und die Differenzierung von neuronalen Zellen, Fettspeicherzellen und Skelettmuskelzellen modulieren.

[0004] Neben diesen biologischen Wirkungen in normalen Geweben wurden die FGF-Proteine mit der Förderung der Tumorbildung in Karzinomen und Sarkomen in Verbindung gebracht, dies geschieht durch die Förderung der Gefäßneubildung in Tumoren und ihre Wirkung als transformierende Proteine, wenn ihre Expression dereguliert wird.

[0005] Die FGF-Familie umfaßt derzeit acht strukturell verwandte Polypeptide. Die Gene für jedes Mitglied wurden cloniert und sequenziert. Zwei der Mitglieder, FGF-1 und FGF-2, wurden unter vielen verschiedenen Namen charakterisiert, am häufigsten aber als saurer beziehungsweise als basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor. Die normalen Genprodukte beeinflussen das allgemeine Zellvermehrungsvermögen des Großteils der vom Mesoderm und vom Neuroectoderm abstammenden Zellen. Sie sind in der Lage, die Angiogenese in vivo zu induzieren und spielen möglicherweise wichtige Rollen in der frühen Entwicklung (Burgess, W. H. und Maciag, T., Ann. Rev. Biochem. 58: 575–606 (1989)).

[0006] Ein eukaryontischer Expressionsvektor, der eine sekretierte Form von FGF-1 codiert, wurde über Gentransfer in Schweinearterien eingebracht. Dieses Modell definiert die Funktion des Gens in der arteriellen Wand in vivo. Die Expression von FGF-1 induzierte 21 Tage nach dem Gentransfer die Verdickung der Intima in Schweinearterien (Nabel, E. G. et al., Nature 362: 844–6 (1993)). Es ist weiterhin gezeigt worden, dass der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor, unabhängig von seiner Rolle bei der Tumorangiogenese, möglicherweise das Wachstum und das Fortschreiten von Gliomen regulieren kann und dass die Freisetzung oder die Sekretion des basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors möglicherweise für diese Wirkungen erforderlich ist (Morrison, R. S. et al., J. Neurosci. Res. 34: 502–9 (1993)).

[0007] Fibroblasten-Wachstumsfaktoren wie z. B. der basische FGF wurden weiterhin mit dem Wachstum von Kaposi-Sakom-Zellen in vitro in Verbindung gebracht (Huang, Y. Q. et al., J. Clin. Invest. 91: 1191–7 (1993)). Ebenfalls wurde die cDNA-Sequenz, die den menschlichen basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor codiert, stromabwärts eines Transkriptionspromotors cloniert, der durch die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 erkannt wird. Es wurde gezeigt, dass die so erhaltenen basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktoren eine biologische Aktivität besitzen, die sich von der des menschlichen Fibroblasten-Wachstumsfaktors aus der Plazenta in der mitogenen Wirkung, in Bezug auf die Synthese des Plasminogen-Aktivators und in Testansätzen zur Angiogenese nicht unterscheidet (Squires, C. H. et al., J. Biol. Chem. 263: 16297–302 (1988)).

[0008] Das U.S.-Patent Nr. 5,155,214 offenbart im Wesentlichen reine basische Fibroblasten-Wachstumsfaktoren aus Säugern und ihre Herstellung. Es werden die Aminosäuresequenzen der basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktoren aus Rind und Mensch offenbart sowie die DNA-Sequenz, die das Polypeptid aus der Rinderart codiert.

[0009] Aus der FGF-Familie wurden weiterhin beschrieben: FGF-3 (int-2), FGF-4 (HST), das Produkte der Gene, die als FGF-5 und FGF-6 bekannt sind (Maries, Oncogene 4: 335 (1989)), FGF-7 (Keratinocyten-Wachstumsfaktor, KGF; Finch, Science 245: 752 (1989)), FGF-8 Androgen induzierter Wachstumsfaktor, Tanaka, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89: 8928 (1992)) und FGF-9 (Miyamoto, Mol. Cell Biol. 13: 4251 (1993)).

[0010] Das Polypeptid der vorliegenden Erfindung wurde als Ergebnis einer Aminosäuresequenz-Homologie zu anderen Mitgliedern der FGF-Familie vorläufig als ein Mitglied der FGF-Familie identifiziert.

[0011] Gemäß eines Aspekts der vorliegenden Erfindung werden neuartige reife Polypeptide bereitgestellt, bei denen es sich um FGF-10 handelt, sowie biologisch aktive und diagnostisch oder therapeutisch nützliche Fragmente davon. Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung sind menschlichen Ursprungs.

[0012] Gemäß eines Aspekts der vorliegenden Erfindung werden isolierte Nucleinsäuremoleküle bereitgestellt, die den menschlichen FGF-10 codieren, einschließlich der mRNAs, der DNAs, der cDNAs, der genomischen DNA, sowie Antisense-Analoga davon und biologisch aktive und diagnostisch oder therapeutisch nützliche Fragmente davon.

[0013] Gemäß eines anderen Aspekts der vorliegenden Endung wird ein Verfahren zur Herstellung solcher Peptide über rekombinante Verfahren durch die Verwendung rekombinanter Vektoren wie z. B. Clonierungs- und Expressionsplasmide bereitgestellt, die als Reagenzien bei der rekombinanten Herstellung von FGF-10-Proteinen nützlich sind, sowie rekombinante prokaryontische und/oder eukaryontische Wirtszellen, die eine menschliche FGF-10-Nucleinsäuresequenz enthalten.

[0014] Gemäß eines weiteren Aspekts der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Verwendung eines solchen Polypeptids oder eines Polynucleotids, das ein solches Polypeptid codiert, für therapeutische Zwecke bereitgestellt, zum Beispiel für die Förderung der Heilung von Wunden, Verbrennungen und Geschwüren, für die Verhinderung von Nervenschädigungen aufgrund neuronaler Erkrankungen und um die Hautalterung und den Haarverlust zu verhindern.

[0015] Gemäß eines weiteren Aspekts der vorliegenden Erfindung werden Antikörper gegen solche Polypeptide bereitgestellt.

[0016] Gemäß eines weiteren Aspekts der vorliegenden Endung werden Antagonisten gegen solche Polypeptide bereitgestellt, die dazu verwendet werden können, die Wirkung solcher Polypeptide zu hemmen, zum Beispiel bei der Behandlung von Tumoren und hypervaskulären Krankheiten.

[0017] Gemäß eines anderen Aspekts der vorliegenden Erfindung werden Nucleinsäuresonden bereitgestellt, die Nucleinsäuremoleküle mit ausreichender Länge umfassen, um spezifisch an menschliche FGF-10-Sequenzen zu hybridisieren.

[0018] Gemäß eines weiteren Aspekts der vorliegenden Erfindung werden diagnostische Testansätze zum Nachweis von Krankheiten oder von Empfänglichkeiten für Krankheiten bereitgestellt, die mit Mutationen in den FGF-10-Nucleinsäuresequenzen oder mit Überexpression der Polypeptide, die durch solche Sequenzen codiert werden, in Verbindung stehen.

[0019] Gemäß eines anderen Aspekts der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Verwendung solcher Polypeptide oder Polynucleotide, die solche Polypeptide codieren, für in vitro-Zwecke bereitgestellt, die mit der wissenschaftlichen Forschung, der Synthese von DNA und der Herstellung von DNA-Vektoren in Verbindung stehen.

[0020] Diese und andere Aspekte der vorliegenden Erfindung sollten den Fachleuten aus den hierin angeführten Lehren ersichtlich sein.

[0021] Die folgenden Zeichnungen dienen nur als Erläuterungen spezieller Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung und sind nicht als Einschränkungen in irgendeiner Weise beabsichtigt.

[0022] **Fig.** 1 zeigt die cDNA-Sequenz und die entsprechende abgeleitete Aminosäuresequenz von FGF-10. Die gezeigte Aminosäuresequenz stellt die reife Form des Proteins dar. Es wird die Ein-Buchstaben-Standardabkürzung für die Aminosäuren verwendet. Sequenzierungsungenauigkeiten sind ein übliches Problem, wenn man versucht, Polynucleotidsequenzen zu bestimmen. Die Sequenzierung wurde unter Verwendung des automatisierten DNA-Sequenziergeräts 373 (Applied Biosystems, Inc.) durchgeführt. Es wird vorhergesagt, dass die Sequenzierungsgenauigkeit mehr als 97% beträgt.

[0023] **Fig.** 2 stellt die Aminosäuresequenz-Homologie zwischen FGF-10 und den anderen Mitgliedern der FGF-Familie dar. Die konservierten Aminosäuren sind fettgedruckt.

[0024] **Fig.** 3 zeigt ein SDS-PAGE-Gel nach der in vitro-Transkription/Translation des FGF-10-Proteins.

[0025] Gemäß eines Aspekts der vorliegenden Erfindung werden isolierte Nucleinsäuremoleküle (Polynucleotide) bereitgestellt, die das reife Polypeptid, das die abgeleitete Aminosäuresequenz der **Fig.** 1 (SEQ ID Nr. 2) besitzt, oder das reife Polypeptid, das durch die cDNA des Clons codiert wird, der am 4. März 1994 bei der ATCC mit der Hinterlegungs-Nr. 75696 hinterlegt wurde, codieren.

[0026] Das Polynucleotid dieser Erfindung wurde ursprünglich in einer cDNA-Genbank entdeckt, die aus 8 Wochen altem menschlichem Gewebe in einen frühen Stadium stammte, und anschließend wurde die Volllängen-cDNA in einer Genbank gefunden, die aus dem menschlichen Mandelkern stammte. Es ist strukturell mit allen Mitgliedern der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Genfamilie verwandt und enthält ein offenes Leseraster, das ein Polypeptid von 181 Aminosäuren codiert. Unter den besten Übereinstimmungen befinden sich: 1) 37% Identität und 67% Sequenzähnlichkeit mit aus Gehirn isoliertem FGF-9 über einen Bereich von 129 Aminosäuren; 2) 36% Identität und 64% Ähnlichkeit mit FGF-7 (Keratinocyten-Wachstumsfaktor) in einem Bereich von 121 Aminosäuren; 3) 33% Identität und 55% Ähnlichkeit mit FGF-1 (saurer FGF) über einen Bereich von 110

Aminosäuren. Darüber hinaus ist das die FGF/HBGF-Familie kennzeichnende Sequenzmotiv GXLX(S, T, A, G) X6(D, E)CXFXE im Polypeptid der vorliegenden Erfindung konserviert (X bedeutet ein beliebiger Aminosäurerest; (D, E) bedeutet entweder einen D- oder einen E-Rest; X6 bedeutet beliebige 6 Aminosäurereste).

[0027] Das Polynucleotid der vorliegenden Erfindung kann in Form von RNA oder in Form von DNA vorliegen, wobei die DNA, cDNA, genomische DNA und synthetische DNA umfaßt. Die DNA kann doppelsträngig oder einzelsträngig sein. Die codierende Sequenz, die das reife Polypeptid codiert, kann mit der in **Fig.** 1 (SEQ ID Nr. 1) gezeigten codierenden Sequenz oder mit der des hinterlegten Clons identisch sein, oder sie kann als Folge der Redundanz oder der Degeneration des genetischen Codes eine unterschiedliche codierende Sequenz sein, die das gleiche reife Polypeptid wie die DNA der **Fig.** 1 (SEQ ID Nr. 1) oder die hinterlegte cDNA codiert.

[0028] Das Polynucleotid, das das reife Polypeptid der **Fig.** 1 (SEQ ID Nr. 2) oder das reife Polypeptid codiert, das durch die hinterlegte cDNA codiert wird, kann umfassen: nur die codierende Sequenz für das reife Polypeptid; die codierende Sequenz für das reife Polypeptid und zusätzliche codierende Sequenzen wie z B. eine Leader- oder eine sekretorische Sequenz oder eine Proproteinsequenz; die codierende Sequenz für das reife Polypeptid (und gegebenenfalls zusätzliche codierende Sequenzen) und nicht codierende Sequenzen wie z. B. Introns oder nicht codierende Sequenzen, die sich 5' und/oder 3' der codierenden Sequenz für das reife Polypeptid befinden.

[0029] Daher umfaßt der Ausdruck "Polynucleotid, das ein Polypeptid codiert", ein Polynucleotid, das nur die codierende Sequenz für das Polypeptid codiert, sowie ein Polynucleotid, das weitere codierende und/oder nicht codierende Sequenzen enthält.

[0030] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Varianten der hierin vorstehend beschriebenen Polynucleotide, die Fragmente, Analoga und Derivate des Polypeptids, das die abgeleitete Aminosäuresequenz der **Fig.** 1 (SEQ ID Nr. 2) aufweist, oder des Polypeptids codieren, das durch die cDNA des hinterlegten Clons codiert wird. Die Varianten des Polynucleotids kann eine natürlich vorkommende allelische Variante des Polynucleotids sein oder eine nicht natürlich vorkommende Variante des Polynucleotids.

[0031] Daher umfaßt die vorliegende Endung Polynucleotide, die das gleiche reife Polypeptid codieren, das in **Fig.** 1 (SEQ ID Nr. 2) gezeigt wird, oder das gleiche reife Polypeptid codieren, das durch die cDNA des hinterlegten Clons codiert wird, sowie Varianten solcher Polynucleotide, wobei die Varianten bevorzugt ein Fragment des Polypeptids der **Fig.** 1 (SEQ ID Nr. 2) oder des Polypeptids codieren, das durch die cDNA des hinterlegten Clons codiert wird. Solche Nucleotidvarianten umfassen Deletionsvarianten, Substitutionsvarianten und Additions- oder Insertionsvarianten.

[0032] Wie hierin vorstehend angezeigt, kann das Polynucleotid eine codierende Sequenz aufweisen, die eine natürlich vorkommende allelische Variante der in **Fig.** 1 (SEQ ID Nr. 1) gezeigten codierenden Sequenz oder der codierenden Sequenz des hinterlegten Clons darstellt. Wie im Fachgebiet bekannt ist, stellt eine allelische Variante eine alternative Form einer Polynucleotidsequenz dar, die eine Substitution, eine Deletion oder eine Addition eines oder mehrerer Nucleotide aufweisen kann, welche die Funktion des codierten Polypeptids nicht wesentlich verändern.

[0033] Die vorliegende Erfindung umfaßt auch Polynucleotide, in denen die codierende Sequenz für das reife Polypeptid im gleichen Leseraster mit einer Polynucleotidsequenz fusioniert sein kann, die bei der Expression und der Sekretion eines Polypeptids in bzw. aus einer Wirtszelle hilfreich sein kann, wie zum Beispiel eine Leadersequenz, die als eine sekretorische Sequenz zur Kontrolle des Transports eines Polypeptids aus der Zelle fungieren kann. Das Polypeptid, das eine Leadersequenz besitzt, ist ein Präprotein und kann eine Leadersequenz besitzen, die durch die Wirtszelle gespalten wird, um die reife Form des Polypeptids zu bilden. Die Polynucleotide können auch ein Proprotein codieren, das aus dem reifen Protein plus zusätzlichen 5' gelegenen Aminosäureresten besteht. Ein reifes Protein, das eine Prosequenz besitzt, ist ein Proprotein und stellt eine inaktive Form des Proteins dar. Nachdem die Prosequenz abgespalten ist, verbleibt ein aktives reifes Protein.

[0034] Daher kann zum Beispiel das Polynucleotid der vorliegenden Erfindung ein reifes Protein codieren oder ein Protein codieren, das eine Prosequenz besitzt, oder ein Protein codieren, das sowohl eine Prosequenz als auch eine Präsequenz (Leadersequenz) besitzt.

[0035] Die Polynucleotide der vorliegenden Erfindung können die codierende Sequenz auch im gleichen Leseraster mit einer Markersequenz fusioniert enthalten, die die Reinigung des Polypeptids der vorliegenden Endung erlaubt. Die Markersequenz kann eine Hexa-Histidin-Markierungssequenz sein, die durch den Vektor pQE-9 bereitgestellt wird, um die Reinigung des mit dem Marker fusionierten reifen Polypeptids im Falle eines bakteriellen Wirts zu ermöglichen, oder die Markersequenz kann zum Beispiel eine Hämagglutinin (HA)-Markierungssequenz sein, wenn ein Säugerwirt, wie z. B. COS-7-Zellen, verwendet wird. Die (HA)-Markierungssequenz entspricht einem Epitop, das aus dem Influenza-Hämagglutinin-Protein stammt (Wilson, I. et al., Cell 37: 767 (1984)).

[0036] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Polynucleotide, die mit den hierin vorstehend beschriebenen Sequenzen hybridisieren, wenn mindestens 95% Identität zwischen den Sequenzen besteht. Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere Polynucleotide, die unter stringenten Bedingungen mit den hierin vor-

stehend beschriebenen Polynucleotiden hybridisieren. Wie hierin verwendet, bedeutet der Ausdruck "stringente Bedingungen", dass die Hybridisierung nur dann stattfinden wird, wenn eine Identität von mindestens 95% und bevorzugt von mindestens 97% zwischen den Sequenzen besteht. Die mit den hierin vorstehend beschriebenen Polynucleotiden hybridisierenden Polynucleotide codieren Polypeptide, die die gleiche biologische Funktion oder Aktivität wie das reife Polypeptid, das durch die cDNA der **Fig.** 1 (SEQ ID Nr. 1) oder die hinterlegte DNA codiert wird, im Wesentlichen beibehalten.

[0037] Die Hinterlegung(en), auf die hierin Bezug genommen wird, wird/werden nach dem Budapester Vertrag über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen zum Zwecke des Patentverfahrens weiter erhalten. Diese Hinterlegungen werden ausschließlich aus Gründen der Zweckmäßigkeit bereitgestellt und stellen kein Zugeständnis dar, dass eine Hinterlegung nach 35 U.S.C. § 112 erforderlich ist. Die Sequenz der Polynucleotide, die in den hinterlegten Materialien enthalten ist, sowie die Aminosäuresequenz der durch sie codierten Polypeptide, sind hierin durch Bezugnahme eingeschlossen und stellen für den Fall irgendeiner Unstimmigkeit mit der hierin vorgelegten Beschreibung der Sequenzen eine Kontrolle dar. Es kann eine Lizenz erforderlich sein, um die hinterlegten Materialien herzustellen, zu verwenden oder zu verkaufen, und hiermit wird eine solche Lizenz nicht gewährt.

[0038] Die vorliegende Endung betrifft weiterhin ein FGF-10-Polypeptid, das die abgeleitete Aminosäuresequenz der **Fig.** 1 (SEQ ID Nr. 2) besitzt oder das die Aminosäuresequenz besitzt die durch die hinterlegte cDNA codiert wird, sowie Fragmente eines solchen Polypeptids.

[0039] Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung ein Proprotein, das durch Spaltung des Proproteins aktiviert werden kann, um ein aktives reifes Polypeptid herzustellen.

[0040] Der Ausdruck "Fragment", wenn er sich auf das Polypeptid der **Fig.** 1 (SEQ ID Nr. 2) oder das Polypeptid, das durch die hinterlegte cDNA codiert wird, bezieht, bedeutet ein Polypeptid, das die gleiche biologische Funktion oder Aktivität wie ein solches Polypeptid im Wesentlichen beibehält. Somit umfaßt ein Fragment ein Fragment eines Proproteins, das durch die Abspaltung des Proproteinanteils erzeugt wird, um ein aktives reifes Polypeptid herzustellen.

[0041] Das Polypeptid der vorliegenden Erfindung kann ein rekombinantes Polypeptid, ein natürliches Polypeptid oder ein synthetisches Polypeptid sein, bevorzugt ist es ein rekombinantes Polypeptid.

[0042] Das Fragment des Polypeptids der **Fig.** 1 (SEQ ID Nr. 2) oder dasjenige, welches durch die hinterlegte cDNA codiert wird, kann (i) eines sein, in dem einer oder mehrere der Aminosäurereste durch einen konservierten oder nicht konservierten Aminosäurerest (bevorzugt ein konservierter Aminosäurerest) ersetzt sind, und solche ersetzten Aminosäurereste können solche sein, die durch den genetischen Code codiert werden oder nicht, oder (ii) eines sein, in dem einer oder mehrere der Aminosäurereste eine Substituentengruppe umfassen, oder (iii) eines sein, in dem das reife Polypeptid mit einer anderen Verbindung fusioniert ist, wie z. B. einer Verbindung, die dazu dient, die Halbwertszeit des Polypeptids zu erhöhen (zum Beispiel Polyethylenglycol), oder (iv) eines sein, in dem zusätzliche Aminosäuren mit dem reifen Polypeptid fusioniert sind, wie z. B. eine Leader- oder eine sekretorische Sequenz oder eine Sequenz, die zur Reinigung des reifen Polypeptids verwendet wird, oder eine Proproteinsequenz. Es wird vorausgesetzt, dass sich aus den hierin angeführten Lehren solche Fragmente im Rahmen der Erfahrung der Fachleute befinden, so lange diese Fragmente die gleiche biologische Funktion oder Aktivität wie das reife Polypeptid, das durch die cDNA der **Fig.** 1 (SEQ ID Nr. 1) oder die hinterlegte cDNA codiert wird, im Wesentlichen beibehalten.

[0043] Die Polypeptide und Polynucleotide der vorliegenden Erfindung werden bevorzugt in einer isolierten Form bereitgestellt und sind bevorzugt bis zur Homogenität gereinigt.

[0044] Der Ausdruck "isoliert" bedeutet, dass das Material aus seiner ursprünglichen Umgebung entfernt wurde (z. B. der natürlichen Umgebung, wenn es natürlich vorkommt). Zum Beispiel gilt ein natürlich vorkommendes Polynucleotid oder Polypeptid, das in einem lebenden Tier vorkommt, als nicht isoliert, aber das gleiche Polynucleotid oder die DNA oder das Polypeptid, das von einigen oder allen der ebenfalls vorliegenden Materialien getrennt ist, gilt als isoliert. Ein solches Polynucleotide kann Teil eines Vektors sein, und/oder ein solches Polynucleotid oder Polypeptid kann Teil einer Zusammensetzung sein und immer noch als isoliert gelten, in der Weise, dass ein solcher Vektor oder eine solche Zusammensetzung nicht Teil seiner natürlichen Umgebung ist.

[0045] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Vektoren, die Polynucleotide der vorliegenden Erfindung umfassen, sowie Wirtszellen, die mit Vektoren der Erfindung gentechnisch verändert wurden, und die Herstellung von Polypeptiden der Erfindung durch rekombinante Verfahren.

[0046] Wirtszellen können mit den Vektoren dieser Erfindung gentechnisch verändert werden (transduziert, transformiert oder transfiziert), bei denen es sich zum Beispiel um einen Clonierungsvektor oder um einen Expressionsvektor handeln kann. Der Vektor kann zum Beispiel in Form eines Plasmids, eines viralen Partikels, eines Phagen, usw. vorliegen. Die veränderte Wirtszelle kann in herkömmlichen Nährmedien kultiviert werden, die zur Aktivierung von Promotoren, zur Selektion von Transformanten oder zur Amplifikation der FGF-10-Gene entsprechend modifiziert wurden. Die Anzuchtbedingungen wie z. B. die Temperatur, der pH-Wert und ähnliche sind die gleichen, die vorher für die Wirtszelle zur Expression ausgewählt wurden und sind den Fachleuten bekannt.

[0047] Das Polynucleotid der vorliegenden Erfindung kann zur Herstellung eines Polypeptids über rekombinante Verfahren verwendet werden. Daher kann zum Beispiel die Polynucleotidsequenz in irgendeinem aus einer Vielzahl an Expresionsvehikeln enthalten sein, insbesondere in Vektoren oder in Plasmiden zur Expression eines Polypeptids. Solche Vektoren umfassen chromosomale, nicht chromosomale und synthetische DNA-Sequenzen, wie z. B. Derivate von SV40; bakterielle Plasmide; Phagen-DNA; Hefeplasmide; Vektoren, die aus Kombinationen von Plasmiden und Phagen-DNA, Virus-DNA wie z. B. Vaccinia, Adenovirus, Geflügelpocken-Virus und Pseudorabies stammen. Es kann jedoch jeder/s andere Vektor oder Plasmid verwendet werden, solange er/es im Wirt replikations- und lebensfähig ist.

[0048] Die geeignete DNA-Sequenz kann in den Vektor über eine Vielzahl an Verfahren eingebaut werden. Im Allgemeinen wird die DNA-Sequenz in geeignete Restriktionsendonuclease-Schnittstellen durch im Fachgebiet bekannte Verfahren inseriert. Solche Verfahren und andere sollten sich im Rahmen der Erfahrung der Fachleute befinden.

[0049] Die DNA-Sequenz im Expressionsvektor ist funktionell mit (einer) geeigneten Expressions-Kontrollsequenzen) (Promotor) verbunden, um die mRNA-Synthese zu steuern. Als repräsentative Beispiele für solche Promotoren seien genannt: LTR oder der SV40-Promotor, der lac- oder der trp-Promotor aus E. coli, der P_L-Promotor des Phagen Lambda und andere Promotoren, von denen bekannt ist, dass sie die Expression von Genen in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen oder ihren Viren kontrollieren. Der Expressionsvektor enthält auch eine Ribosomen-Bindestelle zur Initiation der Translation und einen Transkriptions-Terminator. Der Vektor kann auch geeignete Sequenzen zur Verstärkung der Expression enthalten.

[0050] Darüber hinaus enthalten die Expressionsvektoren bevorzugt ein Gen, um eine phänotypisches Merkmal zur Selektion der transformierten Wirtszellen bereitzustellen, wie z. B. die Dihydrofolat-Reduktase oder die Neomycin-Resistenz bei der eukaryontischen Zellkultur oder z. B. die Tetracyclin- oder die Ampicillin-Resistenz bei E. coli.

[0051] Der Vektor, der, wie hierin vorstehend beschrieben, die geeignete DNA-Sequenz sowie einen geeigneten Promotor oder eine Kontrollsequenz enthält, kann dazu verwendet werden, einen geeigneten Wirt zu transformieren, um dem Wirt zu ermöglichen, das Protein zu exprimieren. Als repräsentative Beispiele geeigneter Wirte können erwähnt werden: Bakterienzellen wie z. B. E. coli, Salmonella typhimurium, Streptomyces; Pilz-Zellen wie z. B. Hefe; Insektenzellen wie z. B. Drosophila S2 und Spodoptera Sf9; tierische Zellen wie z. B. CHO, COS oder Bowes-Melanom; Adenoviren; Pflanzenzellen, usw. Die Auswahl eines geeigneten Wirts sollte aus den hierin angeführten Lehren den Fachleuten bekannt sein.

[0052] Insbesondere umfaßt die vorliegende Erfindung ebenfalls rekombinante Konstrukte, die eine oder mehrere der Sequenzen umfassen, die vorstehend grob beschrieben wurden. Die Konstrukte umfassen einen Vektor wie z. B. ein Plasmid oder einen viralen Vektor, in den eine Sequenz der Erfindung in der Vorwärts- oder in der Rückwärts-Orientierung inseriert wurde. In einem bevorzugten Aspekt dieser Ausführungsform umfaßt das Konstrukt weiterhin regulatorische Sequenzen, einschließlich zum Beispiel einen Promotor, der mit der Sequenz funktionell verknüpft ist. Den Fachleuten ist eine große Zahl an geeigneten Vektoren und Promotoren bekannt, und diese sind kommerziell erhältlich. Die folgenden Vektoren werden als Beispiele vorgestellt. Bakterielle: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, Phagescript, psiX174, pBluescript SK, pBSKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTRC99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eukaryontische: pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene); pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). Es kann jedoch jedes andere Plasmid oder jeder andere Vektor verwendet werden, so lange sie im Wirt replizier- und lebensfähig sind.

[0053] Die Promotorbereiche können aus jedem gewünschten Gen unter Verwendung von CAT (Chloramphenicol-Transferase)-Vektoren oder anderen Vektoren mit selektierbaren Markern ausgewählt werden. Zwei geeignete Vektoren sind pKK232-8 und pCM7. Speziell benannte bakterielle Promotoren umfassen lacI, lacZ, T3, T7, gpt, Lambda P_R, P_L und trp. Eukaryontische Promotoren umfassen den sehr frühen Promotor von CMV, den HSV-Thymidin-Kinase-Promotor, die frühen und späten SV40-Promotoren, die LTRs aus Retroviren und den Maus-Metallothionein-I-Promotor. Das Auswählen der geeigneten Vektoren und Promotoren ist den Fachleuten wohlbekannt.

[0054] In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Wirtszellen, welche das vorstehend beschriebene Konstrukt enthalten. Die Wirtszelle kann eine höhere eukaryontische Zelle sein, wie z. B. eine Säugerzelle, oder eine niedere eukaryontische Zelle, wie z. B. eine Hefezelle, oder die Wirtszelle kann eine prokaryontische Zelle sein, wie z. B. eine Bakterienzelle. Das Einbringen des Konstrukts in die Wirtszelle kann durch Calciumphosphat-Transfektion, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion oder Elektroporation bewirkt werden (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology, (1986)).

[0055] Die Konstrukte in den Wirtszellen können in herkömmlicher Weise dazu verwendet werden, um das durch die rekombinante Sequenz codierte Genprodukt herzustellen. Alternativ können die Polypeptide der Erfindung durch herkömmliche Peptid-Synthesegeräte synthetisch hergestellt werden.

[0056] Die reifen Proteine können in Säugerzellen, Hefe, Bakterien oder anderen Zellen unter Kontrolle der geeigneten Promotoren exprimiert werden. Es können ebenfalls zellfreie Translations-Systeme verwendet

werden, um solche Proteine unter Verwendung von RNAs herzustellen, die von den DNA-Konstrukten der vorliegenden Erfindung stammen. Geeignete Clonierungs- und Expressionsvektoren zur Verwendung in prokaryontischen und eukaryontischen Wirten werden in Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Zweite Ausgabe, (Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) beschrieben, dessen Offenlegung hiermit durch Bezugnahme eingeschlossen ist.

[0057] Die Transkription der DNA, welche die Polypeptide der vorliegenden Erfindung codiert, durch höhere Eukaryonten wird durch die Insertion einer Enhancer-Sequenz in den Vektor gesteigert. Enhancer sind cis-wirkende DNA-Elemente von gewöhnlich etwa 10 bis 300 by Länge, die auf einen Promotor wirken, um seine Transkription zu steigern. Beispiele umfassen den SV40-Enhancer auf der späten Seite des Replikationsursprungs (bp 100 bis 270), der Enhancer des frühen Promotors des Cytomegalievirus, der Polyomavirus-Enhancer auf der späten Seite des Replikationsursprungs und Adenovirus-Enhancer.

[0058] Im Allgemeinen umfassen rekombinante Expressionsvektoren Replikationsursprünge und selektierbare Marker, welche die Transformation der Wirtszelle erlauben, wie z. B. das Ampicillin-Resistenzgen aus E. coli und das TRP1-Gen aus S. cerevisiae, sowie einen Promotor, der von einem stark exprimierten Gen stammt, um die Transkription einer sich stromabwärts befindlichen Struktursequenz zu steuern. Solche Promotoren können aus Operons stammen, die unter anderem glycolytische Enzyme wie z. B. die 3-Phosphoglycerat-Kinase (PGK), den α-Faktor, die saure Phosphatase oder Hitzeschock-Proteine codieren. Die heterologe Struktursequenz wird in der geeigneten Phase mit Translations-Initiations- und Terminations-Sequenzen zusammengesetzt. Gegebenenfalls kann die heterologe Sequenz ein Fusionsprotein codieren, das ein N-terminales Kennzeichnungs-Peptid enthält, welches die gewünschten Eigenschaften verleiht, wie z. B. die Stabilisierung oder die vereinfachte Reinigung eines exprimierten rekombinanten Produkts.

[0059] Brauchbare Expressionsvektoren zur Verwendung in Bakterien werden durch die Insertion einer Struktur-DNA-Sequenz, die ein gewünschtes Protein codiert, zusammen mit geeigneten Translations-Initialions- und Terminations-Signalen im funktionellen Leseraster mit einem funktionellen Promotor konstruiert. Der Vektor wird einen oder mehrere selektierbare phänotypische Marker und einen Replikationsursprung enthalten, um den Erhalt des Vektors und wenn gewünscht, auch die Amplifikation innerhalb des Wirtes bereitzustellen. Geeignete prokaryontische Wirte zur Transformation umfassen E. coli, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium und zahlreiche Arten aus den Gattungen Pseudomonas, Streptomyces und Staphylococcus, obwohl Andere ebenfalls wahlweise verwendet werden können.

[0060] Als repräsentatives, aber nicht begrenzendes Beispiel können nützliche Expressionsvektoren zur Verwendung in Bakterien einen selektierbaren Marker und einen bakteriellen Replikationsursprung umfassen, die aus kommerziell erhältlichen Plasmiden stammen, welche genetische Elemente des wohlbekannten Clonierungsvektors pBR322 (ATCC 37017) enthalten. Solche kommerziellen Vektoren umfassen zum Beispiel pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) und pGEMI (Promega Biotec, Madison, WI, USA). Diese "Gerüst"-Bereiche aus pBR322 werden mit einem geeigneten Promotor und der Struktursequenz, die exprimiert werden soll, kombiniert.

[0061] Nach der Transformation eines geeigneten Wirtsstammes und der Anzucht des Wirtsstammes bis zu einer geeigneten Zelldichte, wird der gewählte Promotor durch geeignete Mittel dereprimiert (z. B. eine Temperaturerhöhung oder eine chemische Induktion), und die Zellen werden über einen zusätzlichen Zeitraum kultiviert.

[0062] Die Zellen werden üblicherweise durch Zentrifugation geerntet, durch physikalische oder chemische Mittel aufgebrochen, und der so erhaltene Rohextrakt wird zur weiteren Reinigung aufbewahrt.

[0063] Die zur Expression von Proteinen verwendeten Mikrobenzellen können durch jedes brauchbare Verfahren aufgebrochen werden, einschließlich Einfrier-Auftau-Zyklen, Behandlung mit Ultraschall, mechanischem Aufbrechen oder der Verwendung von zelllysierenden Mitteln.

[0064] Um das rekombinante Protein zu exprimieren, können ebenfalls zahlreiche Säuger-Zellkultur-Systeme verwendet werden. Beispiele für Säuger-Expressions-Systeme umfassen die COS-7-Linie der Affennieren-Fibroblasten, die durch Gluzman, Cell 23: 175 (1981) beschrieben wurde, sowie andere Zelllinien, die in der Lage sind, einen kompatiblen Vektor zu exprimieren, wie z. B. die C127-, 3T3-, CHO-, HeLa- und BHK-Zelllinie. Säuger-Expressionsvektoren umfassen einen Replikationsursprung, einen geeigneten Promotor und Enhancer und ebenfalls alle notwendigen Ribosomen-Bindestellen, Polyadenylierungsstellen, Spleiß-Donor- und Akzeptorstellen, Transkriptions-Terminations-Sequenzen und flankierende nicht-transkribierte 5'-Sequenzen. DNA-Sequenzen, die aus dem viralen Genom von SV40 stammen, wie z. B. der SV40-Replikationsursprung, der frühe Promotor, der Enhancer und die Spleiß- und Polyadenylierungs-Stellen, können dazu verwendet werden, die erforderlichen nicht-transkribierten genetischen Elemente bereitzustellen.

[0065] FGF-10 kann aus den rekombinanten Zellkulturen durch Verfahren wiedergewonnen und gereinigt werden, die schon früher verwendet wurden, einschließlich der Ammoniumsulfat- oder Ethanol-Fällung, der Säure-Extraktion, der Anion- oder Kation-Austausch-Chromatographie, der Phosphocellulose-Chromatographie, der hydrophoben Wechselwirkungs-Chromatographie, der Affinitäts-Chromatographie, der Hydroxylapatit-Chromatographie und der Lectin-Chromatographie. Wenn nötig, können zur Vervollständigung der Konfigu-

ration des reifen Proteins Protein-Rückfaltungsschritte durchgeführt werden. Abschließend kann die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) für die abschließenden Reinigungsschritte verwendet werden.

[0066] Die Polypeptide der vorliegenden Erfindung können ein natürliches, gereinigtes Produkt sein oder ein Produkt aus einem chemischen Syntheseverfahren oder durch rekombinante Verfahren aus einem prokaryontischen oder eukaryontischen Wirt (zum Beispiel durch Bakterien-, Hefe-, höhere Pflanzen-, Insekten- und Säuger-Zellen in Kultur) hergestellt worden sein. In Abhängigkeit von dem bei einem rekombinanten Herstellungsverfahren verwendeten Wirt können die Polypeptide der vorliegenden Erfindung mit aus Säugern oder anderen eukaryontischen Wirten stammenden Kohlenhydraten glycosyliert sein oder können nicht glycosyliert vorliegen. Die Polypeptide der Endung können auch einen Methionin-Aminosäurerest am Anfang enthalten.

[0067] Das Polypeptid der vorliegenden Erfindung kann als Ergebnis seiner Fähigkeit das Wachstum von Gefäß-Endothelzellen zu stimulieren für Behandlungen zur Stimulation der Gefäßneubildung ischämischer Gewebe verwendet werden, die aufgrund verschiedener Krankheitszustände wie z. B. Thrombose, Arteriosklerose und anderen Herzgefäß-Zuständen bestehen.

[0068] FGF-10 kann auch zur Behandlung von Wunden aufgrund von Verletzungen, Verbrennungen, post-operativer Gewebereparatur und Geschwüren verwendet werden, da er die Fähigkeit besitzt, als mitogenes Mittel in verschieden Zellarten zu wirken, wie z. B. in Fibroblasten-Zellen und in Skelettmuskelzellen.

[0069] FGF-10 kann auch dazu verwendet werden, neuronale Schäden zu behandeln und zu verhindern, die bei bestimmten neuronalen Erkrankungen oder neuro-degenerativen Zuständen auftreten, wie z. B. bei der Alzheimer-Krankheit, der Parkinson-Krankheit und dem AIDS-related-Complex. FGF-10 besitzt die Fähigkeit, das Wachstum von Chrondrocyten zu stimulieren und kann daher dazu verwendet werden, die Regeneration von Knochen und Zahnfleisch zu verstärken und Gewebetransplantationen oder Knochenverpflanzungen zu unterstützen.

[0070] FGF-10 kann durch die Stimulation des Wachstums von Keratinocyten auch dazu verwendet werden, die Hautalterung aufgrund von Sonnenbränden zu verhindern.

[0071] FGF-10 kann auch dazu verwendet werden, den Haarverlust zu verhindern, da FGF-10 die Haare bildenden Zellen aktiviert und das Wachstum von Melanocyten fördert. In ähnlicher Weise stimuliert FGF-10 das Wachstum und die Differenzierung von hämatopoietischen Zellen und Knochenmarkszellen, wenn es in Kombination mit anderen Cytokinen verwendet wird.

[0072] FGF-10 kann auch dazu verwendet werden, Organe vor der Transplantation zu erhalten, oder zur Unterstützung der Zellkultur von primären Geweben.

[0073] Gemäß eines weiteren Aspekts der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Verwendung solcher Polypeptide oder Polynucleotide, die solche Polypeptide codieren, für in vitro-Zwecke, die mit wissenschaftlicher Forschung, der Synthese von DNA und der Herstellung von DNA-Vektoren in Beziehung stehen, sowie zum Zwecke der Bereitstellung von diagnostischen und therapeutischen Mitteln zur Behandlung menschlicher Krankheiten bereitgestellt.

[0074] Fragmente des Voll-Längen-FGF-10-Gens können als Hybridisierungs-Sonden für eine cDNA-Genbank verwendet werden, um das Voll-Längen-FGF-10-Gen zu isolieren, sowie um andere Gene zu isolieren, die eine hohe Sequenzähnlichkeit zu diesen Genen oder eine ähnliche biologische Aktivität besitzen. Sonden dieses Typs besitzen im Allgemeinen mindestens 20 Basen. Bevorzugt besitzen diese Sonden jedoch mindestens 30 Basen, und im Allgemeinen sind sie nicht länger als 50 Basen, obwohl sie eine höhere Anzahl an Basen umfassen können. Die Sonde kann auch dazu verwendet werden, einen cDNA-Clon, der einem Volllängen-Transkript entspricht, sowie einen genomischen Clon oder Clone, die das vollständige FGF-10-Gen einschließlich regulatorischer und Promotor-Bereiche, Exons und Introns enthalten, zu identifizieren. Ein Beispiel für eine Durchmusterung umfaßt die Isolierung des codierenden Bereichs des FGF-10-Gens unter Verwendung der bekannten DNA-Sequenz, um eine Oligonucleotid-Sonde zu synthetisieren. Markierte Oligonucleotide mit einer Sequenz, die zu der des Gens der vorliegenden Erfindung komplementär ist, werden dazu verwendet, eine Genbank mit menschlicher cDNA, genomischer DNA oder mRNA zu durchsuchen, um zu bestimmen, mit welchen Mitgliedern der Genbank die Sonde hybridisiert.

[0075] Diese Erfindung stellt ein Verfahren zur Identifizierung der Rezeptoren des FGF-10-Polypeptids bereit. Das Gen, das den Rezeptor codiert, kann durch zahlreiche Verfahren identifiziert werden, die den Fachleuten bekannt sind, zum Beispiel durch Liganden-Panning und FACS-Sortierung (Coligan et al., Currrent Protocols in Immun., 1(2), Kapitel 5, (1991)). Es wird bevorzugt die Expressions-Clonierung verwendet, wobei polyadenylierte RNA aus einer Zelle hergestellt wird, die auf die Polypeptide reagiert, und eine cDNA-Genbank, die aus dieser RNA erzeugt wird, wird in Gruppen einteilt und dazu verwendet, COS-Zellen oder andere Zellen, die nicht auf die Polypeptide reagieren, zu transformieren. Die transfizierten Zellen, die auf Glasobjektträgern angezogen werden, werden dann den markierten Polypeptiden ausgesetzt. Die Polypeptide können auf vielfältige Weisen markiert werden, einschließlich der Iodierung oder dem Einbau einer Erkennungsstelle für eine ortsspezifische Proteinkinase. Nach der Fixierung und der Inkubation werden die Objektträger der autoradiographischen Analyse unterworfen. Die positiven Gruppen werden identifiziert, und es werden Untergruppen hergestellt und unter Verwendung eines wiederholten Untergruppierungs- und Durchsuchungs-Verfahrens er-

neut transfiziert, wodurch schließlich einzelne Clone erhalten werden, die den mutmaßlichen Rezeptor codieren.

[0076] Als alternativer Ansatz zur Identifizierung des Rezeptors können die markierten Polypeptide über Photoaffinität mit Zellmembranen oder extrahierten Präparaten verknüpft werden, die das Rezeptormolekül exprimieren. Das kreuzvernetzte Material wird durch PAGE-Analyse aufgetrennt und einem Röntgenfilm exponiert. Der markierte Komplex, der die Rezeptoren der Polypeptide enthält, kann ausgeschnitten werden, in Peptidfragmente aufgetrennt werden und einer Protein-Mikrosequenzierung unterworfen werden. Die aus der Mikrosequenzierung erhaltene Aminosäuresequenz wird dazu verwendet, ein Reihe an degenerierten Oligonucleotid-Sonden zur Durchmusterung einer cDNA-Genbank zu entwerfen, um die Gene zu identifizieren, die die mutmaßlichen Rezeptoren codieren.

[0077] Diese Erfindung stellt ein Verfahren zu Durchmusterung von Verbindungen bereit, um solche zu identifizieren, die die Wirkung von FGF-10 modulieren. Ein Beispiel eines solchen Testansatzes umfaßt das Zusammenbringen einer Säuger-Fibroblastenzelle, FGF-10, der Verbindung, die durchmustert werden soll, und ^{3}[H]-Thymidin unter Zellkultur-Bedingungen, bei denen sich die Fibrobastenzelle normalerweise teilen würde. Ein Kontroll-Testansatz kann bei Abwesenheit der Verbindung, auf die durchmustert werden soll, durchgeführt werden und mit dem Grad der Fibroblasten-Proliferation bei Anwesenheit der Verbindung verglichen werden, um durch die Bestimmung der Aufnahme von ^{3}[H]-Thymidin für beide Fälle zu bestimmen, ob diese Verbindung die Zellvermehrung von Keratinocyten stimuliert.

[0078] Um Antagonisten zu suchen, kann der gleiche Testansatz hergestellt werden, und es wird die Fähigkeit der Verbindung gemessen, die Zellvermehrung von Fibroblasten zu verhindern, und es wird eine Bestimmung der Potenz des Antagonisten vorgenommen. Der Grad der Fibroblasten-Zellvermehrung wird durch Flüssigszintillations-Chromatographie bestimmt, die den Einbau an ^{3}[H]-Thymidin mißt.

[0079] Bei einem anderen Verfahren wird eine Säugerzelle oder ein Membranpräparat, das den FGF-10-Rezeptor exprimiert, mit markiertem FGF-10 in Anwesenheit der Verbindung inkubiert. Dann kann die Fähigkeit der Verbindung, diese Wechselwirkung zu verstärken oder zu blockieren, gemessen werden. Alternativ wird die Antwort eines bekannten Second-Messenger-Systems nach der Wechselwirkung zwischen FGF-10 und dem Rezeptor gemessen und bei Anwesenheit oder Abwesenheit der Verbindung verglichen. Solche Second-Messenger-Systeme umfassen die cAMP-Guanylat-Cyclase, Ionenkanäle oder die Hydrolyse von Phosphoinositid, sind aber nicht auf diese beschränkt.

[0080] Ein Beispiel für einen möglichen FGF-10-Antagonisten ist ein Antikörper, der an das Polypeptid bindet.

[0081] Ein anderer möglicher FGF-10-Antagonist ist ein Antisense-Konstrukt, das unter Verwendung der Antisense-Technologie hergestellt wird. Die Antisense-Technologie kann dazu verwendet werden, die Genexpression durch Bildung einer Triple-Helix oder einer Antisense-DNA oder -RNA zu kontrollieren, wobei beide Verfahren auf der Bindung eines Polynucleotids an DNA oder RNA basieren. Zum Beispiel wird der codierende 5'-Bereich der Polynucleotidsequenz, der die reifen Polypeptide der vorliegenden Erfindung codiert, dazu verwendet, ein Antisense-RNA-Oligonucleotid mit einer Länge von etwa 10 bis 40 Basen zu entwerfen. Das DNA-Oligonucleotid wird so entworfen, dass es zu einem Bereich des Gens komplementär ist, der an der Transkription beteiligt ist (Triple-Helix – vergleiche Lee et al., Nucl. Acids Res. 6: 3073 (1979); Cooney et al., Science 241: 456 (1988) und Dervan et al., Science 251: 1360 (1991)), wodurch die Transkription und die Produktion von FGF-10 verhindert wird. Das Antisense-RNA-Oligonucleotid hybridisiert mit der mRNA in vivo und blockiert die Translation des mRNA-Moleküls in das FGF-10-Polypeptid (Antisense – Okano, J. Neurochem. 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)). Die Oligonucleotide, die vorstehend beschrieben wurden, können auch in die Zellen eingebracht werden, so dass die Antisense-RNA oder -DNA in vivo exprimiert werden kann, um die Produktion von FGF-10 zu hemmen.

[0082] Die FGF-10-Antagonisten können dazu verwendet werden, das Zellwachstum und die Wirkungen auf die Zellvermehrung durch FGF-10 bei neoplastischen Zellen und Geweben zu verhindern und daher das abnormale Zellwachstum und die Proliferation zu verzögern oder zu verhindern, wie z. B. das Wachstum von Tumoren.

[0083] Die FGF-10-Antagonisten können auch dazu verwendet werden, hypervaskuläre Krankheiten zu verhindern und die Proliferation von Epithel-Linsenzellen nach einer extrakapsulären Katarakt-Operation zu verhindern.

[0084] Die Antagonisten können in einer Zusammensetzung mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger verwendet werden, z. B. wie hierin nachstehend beschrieben wird.

[0085] Die Polypeptide und Antagonisten der vorliegenden Erfindung können in Kombination mit einem geeigneten pharmazeutischen Träger verwendet werden, um ein Arzneimittel zu bilden. Solche Zusammensetzungen umfassen eine therapeutisch wirksame Menge des Polypeptids oder des Antagonisten und einen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Excipienten. Solche Träger umfassen Kochsalzlösung, gepufferte Kochsalzlösung, Dextrose, Wasser, Glycerin, Ethanol und Kombinationen davon, sind aber nicht auf diese beschränkt. Die Formulierung sollte der Art der Verabreichung angepaßt sein.

[0086] Die vorstehend erwähnten Verbindungen können ebenfalls in einer pharmazeutischen Verpackung oder in einem Kit verpackt sein, der einen oder mehrere Behälter umfasst, die mit einer oder mehrerer der Bestandteile der Arzneimittel der Erfindung gefüllt sind. Einem solchen Behälter oder solchen Behältern kann ein Merkblatt beiliegen, das in einer Form abgefaßt ist, die von einer Regierungsbehörde vorgeschrieben wird, welche die Herstellung, die Verwendung oder den Verkauf pharmazeutischer oder biologischer Produkte reguliert, wobei das Merkblatt die Bewilligung der Behörde zur Herstellung, Verwendung oder zum Verkauf für die Verabreichung am Menschen wiedergibt. Darüber hinaus können die Polypeptide und die Antagonisten der vorliegenden Erfindung zusammen mit anderen therapeutischen Verbindungen angewendet werden.

[0087] Die Arzneimittel können in geeigneter Weise verabreicht werden, wie z. B. auf oralen, örtlichen, intravenösen, intraperitonealen, intramuskulären, subcutanen, intranasalen oder intradermalen Wegen. Die Arzneimittel werden in einer Menge verabreicht, die zur Behandlung und/oder zur Vorbeugung der spezifischen Indikation wirksam ist. Im Allgemeinen werden sie in einer Menge von mindestens etwa 10 µg/kg Körpergewicht verabreicht, und in den meisten Fällen werden sie in einer Menge verabreicht, die etwa 8 mg/kg Körpergewicht pro Tag nicht überschreitet. In den meisten Fällen liegt die tägliche Dosis bei etwa 10 µg/kg bis zu etwa 1 mg/kg Körpergewicht, wobei der Weg der Verabreichung, die Symptome usw. berücksichtigt werden. Bei dem speziellen Fall einer örtlichen Verabreichung werden bevorzugt Dosen von etwa 0,1 µg bis zu 9 mg pro cm^2 verabreicht.

[0088] Die FGF-10-Polypeptide und die -Antagonisten, bei denen es sich um Polypeptide handelt, können in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung ebenfalls durch Expression solcher Polypeptide in vivo verwendet werden, was oft als "Gentherapie" bezeichnet wird.

[0089] Somit können zum Beispiel die Zellen mit einem Polynucleotid (DNA oder RNA), das das Polypeptid ex vivo codiert, verändert werden, die gentechnisch veränderten Zellen werden dann einem Patienten zur Verfügung gestellt, der mit dem Polypeptid behandelt werden soll. Solche Verfahren sind im Fachgebiet wohlbekannt. Zum Beispiel können Zellen über Verfahren, die im Fachgebiet bekannt sind, durch die Verwendung eines retroviralen Partikels, der RNA enthält, die das Polypeptid der vorliegenden Erfindung codiert, verändert werden.

[0090] In ähnlicher Weise können Zellen in vivo zur Expression des Polypeptids in vivo verändert werden, zum Beispiel durch Verfahren, die im Fachgebiet bekannt sind. Wie im Fachgebiet bekannt ist, kann eine Produzenten-Zelle zur Herstellung eines retroviralen Partikels, der RNA enthält, welche das Polypeptide der vorliegenden Erfindung codiert, einem Patienten zur gentechnischen Veränderung der Zellen in vivo und zur Expression des Polypeptids in vivo verabreicht werden. Diese und andere Verfahren zur Verabreichung eines Polypeptids der vorliegenden Erfindung durch solche Verfahren sollten den Fachleuten aus den Lehren der vorliegenden Erfindung ersichtlich sein. Zum Beispiel kann es sich bei dem Expressionsvehikel zur gentechnischen Veränderung der Zellen um etwas anderes als einen retroviralen Partikel handeln, wie zum Beispiel um einen Adenovirus, der dazu verwendet werden kann, die Zellen nach der Kombination mit einem geeigneten Vehikel zur Verabreichung in vivo gentechnisch zu verändern.

[0091] Diese Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung des FGF-10-Gens als Teil eines diagnostischen Testansatzes zum Nachweis von Krankheiten oder von Empfänglichkeiten für Krankheiten, die mit der Anwesenheit von Mutationen in den FGF-10 Nucleinsäuresequenzen in Beziehung stehen.

[0092] Individuen, die Mutationen im FGF-10-Gen tragen, können auf DNA-Ebene durch eine Vielzahl an Verfahren nachgewiesen werden. Die Nucleinsäuren zur Diagnose können aus den Zellen eines Patienten, wie z. B. aus Blut, Urin, Speichel, Gewebebiopsie- und Autopsiematerial erhalten werden. Die genomische DNA kann direkt zum Nachweis verwendet werden oder kann vor der Analyse enzymatisch unter Verwendung der PCR amplifiziert werden (Saiki et al., Nature 324: 163–166 (1986)). Die RNA oder die cDNA kann ebenfalls für den gleichen Zweck verwendet werden. Als Beispiel können PCR-Primer, die zu der FGF-10 codierenden Nucleinsäure komplementär sind, dazu verwendet werden, Mutationen in FGF-10 zu identifizieren und zu analysieren. Zum Beispiel können Deletionen und Insertionen durch eine Veränderung der Größe des amplifizierten Produkts im Vergleich zu dem normalen Genotyp nachgewiesen werden. Punktmutationen können durch Hybridsierung der amplifizierten DNA an radioaktiv markierte FGF-10-RNA oder alternativ an radioaktiv markierte FGF-10-Antisense-DNA-Sequenzen nachgewiesen werden. Perfekt gepaarte Sequenzen können von falsch gepaarten Duplexmolekülen durch RNase A-Verdau oder durch Unterschiede in den Schmelztemperaturen unterschieden werden.

[0093] Genetische Untersuchungen, die auf DNA-Sequenzunterschieden basieren, können durch den Nachweis einer Veränderung der elektrophoretischen Mobilität von DNA-Fragmenten in Gelen mit oder ohne denaturierenden Mitteln vorgenommen werden. Kleine Sequenzdeletionen und -insertionen können durch hochauflösende Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden. DNA-Fragmente mit unterschiedlichen Sequenzen können auf denaturierenden Formamid-Gradientengelen unterschieden werden, bei denen die Wanderung der verschiedenen DNA-Fragmente im Gel an unterschiedlichen Positionen gemäß ihrer spezifischen Schmelz- oder Teilschmelztemperaturen verzögert wird (vergleiche z. B. Myers et al., Science 230: 1242 (1985)).

[0094] Sequenzveränderungen an spezifischen Stellen können ebenfalls durch Nuclease-Schutz-Testansät-

ze enthüllt werden, wie z. B. dem Schutz gegen RNase und S1-Nuclease oder dem chemischen Spaltverfahren (z. B. Cotton et al., PNAS, USA 85: 4397–4401 (1985)).

[0095] Somit kann der Nachweis einer spezifischen DNA-Sequenz durch Verfahren wie Hybridisierung, RNase-Schutz, chemische Spaltung, direkte DNA-Sequenzierung oder der Verwendung von Restriktionsenzymen (z. B. Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)) und durch Southern-Blot-Analyse genomischer DNA erreicht werden.

[0096] Neben der eher herkömmlichen Gelelektrophorese und DNA-Sequenzierung, können Mutationen auch durch in situ-Untersuchungen nachgewiesen werden.

[0097] Die vorliegende Erfindung betrifft auch einen diagnostischen Testansatz zum Nachweis veränderter Spiegel des FGF-10-Proteins in zahlreichen Geweben, da eine Überexpression der Proteine im Vergleich zu normalen Gewebeproben die Anwesenheit einer Krankheit oder die Empfänglichkeit für eine Krankheit nachweisen kann, wie zum Beispiel einen Tumor. Testansätze, die dazu verwendet werden, die Spiegel des FGF-10-Proteins in einer aus einem Wirt stammenden Probe nachzuweisen, sind den Fachleuten wohlbekannt und umfassen Radioimmun-Testansätze, kompetitive Bindungs-Testansätze, Western-Blot-Analyse, ELISA-Testansätze und den "Sandwich"-Testansatz. Ein ELISA-Testansatz (Coligan et al., Current Protocols in Immunology 1(2), Kapitel 6, (1991)) umfaßt zu Beginn die Herstellung eines Antikörpers, der für das FGF-10-Antigen spezifisch ist, vorzugsweise einen monoclonalen Antikörper. Zusätzlich wird ein Reporter-Antikörper gegen den monoclonalen Antikörper hergestellt. An den Reporter-Antikörper wird ein nachweisbares Reagenz angehängt, wie z. B. eine radioaktive Substanz, eine fluoreszierende Substanz oder in diesem Beispiel das Meerrettich-Peroxidase-Enzym. Einem Wirt wird eine Probe entnommen und auf einem festen Träger inkubiert, z. B. einer Polystyrol-Schale, welche die Proteine dieser Probe bindet. Alle freien Proteinbindestellen in der Schale werden dann durch die Inkubation mit einem unspezifischen Protein, wie z. B. Rinderserumalbumin, abgedeckt. Als Nächstes wird der monoclonale Antikörper in der Schale inkubiert, wobei sich in dieser Zeit die monoclonalen Antikörper an alle FGF-10-Proteine anheften, die an der Polystyrol-Schale angeheftet sind. Alle ungebundenen monoclonalen Antikörper werden mit Puffer ausgewaschen. Nun wird der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Reporter-Antikörper in die Schale gegeben, was zur Bindung der Reporter-Antikörper an alle monoclonalen Antikörper führt, die an FGF-10 gebunden sind. Die nicht angehefteten Reporter-Antikörper werden dann ausgewaschen. Dann werden Peroxidase-Substrate zu der Schale gegeben, und die Menge der Farbe, die sich in einem bestimmten Zeitraum entwickelt, ist ein Maß für die Menge an FGF-10-Protein, das in einem bestimmten Volumen einer Patientenprobe vorliegt, wenn sie mit einer Standard-Kurve verglichen wird.

[0098] Es kann ein kompetitiver Testansatz verwendet werden, worin FGF-10 spezifische Antikörper an einen festen Träger angeheftet werden, und markierter FGF-10 und eine aus dem Wirt stammende Probe werden über den festen Träger gegeben, und die Menge an Markierung, die zum Beispiel durch Flüssigszintillations-Chromatographie nachgewiesen wird, kann mit der Menge an FGF-10 in der Probe korreliert werden.

[0099] Ein "Sandwich"-Testansatz ist einem ELISA-Testansatz ähnlich. Bei einem "Sandwich"-Testansatz wird FGF-10 über einen festen Träger gegeben und bindet an Antikörper, die auf dem festen Träger angeheftet sind. Dann wird ein zweiter Antikörper an FGF-10 gebunden. Ein dritter Antikörper, der markiert und für den zweiten Antikörper spezifisch ist, wird dann über den festen Träger gegeben und bindet an den zweiten Antikörper, und anschließend kann die Menge quantifiziert werden.

[0100] Die Sequenzen der vorliegenden Erfindung sind auch zur Identifizierung von Chromosomen wertvoll. Die Sequenz wird gezielt an einen bestimmten Ort auf einem individuellen menschlichen Chromosom geleitet und kann mit diesem hybridisieren. Darüber hinaus besteht derzeit ein Bedarf an der Identifizierung bestimmter Orte auf Chromosomen. Um chromosomale Orte zu markieren, sind zur Zeit nur wenige Reagenzien zur Chromosomen-Markierung verfügbar, die auf tatsächlichen Sequenzdaten basieren (Wiederholungssequenzen-Polymorphismen). Die Kartierung von DNAs auf Chromosomen ist gemäß der vorliegenden Endung ein wichtiger erster Schritt bei der Korrelation dieser Sequenzen mit Genen, die mit Krankheiten verbunden sind.

[0101] Kurzgefaßt können Sequenzen auf Chromosomen durch die Herstellung von PCR-Primern (bevorzugt 15–25 bp) aus der cDNA kartiert werden. Die Computeranalyse der nichttranslatierten 3'-Bereiche wird dazu verwendet, rasch die Primer auszuwählen, die nicht mehr als ein Exon in der genomischen DNA überspannen, was andernfalls das Amplifikationsverfahren komplizieren würde. Diese Primer werden dann zur PCR-Durchmusterung von somatischen Zellhybriden verwendet, die individuelle menschliche Chromosomen enthalten. Nur solche Hybride, die das dem Primer entsprechende menschliche Gen enthalten, werden ein amplifiziertes Fragment liefern.

[0102] Die PCR-Kartierung somatischer Zellhybride ist ein schnelles Verfahren zur Zuordnung einer bestimmten DNA zu einem bestimmten Chromosom. Unter Verwendung der gleichen Oligonucleotid-Primer vorliegenden Erfindung kann eine genauere Lokalisierung mit Gruppen von Fragmenten aus spezifischen Chromosomen oder Sammlungen von großen genomischen Clonen in analoger Weise erreicht werden. Andere Kartierungsstrategien, die in ähnlicher Weise dazu verwendet werden können, um Chromosomen zu kartieren, umfassen die in situ-Hybridisierung, die Vordurchmusterung mit markierten, durch Durchflußcytometrie sortierten

Chromosomen und die Vorauswahl durch eine Hybridisierung, um Chromosomen-spezifische cDNA-Genbanken zu konstruieren.

[0103] Die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) eines cDNA-Clons an eine Metaphasen-Chromosomenausbreitung kann dazu verwendet werden, eine präzise chromosomale Lokalisierung in einem Schritt vorzunehmen. Dieses Verfahren kann mit cDNAs durchgeführt werden, die nur 500 oder 600 Basen lang sind; jedoch haben Clone, die größer als 2.000 by sind, eine höhere Wahrscheinlichkeit, an einen einzelnen chromosomalen Ort mit ausreichender Signalintensität für einen einfachen Nachweis zu binden. FISH erfordert die Verwendung der Clone, aus denen die exprimierte Markierungssequenz (ein Fragment des Gens der vorliegenden Erfindung) stammt, und es gilt: je länger, desto besser. Zum Beispiel sind 2.000 by gut, 4.000 sind besser, und mehr als 4.000 sind vermutlich nicht nötig, um gute Ergebnisse in einem angemessenen Zeitraum zu erhalten. Für eine Übersicht über dieses Verfahren vgl. Verma et al., Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York (1988).

[0104] Nachdem eine Sequenz an einem präzisen chromosomalen Ort kartiert ist, kann die physikalische Position der Sequenz auf dem Chromosom mit den Daten der genetischen Kartierung korreliert werden. Solche Daten finden sich zum Beispiel in V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (über das Welch Medical Library der John Hopkins University online verfügbar). Die Beziehung zwischen den Genen und den im gleichen chromosomalen Bereich kartierten Krankheiten wird dann durch Linkage-Analyse (gemeinsame Vererbung physikalisch benachbarter Gene) identifiziert.

[0105] Als Nächstes ist es nötig, die Unterschiede in der cDNA oder in der genomischen Sequenz zwischen betroffenen und nicht betroffenen Individuen zu bestimmen. Wenn eine Mutation in einigen oder in allen der betroffenen Individuen beobachtet wird, aber nicht in irgendeinem normalen Individuum, ist die Mutation wahrscheinlich die Ursache der Krankheit.

[0106] Mit der derzeitigen Auflösungsgenauigkeit der physikalischen und genetischen Kartierungsverfahren kann eine cDNA, die präzise in einem chromosomalen Bereich lokalisiert wurde, der mit der Krankheit verbunden ist, eines von 50 bis 500 möglichen verursachenden Genen darstellen. (Dies setzt eine Kartierungs-Auflösungsgenauigkeit von 1 Megabase und ein Gen pro 20 kb voraus).

[0107] Die Polypeptide, ihre Fragmente oder Zellen, die sie exprimieren, können als Immunogene verwendet werden, um Antikörper gegen sie herzustellen. Diese Antikörper können zum Beispiel polyclonale oder monoclonale Antikörper sein. Die vorliegende Endung umfaßt auch chimäre, Einzelketten- und humanisierte Antikörper sowie Fab-Fragmente oder das Produkt einer Fab-Expressions-Genbank. Zur Produktion solcher Antikörper und Fragmente können verschiedene im Fachgebiet bekannte Verfahren verwendet werden.

[0108] Antikörper, die gegen die Polypeptide erzeugt wurden, die einer Sequenz der vorliegenden Endung entsprechen, können durch direkte Injektion der Polypeptide in ein Tier oder durch Verabreichung der Polypeptide an ein Tier, vorzugsweise ein nicht menschliches, erhalten werden. Der so erhaltene Antikörper wird dann die Polypeptide selber binden. Auf diese Weise kann sogar eine Sequenz, die nur ein Fragment der Polypeptide codiert, dazu verwendet werden, Antikörper zu erzeugen, welche die vollständigen nativen Polypeptide binden. Solche Antikörper können dann dazu verwendet werden, das Polypeptid aus einem Gewebe zu isolieren, welches das Polypeptid exprimiert.

[0109] Zur Herstellung monoclonaler Antikörper kann jedes Verfahren verwendet werden, das Antikörper liefert, die durch kontinuierliche Kultur einer Zelllinie produziert werden. Beispiele umfassen die Hybridom-Technik (Köhler und Milstein, 1975, Nature 256: 495–497), die Triom-Technik, die Hybridom-Technik mit menschlichen B-Zellen (Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4: 72) und die EBV-Hybridom-Technik zur Herstellung menschlicher monoclonaler Antikörper (Cole et al., 1985, in: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. S. 77–96).

[0110] Beschriebene Verfahren zur Produktion von Einzelketten-Antikörpern (U.S.-Patent 4,946,778) können so angepasst werden, dass sie Einzelketten-Antikörper gegen immunogene Polypeptidprodukte dieser Endung herstellen. Es können auch transgene Mäuse dazu verwendet werden, humanisierte Antikörper gegen immunogene Polypeptidprodukte dieser Erfindung herzustellen.

[0111] Die vorliegende Endung wird unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele weiter beschrieben; es sollte jedoch beachtet werden, dass die vorliegende Erfindung nicht auf solche Beispiele begrenzt ist. Alle Teil- oder Mengenangaben erfolgen über das Gewicht, sofern nicht anders angegeben.

[0112] Um das Verständnis der folgenden Beispiele zu erleichtern, werden bestimmte, häufig vorkommende Verfahren und/oder Ausdrücke beschrieben.

[0113] "Plasmide" werden durch ein kleingeschriebenes p gekennzeichnet, dem Großbuchstaben und/oder Zahlen vorangestellt sind und/oder folgen. Die hierin verwendeten Ausgangs-Plasmide sind entweder kommerziell erhältlich, allgemein ohne Einschränkungen erhältlich oder können aus erhältlichen Plasmiden gemäß veröffentlichten Verfahren hergestellt werden. Darüber hinaus sind den beschriebenen Plasmiden äquivalente Plasmide im Fachgebiet bekannt und den Fachleuten ersichtlich.

[0114] "Verdau" einer DNA bezieht sich auf die katalytische Spaltung der DNA mit einem Restriktionsenzym, das nur auf eine bestimmte Sequenz in der DNA wirkt. Die verschiedenen hierin verwendeten Restriktionsen-

zyme sind kommerziell erhältlich, und ihre Reaktionsbedingungen, Cofaktoren und anderen Erfordernisse wurden so verwendet, als wären sie dem Fachleuten bekannt. Für analytische Zwecke werden typischerweise 1 µg Plasmid oder DNA-Fragment mit etwa 2 Einheiten Enzym in etwa 20 µl Pufferlösung verwendet. Zum Zwecke der Isolierung von DNA-Fragmenten zur Konstruktion von Plasmiden werden typischerweise 5 bis 50 µg DNA mit 20 bis 250 Einheiten Enzym in einem größeren Volumen verdaut. Geeignete Puffer und Substratmengen für bestimmte Restriktionsenzyme werden durch den Hersteller angegeben. Es werden normalerweise Inkubationszeiten von etwa 1 Stunde bei 37°C verwendet, aber diese können gemäß den Angaben des Lieferanten variieren. Nach dem Verdau wird das Reaktionsgemisch direkt auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, um das gewünschte Fragment zu isolieren.

[0115] Die Größentrennung der gespaltenen Fragmente wird unter Verwendung eines 8-prozentigen Polyacrylamidgels vorgenommen, das durch Goeddel, D. et al., Nucleic Acids Res. 8: 4057 (1980) beschrieben wurde.

[0116] "Oligonucleotid" bezieht sich entweder auf ein einzelsträngiges Polydesoxynucleotid oder zwei komplementäre Polydesoxynucleotid-Stränge, die chemisch synthetisiert werden können. Solche synthetischen Oligonucleotide besitzen keinen 5'-Phosphatrest und werden daher ohne die Anfügung eines Phosphatrestes mit Hilfe eines ATPs in Gegenwart einer Kinase mit einem anderen Oligonucleotid nicht ligieren. Ein synthetisches Oligonucleotid wird jedoch mit einem Fragment ligieren, das nicht dephosphoryliert wurde.

[0117] "Ligierung" bezieht sich auf den Vorgang der Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen zwei doppelsträngigen Nucleinsäurefragmenten (Maniatis, T., et al., Id. S. 146). Wenn nicht anders ausgeführt, kann die Ligierung unter Verwendung bekannter Puffer und Bedingungen mit 10 Einheiten T4-DNA-Ligase ("Ligase") pro 0,5 µg von etwa äquimolaren Mengen der DNA-Fragmente, die ligiert werden sollen, durchgeführt werden.

[0118] Wenn nicht anders angegeben, wurde die Transformation, wie in Graham, F. und Van der Eb, A., Virology 52: 456–457 (1973) beschrieben, durchgeführt.

Beispiel 1

Die Gewebsverteilung der FGF-10-mRNA in reifen menschlichen Geweben.

[0119] Um die Expression der FGF-10-mRNA zu untersuchen, wurde eine Northern-Analyse mit 2 µg Poly(A^+)-mRNA aus verschiedenen reifen menschlichen Geweben unter Verwendung der radioaktiv markierten vollständigen FGF-10-cDNA als Sonde durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass eine 1,4 kb lange Botschaft im Skelettmuskel am häufigsten, in einem mittleren Spiegel im Herzen, dem Gehirn, der Plazenta, der Niere und dem Pankreas und in einem niedrigeren Spiegel in der Leber exprimiert wird. Im Herz liegen ferner 3 weitere Fragmente mit Größen von 4,4 kb, 2,4 kb und 0,5 kb vor. Es ist wahrscheinlich, dass diese unterschiedlichen mRNA-Größen im Herz durch alternatives Spleißen entstehen. Im Gehirn liegt ebenfalls eine 4,4 kb lange mRNA vor. Der Nylon-Blot, der 2 µg PolyA^+-mRNA aus verschiedenen reifen menschlichen Geweben an die Membran gebunden enthielt, wurde von Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA bezogen. Der Blot wurde mit der vollständigen FGF-10-cDNA hybridisiert, die mit radioaktivem dCTP durch Markierung mit Zufallsprimern markiert worden war. Die Hybridisierung wurde in 7% SDS, 0,5 M $NaPO_4$, pH 7,2 und 1% BSA bei 65°C über Nacht durchgeführt. Nach einer 2-maligen 30-minütigen Waschung in 0,2 X SSC, 0,1% SDS bei 65°C wurde der Blot mit einer Verstärkerfolie einem Röntgenfilm über Nacht exponiert.

Beispiel 2

Die Expression von FGF-10 durch in vitro-Transkription und -Translation.

[0120] Die FGF-10-cDNA, ATCC # 75696 wurde in vitro-transkribiert und -translatiert, um die Größe des translatierbaren Polypeptids zu bestimmen, das durch die Volllängen- und die Teillängen-FGF-10-cDNA codiert wird. Die Volllängen- und die Teillängen-cDNA-Insertionen von FGF-10 im Vektor pBluescript SK wurden über PCR mit drei Primerpaaren amplifiziert: 1) dem reversen und dem Vorwärts-Primer von M13; 2) dem reversen Primer von M 13 und dem FGF-Primer P20; 3) dem reversen Primer von M 13 und dem FGF-Primer P22. Die Sequenzen dieser Primer sind wie folgt.

M13-2 reverser Primer: 5'-ATGCTTCCGGCTCGTATG-3' (SEQ ID Nr. 3)

[0121] Diese Sequenz befindet sich stromaufwärts des 5'-Endes der FGF-10-cDNA-Insertion im pBluescript-Vektor und befindet sich in der Antisinn-Orientierung bezüglich der cDNA. Zwischen diesem Primer und der FGF-10-cDNA befindet sich eine T3-Promotorsequenz.

M13-2 Vorwärts-Primer: 5'-GGGTTTTCCCAGTCACGAC-3' (SEQ ID Nr. 4)

[0122] Diese Sequenz befindet sich stromabwärts des 3'-Endes der FGF-10-cDNA-Insertion im pBluescript-Vektor und befindet sich in der Antisinn-Orientierung bezüglich der cDNA-Insertion.

FGF-Primer P20: 5'-GTGAGATCTGAGGGAAGAAGGGGA-3' (SEQ ID Nr. 5)

[0123] Die 15 by lange Sequenz dieses Primers zum 3'-Primen befindet sich in der Antisinn-Orientierung bezüglich der FGF-10-cDNA-Sequenz an den Basenpaaren 780–766, die 12 by stromabwärts des Stopp-Codons liegen.

FGF-Primer P22: 5'-CCACCGATAATCCTCCTT-3' (SEQ ID Nr. 6)

[0124] Diese Sequenz befindet sich innerhalb der FGF-10-cDNA in der Antisinn-Orientierung und liegt etwa 213 by stromabwärts des Stopp-Codons.

[0125] Die PCR-Reaktion mit allen drei Primerpaaren liefert amplifizierte Produkte mit der T3-Promotorsequenz vor der cDNA-Insertion. Alle drei Primerpaare liefern PCR-Produkte, die das Volllängen-FGF-10-Polypeptid codieren.

[0126] Etwa 1 µg des PCR-Produkts des ersten Primerpaars, 0,3 µg des PCR-Produkts des zweiten Primerpaars und 0,3 µg des PCR-Produkts des dritten Primerpaars wurden zur in vitro-Transkription/Translation verwendet. Die in vitro-Transkriptions/Translations-Reaktion wurde in 25 µl Volumen unter Verwendung des Coupled Reticulocyte Lysate Systems T_NT^{TM} (Promega, Katalog-Nr. L4950) durchgeführt. Genau gesagt enthält das Reaktionsgemisch 12,5 µl des T_NT-Kaninchen-Retikulocytenlysats, 2 µl des T_NT-Reaktionspuffers, 1 µl T3-Polymerase, 1 µl eines 1 mM Aminosäuregemisches (ohne Methionin), 4 µl ^{35}S-Methionin (> 1000 Ci/mmol, 10 mCi/ml), 1 µl an RNasin Ribonuclease-Inhibitor (40 U/µl) und 0,5 oder 1 µg an PCR-Produkten. Es wurde Nuclease-freies H_2O verwendet, um das Volumen auf 25 µl einzustellen. Die Reaktion wurde 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Fünf Mikroliter des Reaktionsprodukts wurden auf einem 4–20%-igen SDS-PAGE-Gradientengel untersucht. Nach der Fixierung in 25% Isopropanol und 10% Essigsäure wurde das Gel getrocknet und bei –70°C über Nacht einem Röntgenfilm exponiert.

[0127] Wie **Fig.** 3 zeigt, liefern die PCR-Produkte, die die Volllängen-FGF-10-cDNA und die cDNA enthielten, der etwa 340 by und etwa 140 by im nicht translatierten 3'-Bereich (3'-UTR) fehlten, translatierte Produkte mit der gleichen Länge, deren Molekulargewichte auf etwa 19 kDa geschätzt wurden (Bahnen 2–4).

[0128] Im Hinblick auf die vorstehend angeführten Lehren sind zahlreiche Modifizierungen und Variationen der vorliegenden Erfindung möglich, und daher kann die Erfindung im Rahmen der angehängten Ansprüche anders als im Einzelfall beschrieben durchgeführt werden.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER: HU, ET AL.

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Fibroblasten-Wachstumsfaktor-10

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSE: CARELLA, BYRNE, BAIN, GILFILLAN, CECCHI, STEWART & OLSTEIN
(B) STRASSE: 6 BECKER FARM ROAD
(C) STADT: ROSELAND
(D) STAAT: NEW JERSEY
(E) LAND: USA
(F) POSTLEITZAHL: 07068

(v) COMPUTER LESBARE FORM:

(A) ART DES MEDIUMS: 3,5 INCH DISKETTE
(B) COMPUTER: IBM PS/2
(C) BETRIEBSSYSTEM: MS-DOS
(D) SOFTWARE: WORD PERFECT 5.1

(vi) ZUR VORLIEGENDEN ANMELDUNG:

(A) ANMELDUNGS-NUMMER:
(B) EINREICHUNGS-DATUM: Gleichzeitig
(C) KLASSIFIZIERUNG:

(vii) ZUR FRÜHEREN ANMELDUNG:

(A) ANMELDUNGS-NUMMER: 08/207,412
(B) EINREICHUNGS-DATUM: 8. März 1994

(viii) ANWALT/VERTRETER-INFORMATION:

(A) NAME: FERRARO, GREGORY D.
(B) REGISTRIERUNGS-NUMMER: 36.134
(C) REFERENZ/AKTEN-NUMMER: 325800-347

(ix) TELEKOMMUNIKATIONS-INFORMATION:

(A) TELEFON: 201-994-1700
(B) TELEFAX: 201-994-1744

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 1:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:
(A) LÄNGE: 1121 BASENPAARE
(B) ART: NUCLEINSÄURE
(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG
(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID Nr.: 1:

```
GGCAAAGTGG GATGATCTGT CACTACACCT GCAGCACCAC GCTCGGAGGA CAGCTCCTGC   60
CTGCAGCTTC CAGACCCAGG AAGCCTGAGG GGAAGGAAGG AAGTACGGGC GAAATCATCA  120
GATTGGCTTC CCAGATTTGG GAATCTGAAG CGGGCCCACA TCTTCCGGCC AACTTCCATT  180
GAACTTCCCA GCACTCGAAA GGGACCGAAA TGGAGAGCAA AGAACCCCAG CTCAAAGGGA  240
TTGTGACAAG GTTATTCAGC CAGCAGGGAT ACTTCCTGCA GATGCACCCA GATGGTACCA  300
TTGATGGGAC CAAGGACGAA AACAGCGACT ACACTCTCTT CAATCTAATT CCCGTGGGCC  360
TGCGTGTAGT GGCCATCCAA GGAGTGAAGG CTAGCCTCTA TGTGGCCATG AATGGTGAAG  420
GCTATCTCTA CAGTTCAGAT GTTTTCACTC CAGAATGCAA ATTCAAGGAA TCTGTGTTTG  480
AAAACTACTA TGTGATCTAT TCTTCCACAC TGTACCGCCA GCAAGAATCA GGCCGAGCTT  540
GGTTTCTGGG ACTCAATAAA GAAGGTCAAA TTATGAAGGG GAACAGAGTG AAGAAAACCA  600
AGCCCTCATC ACATTTTGTA CCGAAACCTA TTGAAGTGTG TATGTACAGA GAACCATCGC  660
TACATGAAAT TGGAGAAAAA CAAGGGCGTT CAAGGAAAAG TTCTGGAACA CCAACCATGA  720
ATGGAGGCAA AGTTGTGAAT CAAGATTCAA CATAGCTGAG AACTCTCCCC TTCTTCCCTC  780
TCTCATCCCT TCCCCTTCCC TTCCTTCCCA TTTACCCATT TCCTTCCAGT AAATCCACCC  840
AAGGAGAGGA AAATAAAATG ACAACGCAAG CACCTAGTGG CTAAGATTCT GCACTCAAAA  900
TCTTCCTTTG TGTAGGACAA GAAAATTGAA CCAAAGCTTG CTTGTTGCAA TGTTGTAGAA  960
AATTCACGTT CACAAAGATT ATCACACTTA AAAGCAAAGG AAAAAATAAA TCAGAACTCC 1020
ATAAATATTA AACTAAACTG TATTGTTATT AGTAGAAGGC TAATTGTAAT GAAGACATTA 1080
ATAAAGGTGA AATAAACTTA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA A                      1121
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 2:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:
(A) LÄNGE: 181 AMINOSÄUREN
(B) ART: AMINOSÄURE
(C) STRANGFORM:
(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) ART DES MOLEKÜLS: PROTEIN

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID Nr.: 2:

Met Glu Ser Lys Glu Pro Gln Leu Lys Gly Ile Val Thr Arg Leu
5 10 15
Phe Ser Gln Gln Gly Tyr Phe Leu Gln Met His Pro Asp Gly Thr
20 25 30
Ile Asp Gly Thr Lys Asp Glu Asn Ser Asp Tyr Thr Leu Phe Asn
35 40 45
Leu Ile Pro Val Gly Leu Arg Val Val Ala Ile Gln Gly Val Lys
50 55 60
Ala Ser Leu Tyr Val Ala Met Asn Gly Glu Gly Tyr Leu Tyr Ser
65 70 75
Ser Asp Val Phe Thr Pro Glu Cys Lys Phe Lys Glu Ser Val Phe
80 85 90
Glu Asn Tyr Tyr Val Ile Tyr Ser Ser Thr Leu Tyr Arg Gln Gln
95 100 105
Glu Ser Gly Arg Ala Trp Phe Leu Gly Leu Asn Lys Glu Gly Gln
110 115 120
Ile Met Lys Gly Asn Arg Val Lys Lys Thr Lys Pro Ser Ser His
125 130 135
Phe Val Pro Lys Pro Ile Glu Val Cys Met Tyr Arg Glu Pro Ser
140 145 150
Leu His Glu Ile Gly Glu Lys Gln Gly Arg Ser Arg Lys Ser Ser
155 160 165
Gly Thr Pro Thr Met Asn Gly Gly Lys Val Val Asn Gln Asp Ser
170 175 180
Thr

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 3:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:
(A) LÄNGE: 18 BASENPAARE
(B) ART: NUCLEINSÄURE
(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG
(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) ART DES MOLEKÜLS: OLIGONUCLEOTID

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID Nr.: 3:

ATGCTTCCGG CTCGTATG

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 4:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:
(A) LÄNGE: 19 BASENPAARE
(B) ART: NUCLEINSÄURE
(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG
(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) ART DES MOLEKÜLS: OLIGONUCLEOTID

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID Nr.: 4:

GGGTTTTCCC AGTCACGAC

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 5:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:
(A) LÄNGE: 24 BASENPAARE
(B) ART: NUCLEINSÄURE
(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG
(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) ART DES MOLEKÜLS: OLIGONUCLEOTID

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID Nr.: 5:

GTGAGATCTG AGGGAAGAAG GGGA

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID Nr.: 6:

(i) EIGENSCHAFTEN DER SEQUENZ:
(A) LÄNGE: 18 BASENPAARE
(B) ART: NUCLEINSÄURE
(C) STRANGFORM: EINZELSTRANG
(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) ART DES MOLEKÜLS: OLIGONUCLEOTID

(xi) BESCHREIBUNG DER SEQUENZ: SEQ ID Nr.: 6:

CCACCGATAA TCCTCCTT

Patentansprüche

1. Polynucleotid, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
(a) Polynucleotiden, die das Polypeptid mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz von SEQ ID NR. 2 codieren;
(b) Polynucleotiden, die die codierende Sequenz wie in SEQ ID NR. 1 dargestellt haben;
(c) Polynucleotiden, die das Polypeptid mit der Aminosäuresequenz codieren, die von der in ATCC 75696 enthaltenen cDNA codiert wird;
(d) Polynucleotiden, die die codierende Sequenz der in ATCC 75696 enhaltenen cDNA besitzen;
(e) Polynucleotiden, umfassend eine Nucleotidsequenz, die ein Fragment eines Polypeptids codiert, das von einem Polynucleotid aus (a) bis (d) codiert wird, wobei das Fragment die biologische Aktivität des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 10 (FGF-10) hat; und
(f) Polynucleotiden, deren komplementärer Strang unter stringenten Bedingungen mit einem Polynucleotid aus

(a) bis (e) hybridisiert und die ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 10 (FGF-10) codieren; oder der komplementäre Strang eines solchen Polynucleotids.

2. Polynucleotid nach Anspruch 1, das eine DNA ist.

3. DNA nach Anspruch 2, die eine genomische DNA ist.

4. Polynucleotid nach Anspruch 1, das eine RNA ist.

5. Vektor, der das Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 enthält.

6. Vektor nach Anspruch 5, wobei das Polynucleotid mit Expressionskontrollsequenzen funktionell verbunden ist, die die Expression in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen gestatten.

7. Wirtszelle, die mit dem Vektor nach Anspruch 5 oder 6 genetisch verändert wurde.

8. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids, umfassend: das Züchten der Wirtszelle nach Anspruch 7 und Gewinnen des von dem Polynucleotid codierten Polypeptids aus der Kultur.

9. Verfahren zur Herstellung von Zellen, die in der Lage sind, ein Polypeptid zu exprimieren, umfassend die genetische Veränderung von Zellen mit dem Vektor nach Anspruch 5 oder 6.

10. Polypeptid, codiert von einem Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 oder erhältlich durch das Verfahren nach Anspruch 8.

11. Antikörper, der das Polypeptid nach Anspruch 10 spezifisch bindet.

12. Verbindung, die als Antagonist gegen das Polypeptid nach Anspruch 10 wirksam ist, wobei die Verbindung ein Antikörper nach Anspruch 11 ist oder wobei die Verbindung ein Antisense-Konstrukt ist, das spezifisch mit einem Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 hybridisiert.

13. Nucleinsäuremolekül, das spezifisch mit einem Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 4 hybridisiert.

14. Arzneimittel, umfassend das Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 4, das Polypeptid nach Anspruch 10 und/oder die Verbindung nach Anspruch 12 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

15. Diagnostische Zusammensetzung, umfassend das Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1 bis 4, das Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 13 oder einen Antikörper nach Anspruch 11.

16. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 10 oder eines Polynucleotids nach einem der Ansprüche 1 bis 4 für die Herstellung eines Arzneimittels für die Stimulation der Revaskularisierung ischämischer Gewebe, für die Behandlung von Wunden, Geschwüren oder neuronalen Schäden, für die Verstärkung der Regeneration von Knochen und Periodontium, für die Vorbeugung von Hautalterung oder Haarausfall oder für die Erhaltung von Organen vor der Transplantation.

17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei der neuronale Schaden Folge einer neuronalen Erkrankung oder eines neurodegenerativen Zustands ist.

18. Verwendung nach Anspruch 17, wobei der neurodegenerative Zustand Parkinson-Krankheit, Alzheimer-Krankheit oder AIDS-verwandter Komplex (ARC) ist.

19. Verwendung der Verbindung nach Anspruch 12 für die Herstellung eines Arzneimittels für die Verzögerung oder Verhinderung abnormalen Zellwachstums und abnormaler Zellvermehrung oder für die Vorbeugung hypervaskulärer Erkrankungen oder für die Vorbeugung gegen die Vermehrung epithelialer Linsenzellen nach extrakapsularer Kataraktoperation.

20. Verfahren zur Identifizierung von Verbindungen, die als Agonisten und Antagonisten von FGF-10 aktiv sind, umfassend:

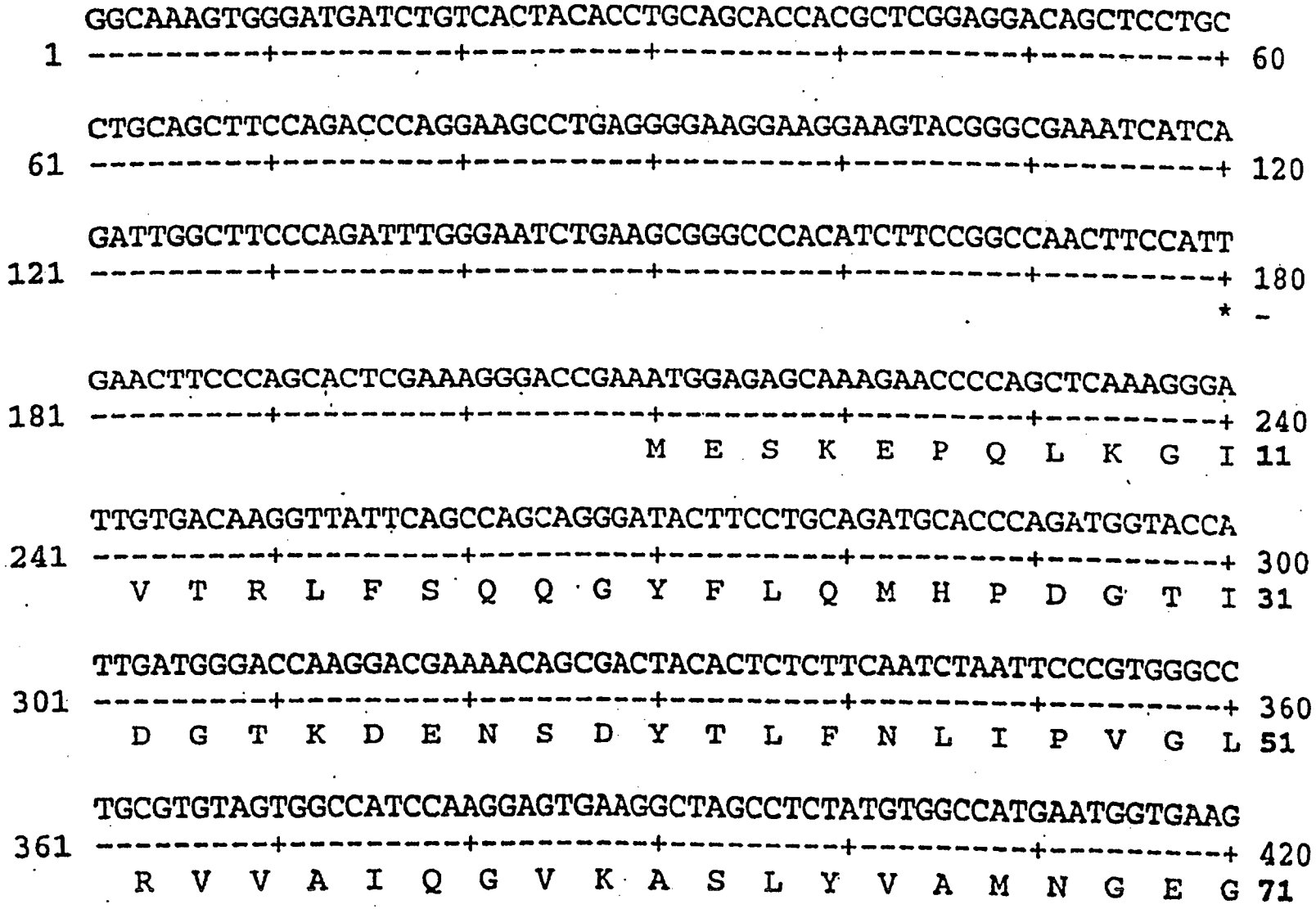
(a) Zusammenbringen von FGF-10, einer Verbindung, die untersucht werden soll, und eines Reaktionsgemischs, das Zellen enthält, unter Bedingungen, unter denen die Zellen normalerweise von FGF-10 stimuliert werden, wobei das Reaktionsgemisch eine Markierung enthält, die in die Zellen eingebaut wird, wenn diese sich vermehren; und
(b) Bestimmen des Ausmaßes der Vermehrung der Zellen, um festzustellen, ob die Verbindung ein wirksamer Agonist oder Antagonist ist.

21. Verfahren zur Diagnose einer Erkrankung oder der Neigung zu einer Erkrankung, die mit einer Unterexpression des Polypeptids nach Anspruch 10 im Zusammenhang steht, umfassend:
die Bestimmung einer Mutation in der Nucleinsäuresequenz, die das Polypeptid codiert.

22. Diagnostisches Verfahren, umfassend: die Analyse auf das Vorliegen eines Polypeptids nach Anspruch 10 in einer Probe, die einem Wirt entnommen wurde.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

FIG. 1A



VERBINDE MIT FIG. 1B

VERBINDE MIT FIG. 1A

FIG. 1B

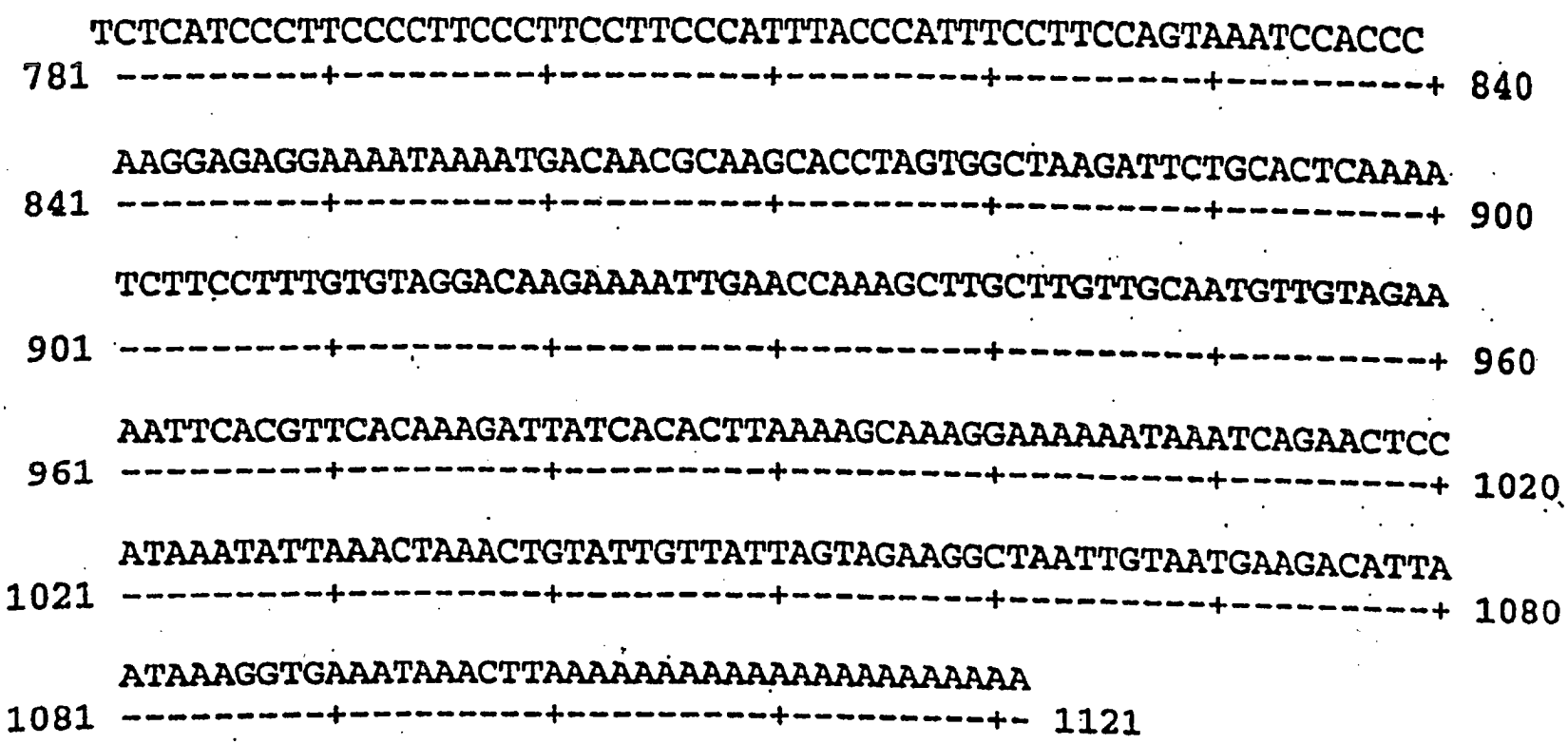


VERBINDE MIT FIG. 1C

DE 695 31 892 T2 2004.07.22

VERBINDE MIT FIG. 1B

FIG. 1C



DE 695 31 892 T2 2004.07.22

FIG. 2A

```
        1                                                                50
Fgf-1   .......... .......... .......... .......... ..........
Fgf-2   .......... .......... ..LGDRGRGR ALPGGRLGGR GRGRAPERVG
Fgf-4   .......... MS.GPGTAAV ALLPAVLLAL LA........ .PWAGRGGAA
Fgf-6   MALGQKLFIT MSRGAGRLQG TLWALVFLGI LV........ .GMVVPSPAG
Fgf-5   .......... .......MSL SFLLLLFFSH LILSAWAHGE KRLAPKGQPG
Fgf-9   .......... .......... .......... .......... ..MAPLGEVG
Fgf10   .......... .......... .......... .......... ..........
Fgf-3   .......... .......... .......... .......... ..........
Fgf-7   .......... .......... .......... .........M HKWILTWILP

        51                                                              100
Fgf-1   .......... .......... .......MAE GEITTFTALT EKFN...LPP
Fgf-2   GRGRGRGTAA PRAAPAARGS RPGPAGTMAA GSITTLPALP EDGGSGAFPP
Fgf-4   APTAPNGTLE AELERRWESL VALSLARLPV AA..QPKEAA VQSGAGDYLL
Fgf-6   TR.ANNTLLD S...RGWGTL LSRSRAGLAG EI......AG VNWESG.YLV
Fgf-5   PAATDRNPIG SSSRQSSSSA MSSSSASSSP AASLGSQGSG LEQSSFQWSP
Fgf-9   NYFGVQDAVP FGNVPVLPVD SPVLLSDHLG QSEAGGLPRG PAVTDLDHLK
Fgf10   .......... .......... .......... .......... .MESKEPQLK
Fgf-3   .......... MGLIWLLLLS LLEPGWPAAG PGARLRRDAG GRGGVYEHLG
Fgf-7   TLLYRSCFHI ICLVGTISLA CNDMTPEQMA TNVNCSSPER HTRSYDYMEG

        101                                                             150
Fgf-1   GNYKKPKLLY CSNGGHFLRI LPDGTVDGTR DRSDQHIQLQ LSAESVGEVY
Fgf-2   GHFKDPKRLY CKNGGFFLRI HPDGRVDGVR EKSDPHIKLQ LQAEERGVVS
Fgf-4   GIKRLRRLYC NVGIGFHLQA LPDGRIGGAH ADT.RDSLLE LSPVERGVVS
Fgf-6   GIKRQRRLYC NVGIGFHLQV LPDGRISGTH EEN.PYSLLE ISTVERGVVS
Fgf-5   SGRRTGSLYC RVGIGFHLQI YPDGKVNGSH EAN.MLSVLE IFAVSQGIVG
```

VERBINDE MIT FIG. 2B

VERBINDE MIT FIG. 2A

FIG. 2B

```
Fgf-9   GILRRRQLYC RT..GFHLEI FPNGTIQGTR KDHSRFGILE FISIAVGLVS
Fgf10   GIVTR..LFS QQ..GYFLQM HPDGTIDGTK DENSDYTLFN LIPVGLRVVA
Fgf-3   GAPRRRKLYC AT..KYHLQL HPSGRVNGSL .ENSAYSILE ITAVEVGIVA
Fgf-7   GDIRVRRLFC RT..QWYLRI DKRGKVKGTQ EMKNNYNIME IRTVAVGIVA

        151                                                 200
Fgf-1   IKSTETGQYL AMDTDGLLYG SQTPNEECLF LERLEENHYN TYISKKH...
Fgf-2   IKGVCANRYL AMKEDGRLLA SKCVTDECFF FERLESNNYN TYRSRKY...
Fgf-4   IFGVASRFFV AMSSKGKLYG SPFFTDECTF KEILLPNNYN AYESYKY...
Fgf-6   LFGVRSALFV AMNSKGRLYA TPSFQEECKF RETLLPNNYN AYESDLY...
Fgf-5   IRGVFSNKFL AMSKKGKLHA SAKFTDDCKF RERFQENSYN TYASAIH...
Fgf-9   IRGVDSGLYL GMNEKGELYG SEKLTQECVF REQFEENWYN TYSSNLY...
Fgf10   IQGVKASLYV AMNGEGYLYS SDVFTPECKF KESVFENYYV IYSSTLY...
Fgf-3   IRGLFSGRYL AMNKRGRLYA SEHYSAECEF VERIHELGYN TYASRLYRTV
Fgf-7   IKGVESEFYL AMNKEGKLYA KKECNEDCNF KELILENHYN TYASAKW...

        201                                                 250
Fgf-1   .......... .AEKNWFVGL KKNGSCKRG. .PRTHYGQKA ILFLPLPVSS
Fgf-2   .......... .T..SWYVAL KRTGQYKLG. .SKTGPGQKA ILFLPMSAKS
Fgf-4   .......PGM ......FIAL SKNGKTKKG. .NRVSPTMKV THFLPRL...
Fgf-6   .......QGT ......YIAL SKYGRVKRG. .SKVSPIMTV THFLPRI...
Fgf-5   .......RTE KTGREWYVAL NKRGKAKRGC SPRVKPQHIS THFLPRFKQS
Fgf-9   .......KHV DTGRRYYVAL NKDGTPREG. .TRTKRHQKF THFLPRPVD.
Fgf10   .......RQQ ESGRAWFLGL NKEGQIMKG. .NRVKKTKPS SHFVPKPIE.
Fgf-3   SSTPGARRQP SAERLWYVSV NGKGRPRRG. .FKTRRTQKS SLFLPRVLDH
Fgf-7   .........T HNGGEMFVAL NQKGIPVRG. .KKTKKEQKT AHFLPMAIT.
```

VERBINDE MIT FIG. 2C

DE 695 31 892 T2 2004.07.22

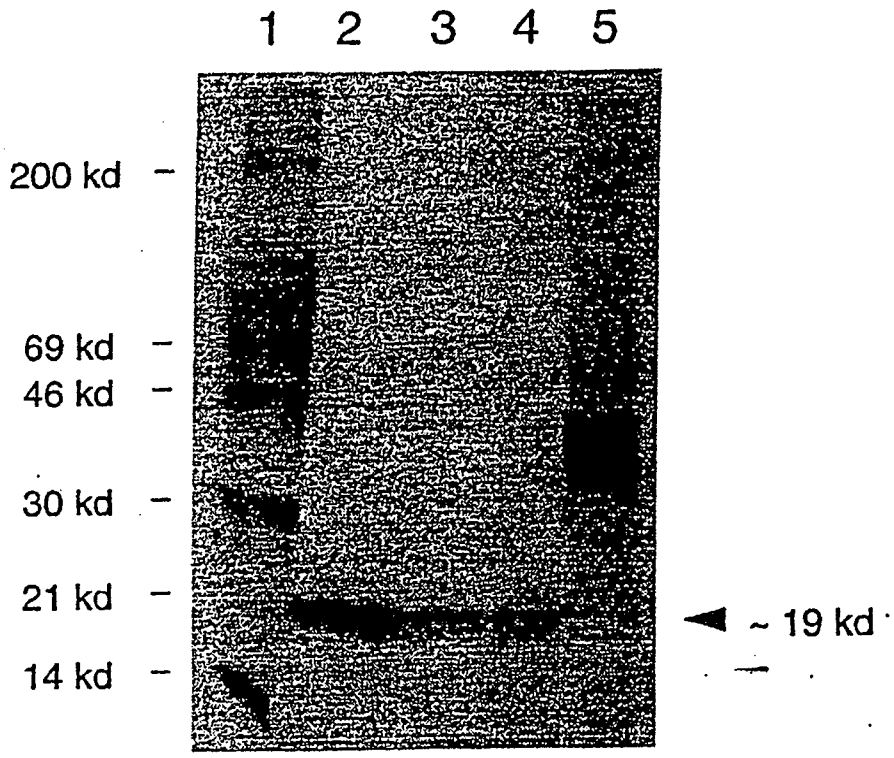
FIG. 2C

VERBINDE MIT FIG. 2B

```
        251                                                  300
Fgf-1   D......... .......... .......... .......... ..........
Fgf-2   .......... .......... .......... .......... ..........
Fgf-4   .......... .......... .......... .......... ..........
Fgf-6   .......... .......... .......... .......... ..........
Fgf-5   EQPELSFTVT VPEKKNPPSP IKSKIPLSAP RKNTNSVKYR LKFRFG....
Fgf-9   .......... ..PDKVPELY KDILSQS... .......... ..........
Fgf10   .......... ..VCMYREPS LHEIGEKQGR SRKSSGTPTM NGGKVVNQDS
Fgf-3   RDHEMVRQLQ SGLPRPPGKG VQPRRRRQKQ SPDNLEPSHV QASRLGSQLE
Fgf-7   .......... .......... .......... .......... ..........

        301
Fgf-1   ....
Fgf-2   ....
Fgf-4   ....
Fgf-6   ....
Fgf-5   ....
Fgf-9   ....
Fgf10   T*..
Fgf-3   ASAH
Fgf-7   ....
```

FIG. 3



Bahn 1: 14-C & Regenbogen-MG-Marker
Bahn 2: FGF-10 (M13-reverser & Vorwärts-Primer)
Bahn 3: FGF-10 (M13-reverser & FGF-P20-Primer)
Bahn 4: FGF-10 (M13-reverser & FGF-P22-Primer)
Bahn 5: FGF-Kontrolle