



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **310032**

(13) B1

(51) Int Cl⁷ C 07 K 14/71, C 12 N 15/12, C 07 K 16/28,
C 12 N 5/10

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19920060	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1990.07.06, PCT/US90/03830
(22) Inng. dag	1992.01.03	(85) Videreføringsdag	1992.01.03
(24) Løpedag	1990.07.06	(30) Prioritet	1989.07.06, US, 377003
(41) Alm. tilgj.	1992.03.02		
(45) Meddelt dato	2001.05.07		

(71) Patenthaver	The Regents of the University of California, 300 Lakeside Drive, 22nd floor, Oakland, CA 94612-3550, US
(72) Oppfinner	Lewis T. Williams, San Francisco, CA, US Daniel E. Johnson, San Francisco, CA, US Pauline L. Lee, San Diego, CA, US
(74) Fullmektig	Bryn & Aarflot AS, 0104 Oslo

(54) **Benevnelse** Fremgangsmåte for fremstilling av fibroblast-vekstfaktorreseptor-blokkerende forbindelse, anvendelse av et løselig peptid, isolert nukleinsyre, fremgangsmåte for fremstilling av antistoff, anvendelse av et fibroblastvekstfaktorreseptor, samt transformert celle

(56) **Anførte publikasjoner** US 4394443
Lee et al., Clinical Research, vol. 37, nr. 2, 1989, 519A
Imamura et al., Biochem. and Biophys. Res. Comm., vol. 155, nr. 2, 1988, side 583-590
Neufeld et al., Jour. of Biol. Chem., vol. 261, nr. 12, 1986, side 5631-5637
Neufeld et al., Jour. of Cellular Phys., vol. 136, 1988, side 537-542

(57) **Sammendrag** Fibroblastvekstfaktor (FGF) reseptor som omfatter en basisk fibroblastvekstfaktor-reseptor har blitt rensert. Forskjellige former er blitt identifisert, og de omfatter løselige former som mangler transmembranområdet. DNA-sekvenser som koder for full-lengde fibroblastvekstfaktor-reseptorer og polypeptider som er karakterisert ved en del av et FGF-ligand-bindende område, har blitt isolert og sekvensert. Disse DNA'ene inneholder DNA som koder for en basisk FGF-R og en human FGF-R og er operativt bundet til kontrollsekvenser og produsert i en kultur av en forenlig vert transformert, transfektert eller elektroporert ved en kloningsbærer som inneholder DNA-sekvensen. Oppfinnelsen omfatter også antistoffer mot reseptoren, fremgangsmåter for å syntetisere vekstfaktorreseptorproteinene, en fremgangsmåte for å fremstille analoger av fibroblastvekstfaktorreseptorene. Fremgangsmåter for å vurdere blandinger som øker eller hemmer fibroblastvekstfaktorer og sammensetninger som er agonistiske eller antagonistiske overfor fibroblastvekstfaktorreseptorer beskrives også. Diagnostiske og terapeutiske anvendelser er beskrevet.

Denne søknad er en delvis fortsettelse av patentsøknad USSN 07/377 003 innlevert 6. juli 1989, på vanlig måte, og som herved er inntatt som referanse.

Denne oppfinnelse ble gjort delvis med regjeringsstøtte under stipendkontrakt nr. HL-07192 og under stipendene RO1 HL-32898 og PO1 HL-43821-01, alle gitt av National Institutes of Health (de nasjonale helseinstituttene). Regjeringen kan ha visse rettigheter i denne oppfinnelse.

Den foreliggende oppfinnelse omhandler fremgangsmåte for fremstilling av fibroblast-vekstfaktorreseptor-blokkerende forbindelse, anvendelse av et løselig peptid, isolert nukleinsyre, fremgangsmåte for fremstilling av antistoff, anvendelse av et fibroblast-vekstfaktorreseptor, samt transformert celle.

Polypeptidvekstfaktorer er mitogener som virker på celler ved å binde seg spesifikt til reseptorer lokalisert på plasmamembranen. Disse reseptorene har vanligvis tre hovedregioner som kan gjenkjennes. Den første er en ekstracellulær region som inneholder området som binder polypeptidvekstfaktoren (dvs. ligandbindende område). Det andre området er en transmembranregion, og det tredje er en intracellulær region. Mange av disse reseptorene inneholder et tyrosin-kinaseområde i den intracellulære regionen.

Fibroblast-vekstfaktorreseptor (FGF-R)-proteinene binder til en familie av beslektete vekstfaktorligander, fibroblast-vekstfaktor (FGF)-familien. Denne familie av vekstfaktorer er karakterisert ved aminosyresekvenshomologi, heparin-bindingsaktivitet, evne til å starte angiogenese (åredannelse) og mitogen aktivitet overfor celler av epitelial, mesenchymal eller neural opprinnelse.

FGF-familien omfatter de følgende syv kjente FGF'er:

(1, 2) sur FGF (aFGF) og basisk FGF (bFGF) (D. Gospodarowicz et al., Mol. Cell. Endocrinol., 46:107 (1986);

(3) int-2-genproduktet (R. Moore et al., EMBO. J., 5:919 (1986));

(4) hst-genproduktet eller Kaposis sarkoma-FGF (K.J. Anderson et al., Nature, 332:360 (1988); M. Taira et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:2980 (1987));

(5) FGF-5 (X. Zhan et al., Mol. Cell. Biol., 8:3487 (1988)); og

(6) keratinocyt vekstfaktor (J.S. Rubin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:802 (1989)).

(7) FGF-6 (I. Marics et al., Oncogene, 3:335 (1989)).

Virkningene til sur og basisk FGF blir formidlet gjennom binding til høyaffinitets celleoverflatereseptorer på omtrent 145 og 125 kDa (G. Neufeld og D. Gospodarowicz, J. Biol. Chem., 261:5631 (1986)).

Referansen til Imamura et al., "Purification of Basic FGF Receptors from Rat Brain", Biochem. Biophys. Res. Communications, 155:583 (15. september 1988) beskriver rensingen av nanogramsmengder av basisk FGF-reseptor (bFGF-R) fra rottehjerne.

Mens genene som koder for en rekke vekstfaktorreseptorer er blitt molekylært klonet (f.eks. muse-PDGF-reseptor, Yarden et al., Nature, 323:226 (1986), har ingen klon tidligere blitt identifisert som koder for en fibroblast-vekstfaktorreseptor (FGF-R). Med bruk av anti-fosfotyrosinantistoffer for å undersøke cgt11 cDNA ekspresjonsbibliotek, ble en 2,5 kilobase cDNA som koder for et nytt tyrosinkinasegen, bestemt bek (bakterielt uttrykt kinase) isolert fra et muselever cDNA-bibliotek. (S. Kornbluth et al., "Novel Tyrosine Kinase Identified by Phosphotyrosine Antibody Screening of cDNA Libraries", Mol Cell. Biol. No. 8, 5541 (1988)). bek-sekvensen inneholdt ikke en transmembranregion og kunne derfor ikke identifiseres som en vekstfaktorreseptor. En annen proteintyrosinkinasegen betegnet flg (fms-liknende gen) ble isolert fra et humant endotelcelle cDNA-bibliotek ved hybridisering under nedsatt stringens med en v-fms onkogen probe. (M. Ruta et al., "A Novel Protein Tyrosine Kinase Gene Whose Expression is Modulated During Endothelial Cell

Differentiation", Oncogene, 3:9 (1988)). Disse forfatterne kunne ikke identifisere en transmembranregion i deres isolerte sekvens og derfor foreslo at flg koder for en cytoplasmatisk tyrosinkinase.

De rensede og klonete kylling bFGF og humane bFGF-reseptorene i denne oppfinnelsen har en aminosyresekvenslikhet med bek- og flg-klonene i regionene som er blitt isolert. Imidlertid var både de omtalte bek- og flg-sekvensene ufullstendige, og deres funksjon som FGF-bindende reseptorer kunne ikke påvises. Videre manglet de tidligere rapporterte mange av de strukturelle og funksjonelle forholdene beskrevet i den foreliggende oppfinnelse.

Medlemmer av FGF-familien synes å ha roller i vevsutvikling, vevsreparasjon, vedlikehold av neuroner og i patogenesen av sykdom. Unormal produksjon av FGF kan forårsake celletransformasjon ved en autokrin mekanisme. Videre kan FGF'er stimulere svulstvekst og invasivitet ved å stimulere vekst av blodkar i svulsten eller ved å lage proteiner slik som plasminogenaktivator. Imidlertid forblir identifisering av de komponenter som er viktige, og forståelse av mekanismene og interaksjonene som opptrer sterkt ufullstendige.

Renset FGF-reseptorer og fragmenter, og isolerte DNA-sekvenser som koder for definerte FGF-reseptorer og definerte fragmenter (f.eks. ligandbindende område) vil i stor grad øke forståelsen av fibroblastvekst-faktorfunksjonene. Antistoffer mot spesifikke og definerte områder av FGF-reseptoren er også blitt tilgjengelige. Disse forbindelsene vil finne både diagnostiske og terapeutiske anvendelser i de forannevnte prosessene. Den foreliggende oppfinnelse oppfyller disse og andre behov.

Den foreliggende oppfinnelse gir fremstilling av fibroblastvekstfaktorreseptor-blokkerende forbindelse, anvendelse av et løselig peptid, isolert nukleinsyre, fremgangsmåte for fremstilling av antistoff, anvendelse av et fibroblastvekstfaktorreseptor, samt transformert celle.

Den foreliggende oppfinnelse gir en fremgangsmåte for fremstilling av fibroblast-vekstfaktorreseptor-blokkerende forbindelse som er effektiv til å hemme fibroblast-vekstfaktorbinding til nevnte fibroblast-vekstfaktorreseptor, hvor den blokkerende forbindelse omfatter IgII- og IGIII-domener i det minste 85% homologe til IgII- og IgIII-områdene av reseptor h3 eller c1 som vist i fig. 7 og er fri for tyroinkinasedomener, kjennetegnet ved at fremgangsmåten omfatter;

uttrykking av nukleinsyre som koder for den blokkerende forbindelsen for å fremstille den blokkerende forbindelsen, og gjenvinning av den blokkerende forbindelsen.

Typisk vil den inhiberende forbindelsen være fra et menneske, f.eks. et fragment laget i en celle transformert med nukleinsyre som inneholder minst omtrent 15 baser av en sekvens valgt fra gruppen som består av:

- a) en DNA-sekvens i fig. 3 eller 4;
- b) en DNA-sekvens som koder for polypeptidet h3 i fig.7, og
- c) en DNA-sekvens som hybridiserer til en sekvens fra fig. 3 eller 4 under stringente betingelser.

Fragmentet vil ofte være en fibroblast-vekstfaktorreseptor ekstracellulær område uten tyrosinkinaserregion.

Foretrukket fremstilles det blokkerende forbindelser som omfatter i det vesentlige rent polypeptid på mindre enn omtrent 85kDa.

Spesielt foretrukket fremstilles det forbindelser fra fibroblast-vekstfaktorreseptor h3 og løselige forbindelser.

Et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse er anvendelse av et løselig peptid fra det ekstracellulære område av en fibroblast-vekstfaktorreseptor til screening av evne til å motvirke binding mellom en fibroblast-vekstfaktorreseptor og en fibroblast-vekstfaktorreseptor som er tilstede i en løsning, nevnte anvendelse omfatter å tilsette peptidet til nevnte løsning og måle binding mellom fibroblast-vekstfaktor og fibroblast-vekstfaktorreseptor hvor peptidet omfatter i det minste syv sammenhengende aminosyrer fra aminosyre-

sekvensen c1 eller h3 vist i fig.7.

Sammensetninger kan anvendes som inneholder et løselig polypeptid som er omtrent 5 og 200 sammenhengende aminosyrer fra et humant FGF-R ekstracellulært område av h3 vist i fig. 7.

Den foreliggende oppfinnelse omfatter isolerte nukleinsyrer som koder for human fibroblast-vekstfaktor reseptorproteiner eller fragmenter derav som omfatter IgII- og IgIII-domener i det minste 85% homologe med IgII- og IgIII-områdene av reseptor h3 eller c1 som vist i fig. 7 og er fri for tyrosinkinasedomener.

Foretrukket koder nukleinsyren ifølge foreliggende oppfinnelse for fibroblast-vekstfaktorreseptoren h3 som har en aminosyresekvens som vist i fig.7, eller et fragment derav. I et foretrukket aspekt av oppfinnelsen koder den isolerte nukleinsyren videre for minst ytterligere et peptidsegment valgt fra gruppen som består av et signalsegment, et IgI-segment, et surt segment, og et transmembran-segment. Den nevnte ytterligere sekvens kan være en sekvens beskrevet i fig. 3,4 eller 9. Spesielt foretrukket koder den isolerte nukleinsyren for en løselig human fibroblast-vekstfaktorreseptor og nevnte løselige humane vekstfaktorreseptor er h4 eller h5.

Fremgangsmåter for fremstilling av et antistoff mot en fibroblast-vekstfaktorreseptor eller et fibroblast-vekstfaktorfragment er også gjenstand for foreliggende oppfinnelse, som kjennetegnes ved at den omfatter å immunisere dyrelymfocytter med en fibroblast-vekstfaktorreseptor som har IgII- og IgIII- domener som har i det minste 85% homologi med IgII- og IgIII- domener av c1 og h3 i figur 7 eller en epitop derav for screening av antistoffer fremstilt av lymfocyttene, for evne til å inhibere binding av fibroblast-vekstfaktor til et ekstracellulært domene av en fibroblast-vekstfaktorreseptor som har IgII- og IgIII- domener med minst 85% homologi med IgII- og IgIII- domenene til c1 og h3 vist i fig. 7.

Foretrukket omfatter oppfinnelsen fremstilling av monoklonale antistoff.

Et ytterligere aspekt ved foreliggende oppfinnelse er anvendelse av en fibroblast-vekstfaktorreseptor omfattende IgII- og IgII- domener som har minst 85% homologi med IgII- og IgIII- domener av c1 eller h3 vist i figur 7 for å måle en fibroblast-vekstfaktor i en valgt prøve, hvori anvendelsen omfatter følgende trinn;

kombinasjon av nevnte prøve med fibroblast-vekstfaktorreseptorsegment, og bestemmelse av graden av binding mellom nevnte segment og nevnte prøve.

Foretrukket er fibroblast-vekstfaktorreseptorsegmentet fra fibroblast-vekstfaktorreseptor h3 som har en aminosyresekvens vist i fig.7.

Denne oppfinnelse beskriver også en transformert celle som er istand til å produsere et polypeptid ifølge krav 1. En foretrukket utførelsesform er hvor cellen produserer et polypeptid som omfatter vesentlig hele det ekstracellulære område av human fibroblast-vekstfaktorreseptor h3 vist i fig. 7.

KORT BESKRIVELSE AV FIG.

Fig. 1 sammenlikner bindingen av forskjellige forbindelser av FGF til FGF-R. Fig. 1(A) er en fremstilling som viser prosent hemming av bindingen til ^{125}I -merket bFGF. Fig. 1(B) er et autoradiogram av bFGF kryssbundet Swiss 3T3-celler som har vært gjenstand for gelelektroforese.

Fig. 2(A) er et autoradiogram av kryssbundne kyllingmembranfraksjoner og WGA-eluate etter gelelektroforese. Fig. 2(B) er en sølvfarget gel som viser ren FGF-reseptor som stammer fra en affinitetsopprensning utført på en WGA-sefarose 4B-søyle kyllingembryoeluat vist i fig. 2(A).

Fig. 3 viser nukleotidet og aminosyresekvensen til en kylling bFGF-reseptor.

Fig. 4 viser nukleotidet og aminosyresekvensen til en human FGF-reseptor.

Fig. 5(A) representerer et autoradiogram av en northern blot av kylling RNA undersøkt med en full lengde cDNA kylling

bFGF-reseptor under høystrengte betingelser. Fig. 5(B) representerer et autoradiogram av en primerekstensjon av kylling mRNA etter gelelektroforese på en akrylamid sekvensgel.

Fig. 6 er en skjematisk fremtilling av en kylling bFGF-reseptor som omfatter det sure området (helt utfylt firkant); transmembranregion (stripet firkant); tyrosinkinaseområde (prikket firkant); (S), posisjon av SH-cysteinrestene (i kontrast til S-betegnelsen i tabell I); (W), posisjon av tryptofanrest med hensyn til den første cysteinresten i Ig-liknende område.

Fig. 7 gir en aminosyresekvenssammenlikning mellom forskjellige FGF-reseptorformer. Aminosyresekvensene til fire humane reseptorformer er vist i sammenlikning med en kylling FGF reseptorsekvens. Sekvenser som atskiller seg fra kylling FGF reseptorsekvensen er beskrevet i åpne firkanter. Transmembransekvensen er understreket. Disse DNA-sekvensene er i GenBank/EMBL databaser under de følgende registreringsnummere: h2 er M34185, h3 er M34186, h4 er M34187 og h5 er M34188.

Fig. 8 gir en skjematisk fremstilling av forskjellige ulike FGF-reseptorer. De følgende strukturelle egenskaper er identifisert: hydrofob sannsynlig signalsekvens (utfylt firkant), den sterke sure regionen (åpne firkanter), transmembranområde (stripete firkanter), kinase 1 og kinase 2 områdene (prikkete firkanter), og den varierende regionen til h4/h5 (sikksakkstrek). Stjerner viser posisjonen der h2 og h4 inneholder sekvensen ArgMet, kyllingreseptoren inneholder en enkel Asn-rest, og h3 og h5 inneholder ingen tilsvarende rester. Triangler indikerer posisjonen der h3 inneholder en Glu-rest og alle andre reseptorformer inneholder en Lys-rest. Tallene på toppen av figuren indikerer graden av aminosyreidentitet mellom liknende domener av h2 human reseptor og kyllingreseptoren.

Fig. 9 presenterer en sammenlikning av forskjellige humane FGF-reseptor genomiske sekvenser med avledete aminosyresekvenser til FGF-reseptor cDNA-kloner. Sekvensen til

et human genomisk fragment som ble oppnådd ved PCR er vist i sammenlikning med humane og kyllingsekvenser. En 1 kb intron atskiller genomiske sekvenser som koder for Ig-liknende (Ig)-område og den sterkt sure regionen. Stiplede streker representerer sammenhengende sekvens uten mellomrom. Den avledete aminosyresekvensen vist for kylling FGF-reseptoren begynner med startmetioninresten (1) og ender med den sure regionen (EDDDDEDD; aminosyrene 125-132 i cl FGF-R). Aminosyresekvensen vist for human h2 FGF-reseptor begynner med startmetioninresten (1) og ender med den sure regionen (EDDDDDDD; aminosyrer 37-44 i h2).

Fig. 10 viser kryssbinding av sur eller basisk FGF til reseptorer i cellene transfektert med FGF reseptor cDNA'er. L6-celler (5×10^5) transfektert med cFGFR/pSV7d-ekspresjonskonstruksjonen (sporene 1, 2, 7 og 8), h2FGFR/pSV7d-ekspresjonskonstruksjonen (sporene 3, 4, 9 og 10), eller med vektorer alene (sporene 5, 6, 11 og 12) ble inkubert med $0,1 \text{ pmol } ^{125}\text{I-aFGF}$ (spor 1-6) eller $^{125}\text{I-bFGF}$ (spor 7-12) i nærvær eller fravær av 200-ganger overskudd av aFGF (spor 2, 4 og 6) eller bFGF (spor 8, 10 og 12). Binding ble utført i 30 minutter ved 37°C . Cellene ble så vasket to ganger med iskald DME som inneholder $20 \text{ mM HEPES pH } 7,4$, $0,2\%$ gelatin, og to ganger med iskald PBS. Disuksinimidylsüberat (DSS) ble tilsatt den endelige konsentrasjon på $0,15 \text{ mM}$ og kryssbinding ble tillatt å foregå i 15 minutter ved 4°C . Prøvene ble resuspendert i prøvebuffer og SDS PAGE ble utført, fulgt av autoradiografi.

Fig. 11 illustrerer sur og basisk FGF utløst $^{45}\text{Ca}^{++}$ effluks fra Xenopus-oocytter som blir injisert med RNA som koder for en kylling FGF-reseptor eller h2 human FGF-reseptor. Fremstillingene viser $^{45}\text{Ca}^{++}$ -effluks for oocytter som blir injisert med kylling FGF-reseptor RNA (A og C, åpne bokser), human h2 RNA (B og D, åpne bokser), human h3 RNA (B og D, utfylte triangler) eller vann (A-D, utfylte firkanter). Injiserte oocytter ble inkubert med $^{45}\text{CaCl}_2$ i 3 timer ved 19°C og så vasket grundig. Grupper på 5 oocytter ble plassert i individuelle brønner på en 24 brønnplate og $0,5 \text{ ml}$ medium ble

tilsatt. Etter 10 minutters intervaller ble mediet fjernet for telling og friskt medium påsatt. Etter 40 minutter ble en aFGF (panel A og B) eller pFGF (panel C og D) tilsatt til en endelig konsentrasjon på 0,5 nM. Som en positiv kontroll ble karbakol tilsatt etter 100 minutter. Hvert resultatpunkt representerer gjennomsnittet av tre brønner.

DETALJERT BESKRIVELSE AV DEN FORETRUKNE UTFØRELSESFORM

I HENHOLD TIL FØLGENDE OPPSETT:

I Generell beskrivelse

- A. FGF-R
 - 1. Strukturelle egenskaper
 - a. Ekstracellulært område
 - i signalsekvens
 - ii Ig-områder
 - iii sur aminosyreregion
 - b. Transmembransegment
 - c. Intracellulært område
 - i tyrosinkinase
 - ii innskudd
 - 2. Funksjon
 - a. Binde FGF
 - b. Binde til FGF-R-peptid
 - c. Tyrosinkinaseaktivitet
- B. Fysiologiske funksjoner
 - 1. Cellulær
 - 2. Vevsdifferensiering
 - 3. I organisme

II Polypeptider

- A. Løselige former
- B. Trunkerte (forkortete) former
- C. Fusjonsproteiner
- D. Genetiske varianter (setespesifikk mutagenese)
- E. Sammensetninger som omfatter proteiner

III Nukleinsyrer

- A. Isolerte nukleinsyrer
- B. Rekombinante nukleinsyrer
- C. Sammensetninger som omfatter nukleinsyrer

IV Fremgangsmåter for å lage FGF-R

- A. Proteinrensing
 - 1. Affinitet med derivatisert FGF
 - 2. Forskjellige ligander, samme reseptor
- B. Ekspresjon av nukleinsyrer

V Antistoffer

- VI Fremgangsmåter for anvendelse
 - A. Diagnostiske
 - B. Terapeutiske

* * * * *

I Generell beskrivelse

En første side av oppfinnelsen gir homogene FGF-R-peptider. Disse homogene FGF-R'ene inkluderer en kylling basisfibroblast-vekstfaktorreseptor og forskjellige humane fibroblast-vekstfaktorreseptorer. Homogene polypeptider er beskrevet som enten har FGF-R ligandbindende aktivitet eller omfatter en del av det ligandbindende område til en FGF-R. Det bør bemerkes at den foreliggende oppfinnelse gir homogene polypeptider som korresponderer til naturlig forekommende FGF-bindende proteiner med uventete strukturelle egenskaper. Én klasse omfatter løselige proteiner som mangler et transmembransegment. En annen klasse omfatter proteiner som har både et transmembransegment og et tyrosinkinaseområde. Begge disse klassene har et uventet ekstracellulært strukturområde kortere enn den korresponderende kylling FGF-R. Eksperimentelle data er også beskrevet som tyder på at en enkelt reseptor binder forskjellige FGF-typer.

En annen side av oppfinnelsen omfatter isolerte DNA-sekvenser. Disse sekvensene koder for polypeptider som har en FGF-R ligandbindingsaktivitet, inkludert polypeptider som korresponderer til naturlig forekommende full-lengde fibroblastvekstfaktorreseptorer. DNA-sekvensene som koder for en kylling bFGF-R eller koder for forskjellige humane FGF-R'er (hFGF-R) har blitt isolert. Også omtalt er kloning og ekspresjonshjelpemidler som inneholder de FGF-R-kodende sekvensene. En DNA-sekvens som koder for fullengde FGF-reseptor eller et FGF-R-polypeptidfragment kan ble operativt bundet til kontrollsekvenser og uttrykt i en kultur av transformerte, transfekterte eller infiserte forenlige vertsceller.

Fremgangsmåter for å syntetisere vekstfaktor-reseptor-proteiner og fremgangsmåter for å gi analoger til fibroblastvekstfaktorreseptorene blir beskrevet.

Det beskrives også antistoffer til definerte områder av reseptoren. Ytterligere sider som omhandles inkluderer fremgangsmåter for å evaluere sammensetninger som er agonistiske eller antagonistiske overfor ligand og reseptor interaksjoner, spesielt de som fremmer eller hemmer bindingsreaksjoner.

Diagnostiske og terapeutiske anvendelser for forbindelsene gitt her blir også beskrevet.

A. FGF-reseptorer

Fibroblast-vekstfaktorreseptorene (FGF-R) er reseptorer for familien av fibroblast-vekstfaktorer (FGF'er), som beskrevet ovenfor. Se også P.L. Lee et al., Science 245:57-60 (1989), som er herved inntatt som referanse.

FGF-familien består av polypeptid vekstfaktorer som er karakterisert ved aminosyre sekvenshomologi, heparin-bindingsaktivitet, evnen til å fremme angiogenese, og mitogen aktivitet overfor celler av epitelial, mesenchymal og neural opprinnelse. FGF-familien omfatter sur FGF, basisk FGF, int-2 genproduktet, hst genproduktet (Kaposi sarkoma-FGF), FGF-5, keratinocyt vekstfaktor, og FGF-6. Medlemmer av FGF-familien synes å ha roller i utvikling, vevsreparasjon, vedlikehold av neuroner og patogenesen av sykdom. Unormal produksjon av FGF'er kan forårsake celletransformasjon ved hjelp av en autokrin (egenpåvirknings) mekanisme. Videre kan FGF'er fremme tumorvekst og invasivitet ved å stimulere blodkarvekst inn i svulsten eller ved å lage proteaser slik som plasminogenaktivator.

Betegnelsen "ligand" refererer seg til molekylene, vanligvis medlemmer av fibroblast-vekstfaktorfamilien, som binder områdene innblandet i vekstfaktorbindingen. Også, en ligand er et molekyl som tjener enten som en naturlig ligand til hvilken reseptoren binder, eller en funksjonell analog som tjener som en agonist eller antagonist.

Som beskrevet her er en kylling bFGF-reseptor karakterisert ved hjelp av forskjellige identifiserbare strukturelle egenskaper. Kylling og human FGF-R-strukturer kan

generelt defineres som en strukturrelatert nomenklatur som kan anvendes overfor andre FGF-R'er. Generelle beskrivelser av proteinstruktur og dets forhold til nukleinsyresekvenser er diskutert i J.D. Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, 4. utg., vol. 1 og 2, Benjamin/Cummings, Menlo Park, California (1987); og B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 2. utg., Garland, New York (1989), hver av disse er inntatt her ved som referanse. Felles strukturelle egenskaper til kjente FGF-R'er er beskrevet, inklusive forskjellige naturlig forekommende løselige humane FGF bindingsproteiner. En human fibroblast-vekstfaktorreseptor er protein som stammer enten fra et naturlig humant FGF-R-gen, eller som deler betydelige strukturelle egenskaper som er karakteristisk for en naturlig forekommende human reseptor for FGF.

Det isolerte full-lengde kylling FGF-R mRNA inneholder et enkelt hydrofobt segment som likner på et membran-omfattende segment (betegnet transmembransegmentet). Segmentene til FGF-R amino-proksimalt for transmembransegmentet er betegnet det ekstracellulære området, mens segmentene karboksy-proksimalt for transmembransegmentet er betegnet det intracellulære området. Fra aminoenden har det ekstracellulære området en NH₂-terminal antatt hydrofob signalsekvens, en immunglobulin-liknende region (betegnet IgI), et annet immunglobulin-liknende område (betegnet IgII), og et tredje immunglobulin-liknende område (betegnet IgIII). Skjønt forskjellige strukturelle egenskaper kan bli identifisert i den ytre del av FGF-R, er den viktigste funksjonelle egenskapen som definerer området binding til reseptorligandene, f.eks. medlemmer av FGF-familien. Som diskutert nedenfor er denne funksjon korrelert til den kombinerte tilstedeværelse av IgII- og IgIII-områdene.

Det intracellulære området er karakterisert av nærvær av et delt tyrosinkinase strukturelt område og, i kyllingreseptoren, er omtrent 424 rester langt. Funksjonelt er dette området definert ved sin tyrosinkinaseaktivitet, som blir typisk påvirket av ligandbinding til det ekstracellulære området. Et protein mangler i det vesentlige et intracellulært

område når det mangler et typisk intracellulært område, spesielt når det mangler et tyrosinkinaseområde.

Ved siden av kyllingreseptoren har fire spesifikke humane cDNA-kloner blitt identifisert. Disse koder for tidlige ukjente FGF reseptorvarianter som inneholder bare to Ig-liknende områder. To av de humane klonene koder for membranomfattende reseptorer og to koder for antatte utskilte former. Både formene som viser 3 Ig-liknende eller 2 Ig-liknende områdestrukturer formidler biologisk respons overfor sur og basisk FGF. Således, det første Ig-området av de tre Ig-områdene kan ha en funksjon forskjellig fra binding av sur og basisk FGF. De multiple humane reseptorformene er identiske i noen områder, men er sterkt divergerende i andre utvalgte områder av den ekstracellulære regionen. To av de humane reseptorene, h4 og h5, koder sannsynligvis for en utskilt form av FGF-reseptoren.

En typisk FGF-R nukleinsyresekvens koder for en overgangs NH_2 -terminal hydrofob sekvens, som blir vanligvis spaltet under translokasjonsprosessen. Den klassiske funksjonen til en signalsekvens er å dirigere den nye polypeptidkjeden til membranbundne ribosomer, og leder derved til membran translokasjon. Imidlertid, signalsekvensen blir typisk fjernet i translokasjonsprosessen, signalsekvensen er fraværende i et modent polypeptid.

Ig-liknende regioner (Ig-domener) ble karakterisert av tre hovedegenskaper: (i) nærværet av to karakteristiske cysteinrester i hvert område; (ii) nærværet av en konsensus tryptofanrest 11 til 12 aminosyrer på den COOH-terminale side av den første cysteinresten i hver Ig-liknende domene; og (iii) nærværet av konsensussekvensen, DXGXYXC, på den NH_2 -terminale side av den andre cysteinresten. Den siste egenskapen er modifisert i tilfellene med løselige reseptorproteiner, og erstattet med en tilsvarende størrelsessekvens.

Ytterligere egenskaper som er karakteristiske for Ig-områdene er tydelige både når det gjelder sammenlikning av områdene med hverandre og ved sammenlikning av homologe

områder i forskjellige reseptormolekyler. Amino-proksimal Ig-område funnet i kyllingklonen ble betegnet IgI. Som kyllingklonen har tre Ig-områder, er områdene blitt nummerert fra aminoenden. Som vist i fig. 6, inkluderer Ig-området de 45 aminosyrene som blir flankert av to cysteinrester. Kylling IgI-området har en høy sekvenshomologi med IgI-området funnet i den genomiske sekvensen til human FGF-R. Imidlertid, den humane formen synes å mangle et område som korresponderer til IgI.

Det neste Ig-området er betegnet IgII, og i kyllingreseptoren omfatter 51 aminosyrer mellom de to cysteinrestene (se fig. 3 og 6). Som beskrevet nedenfor er dette område, sammen med IgIII-området, viktig for ligandbinding. Polypeptidsekvenshomologi i dette området mellom kylling og menneskereseptorene er ganske høy, slik som vist i sekvenssammenstillingen i fig. 7. Det vil bemerkes at de humane reseptorene mangler et IgI-område, men har IgII- og IgIII-områder. Cysteinrestene som er benyttet for å klarlegge dette området er restene 176, 89, 87, 89 og 87 på den amino-proksimale side, og 228, 141, 139, 141 og 139 på den karboksy-proksimale side for henholdsvis kylling, h2, h3, h4 og h5 reseptorene.

Det tredje Ig-området er betegnet IgIII og i kyllingreseptoren omfatter 63 aminosyrer mellom de to cysteinrestene. Se fig. 3 og 6. Igjen, skjønt de humane reseptorene bare har to områder, korresponderer områdene til IgII og IgIII. I både kylling og de humane formene er IgIII-området nærmest til transmembransegmentet. Cysteinrestene for henholdsvis kylling, h2, h3, h4 og h5-reseptorene, benyttet for å påvise dette området, er restene 274, 187, 185, 187 og 185 på den amino-proksimale side og restene 339, 252, 250, 253 og 251 på den karboksy-proksimale side.

De h4- og h5-løselige reseptorene har et substituert terminalt segment betegnet IgIIIT. Dette segment er et substituert terminalt segment som erstatter del av membranen bundet til IgIII og er 79 aminosyrer langt. Denne sekvensen korresponderer til aminosyrene henholdsvis 224 og 222 i h4 og

h5, mens mange av egenskapene som er funnet i IgIII-området bortsett fra DSGSYSC er bevart. Det burde imidlertid bemerkes at IgIIIT-sekvensen er konserverv mellom de løselige formene i det humane FGF-R.

Mellom de første og andre immunliknende områdene har FGF-reseptorene (vist for den basiske FGF-R, men den samme FGF-R binder både de sure og basiske FGF'er) en egenskap som ikke er funnet i andre medlemmer av immunoglobulin superfamilien. Det er en serie av 8 etterfølgende sure rester (EDDDDEDD i kyllingtilfellet og EDDDDDDD i det humane tilfellet) etterfulgt av 3 serinrester og 2 ytterligere sure rester (fig. 3 og 7). Skjønt ikke avbrutte strekninger på 7 til 35 sure rester er blitt beskrevet for flere intracellulære proteiner, spesielt nukleære proteiner, er slike sure regioner uvanlige i den ekstracellulære regionen av transmembrane reseptorproteiner.

De 5 reseptortypene (f.eks. kylling, h2, h3, h4 og h5-formene) viser også variasjon på et bestemt sted mellom den konserverte sure regionen og det konserverte andre Ig-liknende området (IgII). h2 og h4 reseptorformene inneholder 2 aminosyrer (ArgMet) i posisjonene 59 og 60, mens kyllingreseptoren inneholder en enkel aminosyre (Asn) i denne posisjon og h3 og h5 reseptorformene inneholder ingen tilsvarende aminosyrer i denne posisjon (se stjerne, fig. 8).

En annen uvanlig egenskap er lengden av juxtamembranregionen, regionen mellom det membranomfattende segment og kinaseområdet. Denne region er vanligvis konservert blant reseptortyrosinkinasene. F.eks., juxtamembranregionen er vanligvis 49 til 51 rester i lengde i reseptorene for PDGF, CSF-1, epidermal vekstfaktor (EGF), humant epidermal vekstfaktor-2 (HER2) og insulin. FGF-reseptorene med et intracellulært område har en uvanlig lang juxtamembranregion på omtrent 87 rester.

De cytoplasmatiske regionene til aminosyresekvensen er henholdsvis omtrent 424 og 425 rester lange for kylling- og menneskeformene. Disse inneholder også en tyrosin kinasesekvens (henholdsvis omkring restene 482 til 759, 395

til 672, og 393 til 670 for hylling-, h2- og h3-formene). Totalt sett deler kinaseregionen til bFGF-reseptorene størst sekvensidentitet (omtrent 51-53%) med PDGF og CSF-1-reseptorene. bFGF-reseptorene inneholder GXGXXG-motivet og den konserverte lysinresten (omtrent rest 512) som danner del av adenosin 5'-trifosfat (ATP) bindingssete i tyrosinkinase. bFGF-reseptorene inneholder også de to karakteristiske tyrosin kinasemotivene, HRDLAARNVL og DFGLAR, og en tyrosin (omkring restene 651, 564 og 562) i stillingen som er analog til hovedfosforyleringssetet til pp60^{V-src} (omkring Tyr 416).

Den kinasekodende sekvensen til bFGF-reseptorene, definert ut i fra homologi til andre tyrosinkinaser, er spaltet ved en innsetting av 14 aminosyrer. Lengden til innsettingen i kinaseregionen er kortere enn den som er funnet i reseptorene for PDGF og SCF-1 (henholdsvis 104 og 70 aminosyrer) og er lik lengden til den innsatte sekvensen i reseptorene for insulin og insulinliknende vekstfaktor-I.

FGF-R synes å ha tre forskjellige biologiske funksjoner. Den første er binding av ligander, vanligvis FGF-proteiner eller deres analoger. Disse ligandene eller analogene kan også tjene som enten agonister eller antagonister. Ligand bindingssetet er tilsynelatende i det ekstracellulære området. Reseptoren overfører et signal som svar på ligandbinding, og resultatet er en ligandendret aktivitet. Siden den sannsynlige ligand er en FGF, vil signalet vanligvis bli FGF-påvirket.

En annen biologisk aktivitet omfatter cysteinkinase enzymaktiviteten. Denne aktivitet er typisk stimulert som svar på ligandbinding. Imidlertid, siden reseptorene synes å fungere i en dimertilstand, kan intrakjedebindingsreaksjoner bli betraktet å være en annen biologisk aktivitet som kan bli formidlet ved hjelp av blokkerende forbindelser. Dette kan tjene som en ytterligere hjelpemiddel for å endre FGF-formidling av spesielle aktiviteter.

B. Fysiologiske konsekvenser

Interaksjonene til FGF'er overfor deres reseptorer forårsaker forandringer i, en spesiell celletype,

cellemorfologi og celletransformasjon, celleproliferasjon, celledifferensiering, cellealdring, heparinfølsomhet og heparineffekter. In vivo-effektene til FGF omfatter, i spesielle organismer, endring av en rekke aktiviteter, f.eks. regenerering av lemmer, liseregenerering, angiogene virkninger på både normale og svulstceller, sårtilheling, fettcelledifferensiering, og vekst av forskjellige neural- og myoblastceller. FGF'er viser også potente angiogene aktiviteter. Det er tenkt at den angiogene aktiviteten til FGF'er skyldes i det vesentlige de kjemotaktiske og mytogene virkninger til disse faktorer på endotelceller. I tillegg er det vist at etterfølgende produksjon av FGF'er øker cellulær transformasjon (omforming) i transfekterte celler, hvilket antyder at autokrine eller parakrine (nabocelle) stimulering av FGF'er kan være innblandet i svulstdannelse. Disse ulike cellulære og fysiologiske virkningene overskygger den sentrale viktighet til disse reseptor-ligand-interaksjonene.

Forandringene og de celler som omfattes av den kan bli benyttet for diagnostiske formål og for å studere og behandle sykdom forbundet med FGF-reseptorer. Celler som uttrykker kloningshjelpemidler som inneholder definerte sekvenser kan bli benyttet for å definere spesifikke seter på en FGF-reseptor som er nødvendig for å utføre en spesiell aktivitet.

Alternativt kan disse cellene være nyttige for å bedømme evnen til en utvalgt reseptor til å binde forskjellige ligander (FGF'er og analoger) og derved gi et kraftig verktøy for å evaluere virkningen til legemidler for å fremme eller hemme spesifikke FGF-utløste cellulære svar.

Celler som er transfektert, injisert, infektert eller elektroporert med DNA eller mRNA som inneholder en full lengde naturlig FGF-R-sekvens vil ofte uttrykke den naturlige eller villtypereseptor og svare etter dette. Spesifikke konsentrasjoner av en renset reseptor eller et reseptor polypeptidfragment kan bli benyttet for å blokkere bindingen av liganden (FGF) til normale FGF-reseptorer. Alternativt kan antistoffer mot reseptoren eller fragment ha den samme virkningen.

Homogene og definerte polypeptider og DNA-sekvenser vil være nyttige for å utvikle antistoffer. Spesielt vil antistoffer mot spesifikke områder av reseptoren, f.eks. ligand-bindende område, være nyttig for diagnostisk testing. Reagensene FGF-R, FGF-R-polypeptider og antistoffer overfor spesifikke områder av reseptoren kan bli benyttet for å studere regulering av FGF-formidlete aktiviteter. F.eks. skulle FGF-agonister stimulere blodkarutvikling, en effekt som er spesielt nyttig i sårtilheling og i vekst av kolaterale (nabobeliggende) blodkar i iskjemiske (blodfattige) områder i hjertet. FGF-antagonister kunne finne anvendelse i å forhindre unormal angiogenese slik man ser det i diabetisk retinopati (netthinnesykdom) og reumatoid artritt (leddgikt) eller ved å kontrollere svulster ved å blokkere celledeling eller åreutvikling i en svulst.

II Polypeptider

Denne oppfinnelse omfatter fremstilling av fibroblast-vekstfaktor-reseptorpolypeptider og proteiner som har FGF-R-ligandbindende aktivitet. Reseptorene omfatter FGF reseptoraminosyresekvenser slik som aminosyresekvensene til en kylling bFGF-R og human FGF-R-former som vist i fig. 3, 4 og 7. Også inkludert er homologe sekvenser, allele variasjoner, naturlige mutanter, induserte mutanter, alternativt produserte varianter og proteiner som blir kodet for av DNA som hybridiserer under høy eller lav stringente betingelser, til FGF-reseptor som koder for nukleinsyrer som stammer fra naturlig forekommende materialer. Nært beslektet FGF-reseptorer påvist ved hjelp av antisera mot FGF-reseptorer er også inkludert.

Symbolene for aminosyrerestene er vist i tabell I.

Tabell I

Forkortelse for aminosyrerestene

A, Ala; G, Gly; M, Met; R, Ser;
C, Cys; H, His; N, Asn; T, Thr;

D, Asp; I, Ile; P, Pro; V, Val;
E, Glu; K, Lys; Q, Gln; W, Trp;
F, Phe; L, Leu; R, Arg; Y, Tyr;
X, enhver aminosyre, og Z, terminering.

Forskjellige nye humane FGF-reseptorer er blitt klonet og karakterisert, som beskrevet videre under. Av spesiell betydning har forskjellige kortere former (h2 og h3) og løselige versjoner (h4 og h5) av FGF-reseptorer blitt oppdaget. De løselige proteiner (f.eks. former som mangler et transmembransegment) som besitter FGF bindingskapasitet indikerer at kortere former vil finne terapeutiske og/eller diagnostiske anvendelser.

Det er typisk at fibroblast-vekstfaktorreseptorpeptidene vil vise minst 85% homologi med de naturlig forekommende reseptorene i IgII- og IgIII-områdene, vanligvis minst rundt 90% homologi, og det er å foretrekke minst omkring 95% homologi.

Spesielt er ligand bindingsfunksjonen lokalisert til det ekstracellulære området, og de løselige formene beholder denne spesielle funksjonen. Løselige fragmenter av FGF-reseptorer skulle være anvendbare i å erstatte eller påvirke funksjonene til de naturlig løselige variantene. Alternativt kan de løselige formene påvirke dimerisering av FGF-reseptorene, siden reseptorene kan normalt være i en dimer form. Reseptor-dimerisering kan være viktig for riktig fysiologisk signaloverføring.

De humane reseptorene som besitter et transmembransegment er uvanlig i å ha bare IgII og IgIII av de tre Ig-områdene. Fraværet av IgI-området indikerer at visse funksjoner kan være fraværende i den humane reseptor, eller, mer sannsynlig, at IgI-området er unødvendig i den humane reseptoren. Resultater vist nedenfor viser at IgI-området er ikke essensiell for ligandbinding.

Som benyttet her, beskriver betegnelsen i det vesentlig ren og homogen et protein som er blitt atskilt fra komponenter som naturlig følger det. Typisk, et monomert protein er i det

vesentlige rent når det er minst omtrent 60-75% av prøven som viser en enkel polypeptidbakgrunn. Mindre varianter eller kjemiske modifikasjoner deler typisk den samme polypeptidsekvensen. Et i det vesentlige rent protein vil typisk omfatte omtrent 85-90% av en proteinprøve, vanligvis minst omtrent 95%, og fortrinnsvis over omtrent 99% renhet. Vanligvis blir renhet målt på polyakrylamidgel, med homogenitet bestemt ved farging. For visse formål vil høy oppløsning bli benyttet og HPLC eller liknende hjelpemidler benyttet for opprensing. For de fleste formål vil en enkel kromatografisøyle eller polyakrylamidgel bli benyttet for å bestemme renhet.

Et protein er i det vesentlige fritt for naturlig ledsagende komponenter når det er atskilt fra de naturlige forurensningene som følger det i sin naturlige tilstand. Således, et protein som er kjemisk syntetisert eller syntetisert i et cellulært system, forskjellig fra cellen som det normalt stammer fra vil være i det vesentlige fritt for naturlig forekommende komponenter. Betegnelsen er benyttet for å beskrive reseptorer og nukleinsyrer som er blitt syntetisert i heterologe pattedyrceller eller planteceller, E.coli og andre prokaryoter.

Et polypeptid er i det vesentlige i en helt membranbundet form av FGF-R når det i det vesentlige er et full-lengde peptid som korresponderer til eller er sterkt homolog til en naturlig forekommende membranbundet form av FGF-R.

Hvorvidt løselige eller membranbundet, omfatter den foreliggende oppfinnelse i det vesentlige rene preparater. Forskjellige fremgangsmåter for deres isolering fra biologisk materiale kan bli benyttet, basert delvis på strukturelle og funksjonelle beskrivelser som er inkludert her.

FGF reseptorpeptidene inklusive kylling og human FGF-reseptorer kan bli rensset ved bruk av fremgangsmåter ifølge klassisk proteinkjemi, se nedenfor. F.eks., et lektin affinitetskromatografitrinn kan bli benyttet, etterfulgt av høyt spesifikt ligand affinitetskromatografi-fremgangsmåte som benytter FGF konjugert til biotin gjennom cysteinrestene av

FGF. Renset FGF-R reseptorene kan også bli oppnådd ved hjelp av en fremgangsmåte slik som FGF affinitetskromatografi med bruk av aktivert CH-sefaroze koblet til FGF gjennom primære aminogrupper som beskrevet i Imamura, supra. Denne fremgangsmåte kan imidlertid, selvom den resulterer i et rensset protein, ikke gi en tilstrekkelig mengde for videre arbeid av rensset protein (dvs. mer enn nanograms mengder).

Avhengig av tilgjengeligheten av spesifikke antistoffer, som gitt heri, kan spesifikke FGF-reseptorer også bli rensset ved bruk av immunoaffinitetskromatografi. Antistoffer som er laget, som beskrevet nedenfor, kan bli immobilisert til en inert substans for å lage høyspesifikk affinitetssøyle. Se Harlow og Lane under.

Ved å vise til eksempel, men ikke uttrykk for begrensning, kan en renseprosedyre bli benyttet som tar fordel av det faktum at merket biotin-bFGF binder med høy affinitet til reseptorer i celler som inneholder store mengder av disse reseptorene. 125 I-merket biotin-bFGF vil binde til bFGF-reseptorer i Swiss 3T3-celler og kan bli kryssbundet til reseptorproteinet.

Forskjellige celle- eller vevskilder kan bli valgt som startmaterialer vanligvis valgt på grunn av en overflod av ønsket reseptor. Kyllingembryo (dag 6, stadium 29-30) blir foretrukket fordi de inneholder relativt store mengder av reseptorprotein som bestemt ved høy-affinitetsbinding av human- og bovin-bFGF. Embryoekstrakter kan først bli fraksjonert på hvetekimagglutinin (WGA) Sepharose 4B og de delvis rensede bFGF-reseptorene blir så bundet til biotin-bFGF. Reseptor-ligandkomplekset kan bli bundet til en avidin-agarose på grunn av høyaffinitets interaksjon mellom biotin- og avidindelene. Avidin-agarose-søylene kan bli eluert med forbindelser som dissosierer FGF fra sin reseptor, slik som suramin eller SDS. Kyllingprotein som binder til avidin-agarose i en FGF-avhengig prosess vandret ifølge den forventete størrelsen (130 kDa) på bFGF-reseptoren. Se fig. 2B.

For å bestemme aminosyresekvensen eller for å oppnå

polypeptidfragmenter i reseptoren, kan reseptoren bli fordøyet med trypsin. Peptidfragmenter kan bli atskilt ved revers fase høyoppløselighets væskrokromatografi (HPLC) og analysert ved gassfase-sekvensering. Andre sekvenseringsfremgangsmåter kjent i feltet kan også bli benyttet.

FGF-reseptorene eller de spesifikke ytre regionene av reseptorene kan bli benyttet til affinitetsrensing av de enkelte FGF'er. Den ytre regionen som omfatter ligandbindende område av kylling bFGF'er vist i fig. 3 går fra omtrent aminosyre 22 til omtrent aminosyre 374. Ligandbindende område til human FGF-R vist i fig. 4 går fra omtrent aminosyre 22 til omtrent aminosyre 285. Ligandbindende område varierer med forskjellige FGF-reseptorer og kan være et eller annet sted fra 5% til 100% av det nødvendige området. Minimumsmengde proteinsekvens nødvendig for ligandbinding kan bli bestemt ved hjelp av å fjerne forskjellige segmenter i det ekstracellulære området og undersøke ligandbinding til den gjenværende sekvensen. Studier av ligand-reseptorinteraksjon indikerer at minst ligandbindings-regionen som er lokalisert i den ekstracellulære region av reseptoren, er påkrevet. Som benyttet i denne søknad, betyr FGF-reseptor eller FGF-R-ligandbindings-aktivitet at den har evnen til å binde en fibroblast vekstfaktor eller andre spesifikke ligander. Vanligvis vil disse ligandene være medlemmer av FGF-familien. Derfor har den ytre regionen anvendelse i å etablere FGF-agonister eller antagonister.

Det er også sannsynlig at FGF-R, likesom mange andre vekstfaktorreseptorer, blir funnet naturlig i en multimer proteinkompleks, mest sannsynlig i dimer form. Således, andre viktige områder i en reseptor vil være de, enten ekstracellulært eller på annen måte, som er involvert i dimerisering.

De ekstracellulære områdene til reseptorene (f.eks. med start ved omtrent aminosyre 396 via COOH-terminus for kylling bFGF-R og aminosyre 307 via COOH-enden for det humane FGF-R vist i fig. 3 og 4, kan også bli benyttet som enzymet med tyrosin kinaseaktivitet. bek-genet har 84% aminosyresekvens-

identitet til den analoge regionen (tyrosinkinase-region) i kylling bFGF-R. flg har 99% homologi med forskjellige sekvenser i den humane FGF-reseptoren beskrevet i fig. 4.

En signal- eller ledesequens dirigerer et protein gjennom membranen til cellen. Signalsequensene til reseptorene kan bli benyttet sammen med deres respektive reseptorer, men kan også bli benyttet med andre proteiner (f.eks. aminosyre omkring 1 til 21 i den N-terminale sekvensen omfatter lederen eller signalsequensen til kylling bFGF-R vist i fig. 3 og den humane FGF-R vist i fig. 4).

Den foreliggende oppfinnelse gir også analoger av fibroblast-vekstfaktorreseptor polypeptidene. Slike analoger inkluderer både modifikasjoner av en polypeptid bakgrunn og varianter og mutanter av polypeptidene. Modifikasjonene inkluderer kjemisk derivering av polypeptidene, slik som acetylering, karboksylering og liknende. De inkluderer også glykosyleringsmodifikasjoner og spaltingsvarianter av et typisk polypeptid. Disse prosesseringstrinnene inkluderer spesifikt enzymatiske modifikasjoner slik som ubikinisering. Se f.eks. Hershko og Ciechanover (1982, "Mechanisms of Intracellular Protein Breakdown", *Ann. Rev. Bioch.*, 51:335-364.

Andre analoger inkluderer genetiske varianter, både naturlige og utviklete. Utviklete mutanter kan bli oppnådd ved hjelp av forskjellige fremgangsmåter inklusive både tilfeldig mutagenese av kodende nukleinsyre ved bruk av stråling eller under påvirkning av EMS, eller kan ta form av målrettede forandringer ved hjelp av sete-spesifikk mutagenese eller andre teknikker i moderne molekylærbiologi. Se Sambrook, Fritsch og Maniatis (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2. utg.), CSH Press.

Ved siden av hovedsakelig full-lengde polypeptider, gir den foreliggende oppfinnelse biologisk aktive fragmenter av polypeptidene. Betydelige biologiske aktiviteter inkluderer ligandbinding, immunologisk aktivitet og andre biologiske aktiviteter som er karakteristiske for fibroblastvekstfaktorreseptorpolypeptidene. Immunologiske aktiviteter inkluderer

både immunogen funksjon i et målimmunsystem, såvel som å dele immunologiske epitoper for binding, hvilket tjener som enten et kompetitor (konkurrent) eller erstatte antigen for en fibroblastvekstfaktor reseptorepitop. Som benyttet her, vil betegnelsen segment, som benyttet for et polypeptid, være vanligvis minst omtrent 15 sammenhengende aminosyrer, typisk minst omtrent 7 sammenhengende aminosyrer, mer typisk minst omkring 9 sammenhengende aminosyrer, vanligvis minst omkring 11 sammenhengende aminosyrer, fortrinnsvis minst omkring 13 sammenhengende aminosyrer, og mer fortrinnsvis minst omkring 16 sammenhengende aminosyrer, og enda mer ønskelig minst omkring 20-30 eller flere sammenhengende aminosyrer. Segmenter av et spesielt område vil være segmenter av passende størrelse innenfor den korresponderende regionen.

F.eks. kan ligandbindende- eller andre områder være "forbyttet" mellom forskjellige nye fusjonspolypeptider eller fragmenter. Således, nye kimære polypeptider som viser nye kombinasjoner med hensyn til spesifisiteter resulterer fra den funksjonelle koblingen mellom ligandbindende spesifisiteter og intracellulære områder. F.eks. kan Ig-områdene bli erstattet ved Ig-områder fra andre beslektete polypeptider.

For immunologiske formål kan immunogener bli laget som er repeterte tandem polypeptidsegmenter, og derved lage høyt antigene proteiner. Alternativt vil slike polypeptider tjene som sterkt effektive kompetitorer for spesifikk binding. Produksjon av antistoffer mot fibroblastvekstfaktor-reseptorpolypeptider er beskrevet nedenfor.

Det fremstilles også andre polypeptider som omfatter fragmenter av fibroblast-vekstfaktorreseptorer. Således, fusjonspolypeptidet mellom reseptorene og andre homologe eller heterologe proteiner blir gitt. Homologe polypeptider kan være fusjoner mellom forskjellige vekstfaktorreseptorer, hvilket resulterer i, f.eks., et hybridprotein som viser ligand-spesifisitet av én reseptor og den intracellulære region av en annen, eller en reseptor som kan ha utvidet eller redusert spesifisitet med hensyn til binding. På samme måte kan heterologe fusjoner bli laget som kunne vise en kombinasjon av

egenskaper eller aktiviteter fra de avledete proteinene. Typiske eksempler er fusjoner av et markørpolypeptid, f.eks. luciferase, med en region av en reseptor, f.eks. en ligand-bindende region, slik at nærværet eller lokaliseringen av en ønsket ligand kan bli lett å bestemme. Se f.eks. Dull et al., US-patent nr. 4 859 609, som er herved inntatt som referanse. Andre genfusjonspartnere inkluderer bakterie- β -galaktosidase, trpE protein A, β -laktamase, alfa-amylase, alkoholdehydrogenase og gjær-alfa-"mating factor" ("parringsfaktor"). Se f.eks. Godowski et al., (1988), Science 241:812-816; og Eksperimentell del under.

Fusjonsproteiner vil typisk bli laget ved hjelp av enten rekombinant nukleinsyrefremgangsmåter eller ved syntetiske polypeptidfremgangsmåter. Teknikker for nukleinsyre-manipulering er beskrevet generelt, f.eks. i Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2. utg.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, som er inntatt herved som referanse. Teknikker for syntese av polypeptider er beskrevet f.eks. i Merrifield, J. Amer. Chem. Soc., 85:2149-2156 (1963). De rekombinante nukleinsyresekvensene benyttet for å lage fusjonsproteiner i den foreliggende oppfinnelse kan stamme fra naturlige eller syntetiske sekvenser. Mange naturlige gensekvenser er oppnådd fra forskjellige cDNA eller fra genomiske bibliotek ved bruk av passende prober. Se GenBank, National Institutes of Health. Typiske prober for fibroblast-vekstfaktorreseptorer kan bli valgt fra sekvensene i fig. 3, 4 eller 9 ifølge standard fremgangsmåte. Passende syntetiske DNA-fragmenter kan bli laget ved hjelp av fosforamiditt-fremgangsmåten beskrevet av Beaucage og Carruthers, Tetra. Letts., 22:1859-1862 (1981). Et dobbeltkjedet fragment kan så bli laget enten ved å syntetisert den komplementære tråden og binde tråden sammen under passende betingelser, eller ved å tilsette en komplementær tråd med bruk av DNA-polymerase med en passende primersekvens.

III Nukleinsyrer

Den foreliggende oppfinnelse gir nukleinsyresekvenser som

koder for forskjellige FGF-reseptorsekvenser beskrevet ovenfor.

Fig. 3, 4 og 7 viser henholdsvis de korresponderende cDNA-sekvensene som koder for kylling og humane FGF-reseptorer.

I fig. 3 vist i kylling bFGF-R, er peptidene som er sekvensert fra rensset protein understreket, inklusive NH₂-proksimalsekvensene fra aminosyrer 35-53 (ala---arg), 56-67 (leu---arg), og 139-158 (glu---lys). Transmembransekvensen er vist ved hjelp av en mørk strek, en spesifikk aminosyreregion er streket under, cysteinrestene er sirklet rundt, potensielle N-bundne glykosyleringssteder er vist ved en prikk, og de prikkete linjene under indikerer den sannsynlige hydrofobe signalsekvensen. Aminosyresekvensen inkluderer en leserammeriktig stoppkodon (omkring rest -12), etterfulgt av et startmetionin. Den strukturelle sekvensen begynner ved omtrent aminosyre 22.

I fig. 4 som viser den humane FGF-R, er metioninet i kodon ATG tilstede omtrent ved nukleotid 529 som den første aminosyre i FGF-R-genet. F.eks., aminosyre 22 i reseptoren beskrevet i fig. 4 er en argininrest (R) lokalisert to aminosyrer fra venstre, to linjer opp fra bunnen mellom "589" og "630" på side 1 i fig. 4.

Nukleinsyren ifølge den foreliggende oppfinnelse vil ha en sekvens som enten stammer fra naturlig menneske, kylling eller annen FGF-R-gen eller som har vesentlig homologi med naturlig FGF-R-gen eller en del av dette.

Vesentlig homologi i nukleinsyresammenheng betyr enten at segmentene, eller deres komplementære kjeder, når de blir optimalt satt sammen og sammenliknet, er identisk med passende nukleotidinnsettinger eller delesjoner, i minst 80% av restene, vanligvis minst omtrent 90%, mer vanlig minst omkring 95%, fortrinnsvis minst omkring 97%, og enda mer å foretrekke minst omkrin 98-99,5% av nukleotidene. Alternativt eksisterer vesentlig homologi når segmentene vil hybridisere under selektive hybridiseringsbetingelser, til en kjede, eller sin komplementære, ved vanligvis å benytte en sekvens som stammer

fra fig. 3, 4 eller 9. Selektivitet med hensyn til hybridisering eksisterer når hybridisering opptrer, hvilket er mer selektiv enn total mangel på spesifisitet. Det er typisk at selektiv hybridisering vil opptre når det er minst omtrent 55% homologi over et område på omtrent 14/25 nukleotider, fortrinnsvis minst omtrent 65%, enda mer å foretrekke minst omtrent 75%, og mest ønskelig ved minst 90%. Se Kanehisa, M. (1984), *Nucleic Acids Res.* 12:203-213, som er inntatt her som referanse. Stringente hybridiseringsbetingelser vil typisk inkludere saltkonsentrasjoner på mindre enn omkring 1 M, mer vanlig mindre enn omkring 500 mM og fortrinnsvis mindre enn omkring 200 mM.

Temperaturbetingelsene vil være typisk større enn 20°C, men vanligvis større enn omtrent 30°C og fortrinnsvis over omtrent 37°C. Som andre faktorer kan i betydelig grad påvirke stringensen for hybridisering, inklusive, blant annet, basesammensetning og størrelse på de komplementære kjedene, tilstedeværelsen av organiske løsningsmidler og grad av base feiltilpasning, kombinasjonen av parametre er viktigere enn den absolutte innflytelse av én.

En isolert nukleinsyre er én som har blitt i det vesentlige rensset fra andre sekvenser som vanligvis følger det, f.eks. andre cellulære nukleinsyresekvenser. Vanligvis refererer betegnelsen seg til et fragment i et genom som har blitt selektivt klonet, isolert og rensset i vesentlig grad.

Prober kan bli laget basert på sekvensen til FGF reseptor cDNA'ene gitt i fig. 3, 4 og 9. Probene vil inkludere en isolert nukleinsyre bundet til en markør eller rapportmolekyl og kan bli benyttet for å isolere andre FGF-reseptor nukleinsyresekvenser ved hjelp av standard fremgangsmåter. Se f.eks. J. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, vol. 1-3, CSH Press, N.Y. (1989), som er herved inntatt som referanse. Andre liknende nukleinsyrer kan bli utvalgt ved å bruke homologe nukleinsyrer. Alternativt kan nukleinsyrer som koder for de samme eller liknende reseptorpolypeptider bli syntetisert eller valgt ved å gjøre bruk av degenerasjonen i den genetiske koden. Forskjellige

kodonerstatninger kan bli innført, f.eks. stumme forandringer som produserer forskjellige restriksjonsseter, eller for å optimalisere ekspresjon av et bestemt system. Mutasjoner kan bli innført for å modifisere egenskapen til reseptorene, kanskje for å forandre ligandbindings-aktivitetene, interkjede-affinitetene eller polypeptid-degradering eller "turnover" hastighet.

DNA-sammensetningen i denne oppfinnelsen kan bli oppnådd fra genomisk DNA eller cDNA, laget ved hjelp av syntese eller kan bli et hybrid av de forskjellige kombinasjonene. Rekombinante nukleinsyrer som omfatter sekvenser som på annen måte ikke forekommer naturlig er også gitt i denne oppfinnelse. En isolert DNA-sekvens inkluderer enhver sekvens som er blitt oppnådd ved primer- eller hybridiseringsreaksjoner eller som følge av behandling med restriksjonsenzymer eller liknende.

Syntetiske oligonukleotider kan bli laget ved hjelp av triestermetoden ifølge Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc., 103:3185 (1981) eller ved hjelp av andre metoder slik som kommersiell automatisk nukleotidsyntese. Oligonukleotidene kan bli merket ved overskudd polynukleotidkinase (f.eks. omkring 10 enheter til 0,1 nmol substrat blir benyttet sammen med 50 mM Tris, pH 7,6, 5 mM ditiotreititol, 10 mM MgCl₂, 1-2 mM ATP, 1,7 pmol ³²P-ATP (2,9 mCi/mmol) 0,1 mM spermidin, 0,1 mM EDTA). Prober kan også bli laget ved nick-translasjon, Klenow utfyllingsreaksjon eller andre fremgangsmåter kjent i feltet.

cDNA eller genomisk bibliotek av forskjellig type kan bli undersøkt. Valget av cDNA-bibliotek korresponderer normalt til en vevskilde som er rikelig med hensyn på mRNA for de ønskete reseptorene. Fagbibliotek blir normalt foretrukket, men plasmid-bibliotek kan også bli benyttet. F.eks., en keratinocyt celledenomisk eller cDNA-bibliotek ville bli foretrukket for å isolere og klonere en keratinocyt vekstfaktorreseptor. Embryonale eller placentale bibliotek kan bli benyttet for int-2, FGF-5 og hst-reseptorer og et endotel-cellebibliotek blir foretrukket for sure FGF-reseptorer. Kloner av et bibliotek blir spredd ut på skåler, overført til

et substrat for undersøkelse, denaturert og undersøkt for nærvær av ønskete sekvenser.

F.eks., med en plaque hybridiseringsfremgangsmåte, blir hver skål som inneholder bakteriofage plakk replikert til duplikate nitrocellulosefilterpapirer (Millipore-HATF). Fag-DNA blir denaturert med en buffer slik som 500 mM NaOH, 1,5 M NaCl i omtrent 1 minutt og nøytralisert med f.eks. 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5, 1,5 M NaCl (3 ganger i 10 minutter hver). Filtrene blir så vasket. Etter tørring blir filtrene typisk bakt, f.eks. i 2 timer ved 80°C i en vakuumovn. De duplikate filtrene blir prehybridisert ved 42°C i 4-24 timer med 10 ml pr. filter DNA hybridiseringsbuffer (20-50% formamid, 5X SSC, pH 7,0, 5X Denhardts løsning (polyvinylpyrrolidon, pluss Ficoll og bovint serumalbumin; 1X = 0,02% av hver), 50 mM natriumfosfatbuffer pH 7,0, 0,2% SDS og 50 µg/ml denaturert laksespermie-DNA.

Hybridisering med passende probe kan bli utført ved 42°C i 16 timer med 10 ml/filter av 1×10^6 cpm/ml DNA hybridiseringsbuffer som inneholder merket probe. Den endelige konsentrasjon av formamid blir variert ifølge lengden av proben og grad av stringens ønsket. Se f.eks. J.G. Wetmur ad Davidson, J. Mol. Biol. 31:349-370 (1968); og M. Kanehisa, Nuc. Acids Res. 12:203-213 (1984), hver av disse er inntatt herved som referanse, for en diskusjon av hybridiseringsbetingelser og sekvenshomologi.

En oligonukleotidprobe basert på aminosyresekvensen til de to tryptiske peptidene av den rensede kylling bFGF-R ble benyttet for å undersøke en kyllingembryo (dag 6) cDNA-bibliotek under lavstringente betingelser. Sekvenser som korresponderte til TVALGSNVEFVCK og VYSDPQPHIQWLK, laget ved bruk av kommersiell automatisert oligonukleotidsyntese (Applied Biosystems) ble benyttet for å oppnå kylling bFGF reseptorklon beskrevet i fig. 3. Denne klon, eller sekvenser avledet fra den, kan bli benyttet for å isolere bFGF-R i andre arter såvel som andre FGF-R i et målart.

Probene beskrevet ovenfor som ble benyttet for å isolere kylling bFGF-R ble også benyttet for å isolere en human bFGF-

reseptor cDNA-klon.

Enhver isolert DNA-sekvens som koder for en FGF-R komplett strukturell sekvens kan bli benyttet som probe. Alternativt kan enhver DNA-sekvens som koder for en FGF-R hydrofob signalsekvens og dens translasjonsstartsete bli benyttet. Enhver isolert delvis DNA-sekvens som koder for en FGF-R-aktivitet (f.eks. ligandbinding eller FGF-R-binding) som beskrevet i kravene blir også del av denne oppfinnelsen. Foretrukne prober er cDNA-kloner for hver isolert FGF-reseptor.

DNA-sekvensene benyttet i denne oppfinnelse vil vanligvis omfatte minst omtrent 5 kodon (15 nukleotider), mer vanlig minst omtrent 7 kodon, typisk minst omtrent 10 kodon, fortrinnsvis minst omtrent 15 kodon, mer å foretrekke minst omtrent 25 kodon og mest ønskelig minst omtrent 35 kodon. Én eller flere introner kan også være tilstede. Dette antall nukleotider er vanligvis omtrent minimumslengden som er krevet for en suksessfull probe som vil hybridisere spesifikk med en FGF-reseptor. F.eks., epitoper som er karakteristiske for en FGF-R kan bli kodet for i korte peptider. Vanligvis vil villtypesekvensen bli benyttet, i noen tilfeller vil én eller flere mutasjoner bli innført, slik som delesjoner, substitusjoner, innsettinger eller endringer (invasjoner), som resulterer i forandring i aminosyresekvensen for å gi stumme mutasjoner, for å modifisere et restriksjonssete, eller for å gi spesifikke mutasjoner. Den genomiske sekvensen vil vanligvis ikke gå over omtrent 200 kb, vanligvis vil den ikke gå over omtrent 100 kb, fortrinnsvis ikke større enn 0,5 kb.

Deler av DNA-sekvensen vil bli foretrukket som prober der man har minst omtrent 15 nukleotider, vanligvis minst omtrent 15 nukleotider, og mindre enn omtrent 6 kd, vanligvis omkring 1,0 kb, fra en DNA-sekvens som koder for en FGF-reseptor. Probene kan også bli benyttet for å bestemme hvorvidt mRNA som koder for en spesifikk FGF-R er tilstede i en celle eller forskjellige vev.

De naturlige eller syntetiske DNA-fragmentene som koder for et ønsket fibroblast-vekstfaktorreseptorfragment vil bli

tatt inn i DNA-konstruksjonene som er istand til å bli ført inn i og bli uttrykt i en in vitro cellekultur. Vanligvis vil DNA-konstruksjonen være passende for replikasjon i en éncellet vert slik som gjær eller bakterier, men kan også bli ment for å føre inn i, med og uten og integrasjon inn i genomet, dyrkede pattedyr eller planter eller andre eukaryote cellelinjer. DNA-konstruksjoner som er laget for innføring i bakterier eller gjær vil inkludere typisk et replikasjonssystem som er gjenkjent av verten, det ønskete DNA-fragmentet koder for det ønskete reseptor polypeptidet, transkripsjon og translasjonsstart regulatoriske sekvenser som er operativt bundet til polypeptidkodende segment og transkripsjons- og translasjonsavslutningsregulatoriske sekvenser operativt bundet til polypeptidkodende segment. Transkripsjonsregulerende sekvenser vil typisk inkludere en heterolog enhancer eller promotor som blir gjenkjent av verten. Seleksjon av en passende promotor vil avhenge av verten, men promotorer slik som trp, lac og fag promotorer, tRNA promotorer og glykolytiske enzympromotorer er kjent. Se Sambrook et al. (1989). Passende tilgjengelige ekspresjonsvektorer som inkluderer replikasjonssystem og transkripsjons- og translasjonsregulatoriske sekvenser sammen med innsettingssetet for fibroblastvekstfaktor-reseptor DNA-sekvens kan bli benyttet. Eksempler på fungerende kombinasjoner av cellelinjer og ekspresjonsvektorer er beskrevet i Sambrook et al. (1989); se også Metzger et al. (1988), Nature 334:31-36.

Ekspresjonsvektorer for disse celler kan inkludere ekspresjons kontrollsekvenser, slik som en origo (start) for replikasjon, en promotor, en enhancer og nødvendige prosesseringsinformasjonsseter, slik som ribosombindingssete, RNA spleiseseter, polyadenyleringsseter, og transkripsjons-terminatorsekvenser. Det er å foretrekke at enhancerene eller promotorene vil være de som er naturlig forbundet med gener som koder for fibroblast-vekstfaktorreseptorene, skjønt det vil bli forstått at i mange tilfeller vil andre være likeverdige eller mer passende. Andre foretrukne

ekspresjonskontrollsekvenser er enhancere eller promotorer som stammer fra virus, slik som SV40, adenovirus, bovin papillomavirus og liknende.

På liknende måte er foretrukne promotorer de som er funnet naturlig i immunoglobulinproduserende celler (se US-patent nr. 4 663 281, som er inntatt her som referanse), men SV40, polyomavirus, cytomegalovirus (human eller gnager) og LTR fra forskjellige retrovirus (slik som gnager leukemivirus, gnager eller Rous sarcoma-virus og HIV) kan bli benyttet, såvel som promotorer som er naturlige for FGF-R-genene. Se *Enhancers and Eukaryotic Gene Expression*, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 1983, som er tatt inn her som referanse.

Vektorer som inneholder DNA-segmentene av interesse (f.eks. fibroblastvekstfaktor-reseptorgen eller cDNA-sekvens eller deler av dette) kan bli overført inn i vertsceller ved velkjente fremgangsmåter, som kan variere avhengig av typen av cellevert. F.eks., kalsiumkloridtransfeksjon blir vanligvis benyttet for prokaryote celler, mens kalsiumfosfatbehandling kan bli benyttet for andre cellulære verter. Se generelt, Sambrook et al. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2. utg.), CSH Press (1989), som er inntatt her som referanse. Betegnelsen "transformert celle" er ment å inkludere også forstadiet til en transformert celle.

Slik som med rensede polypeptider, er nukleinsyresegmenter som er forbundet med ligand-bindingssegmentet, den ekstracellulære delen og den intracellulære regionen spesielt anvendbare. Disse gensegmentene vil bli benyttet som prober for å undersøke nye gener som viser liknende biologiske aktiviteter, skjønt kontrollelementene i disse genene kan også være av viktighet.

IV Fremgangsmåter for å lage FGF-reseptorer

DNA-sekvenser kan også bli benyttet for å uttrykke polypeptider som viser eller hemmer FGF-reseptoraktivitet. F.eks., en DNA-sekvens på omkring 21 nukleotider (omtrent 7 aminosyrer) til omtrent 2,1 kb (omtrent 700 aminosyrer) kan bli benyttet for å uttrykke et polypeptid som har en FGF

reseptorspesifikk aktivitet, typisk ligandbinding.

Store mengder av reseptorproteiner kan bli laget ved å uttrykke hele reseptoren eller deler av reseptoren som en del av ekspresjonshjelpemidler i forenlige verter slik som *E. coli*, gjær, pattedyrceller, insektsceller eller froskeocytter. Ekspresjonsmidlene kan bli satt inn i celler ved å benytte fremgangsmåter som er kjent i feltet, slik som kalsiumfosfat-presipitering (diskutert nedenfor), lipofeksjon, elektroporering eller DEAE dekstran.

Vanligvis vil pattedyrcellevertene være udødeliggjorte cellelinjer. For å studere egenskapene til en FGF-R og dens korresponderende vekstfaktor, vil det være nyttig å transfektere, osv. pattedyrceller som mangler eller har lave nivåer av en FGF-reseptor hvor signalsekvensen dirigerer peptidet inn i cellemembranen. Celler uten nevneverdige FGF-reseptorer inkluderer lymfocytter, myocytter, grønne ape COS-7-celler og kinesiske hamster ovarieceller (CHO). Transformerte eller transfekterte, osv., celler koder for en reseptor som er funksjonelt lik en villtype reseptor og overfører en FGF-følsom mitogen egenskap til cellen. Slike celler vil sette en istand til å analysere bindingsegenskapene til forskjellige naturlige FGF'er. Transfektete celler kan også bli benyttet for å vurdere en sammensetning eller legemiddels effektivitet som en FGF-antagonist eller agonist. Nivået av reseptor tyrosinkinase-aktivitet eller hastigheten av nukleinsyresyntese kan bli bestemt ved å behandle transfektete celler med legemidler og sammenlikne effektene til FGF'er eller deres analoger på legemiddel-behandlede celler sammenliknet med kontrollene. Skjønt de mest vanlige prokaryote celler benyttet som verter er stammer av *E. coli*, kan andre prokaryoter slik som *Bacillus subtilis* eller *Pseudomonas* også bli benyttet. DNA-sekvensen til oppfinnelsen, inklusive fragmenter eller deler av sekvensen som koder for en fullstendig reseptor, en del av reseptoren eller et polypeptid som har en FGF-R-aktivitet kan bli benyttet for å lage et ekspresjonshjelpemiddel eller konstruksjon for en FGF-R eller polypeptid som har en FGF-R-aktivitet. Vanligvis vil

kontrollsekvensen være en eukaryot promotor for produksjon i en pattedyrcelle. I noen bærere kan reseptorens egne kontrollsekvenser også bli benyttet. En vanlig prokaryot plasmidvektor for å transformere E. coli er pBR322 eller dets derivat (f.eks. plasmidet pkt279 (Clontech)) (Bolavar et al., *Gene*, 2:95 (1977)). De prokaryote vektorer kan også inneholde prokaryote promotorer for transkripsjonsstart, valgfritt sammen med en operatør. Eksempler på de mest vanlige brukte prokaryote promotorer inkluderer beta-laktamase (penicillinase) og laktose (lac) promoter (Cheng et al., *Nature*, 198:1056 (1977)), tryptofanpromotoren (trp) (Goeddell et al., *Nucleic Acid Res.*, 8:457 (1980)), P_L-promotoren og N-gen ribosom bindingssetet (Shimatake et al., *Nature*, 292:128 (1981)).

Promotorer benyttet sammen med gjær kan være promotorer som stammer fra enolasegenet (Holland et al., *J. Biol. Chem.*, 256:1385 (1981)) eller promotoren for syntese av glykolytiske enzymer slik som 3-fosfoglyceratkinase (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*, 255 (1980)).

Passende ikke-naturlige pattedyr-promotorer kan inkludere de tidlige og sene promotorene fra SV40 (Fiers et al., *Nature*, 273:113 (1978)) eller promotorer som stammer fra murin molony leukemivirus, mus brystsvulstvirus, fuglesarkomavirus, adenovirus II, bovin papillomavirus eller polyoma. I tillegg kan konstruksjonen bli knyttet til et gen som kan formeres (f.eks. DHFR) slik at multiple kopier av FGF-reseptorgenet kan bli laget.

Prokaryoter kan bli transformert ved hjelp av forskjellige fremgangsmåter, inklusive ved bruk av kalsiumklorid (Cohen, S.N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:2110 (1972)) eller RbCl-metoden (Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press 1982)). Gjær kan bli transformert ved bruk av en fremgangsmåte beskrevet av Van Solingen et al., *J. Bacter.*, 130:946 (1977) og C.L. Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3829 (1979). Med hensyn til eukaryoter, kan pattedyrceller bli transfektert ved bruk av en kalsiumfosfat-presipitasjons-

fremgangsmåte beskrevet av Graham og van der Eb, *Virology*, 52:546 (1978), eller ved lipofektin (BRL) eller retroviral infeksjon (E. Gilboa, *Experimental Manipulation of Gene Expression*, kap. 9, Academic Press s. 175 (1983)). De aktuelle ekspresjonsvektorene som inneholder passende sekvenser kan bli laget ifølge standard fremgangsmåter som omfatter sammenbinding og bruk av restriksjonszymer (se f.eks. Maniatis supra.). Kommersielt tilgjengelige restriksjonszymer for å spalte spesifikke seter av DNA kan bli oppnådd fra New England BioLabs, Waltham, Massachusetts.

Kloner som er valgt ved å bruke markører avhenger av sammensetningen av vektorkonstruksjonen. Markøren kan være på det samme eller forskjellige DNA-molekyl, fortrinnsvis det samme DNA-molekylet. Med pattedyrceller kan reseptorgenet selv være den beste markør. I prokaryote verter kan transformanten bli valgt ved hjelp av motstand overfor ampicillin, tetracyclin eller andre antibiotika. Produksjon av et spesielt produkt basert på temperaturfølsomhet kan også tjene som en passende markør. Forskjellige fremgangsmåter kan bli benyttet for å høste og rense FGF-R reseptorproteinet eller peptidfragmentet. Peptidet kan bli isolert fra et lysat av verten. Peptidet kan bli isolert fra celledsupernatanten hvis peptidet blir skilt ut. FGF-R-peptidet blir så videre rensset som diskutert ovenfor ved bruk av HPLC, elektroforese, affinitetskromatografi (fortrinnsvis immunaffinitet eller ligandaffinitet).

En annen fremgangsmåte som kan bli benyttet for å isolere cDNA-kloner av FGF-R-relaterte arter omfatter bruken av polymerase kjedereaksjon (PCR). (Saiki, R.K. et al., *Science* 230:1350 (1985)). I denne fremgangsmåte blir to oligonukleotider (27mers) som korresponderer til bestemte regioner av FGF-R-sekvensen syntetisert og så benyttet i PCR-reaksjonen for å forsterke (opplage) reseptor-beslektete mRNA-transkripter fra en mRNA-kilde. Binding av oligonukleotidene og PCR reaksjonsbetingelser blir utført under forhold med redusert stringens som beskrevet nedenfor i eksempel 2. De resulterende opplagde fragmentene blir subklonet, og de

resulterende rekombinante koloniene undersøkt med ^{32}P -merket full-lengde FGF-R cDNA ved å bruke både høy- og lavstringensbetingelser (se eksempler 2 og 3). Kloner som hybridiserer under lave, men ikke høye stringensbetingelser representerer FGF-R-beslektete mRNA-transkripter. I tillegg kan denne fremgangsmåte bli benyttet for å isolere variant FGF-R cDNA-typer som oppstår som et resultat av alternativ splicing, se Frohman, M.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8998 (1988).

V Antistoffer

Polyklonale og/eller monoklonale antistoffer mot de forskjellige FGF-reseptorene og peptidfragmentene kan også bli laget. Betegnelsen antistoff blir benyttet både for å referere til en homogen molekylær enhet eller en blanding, slik som et serumprodukt laget av en rekke forskjellige molekylarter. Peptidfragmentene kan bli laget syntetisk i en peptid syntesemaskin og koblet til et bæremolekyl (f.eks. "keyhole limpet" hemocyanin) og injisert i kaniner i løpet av flere måneder. Kaninsera blir undersøkt for immunreaktivitet mot FGF-reseptorproteinet eller fragmentet. Monoklonale antistoffer kan bli laget ved å injisere mus med FGF-R-protein, FGF-R-polypeptider eller museceller som lager store mengder av den klonete FGF-reseptoren på sin celleoverflate. Monoklonale antistoffer vil bli undersøkt ved hjelp av ELISA og testet for spesifikk immunreaktivitet med FGF-reseptorproteinet eller polypeptider av dette. Se E. Harlow og D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Laboratories (1988), som er her tatt inn som referanse. Disse antistoffene vil være nyttige i teknikker og som farmasøytiske forbindelser.

Når en tilstrekkelig mengde av det ønskete fibroblastvekstfaktor-polypeptid er blitt oppnådd, kan proteinet bli benyttet for forskjellige formål. En typisk bruk er produksjon av antistoffer som er spesifikke for binding til disse reseptorene. Disse antistoffene kan være enten polyklonale eller monoklonale og kan bli laget ved in vitro eller in vivo

fremgangsmåter.

For å produsere polyklonale antistoffer blir en passende modell for immunsystem valgt, typisk en mus eller kanin. Det vesentlig rensede antigen blir presentert for immunsystemet på en måte som er bestemt av fremgangsmåter som passer dyret og andre parametre vel kjente av immunologer. Typiske seter for injeksjon er i fotsålene, intramuskulært, intraperitonealt eller intradermalt. Selvfølgelig, kan andre arter erstatte mus eller kanin.

Et immunologisk svar blir vanligvis undersøkt med immunassay. Normalt omfatter slike immunassays en viss rensing av antigenkilden, f.eks. laget av de samme cellene og på samme måte som antigenet ble produsert. Immunassayet kan være en radioimmunassay, et enzytbundet assay (ELISA), et fluorescent assay, eller et av flere andre valg, mange av disse er funksjonelt likeverdige, men kan vise fordeler under spesifikke betingelser.

Monoklonale antistoffer med affiniteter på 10^8 M^{-1} , fortrinnsvis 10^9 til 10^{10} , eller sterkere vil typisk være laget ved hjelp av standard fremgangsmåter som beskrevet f.eks. i Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Laboratory (1988); eller Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2.utg.) Academic Press, New York (1986), som er her tatt inn som referanse. I korthet vil passende dyr bli valgt og den ønskete immuniseringsprotokoll fulgt. Etter den passende tidsperiode blir miltene til slike dyr tatt ut og individuelle miltceller fusjonert, typisk til udødeliggjorte myelomceller under passende valgte betingelser. Deretter blir cellene separert i kloner og supernatanten av hver klon undersøkt for produksjon av et passende antistoff som er spesifikk for den ønskete antigenregion.

Andre passende fremgangsmåter omfatter in vitro eksponering av lymfocytter til antigenpolypeptidene eller alternativ til valg av bibliotek av antistoffer i fag eller liknende vektorer. Se Huse et al., "Generation of a Large Combinatorial Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda", *Science* 246:1275-1281 (1989), som herved er

inntatt som referanse. Polypeptidene og antistoffene i den foreliggende oppfinnelse kan bli benyttet med eller uten modifisering. Ofte vil polypeptidene og antistoffene bli merket ved hjelp av sammenbinding, enten kovalent eller ikke-kovalent, til en forbindelse som gir et målbart signal. En lang rekke markører og konjugeringsfremgangsmåter er kjent og beskrevet utførlig i både den vitenskapelige og patentlitteraturen. Passende markører inkluderer radionuklider, enzymer, substrater, kofaktorer, inhibitorer, fluorescerende forbindelser, kjemiluminescensforbindelser, magnetiske partikler og liknende. Patenter, som omtaler bruken av slike markører, inkluderer US-patentene nr. 3 817 837; 3 850 752; 3 939 350; 3 996 345; 4 277 437; 4 275 149 og 4 366 241. Også rekombinante immunglobuliner kan bli laget, se Cabilly, US-patent nr. 4 816 567.

VIII Anvendelsesmåter

Den foreliggende beskrivelsen omtaler en fibroblast-vekstfaktorreseptor (FGF-R) rensefremgangsmåte, såvel som en fremgangsmåte for å lage FGF-reseptorer i cellene. Også homogene reseptorer laget ved hjelp av disse fremgangsmåtene blir omtalt, og nukleinsyresekvensene som koder for reseptorene eller deler av reseptorene, såvel som ekspresjonshjelpemidlene som inneholder disse sekvensene, celler som omfatter FGF-reseptorer og antistoffer mot reseptorene. Av spesiell interesse er de løselige formene av reseptorene, som har bindings seter som kan konkurrere med reseptorer med hensyn til å binde FGF.

Imidlertid, som nevnt ovenfor, fungerer FGF-R sannsynligvis i en dimer tilstand. De løselige formene til reseptoren kan påvirke dimeriseringen og kan være effektiv i å hindre signaloverføringen ved hjelp av forskjellige mekanismer med tanke på konkurrerende affinitet for FGF-ligandene. De løselige, eller intracellulære eller transmembranfragmentene til de forskjellige reseptorformene er ventet å påvirke dimerdannelsen og kan således tjene til å blokkere minst noen typer av, eller noen deler av signaloverføringen.

Denne observasjonen gir en fremgangsmåte for å modifisere in vivo en fibroblast-vekstfaktorreseptor utløst aktivitet som omfatter tilførsel til en pasient av en mengde av en fibroblast-vekstfaktorreseptor blokkerende forbindelse som er effektiv med tanke på å hemme fibroblast-vekstfaktorbinding til fibroblast-vekstfaktorreseptorer. Som diskutert ovenfor, har FGF-familien av proteiner en betydelig rolle i å regulere mange viktige fysiologiske prosesser. De løselige FGF-R polypeptidene kan være effektive i å modifisere omfanget av FGF-påvirkningen av disse prosessene. Av denne grunn kan de løselige formene av reseptorene finne anvendelse som konkurrerende bindingssteder for FGF. På samme måte kan trunkerte (forkortete) FGF-bindingssteder eller bindingssteder som er blitt mutert, særlig de fra menneske beskrevet her, være like effektive med tanke på denne effekten og til redusert kostnad, både i forhold til økonomi og i forhold til medisinske bivirkninger etter tilførsel.

Reagensene beskrevet her vil også finne anvendelse i diagnose i enten FGF-produksjon eller FGF-R-produksjon. Forskjellige medisinske tilstander er karakterisert av en unormal høy produksjon av en av disse proteinene, inklusive f.eks. Kaposi sarkoma, som lager Kaposi FGF, og diabetisk retinopati. Således blir diagnostiske anvendelser som bygger på disse reagensene nå tilgjengelige.

Med de forskjellige FGF-typene er det sannsynlig at forskjellige former av reseptorer har variasjoner med hensyn til affiniteter for forskjellige ligander. Med genene og proteinene i den foreliggende oppfinnelse, vil forskjeller mellom ulike reseptortyper bli funnet. Således, vevsmarkører skulle bli tilgjengelige.

Siden tumorvekst også er avhengig av mikrokarseng, kan tilførsel av FGF-R tjene for å hindre dette og resultere i undertrykkelse av svulstvekst. Ved å hindre FGF-aktivering kan den foreliggende oppfinnelse være viktig tilskudd til antall forbindelser for å bekjempe svulstvekst.

Virusinfeksjoner kan også være avhengig av binding til spesielle reseptorer med tanke på infeksjonsprosessen. Det er

antydte holdepunkter at HSV (Herpes simplex-virus) infiserer ved å binde til FGF-R-proteiner. Således, tilførsel av terapeutisk effektive mengder av FGF-R-løselige former eller fragmenter kan tjene som en profylaktisk hjelp til å minimalisere smitterisikoen for denne eller andre virus, som gjør bruk av denne mekanismen for celleinfeksjon. Igjen kan beskyttelsesmekanismen avhengig av konkurrerende binding, spalting av dimer struktur, av en kombinasjon, eller andre mekanismer.

Mengde reagenser som er nødvendig for effektiv behandling vil avhenge av mange faktorer, inklusive tilførselsmåter, målsted, fysiologisk tilstand av pasienten, og andre medisiner som blir tilført. Således skulle en titrere behandlingsdosen i spesielle betingelser. Typisk vil doser som blir gitt *in vitro* gi nyttig ledelse med hensyn til mengder som er anvendbare for lokal tilførsel av disse reagensene. Dyretesting med hensyn på behandlingsdose ved spesielle sykdommer vil gi videre prediktive holdepunkter for menneskedosering. Forskjellige betraktninger er beskrevet i Gilman et al., Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7. utg., MacMillan, New York (1985), som er herved inntatt som referanse. På grunn av den høye affinitetsbinding mellom FGF og dets reseptorer, ville lave doser av disse reagensene være først forventet å være effektive. Således doseområder ville vanligvis bli ventet å være i mengder lavere enn mM-konsentrasjoner, typisk mindre enn omkring 10 μ M-konsentrasjoner, vanligvis mindre enn omkring 100 nM konsentrasjoner, mer vanlig mindre enn omkring 1 nM, fortrinnsvis mindre enn omkring 10 pM (pikomolar), mer å foretrekke mindre enn omkring 100 fM (femtomolar), og mest ønskelig mindre enn omkring 1 fM, med en passende bærer.

Oppfinnelsen vil forstås bedre ved referanse til de følgende illustrerende eksempler.

Eksempel 1

Karakterisering av en bFGF-reseptor

¹²⁵I-merket bFGF ble først reversibelt bundet til Swiss

3T3-celler. Som vist i fig. 1(A), ^{125}I -merket bFGF (2 Ci/ μmol) ble tilført til konfluente 3T3-celler (6 fmol av ^{125}I -merket bFGF pr. 10^5 celler) i nærvær av indikerte konsentrasjoner av: ikke-modifisert bFGF (-X-); biotin-bFGF (fylte firkanter); den ikke-bundne fraksjon etter biotin-bFGF ble inkubert med avidin-agarose (åpen firkant); den ikke-bundne fraksjon etter bFGF ble inkubert med avidin-agarose (åpen trekant). Binding ble utført i 30 min. ved 37°C i kulturmedium (DME H21) som inneholdt 0,2% gelatin, og heparin (15 U/ml). Cellene ble vasket tre ganger med en buffer som inneholdt 20 mM HEPES (pH 7,4), 0,2% gelatin og 150 mM NaCl. Radioaktiviteten som var tilstede ble bestemt i en Beckman gammateller. Maksimal binding (0% hemming) representerer 5700 cpm av spesifikk binding (ikke-spesifikk binding var 600 cpm). Alle bestemmelser ble gjort i triplikat. Rekombinant bFGF (Barr et al., J. Biol. Chem., 263: 16471 (1988)) ble jodert ved bruk av Iodobeads (Pierce). bFGF ble jodert ved bruk av 0,5-1 mCi; av ^{125}I pr. 1 μg FGF, 0,2M NaPi, pH 7,4, 2 Iodobeads og inkubert i 15 minutter ved romtemperatur, stoppet med Na metabisulfitt og overskudd KI. Jodert bFGF ble atskilt fra ikke-reagert fritt jod ved gelfiltrering på en PD 10 søyle ekvilibrert med 0,2M Na-fosfat, pH 7,5, 0,2M NaCl, 0,2% gelatin. bFGF ble biotinylerert ved bruk av jodacetyl-LC-biotin (Pierce) i 4:1 overskudd av cysteinrester i 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) i 5 timer ved 4°C ifølge fremgangsmåten til Yamamoto et al., FEBS Lett. 176:75 (1984). Ikke-reagert biotin ble fjernet ved gelfiltrering med PD 10 søyler som beskrevet ovenfor (Pharmacia). Under rensefremgangsmåten var modifisert bFGF ikke forskjellig fra ikke-modifisert bFGF i sin evne til å hemme bindingen av ^{125}I -merket bFGF til høyaffinitet bFGF-reseptorer i Swiss 3T3-celler og dens evne til å stimulere fosforylering av en 90 kD protein, kjent for å være substrat av bFGF-indusert tyrosinkinaseaktivitet. Se fig. 1(A). Biotinyleringsreaksjonen modifiserte 90-95% av bFGF-molekylene målt som binding til avidin-konjugert agarose.

Som vist i fig. 1(B) ble cellulære in situ bFGF-reseptorer kryssbundet til merket bFGF. ^{125}I -merket biotin-

bFGF eller ^{125}I -merket bFGF (0,1 pmol) ble tilsatt til Swiss 3T3-celler (5×10^5 -celler) i nærvær eller fravær av umerket bFGF som vist. Cellene ble vasket og kryssbundet med 0,15 mM disuksinimidyl-substrat (DSS) (Pierce). Cellene ble så solubilisert, SDS polyakrylamid gelelektroforese (PAGE) ble utført og ^{125}I -merkete proteiner ble påvist ved autoradiografi. ^{125}I -merket biotio-bFGF bandt til bFGF-reseptorer i Swiss 3T3-celler med høyaffinitet (dissosiasjonskonstant lik 1 nM) og ble kryssbundet til et 130 kD-protein som vandret sammen med bFGF-reseptor kryssbundet til ^{125}I -merket bFGF.

Renset kylling bFGF-reseptor ble laget friskt ved homogenisering av 6 dagers kyllingembryo (stadium 29-30) med en Brinkmann polytron; (1500 embryo/batch); (1:1 v/v) i en endelig konsentrasjon på 0,25 M sukrose, 50 mM HEPES (pH 7,5), 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 150 μM natriumortovanadat, 30 mM natriumpyrofosfat, 1 mM fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF), aprotinin (20-30 kallikreine internasjonale enheter (KIU)/ml), leupeptin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) og pepstatin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Homogenatet ble sentrifugert ved 17 700 g i 45 minutter ved 4°C. Bunnfallet ble resuspendert i homogeniseringsbuffer (300 ml), og den resulterende suspensjon ble henvist til som membranfraksjonen (Mb). Membranfraksjonen ble så inkuert i 30 min ved 4°C med et likt volum 2x lysisbuffer (1x lysisbuffer består av 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)), 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 50 mM NaF, 150 μM natriumortovanadat, 30 mM natriumpyrofosfat, 1 mM PMSF, aprotinin (20-30 KIU/ml), leupeptid (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) og pepstatin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)), og så sentrifugert ved 31 000 g i 30 min. Supernatanten ble påsatt sats-vis til en 150 ml WGA-Sepharose 4B-søyle, vasket med 300 ml lysisbuffer etterfulgt av 500 ml søylebuffer som inneholdt 20 mM HEPES (pH 7,5), 2 mM EDTA, 10% glycerol, 0,1% Triton X-100, 50 mM NaF, 150 μM natriumortovanadat, 30 mM natriumpyrofosfat, 1 mM PMSF, aprotinin (20-30 KIU/ml), leupeptid (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) og pepstatin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Søylene ble eluert med buffer som inneholdt 0,5 M N-acetylglukosamin. Fraksjoner som inneholdt proteintoppen ble kombinert og lagret ved -70°C.

For å påvise tilstedeværelsen av FGF-R i embryomembranene og WGA-eluat, ble kylling bFGF-reseptoren kryssbundet ved å inkubere 10 μ l av kyllingembryo membranfraksjonen (Mb) eller 100 μ l av eluatet fra WGA-sepharose 4B-søyle med 125 I-merket bFGF (0,1 pmol) i nærvær (+) eller fravær (-) av 200 ganger overskudd av ikke-merket bFGF i 30 min ved 37°C (se fig. 2(A)). DSS ble tilsatt til en konsentrasjon på 0,15 mM, og reaksjonsblandingen ble inkubert i 10 min på is. Prøvene ble undersøkt ved SDS PAGE, etterfulgt av autoradiografi. Spesifikk binding og kryssbinding av 125 I-bFGF til urene kyllingembryo membranfraksjoner viste bare et enkelt proteinbånd på 150 kDa (fig. 2(A)). Etter at molekylmassen til bFGF var subtrahert, ble den avledete størrelse på kylling bFGF-reseptor 130-135 kDa.

Som vist i fig. 2(B) ble to stor-skala ligand affinitetsrensinger utført (hver ved bruk av materialer fra 20 000 embryo). Eluatene fra WGA-Sepharose 4B-søylen ble inkubert med biotin-bFGF laget som beskrevet ovenfor (10:1 molart overskudd av ligand til reseptor) og heparin ved en konsentrasjon på 15 U/ml (for å redusere lavaffinitetsbinding) i 30 min ved 4°C. Blandingen ble så behandlet to ganger gjennom en 10 ml avidin-agarosesøyle (bFGF-agarose). For å bestemme ikke-spesifikk binding av protein til avidin-agarose (kontroll), ble eluatet fra WGA-Sepharose 4B-søylen undersøkt gjennom avidin-agarose i nærvær av biotin-bFGF (kontroll). Søylene ble vasket med 200 ml søylebuffer og benyttet med sefarosesøylen beskrevet ovenfor i nærvær av 0,2 M NaCl etterfulgt av søylebuffer uten NaCl (300 ml) og så eluert med 10 mM suramin i søylebuffer. Fire etterfølgende 10 ml fraksjoner ble samlet (frak. 1-4), og prøvene fra hver fraksjon ble undersøkt ved hjelp av SDS PAGE og farget med sølvnitrat. Som vist i fig. 2(B) bandt bare et enkelt proteinbånd til avidin-agarose på en FGF-avhengig måte, og den vandret med forventet størrelse (130 kDa) som bFGF-reseptoren.

De eluerte proteinene ble separert ved akrylamid gelelektroforese og farget med Coomassie-blått. Båndet som korresponderte til bFGF-reseptoren ble skåret ut og proteinet

elektroeluert ifølge fremgangsmåten til M.W. Hunkapiller et al., Meth. In Enzymol., 91:227 (1983). Denne fremgangsmåte resulterte i opprensing av 2-5 ng ren FGF-reseptor pr. kyllingembryo med en total gjenvinning på 5%.

For å karakterisere videre reseptoren, ble proteinet fordøyd med trypsin. Peptidfragmenter ble isolert ved revers-fase høyopløselig væskkromatografi (HPLC) og analysert ved hjelp av gassfase-sekvensering som beskrevet i Yarden et al., supra. Fra to uavhengige preparater ble aminosyresekvensene til 14 peptider, som vist i fig. 3, oppnådd. 3 av peptidene var felles for begge preparasjonene, hvilket indikerte identitet mellom to uavhengige isolater. 4 av de typiske peptidene (LILGKPLGEGCFGQVVLA, IADFGLAR, MAPEALFDR og IYTHQSDVWSFGV, se tabell I og fig. 3) var homologe til konsensus (anerkjente) sekvenser for tyrosinkinase-områder (fig. 6). Dette var forenlig med det funn at tyrosinkinase-aktivitet er forbundet med bFGF-reseptor som beskrevet av Huang og Huang, J. Biol. Chem. 261:9568 (1986). Således, det rensede proteinet ble bestemt å være en rensed bFGF-reseptor ved at det bandt bFGF, var av forventet molekylstørrelse og inneholdt tyrosinkinasesekvenser.

Som diskutert ovenfor ble aminosyresekvensene av 11 til de 14 peptidene identifisert i en tidligere publisert sekvens av en delvis cDNA-klon, betegnet flg (fms-liknende gen). Se M. Ruta et al., Oncogene, 3:9 (1988). Den sekvensen ble isolert på basis av sin homologi overfor proto-onkogensekvensen og var ikke tidligere kjent for å kode for en transmembran reseptorprotein.

Eksempel 2

Isolering av en full-lengde kylling bFGF-reseptor cDNA-klon

Et kyllingembryo (dag 6) cDNA-bibliotet ble laget fra størrelses-selektert poly A⁺ mRNA. 200 µg poly A⁺ mRNA ble størrelse-fraksjoner i en 10%-30% sukrosegradient og fraksjoner som inneholdt mRNA større enn eller lik 3,5 Kb ble slått sammen. 5 µg av størrelsefraksjoner mRNA ble benyttet for å lage cDNA ifølge fremgangsmåten til U. Gubler og B.

Hoffman, Gene 25:263 (1983) ved bruk av et cDNA syntesekit fra Pharmacia (kat. nr. 27-9260-01). De syntetiserte cDNA ble størrelses-selektert for cDNA større enn eller lik 2,0 kb, og disse cDNA ble så klonet inn i EcoRI-setet til bakteriofagvektoren ZapII (Stratagene, kat. nr. 236211). Det resulterende cDNA-biblioteket inneholdt 2×10^6 uavhengige rekombinanter.

Biblioteket ble undersøkt med en ^{32}P -merket oligonukleotid-probe som kodet for de to sammenhengende peptidene vist i fig. 3 (TVALGSNVEFVCK og VYSDPQPHIQWLK). Oligonukleotidene ble laget ved bruk av en kommersiell automatisk oligonukleotid syntesemaskin. To 43-45 base-oligonukleotider som inneholdt den 12 baseoverlappende komplementærsekvensen ble sammenbundet og merket ved hjelp av Klenow-utfylling med dNTP'er (-dCTP), ^{32}P -dCTP og DNA-polymerase Klenow-fragment hvilket ga 70 bp merket probe. Filtrene ble hybridisert under lavstringente betingelser (20% formamid, 5x standard saltvanncitrat (SSC) og 5x Denhardts løsning ved 42°C) og vasket med 0,2x SSC ved 42°C. 25 positive kloner ble isolert etterfulgt av tre runder plakk-opprensing. Av de 25 positive klonene hybridiserte 11 med høy stringens til human FGF-R cDNA merket ved hjelp av nick-translasjon og benyttet som en probe (se eksempel 3). Alle de 11 klonene var i hovedsak identisk, bortsett fra lengdevariasjon i 5'-enden av klonene. Aminosyresekvensen til den største klonen (3,2 kb) inneholdt sekvensen til alle 14 reseptorpeptidene som ble oppnådd i proteinrensingen beskrevet ovenfor (se fig. 3) og inneholdt den komplette kodende sekvens til FGF-R. Transmembran-regionen og den hydrofobe signalsekvensen ble identifisert ved hjelp av Kyte og Doolittle hydropatianalyse som beskrevet i Kyte og Doolittle, J. Mol. Biol., 157:105 (1982).

Et enkelt hybridiserende bånd på omkring 3,5 Kb ble identifisert ved å undersøke kyllingembryo poly(A)⁺ RNA (5 µg) med full-lengde kylling bFGF-reseptor cDNA under høystrengente betingelser (50% formamid), 5x Denhardts løsning og 5x SSC ved 42°C. Filtrene ble så vasket med 0,2x SSC ved 65°C. Det 3,5 kb enkle hybridiseringsbånd identifisert ved hjelp av RNA blott-

analyse er vist i fig. 5(A). Primer ekstensjonseksperimenter med et oligonukleotid som var komplementær til en sekvens nær 5'-enden av klonen ble utført. Kyllingembryo poly(A)⁺ RNA (5 µg) ble denaturert med 10 mM metylkvikksølv, bundet til ³²P-merket primer (5' CTGCACGTCATCGCGCA-3') og forlenget med murin Moloney leukemi virus revers transkriptase. (Se fig. 5(B): spor (S) representerer ³²P-merket DNA molekylstørrelsestandarder (1 kb); spor (E) representerer forlenget fragment (523 nukleotider); sporene (G, A, T og C) representerer en 5% akrylamid sekvensgel. Resultatene forutsa at mRNA til reseptoren var 48 nukleotider lenger enn den isolerte klonen.

Aminosyresekvensen til den lengste åpne leseramme (2,4 kb) inkluderte en i-leseramme stoppkodon (aminosyrerest -12) etterfulgt av et startmetionin (rest 1) og hele den reseptorkodende sekvensen (fig. 3). cDNA kodet for et protein med en avledet molekylstørrelse på 91,7 kD som har egenskaper funnet i flere kjente vekstfaktorreseptorer. Det inneholdt en enkeltmembran omfattende region, en NH₂-terminal hydrofob signalsekvens, tre ekstracellulære immunoglobulin-liknende områder og et intracellulært tyrosinkinase-område (fig. 6). 11 potensielle N-bundne glykosyleringssteder ble også funnet. N- og O-bundet glykosylering av kylling bFGF-reseptoren kan forklare ulikheten mellom den observerte størrelsen av bFGF-reseptoren og størrelsen antatt fra cDNA-sekvensen.

Tre immunoglobulin-liknende områder i den sannsynlige ekstracellulære regionen ble identifisert på basis av tre kriterier: (i) nærvær av to karakteristiske cysteinrester i hvert område; (ii) nærværet av en felles tryptofanrest 11 til 12 aminosyrer på COOH-terminal side av den første cysteinresten i hver immunoglobulin-liknende område; og (iii) nærværet av konsensussekvensen, DXGXYXC, på NH₂-terminal side av den andre cysteinresten i hvert immunoglobulin-liknende område. Interleukin-1 (IL-1) reseptoren har også tre immunoglobulin-liknende områder, og bFGF har 25-30% sekvensidentitet til IL-1. Fem immunoglobulin-liknende områder er tilstede i reseptorene for plate-avledet vekstfaktor (PDGF) og koloni-stimulerende faktor-1 (CSF-1).

Mellom de første og andre immunglobulin-liknende områdene har bFGF-reseptoren en egenskap som ikke er funnet i andre medlemmer av immunglobulin superfamilien. Det er en serie av 8 etterfølgende sure rester (EDDDDED) etterfulgt av tre serinrester og to ytterligere sure rester (fig. 3). Skjønt ikke avbrutte strekninger på 7-35 sure rester er blitt beskrevet for flere intracellulære proteiner, spesielt nukleære proteiner, er slike sure områder uvanlige i den ekstracellulære regionen til transmembrane reseptorproteiner.

En annen uvanlig egenskap er lengden på den membrantilgrensende region, dvs. området mellom membranomfattende segment og kinaseområdet. Dette område er vanligvis konserverert blant reseptor tyrosinkinase. F.eks. er den membrannære regionen vanligvis 49-51 rester i lengde i reseptorene for PDGF, CSF-1, epidermal vekstfaktor (EGF), human epidermal vekstfaktor-2 (HER2) og insulin. bFGF-reseptoren har en uvanlig lang membrannær region på omkring 87 rester.

Den cytoplasmatiske region til aminosyresekvensen er omtrent 424 rester lang og inneholder en tyrosin kinase-sekvens (omkring restene 482 til 759). Totalt sett deler kinaseregionen i bFGF-reseptoren størst sekvensidentitet (omtrent 51-53%) med PDGF og CSF-1-reseptorene. bFGF-reseptoren inneholder GXGXXG-motivet og den konserverte lysinresten (omkring rest 512) som danner del av adenosin 5'-trifosfat (ATP) bindingssetet til tyrosinkinase. bFGF-reseptoren inneholder også de to karakteristiske tyrosinkinase-motivene, HRDLAARNVL og DFGLAR, og en tyrosin (omkring rest 651) i posisjonen som svarer til hovedfosforyleringssetet til pp60^{V-SRC} (omkring Tyr 416).

Den kinasekodende sekvensen til pFGF-reseptoren, definert ved hjelp av homologi overfor andre tyrosinkinaser, er atskilt av et innskudd på 14 aminosyrer. Lengden av innskuddet i kinaseregionen er kortere enn det som er funnet i reseptorene til PDGF og CSF-1 (henholdsvis 104 og 70 aminosyrer) og likner lengden til den innsatte sekvensen i reseptorene for insulin og insulin-liknende vekstfaktor-I.

Eksempel 3

Isolering av full-lengde human FGF reseptor cDNA-klon

En human FGF-reseptor cDNA-klon ble isolert fra human endotelcelle cDNA bibliotek som stammer fra E. Sadler (R.D. Ye T-C Wun & J.E. Sadler, J. Biol. Chem., 262:3718-3725 (1987)) ved bruk av den samme oligonukleotidprobe beskrevet i eksempel 2.

Endotelcelle-biblioteket ble hybridisert ved høy stringens med merket probe 1×10^6 cpm/ml (50% formamid, 5x SSC, 5x Denhardts, 10 mM NaPO₄, pH 6,5, 100 µg/ml laksemelke-DNA ved 42°C (16-24 timer) og vasket ved 65°C med 0,2x SSC, 0,1% SDS.

Fra den første undersøkelse av det humane endotelcelle cDNA-bibliotek ble fire kloner identifisert og renset gjennom 3 runder plakk-rensing. cDNA-innskuddene fra 3 av disse klonene ga identiske sekvenser og inneholdt sekvenser som var sterkt homologe til sekvensene av tryptiske fragmenter fra rensede kylling bFGF-R. Aminosyre og nukleinsyresekvensen til den største klonen (omtrent 3,6 kb) er vist i fig. 4. Aminosyrene rundt 1-21 representerer den hydrobofe signalsekvensen, omtrent 22-285 av den ekstracellulære region som inneholder ligang-bindingsområdet, omtrent 286-306 av transmembranområdet og omtrent 307-731 av det cytoplasmatiske området som inneholder tyrosinkinase-regionen. Ved denne fremgangsmåte ble også andre sterkt beslektete humane FGF-reseptorer isolert.

Eksempel 4

Isolering av human aFGF-R cDNA-klon

Human endotelcelle eller placentabibliotek blir undersøkt med full-lengde FGF-R-prober eller prober som inneholder en del av sekvensen til FGF-R. Hybridisering blir utført ved lav stringens og vasket i gradvis høyere stringens. Lav- og høystringensbetingelser beskrevet i eksempler 2 og 3 blir fulgt. Mellom hver økning blir autoradiografi utført. Kloner som er positive gjennom de mest stringente betingelsene er mest relatert til bFGF-reseptorene beskrevet tidligere i

eksempler 2 og 3. Kloner som er positive ved redusert stringens, men ikke lenger er positive ved høystringens-betingelser er fjernere beslektet. Alle beslektete men ikke identiske (til fig. 4) kloner blir undersøkt ved hjelp av restriksjonskartlegging og DNA-sekvensering. Alle beslektete kloner blir valgt, subklonet og uttrykt. De utrykte FGF-beslektete cDNA blir så testet for deres evne til å binde de forskjellige FGF'er, dvs. sur FGF.

Alternativt blir to prober konstruert, én probe som inneholder den intracellulære FGF-R-sekvens og den andre den ekstracellulære FGF-R-sekvens. Triplikate filtere blir laget. Ett filter blir hybridisert ved høy stringens (se eksempler 2 og 3) med den intracellulære FGF-R-probe. To filtere blir hybridisert med den ekstracellulære proben, ett filter ved høy stringens og ett ved lav stringens. Siden sure og basiske FGF'er har bare 55% sekvensidentitet, kan deres reseptorer også vise omtrent 55% sekvensidentitet i den ligand-bindende regionen. Kloner som er positive ved høy stringens overfor den intracellulære proben og bare positive ved lav stringens til den ekstracellulære proben er FGF-R-beslektete reseptorer. På den måten blir kloner selektert, restriksjonskartlegging utført, etterfulgt av sekvensering og ekspresjon. De utrykte reseptorene blir testet for deres evne til å binde forskjellige FGF'er, f.eks. sur FGF.

Eksempel 5

Karakterisering av humane FGF-R cDNA-kloner

Plasmidkonstruksjoner

For transfeksjonseksperimenter ble full-lengde kylling FGF-reseptor cDNA som inneholdt 46 nukleotider av 5'-ikke-translatert sekvens og hele den 3' ikke-translaterte sekvens, og full-lengde h2 cDNA som inneholdt 13 nukleotider av 5' ikke-translatert sekvens og hele den 3' ikke-translaterte sekvensen individuelt subklonet i BamHI/SalI-setene til pattedyr ekspresjonsvektor pSV7d (P. Luciw, Chiron Corporation). Dette plasserte reseptor cDNA-fragmentene i den riktige orienteringen direkte nedenfor et SV40

promotorelement.

For å lage konstruksjoner som skal benyttes som templatere for å lage in vitro transkriberte RNA'er, ble full-lengde kylling FGF-reseptor cDNA subklonet inn i BamHI/SalI-setene til Bluescript Sk (Stratagene) og full-lengde human FGF-reseptor cDNA'er (h2 og h3) ble subklonet inn i PstI/SalI-setene i Bluescript KS. Dette plasserte reseptorsekvensene direkte nedenfor T7 RNA polymerasepromotorelementet. For å øke muligheten for effektiv translasjon, ble ATG-sekvensene ovenfor startmetioninresten fjernet før subkloning, hvilket etterlot henholdsvis 46 og 13 nukleotider av intakt 5' ikke-translatert sekvens for kylling og humane konstruksjoner.

Cellelinjer og transfeksjoner

Rotte L6 skjelett muskelmyoblaster (ATCC CRL 1458) ble dyrket i DME H21 som inneholdt 10% føtal kalveserum og overført til Opti-MEM (GIBCO) like før transfeksjon. Innen 24 timer etter utsåing ble 1×10^6 celler kotransfektet med 20 μg av den passende ekspresjonskonstruksjon (enten cFGFR/pSV7d eller h2FGFR/pSV7d) og 1 μg av en vektor som inneholdt neomycin-resistensgenet (pSV2neo). Celler ble transfektet ved bruk av 50 μg Lipofectin (Bethesda Research Laboratories), der protokollen som ble gitt av produsenten ble fulgt. Seksten timer senere ble et likt volum DME H21-medium som inneholdt 20% føtal kalveserum tilsatt. Etter 48 timer ble cellene høstet og overført til (1:10) i seleksjonsmedium (DME H21, 10% føtal kalveserum, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ geneticin (GIBCO)). Transfektantkolonier ble undersøkt for ekspresjon av FGF-reseptoren ved immunblot med anti-reseptorpeptid polyklonalt antiserum.

Affinitetsmerking

Rekombinant human aFGF og human bFGF var en generøs gave fra Chiron Corporation som anført. For affinitets merkings-eksperimentene ble 5×10^6 celler inkubert i 30 minutter ved 37°C med 0,1 pMol ^{125}I -aFGF eller ^{125}I -bFGF i nærvær eller fravær av 200 ganger overskudd av den korresponderende ikke-merkete ligand. Cellene ble så vasket én gang med iskald DME

H21 som inneholder 20 mM HEPES pH 7,4, 0,2% gelatin, og to ganger med iskald PBS. Disuksinimidyl-substrat ble tilsatt til en endelig konsentrasjon på 0,15 mM og inkubasjoner ble tillatt å gå videre i 15 minutter ved 4°C. Kryssbindingsforbindelsen ble så fjernet og cellene ble resuspendert i prøvebuffer som inneholdt 100 mM ditiotreititol, kokt i 5 minutter, og analysert med SDS PAGE, etterfulgt av autoradiografi.

In vitro-transkripsjon av RNA

Før transkripsjon ble plasmidkonstruksjonene linearisert med XhoI. RNA ble transkribert fra lineariserte templatere ved bruk av T7 RNA polymerase i nærvær av 500 μM nNTP'er (200 μM rGTP) og 500 μM 5' GpppG^{3'}, (Pharmacia). Etter inkubasjon ved 4°C i 2 timer ble transkripsjonsreaksjonene behandlet med RNase-fri DNase, fenolekstrahert, etanolpresipitert, tørket og resuspendert i vann.

Injeksjon av oocytter

Dyr ble bedøvet i en løsning av 0,06% etyl p-aminobenzoat. Oocytter ble fjernet kirurgisk og dissekert manuelt i klumper som inneholdt 10-20 oocytter. Samlingene ble inkubert i modifisert Barth saltvann (se Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press (1982), som er tatt inn her som referanse). MBSH som inneholder 1 mg/ml type II kollagenase (Sigma) i 2 timer ved romtemperatur og så vasket omfattende med MBSH som inneholder 2 mg/ml bovint serumalbumin (BSA). Individuelle oocytter ble oppbevart ved 90°C i MBSH (1 mg/ml BSA).

Oocytter ble injisert i den vegetative pol med 50 nl vann eller RNA-løsning (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ i vann). Etter injeksjon ble oocyttene inkubert ved 19°C i 48 timer før ⁴⁵Ca⁺⁺ effluksundersøkelser ble utført.

⁴⁵Ca⁺⁺ effluksundersøkelser

Grupper av 50 injiserte oocytter ble lagt i enkeltbrønner i en 24 brønnskål og vasket fire ganger med 0,5 ml Ca⁺⁺-fri

MBSH-løsning uten BSA. Oocytter ble så inkubert i 0,5 ml av vaskeløsningen som inneholdt $^{45}\text{CaCl}_2$ (100 $\mu\text{Ci/ml}$) i 3 timer ved 19°C. Etter inkubasjon ble oocytterne vasket seks ganger med 0,5 ml MBSH (1 mg/ml BSA), så overført til en annen 24 brønnskål (5 oocytter pr. brønn). Alle etterfølgende vasker og inkubasjoner ble utført ved bruk av 0,5 ml MBSH som inneholdt 1 mg/ml BSA. Kondisjonerte supernatanter ble fjernet fra hver brønn og erstattet med friskt medium etter 10 minutters intervaller. De kondisjonerte mediumprøvene ble talt individuelt i en Beckman scintillasjonsteller. Når bakgrunneffluks stabiliserte, ble ligandene tilsatt til de spesifiserte konsentrasjonene og mediumsammenlikninger fortsatt.

I 2 av 16 eksperimenter viste oocytter som ble injisert med vann og stimulert med enten aFGF eller bFGF $^{45}\text{Ca}^{++}$ effluksnivåer som var lik de oppnådd fra oocytter injisert med FGF reseptor RNA. Vi har ikke bestemt grunnen for disse uventete svarene, men det er mulig at de skyldtes ekspresjon av endogene FGF-reseptorer på ledsagende follikelceller, eller på overflaten til oocytterne selv. I alle andre eksperimenter hadde vanninjiserte oocytter ingen nevneverdig effluksrespons, mens reseptor RNA-responsen til FGF var 10-40 ganger over basalmålingene.

Reseptor-nivåene i injiserte oocytter har ikke blitt målt fordi våre anti-reseptor polyklonale antisera gjenkjenner ikke spesifikt et rikelig forekommende oocyttoprotein på omtrent den samme molekylvekten som FGF-reseptoren på Western blots. Videre, nivået av eksogene reseptorer som blir uttrykt i oocytter synes å være ganske lave.

Isolering og karakterisering av humane cDNA-kloner

Komplementære DNA-bibliotek fra humane placenta og human navlevene endotelceller ble generøst gitt av J. Evan Sadler (Washington University School of Medicine, St. Louis). Bibliotekene ble undersøkt med ^{32}P -merkete oligomerer identiske med de som tidligere ble benyttet for å identifisere kylling FGF reseptor cDNA-kloner. Filtrene ble hybridisert og

vasket under høystrengte betingelser ved bruk av standard fremgangsmåte. Et total av 7 positive kloner ble isolert etter undersøkelse av 250 000 fag fra begge bibliotekene. De fire klonene beskrevet i denne rapport (h2, h3, h4 og h5) ble sekvensert ved hjelp av dideokxy kjedetermineringsfremgangsmåten, ved bruk av sekvensesystemet (United States Biochemical Corporation). Kloner h2, h3 og h4 ble oppnådd fra endotelcellebiblioteket og klon h5 ble oppnådd fra placentabiblioteket. Nukleotid sekvensanalyser viste at alle fire klonene inneholdt identiske 5' ikke-translaterte sekvenser og hadde poly-A-sekvenser ved deres 3'-ender. Imidlertid, bare poly-A-sekvensen ved 3'-enden til h2 fulgte etter en konsensus polyadenylerings signalsekvens (AATAAA; 37), hvilket indikerte at intern start ga opphav til poly A-sekvensene ved 3'-endene til de andre klonene. h2, h3, h4 og h5 cDNA'ene inneholdt henholdsvis 0,93 kb, 0,78 kb, 0,95 kb og 0,2 kb av 3' ikke-translatert sekvens. 3' ikke-translaterte sekvenser til h2 og h3 var identiske og 3'-translaterte sekvenser til h4 og h5 var også identiske. I motsetning var h2/h3 3' ikke-translaterte sekvenser fullstendig forskjellig fra 3' ikke-translaterte sekvenser til h4/h5.

Polymerase kjedereaksjoner

Amplifikasjons reaksjoner (42) ble utført ved bruk av én primer som korresponderte til den sterkt sure humane regionen (omtrent aminosyrene 44-52 i h2; S'GTTTCTTTCTCCTCTGAAGAAGAGGAGT-3') og én degenerert primer som korresponderte til IgI-domenet i kylling FGF-reseptoren (omtrent aminosyrene 58-69; 5'-GA(TC)GACGTGCAG (A/T) (G/C)CATCAACTGGGTGCGTGATGG-3'). I tilleggsreaksjoner brukte vi primeren fra den sterkt sure humane regionen og en annen primer som stammet fra den 5' ikke-translaterte regionen til den humane FGF-reseptoren (5'-GAGGATCGAGCTCACTGTGGAGTA-3'). Reaksjonsblandingen inneholdt 750 ng humant genomisk DNA, 10 pmol av hver primer, 200 µM av hver av de fire dNTP'er og 1 enhet av Taq polymerase (Perkin Elmer Cetus) i 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 100 ng/ml BSA.

Reaksjoner ble utført i et Ericomp twin blokkssystem. 31 sykluser ble utført, hvilket besto av denaturering ved 94°C i 50 sekunder, sammenbinding ved 65°C i 1 minutt og forlengelse ved 72°C i 3 minutter.

Isolering og karakterisering av fire enkeltstående humane FGF reseptor-cDNA'er

Kylling basisk FGF-reseptor inneholder et enkelt transmembranområde, en ekstracellulær region som inneholder 3 Ig-liknende områder og et sterkt surt område, og en intracellulær region som inneholder en spaltet tyrosinkinase-region. Kylling FGF reseptor cDNA er meget homolog til den tidligere publiserte delvis cDNA (hflg) som koder for en tyrosinkinase som, på den tid da den ble beskrevet, hadde ukjent funksjon. Den høye grad av identitet (95%) mellom kylling bFGF-reseptoren og human flg antyder at hflg var den humane motpart til bFGF-reseptoren. For å oppnå full-lengde human FGF reseptor cDNA'er, ble oligonukleotidprobe som var basert på hflg cDNA-sekvensen benyttet for å undersøke et humant navlevene endotelcelle cDNA-bibliotek og et humant placenta cDNA-bibliotek. Fra de første undersøkelsene av 250 000 plakk fra hvert bibliotek ble fire positive kloner isolert fra endotelcellebiblioteket og tre fra placentabiblioteket.

cDNA-klonene kunne bli delt inn i to klasser basert på forskjellige mønstre med hensyn til restriksjonskart i deres 3'-ender. En av disse klassene stammet fra cDNA-kloner som var meget kortere i lengde. Representanter for hver klasse var tilstede i klonene isolert fra hvert bibliotek. To kloner (h2 og h3) som representerte klassen med de større cDNA-klonene og to kloner (h4 og h5) som representerte klassen av kortere cDNA-kloner ble sekvensert i sin helhet. De avledete aminosyresekvensene til de fire humane reseptorformene er vist i sammenlikning med kylling FGF-reseptorsekvensen i fig. 7. En skjematisk representasjon av de forskjellige reseptorformene er vist i fig. 8.

De antatte aminosyresekvensene til h2- og h3-klonene er

nærmest identiske og varierer bare i tre aminosyrer (aminosyrene 59, 60 og 103 i h2, fig. 7). På nukleotidnivået varierer h2 og h3 bare i posisjonene som koder for disse tre aminosyrerestene. h2/h3 åpne leserammer inklusive en hydrofob signalsekvens og den uvanlige sure regionen (8 sammenhengende sure rester med ledsagende rester) som var først bemerket i den publiserte sekvensen i kylling FGF-reseptor DNA. De ekstracellulære områdene til h2 og h3 er sterkt homologe til kylling FGF-reseptoren, bortsett fra at h2 og h3 mangler sekvensene til en Ig-liknende region (merket I i fig. 8). Transmembranområdet og cytoplasmatiske regioner er sterkt homologe til de korresponderende regionene i kylling FGF-reseptoren.

De kodende sekvensene til de korte cDNA-klonene, h4 og h5, atskiller seg bare ved to aminosyrer (posisjonene 59 og 60 i h4; nukleotidsekvensene til h4 og h5 atskiller seg bare ved posisjonene som er kodet for av disse to restene). Signalsekvensen, den sure regionen og én av de Ig-liknende områdene (IgII) er i det vesentlige identiske til de korresponderende regionene i h2 og h3. Den spesielle egenskapen til h4 og h5 er Ig-liknende område (IgIII) nærmest transmembranområdet. Omtrent halvparten av dette området er identisk med den korresponderende sekvensen til h2 og h3. Imidlertid er karboksylterminale halvparten av dette Ig-liknende området ikke beslektet til h2- og h3-sekvensene. Til forskjell fra h2, h3 og kylling FGF-reseptor cDNA, koder ikke h4 og h5 for en hydrofob membranomfattende region eller et cytoplasmatisk område.

Sekvensene til alle de humane cDNA'er som er blitt isolert inneholder bare 2 Ig-liknende områder. For å bestemme hvorvidt humane FGF-reseptorgenet inneholder sekvenser som koder for det første Ig-liknende området (IgI), ble polymerase kjedereaksjonene utført på genomisk DNA isolert fra human forhudsfibroblaster (HFF). For disse eksperimentene benyttet vi en forsterkende primer basert på sekvensen til IgI-området i kyllingreseptoren (som korresponderer til aminosyrene 58-69), og en annen primer basert på sekvensen fra den sure

regionen til den humane reseptoren (aminosyrene 44-52 i h2). Ved bruk av disse primere ble et enkelt 1,3 kb genomisk fragment opp-produsert. Som vist i fig. 9 inneholdt dette fragmentet de kodende sekvensene som var homologe (omtrent 83% aminosyreidentitet) til IgI-området av kylling FGF-reseptoren. I tillegg separerer en intronsekvens på omkring 1,0 kb disse kodende sekvensene fra sekvenser som koder for den sterkt sure regionen i reseptoren. Således inneholder det humane FGF-reseptorgenet klart sekvenser som koder for IgI-området som ikke er funnet i de humane cDNA-klonene. Videre, tilstedeværelsen av et intron mellom IgI-områdesekvensen og den sure regionsekvensen antyder at ekspresjon av 2 eller 3 Ig-områdsformer kan være regulert av alternativ splicing.

For å bestemme hvorvidt en 3 Ig-områdeform av reseptoren er uttrykt i HFF-celler, utførte vi PCR på cDNA laget fra HFF mRNA. Ved bruk av primerne beskrevet ovenfor ble et enkelt 0,24 kb fragment forsterket fra HFF cDNA. Dette fragmentet inneholdt sekvensene som koder for IgI-området og den sure regionen, men ingen intronsekvenser. Således konkluderte vi at HFF-celler transkriberer en 3 Ig områdeform av reseptoren. For å bestemme hvorvidt HFF-celler også utvikler en 2 Ig områdeform av reseptoren, benyttet vi den sure region-primeren og en annen primer basert på sekvens fra den 5' ikke-translatert region til den humane FGF-reseptoren. I disse reaksjonene ble et 0,23 kb fragment forsterket som, på samme måte som våre cDNA-kloner, mangler sekvensene som korresponderer til IgI-området. Således, en 2 Ig områdeform av reseptorer er altså transkribert i HFF-celler.

Reseptorer som inneholder 3 Ig-liknende og 2 Ig-liknende områder binder sur FGF og basisk FGF

Siden den 3 Ig-område reseptoren (først isolert fra et kylling cDNA-bibliotek) var opprenset på basis av sin affinitet for basisk FGF, var det av interesse å bestemme hvorvidt denne reseptoren også binder sur FGF. For å belyse dette spørsmål ble den 3 Ig-område kyllingreseptoren uttrykt i rotte L6 myoblaster, en cellelinje som normalt ikke uttrykker

FGF-reseptorer. I tillegg var 2 Ig-område humane h2 reseptoren også uttrykt i L6-celler. Fig. 10 viser en affinitet merkingseksperiment utført med transfekterte celler. Cellene ble inkubert med enten ^{125}I -aFGF eller ^{125}I -bFGF og bundet ligand ble kryssbundet i nærvær av disuksinimidyl-suberat (0,15 mM). Ved bruk av en av ligandene ble enkelt kryssbundne bånd sett i celler transfektert med reseptor cDNA'er (sporene 1, 3, 7 og 9), men ikke i celler transfektert med vektor alene (sporene 5, 6, 11 og 12). Subtraksjon av molekylvekten til FGF (17 kd) fra størrelsen til de kryssbundne kompleksene gir beregnede molekylvekter på 145 kd for 3 Ig-områdeformen av reseptoren og 125 kd for 2 Ig-områdeformen av reseptoren. Overskudd umerkete ligander hemmer dannelsen av de kryssbundne kompleksene (sporene 2, 4, 8 og 10). Disse resultatene viser at både 3 Ig-områdeformen og 2 Ig-områdeformen til FGF-reseptoren er istand til å binde enten sur eller basisk FGF. Scatchards bindingsanalyser indikerer at halv-maksimal binding av ^{125}I -aFGF til enten 3 Ig-områdeformen eller 2 Ig-områdeformen opptrer i en konsentrasjon på 0,05 nM. På samme måte opptrer halv-maksimal binding av ^{125}I -bFGF til enten 3 Ig-områdeformen eller til 2 Ig-områdeformen ved 0,1 nM.

En tre Ig område FGF-reseptor og en to Ig område FGF-reseptor formidler biologiske effekter overfor både sur og basisk FGF.

For å bestemme hvorvidt noen av de membranomfattende formene til FGF-reseptoren blir aktivert av enten aFGF eller bFGF, uttrykte vi disse reseptorene i *Xenopus*-ocytter og målte reseptoraktivering ved bruk av en sensitiv Ca^{++} effluksmetode. Denne metoden har blitt benyttet for å undersøke ekspresjon av reseptorer for andre Ca^{++} mobiliserende ligander inklusive cholecystokinin, bombesin, vasopressin og angiotensin II. Ligand-indusert effluks reflekterer en mobilisering av Ca^{++} fra intracellulære lagre, hvilket fører til økte nivåer av intracellulær Ca^{++} og øket effluks. For våre eksperimenter ble full-lengde cDNA transkribert in vitro og de "kappete" mRNA'ene ble injisert inn i *Xenopus* oocytter. Etter 48 timer ble de injiserte

oocytterne ladet opp med $^{45}\text{CaCl}_2$ og ligand-avhengig kalsiummobilisering undersøkt ved å måle $^{45}\text{Ca}^{++}$ effluks (fig. 11). Tilsetning av enten aFGF (A og B) eller bFGF (C og D) ga en rask og stor effluks av $^{45}\text{Ca}^{++}$ fra oocytter injisert med RNA som koder for kylling FGF-reseptoren (A og C) eller RNA som koder for den humane h2-reseptoren (B og C). I motsetning viste oocytter som var injisert med enten human h3 RNA (B og D) eller vann alene (A-D) ingen respons til enten aFGF eller bFGF. Som positiv kontroll ble karbakol tilsatt etter 100 minutters tidspunkt. Oocytter uttrykker endogene reseptorer for karbakol, og oocytter injisert med enten FGF reseptor RNA eller vann viste en positiv respons etter karbakol-stimulering. Vi konkluderer at både 3 Ig områdeformen (cFGF-R) og 2 Ig områdeformen (h2) til FGF-reseptoren er biologisk istand til å svare på både sur og basisk FGF. Således synes ligand bindingsområdene for sur og basisk FGF å ligge i reseptorregionen som omfatter den sterkt sure regionen og IgII- og IgIII-områdene.

Mens den humane h2-reseptoren viser klart svar på begge ligandene, ble det ikke sett noe svar i oocytter som var injisert med RNA som koder for h3 reseptorformen. Det er mulig at de tre aminosyreforskjellene mellom h2 og h3 forårsaker at disse proteinene svarer på forskjellig måte. Alternativt, mangel på svar i oocytter injisert med h3 RNA kan skyldes et uvanlig lavt ekspresjonsnivå av h3-protein. Uheldigvis har vi ikke vært istand til å bestemme reseptor protein ekspresjonsnivåene i oocytter.

FGF-R-former som har enten 2 eller 3 ekstracellulære Ig-liknende områder vil binde og svare på både sur og basisk FGF. Noen former av FGF reseptor-mRNA koder for bare den ekstracellulære regionen til FGF-reseptoren, et protein som er sannsynligvis utskilt fra cellen.

Det faktum at en 2 Ig-liknende områdeform av FGF-reseptoren (h2) binder både aFGF og bFGF med høy affinitet har tillatt oss å lokalisere bindingsområdene for disse ligandene til en region som omfatter den sterkt sure regionen og de IgII- og IgIII-områdene.

h4 og h5 reseptorformene mangler transmembransekvenser og representerer sannsynligvis utskilte former av FGF-reseptoren. Foreløpige resultater antyder at celler transfektert med h4 cDNA utskiller et 70 kd protein som er gjenkjent av anti-FGF-R polyklonalt antiserum.

Rollen til utskilte former av FGF-reseptoren er uklar. De utskilte formene kan virke til å regulere nivåene av ekstracellulære FGF'er og derved regulere tilgjengeligheten av FGF'er til celleoverflate FGF-reseptorer. Alternativt kan utskilte FGF-reseptorer tjene til å lagre og atskille FGF'er på et bestemt sted. En annen mulighet er at de utskilte formene kan binde til FGF'er i det intracellulære rom og deretter tjene som et hjelpemiddel for å skille ut faktoren. Dette er en viktig betraktning i lys av det faktum at aFGF og bFGF ikke inneholder signalsekvenser og at deres sekresjonsmekanisme er ukjent.

Våre resultater antyder at reseptormangfold kan bli laget ved hjelp av alternativ sammenbinding (spleising). Vi har isolert et total på 5 forskjellige FGF reseptor cDNA-arter. Sammenlikning mellom aminosyresekvensene indikerer sterkt at alle 5 artene stammer fra det samme genet. En annen interessant egenskap til de humane reseptorformene er tilstedeværelsen eller fraværet av ArgMet-sekvensen (aminosyrene 59 og 60 i h2 og h4) i det ekstracellulære området.

Affinitet merkningseksperimenter ved bruk av enten ^{125}I -aFGF eller ^{125}I -bFGF identifiserte et enkelt 145 kd reseptorprotein på transfekterte celler som uttrykker 3 Ig områdeformen av FGF-reseptoren, og et enkelt 125 kd reseptorprotein på transfekterte celler som uttrykker 2 områdeformen til FGF-reseptoren (se fig. 11). Det er mulig at nærværet av to reseptorarter kan reflektere samekspresjon av 3 Ig-område- og 2 Ig-områdeformene av reseptoren. Våre resultater har tydelig etablert at en enkel FGF-reseptortype kan binde både aFGF og bFGF med høy affinitet og formidle de biologiske virkningene til disse faktorene. Vi har benyttet sur og basisk FGF i disse eksperimentene fordi de er de best

karaktariserte medlemmene av FGF-familien, og er greit tilgjengelig i rekombinant form.

Eksempel 6

Konkurrerende binding mellom FGF-R peptider eller fragmenter, utvikling av FGF-R-beslektete antagonist eller agonister

Et fragment som inneholder alle eller deler av den ekstracellulære, ligandbindende region til FGF-R (dvs. inneholder aminosyrene 22-374 i fig. 3 eller 22-285 i fig. 4) eller analoger av disse er uttrykt i en vert (f.eks. pattedyrceller eller baculovirus infiserte insektceller) og renset som beskrevet i eksempel 1. Alternativt, fragmentene av det ligandbindende område blir laget ved bruk av en peptid-syntesemaskin (Applied Biosystems) og renset på HPLC. Forskjellige konsentrasjoner av FGF-R-fragmentet eller analoger av dette (FGF-Rexs) blir undersøkt for deres evne til å blokkere bindingen av ^{125}I -FGF til Swiss 3T3-celler. Konkurrerende binding blir utført som beskrevet i fig. 1A i eksempel 1 ved bruk av FGF-Rexs istedenfor umerket ligand, og konkurrerende binding blir bestemt.

FGF-Rexs blir også undersøkt for deres evne til å hemme FGF-utløst mitogenese som målt ved ^3H -thymidin-inkorporering i celler og ved å telle celletall. FGF-Rexs som blokkerer binding av FGF til celleoverflatereseptoren kan virke som en antagonist og blokkere ^3H -thymidinopptak og økingen i celletall som utløses av FGF. FGF-Rexs kan også virke som agonister, dvs. ved å utløse dimerisering av celleoverflatereseptoren som kan etterlikne en ligand-formidlet reseptor-rekaptorreaksjon. I slike tilfeller kan FGF-Rexs stimulere mitogenese i fravær av ligand eller kan øke den FGF-formidlete mitogene virkningen.

FGF-Rexs blir også undersøkt for deres evne til å hemme eller aktivere FGF-utløst tyrosin fosforylering av 90 substratproteinet i Swiss 3T3-celler eller autofosforylering av celle-bundet FGF-R. FGF-Rexs som blokkerer FGF-stimulert tyrosin fosforylering er antagonist. FGF-Rexs som aktiverer autofosforylering av celle-forbundet FGF-R i fravær av FGF er

agonister.

FGF-Rexs blir også undersøkt for deres anti-åredannende aktivitet. FGF-Rexs blir testet først for deres evne til å hemme FGF-stimulert vekst og mobilisering av endotelceller til kardannelse in vitro. Angiogenese (åredannelse) blir undersøkt in vitro ved bruk av en aortaringmetode. Aortaringer blir plassert på et kollagenunderlag dannet i nærvær eller fravær av FGF og FGF-Rexs. Endotelceller vokser og danner kar fra aortaringen i løpet av få dager i nærvær av FGF. Tilsetningen av FGF-Rexs som er antagonister i den tidligere metoden hemmer FGF-stimulert vekst av kapillærutskudd. FGF-Rexs som er angiogene endog i fravær av FGF er agonister.

FGF-analoger, angiogene faktorer, anti-angiogene faktorer såvel som antistoffer mot den ekstracellulære delen av FGF-R blir undersøkt for deres evne til å binde direkte eller konkurrere for binding av naturlig FGF med hensyn til binding til renset eller uttrykt FGF-R. I tillegg er de undersøkt for deres evne til å stimulere mitogenese (agonister) eller hemme FGF-avhengig mitogenese (antagonister) såvel som tyrosin-fosforylering i celler som uttrykker FGF-R. Disse studiene er viktige i å bestemme virkningsmåte til hver angiogene og anti-angiogene faktor, osv., som er reseptorformidlet og ved å bestemme hvis det er reseptorspesifisitet (dvs. sur sammenliknet med basisk FGF-R) for angiogene og anti-angiogene faktorer.

FGF-analoger blir radiomerket og binding blir utført med merket ligand, renset eller uttrykt reseptor i den passende fysiologiske buffer (dvs. kulturmedium eller fosfatbuffret saltvann (PBS)) i 0,5 timer ved 37°C eller 2-24 timer ved 4°C. Komplekset blir utfelt (5-10% polyetylen glykol, 1 mg/ml IgG) og atskilt ved filtrering gjennom filtre (dvs. Whitman GFA) og den bundne radioaktivitet bestemt.

Mens oppfinnelsen er blitt beskrevet i forbindelse med visse utførelsesformer av denne, vil det forstås at forskjellige modifikasjoner som kan være åpenbare for en fagmann i feltet til hvem oppfinnelsen henvender seg, faller også innenfor rammen av oppfinnelsen slik de blir definert i

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for fremstilling av fibroblast-vekstfaktorreseptor-
5 blokkerende forbindelse som er effektiv til å hemme fibroblast-vekstfaktorbinding til
nevnte fibroblast-vekstfaktorreseptor hvor den blokkerende forbindelse omfatter
IgII- og IgIII- domener i det minste 85% homologe til IgII- og IgIII- områdene av
reseptor h3 eller c1 som vist i fig. 7 og er fri for tyrosinkinasedomener,
karakterisert ved at fremgangsmåten omfatter ;
10 uttrykking av nukleinsyre som koder for den blokkerende forbindelsen for å
fremstille den blokkerende forbindelsen, og
gjenvinning av den blokkerende forbindelsen.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at den
15 blokkerende forbindelsen er fra et menneske.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at den
blokkerende forbindelsen fremstilles i en celle som er transformert med
nukleinsyre som inneholder minst omtrent 15 baser av en sekvens valgt fra
20 gruppen som består av:
 - a) en DNA-sekvens i fig. 3 eller 4,
 - b) en DNA-sekvens som koder for polypeptidet h3 i fig. 7; og
 - c) en DNA-sekvens som hybridiserer til en sekvens i fig. 3 eller 4 under
stringente betingelser.

4. Anvendelse av et løselig peptid fra det ekstracellulære område av en
25 fibroblast-vekstfaktorreseptor til screening av evne til å motvirke binding mellom en
fibroblast-vekstfaktor og en fibroblast-vekstfaktorreseptor som er tilstede i en
løsning, nevnte anvendelse omfatter å tilsette peptidet til nevnte løsning og måle
binding mellom fibroblast-vekstfaktor og fibroblast-vekstfaktorreseptor hvor
peptidet omfatter i det minste syv sammenhengende aminosyrer fra aminosyre-
30 sekvensen c1 eller h3 vist i fig. 7.

5. Anvendelse ifølge krav 4, hvor nevnte blokkerende forbindelse omfatter et vesentlig rent løselig polypeptid som har mellom omtrent 5 og 200 sammenhengende aminosyrer fra humant fibroblast-vekstfaktorreseptor ekstracellulært område av h3 vist i fig. 7.
- 5
6. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den blokkerende forbindelsen omfatter vesentlig rent polypeptid på mindre enn omtrent 85 kDa.
- 10
7. Fremgangsmåte ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den blokkerende forbindelsen er fra fibroblast-vekstfaktorreseptor h3.
8. Fremgangsmåte ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den blokkerende forbindelsen er løselig.
- 15
9. Isolert nukleinsyre, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den koder for en fibroblast-vekstfaktorreseptor eller fragment derav som omfatter IgII- og IgIII-domener i det minste 85% homologe med IgII- og IgIII- områdene av reseptor h3 eller c1 som vist i Fig. 7 og er fri for tyrosinkinasedomener.
- 20
10. Isolert nukleinsyre ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d a t fibroblast-vekstfaktorreseptoren er h3 og har en aminosyresekvens vist i fig. 7.
- 25
11. Isolert nukleinsyre ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den videre koder for minst ytterligere et peptidsegment valgt fra gruppen som består av et signalsegment, et Igl-segment, et surt segment, og et transmembransegment.
- 30
12. Isolert nukleinsyre ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte ytterligere sekvens er en sekvens beskrevet i fig. 3, 4 eller 9.

13. Isolert nukleinsyre ifølge krav 9, karakterisert ved at den koder for en løselig human fibroblast-vekstfaktorreseptor.

5 14. Isolert nukleinsyre ifølge krav 13, karakterisert ved at nevnte løselige humane vekstfaktorreseptor er h4 eller h5.

15. Fremgangsmåte for å fremstille et antistoff mot en fibroblast-vekstfaktor-
10 reseptor eller et fibroblast-vekstfaktorreseptorfragment,
karakterisert ved at fremgangsmåten omfatter å immunisere
dyrelymfocytter med en fibroblast-vekstfaktor-reseptor som har IgII- og IgIII-
domener som har i det minste 85% homologi med IgII- og IgIII- domener av c1
og h3 i figur 7 eller en epitop derav for screening av antistoffer fremstilt av
15 lymfocytene, for evne til å inhibere binding av fibroblast-vekstfaktor til et
ekstracellulært domene av en fibroblast-vekstfaktorreseptor som har IgII- og
IgIII- domener med minst 85% homologi med IgII- og IgIII- domenene til c1 og
h3 vist i figur 7.

20

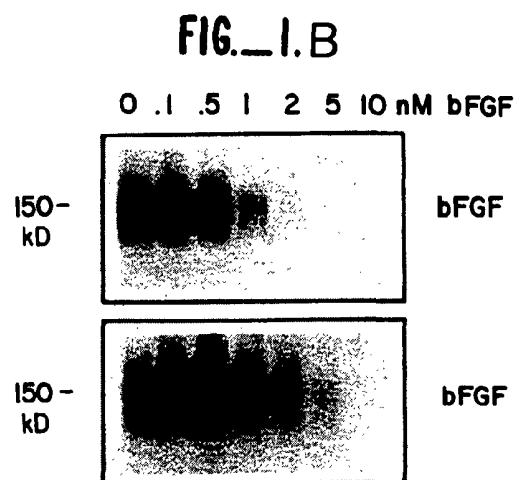
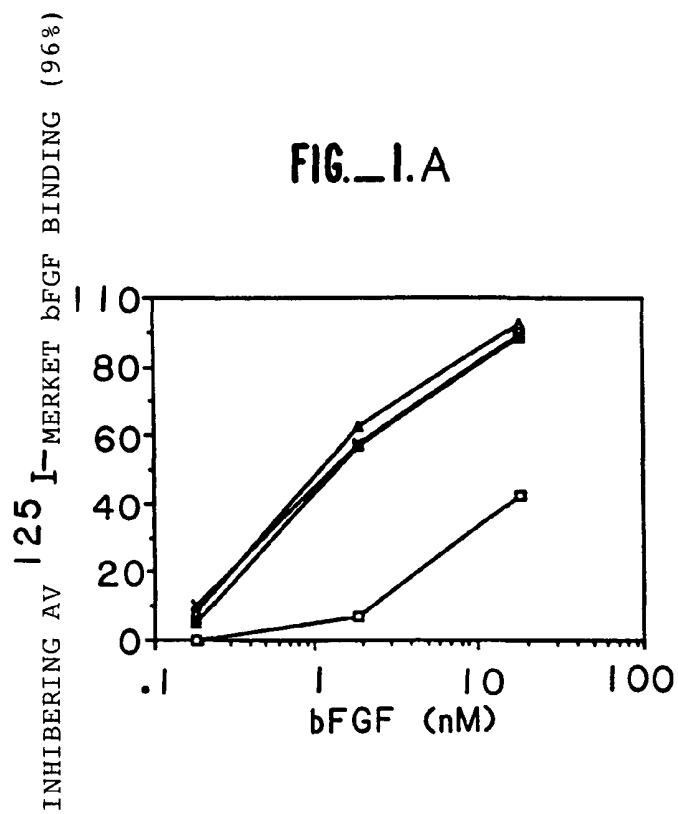
16. Fremgangsmåte ifølge krav 15, karakterisert ved at antistoffet er et monoklonalt antistoff.

17. Anvendelse av en fibroblast-vekstfaktorreseptor omfattende IgII og IgIII
25 domener som har minst 85% homologi med IgII og IgIII domener av c1 eller h3
vist i figur 7 for å måle en fibroblast-vekstfaktor i en valgt prøve, hvori anvendelsen
omfatter følgende trinn;

kombinasjon av nevnte prøve med fibroblast-vekstfaktorreseptorsegment,
og

30 bestemmelse av graden av binding mellom nevnte segment og nevnte
prøve.

18. Anvendelse ifølge krav 17, hvori fibroblast-vekstfaktorreseptorsegmentet er fra fibroblast-vekstfaktorreseptor h3 som har en aminosyresekvens vist i fig. 7.
- 5 19. Transformert celle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er istand til å uttrykke en fibroblast-vekstfaktorreseptor blokkerende forbindelse ifølge krav 1.
20. Transformert celle ifølge krav 19, k a r a k t e r i s e r t v e d at polypeptidet omfatter vesentlig hele det ekstracellulære område av human
10 fibroblast-vekstfaktorreseptor h3 vist i fig. 7.



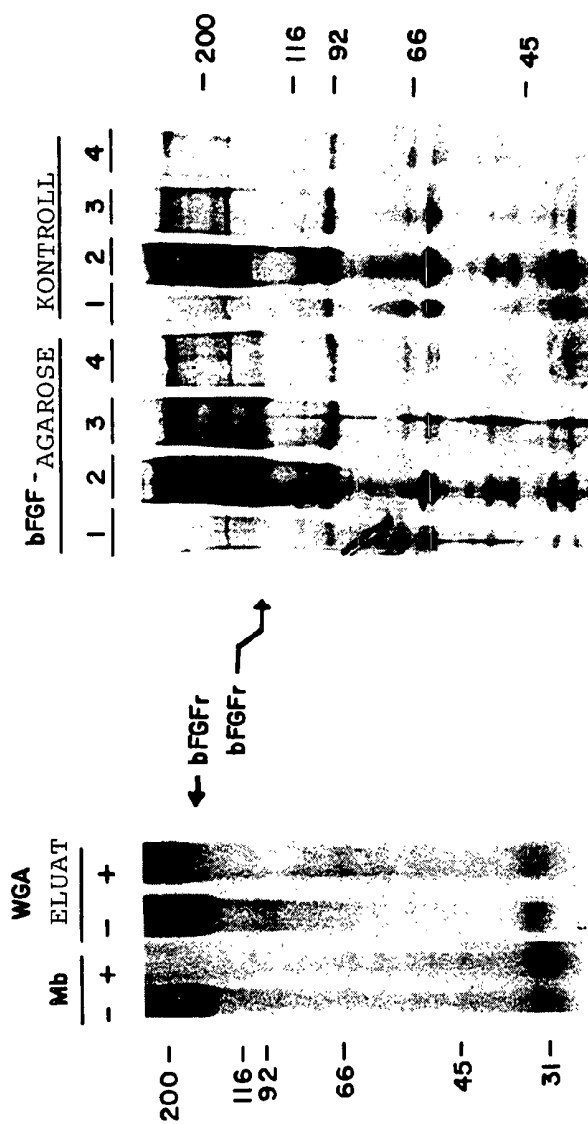


FIG. 2.A

FIG. 2.B

FIG. 3A.

FIG. 3.

FIG. 3A.	FIG. 3B.
FIG. 3C.	FIG. 3D.

1 GGGGACCGGGCGGTGCGGGCAGCGCTGAGCGGGCCGTGGGGCGGACCGCGCTCCC
 120 GCGGCGGCGGCGGGCTGCGCTCTCGCCCGGGCGGGGCTCCCTCCATTGTTCCGGG
 239 GCCCATGGAGGGGCGGTTGAGCGCAGTCGCTGAGCAGTAGCCGCAGCAGTGGG ^{Met}
 ATG

341 Thr Leu Ser Ala Ala Arg Pro Ala Pro Thr Leu Pro Asp Gln Ala
 ACG CTG TCT GCT GCC AGA CCG GCC CCC ACG CTG CCC GAC CAA GCT

431 Gly Asp Leu Leu Gln Leu Arg Cys Arg Leu Arg Asp Asp Val Gln
 GGC GAT CTC CTC CAG CTG CGC TGC CGG CTG CGC GAT GAC GTG CAG

521 Arg Thr Arg Ile Thr Gly Glu Glu Val Glu Val Arg Asp Arg Val
 CGC ACG CGC ATC ACC GGC GAG GAG GTA GAG GTG CGG GAC CGG GTG

611 Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Phe Ser Val Asn Val Ser Asp Ala Leu
 GGG AGC GAG ACC ACC TAC TTC TCC GTC AAC GTC TCA GAC GCA CTC

701 Glu Lys Glu Ala Asp Asn Thr Lys Pro Asn Gln Ala Val Ala Pro
 GAG AAG GAG GCG GAT AAC ACC AAG CCG AAC CAG GCT GTA GCT CCT

791 Pro Ala Ala Lys Thr Val Lys Phe Lys Cys Pro Ser Gly Gly Thr
 CCC GCT GCC AAA ACA GTG AAA TTC AAG TGC CCC TCA GGT GGG ACG

881 Pro Asp His Arg Ile Gly Gly Tyr Lys Val Arg Tyr Ala Thr Trp
 CCT GAC CAC CGC ATC GGG GGG TAC AAG GTC CGC TAT GCC ACC TGG

971 Thr Cys Ile Val Glu Asn Lys Tyr Gly Ser Ile Asn His Thr Tyr
 ACG TGC ATC GTG GAG AAC AAA TAC GGG AGC ATC AAC CAC ACC TAC

1061 Ala Gly Leu Pro Ala Asn Lys Thr Val Ala Leu Gly Ser Asn Val
 GCA GGG CTC CCC GCC AAC AAA ACG GTG GCC CTG GGC AGC AAC GTG

1151 Trp Leu Lys His Ile Glu Val Asn Gly Ser Lys Ile Gly Pro Asp
 TGG CTG AAA CAC ATC GAG GTG AAC GGC AGC AAG ATC GGC CCC GAC

1241 Thr Asp Lys Glu Me Glu Val Leu His Leu Arg Asn Val Ser Phe
 ACA GAC AAA GAG ATG GAA GTC CTT CAC TTA AGC AAT GTC TCA TTT

1331 Ile Ser His His Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Glu Ala Thr Glu
 ATC TCC CAT CAC TCT GCA TGG TTG ACA GTT CTC GAA GCT ACT GAG

1421 Ile Tyr Cys Thr Gly Ala Phe Leu Ile Ser Cys Met Val Val Thr
 ATT TAC TGC ACC GGC GCC TTC CTC ATC TCC TGC ATG GTG GTG ACA

				410											420	
1511	Asn	Ser	Gln	Leu	Ala	Val	His	Lys	Leu	Ala	Lys	Ser	Ile	Pro	Leu	
	AAC	AGC	CAG	CTG	GCC	GTG	CAC	AAG	CTG	GCC	AAG	AGC	ATC	CCA	CTG	
				440											450	
1601	Ser	Gly	Val	Met	Leu	Val	Arg	Pro	Ser	Arg	Leu	Ser	Ser	Ser	Gly	
	TCG	GGT	GTG	ATG	TTG	GTG	CGG	CCC	TCA	CGG	CTC	TCC	TCC	AGC	GGA	
				470											480	
1691	Pro	Arg	Trp	Glu	Leu	Pro	Arg	Asp	Arg	Leu	Ile	Leu	Gly	Lys	Pro	
	CCG	CGC	TGG	GAG	CTG	CCA	CGG	GAC	AGG	CTG	ATC	CTG	GGC	AAG	CCG	
				500											510	
1781	Gly	Leu	Asp	Lys	Asp	Lys	Pro	Asn	Arg	Val	Thr	Lys	Val	Ala	Val	
	GGC	CTG	GAC	AAG	GAC	AAG	CCA	AAC	CGC	GTC	ACC	AAA	GTG	GCT	GTA	
				530											540	
1871	Ile	Ser	Glu	Met	Glu	Met	Met	Lys	Met	Ile	Gly	Lys	His	Lys	Asn	
	ATC	TCC	GAG	ATG	GAG	ATG	ATG	AAG	ATG	ATC	GGC	AAG	CAC	AAG	AAC	
				560											570	
1961	Val	Ile	Val	Glu	Tyr	Ala	Ser	Lys	Gly	Asn	Leu	Arg	Glu	Tyr	Leu	
	GTC	ATC	GTG	GAG	TAC	GCC	AGC	AAA	GGC	AAC	CTG	CGT	GAG	TAC	CTG	
				590											600	
2051	Arg	Ile	Pro	Glu	Glu	Gln	Leu	Ser	Phe	Lys	Asp	Leu	Val	Ser	Cys	
	CGC	ATC	CCC	GAG	GAG	CAG	CTC	TCC	TTC	AAG	GAC	CTG	GTG	TCC	TGC	
				620											630	
2141	Cys	Ile	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Val	Leu	Val	Thr	Glu	
	TGC	ATC	CAC	AGG	GAC	CTG	GCG	GCC	AGG	AAC	GTG	CTG	GTG	ACC	GAG	
				650											660	
2231	His	His	Ile	Asn	Tyr	Tyr	Lys	Lys	Thr	Thr	Asn	Gly	Arg	Leu	Pro	
	CAC	CAC	ATC	GAT	TAC	TAC	AAG	AAG	ACG	ACA	AAC	GGC	CGC	TTG	CCG	
				680											690	
2321	His	Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Phe	Gly	Val	Leu	Leu	Trp	Glu	Ile	
	CAT	CAG	AGT	GAT	GTT	TGG	TCC	TTC	GGT	GTG	CTG	CTG	TGG	GAG	ATC	
				710											720	
2411	Leu	Phe	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	His	Arg	Met	Asp	Lys	Pro	Ser	
	CTC	TTC	AAG	CTG	CTG	AAG	GAA	GGC	CAC	AGG	ATG	GAC	AAG	CCC	AGC	
				740											750	
2501	Ala	Val	Pro	Ser	Gln	Arg	Pro	Thr	Phe	Lys	Gln	Leu	Val	Glu	Asp	
	GCC	GTG	CCC	TCC	CAG	CGC	CCC	ACC	TTC	AAG	CAG	CTG	GTG	GAG	GAC	
				770											780	
2591	Leu	Ser	Val	Pro	Leu	Asp	Gln	Tyr	Ser	Pro	Gly	Phe	Pro	Ala	Thr	
	CTG	TCG	GTG	CCG	TTG	GAT	CAG	TAC	TCC	CCC	GGC	TTC	CCG	GCC	ACC	
				800											810	
2681	Asp	Pro	Leu	Pro	Asp	Glu	Pro	Cys	Leu	Pro	Arg	Cys	Pro	Pro	His	
	GAC	CCG	CTG	CCC	GAC	GAG	CCC	TGC	CTG	CCG	CGC	TGC	CCC	CCG	CAC	
2777	CCGGGCACCACCACCGCAGGGA	ACTGCCCAAAGCTTTCGGCTGCTGTTGGGCTGTTGGT														
2897	CCACGTGGCGGTGCCGCCGTG	TCCCTATGGGGCCGATGCGCGCTGTGAGCATCCGATCC														
3017	CGCTAGGACAGAAGTCCCGTGT	TACATAGCTAAAATATGTATAAATATGAATATATATT														
3137	GCTGGTAGATATCAGTTGCTAT	ATATAAAAAAAAAA														

FIG. 3D.

430 Arg Arg Gln Val Thr Val Ser Ala Asp Ser Ser Ser Ser Met Asn
 CGC AGA CAG GTA ACA GTG TCA GCA GAT TCC AGC TCC TCC ATG AAC
 460 Thr Pro Met Leu Ala Gly Val Ser Glu Tyr Glu Leu Pro Glu Asp
 ACC CCC ATG CTG GCC GGC GTC TCC GAG TAT GAG CTG CCC GAG GAC
 490 Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Leu Ala Glu Ala Ile
 CTG GGA GAA GGC TGC TTT GGG CAG GTG GTG CTC GCC GAG GCC ATC
 520 Lys Met Leu Lys Ser Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu Ser Asp Leu
 AAG ATG CTC AAG TCC GAT GCC ACA GAG AAG GAC CTG TCC GAC CTC
 550 Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu Tyr
 ATC ATC AAC CTG CTG GGT GCC TGC ACC CAG GAC GGG CCC CTC TAT
 580 Gln Ala Arg Arg Pro Pro Gly Met Glu Tyr Cys Tyr Asn Pro Thr
 CAG GCA CGG CGC CCA CCG GGC ATG GAG TAC TGC TAC AAC CCC ACA
 610 Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Lys Lys
 GCG TAC CAG GTG GCA CGC GGC ATG GAG TAC CTG GCC TCC AAA AAG
 640 Asp Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile
 GAC AAC GTG ATG AAG ATC GCT GAC TTC GGG CTG GCC CGC GAC ATC
 670 Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Ile Tyr Thr
 GTG AAG TGG ATG GCC CCG GAG GCT CTG TTC GAC GGA ATA TAC ACC
 700 Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Val Pro Val Glu Glu
 TTC ACG CTG GGC GGT TCG CCC TAC CCC GGC GTG CCC GTG GAG GAG
 730 Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met Met Arg Asp Cys Trp His
 AAC TGC ACC AAC GAG CTG TAC ATG ATG ATG CGC GAC TGC TGC CAC
 760 Leu Asp Arg Ile Val Ala Met Thr Ser Asn Gln Glu Tyr Leu Asp
 CTG GAC AGG ATC GTG GCC ATG ACC TCC AAT CAG GAG TAC CTG GAC
 790 Arg Ser Ser Thr Cys Ser Ser Gly Glu Asp Ser Val Phe Ser His
 CGC AGC TCC ACC TGC TCC TCG GGC GAG GAC TCG GTG TTC TCC CAC
 819 Ser His Gly Ala Leu Lys Arg His OP
 ACG CAC GGA GCG CTG AAG CGG CAC TGA GGCTCCGCACGCAGCTGTGCCCC

CGGCTCTTTTTTTTTATCACCCATTTAAACCCCTTCCCACGAGGTCTGTGCTTGGACATCC
 CAGCGCTGCCCAACCCACACGGTGTGGGGTGTGCAGCACACGGGGCGCCCGGGGATCAG
 ACA TGTCTTTTTAAAGGGTGGTTACCAGAGCTGTGCCAGGCTGGTAGGGAGGTGCTGGTG

1	GCGGAACCCAAGGACTTTTCTCCGGTCCGAGCTCGGGGGCC	42
43	CCGCACCGGACGGTACCCGTGCTGGAGTCGGGCACGCCGC	84
85	GGCCCGCCGGGGCCCTCCGCAGGGCGATGGAGCCGGTCTGCA	126
127	AGGAAAGTGAGGCGCCGCCGTGCGTTCTGGAGGAGGGGGC	168
169	ACAAGGTCTGGAGACCCCGGTGGCGGACGGGAGCCCTCCC	210
211	CGGCCCGCGCTCGGGGGCAGCAGCTCGGCTGCATTGTTCCG	252
253	GCCCGGGCTGGAAGCGCCGAGCACCGAGCGCCCGGGGAGTC	294
295	GAGCGCCGGCCGGGGAGGACTCTTGGACCCCGCCAGGACCC	336
337	GAACAGAGCCGGGGGGCGGGCGGGCCGGAGCCGGGGAGCCGGC	378
379	ACAGCCCGCTCGCACAAGCCACGGCGGACTCTCCGAGGGC	420
421	GAACCTCCACGCCGAGCGAGGGTCAGTTTAAAAGGAGGATC	462
463	GAGCTCACTGTGGAGTATCCATGGAGATGTGGAGCCTTGCA	504
505	CCAACCTGTAAGTGCAGAACTGGGATGTGGAGCTGGAAGTGC	546
	I M W S W K C	
547	CTCCTCTTCTGGGCTGTGCTGGTCACAGCCACACTCTGCACC	588
	10 L L F W A V L V T A T L C T 20	
589	GCTAGGCCGTCCCGACCTTGCCTGAACAAGATGCTCTCCC	630
	30 A R P S P T L P E Q D A L P	
631	TCCTCGGAGGATGATGATGATGATGATGACTCCTCTTCAGAG	672
	40 S S E D D D D D D D S S S E	

FIG. 4.1

673	GAGAAAGAAA ⁵⁰ CAGATAACCCAAACCAAACCCCGTAGCTCCA ⁶⁰	714
	E K E T D N T K P N P V A P	
715	TATTGGACATCCCCAGAAAAGATGAAAAGAAATTGCATGCA ⁷⁰	756
	Y W T S P E K M E K K L H A	
757	GTGCCGGCTGCCAAGACAGTGAAGTTCAAATGCCCTTCCAGT ⁸⁰ ⁹⁰	798
	V P A A K T V K F K C P S S	
799	GGGACCCCAAACCCACACTGGCGCTGGTGGAAAATGGCAA ¹⁰⁰	840
	G T P N P T L R W L E N G K	
841	GAATTCAAACCTGACCACAGAATTGGAGGCTACAAGGTCCGT ¹¹⁰	882
	E F K P D H R I G G Y K V R	
883	TATGCCACCTGGAGCATCATAATGGACTCTGTGGTGGCCCTCT ¹²⁰ ¹³⁰	924
	Y A T W S I I M D S V V P S	
925	GACAAGGGCAACTACACCTGCATTGTGGAGAATGAGTACGGC ¹⁴⁰	966
	D K G N Y T C I V E N E Y G	
967	AGCATCAAGCACACATACCAGCTGGATGTGGTGGAGCGGTCC ¹⁵⁰ ¹⁶⁰	1008
	S I N H T Y Q L D V V E R S	
1009	CCTCACCGGCCCATCCTGCAAGCAGGTTGCCCGCCAACAAA ¹⁷⁰	1050
	P H R P I L Q A G L P A N K	
1051	ACAGTGGCCCTGGGTAGCAACGTGGAGTTCATGTGTAAGGTG ¹⁸⁰	1092
	T V A L G S N V E F M C K V	
1093	TACAGTGAGCGGCAGCGGCAGATCCAGTGGCTAAAGCACATC ¹⁹⁰ ²⁰⁰	1134
	Y S D P Q P H I Q W L K H I	
1135	GAGGTGAATGGGAGCAAGATTGGCCAGACAACCTGCCTTAT ²¹⁰	1176
	E V N G S K I G P D N L P Y	
1177	GTCCAGATCTTGAAGACTGCTGGAGTTAATACCACCGACAAA ²²⁰ ²³⁰	1218
	V Q I L K T A G V N T T D K	
1219	GAGATGGAGGTGCTTCACTTAAGAAATGTCTCCTTTGAGGAC ²⁴⁰	1260
	E M E V L H L R N V S F E D	
1261	GCAGGGGACTATACGTGCTTGCGGGTAACCTGTATCGGACTC ²⁵⁰	1302
	A G E Y T C L A G N S I G L	
1303	TCCCATCACTCTGCATGGTTGACCGTTCTGGAAGCCCTGGAA ²⁶⁰ ²⁷⁰	1344
	S H H S A W L T V L E A L E	
1345	GAGAGGCCGGCAGTGATGACCTCGCCCTGTACCTGGAGATC ²⁸⁰	1386
	E R P A V M T S P L Y L E I	
1387	ATCATCTATTGCACAGGGGCCTTCCTCATCTCC TGCATGGTG ²⁹⁰ ³⁰⁰	1428

FIG. — 4.2

I I Y C T G A F L I S C M V
 290 300
 1429 GGGTCGGTCATCGTCTACAAGATGAAGAGTGGTAGCAAGAAG 1470
 G S V I V Y K M K S G T K K
 310
 1471 AGTGA CTTCACAGCCAGATGGCTGTGCACAAGCTGGCCAAG 1512
 S D F H S Q M A V H K L A K
 320
 1513 AGCATCCCTCTGCCGACAGGTAACAGTGTCTGCTGACTCC 1554
 S I P L R R Q V I V S A D S
 330 340
 1555 AGTGCATCCATGAACTCTGGGGTCTTCTGGTTGGCCATCA 1596
 S A S M N S G V L L V R P S
 350
 1597 GGGCTCTCCTCGAGTGGGACTGCCATGCTAGCAGGGGTCTCT 1638
 R L S S S G T P M L A G V S
 360 370
 1639 GAGTATGAGCTTCCGGAAGAGCCTCGCTGGGAGCTGCCTCGG 1680
 E Y E L P E D P R W E L P R
 380
 1681 GACAGACTGGTCTTAGGCCAAACCCCTGGGAGAGGGCTGCTTT 1722
 D R L V L G K P L G E G C F
 390
 1723 GGGCAGGTGGTGTGGCAGAGGCTATCGGGCTGGACAAGGAC 1764
 G Q V V L A E A I G L D K D
 400 410
 1765 AAACCCAA CCGTGTGACCAAAGTGGCTGTGAAGATGTTGAAG 1806
 K P N R V T K V A V K M L K
 420
 1807 TCGGACGCAACAGAGAAAGACTTGTGACACCTGATCTCAGAA 1848
 S D A T E K D L S D L I S E
 430 440
 1849 ATGGAGATGATGAAGATGATCGGGAAGCATAAGAATATCATC 1890
 M E M M K M I G K H K N I I
 450
 1891 AACCTGCTGGGGGCTGCACGCAGGATGGTCCCTTGTATGTC 1932
 N L L S A C T Q D G P L Y V
 460
 1933 ATCGTGGAGTATGCCTCCAAGGGCAACCTCGGGGAGTACCTG 1974
 I V E Y A S K G N L R E Y L
 470 480
 1975 CAGGCCCGGAGGCCCCAGGGCTGGAATACTGCTACAAGCCC 2016
 Q A R R P P G L E Y C Y N P
 490
 2017 AGCCACAACCCAGAGGAGCAGCTCTCCTCCAAGGACCTGGTG 2058
 S H N P E E Q L S S K D L V
 500 510
 2059 TCCTGGCCTACCAAGGTGGCCCGAGGCATGGAGTATCTGGCC 2100
 S C A Y Q V A R G M E Y L A
 520
 2101 TCCAAGAAGTGCATACACCGAGACCTGGCAGCCAGGAATGTC 2142
 S K K C I H R D L A A R N V
 530

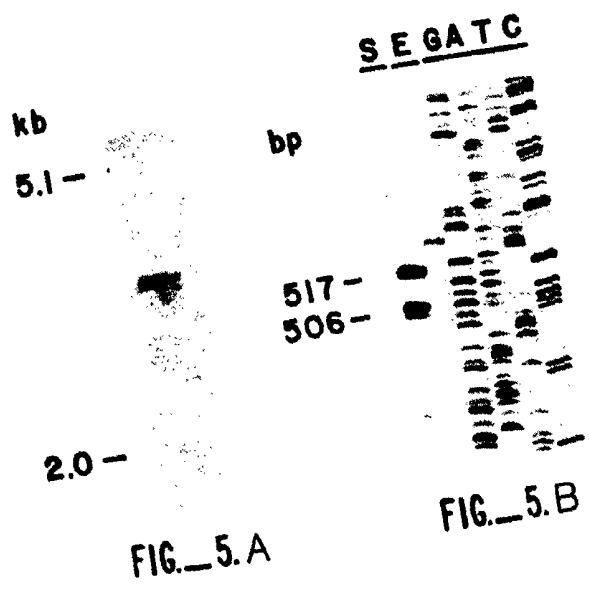
FIG. 4.3

2143 CTGGT⁵⁴⁰GACAGAGGACAATGTGATGAAGATAGCAGACTTTGGC⁵⁵⁰ 2184
 L V T E D N V M K I A D F G
 2185 CTGGCAGGGGACATTCA⁵⁶⁰CCACATCGACTACTATAAAAAGACA 2226
 L A R D I H H I D Y Y K K T
 2227 ACCAACGG⁵⁷⁰CGACTGCCTGTGAAGTGGATGGCACC⁵⁸⁰GGAGGCA 2268
 T N G R L P V K W M A P E A
 2269 TTATTTGACCGGATCTACACCCACCAGAGT⁵⁹⁰GATGTGTGGTCT 2310
 L F D R I Y T H Q S D V W S
 2311 TTCGGGGT⁶⁰⁰GCTCCTGTGGGAGATCTTCACTCTGGGCGGCTCC 2352
 F G V L L W E I F T L G G S
 2353 CCATACCGGGTGTGCCTGTGGAGGA⁶¹⁰ACTTTTCAAGCTGCTG⁶²⁰ 2394
 P Y P G V P V E E L F K L L
 2395 AAGGAGGGTCA⁶³⁰CGGCATGGACAAGCCAGTAACTGCACCAAC 2436
 K E G H R M D K P S N C T N
 2437 GAGCTGTACATGATGCGGGACTGCTGGCATGCAGT⁶⁴⁰GCCC⁶⁵⁰ 2478
 E L Y M M M R D C W H A V P
 2479 TCACAGAGACCCACCTTCAAGCAGCTGGT⁶⁶⁰GGAAGACCTGGAC 2520
 S Q R P T F K Q L V E D L D
 2521 CGCATCGTGGCCTTGACCTCCAACCAGGAGTACCTGGACCTG⁶⁷⁰ 2562
 R I V A L T S N Q E Y L D L
 2563 TCCATGCC⁶⁸⁰CCTGGACCAGTACTCCCCAGCTTTCCCGACACC⁶⁹⁰ 2604
 S M P L D Q Y S P S F P D T
 2605 CGGAGCTTACGTGCTCCTCAGGGGAGGATTCCGTCTTCTCT⁷⁰⁰ 2646
 R S S T C S S G E D S V F S
 2647 CATGAGCGGCTG⁷¹⁰CCCGAGGAGCCCTGCCTGCCCGACACCCA⁷²⁰ 2688
 H E P L P E E P C L P R H P
 2689 GCCCAGCTTGCCAATGGCGGACTCAAAGCCGCTGACTGCCA⁷³⁰ 2730
 A Q L A N G G L K R R Z
 2731 CCCACAGGCCCTCCCGAGACTCCACGGTCAGCTGTAACCCTC 2772
 2773 ACCCAGAGCCCTGCTGGGCCCACCACCTGTCGGTCCCTGTC 2814
 2815 CCGTTTCTGCTGGCAGGAGCCGGCTGCCTACCAGGGGCCTT 2856

FIG._4.4

3613 GCTGGTGAGCAGGTGCGCAAAGGA 3635

FIG._4.5



PDLNLPYVQILKTAGVNTTDKEMEVLHLRNVSVFEDAGEYTCLAGNSIGISHHSAWLTVLEATEQSPAMMTSPLYLE 374
 PDLNLPYVQILKTAGVNTTDKEMEVLHLRNVSVFEDAGEYTCLAGNSIGLSHHSAWLTVLEALEERIPAVMTSPLYLE 287
 PDLNLPYVQILKTAGVNTTDKEMEVLHLRNVSVFEDAGEYTCLAGNSIGLSHHSAWLTVLEALEERIPAVMTSPLYLE 285
 PDLNLPYVQILKIVIMAPVVFVQSTGKETTIVS6AQVPVGRVLSV6AQTLLHLSRDLATSPRTSNRCHKV E 287
 PDLNLPYVQILKIVIMAPVVFVQSTGKETTIVS6AQVPVGRVLSV6AQTLLHLSRDLATSPRTSNRCHKV E 285

 IIIYCTGAF LISCNVVTVI IYKMKSTTKKTDNFNSOLAVHKLAKSIPLRROVTVSADSSSMNSGVMLVRPSRLSS 449
 IIIYCTGAF LISCNVGSVIIVYKMKSGTKK(SDF)HSQMAVHKLAKSIPLRROVTVSADSSAISMNSGV LVRPSRLSS 362
 IIIYCTGAF LISCNVGSVIIVYKMKSGTKK(SDF)HSQMAVHKLAKSIPLRROVTVSADSSAISMNSGV LVRPSRLSS 360
 VSWEQRAIAGMGGAGL* 302
 VSWEQRAIAGMGGAGL* 300

 SGTPLAGVSEYELPEDPRWELPRDRLLGKPLGEGCFGQVVLAEAIGLDKDKPNRVTKVAVKMLKSDATEKDLS 524
 SGTPLAGVSEYELPEDPRWELPRDRLLV LGKPLGEGCFGQVVLAEAIGLDKDKPNRVTKVAVKMLKSDATEKDLS 437
 SGTPLAGVSEYELPEDPRWELPRDRLLV LGKPLGEGCFGQVVLAEAIGLDKDKPNRVTKVAVKMLKSDATEKDLS 435

 DLISEMEMMKMIGKHKN I INLLGACTODGPLYVIVEYASKGNLREYLOARRPPGMEYCYNPTRIP EEQLSFKDLV 599
 DLISEMEMMKMIGKHKN I INLLGACTODGPLYVIVEYASKGNLREYLOARRPPGL EYCYNP SHN PEEQLS SKDLV 512
 DLISEMEMMKMIGKHKN I INLLGACTODGPLYVIVEYASKGNLREYLOARRPPGL EYCYNP SHN PEEQLS SKDLV 510

 SCAYQVARGMEYLASKKCIHRDLAARNVLTEDNVMKIADFGLARIDIHYKKTTNGRLPVKWMPEALFDRI 674
 SCAYQVARGMEYLASKKCIHRDLAARNVLTEDNVMKIADFGLARIDIHYKKTTNGRLPVKWMPEALFDRI 587
 SCAYQVARGMEYLASKKCIHRDLAARNVLTEDNVMKIADFGLARIDIHYKKTTNGRLPVKWMPEALFDRI 585

 YTHQSDVWSFGVLLWEI FT LGGSPYPGVPVEELFKLLKEGHRMDKPSNCTNELYMMMRDCWHA VPSORPTFKQLV 749
 YTHQSDVWSFGVLLWEI FT LGGSPYPGVPVEELFKLLKEGHRMDKPSNCTNELYMMMRDCWHA VPSORPTFKQLV 662
 YTHQSDVWSFGVLLWEI FT LGGSPYPGVPVEELFKLLKEGHRMDKPSNCTNELYMMMRDCWHA VPSORPTFKQLV 660

 EDLDRIVAMTSNOEYLDLSVPLDQYSPGFPA TRSSTCSSGSDSVFSHDPLPDEPCLPRC PPHSHGALKRH* 819
 EDLDRIVAL TSNQEYLDLSMPLDQYSPSFPD TRSSTCSSGSDSVFSHE PLPEEPC LPRH PAO LANGG LKRR* 733
 EDLDRIVAL TSNQEYLDLSMPLDQYSPSFPD TRSSTCSSGSDSVFSHE PLPEEPC LPRH PAO LANGG LKRR* 731

FIG.—7.2

KYLLING FGR = C1

b2
b3
b4
b5

MFTWRCLLWAVLVATL SAARPA PTL PQQALPKANIEVESHSHP6DLLQLRCRLRDDVOSINWVRD6VOLPEN 75
MWSWKCL LF WAVLVATL CTARPSPTLPEO 30
MWSWKCL LF WAVLVATL CTARPSPTLPEO 30
MWSWKCL LF WAVLVATL CTARPSPTLPEO 30
MWSWKCL LF WAVLVATL CTARPSPTLPEO 30

NRTRITGEEVEVRDRPEDSGLYACMTNSPGETTYFSVNSDALPSAEDDDDEFDDSSSEEEKEADNNTKPNQ-AV 149
-----DALPSSEDDDDDDDDSSSEEEKEITDNTKPNRMPV 62
-----DALPSSEDDDDDDDDSSSEEEKEITDNTKPN--PV 60
-----DALPSSEDDDDDDDDSSSEEEKEITDNTKPNRMPV 62
-----DALPSSEDDDDDDDDSSSEEEKEITDNTKPN--PV 60

APYWTYPEKMEKLLHAVPAAKTIVKFKCPSGGT PNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGG YKVR YATWSIIMDSVVPSPDKG 224
APYWT[SPEKMEKLLHAVPAAKTIVKFKCPS]SGT PNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGG YKVR YATWSIIMDSVVPSPDKG 137
APYWT[SPEKMEKLLHAVPAAKTIVKFKCPS]SGT PNPTLRWLENGKEFKPDHRIGG YKVR YATWSIIMDSVVPSPDKG 135
APYWT[SPEKMEKLLHAVPAAKTIVKFKCPS]SGT PNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGG YKVR YATWSIIMDSVVPSPDKG 137
APYWT[SPEKMEKLLHAVPAAKTIVKFKCPS]SGT PNPTLRWLKNGKEFKPDHRIGG YKVR YATWSIIMDSVVPSPDKG 135

NYTCIVENK YGSINH TYQLDVVERS PHRPILQAGLPANKTVALGSNVEFYCKV YSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIG 299
NYTCIVENE YGSINH TYQLDVVERS PHRPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIG 212
NYTCIVENE YGSINH TYQLDVVERS PHRPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIG 210
NYTCIVENE YGSINH TYQLDVVERS PHRPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIG 212
NYTCIVENE YGSINH TYQLDVVERS PHRPILQAGLPANKTVALGSNVEFMCKVYSDPQPHIQWLKHIEVNGSKIG 210

FIG. 7.1

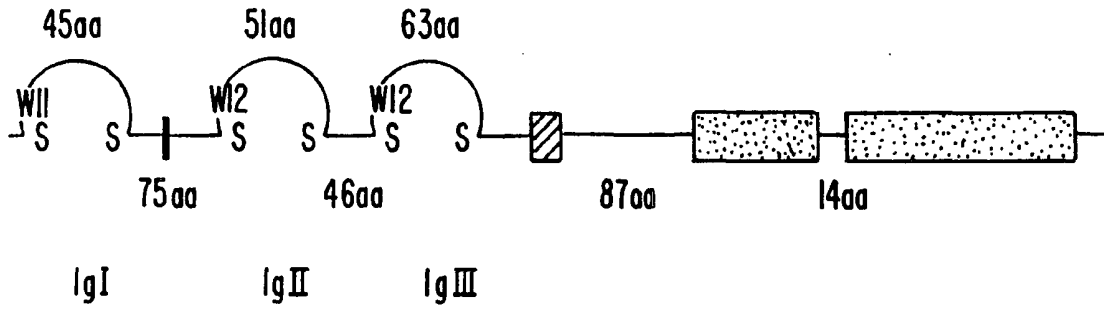


FIG._6.

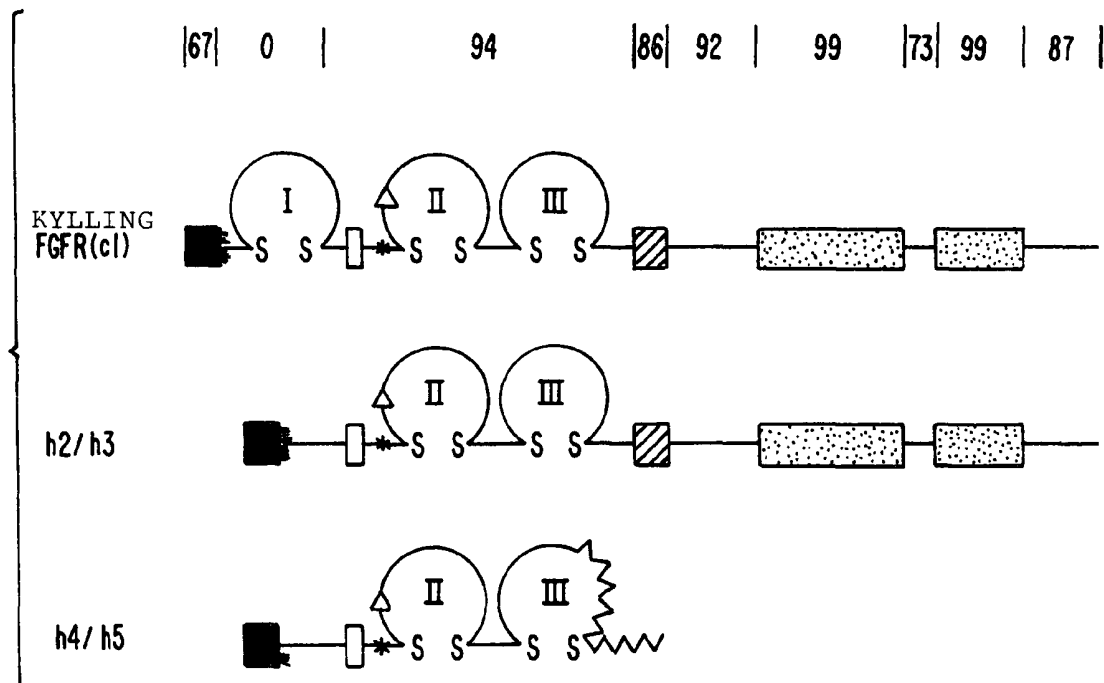


FIG._8.

FIG. II. A

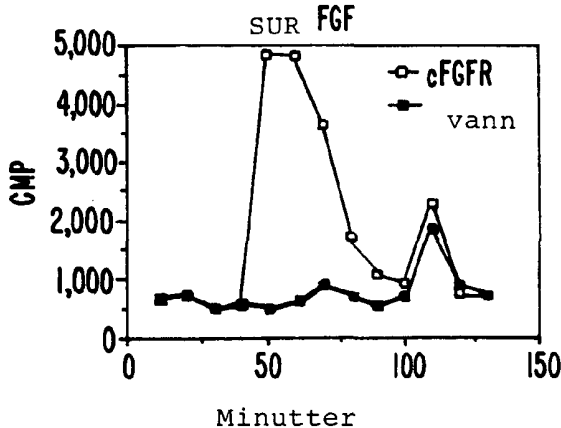


FIG. II. C

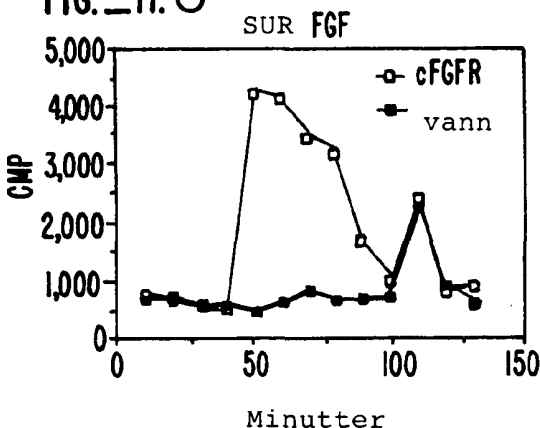


FIG. II. B

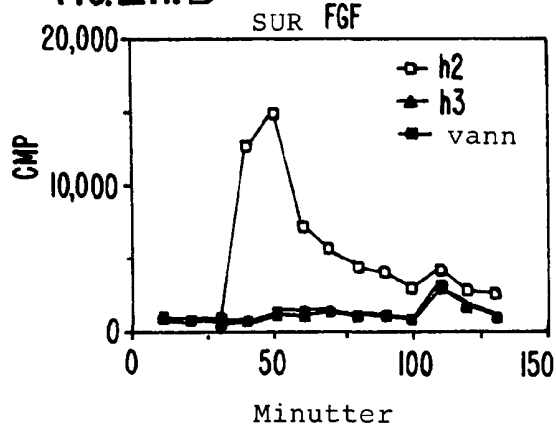


FIG. II. D

