

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4793836号
(P4793836)

(45) 発行日 平成23年10月12日 (2011.10.12)

(24) 登録日 平成23年8月5日 (2011.8.5)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04
C 0 7 K 14/50 (2006.01)	C 0 7 K 14/50
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 6 (全 80 頁)

(21) 出願番号	特願2001-522384 (P2001-522384)	(73) 特許権者	500203709
(86) (22) 出願日	平成12年9月5日 (2000.9.5)		アムジェン インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2003-521893 (P2003-521893A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 913
(43) 公表日	平成15年7月22日 (2003.7.22)		20, サウザンド オークス, ワン
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/024373		アムジェン センター ドライブ
(87) 国際公開番号	W02001/018172	(74) 代理人	110001173
(87) 国際公開日	平成13年3月15日 (2001.3.15)		特許業務法人川口国際特許事務所
審査請求日	平成14年5月29日 (2002.5.29)	(74) 復代理人	100161997
審査番号	不服2007-24415 (P2007-24415/J1)		弁理士 横井 大一郎
審査請求日	平成19年9月5日 (2007.9.5)	(72) 発明者	トマソン, アーレン リード
(31) 優先権主張番号	09/391,861		アメリカ合衆国 カリフォルニア 913
(32) 優先日	平成11年9月7日 (1999.9.7)		60, サウザンド オークス, ウォー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		タータウン コート 2298
(31) 優先権主張番号	09/644,052		
(32) 優先日	平成12年8月23日 (2000.8.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 線維芽細胞増殖因子様ポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離されたポリペプチドを含む、動物の体重を減少させるための薬学的組成物であって

、

当該ポリペプチドは、

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列；および

(b) A T C C 受託番号 P T A - 6 2 6 の D N A 挿入物によってコードされるアミノ酸配列、

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、前記薬学的組成物。

【請求項 2】

単離されたポリペプチドを含む、動物の体重を減少させるための薬学的組成物であって

、

当該ポリペプチドは、

(a) 必要に応じてアミノ末端メチオニンをさらに含む、配列番号 5 に示すアミノ酸配列；および

(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列に少なくとも 95 パーセント同一であるアミノ酸配列であって、コードされるポリペプチドが、動物の体重を減少させる、アミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、前記薬学的組成物。

【請求項 3】

単離されたポリペプチドを含む、動物の体重を減少させるための薬学的組成物であって

10

20

、
当該ポリペプチドは、核酸分子によってコードされ、
当該核酸分子は、

(a) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列；
(b) A T C C 受託番号 P T A - 6 2 6 における D N A 挿入物のヌクレオチド配列；
(c) 配列番号 2 に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；および
(d) 配列番号 1 に示すヌクレオチド配列に少なくとも 9 5 パーセント同一であるヌクレオチド配列であって、コードされるポリペプチドが、動物の体重を減少させる、前記ヌクレオチド配列；
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、前記薬学的組成物。

10

【請求項 4】

単離されたポリペプチドを含む、動物の体重を減少させるための薬学的組成物であって、

、
当該ポリペプチドは、核酸分子によってコードされ、
当該核酸分子は、

配列番号 2 に示すポリペプチドに少なくとも 9 5 パーセント同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、コードされるポリペプチドが、動物の体重を減少させる、ヌクレオチド配列を含む、前記薬学的組成物。

【請求項 5】

20

融合ポリペプチドを含む、動物の体重を減少させるための薬学的組成物であって、

当該融合ポリペプチドは、異種のアミノ酸配列に融合された請求項 1 または 2 に定義されたポリペプチドを含む、前記薬学的組成物。

【請求項 6】

前記異種のアミノ酸配列が、I g G 定常ドメインまたはそのフラグメントである、請求項 5 に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

(発明の分野)

本発明は、新規の線維芽細胞増殖因子様 (F G F 様) ポリペプチドおよびそれをコードする核酸分子に関する。本発明はまた、ベクター、宿主細胞、抗体、および F G F 様ポリペプチドを産生する方法に関する。F G F 様ポリペプチドに関連した疾患の診断および処置のための方法もまた提供される。

30

(発明の背景)

核酸分子の同定、クローニング、発現および操作における技術の進歩は、ヒトゲノムの解読に基づいた新規の治療の発見を大いに加速した。急速な核酸配列決定技術は、現在、空前の速度で配列情報を生じ得、そしてコンピューターを使用した分析と結び付いて、ゲノム全体への重複配列の組立ておよびポリペプチドコード領域の同定を可能にする。公知のアミノ酸配列のデータベース編集物に対する推定アミノ酸配列の比較は、以前に同定された配列および/または構造の顕著な特徴に対する相同性の程度を決定することを可能にする。核酸分子のポリペプチドコード領域のクローニングおよび発現は、構造分析および機能分析のためのポリペプチド産物を提供する。改変体およびその誘導体を産生するための、核酸分子およびコードされるポリペプチドの操作は、治療薬剤として使用するための産物に対して有利な特性を与え得る。

40

しかし、過去 1 0 年にわたるゲノム研究におけるかなりの技術進歩にかかわらず、ヒトゲノムに基づく新規の治療薬剤の開発可能性は、まだ大部分実現されていない。潜在的に有益なタンパク質治療薬剤をコードする遺伝子、または治療分子について「標的」として作用し得るポリペプチドをコードする遺伝子は、同定されていない。さらに、多くのヒト遺伝子からのポリペプチド産物の構造的および機能的分析は、行われていない。

従って、本発明の目的は、診断および治療において利点を有する新規のポリペプチドおよびこれをコードする核酸分子を同定することである。

50

(発明の要旨)

本発明は、新規の F G F 様核酸分子およびコードされるポリペプチドに関する。

本発明は、単離された核酸分子を提供し、この核酸分子は、以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む：

(a) 配列番号 1 または配列番号 3 に示すヌクレオチド配列；

(b) A T C C 受託番号 P T A - 6 2 6 における D N A 挿入物のヌクレオチド配列；

(c) 配列番号 2 または配列番号 4 に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(d) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で (a) ~ (c) のいずれかの相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列；および

(e) (a) ~ (c) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。

10

本発明はまた、単離された核酸分子を提供し、この核酸分子は、以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む：

(a) 配列番号 2 または配列番号 4 に示すポリペプチドに対して少なくとも約 80 パーセント同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、コードされるポリペプチドが、1 以上の F G F レセプターを活性化するか、肝臓もしくは膵臓内の細胞の増殖および分化を調節するか、肝臓もしくは膵臓からの分泌後に他の細胞型を調節するか、肝臓もしくは膵臓走化性において役割を果たすか、または腫瘍形成活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 配列番号 1、配列番号 3 または (a) に示すヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列；

20

(c) 少なくとも約 25 アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号 1、配列番号 3、(a) または (b) のヌクレオチド配列の一領域であって、コードされるポリペプチドが、1 以上の F G F レセプターを活性化するか、肝臓もしくは膵臓内の細胞の増殖および分化を調節するか、肝臓もしくは膵臓からの分泌後に他の細胞型を調節するか、肝臓もしくは膵臓走化性において役割を果たすか、腫瘍形成活性を有するか、または抗体を生成するための抗原として役立つ、一領域；

(d) 少なくとも約 16 ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号 1、配列番号 3 または (a) ~ (c) のうちのいずれかのヌクレオチド配列の一領域；

(e) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で (a) ~ (d) のうちのいずれかの相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列；および

30

(f) (a) ~ (d) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。

本発明はさらに、以下からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する：

(a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号 2 に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、コードされるポリペプチドが、1 以上の F G F レセプターを活性化するか、肝臓もしくは膵臓内の細胞の増殖および分化を調節するか、肝臓もしくは膵臓からの分泌後に他の細胞型を調節するか、肝臓もしくは膵臓走化性において役割を果たすか、または腫瘍形成活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する配列番号 2 に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、コードされるポリペプチドが、1 以上の F G F レセプターを活性化するか、肝臓もしくは膵臓内の細胞の増殖および分化を調節するか、肝臓もしくは膵臓からの分泌後に他の細胞型を調節するか、肝臓もしくは膵臓走化性において役割を果たすか、または腫瘍形成活性を有する、ヌクレオチド配列；

40

(c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する配列番号 2 に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、コードされるポリペプチドが、1 以上の F G F レセプターを活性化するか、肝臓もしくは膵臓内の細胞の増殖および分化を調節するか、肝臓もしくは膵臓からの分泌後に他の細胞型を調節するか、肝臓もしくは膵臓走化性において役割を果たすか、または腫瘍形成活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) カルボキシル末端短縮化および/またはアミノ末端短縮化を有する配列番号 2 に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、コードされるポリペプチドが、

50

1 以上の F G F レセプターを活性化するか、肝臓もしくは膵臓内の細胞の増殖および分化を調節するか、肝臓もしくは膵臓からの分泌後に他の細胞型を調節するか、肝臓もしくは膵臓走化性において役割を果たすか、または腫瘍形成活性を有する、ヌクレオチド配列；
 (e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、カルボキシル末端短縮化およびアミノ末端短縮化からなる群より選択される少なくとも 1 つの改変を有する配列番号 2 に示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、コードされるポリペプチドが、1 以上の F G F レセプターを活性化するか、肝臓もしくは膵臓内の細胞の増殖および分化を調節するか、肝臓もしくは膵臓からの分泌後に他の細胞型を調節するか、肝臓もしくは膵臓走化性において役割を果たすか、または腫瘍形成活性を有する、ヌクレオチド配列；
 (f) 少なくとも約 16 ヌクレオチドのフラグメントを含む、(a) ~ (e) いずれかのヌクレオチド配列の一領域；
 (g) 中程度または高度にストリンジェントな条件下で (a) ~ (f) のいずれかの相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列；および
 (h) (a) ~ (e) のいずれかに相補的なヌクレオチド配列。

本発明は、単離されたポリペプチドを提供し、このポリペプチドは、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む：

- (a) 配列番号 2 または配列番号 4 に示すアミノ酸配列；および
- (b) A T C C 受託番号 P T A - 6 2 6 における D N A 挿入物によってコードされるアミノ酸配列。

本発明はまた、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する：

- (a) 必要に応じてアミノ末端メチオニンをさらに含む、配列番号 5 または配列番号 6 のいずれかに示すアミノ酸配列；
- (b) 配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかのオルソログについてのアミノ酸配列であって、コードされるポリペプチドが、1 以上の F G F レセプターを活性化するか、肝臓もしくは膵臓内の細胞の増殖および分化を調節するか、肝臓もしくは膵臓からの分泌後に他の細胞型を調節するか、肝臓もしくは膵臓走化性において役割を果たすか、または腫瘍形成活性を有する、アミノ酸配列；
- (c) 配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも約 80 パーセント同一であるアミノ酸配列であって、コードされるポリペプチドが、1 以上の F G F レセプターを活性化するか、肝臓もしくは膵臓内の細胞の増殖および分化を調節するか、肝臓もしくは膵臓からの分泌後に他の細胞型を調節するか、肝臓もしくは膵臓走化性において役割を果たすか、または腫瘍形成活性を有する、アミノ酸配列；
- (d) 少なくとも約 25 アミノ酸残基を含む、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示すアミノ酸配列のフラグメントであって、コードされるポリペプチドが、1 以上の F G F レセプターを活性化するか、肝臓もしくは膵臓内の細胞の増殖および分化を調節するか、肝臓もしくは膵臓からの分泌後に他の細胞型を調節するか、肝臓もしくは膵臓走化性において役割を果たすか、腫瘍形成活性を有するか、または抗体の生成のための抗原として役立つ、フラグメント；および

- (e) 配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示すアミノ酸配列；A T C C 受託番号 P T A - 6 2 6 における D N A 挿入物によってコードされるアミノ酸配列；(a)、(b) または (c) のいずれかの対立遺伝子改変体またはスプライス改変体についてのアミノ酸配列。

本発明はさらに、単離されたポリペプチドを提供し、この核酸分子は、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む：

- (a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示すアミノ酸配列であって、コードされるポリペプチドが、1 以上の F G F レセプターを活性化するか、肝臓もしくは膵臓内の細胞の増殖および分化を調節するか、肝臓もしくは膵臓からの分泌後に他の細胞型を調節するか、肝臓もしくは膵臓走化性において役割を果たすか、または腫瘍形成活性を有する、アミノ酸配列；

10

20

30

40

50

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すアミノ酸配列であって、コードされるポリペプチドが、1以上のFGFレセプターを活性化するか、肝臓もしくは膵臓内の細胞の増殖および分化を調節するか、肝臓もしくは膵臓からの分泌後に他の細胞型を調節するか、肝臓もしくは膵臓走化性において役割を果たすか、または腫瘍形成活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すアミノ酸配列であって、コードされるポリペプチドが、1以上のFGFレセプターを活性化するか、肝臓もしくは膵臓内の細胞の増殖および分化を調節するか、肝臓もしくは膵臓からの分泌後に他の細胞型を調節するか、肝臓もしくは膵臓走化性において役割を果たすか、または腫瘍形成活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C末端短縮化および/またはN末端短縮化を有する、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すアミノ酸配列であって、コードされるポリペプチドが、1以上のFGFレセプターを活性化するか、肝臓もしくは膵臓内の細胞の増殖および分化を調節するか、肝臓もしくは膵臓からの分泌後に他の細胞型を調節するか、肝臓もしくは膵臓走化性において役割を果たすか、または腫瘍形成活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮化およびN末端短縮化からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する、配列番号2または配列番号4のいずれかに示すアミノ酸配列であって、コードされるポリペプチドが、1以上のFGFレセプターを活性化するか、肝臓もしくは膵臓内の細胞の増殖および分化を調節するか、肝臓もしくは膵臓からの分泌後に他の細胞型を調節するか、肝臓もしくは膵臓走化性において役割を果たすか、または腫瘍形成活性を有する、アミノ酸配列。

本発明はまた、上記の核酸分子を含む発現ベクター、本発明の発現ベクターを含む宿主細胞、ならびにこの宿主細胞を培養する工程および必要に応じてこのように產生されたポリペプチドを単離する工程を包含するFGF様ポリペプチドを產生する方法を提供する。

FGF様ポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック非ヒト動物もまた本発明によって包含される。FGF様核酸分子は、発現および増大したレベル（これは、増大した循環レベルを含み得る）のFGF様ポリペプチドを可能にする様式で動物中に導入される。あるいは、FGF様核酸分子は、内因性FGF様ポリペプチドの発現を妨害するような様式で動物中に導入される（すなわち、FGF様ポリペプチド遺伝子ノックアウトを保有するトランスジェニック動物を作製する）。トランスジェニック非ヒト動物は、好ましくは哺乳動物であり、そしてより好ましくはげっ歯動物（例えば、ラットまたはマウス）である。好ましくは、FGF様導入遺伝子は、アポリポタンパク質のEプロモーターの制御下で肝臓において、または - アクチンプロモーターの制御下で普遍的に発現される。

本発明のFGF様ポリペプチドの誘導体、本発明のFGF様ポリペプチドの融合ポリペプチド、および本発明のFGF様ポリペプチドを特異的に結合する抗体もまた提供される。本発明のヌクレオチドまたはポリペプチド、およびキャリア、アジュバント、可溶化剤、安定剤もしくは抗酸化剤、または薬学的に受容可能な他の薬剤を含む組成物もまた本発明によって包含される。この組成物としては、治療有効量の本発明のヌクレオチドまたはポリペプチドを含む薬学的組成物およびこのポリペプチドおよび核酸分子を用いる方法が挙げられ得る。

驚くべきことに、FGF様ポリペプチドは、肝臓（ノーザン分析）および膵島（インサイチュ分析）において主に発現されるようであり、それにより、これは、FGFファミリーの他の全てのメンバーとは区別される。それゆえ、本発明のポリペプチドおよびその有用な核酸中間体は、肝臓細胞または膵島細胞をバックグラウンドから分化させる際に有用性を有し得る。さらに、FGF様ポリペプチド発現の局在、FGFファミリーのメンバーに対するFGF様ポリペプチドの構造的類似性、およびFGF様ポリペプチドが血流（ここで、このポリペプチドは、遠位の部位に効果を発揮し得る）中に分泌される可能性を考慮すると、本発明のポリペプチドは、特に、治療薬学的組成物として、肝臓内もしくは肝臓近傍の細胞の刺激、腸の細胞活性の調節、膵島内もしくは膵島近傍の細胞の刺激、ニュー

10

20

30

40

50

ロン細胞の調節、血管新生の刺激もしくは阻害、肉芽組織の上皮もしくは間葉成分の刺激、角膜上皮、水晶体もしくは網膜組織の刺激、尿細管の再生、造血細胞の調節、毛包増殖の調節、肺上皮の調節、または上皮、間葉、造血、またはニューロンの細胞もしくは組織いずれかの刺激において利益を提供し得る。

F G F 様ポリペプチドはまた、増殖または脂肪沈着インヒビターとして有用であり得、それゆえ、過成長（例えば、末端肥大症）、早熟成熟、肥満または糖尿病の処置において有用であり得る。F G F 様ポリペプチドとそれらのレセプターとの相互作用を妨害するインヒビター（例えば、抗体、結合タンパク質または低分子）は、身体の成長および成熟を刺激する際に有用であり得る。それゆえ、このようなインヒビターは、低身長、成熟遅延または成長ホルモンもしくはそのメディエーターであるインスリン様増殖因子のシグナル伝達

10

の欠損に一般的に関連している他の状態の処置において有用であり得る。
本発明のF G F 様ポリペプチドおよび核酸分子、またはそれらの生物学的活性のアゴニストもしくはアンタゴニストは、以下のような医学的状態を処置、予防および/または検出するために治療または診断の目的で使用され得る：肝硬変または肝臓の他の毒性傷害；炎症性腸疾患、粘膜炎（m u c o s i t i s）、クローン病、または他の胃腸管異常；糖尿病；肥満；神経変性疾患；創傷；角膜上皮、水晶体または網膜組織に対する損傷；急性尿細管壊死の結果としての、尿細管に対する損傷；化学療法後の造血細胞再構築；るいそう症候群（例えば、癌関連悪液質）、多発性硬化症、筋障害；低身長、成熟遅延、過成長（例えば、末端肥大症）、早熟成熟；脱毛症；アンドロゲン標的器官の疾患または異常；乳児性呼吸窮迫症候群、気管支肺異形成症、急性呼吸促進症候群または肺の他の異常；眼または他の組織の腫瘍；アテローム性動脈硬化；高コレステロール血症；糖尿病；肥満；発作；骨粗鬆症；変形性関節症（o s t e o a r t h r i t i s）；変形性関節病（d e g e n e r a t i v e j o i n t d i s e a s e）；筋萎縮；低筋肉症（s a r c o p e n i a）；除脂肪体重の減少；禿頭症；しわ；疲労増大；スタミナ減少；心機能低下；免疫系機能不全；癌；パーキンソン病；老年痴呆；アルツハイマー病；および認知機能低下。本発明は、F G F 様ポリペプチドを動物に投与する工程を包含する、障害の処置、予防または改善を提供する。本発明はまた、動物におけるそのような障害またはそのような障害に対する感受性を診断する方法を提供し、この方法は、F G F 様ポリペプチドの発現の存在または量を決定する工程、およびF G F 様ポリペプチドの発現の存在または量に基づいてこのような障害またはこのような障害に対する感受性を診断する工程の両方を含む

20

30

。この動物は、好ましくは哺乳動物であり、そしてより好ましくはヒトである。本発明はまた、上記のような障害の処置のための医薬の製造のための方法に関する。
本発明はまた、上記に列挙した同じ疾患の処置のための、および腫瘍の処置のための、抗体、またはF G F 様ポリペプチドのそのレセプターに対する結合の他のインヒビターの使用を提供する。

本発明はまた、F G F 様ポリペプチドに結合する試験分子を同定する方法を提供し、ここで、この方法は、F G F 様ポリペプチドを試験分子と接触させる工程、およびこのポリペプチドに対する試験分子の結合程度を決定する工程を包含する。この方法はさらに、このような試験分子が、F G F 様ポリペプチドのアゴニストであるかまたはアンタゴニストであるかを決定する工程を包含する。

40

本発明はまた、F G F 様ポリペプチドの発現またはF G F 様ポリペプチドの活性に対する分子の影響を試験する方法を提供する。

F G F 様ポリペプチドの発現を調節し、そしてF G F 様ポリペプチドのレベルを調節する（すなわち、増大または減少させる）方法もまた、本発明によって包含される。1つの方法は、F G F 様ポリペプチドをコードする核酸分子を動物に投与する工程を包含する。別の方法では、F G F 様ポリペプチドの発現を調節するエレメントを含む核酸分子が投与され得る。これらの方法の例としては、遺伝子治療およびアンチセンス治療が挙げられる。

（発明の詳細な説明）

本明細書におけるセクションの見出しは、組織化の目的のみのためであり、そこに記載される対象物を限定すると解釈されるべきではない。本出願において引用される全ての参考

50

文献は明らかに、本明細書中に参考として援用される。

(定義)

用語「F G F 様核酸分子」とは、配列番号 1 もしくは配列番号 3 に記載のヌクレオチド配列を含むか、または配列番号 1 もしくは配列番号 3 に記載のヌクレオチド配列から本質的になる核酸分子、配列番号 2 もしくは配列番号 4 に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むか、または配列番号 2 もしくは配列番号 4 に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列から本質的になる核酸分子、A T C C 受託番号 P T A - 6 2 6 における D N A 挿入物のヌクレオチド配列を含むか、または A T C C 受託番号 P T A - 6 2 6 における D N A 挿入物のヌクレオチド配列から本質的になる核酸分子、あるいはこれらに関連する核酸分子をいう。

10

関連する核酸分子は、配列番号 1 もしくは配列番号 3 に示されるヌクレオチド配列と約 8 0 % 同一であるヌクレオチド配列を含むか、またはこのようなヌクレオチド配列から本質的になるか、あるいは配列番号 2 もしくは配列番号 4 に示されるポリペプチドと約 8 0 % 同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むか、またはこのようなヌクレオチド配列から本質的になる。好ましい実施形態において、このヌクレオチド配列は、配列番号 1 または配列番号 3 に示されるヌクレオチド配列に、約 8 5 %、または約 9 0 %、または約 9 5 %、または約 9 6、9 7、9 8、もしくは 9 9 % 同一であるか、あるいはこのヌクレオチド配列は、配列番号 2 または配列番号 4 に示されるポリペプチド配列に、約 8 5 %、または約 9 0 %、または約 9 5 %、または約 9 6、9 7、9 8、もしくは 9 9 % 同一であるポリペプチドをコードする。関連する核酸分子はまた、上記の F G F 様核酸分子のフラグメントを含み、このフラグメントは、少なくとも約 1 6 連続したヌクレオチド、または約 1 8、または約 2 0、または約 2 5、または約 5 0、または約 7 5、または約 1 0 0、または約 1 0 0 より多く連続したヌクレオチドである。関連する核酸分子はまた、上記の F G F 様核酸分子のフラグメントを含み、このフラグメントは、少なくとも約 2 5 のアミノ酸残基、または約 5 0、または約 7 5、または約 1 0 0、または約 1 0 0 より多くのアミノ酸残基のポリペプチドをコードする。

20

関連する核酸分子はまた、少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号 2 または配列番号 4 のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、少なくとも 1 つの F G F 様ポリペプチド活性を保持する、ヌクレオチド配列、または少なくとも 1 つのアミノ酸の挿入を有する、配列番号 2 もしくは配列番号 4 のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、少なくとも 1 つの F G F 様ポリペプチド活性を保持する、ヌクレオチド配列、または少なくとも 1 つのアミノ酸の欠失を有する、配列番号 2 もしくは配列番号 4 のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、少なくとも 1 つの F G F 様ポリペプチド活性を保持する、ヌクレオチド配列を含む。関連する核酸分子はさらに、C 末端短縮化および/または N 末端短縮化を有する、配列番号 2 もしくは配列番号 4 のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、少なくとも 1 つの F G F 様ポリペプチド活性を保持する、ヌクレオチド配列を含む。関連する核酸分子はまた、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端短縮化および N 末端短縮化からなる群より選択される改変の組合せを有する、配列番号 2 もしくは配列番号 4 のいずれかに示すポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このポリペプチドは、少なくとも 1 つの F G F 様ポリペプチド活性を保持する、ヌクレオチド配列を含む。

30

40

関連する F G F 様核酸分子は、本明細書に定義される中程度または高度にストリンジェントな条件下で、上記の核酸分子のいずれかの相補体とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含むような分子を含む。好ましい実施形態では、関連する核酸分子は、中程度もしくは高度にストリンジェントな条件下で、配列番号 1 または配列番号 3 に示される配列とハイブリダイズする配列、またはポリペプチド（このポリペプチドは、配列番号 2 または 4 に示される配列を含む）をコードする分子とハイブリダイズする配列、または上記に定義される核酸フラグメントとハイブリダイズする配列、または上記に定義されるポリペプチ

50

ドをコードする核酸フラグメントとハイブリダイズする配列を含む。関連する核酸分子が上記の核酸のいずれかの対立遺伝子改変体またはスプライス改変体を含むこと、そして上記のヌクレオチド配列のいずれかに相補的である配列を含むこともまた理解される。

用語「単離された核酸分子」とは、天然で会合している少なくとも1つの夾雑核酸分子を含まない、そして好ましくは、タンパク質産生またはその治療的使用もしくは診断的使用におけるその使用を妨害する何の他の夾雑哺乳動物核酸分子をも実質的に含まない、本発明の核酸分子をいう。

用語「対立遺伝子改変体」とは、生物または生物集団の染色体上の所定の遺伝子座を占める、いくつかの可能性のある天然に存在する別の形態の遺伝子の1つをいう。

用語「スプライス改変体」とは、RNA転写物中のイントロン配列の選択的プロセッシングによって生成される核酸分子（通常、RNA）をいう。

用語「発現ベクター」とは、宿主細胞における増殖に適切であり、かつ挿入された異種核酸配列の発現を指向および/または制御する核酸配列を含む、ベクターをいう。発現は、転写、翻訳およびRNAスプライシング（イントロンが存在する場合）のようなプロセスを含むがこれらに限定されない。

用語「高度なストリンジェンシーの条件」とは、以下の条件をいう：(1)洗浄に関して低イオン強度試薬および高温（例えば、50℃にて0.015M NaCl / 0.0015M クエン酸ナトリウム / 0.1% NaDodSO₄ (SDS)）を用いる条件、または(2)ハイブリダイゼーションの間に、ホルムアミドのような変性剤を用いる条件（例えば、42℃での、0.1%ウシ血清アルブミン、0.2% Ficoll、0.1% ポリビニルピロリドン、50mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.5）、750mM NaClおよび75mMクエン酸ナトリウムを有する50% (vol/vol) ホルムアミド）。別の例は、0.2×SSCおよび0.1% SDS中での42℃での洗浄を伴う、42℃での50%ホルムアミド、5×SSC（0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH 6.8）、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5×デンハルト溶液、超音波処理したサケ精子DNA（50μg/ml）、0.1% SDSおよび10%デキストラン硫酸の使用である。

用語「中程度のストリンジェンシーの条件」とは、上記よりもストリンジェントの低い、洗浄溶液およびハイブリダイゼーションの条件（例えば、温度、イオン強度、およびSDSの百分率）の使用を一般に含む条件を言う。中程度にストリンジェントな条件の例は、20%ホルムアミド、5×SSC（150mM NaCl、15mM クエン酸三ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH 7.6）、5×デンハルト溶液、10%デキストラン硫酸および20μl/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中での37℃での一晩のインキュベーション、続いて、約37℃～50℃での1×SSC中での洗浄のような条件である。当業者は、プローブの長さなどの要因に適合するように必要に応じて温度、イオン強度などをどのようにして調整するかを認識する。

オリゴヌクレオチドプローブを用いてcDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーをスクリーニングする特定の好ましい実施形態では、標的配列に対するオリゴヌクレオチドプローブの融解温度（ T_m ）に依存する高ストリンジェンシー条件が用いられる。 T_m は、以下の式（Boltonら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 48: 1390 (1962)）を用いて評価され得る：

$$T_m = 81.5 - 16.6 (\log [Na^+]) + 0.41 (\% G + C) - (600 / N)$$

ここで、 $[Na^+]$ は、ハイブリダイゼーション（または洗浄）溶液中でのナトリウムイオン濃度であり；

%G + Cは、オリゴヌクレオチドプローブ中でのグアニンおよびシトシンの含有量であり；そして

Nは、ヌクレオチド中のプローブの長さである。

高ストリンジェンシー溶液の一例は、オリゴヌクレオチドプローブの長さに依存して、35℃～63℃の温度での6×SSCおよび0.05%ピロリン酸ナトリウムである。例え

ば、特定の実施形態によれば、14塩基対のプロープは35 ~ 40 で洗浄され、17塩基のプロープは45 ~ 50 で洗浄され、20塩基対のプロープは52 ~ 57 で洗浄され、そして23塩基対のプロープは57 ~ 63 で洗浄される。バックグラウンドの非特異的結合が高く出現する場合、温度を2 ~ 3 上昇させ得る。第2の高ストリンジェンシー溶液は、オリゴヌクレオチドプロープを洗浄するために塩化テトラメチルアンモニウム (TMAC) を利用する。1つのストリンジェントな洗浄溶液は、3M TMAC、50mM Tris-HCl、pH 8.0および0.2% SDSである。この溶液を用いた洗浄温度は、プロープの長さの関数である。例えば、14塩基対のプロープは35 ~ 40 で洗浄され、17塩基対のプロープは約45 ~ 50 で洗浄され、20塩基対のプロープは52 ~ 57 で洗浄され、そして23塩基対のプロープは57 ~ 63 で洗浄される。

10

用語「FGF様ポリペプチド」とは、配列番号2または配列番号4および関連するポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをいう。関連するポリペプチドとしては、以下が挙げられる：対立遺伝子改変体；スプライス改変体；フラグメント；誘導体；置換改変体、欠失改変体、および挿入改変体；融合ポリペプチド；ならびにオルソログ。FGF様ポリペプチドは、本明細書に定義されるような成熟ポリペプチドであり得、そしてこれらを調製する方法に依存して、アミノ末端メチオニン残基を有しても有さなくてもよい。

用語「FGF様ポリペプチドフラグメント」とは、配列番号2または配列番号4に示されるFGF様ポリペプチドの全長未満のアミノ酸配列を含む、ペプチドまたはポリペプチドをいう。このようなフラグメントは、例えば、アミノ末端での短縮化、カルボキシル末端の短縮化、および/またはアミノ酸配列からの残基の内部欠失から生じ得る。FGF様フラグメントは、選択的RNAスプライシングからか、またはインビボプロテアーゼ活性から生じ得る。

20

用語「FGF様ポリペプチド改変体」とは、配列番号2または配列番号4に記載のFGF様ポリペプチドのアミノ酸配列に比べて、1つ以上のアミノ酸配列の置換、欠失および/または付加を含むアミノ酸配列を含むFGF様ポリペプチドをいう。改変体は、天然に存在し得るか、または人工的に構築され得る。このようなFGF様ポリペプチド改変体は、このような改変体をコードする対応する核酸分子から調製され得る。この核酸分子は、配列番号1または配列番号3に記載の野生型FGF様ポリペプチドについてのDNA配列から、それに応じて変化しているDNA配列を有する。

30

用語「FGF様融合ポリペプチド」とは、FGF様ポリペプチド、そのフラグメント、改変体または誘導体と、異種ペプチドまたはポリペプチドとの融合物をいう。

用語「FGF様ポリペプチド誘導体」とは、例えば、1つ以上のポリマー（水溶性ポリマー、N結合型糖質、O結合型糖質、糖、リン酸、および/または他のこのような分子を含むがこれらに限定されない）の共有結合によって、化学的に修飾されている、FGF様ポリペプチド、その改変体またはフラグメントをいう。この誘導体は、ポリペプチドに結合した分子の種類または位置のいずれかの点で、天然に存在するFGF様ポリペプチドとは異なる様式で改変される。誘導体はさらに、FGF様ポリペプチドに天然に結合された1つ以上の化学基の欠失を含む。

用語「生物学的に活性なFGF様ポリペプチド」、「生物学的に活性なFGF様ポリペプチドフラグメント」、「生物学的に活性なFGF様ポリペプチド改変体」、および「生物学的に活性なFGF様ポリペプチド誘導体」とは、FGF様ポリペプチドの少なくとも1つの活性の特徴（例えば、肝臓内もしくは肝臓近傍の細胞の刺激、腸の細胞活性の調節、膵島内または膵島近傍の細胞の刺激、ニューロン細胞の調節、血管新生の刺激もしくは阻害、肉芽組織の上皮もしくは間葉成分の刺激、角膜上皮、水晶体もしくは網膜組織の刺激、尿細管の再生、造血細胞の調節、毛包増殖の調節、肺上皮の調節、または上皮、間葉、造血、ニューロンのいずれかの細胞もしくは組織の刺激）を有するFGF様ポリペプチド（このポリペプチドは、配列番号4のアミノ酸配列を含む）をいう。一般に、FGF様ポリペプチド、ならびにその改変体、フラグメントおよび誘導体は、上記に列挙した活性のような、FGF様ポリペプチドの少なくとも1つの活性の特徴を有する。さらに、FGF

40

50

様ポリペプチドは、免疫原として活性であり得る（すなわち、このポリペプチドは、抗体が惹起され得る少なくとも1つのエピトープを含む）。

「天然に存在する」とは、生物学的材料（例えば、核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞など）に関連して使用される場合、天然に見出されるが、ヒトによって操作されていないものをいう。

用語「単離されたポリペプチド」とは、その天然の環境において見出される少なくとも1つの夾雑ポリペプチドを含まない、好ましくはタンパク質産生またはその治療的使用もしくは診断的使用におけるその使用を妨害する何の他の夾雑哺乳動物ポリペプチドをも実質的に含まない、本発明のポリペプチドをいう。好ましくは、本発明の核酸分子をいう。

用語「オルソログ」とは、異なる種から同定されたポリペプチドに対応するポリペプチドをいう。例えば、マウスおよびヒトのFGF様ポリペプチドは、互いにオルソログとみなされる。

用語「成熟FGF様ポリペプチド」とは、リーダー配列を欠くポリペプチドをいい、そしてポリペプチドの他の改変（例えば、アミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）および/またはカルボキシル末端のタンパク質分解プロセッシング、より大きな前駆体からの、より小さなポリペプチドの切断、N結合型および/またはO結合型グリコシル化、ならびに当業者によって理解される他の翻訳後修飾もまた含み得る。

用語「有効量」および「治療的に有効な量」とは、上記のFGF様ポリペプチドの観察可能なレベルの1つ以上の生物学的活性を支持するために有用な、または必要なFGF様ポリペプチドの量をいう。

（核酸分子および/またはポリペプチドの関連性）

用語「同一性（identity）」は、当該分野で公知のように、2つ以上のポリペプチド分子の配列間の関係、または2つ以上の核酸分子の配列間の関係であって、これらの配列を比較することによって決定される、関係をいう。当該分野では、「同一性」はまた、場合によって、ヌクレオチド配列のストリング間またはアミノ酸配列のストリング間の一致により決定された、ポリペプチド分子配列間または核酸分子配列間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」は、特定の算術モデルのコンピュータプログラム（すなわち、アルゴリズム）によって扱われた、ギャップ整列を伴った2つ以上の配列の間の同一の一致のパーセントを測定する。

用語「類似性（similarity）」は、関連した概念であるが、「同一性」とは対照的に、同一の一致および保存的置換の一致の両方を含む類似性の尺度をいう。保存的置換はポリペプチドに適用され、そして核酸分子には適用されないので、類似性は、ポリペプチド配列の比較のみを扱う。2つのポリペプチド配列が、例えば、20個のうちの10個が同一のアミノ酸を有し、そして残りが全て非保存的置換であるならば、同一性パーセントおよび類似性パーセントは、両方とも50%である。同じ例で、さらに5つの位置において保存的置換があるならば、同一性パーセントは、50%のままであるが、類似性パーセントは75%（20のうちの15）である。従って、保存的置換が存在する場合、2つのポリペプチド配列の間の類似性の程度は、これらの2つの配列の間の同一性パーセントよりも高い。

用語「保存的アミノ酸置換」は、その位置でのアミノ酸残基の極性にも電荷にもほとんどまたは全く影響のないような、非ネイティブな残基による、ネイティブなアミノ酸残基の置換をいう。例えば、保存的置換は、ポリペプチド中の非極性残基の、任意の他の非極性残基による置換から生じる。さらに、ポリペプチド中の任意のネイティブな残基はまた、「アラニンスキャニング変異誘発」について以前に記載された（Cunninghamら, Science 244:1081-85 (1989)）ように、アラニンで置換され得る。保存的アミノ酸置換についての一般的法則を、表Iに示す。

【表1】

表 1
保存的アミノ酸置換

元の残基	代表的な置換	好適な置換	
Ala	Val, Leu, Ile	Val	
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys	
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln	10
Asp	Glu	Glu	
Cys	Ser	Ser	
Gln	Asn	Asn	
Glu	Asp	Asp	
Gly	Pro, Ala	Ala	
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg	
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu	20
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile	
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg	
Met	Leu, Phe, Ile	Leu	
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu	30
Pro	Ala	Ala	
Ser	Thr	Thr	
Thr	Ser	Ser	
Trp	Tyr, Phe	Tyr	
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe	
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu	40

保存的アミノ酸置換はまた、生物学的系における合成ではなく、化学的ペプチド合成によって代表的に取り込まれる、天然に存在しないアミノ酸残基を包含する。これらとしては、ペプチド模倣物、および他の逆形態 (reversed form) または逆転した形態 (inverted form) のアミノ酸部分が挙げられる。

アミノ酸配列に対する保存的な改変 (およびコードするヌクレオチドに対する対応する改変) は、天然に存在する FGF 様ポリペプチドの機能的特徴および化学的特徴に類似した機能的特徴および化学的特徴を有する FGF 様ポリペプチドを生成すると予想される。対照的に、FGF 様ポリペプチドの機能的特徴および / または化学的特徴における実質的な

改変は、以下を維持することに対するその効果が顕著に異なる置換を選択することによって達成され得る：(a) 置換領域における分子骨格の構造（例えば、シートコンホメーションもしくはらせんコンホメーション）、(b) 標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または(c) 大部分の側鎖。天然に存在する残基は、側鎖の共通の特性に基づいてグループに分けられ得る：

- 1) 疎水性：N o lロイシン、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e；
- 2) 中性で親水性：C y s、S e r、T h r；
- 3) 酸性：A s p、G l u；
- 4) 塩基性：A s n、G l n、H i s、L y s、A r g；
- 5) 鎖の方向に影響を与える残基：G l y、P r o；および
- 6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

10

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーの、別のクラス由来のメンバーへの交換を含み得る。このような置換された残基は、ヒトF G F様ポリペプチドのうちの非ヒトF G F様ポリペプチドと相同性である領域、またはこの分子のうちの非相同性領域に導入され得る。

関連した核酸分子およびポリペプチドの同一性および類似性は、以下に記載される方法を含むがこれらに限定されない、公知の方法によって容易に算出され得る：C o m p u t a t i o n a l M o l e c u l a r B i o l o g y (A . M . L e s k 編, O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s 1988)；B i o c o m p u t i n g : I n f o r m a t i c s a n d G e n o m e P r o j e c t s (D . W . S m i t h 編, A c a d e m i c P r e s s 1993)；C o m p u t e r A n a l y s i s o f S e q u e n c e D a t a (第1部, A . M . G r i f f i n および H . G . G r i f f i n 編, H u m a n a P r e s s 1994)；G . v o n H e i n l e , S e q u e n c e A n a l y s i s i n M o l e c u l a r B i o l o g y (A c a d e m i c P r e s s 1987)；S e q u e n c e A n a l y s i s P r i m e r (M . G r i b s k o v および J . D e v e r e u x 編, M . S t o c k t o n P r e s s 1991)；ならびにC a r i l l o ら, S I A M J . A p p l i e d M a t h . 48 : 1073 (1988)。

20

同一性および/または類似性を決定するための好ましい方法は、試験される配列の間で最大の一致を与えるように設計される。同一性および類似性を決定するための方法は、公に利用可能なコンピュタープログラムにおいて体系化される。2つの配列の間の同一性および類似性を決定するために好適なコンピュタープログラム方法としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：G A P (D e v e r e u x ら, N u c . A c i d s R e s . 12 : 387 (1984)；G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , U n i v e r s i t y o f W i s c o n s i n , M a d i s o n , W I)、B L A S T P、B L A S T N および F A S T A (A t s c h u l ら, J . M o l . B i o l . 215 : 403 - 10 (1990))を含むG C G プログラムパッケージ。B L A S T X プログラムは、N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n (N C B I) および他の供給源 (A l t s c h u l ら, B L A S T M a n u a l (N C B N L M N I H , B e t h e s d a , M D)；A l t s c h u l ら, 1990, 前出) から公に利用可能である。周知のS m i t h W a t e r m a n アルゴリズムもまた、同一性を決定するために用いられ得る。

30

例えば、コンピュターアルゴリズムG A P (G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p) を使用して、配列同一性パーセントが決定されるべき2つのポリペプチドは、それらのそれぞれのアミノ酸の最適の一致（このアルゴリズムによって決定したときの「一致したスパン (m a t c h e d s p a n)」) について整列される。ギャップオープニングペナルティー (g a p o p e n i n g p e n a l t y) (これは、平均ダイアゴナルの3倍として計算され；「平均ダイアゴナル」は、使用される比較マトリクスのダイアゴナルの平均であり；「ダイアゴナル」は、特定の比較マトリクスによってそれぞれの完全なアミノ酸一致に割り当てられるスコアまたは数である) およびギャップエクステ

40

50

ンションペナルティー（これは、通常ギャップオープニングペナルティーの0.1倍である）、ならびにPAM250またはBLOSUM62のような比較マトリクスがこのアルゴリズムとともに使用される。標準比較マトリクス（PAM250比較マトリクスについてDayhoffら、5 Atlas of Protein Sequence and Structure（補遺3 1978）を参照のこと；BLOSUM62比較マトリクスについてHenikoffら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19（1992）を参照のこと）もまたこのアルゴリズムによって使用される。

ポリペプチドの配列比較に好ましいパラメーターとしては、以下が挙げられる：

アルゴリズム（Algorithm）：NeedlemanおよびWunsch, J. Mol. Biol. 48:443-53（1970）、

比較マトリクス（Comparison matrix）：BLOSUM 62、Henikoffら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-19（1992）より、

ギャップペナルティー（Gap Penalty）：12、

ギャップレングスペナルティー（Gap Length Penalty）：4、

類似性の閾値（Threshold of Similarity）：0。

GAPプログラムは、上記パラメーターについて有用である。上記パラメーターは、GAPアルゴリズムを使用してポリペプチド比較についてのデフォルトパラメーター（末端ギャップについてペナルティーなし）である。

核酸分子の配列比較について好ましいパラメーターとしては、以下が挙げられる：

アルゴリズム：Needlemanら, J. Mol. Biol. 48:443-53（1970）、

比較マトリクス：一致 = +10、不一致 = 0、

ギャップペナルティー：50、

ギャップレングスペナルティー：3。

GAPプログラムはまた、上記パラメーターについて有用である。上記パラメーターは、核酸分子比較についてのデフォルトパラメーターである。

他の例示的なアルゴリズム、ギャップオープニングペナルティー、ギャップエクステンションペナルティー、比較マトリクス、類似性の閾値などが当業者によって使用され得、これには、Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, 1997年9月に記載されるものを含む。なされる特定の選択は、なされる特定の比較（例えば、DNA-DNA間、タンパク質-タンパク質間、タンパク質-DNA間）；さらに、比較が所定の配列対の間でなされる（この場合、GAPまたはBest Fitが一般的に好ましい）か、一つの配列と大きな配列データベースとの間（この場合、FASTAまたはBLASTAが好ましい）でなされるかに依存する。

単離されたマウスcDNA（マウスFGF様タンパク質；配列番号3）の配列分析は、これが、FGFファミリーのタンパク質の新規のメンバーをコードすることを示した。マウスFGF様遺伝子は、210アミノ酸のタンパク質をコードする630bpのオープンリーディングフレームを含む（図1）。このマウス配列を用いて、ヒトFGF様オルソログを同定した。4つのヒトFGF様ポリペプチドcDNAクローンの配列分析は、ヒトFGF様遺伝子が、209アミノ酸のタンパク質をコードする627bpのオープンリーディングフレームを含むことを示した（図2A～図2B）。

図3A～図3Dは、ヒトFGF様タンパク質、マウスFGF様タンパク質およびFGFファミリーの他のメンバーのアミノ酸配列整列を図示する。SwissprotデータベースのFASTAプログラムを用いた推定マウスFGF様ポリペプチドのコンピューター分析は、このタンパク質がマウスFGF-6、FGF-15およびFGF-4に最も密接に関連していることを示した。GAPプログラムを用いて、マウスFGF様ポリペプチドは、マウスFGF-6に対して32%同一であり、そしてマウスFGF-4に対して28%同一であることが見出された。コンピューター分析はまた、マウスFGF様ポリペプチド

10

20

30

40

50

が、F G F - 6、F G F - 4およびF G F - 15と同様に、しかし、F G F - 1およびF G F - 2とは対照的に、そのアミノ末端に潜在的シグナルペプチドを保有することを示した。マウスF G F様ポリペプチドは、ヒトF G F様タンパク質に対して79%同一である。

(核酸分子)

本明細書中で使用される組換えDNA方法は、一般的に、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)および/またはCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編, Green Publishers Inc. およびWiley and Sons 1994)に記載される方法である。

本発明は、本明細書中に記載される核酸分子およびこのような分子を得るための方法を提供する。F G F様ポリペプチドまたはそのフラグメントをコードする遺伝子またはcDNAがゲノムライブラリーもしくはcDNAライブラリーのハイブリダイゼーションスクリーニングによって、またはPCR増幅によって得られ得る。ハイブリダイゼーションによってライブラリーをスクリーニングするために有用なプローブまたはプライマーは、同じ遺伝子ファミリーまたは関連した遺伝子ファミリーからの他の公知の遺伝子または遺伝子フラグメント(例えば、保存されたモチーフなど)についての配列情報に基づいて作製され得る。さらに、F G F様ポリペプチドをコードする遺伝子が一つの種から同定された場合、その遺伝子の全てまたは一部は、他の種からの対応する遺伝子(オルソログ)または同じ種からの関連する遺伝子(ホモログ)を同定するためのプローブとして使用され得る。プローブまたはプライマーは、F G F様遺伝子を発現すると考えられる種々の組織供給源由来のcDNAライブラリーをスクリーニングするために使用され得る。さらに、配列番号1または配列番号3に示す配列を有する核酸分子の一部または全てを使用してゲノムライブラリーをスクリーニングして、F G F様ポリペプチドをコードする遺伝子を同定および単離し得る。代表的には、中程度または高度のストリンジェンシーの条件は、スクリーニングのために使用されてスクリーニングから得られた偽陽性の数を最小にする。

F G F様ポリペプチドをコードする核酸分子はまた、発現クローニング(これは、発現されたタンパク質の特性に基づく陽性クローンの検出を使用する)によって同定され得る。代表的には、核酸ライブラリーは、発現されそして宿主細胞表面に提示されたクローン化タンパク質への抗体または他の結合パートナー(例えば、レセプターまたはリガンド)の結合によってスクリーニングされる。抗体または結合パートナーは、検出可能な標識を用いて修飾されて、所望のクローンを発現する細胞が同定される。

F G F様ポリペプチドまたはそのフラグメントをコードする核酸分子を調製する別の手段は、Engelsら, Angew. Chem. Intl. Ed. 28: 716-34 (1989)に記載される化学合成のような、当業者に周知の方法を使用する化学合成である。これらの方法としては、特に、核酸合成のためのホスホトリエステル、ホスホロアミダイト、およびH-ホスホネート法が挙げられる。このような化学合成のために好ましい方法は、標準的なホスホロアミダイト化学を使用するポリマー支持合成である。代表的には、F G F様ポリペプチドをコードするDNAは、数百ヌクレオチド長である。約100ヌクレオチドよりも長い核酸は、これらの方法を使用していくつかのフラグメントとして合成され得る。次いで、このフラグメントは一緒に連結されて、全長F G F様ポリペプチドを形成し得る。通常、ポリペプチドのアミノ末端をコードするDNAフラグメントは、ATG(これは、メチオニン残基をコードする)を有する。このメチオニンは、宿主細胞中で産生されるポリペプチドが、その細胞から分泌されるように設計されるか否かに依存して、F G F様ポリペプチドの成熟形態に存在してもよいし存在しなくてもよい。

いくつかの場合、F G F様ポリペプチド改変体をコードする核酸分子を調製することが所望され得る。改変体をコードする核酸分子は、部位特異的変異誘発、PCR増幅または他の適切な方法を用いて産生され得、ここで、プライマーは、所望の点変異を有する(変異誘発技術の説明については、Sambrookら, 前出およびAusubelら, 前出を

10

20

30

40

50

参照のこと)。Engelsら、前出によって記載される方法を用いた化学合成もまた、このような改変体を調製するために用いられ得る。当業者に公知の他の方法もまた使用され得る。

特定の実施形態において、核酸改変体は、所定の宿主細胞におけるFGF様ポリペプチドの最適な発現のために変更されているコドンを含む。特定のコドンの変更は、発現について選択されるFGF様ポリペプチドおよび宿主細胞に依存する。このような「コドン最適化」は、種々の方法によって、例えば、所定の宿主細胞において高度に発現される遺伝子における使用に好ましいコドンを選択することによって行われ得る。高度に発現される細菌遺伝子のコドンの優先度についての「Ecohigh. __Cod」のようなコドン頻度の表を組み込むコンピューターアルゴリズムが使用され得、そしてUniversity of Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group, Madison, WIによって提供されている。他の有用なコドン頻度の表としては、「Celegans __high. cod」、「Celegans __low. cod」、「Drosophila __high. cod」、「Human __high. cod」、「Maize __high. cod」、および「Yeast __high. cod」が挙げられる。

他の実施形態において、核酸分子は、上で定義されるような保存的アミノ酸置換をとまなうFGF様改変体、一つ以上のN結合型グリコシル化部位またはO結合型グリコシル化部位の付加および/または欠失を含むFGF様改変体、一つ以上のシステイン残基の欠失および/または置換を含むFGF様改変体、あるいは上記のFGF様ポリペプチドフラグメントをコードする。さらに、核酸分子は、本明細書中に記載されるFGF様改変体、フラグメント、および融合ポリペプチドの任意の組み合わせをコードし得る。

(ベクターおよび宿主細胞)

FGF様ポリペプチドをコードする核酸分子は、標準的な連結技術を使用して適切な発現ベクターに挿入される。ベクターは、代表的には、使用される特定の宿主細胞において機能的である(すなわち、ベクターは、遺伝子の増幅および/または遺伝子の発現が生じ得るように宿主細胞機構と適合性である)ように選択される。FGF様ポリペプチドをコードする核酸分子は、原核生物、酵母、昆虫(バキュロウイルス系)および/または真核生物宿主細胞において増幅/発現され得る。宿主細胞の選択は、FGF様ポリペプチドが翻訳後修飾(例えば、グリコシル化および/またはリン酸化)されるか否かに一部依存する。そうなら、酵母、昆虫または哺乳動物宿主細胞が好ましい。発現ベクターの総説について、185 Meth. Enz. (D.V. Goeddel編, Academic Press 1990)を参照のこと。

代表的には、宿主細胞のいずれかにおいて使用される発現ベクターは、プラスミド維持のための配列ならびに外因性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のための配列を含む。このような配列(特定の実施形態において集合的に「隣接配列」と呼ばれる)は、代表的には、以下のヌクレオチドの下のうちの1つ以上を含む: プロモーター、1つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナースプライス部位およびアクセプタースプライス部位を含む完全イントロン配列、分泌のためのリーダー配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、および選択マーカーエレメント。これらの配列の各々は以下に議論される。

必要に応じて、ベクターは、「タグ」配列、すなわちFGF様ポリペプチドコード配列の5'末端または3'末端に位置するオリゴヌクレオチド分子を含み得; このオリゴヌクレオチド分子は、ポリHis(例えば、ヘキサHis)、あるいは市販の抗体が存在する、FLAG、HA(ヘマグルチニン(hemagglutinin)インフルエンザウイルス)またはmycのような他の「タグ」をコードする。このタグは、代表的にはポリペプチドの発現時にポリペプチドに融合され、そしてタグは宿主細胞からのFGF様ポリペプチドのアフィニティー精製のための手段として役立ち得る。アフィニティー精製は、例えば、タグに対する抗体をアフィニティーマトリクスとして使用してカラムクロマトグラフィ

ーによって達成され得る。必要に応じて、タグは後に、切断のために特定のペプチダーゼを使用するような種々の手段によって、精製されたF G F様ポリペプチドから除去され得る。

隣接配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種および/または株由来）、異種（すなわち、宿主細胞の種または株とは異なる種または株由来）、ハイブリッド（すなわち、1つより多い供給源由来の隣接配列の組み合わせ）もしくは合成であり得るか、または隣接配列は、F G F様発現を制御するように通常機能するネイティブな配列であり得る。このように、隣接配列の供給源は、隣接配列が宿主細胞機構において機能的であり活性化され得るならば、任意の原核生物、任意の真核生物、任意の脊椎動物生物、任意の無脊椎動物生物、または任意の植物であり得る。

10

本発明のベクターに有用な隣接配列は、当該分野で周知のいくつかの方法のいずれかによって得られ得る。代表的には、F G F様遺伝子に隣接する配列以外の本明細書中で有用な隣接配列は、マッピングおよび/または制限エンドヌクレアーゼ消化によって以前に同定されており、従って適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して適切な組織供給源から単離され得る。いくつかの場合において、1以上の隣接配列の全ヌクレオチド配列が公知であり得る。ここで、隣接配列は、核酸合成またはクローニングについて上記で記載される方法を使用して合成され得る。

隣接配列の全てまたは一部のみが公知である場合、隣接配列は、PCRを使用して、そして/またはゲノムライブラリーを同じかもしくは別の種由来の適切なオリゴヌクレオチドおよび/もしくは隣接配列フラグメントでスクリーニングすることによって得られ得る。隣接配列が公知でない場合、隣接配列を含むDNAフラグメントは、例えば、コード配列または別の遺伝子でさえ含み得る、より大きなDNA片から単離され得る。単離は、制限エンドヌクレアーゼ消化によって適切なDNAフラグメントを産生し、続いてアガロースゲル精製、Qiagen（登録商標）（Valencia, CA）カラムクロマトグラフィー、または当業者に公知の他の方法を使用して単離することによって達成され得る。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者に容易に明らかである。

20

複製起点は、代表的に、商業的に購入される原核生物発現ベクターの一部であり、この開始点は、宿主細胞におけるベクターの増幅に役立つ。特定のコピー数へのベクターの増幅は、いくつかの場合には、F G F様ポリペプチドの最適の発現に重要であり得る。選り抜きのベクターが複製起点部位を含まない場合、これは、公知の配列に基づいて化学的に合成され得、そしてベクターに連結され得る。例えば、プラスミドpBR322（製品番号303-3s、New England Biolabs、Beverly, MA）からの複製起点は、大部分のグラム陰性細菌に適切であり、そして種々の起点（例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス（VSV）あるいはHPVまたはBPVのようなパピローマウイルス）が、哺乳動物細胞におけるベクターをクローニングするために有用である。一般的に、複製起点の構成要素は、哺乳動物発現ベクターに必要ではない（例えば、SV40の起点は、しばしば、初期プロモーターを含むという理由だけで使用される）。

30

転写終結配列は、代表的に、ポリペプチドコード領域の末端の3'側に位置し、転写を終結させるために役立つ。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、G-Cリッチフラグメントであり、これにはポリT配列が続く。この配列はライブラリーから容易にクローニングされるかまたはベクターの一部として商業的に購入さえされるが、この配列は上記に記載されるような核酸合成のための方法を使用して容易に合成され得る。

40

選択マーカー遺伝子エレメントは、選択培養培地で増殖される宿主細胞の生存および増殖に必要なタンパク質をコードする。代表的な選択マーカー遺伝子は、以下のタンパク質をコードする：（a）原核生物宿主細胞に抗生物質または他の毒素（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、またはカナマイシン）に対する耐性を与えるタンパク質、（b）細胞の栄養要求性欠損を補完するタンパク質；または（c）複合培地から入手可能でない重要な栄養素を供給するタンパク質。好ましい選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子およびテトラサイクリン耐性遺伝子である。ネオマイシン耐性遺

50

伝子はまた、原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞における選択に使用され得る。他の選択遺伝子は、発現される遺伝子を増幅するために使用され得る。増幅は、増殖に重要なタンパク質の生成に非常に必要である遺伝子が、組換え細胞の連続的生成の染色体内でタンデムに繰り返されるプロセスである。哺乳動物細胞に適切な選択マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) およびチミジンキナーゼが挙げられる。哺乳動物細胞形質転換体を、この形質転換体のみがベクターに存在する選択遺伝子によって生存するのに独特に適合する淘汰圧下に配置する。培地中の選択因子の濃度が連続的に変化する条件下で形質転換された細胞を培養し、それによって選択遺伝子と FGF 様ポリペプチドをコードする DNA との両方の増幅を導くことによって、淘汰圧がかせられる。結果として、増加した量の FGF 様ポリペプチドが増幅された DNA から合成される。

10

リボソーム結合部位は、通常 mRNA の転写開始に必要とされ、そして Shine - Dalgarno 配列 (原核生物) または Kozak 配列 (真核生物) により特徴付けられる。このエレメントは典型的に、プロモーターに対して 3' に位置し、そして発現される FGF 様ポリペプチドのコード配列に対して 5' に位置する。Shine - Dalgarno 配列は、変化するが典型的にはポリプリンである (すなわち、高い A - G 含量を有する)。多くの Shine - Dalgarno 配列が同定されており、これらのそれぞれは、上記の方法および原核生物ベクターにおいて使用される方法を使用して、容易に合成され得る。

リーダー配列またはシグナル配列は、FGF 様ポリペプチドを宿主細胞から外に出すことを指向するために使用され得る。代表的に、シグナル配列は、FGF 様核酸分子のコード領域に配置されるか、または FGF 様ポリペプチドコード領域の 5' 末端に直接配置される。多くのシグナル配列が同定されており、そして選択された宿主細胞において機能的であるこれらのいずれかが、FGF 様の遺伝子または cDNA とともに使用され得る。従って、シグナル配列は、FGF 様の遺伝子または cDNA に対して同種 (天然に存在する) または異種であり得る。さらに、シグナル配列は、上記の方法を使用して化学的に合成され得る。ほとんどの場合、シグナルペプチドの存在を介する宿主細胞からの FGF 様ポリペプチドの分泌は、FGF 様ポリペプチドからのシグナルペプチドの除去を生じる。シグナル配列は、ベクターの構成要素であってもよいし、またはこれはベクターに挿入される FGF 様 DNA の一部であってもよい。

20

本発明の範囲内には、FGF 様コード領域に連結されたネイティブな FGF 様シグナル配列、および FGF 様コード領域に連結された異種シグナル配列が含まれる。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞により認識されそしてプロセッシングされる (すなわち、シグナルペプチダーゼにより切断される) シグナル配列であるべきである。ネイティブな FGF 様シグナル配列を認識せず、プロセッシングしない原核生物宿主細胞について、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、または熱安定エンテロトキシン II のリーダーの群から選択される原核生物リーダーにより置換され得る。酵母分泌において、ネイティブな FGF 様シグナル配列は、酵母インベルターゼ、因子、または酸性ホスファターゼの リーダー により置換される。哺乳動物細胞発現について、FGF 様ポリペプチドのネイティブなシグナル配列は十分であるが、他の哺乳動物シグナル配列が適切であり得る。

30

40

グリコシル化が真核生物宿主細胞発現系において所望されるようないくつかの場合、種々のプレ配列を操作してグリコシル化または収率を改良し得る。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更するかまたはプロ配列を付加し得、これはまた、グリコシル化に影響を与え得る。最終タンパク質産物は、(成熟タンパク質の最初のアミノ酸に対して) - 1 位に、発現に付随して 1 以上のさらなるアミノ酸を有し得、これは、完全に取り除かれていなくてもよい。例えば、最終タンパク質産物は、N 末端に結合されたペプチダーゼ切断部位において見出される 1 または 2 つのアミノ酸を有し得る。あるいは、いくつかの酵素切断部位の使用は、その酵素が成熟ポリペプチド内のそのような領域で切断する場合、所望の FGF 様ポリペプチドの、わずかに短縮された形態を生じ得る。

多くの場合、核酸分子の転写は、ベクター中の 1 以上のイントロンの存在により増加する

50

；これは、ポリペプチドが真核生物宿主細胞（特に、哺乳動物宿主細胞）において産生される場合に特にあてはまる。使用されるイントロンは、F G F 様遺伝子（特に、使用される遺伝子が全長ゲノム配列またはそのフラグメントである場合）内に天然に存在し得る。イントロンが、遺伝子（ほとんどの c D N A に関して）天然に存在しない場合、そのイントロンは、別の供給源から得られ得る。隣接配列および F G F 様遺伝子に関するイントロンの位置は、イントロンは有効であるように転写されなければならないので、一般に重要である。従って、F G F 様 c D N A 分子が発現されるべき場合、イントロンについての好ましい位置は、転写開始部位に対して 3' であり、かつポリ A 転写終結配列に対して 5' である。好ましくは、イントロンは、c D N A の一方の側または他方の側（すなわち、5' または 3'）に位置し、その結果、イントロンは、そのコード配列を中断しない。イントロンが挿入される宿主細胞と適合するならば、任意の供給源（任意のウイルス、原核生物および真核生物（植物または動物）の生物体が挙げられる）由来の任意のイントロンを使用して、本発明を実施し得る。また、本明細書中には、合成イントロンが含まれる。必要に応じて、1 より多くのイントロンをベクターにおいて使用し得る。

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、それぞれ代表的には、宿主生物により認識され、そして F G F 様ポリペプチドをコードする分子に作動可能に連結されているプロモーターを含む。プロモーターは、構造遺伝子の転写および翻訳を制御する、構造遺伝子（一般的には、約 100 ~ 1000 b p 以内）の開始コドンに対して上流（5'）に位置する、非翻訳配列である。プロモーターは従来、2つのクラス（誘導性プロモーターおよび構成性プロモーター）のうちの一方に分類される。誘導性プロモーターは、培養条件下でいくらかの変化（例えば、栄養素の存在もしくは非存在または温度の変化）にตอบสนองして、それらの制御下の D N A からの増加したレベルの転写を開始する。種々の潜在的な宿主細胞により認識される大量のプロモーターが周知である。これらのプロモーターは、制限酵素消化により供給源 D N A からプロモーターを取り除き、そしてベクターへ所望のプロモーター配列を挿入することにより、F G F 様ポリペプチドをコードする D N A に作動可能に連結される。ネイティブな F G F 様プロモーター配列は、F G F 様コード D N A の増幅および/または発現を指向するために使用され得る。しかし、異種プロモーターがネイティブプロモーターと比較して、発現タンパク質のより多い転写およびより高収率を可能にする場合、および使用のために選択された宿主細胞系と適合する場合、異種プロモーターが好ましい。

原核生物宿主を用いる使用に適切なプロモーターとしては、以下が挙げられる： - ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系；アルカリホスファターゼ、トリプトファン（t r p）プロモーター系；および t a c プロモーターのようなハイブリッドプロモーター。他の公知の細菌性プロモーターもまた適切である。これらの配列は、公開されており、それにより、当業者が、任意の必要な制限部位を供給する必要がある場合に、リンカーまたはアダプターを使用して所望の D N A 配列にそれらを連結することを可能にする。

酵母宿主を用いる使用に適切なプロモーターもまた、当該分野で周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターと共に有利に使用される。哺乳動物細胞との使用に適切なプロモーターは、周知であり、そして以下が挙げられる：ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス 2）、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B 型肝炎ウイルス、そして最も好ましくはシミアンウイルス 40（S V 40）のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター。他の適切な哺乳動物プロモーターとしては、異種哺乳動物プロモーター（例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーター）が挙げられる。

F G F 様遺伝子発現を制御する際の目的のプロモーターであり得るさらなるプロモーターとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：S V 40 初期プロモーター領域（B e r n o i s t および C h a m b o n , N a t u r e 290 : 304 - 10 (1981)）；C M V プロモーター；ラウス肉腫ウイルスの 3' 長末端反復配列に含まれるプロモーター（Y a m a m o t o ら , C e l l 22 : 787 - 97 (1980)）；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（W a g n e r ら , P r o c . N a t l . A c a d . S

10

20

30

40

50

ci . U . S . A . , 78 : 1444 - 45 (1981))、メタロチオネイン遺伝子の調節配列 (Brinster ら , Nature 296 : 39 - 42 (1982))、
- ラクタマーゼプロモーターのような原核生物発現ベクター (Villa - Kamaroff ら , Proc . Natl . Acad . Sci . U . S . A . , 75 : 3727 - 31 (1978)) ; または tac プロモーター (DeBoer ら , Proc . Natl . Acad . Sci . U . S . A . , 80 : 21 - 25 (1983)) 。以下の動物転写制御領域もまた目的のものであり、これらは、組織特異性を示し、そしてトランスジェニック動物において利用されている : 膵臓腺房細胞において活性であるエラスターゼ I 遺伝子制御領域 (Swift ら , Cell 38 : 639 - 46 (1984) ; Ornitz ら , Cold Spring Harbor Symp . Quant . Biol . 50 : 399 - 409 (1986) ; MacDonald , Hepatology 7 : 425 - 515 (1987)) ; 膵臓細胞中で活性であるインスリン遺伝子制御領域 (Hanahan , Nature , 315 : 115 - 22 (1985)) ; リンパ系細胞中で活性である免疫グロブリン遺伝子制御領域 (Grosschedl ら , Cell 38 : 647 - 58 (1984) ; Adames ら , Nature 318 : 533 - 38 (1985) ; Alexander ら , Mol . Cell . Biol . , 7 : 1436 - 44 (1987)) ; 精巣細胞、乳房細胞、リンパ系細胞および肥満細胞において活性であるマウス乳腺癌ウイルス制御領域 (Leder ら , Cell 45 : 485 - 495 (1986)) ; 肝臓において活性であるアルブミン遺伝子制御領域 (Pinkert ら , Genes and Devel . , 1 : 268 - 276 , 1987) ; 肝臓において活性であるフェトプロテイン遺伝子制御領域 (Krumlauf ら , Mol . Cell . Biol . , 5 : 1639 - 1648 , 1985 ; Hammer ら , Science , 235 : 53 - 58 (1987)) ; 肝臓において活性である 1 アンチトリプシン遺伝子制御配列 (Kelsey ら , Genes and Devel . 1 : 161 - 171 (1987)) ; 骨髄性細胞において活性である - グロビン遺伝子制御領域 (Mogram ら , Nature 315 : 338 - 340 (1985) ; Kollias ら , Cell 46 : 89 - 94 , 1986) ; 脳中の稀突起膠細胞において活性であるミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 (Readhead ら , Cell 48 : 703 - 12 (1987)) ; 骨格筋において活性であるミオシン軽鎖 - 2 遺伝子制御領域 (Sani , Nature , 314 : 283 - 86 (1985)) ; および視床下部において活性化される性腺刺激放出ホルモン遺伝子制御領域 (Mason ら , Science 234 : 1372 - 1378 (1986)) 。

エンハンサー配列は、高等真核生物による本発明の FGF 様タンパク質をコードする DNA の転写を増加させるためにベクターへ挿入され得る。エンハンサーは、DNA のシス作用性エレメントであり、通常約 10 ~ 300 bp 長であり、これは、プロモーターに対して作用し、その転写を増加させる。エンハンサーは比較的、配向依存性でありそして位置依存性である。エンハンサーは、転写単位に対して 5' 側および 3' 側に見出されてきた。哺乳動物遺伝子 (例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 - フェトプロテインおよびインスリン) から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が公知である。しかし、代表的に、ウイルス由来のエンハンサーが使用される。SV40 エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーターの活性化についての例示的な増強エレメントである。エンハンサーは、FGF 様 DNA に対して 5' 位または 3' 位でベクターへスプライスされ得るが、エンハンサーは、代表的には、プロモーターから 5' 部位に配置される。

本発明の発現ベクターは、市販のベクターのような出発ベクターから構築され得る。このようなベクターは、全ての所望の隣接配列を含んでも含まなくてもよい。上記の隣接配列のうちの 1 以上が、使用されるべきベクター中にまだ存在しない場合、これらは、それぞれ入手され、そしてベクターへ連結され得る。それぞれの隣接配列を得るために使用される方法は、当業者に周知である。

10

20

30

40

50

本発明を実施するために好ましいベクターは、細菌宿主細胞、昆虫宿主細胞および哺乳動物宿主細胞と適合するベクターである。このようなベクターとしては、特に、pCRII、pCR3およびpcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA)、pBSII (Stratagene, La Jolla, CA)、pET15 (Novagen, Madison, WI)、pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)、pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA)、pETL (BlueBacII; Invitrogen)、pDSR- (PCT公開番号WO90/14363) およびpFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY) が挙げられる。

さらに可能なベクターとしては、コスミド、プラスミドまたは改変ウイルスが挙げられるがこれらに限定されない。しかし、このベクター系が選択された宿主細胞と適合しなければならない。このようなベクターとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：例えば、Bluescript (登録商標) プラスミド誘導体 (高コピー数ColE1ベースのファージミド, Stratagene Cloning Systems, La Jolla CA)、Taq増幅されたPCR産物をクローニングするために設計されたPCRクローニングプラスミド (例えば、TOPO™ TA Cloning (登録商標) Kit, PCR2.1 (登録商標) プラスミド誘導体, Invitrogen, Carlsbad, CA) のようなプラスミド、ならびに哺乳動物ベクター、酵母ベクターまたはウイルスベクター (例えば、バキュロウイルス発現系 (pBacPAKプラスミド誘導体, Clontech, Palo Alto, CA))。組換え分子は、形質転換、トランスフェクション、感染、エレクトロポレーションまたは公知の他の技術を介して宿主細胞に導入され得る。

ベクターが構築され、そしてFGF様ポリペプチドをコードする核酸分子がベクターの適切な部位に挿入された後、完成されたベクターは、増幅および/またはポリペプチド発現のために適切な宿主細胞へ挿入され得る。

宿主細胞は、原核生物宿主細胞 (例えば、E. coli) または真核生物宿主細胞 (酵母細胞、昆虫細胞、または脊椎動物細胞) であり得る。適切な条件下で培養された場合、宿主細胞は、FGF様ポリペプチドを合成し、これはその後培養培地から収集され得るか (宿主細胞がFGF様ポリペプチドを培地中に分泌する場合)、またはFGF様ポリペプチドを産生する宿主細胞から直接収集される (FGF様ポリペプチドが分泌されない場合)。

適切な宿主細胞の選択は、種々の要因 (例えば、所望の発現レベル、活性にとって所望であるかまたは必要であるポリペプチド改変 (例えば、グリコシル化またはリン酸化) および生物学的に活性な分子への折り畳みの簡便性) に依存する。

多数の適切な宿主細胞が当該分野で公知であり、そして多くのものがAmerican Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VAから入手可能である。例としては、哺乳動物細胞 (例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO)、CHO DHFR-細胞 (Urlaubら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97: 4216-20 (1980))、ヒト胎児腎臓 (HEK) 293細胞もしくは293T細胞または3T3細胞であり得る。適切な哺乳動物宿主細胞の選択ならびに形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物産生および精製のための方法は、当該分野で公知である。他の適切な哺乳動物細胞株は、サルCOS-1細胞株およびCOS-7細胞株ならびにCV-1細胞株である。さらなる例示的な哺乳動物宿主細胞としては、形質転換された細胞株を含む、霊長類細胞株およびげっ歯類細胞株が挙げられる。正常な二倍体細胞、一次組織のインビトロ培養に由来する細胞株、ならびに一次外植片もまた適切である。候補細胞は、遺伝子型的に選択遺伝子が欠損していてもよいし、または優性に作用する選択遺伝子を含んでいてもよい。他の適切な哺乳動物細胞株としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：マウス神経芽細胞腫N2A細胞、HeLa細胞、マウスL-929細胞、Swiss、Balb-cもしくはNIHマウスに由来する3T3株またはBHKハムスター細胞株もしくはHaKハムスター細胞株。各々これらの細胞株は、タンパク質発現の分野の当業者に公知であり、そしてタンパク質発

10

20

30

40

50

現の分野の当業者にとって利用可能である。

本発明に適切な宿主細胞として同様に有用であるのは、細菌細胞である。例えば、*E. coli*の種々の株（例えば、HB101、DH5、DH10、およびMC1061）が、バイオテクノロジーの分野において宿主細胞として周知である。*B. subtilis*、*Pseudomonas spp.*、他の*Bacillus spp.*、*Streptomyces spp.*などの種々の株もまた、本方法において使用され得る。

当業者に公知の酵母細胞の多くの株もまた、本発明のポリペプチドの発現のための宿主細胞として利用可能である。好ましい酵母細胞としては、例えば、*Saccharomyces cerevisiae*が挙げられる。

さらに、所望される場合、昆虫細胞系が、本発明の方法において利用され得る。このような系は、例えば、Kittsら（*Biotechniques* 14: 810~17 (1993)）；Lucklow, *Curr. Opin. Biotechnol.* 4: 564~72 (1993)；およびLucklowら, *J. Virol.*, 67: 4566~79 (1993)に記載される。好ましい昆虫細胞は、Sf-9およびHi5 (*Invitrogen*) である。

選択された宿主細胞へのFGF様ポリペプチドについての発現ベクターの形質転換またはトランスフェクションは、周知の方法（例えば、塩化カルシウム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクチンまたはDEAE-デキストラン法を含む）により達成され得る。選択される方法は、部分的に、使用される宿主細胞の型と相関関係にあるものである。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、そして例えば、Sambrookら（前出）に記載される。

グリコシル化FGF様ポリペプチドを発現するためにトランスジェニック動物もまた使用し得る。例えば、トランスジェニック乳汁産生動物（例えば、ウシまたはヤギ）を使用し得、そしてその動物の乳汁中の本発明のグリコシル化ポリペプチドを入手し得る。FGF様ポリペプチドを産生するために植物もまた使用し得るが、一般に、植物中で生じるグリコシル化は、哺乳動物細胞にて産生されるものと異なり、そしてヒト治療用途に適切でないグリコシル化産生物を生じ得る。

（ポリペプチド産生）

FGF様ポリペプチド発現ベクターを含む（すなわち、形質転換またはトランスフェクトされた）宿主細胞が、当業者に周知の標準培地を使用して培養され得る。この培地は、通常、その細胞の増殖および生存に必要な栄養素すべてを含む。*E. coli*細胞を培養するのに適切な培地は、例えば、*Luria Broth (LB)*および/または*Terrific Broth (TB)*である。真核生物細胞を培養するのに適切な培地は、RPMI 1640、MEM、DMEMであり、これらすべては、培養される特定の細胞株により必要とされる血清および/または増殖因子が補充され得る。昆虫培養に適切な培地は、必要な場合にはイーストレート (*yeastolate*)、ラクトアルブミン加水分解産物および/またはウシ胎仔血清を補充した、グレース培地である。

代表的には、トランスフェクトまたは形質転換された細胞の選択的増殖に有用な抗生物質または他の化合物が、この培地に補充物として添加される。使用される化合物は、宿主細胞が形質転換されたプラスミド上に存在する選択マーカーエレメントにより決定される。例えば、その選択マーカーエレメントがカナマイシン耐性である場合、培養培地に添加される化合物は、カナマイシンである。選択的増殖のための他の化合物としては、アンピシリン、テトラサイクリンおよびネオマイシンが挙げられる。

宿主細胞により産生されるFGF様ポリペプチドの量は、当該分野で公知の標準的方法を使用して評価され得る。このような方法としては、限定はしないが、ウェスタンブロット分析、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、HPLC分離、免疫沈降、および/または活性アッセイ（例えば、DNA結合ゲルシフトアッセイ）が挙げられる。

FGF様ポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように設計された場合、ポリペプチドの大部分は、細胞培養培地にて見出され得る。しかし、FGF様ポリペプチドが宿主細胞か

10

20

30

40

50

ら分泌されない場合、F G F 様ポリペプチドは細胞質および／または核（真核生物宿主細胞について）あるいは細胞質ゾル（グラム陰性細菌宿主細胞について）に存在する。

宿主細胞の細胞質および／または核に存在するF G F 様ポリペプチドについては、宿主細胞は代表的に、最初に機械的にまたは界面活性剤を用いて破壊されて、細胞内含有物が緩衝化溶液中に放出される。次いで、F G F 様ポリペプチドは、この溶液から単離され得る。

溶液からのF G F 様ポリペプチドの精製は、種々の技術を使用して達成され得る。そのポリペプチドがそのカルボキシル末端もしくはアミノ末端のいずれかに、ヘキサヒスチジンのようなタグを含む（F G F 様ポリペプチド／ヘキサHis）かまたはF L A G（E a s t m a n K o d a k C o . , N e w H a v e n , C T）もしくはm y c（I n v i t r o g e n）のような他の小さいペプチドを含むように合成されている場合、そのポリペプチドは、カラムマトリックスがそのタグにまたはそのポリペプチドに直接高い親和性を有する（すなわち、F G F 様ポリペプチドを特異的に認識するモノクローナル抗体）アフィニティークラムにその溶液を通すことによって、本質的に1工程のプロセスで精製され得る。例えば、ポリヒスチジンはニッケルに大きな親和性および特異性で結合し、従ってニッケルのアフィニティークラム（例えば、Q i a g e n（登録商標）ニッケルカラム）が、F G F 様ポリペプチド／ポリHisの精製に使用され得る。例えば、C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y、10.11.8節（A u s u b e lら編、J o h n W i l e y & S o n s 1993）を参照のこと。

タグが結合されずにF G F 様ポリペプチドが調製され、そして抗体が利用可能でない場合、他の周知の精製手順が用いられ得る。このような手順としては、限定はしないが、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、H P L C、ゲル溶出と組み合わせたネイティブゲル電気泳動、ならびに分取等電点電気泳動（「I s o p r i m e」マシン／技術、H o e f e r S c i e n t i f i c）が挙げられる。いくつかの場合、2つ以上のこれらの技術が、純度の上昇を達成するために組み合わせられ得る。

F G F 様ポリペプチドが細胞内で産生される場合、細胞内物質（グラム陰性細菌についての封入体を含む）が、当業者に公知の任意の標準的技術を使用して宿主細胞から抽出され得る。例えば、宿主細胞は、フレンチプレス、ホモジナイゼーション、および／または超音波処理によって、ペリプラズム／細胞質の中身を放出するように溶解され得、それに続いて遠心分離され得る。

F G F 様ポリペプチドが細胞質ゾルにおいて封入体を形成した場合、その封入体は、しばしば、内側細胞膜および／または外側細胞膜に結合し得、従って、遠心分離後に、主にペレット物質中に見出される。次いで、このペレット物質は、極端なpH状態で処理されるか、またはカオトロピック剤（例えば、界面活性剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素、または尿素誘導体）を還元剤（例えば、ジチオスレイトール（アルカリ性pH）もしくはトリスカルボキシエチルホスフィン（酸性pH））の存在下で用いて処理されて、封入体を遊離、ばらばらにおよび可溶化し得る。ここで可溶化形態のF G F 様ポリペプチドは、次いで、ゲル電気泳動、免疫沈降などを使用して分析され得る。F G F 様ポリペプチドを単離することが所望される場合、単離は、以下に記載される方法およびM a r s t o nら、M e t h . E n z . 182:264-75（1990）に記載される方法のような、標準的方法を使用して達成され得る。

いくつかの場合において、F G F 様ポリペプチドは、単離の際に生物学的に活性でないかもしれない。そのポリペプチドを「リフォールディング」する、すなわち、その3次構造に変換してジスルフィド結合を生じるための種々の方法が、生物学的活性を回復するために使用され得る。このような方法は、可溶化されたポリペプチドを通常は7を超えるpHに、特定の濃度のカオトロップの存在下で曝すことを包含する。カオトロップの選択は、封入体可溶化のために使用される選択に非常に類似するが、通常このカオトロップは、より低い濃度で使用され、そして可溶化に使用されるカオトロップと必ずしも同じではない。ほとんどの場合、リフォールディング／酸化溶液はまた、還元剤を含むかまたは還元剤

に加えてその酸化形態を特定の比で含んで、特定の酸化還元ポテンシャルを生じ、それによりそのタンパク質のシステイン架橋の形成を生じるようなジスルフィドシャッフリングを可能にする。一般的に使用される酸化還元カップルのいくつかとしては、システイン/シスタミン、グルタチオン (GSH) / ジチオビス GSH、塩化銅 (II)、ジチオスレイトール (DTT) / ジチアン DTT、および 2 -メルカプトエタノール (bME) / ジチオ - b (ME) が挙げられる。多くの場合、共溶媒が、リフォールディングの効率を高めるために使用され得るかまたは必要であり得、そしてこの目的に使用されるさらに一般的な試薬としては、グリセロール、種々の分子量のポリエチレングリコール、アルギニンなどが挙げられる。

封入体が、FGF様ポリペプチドの発現の際に有意な程度まで形成されない場合は、そのポリペプチドは、主に、細胞ホモジネートの遠心分離後に上清中に見出される。そのポリペプチドは、以下に記載されるような方法を使用して、上清からさらに単離され得る。夾雑物を部分的または実質的に含まないように、FGF様ポリペプチドを部分的または完全に精製することが好ましい状況では、当業者に公知の標準的な方法が用いられ得る。このような方法としては、限定しないが、以下が挙げられる：電気泳動による分離とそれに続く電気溶出、種々の種類のクロマトグラフィー (アフィニティー、イムノアフィニティー、分子ふるい、および / またはイオン交換)、および / または高圧液体クロマトグラフィー。いくつかの場合、完全な精製のためにこれらの方法のうちの 1 より多くを使用することが好適であり得る。

FGF様ポリペプチド、そのフラグメント、および / または誘導体もまた、当該分野で公知の技術を使用して化学合成法 (例えば、固相ペプチド合成) により調製され得、その公知技術は、例えば、Merrifieldら、J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 (1963); Houghtenら、Proc Natl Acad. Sci. USA 82: 5132 (1985)、ならびにStewartおよびYoung Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co. 1984) に示される技術である。このようなポリペプチドは、アミノ末端にメチオニンを含んで合成され得るし、または含まずに合成され得る。化学的に合成された FGF様ポリペプチドまたはフラグメントは、これらの参考文献に示される方法を使用して、ジスルフィド架橋を形成するように酸化され得る。FGF様ポリペプチド、フラグメントもしくは誘導体は、組換え産生されるかもしくは天然の供給源から精製された対応する FGF様ポリペプチド、フラグメントもしくは誘導体に匹敵する生物学的活性を有すると予測され、従って、組換え FGF様ポリペプチドもしくは天然の FGF様ポリペプチドと互換可能に使用され得る。

FGF様ポリペプチドを得る別の手段は、その FGF様ポリペプチドが天然で見出される生物学的サンプル (例えば、供給源組織および / または流体) からの精製を介する。このような精製は、上記のようなタンパク質精製のための方法を使用して実行され得る。精製の間の FGF様ポリペプチドの存在は、例えば、組換え産生された FGF様ポリペプチドもしくはそのペプチドフラグメントに対して調製された抗体を使用して、モニターされ得る。

(ポリペプチド)

本発明のポリペプチドは、単離された FGF様ポリペプチドおよびそれに関するポリペプチド (本明細書中上記規定されるような、フラグメント、改変体、融合ポリペプチドおよび誘導体を含む) を包含する。

本発明の FGF様ポリペプチドフラグメントは、例えば、アミノ末端 (リーダー配列を有するかまたは有さない) の短縮化、カルボキシル末端の短縮化、および / またはポリペプチドの内部欠失から生じ得る。好ましい実施形態において、短縮および / または欠失は、約 10 アミノ酸、または約 20 アミノ酸、または約 50 アミノ酸、または約 75 アミノ酸、または約 100 アミノ酸、または 100 アミノ酸より多いアミノ酸を含む。このように産生されたポリペプチドフラグメントは、約 25 連続するアミノ酸、または約 50 アミノ酸、または約 75 アミノ酸、または約 100 アミノ酸、または約 150 アミノ酸、または

約 200 アミノ酸を含む。このような FGF 様ポリペプチドフラグメントは、必要に応じて、アミノ末端メチオニン残基を含み得る。

本発明の FGF 様ポリペプチド改変体は、配列番号 2 または配列番号 4 と比較して、1 つ以上のアミノ酸置換、付加および/または欠失を含む。好ましい実施形態において、この改変体は、1 ~ 3、または 1 ~ 5、または 1 ~ 10、または 1 ~ 15、または 1 ~ 20、または 1 ~ 25、または 1 ~ 50、または 1 ~ 75、または 1 ~ 100、または 100 を超える、アミノ酸置換、挿入、付加および/もしくは欠失を有し、ここでその置換は、上記のように保存的であり得るか、または非保存的であり得るか、あるいはその組み合わせであり得、そしてここで FGF 様ポリペプチド改変体は、FGF 様活性を保持している。これらの改変体は、カルボキシ末端においてかまたはアミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）のいずれかにおいてアミノ酸残基の付加を有し得る。

好ましい FGF 様ポリペプチド改変体としては、グリコシル化改変体が挙げられ、ここで、グリコシル化部位の数および/または種類は、ネイティブな FGF 酸様ポリペプチドと比較して変更されている。1 つの実施形態において、FGF 様改変体は、多いかまたは少ない数の N 結合型グリコシル化部位を含む。N 結合型グリコシル化部位は、配列 Asn - X - Ser または Asn - X - Thr によって特徴付けられ、ここで、「X」として示されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のタイプのアミノ酸残基であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N 結合型糖鎖の付加のための潜在的な新たな部位を提供する。あるいは、この配列を除去する置換は、存在する N 結合型糖鎖を除く。また、N 結合型糖鎖の再配列が提供され、ここで、一つ以上の N 結合型グリコシル化部位（代表的には、天然にある部位）が除去されてそして一つ以上の新しい N 結合型部位が作製される。さらなる好ましい FGF 様改変体としては、システイン改変体が挙げられ、ここで、一つ以上のシステイン残基が、欠失されているか、または別のアミノ酸（例えば、セリン）を置換している。システイン改変体は、FGF 様ポリペプチドが、不溶性封入体の単離の後のように、生物学的に活性なコンホメーションに折り畳まれなければならない場合に有用である。システイン改変体は、一般的に、ネイティブなタンパク質よりも少ないシステイン残基を有し、そして代表的には、不對システインから生じる相互作用を最小化するために偶数を有する。

当業者は、周知の技術を使用して、ネイティブの FGF 様ポリペプチドの適切な改変体を決定し得る。例えば、生物学的活性を破壊することなく変化され得る分子を適切な領域を推定し得る。また、当業者は、生物学的活性または構造に重要であり得る領域さえも、その生物学的活性を破壊することもしくはそのポリペプチド構造に不利に影響することなく、保存的アミノ酸置換に供され得ることを認識する。

活性を破壊することなく変化され得る分子の適切な領域を予測するために、当業者は、活性に重要であると考えられていない領域を標的化し得る。例えば、同じ種または他の種由来の類似の活性を有する類似のポリペプチドが公知である場合、当業者は、FGF 様ポリペプチドのアミノ酸配列をそのような類似のポリペプチドと比較し得る。このような比較を行った後、当業者は、類似のポリペプチド間で保存される分子の残基および部分を決定し得る。当業者は、保存されない FGF 様分子の領域での変化が生物学的活性および/または構造に不利に影響しそうにないことを知っている。当業者はまた、比較的保存された領域においてさえ、活性を保持しつつ、天然に存在する残基に代わって化学的に類似するアミノ酸でおそらく置換し得る（保存的アミノ酸残基置換）。

また、当業者は、活性もしくは構造について重要な類似のポリペプチド中の残基を同定する構造 - 機能研究を検討し得る。このような比較を考慮して、当業者は、類似のポリペプチド中の活性もしくは構造に重要なアミノ酸残基に対応する FGF 様ポリペプチド中のアミノ酸残基の重要性を予測し得る。当業者は、FGF 様ポリペプチドのこのような推定された重要なアミノ酸残基に代わる化学的に類似のアミノ酸置換を選択し得る。

利用可能な場合、当業者はまた、3 次元構造、およびその構造に関連するアミノ酸配列を分析し得る。その情報を考慮して、当業者は、その 3 次元構造に関する FGF 様ポリペプチドのアミノ酸残基の整列を予測でき得る。当業者は、そのタンパク質の表面上にあると

10

20

30

40

50

予測されるアミノ酸残基に対する急激な変化を作製しないように選択し得る。なぜなら、そのような残基は、他の分子との重要な相互作用に関与し得るからである。

さらに、当業者は、各所望のアミノ酸残基において単一アミノ酸置換を含む試験改変体を作製し得た。この改変体は、当業者に公知の活性アッセイを用いてスクリーニングされ得た。そのような改変体を使用して、適切な改変体に関する情報を集め得る。例えば、当業者は、特定のアミノ酸残基に対する変更が、崩壊された活性を生じることを発見した場合、そのような変更を有する改変体は、回避される。言い換えると、そのような実験から集められた情報に基づいて、さらなる受容可能な改変体を見出すことを試みる場合、当業者は、さらなる置換が単独または他の変異と組み合わせるとかのいずれかで回避されるべきであるアミノ酸を知る。

10

本発明の F G F 様融合ポリペプチドは、異種ペプチドもしくはタンパク質に融合された、F G F 様ポリペプチド、フラグメント、改変体もしくは誘導体を含む。異種ペプチドおよびタンパク質としては、F G F 様融合ポリペプチドの検出および/もしくは単離を可能にするエピトープ、膜貫通レセプタータンパク質もしくはその部分（例えば、細胞外ドメイン、または膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン）、または膜貫通レセプタータンパク質に結合するリガンドもしくはその部分、触媒活性な酵素もしくはその部分、オリゴマー化を促進するタンパク質もしくはペプチド（例えば、ロイシンジッパードメイン）、および安定性を増大させるタンパク質もしくはペプチド（例えば、免疫グロブリン定常領域）が挙げられるが、これらに限定されない。F G F 様ポリペプチドは、それ自体またはそのフラグメント、改変体もしくは誘導体に融合され得る。融合は、F G F 様ポリペプチドのアミノ末端もしくはカルボキシ末端のいずれかでなされ得、そしてリンカーまたはアダプター分子なしで直接であり得るし、あるいはリンカーまたはアダプター分子（例えば、1つ以上のアミノ酸残基～約20アミノ酸残基まで、もしくは約50アミノ酸残基まで）を介してであり得る。リンカーまたはアダプター分子はまた、融合部分の分離を可能にするように、DNA制限エンドヌクレアーゼについてまたはプロテアーゼについての切断部位を含んで設計され得る。

20

本発明のさらに好ましい実施形態において、F G F 様ポリペプチド、フラグメント、改変体および/または誘導体を、ヒト Ig G の F c 領域に融合させる。1つの例において、当業者に公知の方法を使用して、ヒト Ig G のヒンジ、C H 2 および C H 3 領域を、F G F 様ポリペプチドの N 末端または C 末端のいずれかに融合させ得る。別の例において、ヒンジ領域の一部ならびに C H 2 および C H 3 領域を、融合し得る。このように産生された F G F 様 F c 融合ポリペプチドは、Protein A アフィニティークラムを用いて精製され得る。さらに、F c 領域に融合されたペプチドおよびタンパク質は、その融合されていない対応物よりも実質的に大きい、インビボでの半減期を示すことが見い出されている。また、F c 領域への融合は、この融合ポリペプチドのダイマー化/マルチマー化を可能にする。この F c 領域は、天然に存在する F c 領域であり得るか、または治療的品質、循環時間、凝集の減少などのような、特定の質を改善するように変更され得る。

30

F G F 様ポリペプチド誘導体は、本発明の範囲に含まれる。このような誘導体は、F G F 様ポリペプチドがポリマーに連結されている、化学的に改変された F G F 様ポリペプチド組成物である。選択されるポリマーは、代表的には水溶性であり、その結果、そのポリマーに連結されているタンパク質は、水性環境（例えば、生理学的環境）下で沈殿しない。このポリマーは、任意の分子量であり得、そして分枝されていても分枝されていなくてもよい。ポリマーの混合物が、F G F 様ポリペプチドポリマーの範囲内に含まれる。好ましくは、最終生成物の調製物の治療的使用のために、このポリマーは、薬学的に受容可能である。

40

水溶性ポリマーまたはそれらの混合物としては、例えば、以下からなる群より選択される：ポリエチレングリコール（PEG）、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、デキストラン（例えば、低分子量（例えば、約6kD）のデキストラン）、セルロースまたは他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ-（N-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポ

50

リマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）およびポリビニルアルコール。共有結合されたF G F様ポリペプチドマルチマーを調製するために使用され得る、二官能性P E G架橋分子もまた、本発明に含まれる。

アシル化反応について、選択されるポリマーは、1つの反応エステル基を有するべきである。還元アルキル化について、選択されるポリマーは、1つの反応性アルデヒド基を有するべきである。反応性アルデヒドは、例えば、水溶性のポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、またはそのモノC 1 ~ C 1 0アルコキシまたはアリーロキシ誘導体である（米国特許第5, 252, 714号を参照のこと）。

F G F様ポリペプチドのペグ化（p e g y l a t i o n）は、例えば、以下の参考文献に記載されるように、当該分野で公知のペグ化反応のいずれかにより行われ得る：F r a n c i sら、F o c u s o n G r o w t h F a c t o r s 3、4 ~ 1 0（1992）；欧州特許第0 154 316号；同第0 401 384号および米国特許第4, 179, 337号。ペグ化は、以下に記載するように反応性ポリエチレングリコール分子（または、同種反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して行われ得る。

本明細書中での使用のための1つの水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコールであり、P E Gと省略される。本明細書中で使用される場合、ポリエチレングリコールは、他のタンパク質（例えば、モノ - （C 1 ~ C 1 0）アルコキシポリエチレングリコールまたはモノ - （C 1 ~ C 1 0）アリーロキシポリエチレングリコール）を誘導体化するために使用されてきたP E Gの形態のいずれかを含むことを意図する。

一般に、化学的な誘導体化は、生物学的に活性な物質を活性化ポリマー分子と反応させるために使用される任意の適切な条件下で行われ得る。ペグ化F G F様ポリペプチドを調製するための方法は、一般に以下の工程を包含する：（a）F G F様ポリペプチドが、1以上のP E G基に結合されるような条件下でポリペプチドをポリエチレングリコール（例えば、P E Gの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体）と反応させる工程、および（b）反応生成物を得る工程。一般に、アシル化反応に最適な反応条件は、公知のパラメーターおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、P E G：タンパク質の比が大きいほど、ポリ - ペグ化生成物の割合が高くなる。

好ましい実施形態において、F G F様ポリペプチド誘導体は、アミノ末端で単一のP E G部分を有する。米国特許第5, 234, 784号（本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。

一般に、本発明のF G F様ポリペプチド誘導体の投与によって緩和または調節され得る状態としては、F G F様ポリペプチドについて本明細書中で記載される状態が挙げられる。しかし、本明細書中に開示されるF G F様ポリペプチド誘導体は、非誘導体化分子と比較して、さらなる活性、増強または減少された生物学的活性、または他の特徴（例えば、増加または減少された半減期）を有し得る。

（抗体）

F G F様ポリメラーゼ、フラグメント、変異体および誘導体は、当該分野で公知の方法を使用して、抗体を調製するために使用され得る。従って、F G F様ポリペプチドを結合する抗体および抗体フラグメントは、本発明の範囲内である。抗体は、ポリクローナル、単一特異的（m o n o s p e c i f i c）ポリクローナル、モノクローナル、組換え、キメラ、ヒト化、完全ヒト、単鎖および/または二重特異的（b i s p e c i f i c）であり得る。

F G F様ポリメラーゼに対するポリクローナル抗体は、一般に、F G F様ポリペプチドおよびアジュバントを複数回の皮下注射または腹腔内注射することにより動物（ウサギまたはマウス）において誘起される。F G F様ポリペプチドあるいはその改変体、フラグメントまたは誘導体を、キャリアタンパク質に結合体化することが有用であり得、このキャリアタンパク質は、免疫される種において免疫原性である（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清、アルブミン、ウシサイログロブリンまたはダイズトリプシンインヒビター）。また、凝集因子（例えば、ミョウバン）も、免疫応答を増強するために使用さ

れる。免疫後、動物を採血し、そして血清を、抗 F G F 様抗体力価についてアッセイする。

F G F 様ポリペプチドに対するモノクローナル抗体は、培養物中の継代細胞株による抗体分子の産生を提供する、任意の方法を使用して産生される。モノクローナル抗体を調製するための適切な方法の例としては、Kohlerら、Nature 256:495-497、1975のハイブリドーマ法、およびKozbor, J. Immunol. 133:3001、1984; Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications、51~63頁(Marcel Dekker, 1987)のヒトB細胞ハイブリドーマ法が挙げられる。

10

F G F 様ポリペプチドと反応性のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた、本発明によって提供される。

本発明のモノクローナル抗体は、治療剤としての使用のために改変され得る。1つの実施形態は、「キメラ」抗体であり、ここで、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するかまたは特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列のフラグメントと、同一であるかまたは相同であり、一方、鎖の残りの部分は、別の種に由来するかまたは別の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と、同一であるかまたは相同である。このような抗体のフラグメントもまた、それらが、所望の生物学的活性を示す限り、含まれる(米国特許第4,816,567号; Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851-6855、1985を参照のこと)。

20

別の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、「ヒト化」抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト供給源由来のそのヒト化抗体に導入された1以上のアミノ酸残基を有する。ヒト化は、例えば、齧歯目の相補的決定領域(CDR)の少なくとも一部を、ヒト抗体の対応する領域で置換することによる、当該分野で公知の以下の方法(Jonesら、Nature 321:522-52(1986); Riechmannら、Nature 332:323-327(1988); Verhoeyenら、Science 239:1534-1536(1988))に従って、行われ得る。

F G F 様ポリペプチド、フラグメント、改変体および/または誘導体を結合する、完全ヒト抗体もまた、本発明に含まれる。このような抗体は、内因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体のレパートリーを産生し得る、トランスジェニック動物(例えば、マウス)の(必要に応じてキャリアに結合体化された)F G F 様抗原で免疫することによって産生される。例えば、Jakobovitsら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:2551-2555(1993); Jakobovitsら、Nature 362:255-258(1993); Bruggemannら、Year in Immunol. 7:33(1993)を参照のこと。ヒト抗体もまた、ファージディスプレイライブラリーにおいて生成され得る(Hoogenboomら、J. Mol. Biol. 227:381(1991); Marksら、J. Mol. Biol. 222:581(1991))。

30

40

キメラ抗体、CDRグラフト化抗体、およびヒト化抗体は、代表的には、組換え方法により生成される。これらの抗体をコードする核酸は、宿主細胞に導入され、そして本明細書中上記される材料および方法を用いて産生される。好ましい実施形態において、抗体は、哺乳動物宿主細胞(例えば、CHO細胞)において発現される。完全ヒト抗体は、宿主細胞における組換えDNAの発現によるか、または上記のハイブリドーマ細胞における発現により生成され得る。

診断適用に関しては、特定の実施形態において、抗F G F様抗体は、代表的には検出可能な部分で標識され得る。この検出可能な部分は、直接的または間接的のいずれかで検出可能なシグナルを生じ得る任意の部分である。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体(例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S または ^{125}I)、蛍光化合物もしくは化学発光化合物(例

50

えば、フルオロセインイソチオシアネート、ローダミンもしくはルシフェリン)；または酵素(例えば、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ)であり得る。Bayerら, Meth. Enz. 184:138-163(1990)。

本発明の抗FGF様抗体は、FGF様ポリペプチドの検出および定量について、任意の公知のアッセイ方法(例えば、競合結合アッセイ、直接的サンドイッチアッセイおよび間接的サンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイ(Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, 147-158(CRC Press, 1987))において用いられ得る。この抗体は、使用されるアッセイ法について適切な親和性でFGF様ポリペプチドを結合する。

競合結合アッセイは、限定された量の抗FGF様抗体との結合について試験サンプル分析物(FGF様ポリペプチド)と競合する標識された標準物質(例えば、FGF様ポリペプチドまたはその免疫学的に反応性の部分)の能力に依存する。試験サンプル中のFGF様ポリペプチドの量は、この抗体に結合する標準物質の量に逆比例する。結合する標準物質の測定を容易にするために、この抗体は、代表的には、競合の前または後に不溶化され、その結果、この抗体に結合する標準物質および分析物は、結合しないままの標準物質および分析物から簡単に分離され得る。

サンドイッチアッセイは、2つの抗体(各々、検出され、そして/または定量されるタンパク質の異なる免疫原性部分または、エピトープに結合し得る)の使用に関する。サンドイッチアッセイにおいて、この試験サンプル分析物は、代表的には、固体支持体に固定化された第1の抗体、その後第2の抗体が分析物に結合し、このようにして不溶性の3部分で構成される複合体を形成する。例えば、米国特許第4,376,110号を参照のこと。第2の抗体は、それ自体検出可能な部分で標識され得るか(直接サンドイッチアッセイ)、または検出可能な部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を用いて測定され得る(間接サンドイッチアッセイ)。例えば、サンドイッチアッセイの1つの型は、ELISAアッセイであり、この場合、この検出可能な部分は酵素である。

本発明の抗FGF様抗体はまた、インビボ画像化のために有用である。検出可能な部分で標識された抗体は、動物に(好ましくは、血流に)投与され得、そして宿主における標識化抗体の存在および位置がアッセイされる。この抗体は、動物において(核磁気共鳴、放射線学または当該分野で公知の他の検出手段のいずれかで)検出可能な任意の部分で標識され得る。

本発明はまた、抗FGF様抗体および生物学的サンプルにおいてFGF様ポリペプチドレベルを検出するに有用な他の試薬を含むキットに関する。このような試薬としては、以下が挙げられ得る: 2次活性、検出可能な標識、ブロッキング血清、陽性コントロールサンプルおよび陰性コントロールサンプル、ならびに検出試薬。

本発明の抗体は、治療剤として使用され得る。これらの治療的抗体は、一般に、それらがFGF様ポリペプチドの生物学的活性の少なくとも1つを増強または減少するかのいずれかであるという点で、それぞれ、アゴニストまたはアンタゴニストである。1つの実施形態において、本発明のアンタゴニスト抗体は、FGF様ポリペプチド、フラグメント、改変体および/または誘導体に特異的に結合し得、そしてFGF様ポリペプチドの機能的活性をインビボまたはインビトロで阻害または排除し得る抗体またはその結合フラグメントである。好ましい実施形態において、アンタゴニスト抗体は、FGF様ポリペプチドの機能的活性を少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約80%阻害する。別の実施形態において、アンタゴニスト抗体は、FGF様結合パートナーと相互作用し、それによりインビトロまたはインビボでFGF様活性を阻害または排除し得る抗体であり得る。アゴニスト抗FGF様抗体およびアンタゴニスト抗FGF様抗体は、以下に記載のスクリーニングアッセイにより同定される。

(遺伝子操作した非ヒト動物)

ネイティブFGF様ポリペプチドをコードする遺伝子が破壊(すなわち「ノックアウト」)されて、その結果、FGF様ポリペプチドの発現レベルが、有意に減少されているかま

10

20

30

40

50

たは完全に消失されている、非ヒト動物（例えば、マウス、ラットまたは他の齧歯目、ウサギ、ヤギまたはヒツジ、あるいは他の家畜動物）も、本発明にさらに含まれる。このような動物は、米国特許第 5,557,032 号に記載されるような技術および方法を使用して調製され得る。

本発明はさらに、その動物についてネイティブな形態の FGF 様ポリペプチドをコードする遺伝子または異種 FGF 様ポリペプチド遺伝子が、その動物によって過剰発現されている（それによって「トランスジェニック」動物が作製される）非ヒト動物（例えば、マウス、ラットまたは他の齧歯目、ウサギ、ヤギまたはヒツジ、あるいは他の家畜動物）を包含する。このようなトランスジェニック動物は、米国特許第 5,489,743 号および PCT 出願番号 WO 94/28122 に記載のような、周知の方法を使用して調製され得る。

10

本発明はさらに、本発明の 1 以上の FGF 様ポリペプチドに対するプロモーターが、活性化または不活性化されて（例えば、以下に記載されるような相同組換え法を使用することによって）1 以上のネイティブ FGF 様ポリペプチドの発現レベルが変更されている非ヒト動物を包含する。

これらの非ヒト動物は、薬物候補スクリーニングに使用され得る。動物に対する薬物候補の影響が測定され得る。例えば、薬物候補は、FGF 様遺伝子の発現を減少または増加し得る。特定の実施形態において、産生される FGF 様ポリペプチドまたは FGF 様ポリペプチドフラグメントの量は、薬物候補への動物の曝露後に測定され得る。特定の実施形態において、動物に対する薬物候補の実際の影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、疾患または病理学的状態を生じ得るか、またはそれらに関連し得る。このような場合において、遺伝子の発現を減少する薬物候補の能力または病理学的状態を防止または阻止する能力を試験し得る。他の例において、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメント）の産生が、疾患または病理学的状態を生じ得るか、またはそれらに関連し得る。このような場合において、このような代謝産物の産生を減少する薬物候補の能力または病理学的状態を防止または阻止する能力を試験し得る。

20

（FGF 様ポリペプチド活性のモジュレーター）

いくつかの状況において、FGF 様ポリペプチドの活性のモジュレーターである分子（すなわち、アゴニストまたはアンタゴニスト）を同定することが所望され得る。

FGF 様ポリペプチドを調節する天然または合成の分子は、1 つ以上のスクリーニングアッセイ（例えば、本明細書において記載されるようなもの）を用いて同定され得る。そのような分子は、エキソピボでの様式もしくはインピボでの様式のいずれかで、または局所もしくは静脈内注射、または経口送達、移植デバイスなどにより、投与され得る。

30

以下の定義が、アッセイを記載するために本明細書中で使用される。

「試験分子」とは、FGF 様ポリペプチドの活性を調節（すなわち、増加または減少）させる能力について評価される状態にある分子をいう。最も一般的には、試験分子は、FGF 様ポリペプチドと直接相互作用する。しかし、試験分子はまた、FGF 様遺伝子発現に影響を与えることにより、または FGF 様結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）に結合することにより、FGF 様ポリペプチド活性を間接的に調節し得ることもまた企図される。1 つの実施形態において、試験分子は、少なくとも約 10^{-6} M、好ましくは約 10^{-8} M、より好ましくは約 10^{-9} M、そしてさらに好ましくは約 10^{-10} M の親和性定数で FGF 様ポリペプチドに結合する。

40

FGF 様ポリペプチドと相互作用する化合物を同定するための方法は、本発明に包含される。特定の実施形態において、FGF 様ポリペプチドは、試験分子と、その試験分子がその FGF 様ポリペプチドとの相互作用を可能にする条件下で、インキュベートされ、そしてその相互作用の程度が測定され得る。この試験分子は、実質的に精製された形態で、または粗混合物中でスクリーニングされ得る。この試験分子は、核酸分子、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質または低分子量分子の有機もしくは無機化合物であり得る。1 セットの分子が FGF 様ポリペプチドと相互作用すると同定された場合、この分子が FGF 様ポリペプチド活性を増加または減少させる能力についてさらに評価され得る。

50

試験分子と、F G F 様ポリペプチドとの相互作用の測定は、いくつかの形式で行われ得、これには、細胞ベースの結合アッセイ、膜結合アッセイ、溶液相アッセイおよび免疫アッセイが含まれる。一般的に、試験分子は、特定時間にわたり、F G F 様ポリペプチドとインキュベートされ、そしてF G F 様ポリペプチド活性は、生物学的活性を測定する1つ以上の本明細書中で記載されるアッセイにより決定される。

試験分子とF G F 様ポリペプチドとの相互作用はまた、免疫アッセイにおいてポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いて直接アッセイされ得る。あるいは、上記のようなエピトープタグを含む、改変された形態のF G F 様ポリペプチドは、溶液および免疫アッセイにおいて使用され得る。

特定の実施形態において、F G F 様ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストは、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質または低分子量分子であって、F G F 様ポリペプチドと相互作用してその活性を調節するものであり得る。F G F 様ポリペプチドの潜在的なタンパク質アンタゴニストとしては、ポリペプチドの活性領域と相互作用する抗体およびF G F 様ポリペプチドの少なくとも1つを阻害または排除する抗体が挙げられる。F G F 様ポリペプチド発現を調節する分子としては、F G F 様ポリペプチドをコードする核酸に相補的であるか、またはF G F 様ポリペプチドの発現を指向または制御する核酸配列に相補的であり、そして発現のアンチセンスレギュレーターとして作用する核酸が挙げられ得る。F G F 様ポリペプチドが結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）との相互作用を介して生物学的活性を提示する事象において、種々のインビトロアッセイを使用して、F G F 様ポリペプチドの対応する結合パートナーへの結合を測定し得る。これらのアッセイを使用して、試験分子を、それらがF G F 様ポリペプチドのその結合パートナーへの結合の速度および/または程度を増加もしくは減少させる能力について、スクリーニングし得る。1つのアッセイにおいて、F G F 様ポリペプチドは、マイクロタイタープレートのウェルの底部への付着によって固定される。次いで、放射標識されたF G F 様結合パートナー（例えば、ヨウ化F G F 様結合パートナー）および試験分子は、1回にいずれか一方を（いずれの順番でも）または同時にそのウェルに加えることができる。インキュベーション後、そのウェルを洗浄し得、そして放射能について計数して（シンチレーションカウンターを用いて）その結合パートナーがF G F 様ポリペプチドへ結合した結合の程度を決定し得る。代表的に、その分子は、ある範囲の濃度にわたって試験され得、そしてその試験アッセイの1つ以上の要素を欠く一連のコントロールウェルを、その結果の評価における精確さのために使用し得る。この方法の代替としては、そのタンパク質の「位置」を反転させること（すなわち、F G F 様結合パートナーを、マイクロタイタープレートウェルに固定すること）、その試験分子および放射標識されたF G F 様ポリペプチドとインキュベートすること、ならびにF G F 様結合の程度を決定すること（例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, New York, NY, 1995の第18章を参照のこと）が含まれる。

放射標識の代替として、F G F 様ポリペプチドまたはその結合パートナーは、ビオチンと結合体化され得、次いでビオチン化タンパク質の存在は、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）もしくはアルカリホスファターゼ（AP））に結合したストレプトアビジン（これは、比色測定で検出され得る）またはストレプトアビジンの蛍光タグ化によって、検出され得る。F G F 様ポリペプチドまたはF G F 様結合体パートナーに対して指向され、そしてビオチンと結合体化された抗体もまた使用され得、そしてAPまたはHRPに結合した酵素結合ストレプトアビジンとのインキュベーション後に、検出され得る。

F G F 様ポリペプチドおよびF G F 様結合パートナーもまた、アガロースビーズ、アクリルビーズまたは他の型のそのような不活性固相基体への付着によって固定され得る。この基体-タンパク質複合体は、その相補タンパク質およびその試験化合物を含む溶液中に配置され得る。インキュベーション後、そのビーズは、遠心分離によって沈降され得、そしてF G F 様ポリペプチドとその結合パートナーとの間の結合量を上記の方法を用いて検討

10

20

30

40

50

し得る。あるいは、その基体 - タンパク質複合体は、カラムに固定され得、そしてその試験分子および相補タンパク質は、そのカラムを通過させられ得る。次いで、F G F 様ポリペプチドとその結合パートナーとの間の複合体の形成は、上記の技術（すなわち、放射標識、抗体結合など）のいずれかを用いて検討され得る。

別のインビトロアッセイであって、F G F 様結合タンパク質とF G F 様結合パートナーとの複合体の形成を増加または減少する試験分子を同定するために有用であるアッセイは、表面プラズモン共鳴検出器系（例えば、B i a c o r e アッセイ系（P h a r m a c i a , P i s c a t a w a y , N J ））である。B i a c o r e 系は、製造業者のプロトコルを用いて実施され得る。このアッセイは、本質的に、F G F 様またはF G F 様結合パートナーのいずれかを、デキストランコーティングされたセンサーチップであって、検出器に配置されているものへの共有結合を包含する。次いで、この試験化合物および他の相補タンパク質は、同時または連続的のいずれかでそのセンサーチップを含むチャンバーへと注射され得る。相補タンパク質の結合量は、そのセンサーチップのデキストランコーティングされた側と物理的に結合した分子量の変化に基づいて評価され得、分子量における変化は、その検出器系によって測定され得る。

いくつかの場合において、2つ以上の試験化合物と一緒に、それらがF G F 様ポリペプチドとF G F 様結合パートナー複合体との複合体の形成を増加または減少する能力について、評価することが所望され得る。これらの場合において、上記のアッセイは、そのようなさらなる試験化合物を、第一の試験化合物と同時またはその後のいずれかで加えることによって、容易に改変され得る。このアッセイにおける残りの工程は、上記のとおりである。

インビトロアッセイ（例えば、上記のようなアッセイ）は、F G F 様およびF G F 様結合パートナーによる複合体形成に対する効果について、大多数の化合物を迅速にスクリーニングするために有利に使用され得る。このアッセイは、ファージディスプレイにおいて生成された化合物、合成ペプチドおよび化学合成ライブラリーをスクリーニングするように自動化され得る。

F G F 様ポリペプチドとF G F 様結合パートナーとの複合体の形成を増加または減少させる化合物もまた、F G F 様ポリペプチドまたはF G F 様結合パートナーのいずれかを発現する細胞および細胞株を用いて細胞培養物中においてスクリーニングされ得る。細胞および細胞株は、任意の哺乳動物から入手され得るが、好ましくは、ヒトまたは他の霊長類、イヌ、または齧歯類起源由来であり得る。F G F 様ポリペプチドの、表面にF G F 様結合パートナーを発現する細胞への結合は、試験分子の存在または非存在下で評価され、そして結合の程度は、例えば、F G F 様結合パートナーへのビオチン化抗体を用いたフローサイトメトリーにより決定され得る。細胞培養アッセイは、上記のタンパク質結合アッセイにおいて陽性と評価される化合物をさらに評価するために有利に使用され得る。

細胞培養物は薬物候補の効果をスクリーニングするために用いられ得る。例えば、薬物候補は、F G F 様遺伝子の発現を減少または増加し得る。特定の実施形態において、産生されるF G F 様ポリペプチドの量は、その細胞培養物をその薬物候補へ暴露した後に測定され得る。特定の実施形態において、その細胞培養物に対する実際の効果が検出され得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、その細胞培養物に対して特定の効果を有し得る。そのような場合、薬物候補がその遺伝子の発現を増加または減少する能力、あるいはそれがその細胞培養物に対する特定の効果を妨害または阻害する能力が試験され得る。他の実施例において、特定の代謝産物の生成（例えば、ポリペプチドのフラグメント）は、疾患または病理学的状態を生じ得るか、またはそれらと関連し得る。そのような場合、薬物候補が細胞培養物においてそのような代謝産物の生成を減少する能力が試験され得る。

（F G F 様ポリペプチドを使用する細胞源の同定）

特定の実施形態に従って、特定の細胞型の供給源を決定し得ることが有用であり得る。例えば、適切な治療を選択するのに援助し得る疾患または病理状態の起源を決定することが有用であり得る。F G F 様ポリペプチドは、肝臓で特異的に発現（そして肺で弱く発現）する。特定の実施形態において、F G F 様ポリペプチドをコードする核酸は、プローブと

10

20

30

40

50

して使用され、このようなプローブを用いて細胞の核酸をクローニングすることによって肝臓由来細胞を同定し得る。他の実施形態において、F G F 様ポリペプチドに特異的な抗体を産生するためにF G F 様ポリペプチドを使用し得る。このような抗体を使用して、細胞中のF G F 様ポリペプチドの存在について試験し、そしてこのように、これらの細胞が肝臓から誘導されたどうかを決定するための手段として試験し得る。

(F G F 様ポリペプチド組成物および投与)

F G F 様のポリペプチドの薬学的組成物は、本発明の範囲内である。そのような組成物は、治療有効量のF G F 様ポリペプチド、フラグメント、改変体または誘導体を、薬学的に受容可能な薬剤（例えば、薬学的に受容可能なキャリア）と混合されて含み得る。このキャリア剤は、注射用水、好ましくは、哺乳動物への投与のために溶液中で他の物質と共に添加され得る。代表的には、F G F 様ポリペプチドを含む治療的化合物は、精製されたポリペプチド、フラグメント、改変体または誘導体を、1つ以上の生理的に受容可能な薬剤とともに含む組成物の形態で投与される。中性緩衝化生理食塩水、または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、例示の適切なキャリアである。好ましくは、その生成物は、適切な賦形剤（例えば、スクロース）を用いて凍結乾燥剤として処方される。他の標準的な薬学的に受容可能な試薬（例えば、キャリア、希釈剤および賦形剤）は所望に応じて含まれ得る。他の例示的な組成物は、p H 7 . 0 ~ 8 . 5 の T r i s 緩衝剤または p H 4 . 0 ~ 5 . 5 の酢酸緩衝剤を含み、これらは、さらに、ソルビトールまたはその適切な代替物を含み得る。

F G F 様ポリペプチド薬学的組成物は、代表的に、治療的または予防的有効量のF G F 様タンパク質を、投薬の形態での適切性のために選択された1以上の薬学的および生理学的に受容可能な処方剤と混合して含む。適切な処方物質または薬学的に受容可能な薬剤には、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗酸化剤、保存剤、着色料、風味料、および希釈剤、乳化剤、懸濁化剤、溶媒、フィラー、増量剤、緩衝剤、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および/または薬学的アジュバント。例えば、適切なビヒクルは、注射用水、生理的溶液、または人工脳脊髄液であり得、これらには、非経口送達のための組成物に一般的な他の物質を補充することが可能である。中性緩衝化生理食塩水、または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、さらなる例示のビヒクルである。本明細書中に使用される場合、用語「薬学的に受容可能なキャリア」または「生理学的に受容可能なキャリア」は、薬学的組成物としてF G F 様タンパク質の送達を、達成するかまたは増強するために適切な1つ以上の処方材料をいう。

組成物における主要な溶媒は、天然で水性または非水性のいずれかであり得る。さらに、そのビヒクルは、処方物の、p H、容量オスモル濃度、粘性、明澄性、色、滅菌性、安定性、等張性、崩壊速度、または臭いを改変または維持するための他の処方物材料を含み得る。同様に、その組成物は、F G F 様タンパク質の放出速度を改変または維持するため、またはF G F 様タンパク質の吸収もしくは透過を促進するためのさらなる処方物材料を含み得る。

F G F 様ポリペプチド組成物は、非経口的に投与され得る。あるいは、その組成物は、静脈内または皮下で投与され得る。全身投与されるとき、本発明における使用のための治療組成物は、発熱物質を含まない、経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。そのような薬学的に受容可能なタンパク質溶液の調製は、p H、等張性、安定性などに相当な注意を払えば、当業者の範囲内である。

本発明を実施するために有用なF G F 様ポリペプチド組成物の治療処方物は、必要に応じて生理学的に受容可能なキャリア、賦型剤または安定化剤（Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990）と、所望の程度の純度を有する選択された組成物とを混合することによって、凍結乾燥されたケーキまたは水溶液の形態で、保存のために調製され得る。受容可能なキャリア、賦形剤または安定化剤は、好ましくは、レシipientに対して非毒性であり、そして好ましくは、使用される投薬量および濃度において不活性であり、そしてこのましくは、以下が挙げら

れる：緩衝液（リン酸塩、クエン酸塩、または他の有機酸）；抗酸化剤（例えば、アスコルピン酸）；低分子量ポリペプチド；タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン）；親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）；アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン）；モノサッカリド、ジサッカリドおよび他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む）；キレート剤（例えば、EDTA）；糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）；塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）；ならびに／あるいは非イオン性表面活性化剤（例えば、Tween、プルロニック（pluronic）またはポリエチレングリコール（PEG））。

最適な薬学的処方物は、意図された投与経路、送達形式および所望の投薬量に依存して、当業者により容易に決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 1435-1712（第18版、A. R. Gennaro編., Mack Publishing Company 1990）。このような組成物は、例えば、本発明のFGF様タンパク質の物理的状態、安定性、インビボでの放出の早さ、およびインビボでのクリアランスの早さに影響し得る。

治療的に用いられるFGF様ポリペプチド組成物の有効量は、例えば、FGF様ポリペプチド組成物が使用される適応症（indication）、投与経路、および患者の状態のような治療目的に依存する。従って、治療専門家が投薬量を滴定し、そして最適な治療効果を得るために必要とされる投与経路を変更することは、必要なことであり得る。代表的な投薬量は、上記の因子に依存して、約 $0.1 \mu\text{g} / \text{kg}$ ～約 $100 \text{mg} / \text{kg}$ 以上までの範囲であり得る。他の実施形態において、この投薬量は、 $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ ～約 $100 \text{mg} / \text{kg}$ ；または $5 \mu\text{g} / \text{kg}$ ～約 $100 \text{mg} / \text{kg}$ ；または $0.1 \mu\text{g}$ ～約 $100 \text{mg} / \text{kg}$ ；または $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ ～約 $100 \text{mg} / \text{kg}$ の範囲であり得る。代表的には、医師は、投薬量が所望の効果に達するまで、組成物を投与する。従って、この組成物は、経時的に、または移植デバイスまたはカテーテルを介した連続注入によって、単一用量または2以上の用量として投与され得る（これらは、同じ量のFGF様ポリペプチドを含んでいてもよいし、そうでなくともよい）。

さらに研究を行うにつれて、種々の患者における種々の状態の処置のための適切な投薬レベルに関する情報が明らかになり、そして当業者は、治療状況、処置中の障害の型、レシピエントの年齢および一般的健康状態を考慮して、適切な投薬を確認し得る。

インビボでの非経口投与のために使用されるFGF様ポリペプチド組成物は、代表的には、滅菌されていなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。この組成物が凍結乾燥されている場合、これらの方法を用いた滅菌は、凍結乾燥および再構成の前または後のいずれかに行われ得る。非経口投与のための組成物は、通常、凍結乾燥された形態でまたは溶液で保存される。

治療的組成物は、一般に、滅菌アクセスポートを有する容器（例えば、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針により穿刺可能なストッパーを有するバイアル）に入れられる。

効果的な投与形態（例えば、（1）徐放性処方物、（2）吸入ミスト、または（3）経口的に活性な処方物）もまた想到される。このFGF様ポリペプチド薬学的組成物はまた、非経口投与のために処方され得る。このような非経口投与治療組成物は、代表的には、薬学的に受容可能なビヒクル中にFGF様ポリペプチドを含む、発熱物質を含まない、非経口的に受容可能な水溶液の形態である。このFGF様ポリペプチド薬学的組成物はまた、ポリマー化合物（例えば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸など）の粒子状の調製物、またはリポソームへのFGF様ポリペプチドの導入物を含み得る。ヒアルロン酸もまた使用され得、そしてこれは、循環中の持続期間を助長する効果を有し得る。

非経口注射のために特に適切なビヒクルは、適切に保護された滅菌等張性溶液としてFGF様ポリペプチドが処方された、滅菌蒸留水である。なお別の調製物は、タンパク質産物の制御されたかまたは持続した放出を提供し、次いで、蓄積注射（depot injection）として送達され得る、因子（例えば、注射可能なミクロスフェア、生体侵食性（bio-erodible）粒子もしくはビーズ、またはリポソーム）を伴うFGF

10

20

30

40

50

様ポリペプチドの処方物を含み得る。F G F 様ポリペプチドの導入のための他の適切な手段としては、F G F 様ポリペプチドを含む、移植可能な薬物送達デバイスが挙げられる。本発明の調製物は、当該分野で周知のように、他の成分（例えば、非経口的に受容可能な保存剤、張度（tonicity）剤、共溶媒、湿潤剤、錯化剤、緩衝剤、抗菌剤、抗酸化剤および界面活性剤）を含み得る。例えば、適切な張度増強剤（tonicity enhancing agent）としては、アルカリ金属ハライド（好ましくは、塩化ナトリウムまたは塩化カリウム）、マンニトール、ソルビトールなどが挙げられる。適切な保存剤としては、塩化ベンザルコニウム、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸などが挙げられるがこれらに限定されない。過酸化水素もまた、保存剤として用いられ得る。適切な共溶媒は、例えば、グリセリン、プロピレングリコールおよびポリエチレングリコールである。適切な錯化剤は、例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、 β -シクロデキストリンまたはヒドロキシプロピル β -シクロデキストリンである。適切な界面活性剤または湿潤剤としては、ソルビタンエステル、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート80）、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサポール（tyloxapol）などが挙げられる。緩衝剤は、従来の緩衝剤（例えば、ホウ酸塩、クエン酸塩、リン酸塩、炭酸水素塩またはTris-HCl）であり得る。

処方物成分は、投与部位に受容可能である濃度で存在する。例えば、緩衝剤は、組成物を生理学的pHにまたはわずかに低いpHに（代表的には、約5～約8のpH範囲内に）維持するために用いられ得る。

薬学的組成物は、吸入のために処方され得る。例えば、F G F 様ポリペプチドは、吸入のための乾燥散剤として処方され得る。F G F 様ポリペプチド吸入溶液はまた、エアロゾル送達のための液化プロペラント中に処方され得る。なお別の処方物において、溶液が噴霧化され得る。

F G F 様ポリペプチドを含む特定の処方物が経口投与され得ることもまた意図される。この様式で投与されるF G F 様ポリペプチドは、固体投薬形態（例えば、錠剤およびカプセル剤）の調合において習慣的に用いられるキャリアを伴ってまたは伴わずに処方され得る。例えば、カプセル剤は、胃腸管にある時点で（このとき、バイオアベイラビリティが最大にされ、そして全身以前（pre-systemic）の分解が最少にされる）処方物の活性な部分を放出するように設計され得る。さらなる薬剤は、F G F 様ポリペプチドの吸収を促進するために含まれ得る。希釈剤、矯味矯臭剤、低融点ろう、植物油、滑沢剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤および結合剤もまた用いられ得る。

別の調製物は、錠剤の製造に適切である非毒性賦形剤を伴う混合物中で有効量のF G F 様ポリペプチドを含み得る。滅菌水または他の適切なビヒクル中に錠剤を溶解することによって、溶液は、単位用量形態で調製され得る。適切な賦形剤としては、不活性希釈剤（例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムもしくは炭酸水素ナトリウム、ラクトースまたはリン酸カルシウム）；または結合剤（例えば、デンプン、ゼラチンまたはアカシア）；または滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸または滑石）が挙げられるがこれらに限定されない。

さらなるF G F 様ポリペプチド処方物は、当業者に明らかであり、1以上の他の治療剤と組み合わせてF G F 様ポリペプチドを含む処方物が挙げられる。種々の他の持続送達手段または制御送達手段を処方するための技術（例えば、リポソームキャリア、生体侵食性微粒子または多孔質ビーズおよび蓄積注射）もまた、当業者に公知である。例えば、Super Saxoらの薬学的組成物の送達のための制御放出多孔性ポリマー性微粒子の記載を参照のこと（PCT公開番号WO 93 / 15722号を参照のこと）。この開示は、本明細書中に参考として援用される。

投与の様式に拘わらず、体重、体表面積、または生物のサイズに従って、特定の用量が計算され得る。上記の処方物の各々が関連する処置のための適切な投薬量を決定するために必要なこの計算のさらなる改良は、当業者により慣用的に行われ、そして彼らにより慣用的に行われる仕事の範囲内である。適切な投薬量は、適切な用量応答データを用いること

により確認され得る。

組成物の投与経路は、公知の方法（例えば、経口、静脈内、腹腔内、大脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、または病変内経路によるか、または必要に応じてカテーテルの使用を含み得る、徐放系もしくは移植デバイスによる注射または注入）に従い得る。所望であれば、この組成物は、注入、ボーラス注射によるか、または移植デバイスにより連続的に投与され得る。

当業者は、本発明の薬学的組成物を、肺投与によってさらに投与し得る。例えば、PCT公開WO 94/20069号を参照のこと。国際公開第WO 94/20069号は、化学的に改変されたタンパク質の肺性送達を開示し、本明細書中に参考として援用される。肺送達については、粒子の大きさは、肺の遠位への送達に適切であるべきである。例えば、粒子の大きさは、 $1\mu\text{m} \sim 5\mu\text{m}$ であり得る。しかし、例えば、各粒子がかなり多孔性であれば、より大きな粒子が用いられ得る。

あるいは、またはさらに、この組成物は、罹患した領域への、FGF様ポリペプチドが吸収またはカプセル化された膜、スポンジまたは他の適切な材料の移植を介して局所投与され得る。

移植デバイスが用いられる場合、このデバイスは、任意の適切な組織または器官に移植され得、そしてFGF様ポリペプチドの送達は、ボーラスを介して、または連続投与を介して、または連続注入を用いたカテーテルを介して、デバイスを通して直接的であり得る。FGF様ポリペプチドは、徐放性処方物または調製物中で投与され得る。徐放性調製物の適切な例としては、成型品（例えば、フィルムまたはマイクロカプセル）の形態の半透性ポリマーマトリックスが挙げられる。徐放性放出マトリックスとしては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号、EP特許58,481号）、L-グルタミン酸とD-エチル-L-グルタメートとのコポリマー（Sidmanら, Biopolymers, 22:547-556, 1983）、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)（Langerら, J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277(1981)およびLanger, Chem. Tech., 12:98-105(1982)）、エチレンビニル酢酸（Langerら, 前出）またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸（EP特許133,988号）が挙げられる。徐放性組成物はまた、リポソームを含み得る。リポソームは、当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製され得る（例えば、Epsteinら, Proc. Natl. A

cad. Sci. USA, 82:3688-3692(1985); EP特許36,676号; EP特許88,046号; およびEP特許143,949号を参照のこと）。FGF様ポリペプチド、そのフラグメント、改変体および誘導体は、単独で、ともに、または他の薬学的組成物と組み合わせて用いられ得る。FGF様ポリペプチド、フラグメント、改変体および誘導体は、処置される適応症について適切である場合、サイトカイン、増殖因子、抗生物質、抗炎症剤および/または化学療法剤と組み合わせて用いられ得る。いくつかの場合、FGF様ポリペプチド薬学的組成物をエキソビボの様式で使うことが所望され得る。このような場合には、患者から取り出された細胞、組織または器官がFGF様ポリペプチド組成物に曝露され、その後、この細胞、組織および/または器官が続いて、その患者に移植し戻される。

他の場合、FGF様ポリペプチドは、方法（例えば、本明細書中に記載された方法）を用いて、このポリペプチド、フラグメント、改変体または誘導体を発現および分泌するように遺伝子操作された特定の細胞を患者に移植することによって送達され得る。このような細胞は、動物またはヒトの細胞であり得、そして患者自身の組織または別の供給源（ヒトまたは非ヒトのいずれか）に由来し得る。必要に応じて、この細胞は、不死化され得る。しかし、免疫学的応答の機会を減少させるために、この細胞がカプセル化されて、周囲の組織の浸潤を回避し得ることが好ましい。カプセル化物質は代表的に、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系または周囲の組織からの他の有害な因子によるこの細胞の破壊を妨げる、生体適合性の半透性ポリマー性の被包物(enclosure)または膜である。

細胞の膜カプセル化のために使用される方法は、当業者に熟知され、そしてカプセル化された細胞の調製および患者中でのそれらの移植は、過度の実験を伴わずに達成され得る。例えば、米国特許第4,892,538号；同第5,011,472号；および同第5,106,627号を参照のこと。生きている細胞をカプセル化するための系は、PCT公開WO91/10425号(Aebischerら)に記載されている。種々の他の持続送達手段または制御送達手段を処方するための技術(例えば、リボソームキャリア、生体侵食性粒子またはビーズ)もまた当業者に公知であり、記載される。カプセル化を伴うかまたは伴わない細胞は、患者の適切な身体組織または器官に移植され得る。

上記で考察されるように、1以上のFGF様ポリペプチド、改変体、誘導体および/またはフラグメントを用いて、単離された細胞集団(例えば、幹細胞、白血球、赤血球、骨髓、軟骨細胞、ニューロン、膵島、肝細胞など)を処置することが所望され得る。このことは、単離された細胞を、このポリペプチド、改変体、誘導体またはフラグメントに直接曝露することによって達成され得、ここで、これらは、細胞膜に透過性または細胞膜に作用する形態である。

本発明のさらなる目的は、相同組換えによる治療的タンパク質のインビトロ産生、ならびに遺伝子治療による治療的タンパク質の産生および送達の両方のための方法に関する。

FGF様タンパク質が相同組換えにより、またはFGF様ポリペプチドをコードするDNAをすでに含む細胞へ導入された制御エレメントを利用する組換え生成方法を用い得ることは、さらに想到される。例えば、相同組換え方法を用いて、正常には転写的にサイレントなFGF様遺伝子または過少発現される遺伝子を含む細胞を改変し、それによって、治療的に効力のある量のFGF様ポリペプチドを発現する細胞を産生し得る。相同組換えは、転写的に活性な遺伝子における変異を誘導または正すために遺伝子を標的化するために元々開発された技術である(Kucherlapati, Prog. in Nucl. Acid Res. and Mol. Biol., 36:301, 1989)。基本的技術は、特定の変異を、哺乳動物ゲノムの特定の領域へ導入するための方法として(Thomasら, Cell, 44:419-428, 1986; ThomasおよびCapecchi, Cell, 51:503-512(1987); Doetschmanら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8583-8587(1988))、または欠損遺伝子内の特定の変異を正すための方法として(Doetschmanら, Nature, 330:576-578(1987))開発された。例示的な相同組換え技術は、米国特許第5,272,071号、EP特許91 90 3051号、EP公開第505 500号；PCT/US90/07642、PCT公開WO91/09955に記載される。

相同組換えを通して、ゲノム中に挿入されるべきDNA配列は、標的化DNAにこのDNA配列を結合することによって目的の遺伝子の特定の領域に指向され得る。標的化DNAは、ゲノムDNA領域に相補的である(相同である)ヌクレオチド配列である。ゲノムの特定の領域に相補的である、標的化DNAの薄片は、DNA複製プロセスの間に親鎖と接触させられる。ハイブリダイズする、それゆえ、共有された相同領域を通して内因性DNAの他の薄片と組み換わることは、細胞内に挿入されたDNAの一般的な特性である。この相補鎖が、変異または異なる配列またはさらなるヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドに結合された場合、これもまた、新たに合成された鎖に組換えの結果として組み込まれる。プルーフリーディング機能の結果として、新たなDNA配列が、テンプレートとして役立つことが可能である。従って、移入されたDNAは、ゲノム内に組み込まれる。

標的化DNAのこれらの薄片に結合されるのは、FGF様タンパク質の発現と相互作用し得るDNA領域である。例えば、プロモーター/エンハンサーエレメント、サプレッサーまたは外因性転写調節エレメントは、所望のFGF様タンパク質をコードするDNAの転写に影響を与えるに十分に近位でかつ十分な方向で、意図される宿主細胞のゲノムに挿入される。制御エレメントは、宿主細胞ゲノム中に存在する一部のDNAを制御する。従って、FGF様タンパク質の発現は、FGF様遺伝子自体をコードするDNAのトランスフェクションによってではなく、FGF様タンパク質の転写について認識可能なシグナルと

10

20

30

40

50

内因性遺伝子配列を提供するDNA調節セグメントと結合された標的化DNA（目的の内因性遺伝子と相同な領域を含む）の使用によって達成され得る。

例示的な方法では、細胞内の所望の標的化された遺伝子（すなわち、所望の内因性細胞性遺伝子）の発現は、少なくとも調節配列、エキソンおよびスプライスドナー部位を含むDNA導入によって、予め選択された部位での細胞ゲノムへの相同組換えによって変更される。これらの成分は、事実上、これらの成分が、新たな転写単位（ここでは、DNA構築物中に存在する調節配列、エキソンおよびスプライスドナー部位が内因性遺伝子に作動的に連結される）の産生をもたらす様式で染色体（ゲノム）DNA中に導入される。染色体DNAへのこれらの成分の導入の結果として、所望の内因性遺伝子の発現が変更される。

変更された遺伝子発現は、本明細書中に記載されるように、得られたときの細胞において通常サイレントな（発現されない）遺伝子を活性化すること（または発現させること）、遺伝子の発現を増大させること（得られたときの細胞において生理学的に有意なレベルで発現されない遺伝子を発現させることを包含する）、得られたときの細胞において生じる調節または誘導のパターンとは異なるように調節または誘導のパターンを変更すること、ならびに得られたときの細胞において発現される遺伝子の発現を減少させること（除去することを含む）を包含する。

本発明は、さらに、標的遺伝子の発現を変化させる方法において有用な、DNA構築物に関する。特定の実施形態においては、例示的なDNA構築物は、以下を含む：（a）標的化配列；（b）調節配列；（c）エキソン；および（d）非対性スプライスドナー部位。

このDNA構築物における標的化配列は、細胞内の標的遺伝子へのエレメント（a）～（d）の取り込みを、エレメント（b）～（d）が内因性標的遺伝子の配列に作動可能に連結するよう指向する。別の実施形態においては、DNA構築物は、以下を含む：（a）標的化配列、（b）調節配列、（c）エキソン、（d）スプライスドナー部位、（e）イントロン、および（f）スプライスアクセプター部位；ここで、この標的化配列は、エレメント（a）～（f）の取り込みを、（b）～（f）のエレメントが内因性遺伝子に作動可能に連結するよう指向する。この標的化配列は、細胞染色体DNAの、相同組換えが起こる予め選択された部位に相同である。この構築物において、エキソンは、一般に、調節配列の3'側であり、そしてスプライスドナー部位は、エキソンの3'側である。

特定の遺伝子の配列（例えば、本明細書中に提示されるFGF様ポリペプチドの核酸配列）が既知である場合には、この遺伝子の選択された位置に相補的なDNA片が、例えば、天然のDNAの、目的の領域に結合している特異的な認識部位における適切な制限によって合成され得るか、または他の様式で得られ得る。この片は、細胞への取り込みの際の標的化配列として働き、そしてゲノム内のその相同領域とハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションが、DNA複製の間に起こる場合には、このDNA片、およびこのDNA片に付着した任意のさらなる配列が、岡崎フラグメントとして働き、そして新に合成されたDNAの娘鎖に取り込まれる。従って、本発明は、FGF様分子をコードするヌクレオチドを包含し、このヌクレオチドは、標的化配列として使用され得る。

FGF様ポリペプチド細胞治療（例えば、FGF様ポリペプチドを産生する細胞の移植）もまた、本発明に含まれる。この実施形態は、生物学的に活性な形態のFGF様ポリペプチドを合成および分泌し得る構築物を患者の細胞に移植することを包含する。このようなFGF様ポリペプチド産生細胞は、FGF様ポリペプチドの天然の産生者である細胞であり得るか、またはFGF様ポリペプチドを産生するその能力が所望のFGF様分子をコードする遺伝子もしくはFGF様ポリペプチドの発現を増強する遺伝子で形質転換することによって増強された、組換え細胞であり得る。このような改変は、その遺伝子を送達するため、ならびにその発現および分泌を促進するために適したベクターによって、達成され得る。外来種のFGF様ポリペプチドまたはタンパク質を投与される患者において潜在的な免疫学的反応を最小化するためには、FGF様ポリペプチドを産生する天然の細胞がヒト起源であること、およびヒトFGF様タンパク質を産生することが好ましい。同様に、FGF様ポリペプチドを産生する組換え細胞が、ヒトFGF様分子をコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換されることが、好ましい。

移植される細胞は、周囲の組織の浸潤を回避するために、カプセル化され得る。ヒトまたは非ヒト動物の細胞が、F G F様ポリペプチドの放出を可能にするが患者の免疫系によるかまたは周囲の組織からの他の有害な因子による細胞の破壊を防止する、生体適合性の半透過性のポリマー性被包物または膜内で、患者に移植され得る。あるいは、F G F様ポリペプチドを産生するようにエキソビボで形質転換された患者自身の細胞が、このようなカプセル化なしに、患者に直接移植され得る。

生存細胞をカプセル化するための技術は、当該分野において公知であり、そしてカプセル化された細胞の調製およびこれらの患者への移植は、過度の実験なしに達成され得る。例えば、Baetgeら(PCT公開番号WO 95/05452(この開示は、本明細書中によって参考として援用される))は、生物学的に活性な分子の効果的な送達のための、遺伝子操作された細胞を含む膜カプセルを記載する。これらのカプセルは生体適合性であり、そして容易に回収可能である。これらのカプセルは、プロモーターに作動可能に連結した生物学的に活性な分子をコードするDNA配列を含む組換えDNA分子でトランスフェクトされた細胞をカプセル化し、これらは、哺乳動物宿主への移植の際に、インビボでのダウンレギュレーションに曝されない。このデバイスは、生存細胞からレシピエント内の特異的な部位への分子の送達を提供する。さらに、米国特許第4,892,538号;同第5,011,472号および同第5,106,627号を参照のこと。生存細胞をカプセル化するための系は、Aebischerらの国際公開番号WO 91/10425に記載される。Aebischerらの国際公開番号WO 91/10470;Winnら、Exper.Neurol.,113:322-29,1991,Aebischerら、Exper.Neurol.,111:269-75,1991;およびTrescoら、ASAIO,38:17-23,1992を参照のこと。

F G F様ポリペプチドの、インビボおよびインビトロでの遺伝子治療送達もまた、想定される。インビボ遺伝子治療は、F G F様ポリペプチドをコードする遺伝子を、ポリヌクレオチド分子または他の適切な送達ベクターの局所的注射によって、細胞に導入することによって、達成され得る(Hefhti,J.Neurobiology,25:1418-1435,1994)。例えば、F G F様タンパク質をコードするポリヌクレオチド分子は、標的化された細胞への送達のために、アデノ随伴ウイルスベクターに含まれ得る(例えば、Johnson、国際公開番号WO 95/34670;国際出願番号PCT/US95/07178を参照のこと)。組換えアデノ随伴ウイルス(AAV)ゲノムは、代表的に、機能的プロモーターに作動可能に連結したF G F様ポリペプチドをコードするDNA配列に隣接するAAV逆方向末端反復、およびポリアデニル化配列を含む。

代替のウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、単純疱疹ウイルスベクターおよびパピローマウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。米国特許第5,672,344号は、組換え神経栄養性HSV-1ベクターを含む、インビボのウイルスにより媒介される遺伝子移入系を記載する。米国特許第5,399,346号は、治療タンパク質をコードするDNAセグメントを挿入するようインビトロで処理されたヒト細胞の送達によって、患者に治療タンパク質を提供するためのプロセスの例を、提供する。遺伝子治療技術の実施のためのさらなる方法および材料は、米国特許第5,631,236号(アデノウイルスベクターを含む);米国特許第5,672,510号(レトロウイルスベクターを含む);および米国特許第5,635,399号(サイトカインを発現するレトロウイルスベクターを含む)に記載されている。

非ウイルス送達方法としては、リボソーム媒介移入、裸のDNA送達(直接注射)、レセプター媒介移入(リガンド-DNA複合体)、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降および微粒子ボンバードメント(例えば、遺伝子銃)が挙げられる。遺伝子治療の材料および方法としてはまた、誘導的プロモーター、組織特異的エンハンサー-プロモーター、部位特異的取り込みのために設計されたDNA配列、親細胞より優れた選択的利点を提供し得るDNA配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブ選択系および発現制御系(安全性の尺度)、細胞特異的結合因子(細胞標的化のため)、細胞特異的インターナリゼーション因子、ベクターによる発現を増強するための転写因子、なら

10

20

30

40

50

びにベクター作製の方法が挙げられ得る。遺伝子治療技術の実施のための、このようなさらなる方法および材料は、米国特許第4,970,154号(エレクトロポレーション技術);国際公開番号WO 96/40958(核リガンド);米国特許第5,679,559号(遺伝子送達のためのリポタンパク質含有系を考慮する);米国特許第5,676,954号(リポソームキャリアを含む);米国特許第5,593,875号(リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法に関する);および米国特許第4,945,050号(ここで、生物学的に活性な粒子が、細胞において、この粒子がこの細胞の表面を貫通する速度で推進され、そしてこの細胞の内側に取り込まれる)に記載されている。発現制御技術としては、化学的に誘導される調節(例えば、国際公開番号WO 96/41865およびWO 97/31899を参照のこと)、改変されたステロイドホルモンレセプター系におけるプロゲステロンアンタゴニストの使用(例えば、米国特許第5,364,791号を参照のこと)、エクジソン制御系(例えば、国際公開番号WO 96/37609を参照のこと)ならびにポジティブテトラサイクリン制御可能トランスアクチベーター(例えば、米国特許第5,589,362号;米国特許第5,650,298号;および米国特許第5,654,168号を参照のこと)が挙げられる。

F G F様ポリペプチドの遺伝子治療または細胞治療が、第二のタンパク質の送達をさらに含み得ることもまた、考慮される。例えば、宿主細胞が、F G F様ポリペプチドと第2のタンパク質(例えば、インスリン様増殖因子1(I G F - 1))を発現し、そして放出するように、改変され得る。あるいは、F G F様ポリペプチドおよび第2タンパク質の両方は、別の細胞において発現され、そしてその細胞から放出され得る。このような細胞は、患者に別々に導入され得るか、またはこれらの細胞は、単一の移植可能なデバイス(例えば、上記のカプセル化膜)内に含まれ得る。

遺伝子治療が適用され得る1つの様式は、構成的プロモーターまたは誘導的プロモーターに作動可能に連結され得るF G F様遺伝子(F G F様ポリペプチドをコードするゲノムDNA、cDNA、および/または合成DNA、あるいはそのフラグメント、改変体、または誘導体のいずれか)を使用して、「遺伝子治療DNA構築物」を形成することである。このプロモーターは、内因性F G F様遺伝子に対して相同であっても異種であってもよいが、但し、この構築物が挿入される細胞または組織型において、このプロモーターは活性である。遺伝子治療DNA構築物の他の成分としては、以下:部位特異的取り込みのために設計されたDNA分子(例えば、相同組換えのために有用な内因性隣接配列)、組織特異的なプロモーター、エンハンサー、サイレンサー、親細胞より優れた選択的利点を提供し得るDNA分子、形質転換された細胞を同定するための標的として有用なDNA分子、ネガティブ選択系、細胞特異的結合因子(例えば、細胞標的化のため)、細胞特異的インターナリゼーション因子、およびベクターによる発現を増強するための転写因子、ならびにベクターの製造を可能にする因子が挙げられ得る。

次いで、遺伝子治療DNA構築物は、患者の細胞に(エキソビボまたはインビボでのいずれかで)導入され得る。遺伝子治療DNA構築物を導入するための1つの手段は、ウイルスベクターを介する。遺伝子治療DNA構築物の送達のための遺伝子治療に代表的に使用される適切なウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、単純疱疹ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、パピローマウイルスベクター、およびレトロウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。これらのベクターの内のいくつか(例えば、レトロウイルスベクター)は、遺伝子治療DNA構築物を患者の細胞の染色体DNAへ送達し、そして遺伝子治療DNA構築物は、染色体DNAへ組み込まれ得る;他のベクターは、エピソームとして機能し、そして遺伝子治療DNA構築物は、細胞質に残る。

遺伝子治療によって、細胞における内因性F G F様ポリペプチド発現を増加させるための別の手段は、1つ以上のエンハンサーエレメントをF G F様ポリペプチドプロモーターに挿入することであり、ここで、このエンハンサーエレメントは、F G F様ポリペプチド遺伝子の転写活性を増加させるよう作用し得る。使用されるエンハンサーエレメントは、遺伝子を活性化することが所望である組織に基づいて、選択される - この組織においてプロ

10

20

30

40

50

モーター活性化を与えることが公知であるエンハンサーエレメントが、選択される。例えば、F G F様ポリペプチドをコードする遺伝子がT細胞において「オンにされる」場合には、l c kプロモーターエンハンサーエレメントが使用され得る。ここで、添加される転写エレメントの機能性部分が、標準的なクローニング技術を使用して、F G F様ポリペプチドプロモーターを含むDNAのフラグメントに挿入され得る（そして必要に応じて、ベクター、ならびに／または5'隣接配列および／もしくは3'隣接配列などに挿入される）。次いで、この構築物（「相同組換え構築物」として公知）が、エキソビボでかまたはインビボでのいずれかで、所望の細胞に導入され得る。

遺伝子治療は、内因性プロモーターのヌクレオチド配列を改変することによって、F G F様ポリペプチド発現を減少させるために、使用され得る。このような改変は、代表的に、相同組換え法を介して達成される。例えば、不活化のために選択されたF G F様遺伝子のプロモーターの全てまたは一部を含むDNA分子は、転写を調節するプロモーター片を除去および／または置換するように、操作され得る。ここで例えば、T A T Aボックスおよび／またはプロモーターの転写アクチベーターの結合部位が、標準的な分子生物学の技術を使用して、欠失され得る；このような欠失は、プロモーター活性を阻害し得、これによって、対応するF G F様遺伝子の転写を抑制する。プロモーターにおけるT A T Aボックスまたは転写アクチベーター結合部位の欠失は、（調節されるF G F様遺伝子と同じ種かまたは関連する種由来の）F G F様ポリペプチドプロモーターの全てまたは関連する部分を含むDNA構築物を生成することによって、達成され得、ここで、1つ以上のT A T Aボックスおよび／または転写アクチベーター結合部位のヌクレオチドが、1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失および／または挿入を介して、変異される。その結果、T A T Aボックスおよび／またはアクチベーター結合部位は、活性が減少しているか、または完全に不活性にされている。この構築物はまた、代表的に、改変されたプロモーターセグメントに近接するネイティブな（内因性の）5'および3' DNA配列に対応する、少なくとも約500塩基のDNAを含む。この構築物は、直接的にかまたは本明細書中に記載されるようなウイルスベクターを介してかのいずれかで、適切な細胞に（エキソビボでかまたはインビボでかのいずれかで）導入され得る。代表的に、細胞のゲノムDNAへの、この構築物の取り込みは、相同組換えを介し、ここで、プロモーター構築物における5'および3' DNA配列は、ハイブリダイゼーションを介する内因性染色体DNAへの改変されたプロモーター領域の取り込みを補助するよう作用し得る。

他の遺伝子治療方法がまた、1つ以上のF G F様ポリペプチドの活性を阻害することが望ましい場合、使用され得る。例えば、アンチセンスDNAまたはRNA分子（これは、選択されたF G F様ポリペプチド遺伝子の少なくとも一部に相補的である配列を有する）が、細胞へ導入され得る。代表的には、そのようなアンチセンス分子各々は、各選択されたF G F様遺伝子の開始部位（5'末端）に相補的である。次いで、アンチセンス分子が対応するF G F様mRNAにハイブリダイズする場合、このmRNAの翻訳が妨げられる。あるいは、遺伝子治療が使用されて、1つ以上のF G F様ポリペプチドのドミナントネガティブインヒビターが作製され得る。この場合、各選択されたF G F様ポリペプチドの変異体全長または短縮ポリペプチドをコードするDNAが、調製され得、そして上記のようなウイルス方法または非ウイルス方法のいずれかをを用いて患者の細胞へ導入され得る。このような変異体の各々は、代表的には、その生物学的役割において内因性ポリペプチドと競合するように設計される。

（F G F様核酸およびポリペプチドの用途）

本発明の核酸分子を使用して、F G F様遺伝子および関連する遺伝子の位置を、染色体上にマップし得る。マッピングは、PCR増幅およびインサイチュハイブリダイゼーションのような、当該分野において公知の技術によって、なされ得る。

核酸分子はまた、F G F様ポリペプチド発現のアンチセンスインヒビターとして使用される。このような阻害は、発現制御配列（三重らせん形成）またはF G F様mRNAに相補的であり、そしてこれらとハイブリダイズする核酸分子によって、生じ得る。アンチセンスプローブは、本明細書中に開示されるF G F様遺伝子の配列を使用して、利用可能な技

10

20

30

40

50

術によって、設計され得る。アンチセンスインヒビターは、細胞または生物における F G F 様ポリペプチドの減少または非存在に関連する情報を提供する。

ハイブリダイゼーションプローブは、本明細書中に提供されるような F G F 様遺伝子配列を用いて調製され得、c D N A ライブラリー、ゲノム D N A ライブラリーまたは合成 D N A ライブラリーを関連配列に関してスクリーニングし得る。既知の配列に対して有意な同一性を示す F G F 様ポリペプチドの D N A 配列および / またはアミノ酸配列の領域は、上記に開示される配列アラインメントアルゴリズムを用いて用意に決定され、そしてこれらの領域は、スクリーニングのためのプローブを設計するために使用され得る。

本発明の核酸分子は、遺伝子治療に使用され得る。インビボで F G F 様ポリペプチドを発現する核酸分子は、細胞または生物におけるこのポリペプチドの効果に関連する情報を提供

10

する。それ自身は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない F G F 様の核酸分子、フラグメント、改変体および / または誘導体は、診断アッセイにおけるハイブリダイゼーションプローブとして有用であり得、定性的または定量的に、哺乳動物の組織サンプルまたは体液サンプルにおける F G F 様 D N A または対応する R N A の存在に関して試験する。

F G F 様のポリペプチド、フラグメント、改変体および / または誘導体は、以下を予防または処置するために使用され得る；肝硬変または肝臓の他の毒性傷害；炎症性腸疾患、粘膜炎 (m u c o s i t i s)、クローン病または他の胃腸管異常；糖尿病；肥満；神経変性疾患；創傷；角膜上皮、水晶体または網膜組織に対する損傷；急性尿細管壊死の結果としての、尿細管に対する損傷；化学療法後の造血細胞の再構築；るいそう症候群（例えば、癌関連悪液質）、多発性硬化症、筋障害；低身長、成熟遅延、過成長（例えば、末端肥大症）、早熟成熟；脱毛症；アンドロゲン標的器官の疾患または異常；乳児性呼吸窮迫症候群、気管支肺異形成症、急性呼吸促進症候群または他の肺の異常；眼または他の組織の腫瘍；アテローム性動脈硬化症；高コレステロール血症；糖尿病；肥満；発作；骨粗鬆症；変形性関節症；変形性関節病；筋萎縮症；低筋肉症 (s a r c o p e n i a)；除脂肪体重の減少；禿頭症；しわ；疲労増大；スタミナ減少；心機能低下；免疫系機能不全；癌；パーキンソン病；老年痴呆；アルツハイマー病；および認知機能低下。

20

F G F 様ポリペプチドフラグメント、改変体、および / または誘導体は、生物学的に活性であるか否かに関わらず、F G F 様ポリペプチドに結合する抗体を調製するために有用である。この抗体は、インビボおよびインビトロの診断目的のために使用され得、これらには、体液サンプルまたは細胞サンプルにおける F G F 様ポリペプチドの存在を検出するための標識形態での使用が挙げられるが、これに限定されない。この抗体はまた、F G F 様ポリペプチドの発現または活性における増加と関連し得る状態を予防または処置するために使用され得る。この抗体は、F G F 様ポリペプチドの少なくとも 1 つの活性特徴を消滅またはブロックするために、F G F 様ポリペプチドに結合し得るか、または活性を増加するためのポリペプチドへ結合し得る。

30

F G F 様ポリペプチドをコードする c D N A の寄託は、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n、1 0 8 0 1 U n i v e r s i t y B o u l e v a r d、M a n a s s a s、V A 2 0 1 1 0 - 2 2 0 9 に、1 9 9 9 年 9 月 3 日になされ、登録番号 P T A - 6 2 6 を有する。

40

以下の実施例は、例示目的のみであることが意図され、そしてどのようにも本発明の範囲を限定するとして構築されるべきではない。

(実施例 1：マウス F G F 様ポリペプチド遺伝子のクローニング)

一般的に、S a m b r o o k ら (前出) に記載される材料および方法を使用して、ラット F G F 様ポリペプチドをコードする遺伝子をクローン化および分析した。

マウス F G F 様ポリペプチドをコードする配列は、マウス再生肝 c D N ライブラリーから、k F G F シグナルトラップシステムにおいてライブラリーをスクリーニングすることによって、単離した (米国特許出願番号 0 9 / 0 2 6 , 9 5 8)。この一次スクリーニング技術は、分泌タンパク質を含むシグナルペプチドをコードするクローンに関して富化した

50

一次ライブラリー (T m r l 1) を、以下のように k F G F ベクターに構築した。再生マウス肝臓を、部分肝切除の 24 時間後に取り除き、そしてポリ A + RNA を、市販の RNA 抽出キットおよび mRNA 精製キット (P h a r m a c i a B i o t e c h) を用いて調製した。cDNA ライブラリーは、SuperScript™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (G i b c o B R L) をいくらか改変して用いて調製した。第 1 鎖の反応を、3 μ g のポリ A + RNA および 500 μ g のプライマー 5' - G - G - A - A - G - G - A - A - A - A - A - A - G - C - G - G - C - C - G - C - A - A - C - A - N - N - N - N - N - N - N - N - 3' (配列番号 34) を用いて実施した。第 2 鎖合成の後に、cDNA を、S a l I アダプターに連結し、N o t I を用いて消化し、次いで、アガロースゲル電気泳動によってサイズ分画した。分画された cDNA (0.2 ~ 0.8 kb の範囲のサイズ) を、Q i a g e n ゲル抽出キットを用いて精製し、次いで、以下のように k F G F ベクターへ連結した。20 μ l の反応において、50 μ g のベクター DNA (S a l I および N o t I を用いて事前に消化した) を、20 μ g の精製 cDNA、1 × リガーゼ緩衝液、および 1 ml の T4 DNA リガーゼと 16 で 20 時間混合した。

10

この連結産物を、沈澱させ、そしてエレクトロポレーションによって E . c o l i に導入し、この後、形質転換された細菌細胞を、5 ml の S O C 培地中、37 で 1 時間増殖させ、次いで、10 % グリセロール中 - 80 で凍結した。これは、一次 T m r l 1 ライブラリーを構築した。一次 T m r l 1 cDNA ライブラリー由来のプラスミド DNA を、標準的な手順を用いて L B / アガープレート上に増殖された 50,000 個のコロニーのプールから調製した。10 個のプールを調製し、そしてプラスミド DNA を、Q i a g e n マキシプレップキットを用いてこのプールから単離した。

20

収集されたプラスミド DNA を、引き続き、カルシウムリン酸トランスフェクションによって N I H 3 T 3 細胞へ導入した。各反応において、各プール由来の 100 ng のプラスミド DNA を使用して、1 枚の 35 mm プレートに約 2×10^5 細胞をトランスフェクトした。24 時間後、次いでこの細胞を 5 枚の 100 mm プレートに分け、通常培地中で一日増殖させ、次いで、低血清培地で 13 日間増殖させた。約 4000 個の全コロニーを、低血清培地における増殖に続いて得た。

シグナルペプチド富化された再生 cDNA 分子を、以下のようにトランスフェクトされた細胞から回収した。2 ml のトリプシン - E D T A の添加、および 37 で 5 分間のインキュベーション、続いて、温和に渦を巻くことによって、細胞をプレートから解放させた。解放された細胞を、2 ml のウシ胎仔血清を有する 50 ml のコニカルチューブに移し、1000 rpm で 5 分間遠心分離して、細胞をペレットにした。わずかに 1 g の細胞ペレットを、20 ml の T R I Z O L 試薬 (B R L) を用いて溶解し、30 秒間ホモジナイズし、次いで、4 ml のクロロホルムを用いて抽出した。このチューブを、4000 rpm で 30 分間遠心分離し、そして水相を、新しいチューブに移した。RNA を、10 ml のイソパノールを添加し、混合し、次いで、30 分間 4200 rpm で遠心分離することによって沈澱させた。RNA ペレットを、10 ml の 70 % エタノールを用いて洗浄し、簡単に乾燥させ、次いで、このペレットを、0.5 ml の T E 緩衝液中に再懸濁した。ポリ A + RNA を、市販の mRNA 精製キット (P h a r m a c i a) を用いることによって調製した。750 μ l の T E 緩衝液中ポリ A + RNA をカラムから溶出した後、次いでこのサンプルを、40 μ l のサンプル緩衝液および 1 ml のエタノールを添加し、一晚 - 70 でインキュベートすることによって、2 つの 1.5 ml マイクロ遠心分離チューブ中でエタノール沈澱させた。

30

40

陽性クローンの cDNA 挿入物を、以下のように R T - P C R によってレスキューした。第 1 の鎖合成を、SuperScript™ 前増幅システム (preamplification system) (B R L) を用いて実施した。選択された 3 T 3 コロニー由来の 15 μ g のポリ A + RNA を含む混合物および 15 μ l (2 μ M) のベクタープライマー (5' - A - A - T - C - C - G - A - T - G - C - C - C - A - C - G - T - T - G

50

- C - A - G - T - A - 3' ; 配列番号 35) を、調製し、次いで、70 で 10 分間インキュベートし、続いて、50 で平衡させた。次いで、2.5 μl 10 × 緩衝液、2.5 μl 25 mM MgCl₂、1.3 μl 10 mM dNTP、および 2.5 μl 0.1 M ジチオトレイトールを含む前混合物を、ポリ A + RNA / プライマー混合物に添加し、この後、1.2 μl の逆転写酵素を添加し、そしてこの反応物を、50 で 1 時間インキュベートした。この反応物を、70 で 15 分間加熱することによって停止した。

第 1 鎖合成のあと、RNA を、1 μl の RNase H を用いて 37 で 20 分間で消化した。PCR を、以下のように、Pfu ポリメラーゼ (Perkin Elmer) を用いて実施した。100 μl の総容量において、2 μl の第 1 鎖反応物を、1 × Pfu 緩衝液、0.5 μM の各増幅プライマー (5' - A - A - A - A - T - C - T - T - A - G - A - C - C - G - A - C - G - A - C - T - G - T - G - T - T - T - 3' ; 配列番号 36 ; および 5' - G - A - G - T - C - T - C - C - G - C - A - G - C - C - T - T - T - T - G - A - G - G - 3' ; 配列番号 37)、0.2 mM dNTP、5% DMS、および 2.5 ユニットの Pfu ポリメラーゼに添加した。この増幅反応は、95 で 1 分間を 1 サイクル ; 95 で 30 秒間、66 で 45 秒間、および 72 を 30 サイクル ; ならびに 72 で 10 分間を 1 サイクルで実施した。PCR 産物を、フェノール / クロロホルム抽出、続くエタノール沈澱によって精製し、次いで、Not I および Sal I を用いて消化した。Sma I 消化産物および PCR プライマーを、Size Sep 400 Spun カラムを用いてこの反応物から除去した。

一次スクリーニングにおいて同定されたクローンを、引き続き 2 次分泌アッセイにおいて分析した。この二次スクリーニング技術は、短縮型胎盤アルカリホスファターゼ (PLAP) を含むベクター (ここで、ネイティブなシグナルペプチドは、取り除かれている) を分泌レポーター遺伝子として使用した。異種 cDNA フラグメントを、個々の配列を短縮 PLAP 遺伝子のすぐ上流に挿入し、次いで、この試験構築物を用いて COS7 細胞をトランスフェクトすることによって、シグナルペプチド分泌配列の存在に関して試験した。シグナルペプチドをコードする挿入された cDNA 配列は、PLAP レポーター配列とインフレームで挿入された場合、トランスフェクト細胞から分泌され得る融合タンパク質の形成を導く。

PLAP レポーター構築物は、以下のように作製された。ヒト胎盤 RNA を、標準的な条件下で RT / PCR 増幅に供し、短縮ヒト PLAP タンパク質をコードする DNA フラグメントを作製した。RNA を、オリゴ d (T) をプライマーとして使用した逆転写酵素によって転写し、次いで、PLAP 特異的プライマーを用いて PCR 増幅し、アミノ酸 22 ~ 536 に対応する PLAP 配列をコードする RNA 産物を生成した (Millan, J. Biol. Chem. 261 (7) : 3112 - 15 (1986))。PLAP 増幅プライマー (5' - A - C - T - G - G - C - G - G - C - C - G - C - A - G - G - C - A - T - C - A - T - C - C - C - A - G - T - T - G - A - G - G - A - G - 3' ; 配列番号 38 ; および 5' - A - C - T - G - G - T - C - A - C - T - C - G - A - G - G - G - T - A - C - C - T - T - A - G - C - T - A - G - C - C - C - C - C - G - G - G - 3' ; 配列番号 39) を、それぞれ、Not I および Kpn I 制限部位を含むように設計し、これは、PLAP フラグメントの p cDNA 3.1 ベクターへの連結を容易にする (ベクター p cDNA 3.1 / PLAP を作製する)。

Tmr11 二次ライブラリーを、以下のように p cDNA 3.1 / PLAP 中に構築した。一次 Tmr11 ライブラリー中のクローン由来の cDNA 挿入物を、PCR 増幅プライマーおよび上記の条件を用いて 3T3 細胞のコロニーから回収した。回収された PCR 産物を、次いで、Xho I および Not I 制限酵素で消化された p cDNA 3.1 / PLAP ベクター中に連結した。次いで、連結産物を、E. coli 菌株 DH10B に形質転換し、二次 Tmr11 ライブラリーを作製した。

シグナルペプチド分泌配列の存在について異種 cDNA フラグメントをアッセイするために、個々のコロニーを、最初に、低密度でプレートした寒天プレートの二次 Tmr11 ライ

10

20

30

40

50

ブラリーから選択し、そして細菌増殖培地を含む標準的な96ウェルのプレートのウェルに配置した。次いで、培養物を飽和するまで増殖させ、そしてプラスミドDNAを標準的な手順によってそれぞれの培養物から調製した。このように調製されたプラスミドDNAを使用して以下に記載のようにCOS7細胞をトランスフェクトした。

COS7細胞を、DMEM-HG、10%ウシ胎仔血清および1xPSG(ペニシリン、ストレプトマイシンおよびゲンタマイシン)からなる200 μ lの増殖培地中1ウェル当たり6000個の細胞の濃度で96ウェルの平底プレートに播種した。COS7細胞の播種に続いて、プレートをCO₂インキュベーター中で37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートした。それぞれのウェルの細胞を、Superfect試薬(Qiagen)を使用する選択二次Tmr1ライブラリークローンから回収した500ngのプラスミドDNAでトランスフェクトした。トランスフェクション反応を、二時間進行させ、その後、トランスフェクトされた細胞を、200 μ lのフェノールレッドを含まない、無血清DMEMを用いて洗浄し、次いで、100 μ lのフェノールレッドを含まない血清を含まないDMEMおよびグルタメートとともにCO₂インキュベーター中で37 $^{\circ}$ Cで24時間インキュベートした。インキュベーションに続いて、1Mジエタノールアミン、10mMホモアルギニン、1mM MgCl₂、および1mg/ml BSA中の200 μ M 4-メチルウンベリ-フェリル(methylumbelliferyl)ホスフェート(Molecular Probes)を含む100 μ lの溶液をそれぞれのウェルに加え、インキュベーションを1時間37 $^{\circ}$ Cで続けた。次いで、アルカリホスファターゼ反応の生成物を蛍光計で360/460nmで読んだ。

単一のクローン(tmr11-00001-e9)(PLAPアッセイで読み取られた蛍光の増加を生じ、そしてコンピュータ予測されたシグナルペプチド配列を有し、FGFファミリーに相同である)を、二次Tmr11ライブラリースクリーンで同定した。続いて、このクローンをプローブとして使用してマウス肝臓cDNAライブラリーからマウスFGF様ポリペプチドについて全長cDNAを単離した。マウス肝臓全長cDNAライブラリーを標準的技術を使用して構築した。基本的に、オリゴd(T)を使用して、再生マウス肝臓から単離したmRNAから最初の鎖合成をプライムし、次いで全長cDNA配列を、Superscript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning(Gibco BRL)を使用してpSPORT(Gibco BRL)にクローン化した。

マウス肝臓cDNAライブラリーの一次スクリーンにおいて、50,000コロニーをLB/Ampicillinプレートにプレートし、次いで、ニトロセルロースフィルターに移した。フィルターをkFGFシグナルトラップおよび分泌アッセイスクリーニングにおいて同定されたクローンから誘導されるプローブの混合物でスクリーニングした。このプールのプローブは、tmr11-00001-e9クローンから単離された339bp Not I-Xba Iフラグメントを含んだ。フィルターを、最初に50%ホルムアミド、5xDenhardt's、5xSSC、0.5%SDS、および100 μ g/mlサケ精子DNAからなるハイブリダイゼーション溶液中で2時間42 $^{\circ}$ Cでプレハイブリダイズした。プレハイブリダイゼーションに続いて、フィルターを、新鮮なハイブリダイゼーション溶液中で42 $^{\circ}$ Cで1晩、³²P-dCTP標識プローブとともにインキュベートした。次いでフィルターを0.1xSSC/0.1%SDSで65 $^{\circ}$ Cで洗浄し、続いて-80 $^{\circ}$ Cで1晩オートラジオグラフィによって分析した。この最初のスクリーンから、92の陽性のクローンを同定した。

一次スクリーンで単離された陽性クローンをプールし、そして339bpのtmr11-00001-e9フラグメントのみを再スクリーニングした。この二次スクリーニングにおいて、クローンプールから誘導された6000コロニーをLB/Ampicillinプレートにプレートし、次いでニトロセルロースフィルターに移した。二次スクリーンに使用されるハイブリダイゼーション条件は、一次スクリーンに使用した条件と同じであった。3つの個々のクローン(1E、1E-4、および1E-6)を二次スクリーンで同定した。

二次スクリーンで同定された3つの個々のクローンの制限消化は、それぞれが1.6 kbの挿入物を含んだことを示した。この挿入物によってコードされるコード配列の5'末端(5'-T-G-G-A-A-T-G-G-A-T-G-A-G-A-T-C-T-A-G-A-G-3';配列番号7)および3'末端(5'-C-T-A-G-A-T-T-C-A-G-G-A-A-G-A-G-T-C-A-3';配列番号8)に対応するプライマーを設計し、続いてクローン1Eの部分配列分析を行った。これらのプライマーを、クローン1EプラスミドDNAのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅に使用した。増幅反応を94 で一分間1サイクル;94 15秒間および65 で1.5分間35サイクル;ならびに72 で10分間1サイクルを行った。約650 bpのPCR産物を増幅に続いて得た。

10

Qiagenゲル抽出キットを使用する1%アガロースゲルからの精製に続いて、PCR産物を配列決定した。この増幅産物の配列分析は、PCRプライマーが誘導されるcDNAクローンが210アミノ酸のタンパク質をコードする630 bpのオープンリーディングフレームを含む遺伝子を含むことを示した。図1は、マウスFGF様遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号3)およびマウスFGF様タンパク質の推定アミノ酸配列(配列番号4)を示す。クローン1Eの引き続く配列分析はまた、二次スクリーニングにおいて同定されるcDNAクローンのオープンリーディングフレームが2つのイントロン配列によって中断されていることを確立した。SwissprotデータベースのFASTAプログラムを使用するコンピュータ分析は、このオープンリーディングフレームがFGF-6(図3A~3D)に最も関連した(39%同一)ポリペプチドをコードすることを示した。SIGNALPプログラム(Center for Biological Sequence Analysis, The Technical University of Denmark)を使用するコンピュータ分析はまた、マウスFGF様ポリペプチドがそのアミノ末端に潜在的なシグナルペプチド(M-E-W-M-R-S-R-V-G-T-L-G-L-W-V-R-L-L-L-A-V-F-L-L-G-V-Y-Q-A;配列番号40;図1で下線が引かれる)を保有したことを示した。マウスFGF様ポリペプチドの最初の翻訳産物は、可能な翻訳後修飾を含まないで23,237の計算された分子量を有する。推定の29アミノ酸シグナルペプチド配列の除去の後に、181アミノ酸の残りの推定成熟タンパク質が19,876の計算された分子量を有する。推定されるN連結グリコシル化部位は、このタンパク質において同定されず、このタンパク質は、二塩基プロテアーゼプロセシング部位を保有しない。

20

30

(実施例2:ヒトFGF様ポリペプチド遺伝子のクローニング)

一般的に、Sambrookら上述に記載される物質および方法を使用して、ヒトFGF様ポリペプチドをコードする遺伝子をクローン化および分析した。

ヒトFGF様ポリペプチドをコードする配列は、マウスFGF様ポリペプチド遺伝子から誘導されるプローブを用いてヒトcDNAライブラリーをスクリーニングすることによって単離された。460 bpのプローブを、³²P-dCTPを含む反応物において、以下のプライマー:5'-T-G-G-A-A-T-G-G-A-T-G-A-G-A-T-C-T-A-G-A-G-3';配列番号7)および3'(5'-C-A-T-T-G-C-G-G-C-C-G-C-T-C-A-A-G-A-T-G-C-A-A-A-A-C-G-C-A-G-T-G-3';配列番号9)を使用してマウスFGF様ポリペプチドcDNAのPCR増幅によって作製した。増幅反応を94 で一分間1サイクル;94 で15秒間および65 で1.5分間35サイクル;ならびに72 で10分間1サイクルを行った。

40

460 bpのマウスプローブを使用して、ヒト肝臓cDNAライブラリーからヒトFGF様ポリペプチドに対する全長cDNAを単離した。ヒト肝臓全長cDNAライブラリーを、標準的技術を使用して構築した。基本的に、オリゴd(T)を使用して、Clontech(Palo Alto, CA)から得たmRNAから最初の鎖合成をプライムし、次いで全長cDNA配列を、Superscript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning(Gi

50

b c o B R L) を使用して p S P O R T (G i b c o B R L) にクローン化した。ヒト肝臓 c D N A ライブラリーの一次スクリーンにおいて、550,000 コロニーを L B / A m p i c i l l i n プレートにプレートし、次いで、ニトロセルロースフィルターに移した。フィルターを E x p r e s s H y b 溶液 (C l o n t e c h) 中 30 分間 60 でプレハイブリダイズし、次いで、新鮮な E x p r e s s H y b 溶液で 60 で 1 晩³² P - d C T P 標識マウス F G F 様 c D N A プローブとともにインキュベーションした。ハイブリダイゼーションに続いて、フィルターを 2 x S S C / 0.1 % S D S 中室温で 30 分間 2 回、1 x S S C / 0.1 % S D S 中 60 で 30 分間 2 回、0.1 x S S C / 0.1 % S D S 中 65 で 30 分間 2 回洗浄し、次いで、フィルターを - 80 で 1 晩オートラジオグラフィによって分析した。次いで一次スクリーンにおいて同定される陽性クローンを再スクリーニングし、4 つの独立したクローンを二次スクリーニングの後に回収した。これらの 4 つのクローンに対するプラスミド D N A を調製し配列決定した。

配列分析は、4 つのクローンが 1.2 k b または 1.8 k b のいずれかの挿入物を含んだことを示した。1.2 k b の c D N A 挿入物は、209 アミノ酸のタンパク質をコードする 627 b p のオープンリーディングフレームを含む遺伝子を含んだ。図 2 A ~ 2 B は、ヒト F G F 様遺伝子のヌクレオチド配列 (配列番号 1) およびヒト F G F 様タンパク質の推定アミノ酸配列 (配列番号 2) を示す。1.8 k b の c D N A 挿入物が 1.2 k b 挿入物によってコードされるものと同じオープンリーディングフレームを含むが、この挿入物のオープンリーディングフレームは、さらに実施例 1 で単離されたマウス c D N A クローンのいくつかに見出される第 2 のイントロンに対する位置に対応するイントロンによって中断された。

図 3 A ~ 3 D は、ヒト F G F 様タンパク質、マウス F G F 様タンパク質、および F G F ファミリーの他のメンバーのアミノ酸配列の整列を示す。ヒト F G F 様ポリペプチドは、マウス F G F 様タンパク質に 76 % 同一である。S I G N A L P プログラム (C e n t e r f o r B i o l o g i c a l S e q u e n c e A n a l y s i s , T h e T e c h n i c a l U n i v e r s i t y o f D e n m a r k) を使用するコンピュータ分析は、ヒト F G F 様ポリペプチドがまた、そのアミノ末端に潜在的なシグナルペプチド (M - D - S - D - E - T - G - F - E - H - S - G - L - W - V - S - V - L - A - G - L - L - L - G - A - C - Q - A ; 配列番号 41 ; 図 2 A ~ 2 B で下線が引かれる) を保有することを示した。ヒト F G F 様ポリペプチドの最初の翻訳産物は、22,284 の計算された分子量を有し、可能な翻訳後修飾を含まない。推定の 28 アミノ酸シグナルペプチド配列の除去の後に、181 アミノ酸の残りの推定成熟タンパク質が 19,395 の計算された分子量を有する。推定される N 連結グリコシル化部位は、このタンパク質において同定されず、このタンパク質は、二塩基プロテアーゼプロセッシング部位を保有しない。

(実施例 3 : F G F 様 m R N A 発現)

マウス F G F 様 m R N A の発現は、³² P - d C T P 標識マウス F G F 様 c D N A プローブを使用してマウスの複数の組織に対してノーザンブロット (C l o n t e c h) で試験した。391 b p のフラグメントからなるプローブは、X b a I および N o t I を用いた制限消化によって t m r 1 1 - 0 0 0 0 1 - e 9 クローンから単離した。ブロットを最初に 50 % ホルムアミド、5 x D e n h a r d t ' s 、6 x S S C 、0.5 % S D S 、および 100 μ g / m l サケ精子 D N A からなるハイブリダイゼーション溶液中で 2 時間 42 でプレハイブリダイズした。プレハイブリダイゼーションに続いて、フィルターを、新鮮なハイブリダイゼーション溶液中で 42 で 1 晩、³² P - d C T P 標識マウス F G F 様 c D N A プローブとともにインキュベートした。次いでフィルターを 0.1 x S S C / 0.1 % S D S で 65 で洗浄し、続いて - 80 で 1 晩オートラジオグラフィによって分析した。約 1.35 k b および 1.8 k b の 2 つの転写物を、マウス肝臓 (図 4 A) において検出した。1.35 k b 転写物は、顕著の発現を示した。

ヒト F G F 様 m R N A の発現を、³² P - d C T P 標識ヒト F G F 様 c D N A プローブを使用して、H u m a n R N A M a s t e r B l o t TM (C l o n t e c h) およびヒ

10

20

30

40

50

トの複数の組織のノーザンブロット (Clontech) で試験した。プローブは、以下のプライマー：5' - C - T - A - C - T A - A - A - G - C - T - T - C - C - A - C - C - A - T - G - G - A - C - T - C - G - G - A - C - G - A - G - A - C - C - G - 3' ; 配列番号 12 ; および 5' A - T - T - C - A - T - G - C - G - G - C - C - G - C - G - G - A - A - G - C - G - T - A - G - C - T - G - G - G - G - C - T - T - C - 3' ; 配列番号 13、ならびに鋳型として上記のヒト cDNA クローンを使用して、ヒト FGF 様タンパク質コード領域から誘導された 660 bp の PCR 産物からなる。増幅反応を、94 で 1 分間 1 サイクル ; 94 で 15 秒間、60 で 15 秒間および 72 で 1 分間 35 サイクル ; および 72 で 10 分間 1 サイクルで行った。ブロットを最初に ExpressHyb 溶液 (Clontech) 中 1 時間 65 でプレハイブリダイズし、次いで、新鮮な ExpressHyb 溶液で 65 で 1 晩³²P - dCTP 標識ヒト FGF 様 cDNA プローブとともにインキュベーションした。ハイブリダイゼーションに続いて、フィルターを 2 × SSC / 0.1 % SDS 中室温で 30 分間 2 回、0.1 × SSC / 0.1 % SDS 中 65 で 30 分間 2 回洗浄し、次いで、フィルターを -80 で 1 晩オートラジオグラフィによって分析した。約 1.2 kb および 2 kb の 2 つの転写物を複数の組織ノーザンブロット 9 (図 4 B) におけるヒト肝臓において検出した。成体肝臓における強い発現ならびに肺および胎児肝臓における弱い発現は、Human RNA Master BlotTM で検出された (図 4 C)。

(実施例 4 : FGF 様 mRNA インサイチュ分析)

インサイチュハイブリダイゼーションを、マウス FGF 様ポリペプチドのコード領域にわたる 648 bp のアンチセンス RNA プローブで行った。プローブは、T7 RNA ポリメラーゼおよび³³P - UTP を使用する FGF 様 cDNA 挿入物を含む線形化された pCR2.1 TOPO から転写された。

正常な胚および成体のマウス組織のパネルを、4 % パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに埋め込み、そして 5 μm で切り出した。インサイチュハイブリダイゼーションの前に、組織を 0.2 M HCl で透過性にし、続いてプロテイナーゼ K で消化し、そしてトリエタノールアミンおよび無水酢酸でアセチル化した。区画を³³P 標識リボプローブで 1 晩 55 でハイブリダイズし、次いで 0.1 × SSC 中で 60 で高ストリンジェンシーに供した。スライドを Kodak NTB 2 乳濁液に浸し、4 で 2 ~ 3 週間曝露し、現像し、そしてヘマトキシリンおよびエオシンで対比染色した。区画を暗視野および標準的な照射で調べて組織形態学およびハイブリダイゼーションシグナルの同時評価を可能にした。

最も強い全発現は、膵臓において認められ、強いシグナルが島にわたって検出され、より少なくより拡散したシグナルが膵臓の腺房部分にわたって検出された。肝臓は、中程度のレベルの拡散シグナルを示し、FGF 様ポリペプチドの中程度の肝細胞発現を示す。有意なシグナルはまた、精巢の精細管内の精原細胞および胸腺髄質における細胞にわたって存在した。低いレベルの拡散シグナルは、腎臓、脾臓、下垂体および白色および褐色脂肪組織において検出された。

(実施例 5 : 哺乳動物細胞における FGF 様ポリペプチドの産生)

ヒトとマウスの FGF 様ポリペプチドは両方とも、ヒト免疫グロブリン IgG 重鎖 Fc 領域を有する融合タンパク質としてそれらのカルボキシ末端において発現される。ヒトまたはマウス FGF 様ポリペプチドをコードする鋳型 DNA 配列を、配列の 5' 末端および 3' 末端 (表 I I) に対応するプライマーを使用して PCR によって増幅した。得られた PCR 産物は、ヒトまたはマウス FGF 様ポリペプチドのいずれかのコード領域に対応し、翻訳終結コドンを含く。さらに、プライマーは、PCR 産物の 5' 末端に Hind III 制限エンドヌクレアーゼ部位および産物の 3' 末端に Not I 部位を組み込むように設計された。

【表 2】

表 II
組換え抗体の発現に使用されるプライマー

マウス	5' 5'-CTACTAAAGCTTCCACCATGGAATGGATGAGATCTAG-3' (配列番号 10)
マウス	3' 5'-ATTCATGCGGCCGCGGACGCATAGCTGGGGCTT-3' (配列番号 11)
ヒト	5' 5'-CTACTAAAGCTTCCACCATGGACTCGGACGAGACCG-3' (配列番号 12)
ヒト	3' 5'-ATTCATGCGGCCGCGGAAGCGTAGCTGGGGCTTC-3' (配列番号 13)

10

ヒトおよびマウス FGF 様タンパク質 Fc 融合構築物は、最初に、PCR 産物を Hind III および Not I で切断し、次いでインフレームでフラグメントをヒト免疫グロブリン IgG の HFc 鎖をコードする DNA フラグメントにライゲートすることによって作製された。次いで、FGF 様タンパク質 Fc 挿入物を pCEP4 哺乳動物発現ベクター (Invitrogen) にライゲートした。これらのライゲーションを、エレクトロポレーションおよびアンピシリン耐性について選択された形質転換体による E. coli 菌株 DH10 に形質転換した。選択された形質転換体の配列分析に続いて、大スケールのプラスミドストックを、組織培養トランスフェクションのために調製した。選択されたアンピシリン耐性コロニーに対するプラスミド DNA を調製し配列決定して、クローンが所望の挿入物を含むことを確認した。

20

FGF 様タンパク質に対する機能研究を行うために、ヒトまたはマウス FGF 様タンパク質融合発現構築物を、SuperFectTM トランスフェクション試薬 (Qiagen) を使用して 293-EBNA (Invitrogen) 細胞に導入した。馴化培地を一過性トランスフェクションの 48 時間後に収集した。抗ヒト Fc 抗体を使用するウェスタンブロット分析は、馴化培地がヒトまたはマウス FGF 様 / Fc 融合ポリペプチドを含んだことを確認した。

馴化培地が、以下に記載のようにアフィニティークロマトグラフィーによって精製された。培地を最初に 0.2 μm のフィルターを通した。プロテイン A カラム (Pharmacia) を ImmunoPure Gentle Binding Buffer (Pierce, Rockford, IL) で平衡化し、次いで、濾過した培地で充填した。カラムを、280 nm の吸収が基線に達するまで、ImmunoPure Gentle Binding Buffer を用いて洗浄した。FGF 様 / Fc タンパク質を ImmunoPure Gentle Binding Buffer を用いてカラムから溶出した。FGF 様 / Fc タンパク質を含む画分をプールし、Tris 緩衝化生理食塩水 (TBS) 中で透析し、続いてリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) で透析し、そして 4℃ で保存した。ゲル電気泳動分析は、プールされた画分が予期された分子量の約 60 kD の精製されたタンパク質を含んだことを確認した。

30

(実施例 6: FGF 様ポリペプチドを過剰発現するトランスジェニックマウスの作製および分析)

40

ヒトアポリボタンパク質 E プロモーターからのマウス FGF 様ポリペプチド (配列番号 4) を過剰発現するトランスジェニックマウスを、以前に記載されたように作製した (Simonetら, 1997, Cell 89: 309-19 を参照のこと)。7 匹のマウス (4 匹のオスおよび 3 匹のメス) (これは、マウス FGF 様遺伝子 (配列番号 3) についてトランスジェニックであり、そして 5 匹の非トランスジェニック同腹仔 (2 匹がオスそして 3 匹がメス) である) は、6~8 週齢で剖検および病理分析を受けた。全てのマウスに、収集の 1 時間前に 50 mg/kg の BrdU を注射し、次いで X 線写真を取り、屠殺した。身体および選択された器官の重さを測定し、血液を血液学および血清化学のために引きぬき、器官を組織学的分析および BrdU 標識化のために収集した。

50

全てのトランスジェニックマウスは、20 g m以下の体重であったが、全ての非トランスジェニックマウスは、20 g m以上の体重であった ($p < 0.0001$)。さらに、トランスジェニックマウスは、非トランスジェニックの対応のものよりも統計的に有意に少ない肝臓の重さ ($p = 0.0011$) および脾臓の重さ ($p = 0.0039$) ならびに多い胸腺の重さ ($p = 0.0118$) (体重のパーセンテージとして) を有した。トランスジェニックマウスについて、体重は、野生型の67%であった。肝臓、脾臓および胸腺の重さは、体重のパーセンテージとして、それぞれ、野生型の85%、63%および170%であった。すべての雌性トランスジェニックマウスはまた、小さな子宮および卵管ならびに黄体を欠く卵巣を有し、そしてほとんど卵胞発生を示さなかった。要約すると、トランスジェニックマウスは、小さな肝臓、脾臓および乏しく発達した卵巣を伴う発育阻止された成長、ならびに拡大された (おそらく退縮 (involved) していない) 胸腺を最も特徴とする表現型を有する。これらの変化は、年齢の一致した非トランスジェニック同腹仔と比較して、阻害されたかまたは遅延した成熟を引き起こすトランスジェニックにおけるFGF様ポリペプチドの過剰発現と最も一致する。

(実施例7: 1才齢のFGF様ポリペプチドトランスジェニックマウスの分析)

剖検および病理学的分析を、実施例6に記載される実験で作製された1才齢のFGF様ポリペプチドトランスジェニック(5匹のオスおよび5匹のメス)ならびに非トランスジェニック(3匹のオスおよび2匹のメス)同腹仔で実行した。FGF様ポリペプチドトランスジェニックは、阻害されたかまたは遅延した成熟として一般的に特徴付けられる異常な表現型を示し続けた。これらの観測された効果は、減少した体重(野生型の48%)、雌性においては乏しく発達した卵巣(有意な卵胞発生を欠く)を含んだ。体重のパーセンテージとしての肝臓、脾臓および胸腺の重さは、非トランスジェニック同腹仔において見出されるものに対して正規化された。1才齢の非トランスジェニックコントロールマウスのいくつかは、肥満であることを見出し、少なくとも一つのコントロールが、II型糖尿病の発生と一致する変化を示した。しかし、1才齢のトランスジェニックマウスは、肥満も糖尿病を発生する証拠も示さなかった。従って、FGF様ポリペプチドトランスジェニックが、通常加齢に伴いマウスにおいて見られる年齢に関連した変化の少なくともいくつかを発生せず、実際、本発明のFGF様遺伝子が加齢プロセスを遅らせるのに役立ち得るようである。

これらの発見は、有意であり、本発明のFGF様ポリヌクレオチドおよびポリペプチドが、加齢関連の疾患、障害、または状態の処置または診断に有用であり得るという結論を支持する。例示として、このような疾患、障害または状態としては、限定しないが、アテローム性動脈硬化症、高コレステロール血症、糖尿病、肥満、脳卒中、骨粗鬆症、変形性関節症、変形性関節病、筋萎縮、低筋肉症(sarcopenia)、除脂肪体重の減少、禿頭症、しわ、疲労増大、スタミナ減少、心臓機能低下、免疫系機能不全、癌、パーキンソン病、老年痴呆、アルツハイマー疾患、および認識機能低下が挙げられる。さらに一般的には、本発明の分子は、寿命の向上または増加のために適用可能であり得る。

本発明は、好ましい実施形態に関して記載されているが、改変および変更が当業者に生じることが理解される。従って、特許請求される本発明の範囲内になるこのような等価な改変すべてを添付の請求項がカバーすることを意図する。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、マウスFGF様遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号3)およびマウスFGF様タンパク質の推定アミノ酸配列(配列番号4)を図示する。

【図2】 図2A~図2Bは、ヒトFGF様遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号1)およびヒトFGF様タンパク質の推定アミノ酸配列(配列番号2)を図示する。

【図3】 図3A~図3Dは、ヒトFGF様タンパク質(hAgp-26257; 配列番号2)、マウスFGF様タンパク質(mAgp-26257; 配列番号4)、ヒトFGF-14(Hfgf14; 配列番号16)、マウスFGF-14(Mfgf14; 配列番号26)、ヒトFGF-12(Hfgf12; 配列番号15)、マウスFGF-13(Mfgf13; 配列番号25)、ヒトFGF-5(Hfgf5; 配列番号20)、マウスFG

10

20

30

40

50

F - 5 (M f g f 5 ; 配列番号 3 0)、ヒト F G F - 6 (H f g f 6 ; 配列番号 2 1)、マウス F G F - 6 (M f g f 6 ; 配列番号 3 1)、ヒト F G F - 4 (H f g f 4 ; 配列番号 1 9)、マウス F G F - 4 (M f g f 4 ; 配列番号 2 9)、ヒト F G F - 3 (H f g f 3 ; 配列番号 1 8)、マウス F G F - 3 (M f g f 3 ; 配列番号 2 8)、ヒト F G F - 7 (H f g f 7 ; 配列番号 2 2)、マウス F G F - 7 (M f g f 7 ; 配列番号 3 2)、ヒト F G F - 9 (H f g f 9 ; 配列番号 2 3)、マウス F G F - 9 (M f g f 9 ; 配列番号 3 3)、ヒト F G F - 1、(H f g f 1 ; 配列番号 1 4)、マウス F G F - 1 (M f g f 1 ; 配列番号 2 4)、ヒト F G F - 2 (H f g f 2 ; 配列番号 1 7)、マウス F G F - 2 (M f g f 2 ; 配列番号 2 7) および得られる F G F コンセンサス配列 (c o n s) のアミノ酸配列整列を図示する。

10

【図 4 A】 図 4 A は、(A) マウス F G F 様ポリペプチド発現のノーザンブロット分析の結果を図示する。

【図 4 B】 図 4 B は、(B) ヒト F G F 様ポリペプチド発現のノーザンブロット分析の結果を図示する。

【図 4 C】 図 4 C は、(C) ヒト F G F 様ポリペプチド発現のドットブロット分析の結果を図示する。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Thomason, Arlen
Liu, Benxian

<120> Fibroblast Growth Factor-Like Polypeptides

<130> 99-371-A

<140>

<141>

<150> 09/391,861

<151> 1999-09-07

<160> 41

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1190

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (142)..(771)

<400> 1

gaggatccag ccgaaagagg agccaggcac tcaggccacc tgagtctact cacctggaca 60

actggaatct ggcaccaatt ctaaaccact cagcttctcc gagctcacac cccggagatc 120

acctgaggac ccgagccatt g atg gac tcg gac gag acc ggg ttc gag cac 171
Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His
1 5 10

tca gga ctg tgg gtt tct gtg ctg gct ggt ctt ctg ctg gga gcc tgc 219
Ser Gly Leu Trp Val Ser Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys
15 20 25

cag gca cac ccc atc cct gac tcc agt cct ctc ctg caa ttc ggg ggc 267
Gln Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly
30 35 40

caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa 315
Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu
45 50 55

gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac 363
Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp
60 65 70

cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt 411
Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val
75 80 85 90

10

20

30

att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca 459
 Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro
 95 100 105

gat ggg gcc ctg tat gga tgc ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc 507
 Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser
 110 115 120

ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac cag tcc gaa 555
 Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu
 125 130 135

gcc cac ggc ctc ccg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg 603
 Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg
 140 145 150

10

gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca ggc ctg 651
 Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu
 155 160 165 170

ccc ccc gca ccc ccg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc 699
 Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro
 175 180 185

gat gtg ggc tcc tgc gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc 747
 Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly
 190 195 200

cga agc ccc agc tac gct tcc tga agccagaggc tgtttactat gacatctcct 801
 Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
 205 210

20

ctttatttat taggttattt atcttattta tttttttatt tttcttactt gagataataa 861

agagttccag aggaggataa gaatgagcat gtgtgagtgt ctgaggggaag acatggcagc 921

tgttttgtct cccttgggccc ggacaatccc ctctacacct cccctcacgt ggtccgaggg 981

tcctggtctt ccactgggccc tcactttttt cttttctttt cttttctttt ttttgagacg 1041

gagtctcgtc ctgcactcca gcccaggcca cagagcgaga ttccatctca aaaaaataaa 1101

taaataaata aataaataaa tataaaaaata aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1161

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1190

30

<210> 2

<211> 209

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15

Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro

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

10

20

<210> 3
 <211> 649
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(630)

30

<400> 3
 atg gaa tgg atg aga tct aga gtt ggg acc ctg gga ctg tgg gtc cga 48
 Met Glu Trp Met Arg Ser Arg Val Gly Thr Leu Gly Leu Trp Val Arg
 1 5 10 15
 ctg ctg ctg gct gtc ttc ctg ctg ggg gtc tac caa gca tac ccc atc 96
 Leu Leu Leu Ala Val Phe Leu Leu Gly Val Tyr Gln Ala Tyr Pro Ile
 20 25 30
 cct gac tcc agc ccc ctc ctc cag ttt ggg ggt caa gtc cgg cag agg 144

30

<400> 4
Met Glu Trp Met Arg Ser Arg Val Gly Thr Leu Gly Leu Trp Val Arg
1 5 10 15

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

<210> 5
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
 1 5 10 15
 Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His
 20 25 30
 Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser
 35 40 45
 Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
 50 55 60

10

20

30

Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly
65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro
115 120 125

Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro
130 135 140

Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val
145 150 155 160

Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser
165 170 175

Pro Ser Tyr Ala Ser
180

<210> 6
<211> 181
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6
Tyr Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val
1 5 10 15

Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Gln Asp Thr Glu Ala His
20 25 30

Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Ala Ala His Arg Ser
35 40 45

Pro Glu Ser Leu Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln
50 55 60

Ile Leu Gly Val Lys Ala Ser Arg Phe Leu Cys Gln Gln Pro Asp Gly
65 70 75 80

Ala Leu Tyr Gly Ser Pro His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg
85 90 95

Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His
100 105 110

Gly Leu Pro Leu Arg Leu Pro Gln Lys Asp Ser Pro Asn Gln Asp Ala
115 120 125

Thr Ser Trp Gly Pro Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Leu His

10

20

30

130 135 140
 Glu Pro Gln Asp Gln Ala Gly Phe Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val
 145 150 155 160
 Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser
 165 170 175
 Pro Ser Tyr Ala Ser
 180

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

10

<400> 7
 tggaatggat gagatctaga g

21

<210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 8
 ctagattcag gaagagtca

19

<210> 9
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

20

<400> 9
 cattgcggcc gctcaagatg caaaacgcag tg

32

<210> 10
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 10
 ctactaaagc ttccaccatg gaatggatga gatctag

37

30

<210> 11
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 11
 attcatgcgg ccgcggaacgc atagctgggg ctt

33

<210> 12
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 ctactaaagc ttccaccatg gactcggacg agaccg 36

<210> 13
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 attcatgcgg ccgcggaagc gtagctgggg cttc 34

<210> 14
 <211> 155
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Met Ala Glu Gly Glu Ile Thr Thr Phe Thr Ala Leu Thr Glu Lys Phe
 1 5 10 15
 Asn Leu Pro Pro Gly Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser
 20 25 30
 Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly
 35 40 45
 Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu
 65 70 75 80
 Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu
 85 90 95
 Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr
 100 105 110
 Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys
 115 120 125
 Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala
 130 135 140
 Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
 145 150 155

<210> 15
 <211> 243

10

20

30

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

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

10

20

30

<210> 16
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

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

10

20

30

<210> 17

<211> 155

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Ala Ala Gly Ser Ile Thr Thr Leu Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu
 20 25 30
 Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu
 50 55 60
 Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn
 65 70 75 80
 Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys
 85 90 95
 Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr
 100 105 110
 Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys
 115 120 125
 Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys
 130 135 140
 Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser
 145 150 155

10

<210> 18
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 18
 Met Gly Leu Ile Trp Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu Glu Pro Gly Trp
 1 5 10 15
 Pro Ala Ala Gly Pro Gly Ala Arg Leu Arg Arg Asp Ala Gly Gly Arg
 20 25 30
 Gly Gly Val Tyr Glu His Leu Gly Gly Ala Pro Arg Arg Arg Lys Leu
 35 40 45
 Tyr Cys Ala Thr Lys Tyr His Leu Gln Leu His Pro Ser Gly Arg Val
 50 55 60
 Asn Gly Ser Leu Glu Asn Ser Ala Tyr Ser Ile Leu Glu Ile Thr Ala
 65 70 75 80
 Val Glu Val Gly Ile Val Ala Ile Arg Gly Leu Phe Ser Gly Arg Tyr
 85 90 95
 Leu Ala Met Asn Lys Arg Gly Arg Leu Tyr Ala Ser Glu His Tyr Ser
 100 105 110

30

Ala Glu Cys Glu Phe Val Glu Arg Ile His Glu Leu Gly Tyr Asn Thr
 115 120 125
 Tyr Ala Ser Arg Leu Tyr Arg Thr Val Ser Ser Thr Pro Gly Ala Arg
 130 135 140
 Arg Gln Pro Ser Ala Glu Arg Leu Trp Tyr Val Ser Val Asn Gly Lys
 145 150 155 160
 Gly Arg Pro Arg Arg Gly Phe Lys Thr Arg Arg Thr Gln Lys Ser Ser
 165 170 175
 Leu Phe Leu Pro Arg Val Leu Asp His Arg Asp His Glu Met Val Arg
 180 185 190
 Gln Leu Gln Ser Gly Leu Pro Arg Pro Pro Gly Lys Gly Val Gln Pro
 195 200 205
 Arg Arg Arg Arg Gln Lys Gln Ser Pro Asp Asn Leu Glu Pro Ser His
 210 215 220
 Val Gln Ala Ser Arg Leu Gly Ser Gln Leu Glu Ala Ser Ala His
 225 230 235

<210> 19
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Met Ser Gly Pro Gly Thr Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Leu Ala Pro Trp Ala Gly Arg Gly Gly Ala Ala Ala Pro
 20 25 30
 Thr Ala Pro Asn Gly Thr Leu Glu Ala Glu Leu Glu Arg Arg Trp Glu
 35 40 45
 Ser Leu Val Ala Leu Ser Leu Ala Arg Leu Pro Val Ala Ala Gln Pro
 50 55 60
 Lys Glu Ala Ala Val Gln Ser Gly Ala Gly Asp Tyr Leu Leu Gly Ile
 65 70 75 80
 Lys Arg Leu Arg Arg Leu Tyr Cys Asn Val Gly Ile Gly Phe His Leu
 85 90 95
 Gln Ala Leu Pro Asp Gly Arg Ile Gly Gly Ala His Ala Asp Thr Arg
 100 105 110
 Asp Ser Leu Leu Glu Leu Ser Pro Val Glu Arg Gly Val Val Ser Ile
 115 120 125
 Phe Gly Val Ala Ser Arg Phe Phe Val Ala Met Ser Ser Lys Gly Lys

10

20

30

130 135 140
 Leu Tyr Gly Ser Pro Phe Phe Thr Asp Glu Cys Thr Phe Lys Glu Ile
 145 150 155 160
 Leu Leu Pro Asn Asn Tyr Asn Ala Tyr Glu Ser Tyr Lys Tyr Pro Gly
 165 170 175
 Met Phe Ile Ala Leu Ser Lys Asn Gly Lys Thr Lys Lys Gly Asn Arg
 180 185 190
 Val Ser Pro Thr Met Lys Val Thr His Phe Leu Pro Arg Leu
 195 200 205

 <210> 20
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

10

20

30

Asn Lys Arg Gly Lys Ala Lys Arg Gly Cys Ser Pro Arg Val Lys Pro
 195 200 205
 Gln His Ile Ser Thr His Phe Leu Pro Arg Phe Lys Gln Ser Glu Gln
 210 215 220
 Pro Glu Leu Ser Phe Thr Val Thr Val Pro Glu Lys Lys Asn Pro Pro
 225 230 235 240
 Ser Pro Ile Lys Ser Lys Ile Pro Leu Ser Ala Pro Arg Lys Asn Thr
 245 250 255
 Asn Ser Val Lys Tyr Arg Leu Lys Phe Arg Phe Gly
 260 265

10

<210> 21
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Met Ala Leu Gly Gln Lys Leu Phe Ile Thr Met Ser Arg Gly Ala Gly
 1 5 10 15
 Arg Leu Gln Gly Thr Leu Trp Ala Leu Val Phe Leu Gly Ile Leu Val
 20 25 30
 Gly Met Val Val Pro Ser Pro Ala Gly Thr Arg Ala Asn Asn Thr Leu
 35 40 45
 Leu Asp Ser Arg Gly Trp Gly Thr Leu Leu Ser Arg Ser Arg Ala Gly
 50 55 60
 Leu Ala Gly Glu Ile Ala Gly Val Asn Trp Glu Ser Gly Tyr Leu Val
 65 70 75 80
 Gly Ile Lys Arg Gln Arg Arg Leu Tyr Cys Asn Val Gly Ile Gly Phe
 85 90 95
 His Leu Gln Val Leu Pro Asp Gly Arg Ile Ser Gly Thr His Glu Glu
 100 105 110
 Asn Pro Tyr Ser Leu Leu Glu Ile Ser Thr Val Glu Arg Gly Val Val
 115 120 125
 Ser Leu Phe Gly Val Arg Ser Ala Leu Phe Val Ala Met Asn Ser Lys
 130 135 140
 Gly Arg Leu Tyr Ala Thr Pro Ser Phe Gln Glu Glu Cys Lys Phe Arg
 145 150 155 160
 Glu Thr Leu Leu Pro Asn Asn Tyr Asn Ala Tyr Glu Ser Asp Leu Tyr
 165 170 175
 Gln Gly Thr Tyr Ile Ala Leu Ser Lys Tyr Gly Arg Val Lys Arg Gly
 180 185 190

20

30

Ser Lys Val Ser Pro Ile Met Thr Val Thr His Phe Leu Pro Arg Ile
 195 200 205

<210> 22
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Met His Lys Trp Ile Leu Thr Trp Ile Leu Pro Thr Leu Leu Tyr Arg
 1 5 10 15

10

Ser Cys Phe His Ile Ile Cys Leu Val Gly Thr Ile Ser Leu Ala Cys
 20 25 30

Asn Asp Met Thr Pro Glu Gln Met Ala Thr Asn Val Asn Cys Ser Ser
 35 40 45

Pro Glu Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile
 50 55 60

Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp
 65 70 75 80

Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Asn Tyr Asn
 85 90 95

20

Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly
 100 105 110

Val Glu Ser Glu Phe Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr
 115 120 125

Ala Lys Lys Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu
 130 135 140

Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Asn Gly
 145 150 155 160

Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Arg Gly
 165 170 175

30

Lys Lys Thr Lys Lys Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala
 180 185 190

Ile Thr

<210> 23
 <211> 208
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Ala Pro Leu Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala
 1 5 10 15

Val Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser Pro Val Leu
 20 25 30

Leu Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly
 35 40 45

Pro Ala Val Thr Asp Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg
 50 55 60

Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly
 65 70 75 80

Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu
 85 90 95

Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser
 100 105 110

Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu
 115 120 125

Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp
 130 135 140

Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg
 145 150 155 160

Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr
 165 170 175

Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val
 180 185 190

Asp Pro Asp Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser
 195 200 205

10

20

30

<210> 24

<211> 155

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Met Ala Glu Gly Glu Ile Thr Thr Phe Ala Ala Leu Thr Glu Arg Phe
 1 5 10 15

Asn Leu Pro Leu Gly Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser
 20 25 30

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

10

<210> 25
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20

<400> 25
 Met Thr Ala Ala Ile Ala Ser Ser Leu Ile Arg Gln Lys Arg Gln Ala
 1 5 10 15
 Arg Glu Arg Glu Lys Ser Asn Ala Cys Lys Cys Val Ser Ser Pro Ser
 20 25 30
 Lys Gly Lys Thr Ser Cys Asp Lys Asn Lys Leu Asn Val Phe Ser Arg
 35 40 45
 Val Lys Leu Phe Gly Ser Lys Lys Arg Arg Arg Arg Arg Pro Glu Pro
 50 55 60
 Gln Leu Lys Gly Ile Val Thr Lys Leu Tyr Ser Arg Gln Gly Tyr His
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Gln Ala Asp Gly Thr Ile Asp Gly Thr Lys Asp Glu Asp
 85 90 95
 Ser Thr Tyr Thr Leu Phe Asn Leu Ile Pro Val Gly Leu Arg Val Val
 100 105 110
 Ala Ile Gln Gly Val Gln Thr Lys Leu Tyr Leu Ala Met Asn Ser Glu
 115 120 125
 Gly Tyr Leu Tyr Thr Ser Glu His Phe Thr Pro Glu Cys Lys Phe Lys

30

130 135 140
 Glu Ser Val Phe Glu Asn Tyr Tyr Val Thr Tyr Ser Ser Met Ile Tyr
 145 150 155 160
 Arg Gln Gln Gln Ser Gly Arg Gly Trp Tyr Leu Gly Leu Asn Lys Glu
 165 170 175
 Gly Glu Ile Met Lys Gly Asn His Val Lys Lys Asn Lys Pro Ala Ala
 180 185 190
 His Phe Leu Pro Lys Pro Leu Lys Val Ala Met Tyr Lys Glu Pro Ser
 195 200 205
 Leu His Asp Leu Thr Glu Phe Ser Arg Ser Gly Ser Gly Thr Pro Thr
 210 215 220
 Lys Ser Arg Ser Val Ser Gly Val Leu Asn Gly Gly Lys Ser Met Ser
 225 230 235 240
 His Asn Glu Ser Thr
 245

10

<210> 26
 <211> 247
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 26
 Met Ala Ala Ala Ile Ala Ser Gly Leu Ile Arg Gln Lys Arg Gln Ala
 1 5 10 15
 Arg Glu Gln His Trp Asp Arg Pro Ser Ala Ser Arg Arg Arg Ser Ser
 20 25 30
 Pro Ser Lys Asn Arg Gly Leu Phe Asn Gly Asn Leu Val Asp Ile Phe
 35 40 45
 Ser Lys Val Arg Ile Phe Gly Leu Lys Lys Arg Arg Leu Arg Arg Gln
 50 55 60
 Asp Pro Gln Leu Lys Gly Ile Val Thr Arg Leu Tyr Cys Arg Gln Gly
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Leu Gln Met His Pro Asp Gly Ala Leu Asp Gly Thr Lys Asp
 85 90 95
 Asp Ser Thr Asn Ser Thr Leu Phe Asn Leu Ile Pro Val Gly Leu Arg
 100 105 110
 Val Val Ala Ile Gln Gly Val Lys Thr Gly Leu Tyr Ile Ala Met Asn
 115 120 125
 Gly Glu Gly Tyr Leu Tyr Pro Ser Glu Leu Phe Thr Pro Glu Cys Lys
 130 135 140

20

30

Phe Lys Glu Ser Val Phe Glu Asn Tyr Tyr Val Ile Tyr Ser Ser Met
 145 150 155 160
 Leu Tyr Arg Gln Gln Glu Ser Gly Arg Ala Trp Phe Leu Gly Leu Asn
 165 170 175
 Lys Glu Gly Gln Val Met Lys Gly Asn Arg Val Lys Lys Thr Lys Pro
 180 185 190
 Ala Ala His Phe Leu Pro Lys Pro Leu Glu Val Ala Met Tyr Arg Glu
 195 200 205
 Pro Ser Leu His Asp Val Gly Glu Thr Val Pro Lys Ala Gly Val Thr
 210 215 220
 Pro Ser Lys Ser Thr Ser Ala Ser Ala Ile Met Asn Gly Gly Lys Pro
 225 230 235 240
 Val Asn Lys Cys Lys Thr Thr
 245

<210> 27
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 27
 Met Ala Ala Ser Gly Ile Thr Ser Leu Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly
 1 5 10 15
 Gly Ala Ala Phe Pro Pro Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu Tyr
 20 25 30
 Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg Val
 35 40 45
 Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Val Lys Leu Gln Leu Gln
 50 55 60
 Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn Arg
 65 70 75 80
 Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys Val
 85 90 95
 Thr Glu Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr Asn
 100 105 110
 Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Ser Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys Arg
 115 120 125
 Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys Ala
 130 135 140
 Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser
 145 150

10

20

30

<210> 28
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Mus musculus.

<400> 28
 Met Gly Leu Ile Trp Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu Glu Pro Ser Trp
 1 5 10 15
 Pro Thr Thr Gly Pro Gly Thr Arg Leu Arg Arg Asp Ala Gly Gly Arg
 20 25 30
 Gly Gly Val Tyr Glu His Leu Gly Gly Ala Pro Arg Arg Arg Lys Leu
 35 40 45
 Tyr Cys Ala Thr Lys Tyr His Leu Gln Leu His Pro Ser Gly Arg Val
 50 55 60
 Asn Gly Ser Leu Glu Asn Ser Ala Tyr Ser Ile Leu Glu Ile Thr Ala
 65 70 75 80
 Val Glu Val Gly Val Val Ala Ile Lys Gly Leu Phe Ser Gly Arg Tyr
 85 90 95
 Leu Ala Met Asn Lys Arg Gly Arg Leu Tyr Ala Ser Asp His Tyr Asn
 100 105 110
 Ala Glu Cys Glu Phe Val Glu Arg Ile His Glu Leu Gly Tyr Asn Thr
 115 120 125
 Tyr Ala Ser Arg Leu Tyr Arg Thr Gly Ser Ser Gly Pro Gly Ala Gln
 130 135 140
 Arg Gln Pro Gly Ala Gln Arg Pro Trp Tyr Val Ser Val Asn Gly Lys
 145 150 155 160
 Gly Arg Pro Arg Arg Gly Phe Lys Thr Arg Arg Thr Gln Lys Ser Ser
 165 170 175
 Leu Phe Leu Pro Arg Val Leu Gly His Lys Asp His Glu Met Val Arg
 180 185 190
 Leu Leu Gln Ser Ser Gln Pro Arg Ala Pro Gly Glu Gly Ser Gln Pro
 195 200 205
 Arg Gln Arg Arg Gln Lys Lys Gln Ser Pro Gly Asp His Gly Lys Met
 210 215 220
 Glu Thr Leu Ser Thr Arg Ala Thr Pro Ser Thr Gln Leu His Thr Gly
 225 230 235 240
 Gly Leu Ala Val Ala
 245

10

20

30

<210> 29
 <211> 202
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 29
 Met Ala Lys Arg Gly Pro Thr Thr Gly Thr Leu Leu Pro Arg Val Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Val Val Ala Leu Ala Asp Arg Gly Thr Ala Ala Pro Asn
 20 25 30
 Gly Thr Arg His Ala Glu Leu Gly His Gly Trp Asp Gly Leu Val Ala
 35 40 45
 Arg Ser Leu Ala Arg Leu Pro Val Ala Ala Gln Pro Pro Gln Ala Ala
 50 55 60
 Val Arg Ser Gly Ala Gly Asp Tyr Leu Leu Gly Leu Lys Arg Leu Arg
 65 70 75 80
 Arg Leu Tyr Cys Asn Val Gly Ile Gly Phe His Leu Gln Val Leu Pro
 85 90 95
 Asp Gly Arg Ile Gly Gly Val His Ala Asp Thr Arg Asp Ser Leu Leu
 100 105 110
 Glu Leu Ser Pro Val Gln Arg Gly Val Val Ser Ile Phe Gly Val Ala
 115 120 125
 Ser Arg Phe Phe Val Ala Met Ser Ser Arg Gly Lys Leu Phe Gly Val
 130 135 140
 Pro Phe Phe Thr Asp Glu Cys Lys Phe Lys Glu Ile Leu Leu Pro Asn
 145 150 155 160
 Asn Tyr Asn Ala Tyr Glu Ala Tyr Ala Tyr Pro Gly Met Phe Met Ala
 165 170 175
 Leu Ser Lys Asn Gly Arg Thr Lys Lys Gly Asn Arg Val Ser Pro Thr
 180 185 190
 Met Lys Val Thr His Phe Leu Pro Arg Leu
 195 200

10

20

30

<210> 30
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 30
 Met Ser Leu Ser Leu Leu Phe Leu Ile Phe Cys Ser His Leu Ile His
 1 5 10 15
 Ser Ala Trp Ala His Gly Glu Lys Arg Leu Thr Pro Glu Gly Gln Pro
 20 25 30

Ala Pro Pro Arg Asn Pro Gly Asp Ser Ser Gly Ser Arg Gly Arg Ser
 35 40 45
 Ser Ala Thr Phe Ser Ser Ser Ser Ala Ser Ser Pro Val Ala Ala Ser
 50 55 60
 Pro Gly Ser Gln Gly Ser Gly Ser Glu His Ser Ser Phe Gln Trp Ser
 65 70 75 80
 Pro Ser Gly Arg Arg Thr Gly Ser Leu Tyr Cys Arg Val Gly Ile Gly
 85 90 95
 Phe His Leu Gln Ile Tyr Pro Asp Gly Lys Val Asn Gly Ser His Glu
 100 105 110
 Ala Ser Val Leu Ser Ile Leu Glu Ile Phe Ala Val Ser Gln Gly Ile
 115 120 125
 Val Gly Ile Arg Gly Val Phe Ser Asn Lys Phe Leu Ala Met Ser Lys
 130 135 140
 Lys Gly Lys Leu His Ala Ser Ala Lys Phe Thr Asp Asp Cys Lys Phe
 145 150 155 160
 Arg Glu Arg Phe Gln Glu Asn Ser Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Ile
 165 170 175
 His Arg Thr Glu Lys Thr Gly Arg Glu Trp Tyr Val Ala Leu Asn Lys
 180 185 190
 Arg Gly Lys Ala Lys Arg Gly Cys Ser Pro Arg Val Lys Pro Gln His
 195 200 205
 Val Ser Thr His Phe Leu Pro Arg Phe Lys Gln Ser Glu Gln Pro Glu
 210 215 220
 Leu Ser Phe Thr Val Thr Val Pro Glu Lys Lys Lys Pro Pro Val Lys
 225 230 235 240
 Pro Lys Val Pro Leu Ser Gln Pro Arg Arg Ser Pro Ser Pro Val Lys
 245 250 255
 Tyr Arg Leu Lys Phe Arg Phe Gly
 260

10

20

<210> 31
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30

<400> 31
 Met Ala Leu Gly Gln Arg Leu Phe Ile Thr Met Ser Arg Gly Ala Gly
 1 5 10 15
 Arg Val Gln Gly Thr Leu Gln Ala Leu Val Phe Leu Gly Val Leu Val

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

10

20

<210> 32
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 32
Met Arg Lys Trp Ile Leu Thr Arg Ile Leu Pro Thr Leu Leu Tyr Arg 1 5 10 15
Ser Cys Phe His Leu Val Cys Leu Val Gly Thr Ile Ser Leu Ala Cys 20 25 30
Asn Asp Met Ser Pro Glu Gln Thr Ala Thr Ser Val Asn Cys Ser Ser 35 40 45
Pro Glu Arg His Thr Arg Ser Tyr Asp Tyr Met Glu Gly Gly Asp Ile 50 55 60

30

Arg Val Arg Arg Leu Phe Cys Arg Thr Gln Trp Tyr Leu Arg Ile Asp
 65 70 75 80
 Lys Arg Gly Lys Val Lys Gly Thr Gln Glu Met Lys Asn Ser Tyr Asn
 85 90 95
 Ile Met Glu Ile Arg Thr Val Ala Val Gly Ile Val Ala Ile Lys Gly
 100 105 110
 Val Glu Ser Glu Tyr Tyr Leu Ala Met Asn Lys Glu Gly Lys Leu Tyr
 115 120 125
 Ala Lys Lys Glu Cys Asn Glu Asp Cys Asn Phe Lys Glu Leu Ile Leu
 130 135 140
 Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ala Ser Ala Lys Trp Thr His Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Glu Met Phe Val Ala Leu Asn Gln Lys Gly Ile Pro Val Lys Gly
 165 170 175
 Lys Lys Thr Lys Lys Glu Gln Lys Thr Ala His Phe Leu Pro Met Ala
 180 185 190
 Ile Thr

10

<210> 33
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20

<400> 33
 Met Ala Pro Leu Gly Glu Val Gly Ser Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala
 1 5 10 15
 Val Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser Pro Val Leu
 20 25 30
 Leu Asn Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly
 35 40 45
 Pro Ala Val Thr Asp Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg
 50 55 60
 Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly
 65 70 75 80
 Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu
 85 90 95
 Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser
 100 105 110
 Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu
 115 120 125

30

Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp
 130 135 140
 Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg
 145 150 155 160
 Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr
 165 170 175
 Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val
 180 185 190
 Asp Pro Asp Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser
 195 200 205

10

<210> 34
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Random primer
 with Not I restriction site for first strand cDNA
 synthesis

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(33)
 <223> "N" can be A, G, C, or T

20

<400> 34
 ggaaggaataa aagcgccgc aacannnnnn nnn

33

<210> 35
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer for
 first strand cDNA synthesis

<400> 35
 aatccgatgc ccacgttgca gta

23

30

<210> 36
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for
 amplification of cDNA

<400> 36
 aaaatcttag accgacgact gtgttt

26

<210> 37
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: PCR primer for
 amplification of cDNA

<400> 37
 gagtctccgc agccttttga gg

22

10

<210> 38
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 actggcggcc gcaggcatca tcccagttga ggag

34

<210> 39
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20

<400> 39
 actggtcact cgaggggtacc ttagctagcc cccggg

36

<210> 40
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 40
 Met Glu Trp Met Arg Ser Arg Val Gly Thr Leu Gly Leu Trp Val Arg
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Val Phe Leu Leu Gly Val Tyr Gln Ala
 20 25

30

<210> 41
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser
 1 5 10 15

Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala
 20 25

【図 1】

Fig. 1

```

atg gaa tgg atg aga tct aga gtt ggg acc ctg gga ctg tgg gtc cga 48
Met Glu Trp Met Arg Ser Arg Val Gly Thr Leu Gly Leu Trp Val Arg
1 5 10 15
ctg ctg ctg gct gtc ttc ctg ctg ggg gtc tac caa gca tac ccc atc 96
Leu Leu Leu Ala Val Phe Leu Leu Gly Val Tyr Gln Ala Tyr Pro Ile
20 25 30
cct gac tcc agc ccc ctg ctg cag ttt ggg ggt caa gtc cgg cag agg 144
Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg
35 40 45
tac ctg tac aca gat gac gac caa gac act gaa gcc cac ctg gag atc 192
Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Gln Asp Thr Glu Ala His Leu Glu Ile
50 55 60
agg gag gat gga aca gtg gta ggc gca gca cac cgc agt cca gaa agt 240
Arg Glu Asp Gly Thr Val Val Gly Ala Ala His Arg Ser Pro Glu Ser
65 70 75 80
ctc ctg gag ctg aaa gcc ttg aag cca ggg gtc att caa atc ctg ggt 288
Leu Leu Glu Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly
85 90 95
gtc aaa gcc tct agg ttt ctt tgc caa cag cca gat gga gct ctc tat 336
Val Lys Ala Ser Arg Phe Leu Cys Gln Gln Pro Asp Gly Ala Leu Tyr
100 105 110
gga tgc cct cac ttt gat cct gag gcc tgc agc ttc aga gaa ctg ctg 384
Gly Ser Pro His Phe Asp Ser Pro Asn Gln Asp Ala Thr Ser Trp
115 120 125
ctg gag gac ggt tac aat gtg tac cag tct gaa gcc cat gcc ctg ccc 432
Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro
130 135 140
ctg cgt ctg cct cag aag gac tcc cca aac cag gat gca aca tcc tgg 480
Leu Arg Leu Pro Gln Lys Asp Ser Pro Asn Gln Asp Ala Thr Ser Trp
145 150 155 160
gga cct gtg cgc ttc ctg ccc act cca gcc ctg ctc cac gag ccc caa 528
Gly Pro Val Arg Phe Leu Pro Met Pro Gly Leu Leu His Glu Pro Gln
165 170 175
gac caa gca gga ttc ctg ccc cca gag ccc cca gat gtg ggc tcc tct 576
Asp Gln Ala Gly Phe Leu Pro Pro Glu Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser
180 185 190
gac ccc ctg agc atg gta gag cct tta cag gcc cga agc ccc agc tat 624
Asp Pro Leu Ser Met Val Glu Pro Leu Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr
195 200 205

```

【図 2 B】

Fig. 2B

```

gat gtg ggc tcc tgg gac cct ctg agc atg gtg gga cct tcc cag ggc 747
Asp Val Gly Ser Ser Asp Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly
190 195 200
cga agc ccc agc tac gct tcc tga agcagagggc tggttactat gacatctcct 801
Arg Ser Pro Ser Tyr Ala Ser
205 210
cttattttat taggttattt atcttatttt tttttttatt tttcttactt gagataataa 861
agagttccag aggagataaa gaatgagcat gtgtgagtgct ctgggggaag acatggcagc 921
tggtttgtct cctttggccc ggacaatccc ctctacaact cccctcaagt ggtccgaggg 981
tcttggttct ccaactggggc tcaatttttt cttttctttt cttttctttt ttttgagagc 1041
gagttctgct ctgcactcca gccaggcca cagagcgaga ttcactctca aaaaaataaa 1101
taataataa aataataaaa tataaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa 1161
aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa 1190

```

【図 2 A】

Fig. 2A

```

gaggatccag ccgaagagg agccaggcac tcaggccaac tgaattact cactggaca 60
actggaatct ggcaccaatt ctaaaccaact cagcttctcc gagctcacac cccggagatc 120
acctgaggac ccagagcatt g atg gac tgc gac gag acc ggg ttc gag cac 171
Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His
1 5 10
tca gga ctg tgg gtt tct gtc ctg gct ggt ctt ctg ctg gga gcc tgc 219
Ser Gly Leu Trp Val Ser Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys
15 20 25
cag gca cac ccc atc cct gac tcc agt cct ctc ctg caa ttc ggg ggc 267
Gln Ala His Pro Ile Pro Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly
30 35 40
caa gtc cgg cag cgg tac ctc tac aca gat gat gcc cag cag aca gaa 315
Gln Val Arg Gln Arg Tyr Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu
45 50 55
gcc cac ctg gag atc agg gag gat ggg acg gtg ggg ggc gct gct gac 363
Ala His Leu Glu Ile Arg Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp
60 65 70
cag agc ccc gaa agt ctc ctg cag ctg aaa gcc ttg aag ccg gga gtt 411
Gln Ser Pro Glu Ser Leu Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val
75 80 85 90
att caa atc ttg gga gtc aag aca tcc agg ttc ctg tgc cag cgg cca 459
Ile Gln Ile Leu Gly Val Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro
95 100 105
gat ggg gcc ctg tat gaa tgc ctc cac ttt gac cct gag gcc tgc agc 507
Asp Gly Ala Leu Tyr Gly Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser
110 115 120
ttc cgg gag ctg ctt ctt gag gac gga tac aat gtt tac gag tcc gaa 555
Phe Arg Glu Leu Leu Leu Glu Asp Gly Tyr Asn Val Thr Gln Ser Glu
125 130 135
gcc cac ggc ctc cgg ctg cac ctg cca ggg aac aag tcc cca cac cgg 603
Ala His Gly Leu Pro Leu His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg
140 145 150
gac cct gca ccc cga gga cca gct cgc ttc ctg cca cta cca gcc ctg 651
Asp Pro Ala Pro Arg Gly Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu
155 160 165 170
ccc ccc gca ccc cgg gag cca ccc gga atc ctg gcc ccc cag ccc ccc 699
Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro
175 180 185

```

【図 3 A】

Fig. 3A

```

1 50
hAgp-26257 -----M
nAgp-26257 -----M
Hgf14 -----MAAATASG LIRKQKQARE QHMDRPSASR
Mgf14 -----MAAATASG LIRKQKQARE QHMDRPSASR
Hgf12 -----MAAATASG LIRKQKQARE QHMDRPSASR
Mgf13 -----MTAATASS LIRKQKQARE R . EKSNAK
Hgf5 -----MS LSLLLFFS HLILSAWAG EKRLAPGQP GPAATDRNFI
Mgf5 -----MS LSLLLFFS HLILSAWAG EKRLAPGQP APPNPGDSS
Hgf6 MALGQLFIT MSRGARLQ TLNALVFLGI LVGMVVPSPA QTRA . NYTL
Mgf6 MALGQLFIT MSRGARVQC TLNALVFLGI LVGMVVPSPA GARA . NYTL
Hgf4 -----MSGPGTA AV ALLPAVLAL LAPWAGROGA AAPAPKGTI
Mgf4 -----MAKRGPTTG TLLPRVLLAL VVALADRGTA . . . APNGTR
Hgf3 -----
Mgf3 -----
Hgf7 -----MKHMLITVL PTLLYRSCFH
Mgf7 -----MKHMLITVL PTLLYRSCFH
Hgf9 -----MAPLGEVGVNY FOQODAVFPF
Mgf9 -----MAPLGEVGVNY FOQODAVFPF
Hgf1 -----
Mgf1 -----
Hgf2 -----
Mgf2 -----
cons -----

```

```

51 100
hAgp-26257 DSDETGFPHS GLWVS VLAG LLLGACQAMP IPDSSPLIQ GOQVRQRYLY
nAgp-26257 EWMRSRVGTL GLWVLLAV FLGQVQAYP IPDSSPLIQ GOQVRQRYLY
Hgf14 RRSPPSKN . R GLCNGNLVDI PSKVRIFGLK KRRLRQ . DP QLKGIIVTRYLY
Mgf14 RRSPPSKN . R GLCNGNLVDI PSKVRIFGLK KRRLRQ . DP QLKGIIVTRYLY
Hgf12 RRSPPSKRGR SLCSRVLVV PSKVRIFGSR PSKVRIRFP QLKGIIVTRYLY
Mgf13 CVSSSK OK TSCDIKLMV PSVILFQSK KR . RRRFE QLKGIIVTRYLY
Hgf5 GSSSRQSSSS AMSSSSASSS PAASLGSQGS GLEQSSFWGS PSGRRTGSLY
Mgf5 GSGR . SSA TFSSSSASSP VAASPGQGS GSEHSSFWGS PSGRRTGSLY
Hgf6 LD . SRGWTT LLSRSRAGL . AGEI . AGV WWSG . . . YL VQIKRQRYLY
Mgf6 LD . SRGWTT LLSRSRAGL . AGEI . AGV WWSG . . . YL VQIKRQRYLY
Hgf4 EARLERRNES LVALSRLRP VAAQP . KEA AVQSAGDYL LGIKRLRRLY
Mgf4 HAELOHMDG LVARSRLRP VAAQP . PQA AVRSAGDYL LGIKRLRRLY
Hgf3 -MGLMLLLL SILSPONPAA GPGARLRDA GGGGVYVRL GGPARRRRLY
Mgf3 -MGLMLLLL SILSPONPAA GPGARLRDA GGGGVYVRL GGPARRRRLY
Hgf7 IICLVGTISL ACNDMPBQM ATNVNCSSE RHRSYDYME GGDIVRRRLY
Mgf7 LVCLVGTISL ACNDMPBQM ATNVNCSSE RHRSYDYME GGDIVRRRLY
Hgf9 NVFVLVDSE VLLSDHLAGS BAGGLRPGA . VTDLHLK . . GILRRRLY
Mgf9 NVFVLVDSE VLLSDHLAGS BAGGLRPGA . VTDLHLK . . GILRRRLY
Hgf1 -----MAGS EITTFPALTE . . . KRNLP QNYKPKLLY
Mgf1 -----MAGS EITTFPALTE . . . RPNLP QNYKPKLLY
Hgf2 -----MAGS SITTLPALTE . . . DOGSAPPP GHFKDPKRLY
Mgf2 -----MAGS SITTLPALTE . . . DOGSAPPP GHFKDPKRLY

```

【図 3 B】

Fig. 3B

```

101                               150
hApp-26257 TDDAQQTSEAH LRIREDOTVG GAADQ.SPES LLQLKALKPG VIQILGVKTS
mApp-26257 TDDAQQTSEAH LRIREDOTVV GAHR.SPES LLELKALKPG VIQILGVKAS
Hfgf14 CR..QGV..Y LQMHDPDGLD GTKDDSTNST LFNLLIPVGLR VVAIQGVKVG
Mfgf14 CR..QGV..Y LQMHDPDGLD GTKDDSTNST LFNLLIPVGLR VVAIQGVKVG
Hfgf12 SQ..QGV..P LQMHDPDGLD GTKDDSDYTT LFNLLIPVGLR VVAIQGVKAS
Mfgf13 SR..QGV..H LQIQADGTID GTKDDSDYTT LFNLLIPVGLR VVAIQGVKVG
Hfgf5 CRVIGGF..H LQIYPDGKVN GSHR.AMMLA VLEIFAVSQG IVGIRGVPSN
Mfgf5 CRVIGGF..H LQIYPDGKVN GSHR.ASVLS LLEIFAVSQG IVGIRGVPSN
Hfgf6 CNVIGGF..H LQVLPDGRIS GTHR.EMFYS LLEISTVERG VVSLFGVASA
Mfgf6 CNVIGGF..H LQVLPDGRIS GTHR.EMFYS LLEISTVERG VVSLFGVASA
Hfgf4 CNVIGGF..H LQVLPDGRIG GAHA.DTRDS LLELSPVERG VVSLFGVASE
Mfgf4 CNVIGGF..H LQVLPDGRIG GVAH.DTRDS LLELSPVERG VVSLFGVASE
Hfgf3 CATK..Y..H LQVLPDGRIG GSHR.EMFYS LLEITAVEVG IVAIRGLFSG
Mfgf3 CATK..Y..H LQVLPDGRIG GSHR.EMFYS LLEITAVEVG IVAIRGLFSG
Hfgf7 CRTQ..W..Y LRIDKRGKVK GTQBMKNSYN IMEIRTAVG IVAIKGVASE
Mfgf7 CRTQ..W..Y LRIDKRGKVK GTQBMKNSYN IMEIRTAVG IVAIKGVASE
Hfgf9 CRT..GF..H LRIFPDGTIQ GTRKHSRPG ILEIFSIAGV LVSIRGVDSG
Mfgf9 CRT..GF..H LRIFPDGTIQ GTRKHSRPG ILEIFSIAGV LVSIRGVDSG
Hfgf1 CSNG.GH..P LRILPDGTVD GTRDSDQHI QLQLSABAG EVYIKGTETG
Mfgf1 CSNG.GH..P LRILPDGTVD GTRDSDQHI QLQLSABAG EVYIKGTETG
Hfgf2 CKNG.GF..P LRILPDGTVD GTRKHSRPG QLQLSABAG EVYIKGTETG
Mfgf2 CKNG.GF..P LRILPDGTVD GTRKHSRPG QLQLSABAG EVYIKGTETG
cons cr.g.gf..H Lqihpds.vd Gt.e.spsys l1.e.avevg vv.lkgvks

```

【図 3 C】

Fig. 3C

```

201                               250
hApp-26257 KSPHRDPAPR GPA..RFLP LPGLPPAPPE PGILAPQPP DVGSDDPLSM
mApp-26257 DSPNQDQTSW GPV..RFLP NPGLLHPDQD QAGFLPPEPP DVGSDDPLSM
Hfgf14 .....W FLGLNKEGQA MKG..NRVKK TKPAHFLPK PLEVAMYREP
Mfgf14 .....W FLGLNKEGQA MKG..NRVKK TKPAHFLPK PLEVAMYREP
Hfgf12 .....W FLGLNKEGQI MKG..NRVKK TKPSHFVVK PLEVAMYREP
Mfgf13 .....W YLGLNKEGEI MKG..NRVKK MKPAHFLPK PLKAMYKRP
Hfgf5 .....W YVALNKGKA KRGCSFRVK QHSTHFLPR FKQSBQPELS
Mfgf5 .....W YVALNKGKA KRGCSFRVK QHSTHFLPR FKQSBQPELS
Hfgf6 .....T YIALSKYGRV KRG..SKVSP IMVTHFLPR I-----
Mfgf6 .....T YIALSKYGRV KRG..SKVSP IMVTHFLPR I-----
Hfgf4 .....M FIALSKNGKT KKG..NEVSP TMKVTHFLPR L-----
Mfgf4 .....M FIALSKNGKT KKG..NEVSP TMKVTHFLPR L-----
Hfgf3 BRQPAEELM YVSVNGKRP RRG..FKTRR QKSSFLPR VLGRDHEMV
Mfgf3 BRQPAEELM YVSVNGKRP RRG..FKTRR QKSSFLPR VLGRDHEMV
Hfgf7 .....GEM FVALNQKIP VRG..KTKK BQTAHFLPM AIT-----
Mfgf7 .....GEM FVALNQKIP VRG..KTKK BQTAHFLPM AIT-----
Hfgf9 .....ERV YVALNDGTP REG..TKTRR BQFTHFLPR FVDRKVPBL
Mfgf9 .....ERV YVALNDGTP REG..TKTRR BQFTHFLPR FVDRKVPBL
Hfgf1 .....KNW FVGLKNGSC KRG..PTHY QKAILFLPL FVSSD-----
Mfgf1 .....KNW FVGLKNGSC KRG..PTHY QKAILFLPL FVSSD-----
Hfgf2 .....SW YVALKKTQY KLG..SKTGP QKAILFLPM SAKS-----
Mfgf2 .....SW YVALKKTQY KLG..SKTGP QKAILFLPM SAKS-----
cons .....w yvalnk.g.p krg..nr.kp lqkathflpr pv-s-----

```

【図 3 D】

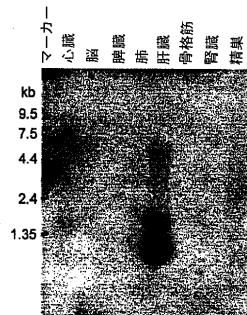
Fig. 3D

```

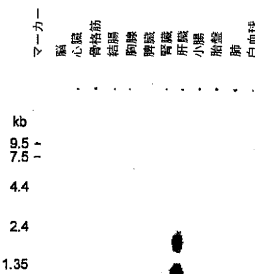
151                               200
hApp-26257 RFLCQRPDGA LYGSILHPEP ACSFRELLLE DQNVYQSEA HGLPLHLPOK
mApp-26257 RFLCQRPDGA LYGSILHPEP ACSFRELLLE DQNVYQSEA HGLPLHLPOK
Hfgf14 LYIANGBOY LYPSLFTPE .CKFKESVFE NYVIYSSML YRQESGRA.
Mfgf14 LYIANGBOY LYPSLFTPE .CKFKESVFE NYVIYSSML YRQESGRA.
Hfgf12 LYIANGBOY LYPSLFTPE .CKFKESVFE NYVIYSSML YRQESGRA.
Mfgf12 LYIANGBOY LYPSLFTPE .CKFKESVFE NYVIYSSML YRQESGRA.
Hfgf13 LYIANGBOY LYPSLFTPE .CKFKESVFE NYVIYSSML YRQESGRA.
Mfgf13 LYIANGBOY LYPSLFTPE .CKFKESVFE NYVIYSSML YRQESGRA.
Hfgf5 KFLAMSKKK LHASAKFTDD .CKFRERFQR NSYNTYASAI HRTKTRGRE.
Mfgf5 KFLAMSKKK LHASAKFTDD .CKFRERFQR NSYNTYASAI HRTKTRGRE.
Hfgf6 LFVAMSKGR LYATPSQDE .CKFRETLLE NNYNAYESDL Y.....QG.
Mfgf6 LFVAMSKGR LYATPSQDE .CKFRETLLE NNYNAYESDL Y.....QG.
Hfgf4 PFVAMSKKK LYGSPPFTDE .CTFKELLPL NNYNAYESYK Y.....PG.
Mfgf4 PFVAMSKKK LYGSPPFTDE .CTFKELLPL NNYNAYESYK Y.....PG.
Hfgf3 RYLANMKGR LYASDHYNAR .CFPVERIHR LGYNTYASRL YRTGSGPGA
Mfgf3 RYLANMKGR LYASDHYNAR .CFPVERIHR LGYNTYASRL YRTGSGPGA
Hfgf7 RYLANMKGR LYAKKCNED .CNFKELLLE NRYNTYASAK WTH..SG..
Mfgf7 RYLANMKGR LYAKKCNED .CNFKELLLE NRYNTYASAK WTH..SG..
Hfgf9 RYLANMKGR LYSEKLTQE .CVFREQFER NRYNTYSSNL YKHVDTG...
Mfgf9 RYLANMKGR LYSEKLTQE .CVFREQFER NRYNTYSSNL YKHVDTG...
Hfgf1 QYLANMDTGL LYGSQPMEE .CLPLELER NRYNTYSSK H...AR...
Mfgf1 QYLANMDTGL LYGSQPMEE .CLPLELER NRYNTYSSK H...AR...
Hfgf2 RYLANMKGR LYASKCVTE .CFFFERLES NRYNTYSSK Y...T...
Mfgf2 RYLANMKGR LYASKCVTE .CFFFERLES NRYNTYSSK Y...T...
cons cr.g.gf..H Lqihpds.vd Gt.e.spsys l1.e.avevg vv.lkgvks

```

【図 4 A】



【図 4 B】



【図4C】

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Al	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
B	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
C	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
D	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
E	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
F	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
G	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
H	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	全脳	扁桃	尾状核	小脳	大脳皮質	前頭葉	海馬	延髄
B	後頭葉	被殻	黒質	側頭葉	視床	側坐核	腎臓	
C	心臓	大動脈	骨格筋	結腸	膀胱	子宮	前立腺	胃
D	精巣	卵巣	脾臓	下垂体	副腎	甲状腺	唾液腺	乳腺
E	腎臓	肝臓	小腸	脾臓	胸腺	末梢白血球	リンパ節	骨髓
F	垂	肺	気管	胎盤				
G	胎児脳	胎児心臓	胎児腎臓	胎児肝臓	胎児脾臓	胎児胸腺	胎児肺	
H	酵母 tRNA 100 ng	酵母 tRNA 100 ng	E. coli rRNA 100 ng	E. coli DNA 100 ng	Poly-(A) 100 ng	ヒト CotDNA 100 ng	ヒト DNA 100 ng	ヒト DNA 500 ng

フロントページの続き

微生物の受託番号 ATCC PTA-626

(72)発明者 リウ, ベンシアン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 91362, サウザンド オークス, ルトランド プレイ
ス 2528

(72)発明者 ダニレンコ, ディミトリ マイケル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 91361, サウザンド オークス, ローリング オーク
ス ドライブ 750

合議体

審判長 鈴木 恵理子

審判官 加々美 一恵

審判官 鵜飼 健

(56)参考文献 特開2010-141216(JP,A)

Biochimica et Biophysica Acta(2000)Vol.1492
, p.203-206

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-90

PUBMED

BIOSIS

WPI

SWISSPROT

PIR

GENESEQ

GENEBANK

EMBL

DDBJ