

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-500037
(P2004-500037A)

(43) 公表日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int.C1.⁷

C12N 15/09
A01K 67/027
A61K 38/22
A61K 48/00
A61P 1/16

F 1

C12N 15/00
A01K 67/027
A61K 48/00
A61P 1/16
A61P 3/00

テーマコード(参考)

2GO45
4B024
4B063
4B064
4B065

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 237 頁) 最終頁に続く

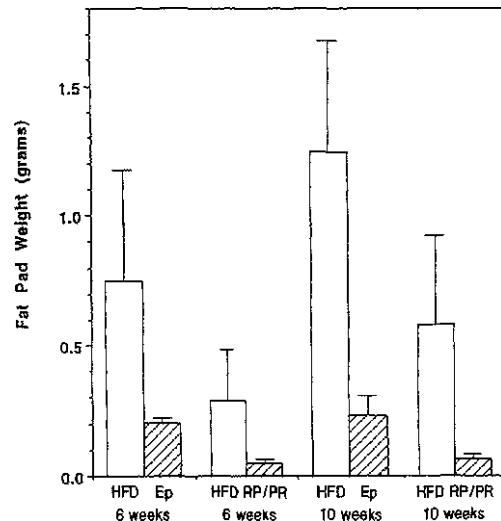
(21) 出願番号	特願2001-521746 (P2001-521746)	(71) 出願人	596168317 ジェネンテック・インコーポレーテッド GENENTECH, INC. アメリカ合衆国カリフォルニア・9408 0-4990・サウス・サン・フランシス コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(86) (22) 出願日	平成12年3月9日 (2000.3.9)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(85) 翻訳文提出日	平成14年3月8日 (2002.3.8)	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(86) 國際出願番号	PCT/US2000/006471	(72) 発明者	スチュワート, ティモシー, エー. アメリカ合衆国 カリフォルニア 941 14, サン フランシスコ, ダグラス ストリート 465
(87) 國際公開番号	WO2001/018210		
(87) 國際公開日	平成13年3月15日 (2001.3.15)		
(31) 優先権主張番号	PCT/US99/20594		
(32) 優先日	平成11年9月8日 (1999.9.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	PCT/US99/21090		
(32) 優先日	平成11年9月15日 (1999.9.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	PCT/US99/30999		
(32) 優先日	平成11年12月20日 (1999.12.20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 繊維芽細胞成長因子-19 (FGF-19) 核酸及びポリペプチド並びに肥満の治療のための利用の方法

(57) 【要約】

本発明は、纖維芽細胞成長因子ファミリーに属する新規ポリペプチド、それらペプチドをコードする核酸分子に関する。また、ここで提供されているのは、これらの核酸配列を含んでなるベクター及び宿主細胞、異種ポリペプチド配列に融合した本発明のポリペプチドを含んでなるキメラポリペプチド分子、本発明のポリペプチドへ結合する抗体、及び本発明のポリペプチドを生産する方法である。更には、肥満を治療する方法が提供されている。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) Fig. 2 (配列番号: 2) のアミノ酸残基約 1 又は約 23 から約 216 の配列を含んでなる FGF-19 ポリペプチドをコードする DNA 分子、又は (b) (a) の DNA 分子の補体に対して、少なくとも約 80 % の配列同一性を有する DNA を含む単離された核酸分子。

【請求項 2】

Fig. 1 (配列番号: 1) のヌクレオチド位置約 464 又は約 530 から約 1111 の配列を含んでなる請求項 1 の単離された核酸。

【請求項 3】

Fig. 1 (配列番号: 1) のヌクレオチド配列を含んでなる請求項 1 の単離された核酸分子。

【請求項 4】

Fig. 2 (配列番号: 2) のアミノ酸残基約 1 又は約 23 から約 216 の配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなる請求項 1 の単離された核酸分子。

【請求項 5】

(a) ATCC へ 1997 年 11 月 21 日に ATCC 寄託番号 209480 (DNA 49435-1219) で寄託したヒトタンパク質 cDNA によってコードされているのと同じ成熟ポリペプチドをコードする DNA 分子、又は (b) (a) の DNA 分子の補体に対して、少なくとも約 80 % の配列同一性を含む DNA を含んでなる単離された核酸分子。

【請求項 6】

ATCC へ 1997 年 11 月 21 日に ATCC 寄託番号 209480 (DNA 49435-1219) で寄託したヒトタンパク質 cDNA によってコードされているのと同じ成熟ポリペプチドをコードする DNA 分子を含んでなる請求項 5 の単離された核酸分子。

【請求項 7】

(a) ATCC へ 1997 年 11 月 21 日に ATCC 寄託番号 209480 (DNA 49435-1219) で寄託したヒトタンパク質 cDNA の全長ポリペプチドコード化配列、又は (b) (a) のコード化配列の補体に対して、少なくとも約 80 % の配列同一性を含む DNA を含んでなる単離された核酸分子。

【請求項 8】

(a) ATCC へ 1997 年 11 月 21 日に ATCC 寄託番号 209480 (DNA 49435-1219) で寄託したヒトタンパク質 cDNA の全長ポリペプチドコード化配列を含んでなる請求項 7 の単離された核酸分子。

【請求項 9】

Fig. 2 (配列番号: 2) のアミノ酸 1 又は約 23 から約 216 をコードする核酸配列の補体へハイブリダイゼーションする DNA を含んでなる FGF-19 ポリペプチドをコードする単離された核酸分子。

【請求項 10】

Fig. 2 (配列番号: 2) のアミノ酸 1 又は約 23 から約 216 をコードする核酸が、Fig. 1 (配列番号: 1) のヌクレオチド 464 又は約 530 から約 1111 を含む、請求項 9 の単離された核酸分子。

【請求項 11】

緊縮なハイブリダイゼーション及び洗浄条件下でハイブリダイゼーションが起こる、請求項 9 の単離された核酸分子。

【請求項 12】

(a) Fig. 2 (配列番号: 2) の 1 又は約 23 から約 216 のアミノ酸残基の配列と比較した場合に、少なくとも約 80 % のポジティブ (陽性) をスコアするポリペプチドをコードする DNA、又は (b) (a) の DNA の補体を含んでなる単離された核酸分子。

【請求項 13】

少なくとも約 22 ヌクレオチドを含んでなり、試験 DNA 分子を (a) Fig. 2 (配列番号: 2) の 1 又は約 23 から約 216 のアミノ酸残基の配列と比較した場合に、少なくとも約 80 % のポジティブ (陽性) をスコアするポリペプチドをコードする DNA、又は (b) (a) の DNA の補体を含んでなる単離された核酸分子。

10

20

30

40

50

番号：2)のアミノ酸残基1又は約23から約216を含んでなるFGF-19ポリペプチドをコードするDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の補体と緊縮な条件下でハイブリダイゼーションすることで生成される単離された核酸分子、並びに試験DNAを分離すること。

【請求項14】

(a)又は(b)に対して、少なくとも約80%の配列同一性を有する、請求項13の単離された核酸分子。

【請求項15】

請求項1から14の何れか1つの核酸分子を含んでなるベクター。

【請求項16】

前記核酸分子がベクターで形質転換された宿主細胞によって認識コントロール配列に作用可能に結合している、請求項15のベクター。

【請求項17】

ATCCへ受入番号209480(DNA49435-1219)で寄託した核酸分子。

【請求項18】

請求項15のベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項19】

前記細胞がCHO細胞である、請求項18の宿主細胞。

【請求項20】

前記細胞が大腸菌である、請求項18の宿主細胞。

【請求項21】

前記細胞が酵母細胞である、請求項18の宿主細胞。

【請求項22】

FGF-19ポリペプチドの発現に適した条件下で請求項18の宿主細胞を培養し、前記FGF-19ポリペプチドを細胞培養から回収することを含んでなる、前記FGF-19ポリペプチドを生産する工程。

【請求項23】

Fig.2(配列番号：2)のアミノ酸残基約1又は約23から約216の配列に対して、少なくとも約80%の配列同一性を含むアミノ酸配列を含んでなる、単離されたFGF-19ポリペプチド。

【請求項24】

Fig.2(配列番号：2)のアミノ酸残基1又は約23から約216を含んでなる請求項23の単離されたFGF-19ポリペプチド。

【請求項25】

ATCCへ1997年11月21日にATCC寄託番号209480(DNA49435-1219)で寄託したベクターのcDNA挿入物によってコードされるポリペプチドに対して、少なくとも約80%の配列同一性を有する単離されたFGF-19ポリペプチド。

【請求項26】

ATCCへ1997年11月21日にATCC寄託番号209480(DNA49435-1219)で寄託したベクターのcDNA挿入物によってコードされる、請求項25の単離されたFGF-19ポリペプチド。

【請求項27】

Fig.2(配列番号：2)の1又は約23から約216のアミノ酸残基の配列と比較した場合に、少なくとも約80%のポジティブ(陽性)をスコアする単離されたFGF-19ポリペプチド。

【請求項28】

Fig.2(配列番号：2)のアミノ酸残基1又は約23から約216の配列を含んでなる単離されたFGF-19ポリペプチド、或いは抗-FGF-19抗体の結合部位を提供するのに十分なその断片。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

(i) 緊縮な条件下で、試験DNA分子を(a)Fig. 2(配列番号: 2)のアミノ酸残基1又は約23から約216の配列を含んでなるFGF-19ポリペプチドをコードするDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の補体とハイブリダイゼーションさせること、(ii)前記ポリペプチドの発現に適した条件下において試験DNA分子を含んでなる宿主細胞を培養すること、並びに(iii)細胞培養から前記ポリペプチドを回収することによって生産される単離されたポリペプチド。

【請求項 30】

前記試験DNAが、(a)又は(b)に対して、少なくとも約80%の配列同一性を有する、請求項29の単離されたポリペプチド。

10

【請求項 31】

異種アミノ酸配列と融合したFGF-19ポリペプチドを含んでなるキメラ分子。

【請求項 32】

前記異種アミノ酸配列がエピトープタッグ配列である、請求項31のキメラ分子。

【請求項 33】

前記異種アミノ酸配列がイムノグロブリンのFc領域である、請求項31のキメラ分子。

【請求項 34】

FGF-19ポリペプチドへ特異的に結合する抗体。

【請求項 35】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項34の抗体。

20

【請求項 36】

前記抗体がヒト化抗体である、請求項34の抗体。

【請求項 37】

前記抗体が抗体断片である、請求項34の抗体。

【請求項 38】

FGF-19ポリペプチドに対するアゴニスト。

【請求項 39】

FGF-19ポリペプチドに対するアンタゴニスト。

【請求項 40】

(a) FGF-19ポリペプチド、(b) FGF-19ポリペプチドに対するアゴニスト、(c) FGF-19ポリペプチドに対するアンタゴニスト、又は(d) 製薬的に許容可能な担体との混合物中の抗-FGF-19抗体を含んでなる組成物。

30

【請求項 41】

a) FGF-19の試料へ候補生物活性剤を添加し；及び

b) 前記FGF-19への前記候補剤の結合を測定し、この結合がFGF-19へ結合することができる生物活性剤を示す、ことを含んでなるFGF-19へ結合することができる生物活性剤をスクリーニングする方法。

40

【請求項 42】

FGF-19の活性を調節することができる生物活性剤をスクリーニングする方法であつて、

a) FGF-19の試料へ候補生物活性剤を添加し；及び

b) FGF-19の生物学的活性の変化を測定することで、この変化が、FGF-19の生物学的活性を調節することができる生物活性剤を示す、段階を含んでなる前記方法。

【請求項 43】

前記生物活性が脂肪細胞のグルコース取り込みを低下させる、請求項42に記載の方法。

【請求項 44】

前記生物活性が脂肪細胞のレプチン放出を増加させる、請求項42に記載の方法。

【請求項 45】

FGF-19のレセプターを同定する方法であつて、前記FGF-19が細胞膜物質上のレセプターと複合化し、そして前記レセプターをFGF-19レセプターとして同定する

50

、 F G F - 1 9 を細胞膜物質を含んでなる組成物と混合することを含んでなる前記方法。

【請求項 4 6】

F G F - 1 9 が前記レセプターと結合する請求項 4 5 の方法であって、更に前記 F G F - 1 9 とレセプターを架橋する段階を含む前記方法。

【請求項 4 7】

前記組成物が細胞である、請求項 4 5 の方法。

【請求項 4 8】

前記組成物が細胞膜抽出調製物である、請求項 4 5 の方法。

【請求項 4 9】

脂肪細胞からのレプチン放出を誘導する方法であって、レプチン放出を誘導するのに効果的な量の F G F - 1 9 を前記細胞へ投与することを含んでなる前記方法。 10

【請求項 5 0】

前記 F G F - 1 9 をタンパク質として投与する、請求項 4 9 の方法。

【請求項 5 1】

前記 F G F - 1 9 を核酸として投与する、請求項 4 9 の方法。

【請求項 5 2】

脂肪細胞のグルコース取り込みの減少を誘導する方法であって、グルコース取り込みの減少を誘導するのに効果的な量の F G F - 1 9 を前記細胞へ投与することを含んでなる前記方法。

【請求項 5 3】

前記 F G F - 1 9 をタンパク質として投与する、請求項 5 2 の方法。 20

【請求項 5 4】

前記 F G F - 1 9 を核酸として投与する、請求項 5 2 の方法。

【請求項 5 5】

個体の肥満を治療する方法であって、前記肥満を治療するのに効果的な量の F G F - 1 9 を含んでなる組成物を前記個体へ投与することを含んでなる前記方法。

【請求項 5 6】

前記肥満の治療法が、更に肥満に関連する症状の治療となる、請求項 5 5 の方法。

【請求項 5 7】

前記 F G F - 1 9 をタンパク質として投与する、請求項 5 5 の方法。 30

【請求項 5 8】

前記 F G F - 1 9 を核酸として投与する、請求項 5 5 の方法。

【請求項 5 9】

前記組成物が、更に製薬的に許容可能な担体を含む、請求項 5 5 の方法。

【請求項 6 0】

前記 F G F - 1 9 が、 F i g . 2 (配列番号：2) に示すアミノ酸配列に対して、少なくとも 85 % のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 6 1】

個体の全体重を減じる方法であって、前記個体へ F G F - 1 9 の有効量を投与することを含んでなる前記方法。 40

【請求項 6 2】

前記 F G F - 1 9 をタンパク質として投与する、請求項 6 1 の方法。

【請求項 6 3】

前記 F G F - 1 9 を核酸として投与する、請求項 6 1 の方法。

【請求項 6 4】

前記 F G F - 1 9 を製薬的に許容可能な担体とともに投与する、請求項 6 1 の方法。

【請求項 6 5】

全体重における前記減少が、前記個体の脂肪の減少を含む、請求項 6 1 の方法。

【請求項 6 6】

前記 F G F - 1 9 が、 F i g . 2 (配列番号：2) に示すアミノ酸配列に対して、少なく 50

とも約 85% のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 7】

個体において、少なくとも 1 つのトリグリセリド及び遊離脂肪酸のレベルを減じる方法であって、前記個体へ FGF - 19 の有効量を投与することを含んでなる前記方法。

【請求項 6 8】

前記 FGF - 19 をタンパク質として投与する、請求項 6 7 の方法。

【請求項 6 9】

前記 FGF - 19 を核酸として投与する、請求項 6 7 の方法。

【請求項 7 0】

前記 FGF - 19 を製薬的に許容可能な担体とともに投与する、請求項 6 7 の方法。

10

【請求項 7 1】

前記 FGF - 19 が、Fig. 2 (配列番号: 2) に示すアミノ酸配列に対して、少なくとも約 85% のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 7 2】

個体の代謝速度を高める方法であって、FGF - 19 の有効量を前記個体へ投与することを含んでなる前記方法。

【請求項 7 3】

前記 FGF - 19 をタンパク質として投与する、請求項 7 2 の方法。

【請求項 7 4】

前記 FGF - 19 を核酸として投与する、請求項 7 2 の方法。

20

【請求項 7 5】

前記 FGF - 19 を製薬的に許容可能な担体とともに投与する、請求項 7 2 の方法。

【請求項 7 6】

前記 FGF - 19 が、Fig. 2 (配列番号: 2) に示すアミノ酸配列に対して、少なくとも約 85% のアミノ酸配列同一性を有する、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 7】

FGF - 19 をコードする導入遺伝子を含むゲノムを含んでなる齧歯動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

30

本発明は、概して、ここにおいて纖維芽細胞成長因子 - 19 (FGF - 19) ポリペプチドと命名された新規ポリペプチドの同定及び単離並びに組み換え型生産、肥満の治療的処置並びに肥満の処置に関連した治療的及び製薬的な特性を有する製薬的に活性な物質の生産のためにこのようなポリペプチドを利用した方法、組成物及びアッセイに関する。

【0002】

(発明の背景)

肥満は、現代社会に広く蔓延し、社会的不名誉だけでなく、減少した寿命及び有害な生理的発達、生殖疾患例えば多囊胞卵巣、感染症、静脈瘤、黒色表皮腫（黒色表皮肥厚症）、及び湿疹などの皮膚疾患、運動不耐性症、糖尿病、インシュリン抵抗症、高血圧、高脂血症、胆石症、変形性関節症、整形外科的障害、血栓疾患、癌、及び心臓冠状動脈疾患を含む多くの医学的課題と関連がある。Rissanenら., British Medical Journal, 301: 835-837 (1990)。

40

【0003】

肥満に対する現在の治療は、標準的な食事療法、低カロリーの食事、行動療法、食欲抑制剤、発熱薬剤、食事吸収阻害剤に関する薬物療法、顎配線、ウェストコード及び風船のような機械装置、及び手術を含む。Jung 及びChong, Clinical Endocrinology, 35: 11-20 (1991); Bray, Am. J. Clinical Nutrition, 55: 538S-544S (1992)。タンパク質節約（タンパク質異化）修飾絶食が、思春期の減量において効果的であることが報告されている。Leeら., Clin. Pediatr., 31: 234-236 (4月 1992)。

50

肥満の処置としてのカロリー制限は、貯蔵体タンパク質の異化を引き起こし、負のタンパク質バランスを起こす。従って、タンパク質補給食事療法は、カロリー制限下での窒素減少を少なくする手段として人気を得ている。このような食事療法では、単に中程度のタンパク質節約が生じるので、細い体容積を維持するためのより効果的な方法と貯蔵タンパク質が必要である。更には、このような療法が同じく体脂肪の減少の加速を引き起こすならば、肥満の処置は向上されうる。このような処置への種々の手段は、Weintraub及びBray, Med. Clinics N. Amer., 73: 237 (1989); Bray, Nutrition Reviews, 49: 33 (1991)で論じられているものを含む。

【0004】

10

我々の社会における肥満の広範な蔓延、並びに上記で議論したような関連した深刻な結果を考慮すると、肥満者の体重を減じることに潜在的に有用ないずれの治療薬剤も、このような方々の健康にとって極めて有益な効果を有する。大きな副作用をともなわずに理想的な体重へ肥満患者の全体重を減じる薬剤のための技術が必要であり、それによって肥満患者が減量体重のレベルを維持することが支えられる。

従って、肥満患者の体重を正常で、理想的な体重へ戻すことに有用である治療法を示すことが所望されている。

更に、長期に渡って減量した体重を維持できる、肥満に対する治療法を示すことが所望されている。

また、肥満を予防すること、並びに一度治療が開始されると、例えば動脈硬化及び多囊胞性卵巣症候群のような結果として、或いは二次的に肥満となる疾患の始まりを予防又は進展を止めることができ望ましい。

20

そのような治療方法及び関連組成物をここで示す。また、ここで示されるのは、新規タンパク質及び核酸、そのモジュレーターのスクリーニングのための方法である。ここで示されている他の方法、治療方法及び組成物は、当業者にとって明かなものである。

【0005】

(本発明の概要)

cDNAクローン (DNA 49435-1219) は新規ポリペプチドをコードしているとして同定され、本出願で「纖維芽細胞成長因子-19 (FGF-19)」と命名された纖維芽細胞成長因子ファミリーのメンバーに幾つかの配列同一性を有する。

30

一実施態様では、本発明は、FGF-19ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸を示す。

【0006】

一側面では、単離された核酸分子は、(a) Fig. 2 (配列番号: 2) のアミノ酸残基約1又は約23から約216を含む配列を有するPEACHポリペプチドをコードするDNA分子、又は(b) (a)のDNA分子の補体に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

40

【0007】

その他の側面では、単離された核酸分子は、(a) Fig. 2 (配列番号: 2) のアミノ

50

酸残基約 1 又は約 2 3 から約 2 1 6 を含む配列を有する F G F - 1 9 ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、又は (b) (a) のヌクレオチド配列の補体を含む。

【 0 0 0 8 】

その他の側面では、単離された核酸は、(a) F i g . 1 (配列番号 : 1) の約 4 6 4 又は約 5 3 0 から約 1 1 1 1 を含むヌクレオチド配列を有する D N A 分子、又は (b) (a) の D N A 分子の補体に対して、少なくとも約 8 0 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 1 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 2 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 3 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 4 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 5 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 6 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 7 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 8 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 9 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 0 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 1 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 2 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 3 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 4 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 5 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 6 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 7 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 8 % の核酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約 9 9 % の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【 0 0 0 9 】

その他の側面では、単離された核酸分子は、(a) F i g . 1 (配列番号 : 1) の約 4 6 4 又は約 5 3 0 から約 1 1 1 1 を含むヌクレオチド配列、又は (b) (a) のヌクレオチド配列の補体を含む。

【 0 0 1 0 】

更なる側面では、本発明は、(a) A T C C へ 1 9 9 7 年 1 1 月 2 1 日に A T C C 寄託番号 2 0 9 4 8 0 (D N A 4 9 4 3 5 - 1 2 1 9) で寄託したヒトタンパク質 c D N A によってコードされているのと同じ成熟ポリペプチドをコードする D N A 分子、又は (b) (a) の D N A 分子の補体に対して、少なくとも約 8 0 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 1 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 2 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 3 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 4 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 5 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 6 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 7 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 8 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 9 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 0 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 1 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 2 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 3 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 4 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 5 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 6 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 7 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 8 % の核酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約 9 9 % の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。このましい実施態様では、単離された核酸分子は、(a) (a) A T C C へ 1 9 9 7 年 1 1 月 2 1 日に A T C C 寄託番号 2 0 9 4 8 0 (D N A 4 9 4 3 5 - 1 2 1 9) で寄託したヒトタンパク質 c D N A の全長ポリペプチドコード化配列、又は (b) (a) の D N A 分子の補体に対して、少なくとも約 8 0 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 1 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 2 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 3 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 4 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 5 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 6 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 7 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 8 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 8 9 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 0 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 1 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 2 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 3 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 4 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 5 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 6 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 7 % の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約 9 8 % の核酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約 9 9 % の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。

10

20

30

40

50

列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。好ましい実施態様では、単離された核酸分子は、(a)ATCCへ1997年11月21日にATCC寄託番号209480(DNA49435-1219)で寄託したヒトタンパク質cDNAによってコードされる同じ成熟ポリペプチド、又は(b)(a)のヌクレオチド配列の補体を含む。

【0011】

その他の側面では、本発明は、(a)ATCCへ1997年11月21日にATCC寄託番号209480(DNA49435-1219)で寄託したヒトタンパク質cDNAの全長ポリペプチドコード化配列、又は(b)(a)のヌクレオチド配列の補体に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。好ましい実施態様では、単離された核酸分子は、(a)ATCCへ1997年11月21日にATCC寄託番号209480(DNA49435-1219)で寄託したDNAの全長ポリペプチドコード化配列、又は(b)(a)のヌクレオチド配列の補体を含む。

【0012】

その他の側面では、本発明は、Fig.2(配列番号:2)のアミノ酸1又は約23から約216を含むアミノ酸配列をコードする核酸配列の補体へハイブリダイゼーションするヌクレオチド配列を含む、下記に定義されているような活性FGF-19をコードする単離された核酸分子に関する。好ましくは、緊縮なハイブリダイゼーション及び洗浄条件下でハイブリダイゼーションが起こる。

更にその他の側面では、本発明は、Fig.1(配列番号:1)の約ヌクレオチド464又は約530と約1111の間の核酸配列の補体へハイブリダイゼーションするヌクレオチド配列を含む、下記に定義されているような活性FGF-19ポリペプチドをコードする単離された核酸分子に関する。好ましくは、緊縮なハイブリダイゼーション及び洗浄条件下でハイブリダイゼーションが起こる。

【0013】

更なる側面では、本発明は、少なくとも約22ヌクレオチドを有し、試験DNA分子が(a)Fig.2(配列番号:2)の約1又は約23から約216を含むアミノ酸残基の配列を有するFGF-19ポリペプチドをコードするDNA分子、又は(b)(a)のDNA分子の補体に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性

10

20

30

40

50

一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有する場合に、この試験DNA分子を前記(a)又は前記(b)と緊縮な条件下でハイブリダイゼーションさせることで生成される単離された核酸分子、並びに試験DNAの分離に関する。

【0014】

その他の側面では、本発明は、(a) Fig. 2(配列番号: 2)の残基約1又は約23から216を含むアミノ酸配列と比較した場合に、少なくとも約80%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約81%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約82%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約83%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約84%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約85%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約86%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約87%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約88%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約89%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約90%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約91%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約92%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約93%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約94%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約95%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約96%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約97%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約98%のポジティブ(陽性)、そして、あるいは少なくとも約99%のポジティブ(陽性)をスコアするポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、又は(b)(a)のヌクレオチド配列の補体を含む単離された核酸に関する。

【0015】

特別な側面では、本発明は、N末端シグナル配列及び/又は開始メチオニンを有しないFGF-19ポリペプチドをコードするDNAを含むか、或いはそのようなコード化核酸分子に対して相補的である単離された核酸分子を提供する。シグナルペプチドは、(a) Fig. 2(配列番号: 2)の配列のアミノ酸残基約1からアミノ酸残基約22を含むまで伸展するものとして試験的に同定された。しかし、シグナルペプチドのC末端の境界は変化するが、最も可能性があるのはここで最初に同定されたようなシグナルペプチドのC末端の境界の何れかの側のほぼ約5のアミノ酸に過ぎないことは知られており、ここで、シグナルペプチドのC末端の境界はこのようなタイプのアミノ酸配列エレメントを同定するための当該分野で日常的に使用されている基準に従って同定することができる(例えば、Nielsenら, Prot. Engin. 10:1-6 (1997), von Heijneら, Nucl. Acids Res. 14:4683-4690 (1986)。更に、ある場合には、分泌されたポリペプチドからのシグナル配列の切断は完全には一様ではなく、1つを越える分泌種を生じることもまた認識される。これらのポリペプチド、及びそれをコードするポリヌクレオチドは本発明によって考慮される。しかして、本出願の目的に対して、Fig. 2(配列番号: 2)に示したFGF-19ポリペプチドのシグナルペプチドは、アミノ酸1からXまで延び、ここでXは(a) Fig. 2(配列番号: 2)の17~27及び下記に記載のこれの変異体である。従って、本発明によって包含されるFGF-19ポリペプチドの成熟形態は、XがFig. 2(配列番号: 2)の17から27の任意のアミノ酸である、Fig. 2(配列番号: 2)のアミノ酸Xから216を含んでなるもの、並びに下記に記載のようなこれの変異体を含む。

【0016】

その他の実施態様は、例えばハイブリダイゼーションプローブとして、或いは、場合によつては抗-FGF-19抗体に対する結合部位を含むポリペプチドをコードしうるFGF-19ポリペプチドの、コード化断片としての用途が見出されうるコード化配列を含むFGF-19ポリペプチド配列の断片に関する。そのような核酸断片は、通常少なくとも約20のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約30のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約40のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約50のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約60のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約70のヌクレオチド長

さ、あるいは少なくとも約 80 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 90 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 100 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 110 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 120 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 130 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 140 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 150 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 160 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 170 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 180 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 190 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 200 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 250 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 300 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 350 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 400 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 450 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 500 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 600 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 700 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 800 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 900 のヌクレオチド長さ、あるいは少なくとも約 1000 のヌクレオチド長さであり、ここで、「約」は、その参照長さのプラスマイナス 10 % の参照ヌクレオチド配列長さを意味する。好適な実施態様では、ヌクレオチド配列断片は、Fig. 1 (配列番号: 1) に示すヌクレオチド配列の任意のコード化領域から派生する。いくつもの良く知られた配列アライメントプログラムを用いて FGF - 19 ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列と他の知られているヌクレオチド配列を一列に並べ、そしてどの FGF - 19 ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列断片が新規であるかを決定することによる常套的な方法によって、FGF - 19 ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列の新規断片が決定できうることが知られている。このような FGF - 19 ポリペプチドコード化ヌクレオチド配列のすべてが、ここで考慮され、過度の実験をせずに決定することができる。また、これらヌクレオチド分子断片によってコードされている FGF - 19 ポリペプチド断片、好ましくは抗 - FGF - 19 抗体のための結合部位を含むこれら FGF - 19 ポリペプチド断片が考慮される。
10
20
30

【0017】

その他の実施態様では、本発明は、FGF - 19 又はその変異体をコードするヌクレオチド配列を含んでなるベクターを提供する。ベクターは上述の単離された核酸分子の任意のものを含みうる。

また、このようなベクターを含んでなる宿主細胞を提供する。例を挙げると、宿主細胞は CHO 細胞、大腸菌、バキュロウイルス感染昆虫細胞、又は酵母でありうる。FGF - 19 ポリペプチドを生産するための方法が更に提供され、これは、それぞれ FGF - 19 の発現に対して適した条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養から FGF - 19 をそれぞれ回収することを含んでなる。

その他の実施態様では、本発明は上述の単離された核酸配列の何れかによってコードされる単離 FGF - 19 ポリペプチドを提供する。

特別な側面では、本発明は、単離された天然配列 FGF - 19 ポリペプチドを提供し、ある実施態様においては、Fig. 2 (配列番号: 2) の残基約 1 又は約 23 から約 216 のアミノ酸残基の配列を含む。

【0018】

その他の側面では、本発明は、Fig. 2 (配列番号: 2) の約 1 又は約 23 から約 216 を含むアミノ酸残基の配列に対して、少なくとも約 80 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 81 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 82 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 83 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 84 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 85 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 86 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 87 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 88 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 89 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 90 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 91 % のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約 92 % のアミノ酸

10

20

30

40

50

配列同一性、あるいは少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離されたFGF-19ポリペプチドに関する。

【0019】

更なる側面では、本発明は、ATCCへ1997年11月21日にATCC寄託番号209480(DNA49435-1219)で寄託したヒトタンパク質cDNAによってコードされているアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離されたFGF-19ポリペプチドに関する。好ましい実施態様では、単離されたFGF-19ポリペプチドは、ATCCへ1997年11月21日にATCC寄託番号209480(DNA49435-1219)で寄託したヒトタンパク質cDNAによってコードされているアミノ酸配列を含む。

【0020】

更なる実施態様では、本発明は、Fig.2(配列番号:2)の約1又は約23から約216を含む残基のアミノ酸配列と比較した場合に、少なくとも約80%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約81%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約82%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約83%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約84%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約85%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約86%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約87%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約88%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約89%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約90%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約91%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約92%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約93%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約94%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約95%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約96%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約97%のポジティブ(陽性)、あるいは少なくとも約98%のポジティブ(陽性)、そして、あるいは少なくとも約99%のポジティブ(陽性)をスコアするアミノ酸配列を含む、単離されたFGF-19ポリペプチドに関する。

【0021】

特別な側面では、本発明は、N末端シグナル配列及び/又は開始メチオニンを有しない単離されたFGF-19ポリペプチドを提供し、上述されたようにそのようなアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によりコードされる。これを製造するための方法もまたここに記載され、この方法は、FGF-19ポリペプチドの発現に適した条件下で適切にコードする核酸分子を含むベクターを含んでなる宿主細胞を培養し、細胞培養からFGF-19ポリペプチドをそれぞれ回収することを含んでなる。

【0022】

10

20

30

40

50

更なるその他の側面では、本発明は、Fig. 2 (配列番号：2) の約1又は約23から約216を含むアミノ酸残基の配列を含む単離されたFGF-19ポリペプチド、あるいは生物学的に活性又は抗-FGF-19抗体のための結合部位を提供するのに十分なその断片に関してであり、生物学的に活性な、又は抗-FGF-19抗体のための結合部位を提供するFGF-19ポリペプチド断片の同定は、当該分野において良く知られている技術を用いて常套的な方法で達成することができうる。好ましくは、このFGF-19断片は、肥満を治療的に処置する能力を含む、天然FGF-19ポリペプチドの定的な生物活性を保持する。

【0023】

また更なる側面では、本発明は、(i) 緊縮な条件下で試験DNA分子を(a) Fig. 2 (配列番号：2) の約1又は約23から約216を含むアミノ酸残基の配列を有するFGF-19ポリペプチドをコードするDNA分子、又は(b) (a)のDNA分子の補体とハイブリダイゼーションさせること、並びに試験DNA分子が(a)又は(b)に対して、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有する場合に、(ii) ポリペプチドの発現に適した条件下において試験DNA分子を含む宿主細胞を培養すること、並びに(ii) 細胞培養からポリペプチドを回収することによって生産されるポリペプチドを提供する。

【0024】

他の実施態様では、本発明は、異種性ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したFGF-19ポリペプチドを含んでナルキメラ分子を提供し、このFGF-19ポリペプチドはすべてのFGF-19ポリペプチド、上文に記載のしたその変異体又は断片を含む。このようなキメラ分子の例としては、イムノグロブリンのエピトープタグ配列又はFc領域と融合したFGF-19ポリペプチドを含む。

他の実施態様では、本発明は、上文に記載されたFGF-19ポリペプチドと特異的に結合する下記において定義される任意の抗体を提供する。場合によっては、抗体はモノクローナル抗体、抗体断片又は单鎖抗体である。

更に他の実施態様では、本発明は、下記に定義される未変性のFGF-19ポリペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストに関する。特定の形態では、アゴニスト又はアンタゴニストは抗-FGF-19抗体、あるいは小分子である。

【0025】

更なる実施態様では、本発明は、FGF-19ポリペプチドを候補分子に接触させ、前記FGF-19ポリペプチドにより媒介される生物活性をモニターすることにより、FGF-19ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定する方法に関する。好ましくは、このFGF-19ポリペプチドは、未変性FGF-19ポリペプチドである。

また更なる実施態様では、本発明は、担体と組み合わせた、FGF-19ポリペプチド、又は上述したFGF-19ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニスト、抗-FGF-19ポリペプチド抗体を含む組成物に関する。場合によっては、担体は製薬的に許容可能である。

【0026】

本発明の他の実施態様は、FGF-19ポリペプチド、そのアゴニスト又はアンタゴ

10

20

30

40

50

ニスト又は抗 - FGF - 19 抗体に対して応答性のある症状の治療に有用な医薬の調製のための FGF - 19 ポリペプチド、又は上述したアゴニスト又はアンタゴニスト、又は抗 - FGF - 19 抗体の用途に関する。

一実施態様では、FGF - 19 へ結合することができる生物学的薬剤をスクリーニングする方法が示されている。一側面では、この方法は、候補である生物学的薬剤を FGF - 19 試料へ添加し、前記候補薬剤の FGF - 19 への結合を測定することを含み、この結合は、生物学的薬剤が FGF - 19 へ結合することができることを示す。

【0027】

更にここで提供されているのは、FGF - 19 の活性を調節することができる生物学的薬剤をスクリーニングする方法である。一実施態様では、候補である生物学的薬剤を FGF - 19 の試料へ添加し、FGF - 19 の生物学的活性の変化を測定する段階を含む方法が提供され、この変化は、生物学的薬剤が FGF - 19 の活性を調節することができることを示す。一実施態様では、FGF - 19 活性は細胞のグルコースの取り込みを減少させた。その他の実施態様では、FGF - 19 活性は、グルコースの取り込みを減少させ、細胞からのレプチンの遊離を増加させる。好ましくは、この細胞は脂肪細胞である。更にその他の実施態様では、FGF - 19 活性は、脂質と炭水化物の酸化を増加させた。好ましくは、この細胞は肝臓又は筋肉細胞である。

【0028】

更なるその他の実施態様では、本発明は、FGF - 19 のレセプターを同定する方法を提供する。好ましい実施態様では、この方法は、細胞膜上のレセプターと複合体を形成する FGF - 19 を前記細胞膜を含む組成物と混合させ、前記レセプターが FGF - 19 レセプターであることを同定することを含む。一実施態様では、この方法は、前記 FGF - 19 とレセプターを架橋することを含む。細胞膜は、無傷の細胞又は細胞膜抽出調製物から得ることができる。

本発明の更なる側面としては、1つの方法は、細胞、好ましくは脂肪細胞から遊離するレプチンを含むために提供される。一実施態様としては、この方法は、レプチン遊離を誘導するのに有効な量の FGF - 19 を細胞へ投与することを含む。

【0029】

ここで提供される方法では、FGF - 19 は、FGF - 19 を発現する核酸又はタンパク質の形態として投与されうる。更に下記にて記述されるように、FGF - 19 は、輸液又は持続放出性製剤として投与してもよい。好ましくは、FGF - 19 は、製薬的に許容可能な担体として個別に投与される。

また、ここで提供されるのは、細胞、好ましくは脂肪細胞におけるグルコースの取り込みの減少を含むための方法である。一実施態様では、グルコース取り込みの減少を誘導するのに有効な量の FGF - 19 を細胞へ投与することを含む。

【0030】

さらに本発明のその他の側面では、肥満を個別に治療する方法が提供されている。一実施態様では、この方法は、肥満を治療するのに有効な量の FGF - 19 を含んでなる組成物個別に投与することを含む。この方法では、心疾患のような、肥満に関連する症状が治療することができる。

また、ここで提供されるのは、FGF - 19 の有効量を個別に投与することを含んでなる、個体の総体重を減少させる方法である。好ましい実施態様では、各個体の体脂肪蓄積（脂肪）が減少する。

【0031】

更には、個体の少なくとも1つのトリグリセリドと遊離脂肪酸のレベルを減少させるために、前記個体へ FGF - 19 の有効量を投与することを含んでなる、ある1つの方法がここで提供されている。また、ここで提供されるのは、個体へ FGF - 19 の有効量を投与することを含んでなる、前記個体における代謝速度を高める方法である。

また、ここで提供されるのは、種々の条件と状況の下で、FGF - 19 の影響とそのモジュレーターを決定するための動物モデルである。一実施態様では、FGF - 19 をコード

10

20

30

40

50

する導入遺伝子を含んでなるゲノムを含む動物、好ましくは齧歯動物が提供されている。

【0032】

(好ましい実施態様の詳細な説明)

I. 定義

ここで使用される際の「FGF-19ポリペプチド」、「FGF-19タンパク質」及び「FGF-19」という用語は、それぞれ天然配列FGF-19及びFGF-19ポリペプチド変異体（ここで更に詳細に定義する）を包含する。FGF-19ポリペプチドは、ヒト組織型又は他の供給源といった種々の供給源から単離してもよく、あるいは組換え及び/又は合成方法によって調製してもよい。

【0033】

「天然配列FGF-19ポリペプチド」は、天然由来のFGF-19ポリペプチドと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでいる。このような天然配列FGF-19ポリペプチドは、自然から単離することもできるし、組換え及び/又は合成手段により生産することもできる。「天然配列FGF-19ポリペプチド」という用語は、特に、FGF-19ポリペプチドの自然に生じる切断又は分泌形態（例えば、細胞外ドメイン配列を含む可溶型）、天然に生じる変異体型（例えば、選択的にスプライシングされた形態）及びFGF-19ポリペプチドの天然に生じる対立遺伝子変異体を包含する。本発明の一実施態様では、天然配列FGF-19は、Fig. 2（配列番号：2）のアミノ酸1から216を含んでなる成熟又は全長天然配列FGF-19である。また、Fig. 2（配列番号：2）に開示されているFGF-19ポリペプチドが、アミノ酸位置1としてここで命名されたメチオニン残基で開始すると示されているが、Fig. 2（配列番号：2）のアミノ酸位置1から上流又は下流の何れかに位置するその他のメチオニン残基が、FGF-19ポリペプチドの開始アミノ酸残基として用いられうることは、考えらるし可能である。

【0034】

「FGF-19変異体」とは、(a) Fig. 2（配列番号：2）に示すFGF-19ポリペプチドの残基1又は約23から216、(b) XがFig. 2（配列番号：2）の17から27の任意のアミノ酸残基である、Fig. 2（配列番号：2）に示すFGF-19ポリペプチドのXから216、或いは(c) Fig. 2（配列番号：2）に示すアミノ酸配列のその他の特異的に誘導された断片と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する下記に定義する活性FGF-19ポリペプチドを意味する。このようなFGF-19ポリペプチド変異体には、例えば、Fig. 2（配列番号：2）の配列の、1つ又は複数の内部ドメインと同じく、N末端及び/又はC末端において1つ又は複数のアミノ酸残基が付加、置換もしくは欠失されたFGF-19ポリペプチドが含まれる。通常、FGF-19ポリペプチド変異体は、(a) Fig. 2（配列番号：2）に示すFGF-19ポリペプチドの残基1又は約23から216、(b) XがFig. 2（配列番号：2）の17から27の任意のアミノ酸残基である、Fig. 2（配列番号：2）に示すFGF-19ポリペプチドのXから216、或いは(c) Fig. 2（配列番号：2）に示すアミノ酸配列のその他の特異的に誘導された断片と、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%のアミノ酸配列同一性、そしてあるいは少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有している。FGF-19変異体ポリペプチド

10

20

30

40

50

チドは、天然 FGF - 19 ポリペプチド配列を包含しない。通常は、FGF - 19 変異体ポリペプチドは、少なくとも約 10 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 20 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 30 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 40 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 50 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 60 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 70 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 80 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 90 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 100 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 150 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 200 アミノ酸長、あるいは少なくとも約 300 アミノ酸長、又はそれ以上である。

【0035】

ここに定義される FGF - 19 ポリペプチドに対してここで同定されている「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした、FGF - 19 ポリペプチドのアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えば BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2 又は Megalign (DNASTAR) ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、ここで目的ためには、%アミノ酸配列同一性値は下記に記載のように ALIGN-2 配列比較コンピュータプログラムを用いて得られ、この ALIGN-2 プログラムに対する完全なソースコードは以下の表 1 に提供される。ALIGN-2 配列比較コンピュータプログラムはジェネンテク社により作成され、以下の表 1 に示されたソースコードは、米国著作権庁、ワシントン D.C., 20559 にユーザー資料と共に提出されており、米国著作権登録番号 TXU510087 で登録されている。ALIGN-2 プログラムはジェネンテク社 (サウス サンフランシスコ、カリフォルニア) を通じて公的に利用できるし、あるいは以下の表 1 に提供されるソースコードからコンパイルすることができる。ALIGN-2 プログラムは UNIX オペレーティングシステム、好ましくはデジタル UNIX V4.0D での使用のためにコンパイルされなければならない。全ての配列比較パラメータは ALIGN-2 プログラムにより設定され、変動しない。

【0036】

ここでの目的ためには、与えられたアミノ酸配列 A の、与えられたアミノ酸配列 B との、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性 (あるいは、与えられたアミノ酸配列 B と、又はそれに対して或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列 A と言ふこともできる) は次のように計算される：

分率 X / Y の 100 倍

ここで、X は配列アラインメントプログラム ALIGN-2 の A 及び B のアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、Y は B の全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さと異なる場合、A の B に対する%アミノ酸配列同一性は、B の A に対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。この方法を用いた%アミノ酸配列同一性の計算の例として、以下の表 2 及び 3 は、「比較タンパク質」と称されるアミノ酸配列の「PRO」と称されるアミノ酸配列に対する%アミノ酸配列同一性を如何に計算するかを証明する。

【0037】

特に断らない限り、ここで使用される全ての%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2 コンピュータプログラムを使用して上記に記載したようにして得られる。

しかし、%アミノ酸配列同一性は、配列比較プログラム NCBI-BLAST2 (Alt schulr, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)) を用いて決定してもよい。NCBI-BLAST2 配列比較プログラムは、h

10

20

30

40

50

http://www.ncbi.nlm.nih.govからダウンロードして得るか、あるいは米国国立衛生研究所、ベゼスタ、メリーランドから得ることができる。NCBI-BLAST2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、unmask=可、鎖=全て、予測される発生=10、最小低複合長=15/5、マルチパスe-値=0.01、マルチパスの定数=25、最終ギャップアラインメントのドロップオフ=25、及びスコアリングマトリクス=BLOSUM62を含む。

【0038】

アミノ酸配列比較にNCBI-BLAST2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性（あるいは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる）は次のように計算される：

分率X/Yの100倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2のA及びBのアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

【0039】

「FGF-19変異体ポリヌクレオチド」又は「FGF-19変異体核酸配列」とは、下記に定義されるように、活性FGF-19ポリペプチドをコードする核酸分子であり、(a)Fig.2(配列番号:2)に示すFGF-19ポリペプチドの残基1又は約23から216をコードする核酸配列、(b)XがFig.2(配列番号:2)の17から27の任意のアミノ酸残基である、Fig.2(配列番号:2)に示すFGF-19ポリペプチドのXから216をコードする核酸配列、或いは(c)Fig.2(配列番号:2)に示すアミノ酸配列のその他の特異的に誘導された断片をコードする核酸配列の何れかと、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。通常は、FGF-19変異体ポリヌクレオチドは、(a)Fig.2(配列番号:2)に示すFGF-19ポリペプチドの残基1又は約23から216をコードする核酸配列、(b)XがFig.2(配列番号:2)の17から27の任意のアミノ酸残基である、Fig.2(配列番号:2)に示すFGF-19ポリペプチドのXから216をコードする核酸配列、或いは(c)Fig.2(配列番号:2)に示すアミノ酸配列のその他の特異的に誘導された断片をコードする核酸配列の何れかと、少なくとも約80%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約81%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約82%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約83%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約84%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約85%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約86%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約87%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約88%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約89%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約90%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約91%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約92%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約93%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約94%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約95%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約96%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約97%の核酸配列同一性、あるいは少なくとも約98%の核酸配列同一性、そして、あるいは少なくとも約99%の核酸配列同一性を有している。FGF-19変異体ポリヌクレオチドは、天然FGF-19ヌクレオチド配列を含まない。

【0040】

通常は、FGF-19変異体ポリヌクレオチドは、少なくとも約30ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約60ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約90ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約120ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約150ヌクレオチド長

10

20

30

40

50

、あるいは少なくとも約180ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約210ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約240ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約270ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約300ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約450ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約600ヌクレオチド長、あるいは少なくとも約900ヌクレオチド長、又はそれ以上である。

【0041】

ここで同定されるF G F - 19ポリペプチドコード化核酸配列に対する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入し、F G F - 19ポリペプチドコード化核酸配列のヌクレオチドと同一である候補配列中のヌクレオチドのパーセントとして定義される。パーセント核酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の知る範囲にある種々の方法、例えばB L A S T、B L A S T - 2、A L I G N、A L I G N - 2又はM e g a l i g n (D N A S T A R)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、ここでの目的ためには、%核酸配列同一性値は下記に記載のようにA L I G N - 2配列比較コンピュータプログラムを用いて得られ、このA L I G N - 2プログラムに対する完全なソースコードは以下の表1に提供される。A L I G N - 2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテク社により作成され、以下の表1に示されたソースコードは、米国著作権庁、ワシントンD . C . , 20559にユーザー資料と共に提出されており、米国著作権登録番号T X U 5 1 0 0 8 7で登録されている。A L I G N - 2プログラムはジェネンテク社(サウスサンフランシスコ、カリフォルニア)を通じて公的に利用できるし、あるいは以下の表1に提供されるソースコードからコンパイルすることができる。A L I G N - 2プログラムはU N I Xオペレーティングシステム、好ましくはデジタルU N I X V 4 . 0 Dでの使用のためにコンパイルされなければならない。全ての配列比較パラメータはA L I G N - 2プログラムにより設定され、変動しない。

【0042】

ここでの目的ためには、与えられた核酸配列Cの、与えられた核酸配列Dとの、又はそれに対する%核酸配列同一性(あるいは、与えられた核酸配列Dと、又はそれに対して或る程度の%核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列Cと言うこともできる)は次のように計算される:

分率W / Zの100倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムA L I G N - 2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアのヌクレオチドの数であり、ZはDの全ヌクレオチド数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さと異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。%核酸配列同一性の計算の例として、表4及び5は、「比較D N A」と称される核酸配列の「P R O - D N A」と称される核酸配列に対する%核酸配列同一性の計算方法を示す。

【0043】

特に断らない限り、ここで使用される全ての%核酸配列同一性値は、A L I G N - 2コンピュータプログラムを使用して上記前に記載したようにして得られる。

しかし、%核酸配列同一性はまた、配列比較プログラムN C B I - B L A S T 2 (A l t s c h u l r , N u c l e i c A c i d s R e s . 2 5 : 3 3 8 9 - 3 4 0 2 (1997))を用いて決定してもよい。このN C B I - B L A S T 2配列比較プログラムは、h t t p : / / w w w . n c b i . n l m . n i h . g o vからダウンロードして得るか、あるいは米国国立衛生研究所、ベゼスタ、メリーランドから得ることができる。N C B I - B L A S T 2は幾つかの検索パラメータを使用し、それら検索パラメータの全ては初期値に設定され、例えば、u n m a s k = 可、鎖 = 全て、予測される発生 = 1 0 、最小低複合長 = 1 5 / 5 、マルチパスe - 値 = 0 . 0 1 、マルチパスの定数 = 2 5 、最終ギャ

10

20

30

40

50

ップアラインメントのドロップオフ = 25、及びスコアリングマトリクス = BLOSUM 62 を含む。

核酸配列比較にNCBI-BLAST2が用いられる状況では、与えられた核酸配列Cの、与えられた核酸配列Dとの、又はそれに対する%核酸配列同一性（あるいは、与えられた核酸配列Dと、又はそれに対して或る程度の%核酸配列同一性を持つ又は含む与えられた核酸配列Cと言うこと）は次のように計算される：

分率W/Zの100倍

ここで、Wは配列アラインメントプログラムNCBI-BLAST2のC及びDのアラインメントによって同一であると一致したスコアの核酸残基の数であり、ZはDの全核酸残基数である。核酸配列Cの長さが核酸配列Dの長さと異なる場合、CのDに対する%核酸配列同一性は、DのCに対する%核酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。

【0044】

他の実施態様では、FGF-19変異体ポリペプチドヌクレオチドは、活性FGF-19ポリペプチドをコードし、好ましくは緊縮性ハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で、ここに開示する全長FGF-19ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列にハイブリダイゼーションする核酸分子である。PRO変異体ポリペプチドは、PRO変異体ポリヌクレオチドにコードされるものであってもよい。

【0045】

「陽性（ポジティブ）」という用語は、上記のように実施されたアミノ酸配列同一性比較の中で、比較された配列において同一ではないが類似の特性を有しているアミノ酸残基を含む。関心あるアミノ酸残基に対して陽性値がスコアされたアミノ酸残基は、関心あるアミノ酸残基と同一であるか、又は関心あるアミノ酸残基が好ましく置換（以下の表6に定義）されたものである。

【0046】

この目的において、付与されたアミノ酸配列Bに対する、Bとの、又はBに対抗する付与されたアミノ酸配列Aのポジティブ%値（別に、付与されたアミノ酸配列Aが、付与されたアミノ酸配列Bに対する、Bとの、又はBに対抗する所定の%ポジティブを有するか、又はこれを含むものとしても呼称することができる）は、次の式：

分率X/Yの100倍

により算出され、ここで、Xは、A及びBのプログラム整列において、配列整列プログラムALIGN-2によりポジティブ値がスコアされたアミノ酸残基の数であり、YはBのアミノ酸残基の全数である。アミノ酸配列Aの長さはアミノ酸配列Bの長さとは等しくなく、Bに対するAの%ポジティブは、Aに対するBの%ポジティブとは等しくないと認識されるであろう。

【0047】

「単離された」とは、ここで開示された種々のポリペプチドを記述するために使用するときは、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたポリペプチドを意味する。好ましくは、単離されたポリペプチドは、自然に結合する全ての成分と結合していない。その自然環境の汚染成分とは、そのポリペプチドの診断又は治療への使用を典型的には妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、ポリペプチドは、（1）スピニングカップシーカエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに充分なほど、あるいは、（2）クーマシープルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離されたポリペプチドには、FGF-19ポリペプチドの自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサルツのタンパク質が含まれる。しかしながら、通常は、単離されたポリペプチドは少なくとも1つの精製工程により調製される。

【0048】

FGF-19ポリペプチドをコード化する「単離された」核酸分子は、FGF-19-コ

10

20

30

40

50

ード化核酸の天然源に通常付随している少なくとも1つの汚染核酸分子から同定され、分離された核酸分子である。好ましくは、単離された核酸分子は、自然に結合する全ての汚染物質と結合していない。単離されたFGF-19-コード化核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。ゆえに、単離された核酸分子は、天然の細胞中に存在するFGF-19-コード化核酸分子とは区別される。しかし、FGF-19ポリペプチドをコードする単離された核酸分子は、例えば、核酸分子が天然細胞のものとは異なった染色体位置にあるFGF-19を通常発現する細胞に含まれるFGF-19コード化核酸分子を含む。

【0049】

「コントロール配列」という用語は、特定の宿主生物において作用可能に結合したコード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することができている。

【0050】

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合し」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に参画するプレタンパク質として発現されているなら、ポリペプチドのDNAに作用可能に結合している；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならば、コード配列に作用可能に結合している；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にする位置にあるなら、コード配列と作用可能に結合している。一般的に、「作用可能に結合している」とは、結合したDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接していて読みフェーズにあることを意味する。しかし、エンハンサーは必ずしも近接している必要はない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、従来の手法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンカーが使用される。

【0051】

「抗体」という用語は最も広い意味において使用され、特に単一の抗FGF-19モノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニスト、及び中和抗体を含む）、及び多エピトープ特異性を持つ抗FGF-19抗体組成物、単鎖抗FGF-19抗体、及び抗FGF-19抗体の断片を包含する（下記を参照のこと）。ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、少量存在しうる自然に生じる可能な突然変異を除いて同一である。

【0052】

ハイブリダイゼーション反応の「緊縮性」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニーリングのための温度が高くなり、プローブが短くなると温度は低くなる。ハイブリダイゼーションは、一般的に、相補的ストランドがその融点より低い環境に存在する場合における変性DNAの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイゼーション可能な配列との間の所望の相同性の程度が高くなると、使用できる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をより緊縮性にするが、低い温度は緊縮性を低下させる。ハイブリダイゼーション反応の緊縮性の更なる詳細及び説明は、Ausubelら, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

【0053】

ここで定義される「緊縮性条件」又は「高度の緊縮性条件」は、（1）洗浄のために低イオン強度及び高温度、例えば、50において0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを用いるもの；（2）

10

20

30

40

50

ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤、例えば、42において50% (v/v) ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを用いるもの；(3)42における50%ホルムアミド、5×SSC (0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム (pH6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5×デンハード液、超音波処理サケ精子DNA (50μg/ml)、0.1%SDS、及び10%のデキストラン硫酸と、42における0.2×SSC (塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム) 中の洗浄及び55での50%ホルムアミド、次いで55におけるEDTAを含む0.1×SSCからなる高緊縮性洗浄を用いるものによって同定される。10

【0054】

「中程度の緊縮性条件」は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されているように同定され、上記の緊縮性より低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件(例えば、温度、イオン強度及び%SDS)の使用を含む。中程度の緊縮性条件は、20%ホルムアミド、5×SSC (150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム (pH7.6)、5×デンハード液、10%デキストラン硫酸、及び20mg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中の37での終夜インキュベーション、次いで1×SSC中37-50でのフィルターの洗浄といった条件である。当業者であれば、プローブ長などの因子に適合させる必要に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかを認識するであろう。20

【0055】

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」に融合したFGF-19ポリペプチド、又はそれらのドメイン配列を含んでなるキメラポリペプチドを指す。タグポリペプチドは、その抗体が産生され得るエピトープ、又は幾つかの他の試薬によって同定できるエピトープを提供するに十分な数の残基を有しているが、その長さは対象とするポリペプチドの活性を阻害しないよう充分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは、抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようにかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8～約50のアミノ酸残基(好ましくは約10～約20の残基)を有する。30

【0056】

ここで用いられる「イムノアドヘシン」なる用語は、異種タンパク質(「アドヘシン」)の結合特異性と免疫グロブリン定常ドメインとを結合した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは、所望の結合特異性を持ち、抗体の抗原認識及び結合部位以外である(即ち「異種の」)アミノ酸配列と、免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む隣接アミノ酸配列である。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG-1、IgG-2、IgG-3又はIgG-4サブタイプ、IgA (IgA-1及びIgA-2を含む)、IgE、IgD又はIgMなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。40

【0057】

ここで意図している「活性な」及び「活性」とは、天然又は天然発生FGF-19ポリペプチドの生物学的及び/又は免疫学的活性を保持するFGF-19の形態を意味し、「生物学的」活性とは、天然又は天然発生FGF-19によって生ずる(阻害性又は刺激性の)生物学的機能であって、天然又は天然発生FGF-19が有する抗原性エピトープに対して抗体を生成する能力を除くものを意味し、「免疫学的」活性とは、天然又は天然発生FGF-19が有する抗原性エピトープに対して抗体を生成する能力を意味する。好ましい生物学的活性は、次の活性の何れか1つ又は複数を含む：個体の代謝(又は代謝速度)50

を増大させる、脂肪細胞のグルコース取り込みを減少させる、脂肪細胞からのレプチンの遊離を増大させる、個体のトリグリセリドを減少させる、そして個体の遊離脂肪酸を減少させる。FGF-19の幾つかの活性がFGF-19によって直接的に誘導され、幾つかは間接的に誘導されるが、各々がFGF-19の存在の結果であり、そうでなければ、FGF-19の非存在下ではそのような結果とならないことは、理解されている。

【0058】

「アンタゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然FGF-19ポリペプチドの生物学的活性を阻止、阻害、又は中和する任意の分子を指す。同様に「アゴニスト」なる用語は最も広い意味で用いられ、ここに開示した天然FGF-19ポリペプチドの生物学的活性を模倣する任意の分子を指す。好適なアゴニスト又はアンタゴニスト分子は特に、アゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、天然FGF-19ポリペプチドの断片又はアミノ酸配列変異体、ペプチド、有機小分子、などを含む。FGF-19ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストの同定方法は、FGF-19ポリペプチドに通常付随する1つ又は複数の生物学的活性の変化を測定することを含みうる。

【0059】

ここで使用される「治療」とは、治癒的処置、予防的療法及び防止的療法の両方を意味し、患者は標的とする病理学的状態又はしつかんを防止又は低下（減少）させられる。治療が必要なものとは、既に疾患に罹っているもの、並びに疾患に罹りやすいもの又は疾患が防止されているものを含む。

「慢性」投与とは、急性様式とは異なり連続的な様式での薬剤を投与し、初期の治療効果（活性）を長時間に渡って維持することを意味する。「間欠」投与とは、中断無く連続的になされるのではなく、むしろ本質的に周期的になされる処理である。

【0060】

治療の対象のための「哺乳動物」は、ヒト、家庭及び農業用動物、動物園、スポーツ、又はペット動物、例えばヒツジ、イヌ、ウマ、ネコ、ウシなどを含む哺乳類に分類される任意の動物を意味する。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0061】

「個体」とは、すべての対象であり、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。「肥満」は、体重（kg）をメートルで表した身長の2乗で割ることで計算する、哺乳動物の体重指数（ボディマスインデックス、BMI）の少なくとも25.9の状態に相当する。通常は、平均的な体重のヒトは、19.9から25.9未満のBMIである。ここで肥満とは、遺伝的又は環境的な原因であろうと、すべての原因に起因しうる。結果として肥満となりうる、又は肥満の原因となりうる疾患の例としては、食べ過ぎ及び過食症、多囊胞性卵巣症候群、頭蓋咽頭腫、プラダーリ・ウイリー症候群、フレーリッヒ症候群、II型糖尿病、成長ホルモン欠乏患者、正常範囲内の低身長変異、ターナー症候群、並びに、例えば急性リンパ性白血病の子供など、代謝活性が低下や全無脂肪量のパーセントとしての安静時エネルギー消費量の低下を示す他の生理学的症状を含む。

【0062】

「肥満に関連する症状」とは、感染症などの皮膚疾患に限定されないが、静脈瘤、黒色表皮腫、及び湿疹、運動不耐性、糖尿病、インシュリン抵抗性、高血圧、高脂血症、胆石症、変形性関節症、歯障害、血栓疾患、癌、及び冠状動脈性心臓病、特に個体における高トリグリセリド及び遊離脂肪酸に関連した心疾患などの、肥満の結果の又は肥満によって悪化する症状に相当する。

1つ又は複数の更なる治療薬剤との「組み合わせに」による投与には、順序を問わない同時（共同の）及び連続投与が含まれる。

【0063】

ここで用いられる「担体」は、製薬的に許容されうる担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、用いられる用量及び濃度でそれらに暴露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に許容されうる担体は、水性pH緩衝溶液であることが多い。生理学的に許容

10

20

30

40

50

されうる担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸塩のバッファー；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；疎水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン；グルコース、マンノース又はデキストランを含む单糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール又は祖ルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び/又は非イオン性界面活性剤、例えばTWEEN（商品名）、ポリエチレングリコール（PEG）、及びPLURONICS（商品名）を含む。

【0064】

「抗体断片」は、無傷の抗体の一部、好ましくは無傷の抗体の抗原結合又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びFv断片；ダイアボディ（diabodies）；直鎖状抗体（Zapataら、Protein Eng. 8(10)：1057-1062 [1995]）；单鎖抗体分子；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は单一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Fc」断片と命名される。ペプシン処理はF(ab')₂断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

【0065】

「Fv」は、完全な抗原認識及び結合部位を含む最小の抗体断片である。この領域は、密接に非共有結合した1本の重鎖と1本の軽鎖の可変領域の二量体からなる。この配置において各ドメインの3つのCDRが相互作用してVH-VL二量体の表面に抗原結合部位を決定する。集合的に、6つのCDRは抗体に抗原結合性を付与する。しかしながら、单一の可変ドメイン（又は抗原に特異的な3つのCDRのみを含んでなるFvの半分）でさえ、結合部位全体よりは低い親和性であるが、抗原を認識し結合する能力を持つ。

またFab断片は、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン（CH1）も含む。Fab断片は、抗体ヒンジ領域からの1つ又は複数のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に幾つかの残基が付加されていることによりFab断片と相違する。ここで、Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が遊離のチオール基を持つFab'を表す。F(ab')₂抗体断片は、最初はFab'断片の対として生成され、それらの間にヒンジシステインを有する。抗体断片の他の化学的結合も知られている。

【0066】

任意の脊椎動物種からの抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる二つの明らかに異なる型の一方に分類される。

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンは異なるクラスに分類できる。免疫グロブリンの五つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMがあり、それらの幾つかは更にサブクラス（アイソタイプ）、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及びIgA2に分類される。

【0067】

「单鎖Fv」又は「sFv」抗体断片は、抗体のVH及びVLドメインを含む抗体断片を含み、これらのドメインは单一のポリペプチド鎖に存在する。好ましくは、FvポリペプチドはVH及びVLドメイン間にポリペプチドリンクターを更に含み、それはsFvが抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。sFvの概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)のPluckthunを参照のこと。

【0068】

「ダイアボディ（diabodies）」なる用語は、二つの抗原結合部位を持つ小型の

10

20

30

40

50

抗体断片を指し、その断片は同じポリペプチド鎖（V H - V L）内で軽鎖可変ドメイン（V L）に結合した重鎖可変ドメイン（V H）を含む。同じ鎖の二つのドメイン間に対形成するには短すぎるリンクカーを用いることにより、ドメインは強制的に他の鎖の相補的ドメインと対形成して二つの抗原結合部位を生成する。ダイアボディは、例えば、E P 4 0 4, 0 9 7 ; W O 9 3 / 1 1 1 6 1 ; 及び H o l l i n g e r ら, P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 0 : 6 4 4 4 - 6 4 4 8 (1 9 9 3) により十分に記載されている。

【0069】

「単離された」抗体は、その自然環境の成分から同定され分離及び／又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、その抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。好みしい実施態様において、抗体は、(1)ローリ法 (L o w r y m e t h o d) で測定した場合 9 5 % を越える抗体、最も好みしくは 9 9 重量 % を越えるまで、(2)スピニングカップシーケンエネーターを使用することにより、少なくとも 1 5 残基の N 末端あるいは内部アミノ酸配列を得るのに充分なほど、あるいは、(3)クーマシーブルーあるいは好みしくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下での S D S - P A G E による均一性まで精製される。単離された抗体には、抗体の自然環境の少なくとも 1 つの成分が存在しないため、組換え細胞内のインサイトの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも 1 つの精製工程により調製される。

【0070】

「標識」なる語は、ここで用いられる場合、抗体に直接又は間接的に抱合して「標識」抗体を生成する検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識は、それ自身検出可能でもよく（例えば、放射性標識又は蛍光標識）、又は酵素標識の場合、検出可能な基質化合物又は組成物の化学変換を触媒してもよい。

【0071】

「固相」とは、本発明の抗体がそれに付着することのできる非水性マトリクスを意味する。ここに意図する固相の例は、部分的又は全体的に、ガラス（例えば、孔制御ガラス）、多糖類（例えばアガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコール及びシリコーンから形成されたものを含む。或る種の実施態様では、内容に応じて、固相はアッセイプレートのウェルを構成することができ、その他では精製カラム（例えばアフィニティクロマトグラフィーカラム）とすることもできる。また、この用語は、米国特許第 4, 275, 149 号に記載されたような、別個の粒子の不連続な固相も包含する。

【0072】

「リポソーム」は、種々の型の脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤からなる小型の小胞であり、哺乳動物への薬物（例えば F G F - 1 9 ポリペプチド又はそれに対する抗体）の送達に有用である。リポソームの成分は、通常は生体膜の脂質配列に類似する二層形式に配列させる。

「小分子」は約 5 0 0 ダルトン以下の分子量を有するものとここでは定義される。

【0073】

10

20

30

表 1

30

40

表1(続き)

```

/*
 */
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>
#define MAXJMP 16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP 24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define J MPS 1024      /* max jmps in an path */
#define MX 4            /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */
#define DMAT 3          /* value of matching bases */
#define DMIS 0          /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0 8          /* penalty for a gap */
#define DINS1 1          /* penalty per base */
#define PINS0 8          /* penalty for a gap */
#define PINS1 4          /* penalty per residue */

struct jmp {
    short n[MAXJMP];      /* size of jmp (neg for delay) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
    /* limits seq to 2^16 - 1 */
};

struct diag {
    int score;            /* score at last jmp */
    long offset;          /* offset of prev block */
    short ijmp;           /* current jmp index */
    struct jmp jp;        /* list of jmps */
};

struct path {
    int spc;              /* number of leading spaces */
    short n[J MPS];       /* size of jmp (gap) */
    int x[J MPS];          /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char *ofile;           /* output file name */
char *namex[2];        /* seq names: getseqs() */
char *prog;             /* prog name for err msgs */
char *seqx[2];          /* seqs: getseqs() */
int dmax;              /* best diag: nw() */
int dmax0;              /* final diag */
int dna;                /* set if dna: main() */
int endgaps;           /* set if penalizing end gaps */
int gapx, gapy;        /* total gaps in seqs */
int len0, len1;          /* seq lens */
int ngapx, ngapy;        /* total size of gaps */
int smax;                /* max score: nw() */
int *xbm;                /* bitmap for matching */
long offset;           /* current offset in jmp file */
struct diag *dx;        /* holds diagonals */
struct path pp[2];      /* holds path for seqs */
char *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char *getseq(), *g_calloc();

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: progs file1 file2
 *   where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 *   The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
 *   Any lines beginning with ';' or '>' or '<' are ignored
 *   Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 *   A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 *   Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"
static    _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};
static    _pbval[26] = {
    1, 2|(1 < < ('D'-'A'))|(1 < < ('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFF, 1 < < 10, 1 < < 11, 1 < < 12, 1 < < 13, 1 < < 14,
    1 < < 15, 1 < < 16, 1 < < 17, 1 < < 18, 1 < < 19, 1 < < 20, 1 < < 21, 1 < < 22,
    1 < < 23, 1 < < 24, 1 < < 25|(1 < < ('E'-'A'))|(1 < < ('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
{
    int      ac;
    char    *av[];
    {
        prog = av[0];
        if (ac != 3) {
            fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
            fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
            fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
            fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
            fprintf(stderr, "Output is in the file 'align.out'\n");
            exit(1);
        }
        namex[0] = av[1];
        namex[1] = av[2];
        seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
        seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
        xbm = (dna)? _dbval : _pbval;
        endgaps = 0;           /* 1 to penalize endgaps */
        ofile = "align.out";   /* output file */
        nw();                 /* fill in the matrix, get the possible jmps */
        readjmps();            /* get the actual jmps */
        print();               /* print stats, alignment */
        cleanup(0);            /* unlink any tmp files */
    }
}

```

10

main

20

30

40

Page 1 of nw.c

【 0 0 7 6 】

表1(続き)

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw0
{
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely;    /* keep track of dely */
    int       ndelx, delx;     /* keep track of delx */
    int       *tmp;            /* for swapping row0, row1 */
    int       mis;             /* score for each type */
    int       ins0, ins1;      /* insertion penalties */
    register  id;              /* diagonal index */
    register  ij;              /* jmp index */
    register  *col0, *col1;    /* score for curr, last row */
    register  xx, yy;          /* index into seqs */
    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diag", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;      /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;
    /* fill in match matrix
     */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0 + ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongoing del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }
}

/* update penalty for del in y seq;
 * favor new del over ongoing del
 */
if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else {
        delx -= ins1;
        ndelx++;
    }
} else {
    if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
        ndelx = 1;
    } else
        ndelx++;
}

/* pick the maximum score; we're favoring
 * mis over any del and delx over dely
 */

```

...nw

10

20

30

40

表1(続き)

```

...nw
id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij] + MX) || mis > dx[id].score + DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = nodelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
}
else {
    col1[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij] + MX) || mis > dx[id].score + DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = dely[yy];
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        col1[yy] -= ins0 + ins1 * (len1 - yy);
    if (col1[yy] > smax) {
        smax = col1[yy];
        dmax = id;
    }
}
if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0 + ins1 * (len0 - xx);
if (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```

10 20 30 40

Page 4 of nw.c

表1(続き)

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * germat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC      3
#define P_LINE   256      /* maximum output line */
#define P_SPC    3         /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen;           /* set output line length */
FILE *fx;           /* output file */

print()                                print
{
    int    ix, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    sprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    sprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    ix = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        ix -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        ix -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(ix, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)           getmat
{
    int      lx, ly;                      /* "core" (minus endgaps) */
    int      firstgap, lastgap;           /* leading/trailing overlap */
{
    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char    outx[32];
    double   pct;
    register  n0, n1;
    register char  *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }
    /* pct homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*double)nm/(double)lx;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "< %d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
            nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

printf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);                                ...format
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",                                             
        ngapx, (dna)? "base": "residue", (ngapx == 1)? ":" : "s");
    sprintf(fx, "%s", outx);
}

printf(fx, " ", gaps in second sequence: %d", gapy);                                 10
if (gapy) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",                                             
        ngapy, (dna)? "base": "residue", (ngapy == 1)? ":" : "s");
    sprintf(fx, "%s", outx);
}
if (dna)
    sprintf(fx,
    "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
    smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
else
    sprintf(fx,
    "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
    smax, PINS0, PINS1);
if (endgaps)
    sprintf(fx,
    "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
    firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? ":" : "s",
    lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? ":" : "s");
else
    sprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");                                         20

}

static nm;          /* matches in core -- for checking */
static lmax;        /* lengths of stripped file names */
static ij[2];        /* jmp index for a path */
static nc[2];        /* number at start of current line */
static ni[2];        /* current elem number -- for gapping */
static siz[2];
static char *ps[2];    /* ptr to current element */
static char *po[2];    /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */                                         30

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()                                         pr_align
{
    int nn;          /* char count */
    int more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}                                         40

```

表1(続き)

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;
            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]]++;
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]]++;
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}
/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()                                                 dumpblock
{
    register i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

【 0 0 8 3 】

表1(続き)

```

...dumpblock
(void)putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}
/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
{
    int      ix;      /* index in out[] holding seq line */
    char      nline[P_LINE];
    register  i, j;
    register char  *pn, *px, *py;
    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void)putc(*pn, fx);
    (void)putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
{
    int      ix;
    ...

```

表1(続き)

```

int          i;
register char *px;

for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
  (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
  (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from 1)
 * nc[] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
  (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()                                stars
{
  int          i;
  register char *p0, *p1, cx, *px;

  if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(p0[0]) == ' ') ||
      !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(p0[1]) == ' '))
    return;
  px = star;
  for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
    *px++ = ' ';

  for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
    if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

      if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
        cx = '*';
        nm++;
      }
      else if (!dma && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
        cx = '.';
      else
        cx = ' ';
    }
    else
      cx = ' ';
    *px++ = cx;
  }
  *px++ = '\n';
  *px = '\0';
}

```

40

表1(続き)

```

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
    char    *pn;      /* file name (may be path) */
{
    register char    *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjmps() -- get the good jmps, from tmp file if necessary
 * writejmps() -- write a filled array of jmps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXX";           /* tmp file for jmps */
FILE *fj;

int cleanup();                            /* cleanup tmp file */
long lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)
    int i;
{
    if (i)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len)
    char *file;    /* file name */
    int len;      /* seq len */
{
    char line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int natgc, tlen;
    FILE *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        sprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        sprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
}

cleanup
getseq

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

py = pseq + 4;
*tlen = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}

char *
g_calloc(msg, nx, sz)                                g_calloc
    char    *msg;          /* program, calling routine */
    int     nx, sz;        /* number and size of elements */
{
    char    *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()                                            readjmps
{
    int             fd = -1;
    int             siz, i0, i1;
    register int i, j, xx;

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup();
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].jmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;
        }
    }
}

```

表1(続き)

```

...readjmps
if(j < 0 && dx[dmax].offset && l) {
    (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
    (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
    (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
    dx[dmax].jmp = MAXJMP-1;
}
else
    break;
}
if(i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if(j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if(siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
    /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if(siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
    /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}
/* reverse the order of jmps
 */
for(j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for(j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if(fd >= 0)
    (void) close(fd);
if(lj) {
    (void) unlink(jname);
    lj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

10

20

30

40

表1(続き)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)                                writejmps
  int      ix;
{
  char    *mktemp();
  if (!fj) {
    if (mktemp(jname) < 0) {
      fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
      cleanup(1);
    }
    if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
      fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
      exit(1);
    }
  }
  (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
  (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

10

20

30

40

【 0 0 9 0 】

表2

PRO	XXXXXXXXXXXXXX	(長さ=15アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXXYYYYYY	(長さ=12アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2で決定された、2つのポリペプチド配列間で一致したアミノ酸残基の数)を
(PRO ポリペプチドのアミノ酸残基の総数)で割る =

 $5 \div 15 = 33.3\%$

【 0 0 9 1 】

表3

PRO	XXXXXXXXXX	(長さ=10アミノ酸)
比較タンパク質	XXXXXXYYYYYYZZYZ	(長さ=15アミノ酸)

% アミノ酸配列同一性 =

(ALIGN-2で決定された、2つのポリペプチド配列間で一致したアミノ酸残基の数)を
(PRO ポリペプチドのアミノ酸残基の総数)で割る =

 $5 \div 10 = 50\%$

【 0 0 9 2 】

表4

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(長さ=14ヌクレオチド)
比較 DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(長さ=16ヌクレオチド)

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2 で決定された、 2つの核酸配列間で一致したヌクレオチドの数)を
(PRO-DNA 核酸配列のヌクレオチドの総数)で割る =

$$6 \div 14 = 42.9\%$$

10

【 0 0 9 3 】

表5

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNN	(長さ=12ヌクレオチド)
比較 DNA	NNNNLLLVV	(長さ=9ヌクレオチド)

% 核酸配列同一性 =

(ALIGN-2 で決定された、 2つの核酸配列間で一致したヌクレオチドの数)を
(PRO-DNA 核酸配列のヌクレオチドの総数)で割る =

$$4 \div 12 = 33.3\%$$

20

【 0 0 9 4 】

I I . 本発明の組成物と方法

A . 全長 F G F - 1 9 ポリペプチド

本発明は、本出願で F G F - 1 9 と（または U N Q 3 3 4 とも）命名されるポリペプチドをコードする新規に同定され単離されたヌクレオチド配列を提供する。特に下記の実施例でさらに詳細に説明するように、 F G F - 1 9 ポリペプチドをコードする c D N A が同定され単離された。別々の発現ラウンドで生成されたタンパク質には異なる P R O 番号が与えられるが、 U N Q 番号は任意の与えられた D N A 及びコード化タンパク質に特有のものであり、変わることはないことを記しておく。しかしながら、簡単にするために、本明細書では、 D N A 4 9 4 3 5 - 1 2 1 9 によりコード化されるタンパク質並びに上記の F G F - 1 9 (しばしば P R O 5 3 3 とも称される) の定義に含まれるさらなる天然相同体と変異体は、それらの起源又は調製態様に関わらず、「 F G F - 1 9 」と称する。

30

【 0 0 9 5 】

下記の実施例に開示するように、 D N A 4 9 4 3 5 - 1 2 1 9 とここで命名された c D N A クローンが A T C C に寄託されている。該クローンの実際のヌクレオチド配列は、この分野で日常的な方法を用いて寄託されたクローンの配列決定を行うことにより当業者によって容易に決定され得る。予測されるアミノ酸配列は、ヌクレオチド配列から常套的技量を用いて決定できる。ここに記載した F G F - 1 9 ポリペプチド及びコード化核酸について、本出願人は、その時点で入手可能な配列情報と最も良好に合致する特定可能な読み枠であるものを同定した。

40

【 0 0 9 6 】

上記にて照会した A L I G N - 2 配列アラインメントコンピュータープログラムを用いることで、全長天然配列 F G F - 1 9 (F i g . 2 及び配列番号： 2 に示す) が A F 0 0 7 2 6 8 _ 1 と特定のアミノ酸配列同一性を有することが見出されている。従って、本出願において開示された F G F - 1 9 ポリペプチドは、新規に同定された纖維芽細胞成長因子

50

タンパク質ファミリーのメンバーであり、1つ又は複数の生物学的及び／又は免疫学的活性又はこのタンパク質ファミリーにとって典型的な特性を有しうると現在考えられている。

【0097】

B. FGF-19変異体

ここに記載した全長天然配列 FGF-19 ポリペプチドに加えて、FGF-19 変異体も調製できると考えられる。FGF-19 変異体は、FGF-19 DNA に適当なヌクレオチド変化を導入することにより、及び／又は所望の FGF-19 ポリペプチドを合成することにより、調製できる。当業者であれば、グリコシリ化部位の数又は位置を変えたりあるいは膜固着特性をえるように、アミノ酸変化が FGF-19 の翻訳後プロセスを変えることを理解するであろう。

【0098】

天然全長配列 FGF-19 又はここに記載した FGF-19 の様々なドメインにおける変異は、例えば米国特許第 5,364,934 号に記載されている保存的及び非保存的変異についての技術及び指針の何れかを用いてなすことができる。変異は、天然配列 FGF-19 と比較して FGF-19 のアミノ酸配列が変化することになる FGF-19 をコードする 1 つ又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってよい。場合によっては、変異は少なくとも一つのアミノ酸の FGF-19 の 1 つ又は複数のドメインの任意の他のアミノ酸による置換である。アミノ酸残基が所望の活性に悪影響を与えることなく挿入、置換又は欠失されうるかの指針は、FGF-19 の配列を、相同な既知のタンパク質分子のものと比較し、相同性の高い領域になされるアミノ酸配列変化の数を最小にすることによって見出されうる。アミノ酸置換は、一のアミノ酸の類似した構造及び／又は化学的性質を持つ他のアミノ酸での置換、例えばロイシンのセリンでの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果とすることができます。挿入又は欠失は、場合によっては約 1 から 5 のアミノ酸の範囲内とすることができる。許容される変異は、配列においてアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に行い、得られた変異体について全長又は成熟天然配列が示す活性を試験することにより決定されうる。

【0099】

FGF-19 ポリペプチド断片がここに提供される。このような断片は、例えば全長天然タンパク質と比較した際に、N 末端又は C 末端で切断されてもよく、又は内部残基を欠いていてもよい。ある種の断片は、FGF-19 ポリペプチドの所望の生物学的活性に必須ではないアミノ酸残基を欠いている。

FGF-19 断片は、多くの一般的な技術の任意のものによって調製されうる。所望のペプチド断片は化学合成されてもよい。代替方法は、酵素での消化、例えば特定のアミノ酸残基によって定まる部位でタンパク質を切断することが知られた酵素でタンパク質を処理することにより、あるいは適当な制限酵素で DNA を消化して所望の断片を単離することにより FGF-19 断片を產生することを含む。さらに他の好適な技術は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により、所望のポリペプチド断片をコードする DNA 断片を単離し増幅することを含む。DNA 断片の所望の末端を定めるオリゴヌクレオチドは、PCR の 5' 及び 3' プライマーに用いられる。好ましくは、FGF-19 ポリペプチド断片は、Fig. 2 (配列番号: 2) に示した天然 FGF-19 ポリペプチドと少なくとも一つの生物学的及び／又は免疫学的活性を共有する。

【0100】

特定の実施態様では、関心ある保存的置換を、好ましい置換との表題で表 6 に示す。このような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表 6 に置換例と標記され、又は以下にアミノ酸分類についてさらに記載されるような、より実質的な変化が導入され、生成物がスクリーニングされる。

【0101】

10

20

30

40

表6

元の残基	例示的置換	好ましい置換	
Ala(A)	val; Leu; ile	val	
Arg(R)	lys; gln; asn	lys	
Asn(N)	gln; his; lys; arg	gln	
Asp(D)	glu	glu	
Cys(C)	ser	ser	
Gln(Q)	asn	asn	
Gln(E)	asp	asp	
Gly(G)	pro; ala	ala	
His(H)	asn; gln; lys; arg	arg	10
Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; ノルロイシン	leu	
Leu(L)	ノルロイシン; ile; val; met; ala; phe	ile	
Lys(K)	arg; gln; asn	arg	
Met(M)	leu; phe; ile	leu	
Phe(F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu	
Pro(P)	ala	ala	
Ser(S)	thr	thr	
Thr(T)	ser	ser	20
Trp(W)	tyr; phe	tyr	
Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	phe	
Val(V)	ile; leu; met; phe; ala; ノルロイシン	leu	

【0102】

F G F - 1 9 ポリペプチドの機能又は免疫学的同一性の実質的修飾は、(a) 置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b) 標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は(c) 側鎖の嵩を維持するそれらの効果において有意に異なる置換基を選択することにより達成される。天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいてグループ分けすることができる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン， met , ala , val , leu , ile ;
- (2) 中性の親水性：cys , ser , thr ;
- (3) 酸性：asp , glu ;
- (4) 塩基性：asn , gln , his , lys , arg ;
- (5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：gly , pro ; 及び
- (6) 芳香族：trp , tyr , phe .

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。また、そのように置換された残基は、保存的置換部位、より好ましくは残された(非保存)部位に導入されうる。

【0103】

変異は、オリゴヌクレオチド媒介(部位特異的)突然変異誘発、アラニンスキャンニング、及びPCR突然変異誘発等の当該分野において公知の技術を使用して行わせることができる。部位特異的突然変異誘発 [Carterら, Nucl. Acids Res. , 13 : 4331 (1986) ; Zollerら, Nucl. Acids Res. , 10 : 6487 (1987)] 、カセット突然変異誘発 [Wellsら, Gene , 34 : 315 (1985)] 、制限選択突然変異誘発 [Wellsら, Philos. Trans. R. Soc. London Ser A , 317 : 415 (1986)] 又は他の周知の技術が、FGF-19変異体DNAを製造するために、クローン化されたDNAに実施できる。

10

20

30

40

50

【0104】

また、隣接配列に沿って1つ又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャンニングアミノ酸分析法を用いることができる。好ましいスキャンニングアミノ酸は比較的小小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。典型的には、アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で好ましいスキャンニングアミノ酸である [Cunningham and Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]。アラニンもまた最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。さらに、それは埋もれた位置と露出した位置の両方に見いだされることが多い [Creighton, The Proteins, (W. H. Freeman & Co., N. Y. 10); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]。アラニン置換が十分な量の変異体を生じない場合は、アイソテリック (isoteric) アミノ酸を用いることができる。

【0105】

C. FGF-19の修飾

FGF-19の共有結合的修飾は本発明の範囲内に含まれる。共有結合的修飾の一つのタイプは、FGF-19ポリペプチドの標的とするアミノ酸残基を、FGF-19の選択された側鎖又はN又はC末端残基と反応可能な有機誘導体化剤と反応させることを含む。二官能性剤での誘導体化は、例えば、抗FGF-19抗体の精製方法及びその逆で用いるためにFGF-19を水不溶性支持体マトリクスあるいは表面に架橋させるのに有用である。通常用いられる架橋剤は、例えば、1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば4-アジドサリチル酸エステル、3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)等のジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1,8-オクタン等の二官能性マレイミド及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)ジチオ]プロピオイミデート等の試薬を含む。

【0106】

他の修飾は、グルタミニル及びアスパラギニル残基の各々対応するグルタミル及びアスパルチル残基への脱アミノ化、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル又はトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の-N-アミノ基のメチル化 [T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., サンフランシスコ, pp. 79-86 (1983)]、N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化を含む。

【0107】

本発明の範囲に含まれるFGF-19ポリペプチドの共有結合的修飾の他の型は、ポリペプチドの天然グリコシル化パターンの変更を含む。「天然グリコシル化パターンの変更」は、この目的に対しては、天然配列FGF-19に見いだされる1つ又は複数の炭水化物部分の欠失(存在するグリコシル化部位の除去又は化学的及び/又は酵素的手段によるグリコシル化の削除のいずれかによる)、及び/又は天然配列FGF-19に存在していない1つ又は複数のグリコシル化部位の付加を意味することが意図されている。さらに、この語句は、存在する様々な炭水化物部分の性質及び割合の変化を含む、天然タンパク質のグリコシル化における定性的変化を含む。

【0108】

FGF-19ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加はアミノ酸配列の変更を伴ってよい。この変更は、例えば、1つ又は複数のセリン又はトレオニン残基の天然配列FGF-19(O-結合グリコシル化部位)への付加、又は置換によってなされてもよい。FGF-19アミノ酸配列は、場合によっては、DNAレベルでの変化、特に、FGF-19ポリペプチドをコードするDNAを予め選択された塩基において変異させ、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンを生成させることを通して変更されてもよい。

F G F - 1 9 ポリペプチド上に炭水化物部分の数を増加させる他の手段は、グリコシドのポリペプチドへの化学的又は酵素的結合による。このような方法は、この技術分野において、例えば、1987年9月11日に公開された国際公開87/05330、及びAp1in及びWriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)に記載されている。

【0109】

F G F - 1 9 ポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的又は酵素的に、あるいはグルコシル化の標的となるアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によってなすことができる。化学的脱グリコシル化技術は、当該分野で知られており、例えば、Hakimuddinら, Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (1987)により、及びEdgeら, Anal. Biochem., 118: 131 (1981)により記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakuraら, Meth. Enzymol. 138: 350 (1987)に記載されているように、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼを用いることにより達成される。

F G F - 1 9 の共有結合的修飾の他の型は、F G F - 1 9 ポリペプチドを、種々の非タンパク質様ポリマーの一つ、例えばポリエチレングリコール (PEG)、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンへの、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号又は第4,179,337号に記載された方法で結合させることを含む。

また、本発明のF G F - 1 9 は、他の異種ポリペプチド又はアミノ酸配列に融合したF G F - 1 9 を含むキメラ分子を生成するように修飾されてもよい。

【0110】

一実施態様では、このようなキメラ分子は、抗タグ抗体が選択的に結合できるエピトープを提供するタグポリペプチドとF G F - 1 9 との融合を含む。エピトープタグは、一般的にはF G F - 1 9 のアミノ末端又はカルボキシル末端に位置する。このようなF G F - 1 9 のエピトープタグ形態の存在は、タグポリペプチドに対する抗体を用いて検出することができる。また、エピトープタグの提供は、抗タグ抗体又はエピトープタグに結合する他の型の親和性マトリクスを用いたアフィニティ精製によってF G F - 1 9 を容易に精製できるようにする。種々のタグポリペプチド及びそれら各々の抗体は当該分野で良く知られている。例としては、ポリ-ヒスチジン (poly-his) 又はポリ-ヒスチジン-グリシン (poly-his-gly) タグ；flu HAタグポリペプチド及びその抗体 [12CA5 (Fieldら, Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)] ；c-mycタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7及び9E10抗体 [Evansら, Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)] ；及び単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D (gD) タグ及びその抗体 [Paborskyら, Protein Engineering, 3(6): 547-553 (1990)] を含む。他のタグポリペプチドは、フラッグペプチド [Hoppら, Biotechnology, 6: 1204-1210 (1988)] ；KT3エピトープペプチド [Martinら, Science, 255: 192-194 (1992)] ；-チューブリンエピトープペプチド [Skinnerら, J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)] ；及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuthら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397 (1990)] を含む。

【0111】

別の実施態様では、キメラ分子はF G F - 1 9 の免疫グロブリン又は免疫グロブリンの特定領域との融合体を含んでもよい。キメラ分子の二価形態（「イムノアドヘシン」とも呼ばれる）については、そのような融合体はIgG分子のFc領域であり得る。Ig融合体は、好ましくはIg分子内の少なくとも一つの可変領域に代えてF G F - 1 9 ポリペプチ

ドの可溶性（膜貫通ドメイン欠失又は不活性化）形態を含む。特に好ましい実施態様では、免疫グロブリン融合体は、IgG1分子のヒンジ、CH2及びCH3、又はヒンジ、CH1、CH2及びCH3領域を含む。免疫グロブリン融合体の製造については、1995年6月27日発行の米国特許第5,428,130号を参照のこと。

【0112】

D. FGF-19の調製

以下の説明は、主として、FGF-19核酸を含むベクターで形質転換又は形質移入された細胞を培養することによりFGF-19を生産する方法に関する。もちろん、当該分野においてよく知られている他の方法を用いてFGF-19を調製することもできると考えられる。例えば、FGF-19配列、又はその一部は、固相技術を用いた直接ペプチド合成法によって生産してもよい[例えば、Stewartら, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., サンフランシスコ, カリフォルニア(1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154(1963)参照]。手動の技術又は自動によるインビトロタンパク質合成法を実施してもよい。自動合成法は、例えば、アプライド・バイオシステムズ・ペプチド合成機(フォスター・システムズ、カリフォルニア)を用いて、製造者の指示により実施することができる。FGF-19の種々の部分は、別々に化学的に合成され、化学的又は酵素的方法を用いて結合させて全長FGF-19を生産してもよい。

【0113】

1. FGF-19をコードするDNAの単離

FGF-19をコードするDNAは、FGF-19 mRNAを保有していてそれを検出可能なレベルで発現すると考えられる組織から調製されたcDNAライブラリーから得ることができる。従って、ヒトFGF-19 DNAは、実施例に記載されるように、ヒトの組織から調製されたcDNAライブラリーから簡便に得ることができる。またFGF-19-コード化遺伝子は、ゲノムライブラリーから又は公知の合成方法(例えば、自動化核酸合成)により得ることもできる。

ライブラリーは、関心ある遺伝子あるいはその遺伝子によりコードされるタンパク質を同定するために設計されたプローブ(FGF-19に対する抗体又は少なくとも約20-80塩基のオリゴヌクレオチド等)によってスクリーニングできる。選択されたプローブによるcDNA又はゲノムライブラリーのスクリーニングは、例えばSambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されている標準的な手順を使用して実施することができる。FGF-19をコードする遺伝子を単離する他の方法はPCR法を使用するものである[Sambrookら, 上掲; Dieffenbachら, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]。

【0114】

下記の実施例には、cDNAライブラリーのスクリーニング技術を記載している。プローブとして選択されたオリゴヌクレオチド配列は、充分な長さで、疑陽性が最小化されるよう充分に明瞭でなければならない。オリゴヌクレオチドは、スクリーニングされるライブラリー内のDNAとのハイブリダイゼーション時に検出可能であるように標識されていることが好ましい。標識化の方法は当該分野において良く知られており、³²P標識されたATPのような放射線標識、ビオチン化あるいは酵素標識の使用が含まれる。中程度の厳密性及び高度の厳密性を含むハイブリダイゼーション条件は、上掲のSambrook等に与えられている。

【0115】

このようなライブラリースクリーニング法において同定された配列は、Genbank等の公共データベース又は個人の配列データベースに寄託され公衆に利用可能とされている

10

20

30

40

50

周知の配列と比較及びアラインメントすることができる。分子の決定された領域内又は全長に渡っての（アミノ酸又はヌクレオチドレベルのいずれかでの）配列同一性は、この分野で知られた、そしてここに記載した方法を用いて決定することができる。

タンパク質コード配列を有する核酸は、初めてここで開示された推定アミノ酸配列を使用し、また必要ならば、cDNAに逆転写されなかったmRNAの生成中間体及び先駆物質を検出する上掲のSambrook等に記述されているような従来のプライマー伸展法を使用し、選択されたcDNA又はゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより得られる。

【0116】

2. 宿主細胞の選択及び形質転換

宿主細胞を、ここに記載したFGF-19生産のための発現又はクローニングベクターで形質移入又は形質転換し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に変性された常套的栄養培地で培養する。培養条件、例えば培地、温度、pH等々は、過度の実験をすることなく当業者が選ぶことができる。一般に、細胞培養の生産性を最大にするための原理、プロトコール、及び実用技術は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler編 (IRL Press, 1991) 及びSambrookら、上掲に見出すことができる。

【0117】

原核生物細胞形質移入及び真核生物細胞形質転換の方法、例えば、CaCl₂、CaPO₄、リポソーム媒介及びエレクトロポレーションは当業者に知られている。用いられる宿主細胞に応じて、その細胞に対して適した標準的な方法を用いて形質転換はなされる。前掲のSambrook等に記載された塩化カルシウムを用いるカルシウム処理又はエレクトロポレーションが、一般的に原核生物に対して用いられる。アグロバクテリウム・トウメファシエンスによる感染が、Shawら, Gene, 23:315 (1983) 及び1989年6月29日公開のWO89/05859に記載されているように、或る種の植物細胞の形質転換に用いられる。このような細胞壁のない哺乳動物の細胞に対しては、Graham及びvan der Eb, Virology, 52:456-457 (1978) のリン酸カルシウム沈降法を使用することができる。哺乳動物細胞の宿主系形質転換の一般的な態様は米国特許第4,399,216号に記載されている。酵母菌中への形質転換は、典型的には、Van Solingenら, J. Bact., 130:946 (1977) 及びHsiaoら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3829 (1979) の方法に従って実施される。しかしながら、DNAを細胞中に導入する他の方法、例えば、核マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、無傷の細胞、又はポリカチオン、例えばポリブレン、ポリオルニチン等を用いる細菌プロトプラスト融合もまた用いることもできる。哺乳動物細胞を形質転換するための種々の技術については、Keownら, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) 及びMansourら, Nature, 336:348-352 (1988) を参照のこと。

【0118】

ここに記載のベクターにDNAをクローニングあるいは発現するために適切な宿主細胞は、原核生物、酵母菌、又は高等真核生物細胞である。適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えば大腸菌のような腸内細菌科を含む。種々の大腸菌株が公衆に利用可能であり、例えば、大腸菌K12株MM294 (ATCC31,446)；大腸菌X1776 (ATCC31,537)；大腸菌株W3110 (ATCC27,325) 及びK5772 (ATCC53,635) である。他の好ましい原核動物宿主細胞は、大腸菌、例えば、E. coli、エンテロバクター、エルビニア (Erwinia)、クレブシエラ (Klebsiella)、プロテウス (Proteus)、サルモネラ、例えば、ネズミチフス菌、セラチア、例えば、セラチアマルセサンス (Serratia marcescans)、及び赤痢菌、並びに桿

10

20

30

40

50

菌、例えばバシリスブチリス (*B. subtilis*) 及びバシリリチエニフォルミス (*B. licheniformis*) (例えば、1989年4月12日発行のDD266, 710に記載されたバシリリチエニフォルミス41P)、シュードモナス、例えば緑膿筋及びストレプトマイセスなどの腸内細菌科を含む。これらの例は限定ではなく例示である。株W3110は、組換えDNA生産発行のための共通の宿主株であるので一つの特に好みしい宿主又は親宿主である。好みしくは、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌する。例えば、株W3110は、細胞に外来のタンパク質をコードする遺伝子における遺伝子変異をするように修飾してもよく、そのような宿主の例としては、完全な遺伝子型tonAを有する大腸菌W3110株1A2；完全な遺伝子型tonA prt3を有する大腸菌W3110株9E4；完全な遺伝子型tonA prt3 phoA E1 10 (argF-lac)169 degP ompT kan^rを有する大腸菌W3110株27C7 (ATCC 55, 244)；完全な遺伝子型tonA prt3 phoA E15 (algF-lac)169 degP ompT rbs7i1vGkan^rを有する大腸菌W3110株37D6；非カナマイシン耐性degP欠失変異を持つ37D6株である大腸菌W3110株40B4；及び1990年8月7日発行の米国特許第4,946,783号に開示された変異周辺質プロテアーゼを有する大腸菌株を含む。あるいは、クローニングのインビトロ法、例えばPCR又は他の核酸ポリメラーゼ反応が好みしい。

【0119】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、FGF-19コード化ベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセスセレビシエは、通常用いられる下等真核生物宿主微生物である。他に、シゾサッカロミセスポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach及びNurse, Nature, 290: 140 [1981] ; 1985年5月2日公開のEP 139, 383)；クルベロミセスホスツ (*Kluyveromyces hosts*) (米国特許第4,943,529号; Fleerら, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991))、例えばケー・ラクチス (*K. lactis*) (MW 98-8C, CBS 683, CBS 4574; Louvencourtら, J. Bacteriol. 154 (2): 737-742 [1983])、ケー・フラギリス (*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、ケー・ブルガリクス (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、ケー・ウィケラミイ (*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178)、ケー・ワルチイ (*K. waltii*) (ATCC 56,500)、ケー・ドロソフィラルム (*K. drosophilae*) (ATCC 36,906; Van den Bergら, Bio/Technology, 8: 135 (1990))、ケー・テモトレランス (*K. thermotolerans*) 及びケー・マルキシアヌス (*K. marxianus*)；ヤロウイア (*yarowia*) (EP 402,226)；ピッチャバストリス (*Pichia pastoris*) (EP 183,070; Sreekrishnaら, J. Basic Microbiol., 28: 265-278 [1988])；カンジダ；トリコデルマレーシア (*reesia*) (EP 244,234)；アカパンカビ (*Casseら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263 [1979])；シュワニオマイセス (*schwanniomyces*)、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス (*occidentalis*) (1990年10月31日公開のEP 394,538)；及び糸状真菌、例えば、ニューロスボラ、ベニシリウム、トリポクラジウム (*Tolypocladium*) (1991年1月10日公開のWO 91/00357)；及びコウジ菌、例えばアスペルギルスニダランス (*Balanceら, Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 [1983])；Tilburnら, Gene, 26: 205-221 [1983]；Yeltonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) 及びクロカビ (*Kelly*及び¹⁰ *Hynes*, 50

EMBO J., 4: 475-479 [1985]) が含まれる。ここで好ましいメチロトロピック (methylotrophic) 酵母は、これらに限られないが、ハンセンラ (Hansenula)、カンジダ、クロエケラ (Kloeckera)、ピチア (Pichia)、サッカロミセス、トルロプシス (Torulopsis)、及びロドトルラ (Rhodotorula) からなる属から選択されるメタノールで成長可能な酵母を含む。この酵母の分類の例示である特定の種のリストは、C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982) に記載されている。

【0120】

グリコシリ化 FGF-19 の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、ショウジョウバエ S2 及びスプドスペラ Sf9 等の昆虫細胞並びに植物細胞が含まれる。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 及び COS 細胞を含む。多くの特異的な例は、SV40 によって形質転換されたサル腎臓 CV1 株 (COS-7, ATCC CRL 1651) ; ヒト胚腎臓株 (293 又は懸濁培養での増殖のためにサブクローニングされた 293 細胞、Grahamら, J. Gen Virol., 36: 59 (1977)) ; チャイニーズハムスター卵巣細胞 / - DHFR (CHO, Urlaub 及び Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980)) ; マウスのセルトリ細胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243-251 (1980)) ヒト肺細胞 (W138, ATCC CCL 75) ; ヒト肝細胞 (HEP G2, HB 8065) ; 及びマウス乳房腫瘍細胞 (MMT 060562, ATCC CCL 51) を含む。適切な宿主細胞の選択は、この分野の技術常識内にある。

【0121】

3. 複製可能なベクターの選択及び使用

FGF-19 をコードする核酸 (例えば、cDNA 又はゲノムDNA) は、クローニング (DNA の增幅) 又は発現のために複製可能なベクター内に挿入される。様々なベクターが公的に入手可能である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とすることができます。適切な核酸配列が、種々の手法によってベクターに挿入される。一般に、DNA はこの分野で周知の技術を用いて適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター成分としては、一般に、これらに制限されるものではないが、1つ又は複数のシグナル配列、複製開始点、1つ又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、及び転写終結配列を含む。これらの成分の1つ又は複数を含む適当なベクターの作成には、当業者に知られた標準的なライゲーション技術を用いる。

【0122】

FGF-19 は直接的に組換え手法によって生産されるだけではなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドの N-末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。一般に、シグナル配列はベクターの成分であるか、ベクターに挿入される FGF-19 - コード化DNA の一部である。シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、1pp あるいは熱安定性エンテロトキシン I イリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列であってよい。酵母の分泌に関しては、シグナル配列は、酵母インベルターゼリーダー、因子リーダー (酵母菌属 (Saccharomyces) 及びクルイベロマイシス (Kluyveromyces) 因子リーダーを含み、後者は米国特許第 5,010,182 号に記載されている) 、又は酸ホスフォターゼリーダー、カンジダ アルビカンス (C. albicans) グルコアミラーゼリーダー (1990 年 4 月 4 日公開の EP 362179) 、又は 1990 年 11 月 15 日に公開された WO 90/13646 に記載されているシグナルであり得る。哺乳動物細胞の発現においては、哺乳動物シグナル配列は、同一あるいは関連ある種の分泌ポリペプチド由来のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダーのようなタンパク質の直接分泌に使用してもよい。

10

20

30

40

50

【0123】

発現及びクローニングベクターは共に1つ又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスに対してよく知られている。プラスミドpBR322に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2μプラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、HSV又はBPV)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選択性マーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)栄養要求性欠陥を補い、又は(c)例えばバシリに対する遺伝子コードD-アラニンラセマーゼのような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

【0124】

哺乳動物細胞の適切な選べるマーカーの例は、DHFRあるいはチミジンキナーゼのように、FGF-19-コード化核酸を取り込むことのできる細胞成分を同定することができるものである。野生型DHFRを用いた場合の好適な宿主細胞は、Urb1aからにより、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)に記載されているようにして調製され増殖されたDHFR活性に欠陥のあるCHO株化細胞である。酵母菌中の使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である[Stinchcombeら, Nature, 282:39 (1979); Kingmanら, Gene, 7:141 (1979); Tschemperら, Gene, 10:157 (1980)]。trp1遺伝子は、例えば、ATCC番号44076あるいはPEP4-1のようなトリプトファン内で成長する能力を欠く酵母菌の突然変異株に対する選択マーカーを提供する[Jones, Genetics, 85:12 (1977)]。

【0125】

発現及びクローニングベクターは、通常、FGF-19-コード化核酸配列に作用可能に結合し、mRNA合成を制御するプロモーターを含む。種々の可能な宿主細胞により認識されるプロモーターが知られている。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは-LacTマーゼ及びLacTースプロモーター系[Changら, Nature, 275:615 (1978); Goeddeelら, Nature, 281:544 (1979)]、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター系[Goeddeel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776]、及びハイブリッドプロモーター、例えば tacプロモーター[de Boerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]を含む。細菌系で用いるプロモータもまたFGF-19をコードするDNAと作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ(S.D.)配列を有する。

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、3-ホスホグリセラートキナーゼ[Hitzenbacherら, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)]又は他の糖分解酵素[Hessら, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)]、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

【0126】

他の酵母プロモーターとしては、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-

3 - リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域がある。酵母菌での発現に好適に用いられるベクターとプロモータは E P 73, 657 に更に記載されている。

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの FGF - 19 転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウィルス(1989年7月5日公開の U K 2, 211, 504)、アデノウィルス(例えばアデノウィルス2)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B型肝炎ウィルス及びサルウィルス40(S V 40)のようなウィルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、及び熱衝撃プロモーターから得られるプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り制御される。

【0127】

より高等の真核生物による所望の FGF - 19 をコードする DNA の転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによって増強され得る。エンハンサーは、通常は約 10 から 300 塩基対で、プロモーターに作用してその転写を増強する DNA のシス作用要素である。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターーゼ、アルブミン、-フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側の S V 40 エンハンサー(100 - 270 塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーター-エンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。エンハンサーは、FGF - 19 コード配列の 5' 又は 3' 位でベクター中にスプライシングされ得るが、好ましくはプロモーターから 5' 位に位置している。

【0128】

また真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、転写の終結及び mRNA の安定化に必要な配列も含む。このような配列は、真核生物又はウィルスの DNA 又は cDNA の通常は 5' 、時には 3' の非翻訳領域から取得できる。これらの領域は、FGF - 19 をコードする mRNA の非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。

組換え脊椎動物細胞培養での FGF - 19 の合成に適応化するのに適切な他の方法、ベクター及び宿主細胞は、Gethingら, Nature, 293: 620 - 625 (1981); Manteiら, Nature, 281: 40 - 46 (1979); E P 117, 060; 及び E P 117, 058 に記載されている。

【0129】

4. 遺伝子増幅 / 発現の検出

遺伝子の増幅及び / 又は発現は、ここで提供された配列に基づき、適切に標識されたプローブを用い、例えば、従来よりのサザンプロット法、mRNA の転写を定量化するノーザンプロット法 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201 - 5205 (1980)]、ドットプロット法(DNA分析)、又はインサイツハイブリダイゼーション法によって、直接的に試料中で測定することができる。あるいは、DNA 二本鎖、RNA 二本鎖及び DNA - RNA ハイブリッド二本鎖又は DNA - タンパク二本鎖を含む、特異的二本鎖を認識することができる抗体を用いることができる。次いで、抗体を標識し、アッセイを実施することができ、ここで二本鎖は表面に結合しており、その結果二本鎖の表面での形成の時点でその二本鎖に結合した抗体の存在を検出することができる。

【0130】

あるいは、遺伝子の発現は、遺伝子産物の発現を直接的に定量する免疫学的な方法、例えば細胞又は組織切片の免疫組織化学的染色及び細胞培養又は体液のアッセイによって、測定することもできる。試料液の免疫組織化学的染色及び / 又はアッセイに有用な抗体は、

10

20

30

40

50

モノクローナルでもポリクローナルでもよく、任意の哺乳動物で調製することができる。簡便には、抗体は、天然配列 F G F - 1 9 ポリペプチドに対して、又はここで提供される D N A 配列をベースとした合成ペプチドに対して、又は F G F - 1 9 D N A に融合し特異的抗体エピトープをコードする外因性配列に対して調製され得る。

【0131】

5. ポリペプチドの精製

F G F - 1 9 の形態は、培地又は宿主細胞の溶菌液から回収することができる。膜結合性であるならば、適切な洗浄液（例えばトリトン - X 1 0 0 ）又は酵素的切断を用いて膜から引き離すことができる。F G F - 1 9 の発現に用いられる細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤などの種々の化学的又は物理的手段によって破壊することができる。

【0132】

F G F - 1 9 を、組換え細胞タンパク又はポリペプチドから精製することが望ましい。適切な精製手順の例である次の手順により精製される：すなわち、イオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相 H P L C ；シリカ又はカチオン交換樹脂、例えば D E A E によるクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；S D S - P A G E ；硫酸アンモニウム沈殿；例えばセファデックス G - 7 5 を用いるゲルfiltration；I g G のような汚染物を除くプロテイン A セファロースカラム；及び F G F - 1 9 のエピトープタグ形態を結合させる金属キレート化カラムである。この分野で知られ、例えば、Deutcher, M eth odes in Enzymology, 182 (1990) ; Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer - Verlag, New York (1982) に記載された多くのタンパク質精製方法を用いることができる。選ばれる精製過程は、例えば、用いられる生産方法及び特に生産される特定の F G F - 1 9 の性質に依存する。

【0133】

E. F G F - 1 9 の用途

F G F - 1 9 をコードするヌクレオチド配列（又はそれらの補体）は、ハイブリダイゼーションプローブとしての使用を含む分子生物学の分野において、染色体及び遺伝子マッピングにおいて、及びアンチセンス R N A 及び D N A の生成において種々の用途を有している。また、F G F - 1 9 核酸も、ここに記載される組換え技術による F G F - 1 9 ポリペプチドの調製に有用であろう。

【0134】

全長天然配列 F G F - 1 9 遺伝子（配列番号：1）又はその一部は、全長 F G F - 1 9 c D N A の単離又は F i g . 1 (配列番号：1) に示した F G F - 1 9 配列に対して所望の配列同一性を持つ更に他の遺伝子（例えば、F G F - 1 9 の天然に生じる変異体又は他の種からの F G F - 1 9 をコードするもの）の単離のための c D N A ライブラリー用のハイブリダイゼーションプローブとして使用できる。場合によっては、プローブの長さは約 2 0 ~ 約 5 0 塩基である。ハイブリダイゼーションプローブは、少なくとも部分的に配列番号：1 のヌクレオチド配列の新規な領域から誘導してもよく、それらの領域は、過度の実験をすることなく、天然配列 F G F - 1 9 のプロモーター、エンハンサー成分及びイントロンを含むゲノム配列から誘導され得る。例えば、スクリーニング法は、F G F - 1 9 遺伝子のコード化領域を周知の D N A 配列を用いて単離して約 4 0 塩基の選択されたプローブを合成することを含む。ハイブリダイゼーションプローブは、³ ² P 又は³ ⁵ S 等の放射性ヌクレオチド、又はアビディン / ビオチン結合系を介してプローブに結合したアルカリホスファターゼ等の酵素標識を含む種々の標識で標識されうる。本発明の F G F - 1 9 遺伝子に相補的な配列を有する標識されたプローブは、ヒト c D N A 、ゲノム D N A 又は m R N A のライブラリーをスクリーニングし、そのライブラリーの何れのメンバーがプローブにハイブリッド形成するかを決定するのに使用できる。ハイブリダイゼーション技術は、以下の実施例において更に詳細に記載する。

【0135】

10

20

30

40

50

本出願で開示する任意のEST配列はプローブとして、ここに記載した方法で用いることができる。

F G F - 19 核酸の他の有用な断片は、標的 F G F - 19 m RNA (センス) 又は F G F - 19 DNA (アンチセンス) 配列に結合できる一本鎖核酸配列 (RNA 又はDNA のいずれか) を含むアンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを含む、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、本発明によると、F G F - 19 DNA のコード化領域の断片を含む。このような断片は、一般的には少なくとも約 14 ヌクレオチド、好ましくは約 14 から 30 ヌクレオチドを含む。与えられたタンパク質をコードする cDNA 配列に基づく、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドを誘導する能力は、例えば、Stein 及び Cohen (Cancer Res. 48 : 2659 : 1988) 及び van der Krolら (Biotechniques 6 : 958, 1988) に記載されている。10

【0136】

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への結合は二重鎖の形成をもたらし、それは、二重鎖の分解の促進、転写又は翻訳の期外停止を含む幾つかの方法の一つ、又は他の方法により、標的配列の転写又は翻訳を阻止する。よって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、F G F - 19 タンパク質の発現を阻止するのに用いられる。アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、修飾糖 - ホスホジエステル骨格 (又は他の糖結合、WO 91/06629 に記載のもの等) を有するオリゴヌクレオチドをさらに含み、そのような糖結合は内因性ヌクレアーゼ耐性である。そのような耐性糖結合を持つオリゴヌクレオチドは、インビボで安定であるが (即ち、酵素分解に耐えうるが)、標的ヌクレオチド配列に結合できる配列特異性は保持している。20

【0137】

センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの他の例は、WO 90/10048 に記載されているもののような、有機部分、及びオリゴヌクレオチドの標的核酸配列への親和性を向上させる他の部分、例えばポリ - (L - リジン) に共有結合したオリゴヌクレオチドを含む。さらにまた、エリプチシン等の挿入剤、アルキル化剤又は金属作体をセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドに結合させ、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドの標的ヌクレオチド配列への結合特異性を改変してもよい。

【0138】

アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、CaPO₄ - 媒介 DNA 形質移入、エレクトロポレーションを含む任意の遺伝子転換方法により、又はエプスタイン - バーウィルスなどの遺伝子転換ベクターを用いることにより、標的核酸配列を含む細胞に導入される。好ましい方法では、アンチセンス又はセンスオリゴヌクレオチドは、適切なレトロウイルスベクターに挿入される。標的核酸配列を含む細胞は、インビボ又はエキソビボで組換えレトロウイルスベクターに接触させる。好適なレトロウイルスベクターは、これらに限られないが、マウスレトロウイルス M - MuLV から誘導されるもの、N2 (M - MuLV から誘導されたレトロウイルス)、又は DCT5A、DCT5B 及び DCT5C と命名されたダブルコピーベクター (WO 90/13641 参照) を含む。30

【0139】

また、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、WO 91/04753 に記載されているように、リガンド結合分子との複合体の形成により標的ヌクレオチド配列を含む細胞に導入してもよい。適切なリガンド結合分子は、これらに限られないが、細胞表面レセプター、成長因子、他のサイトカイン、又は細胞表面レセプターに結合する他のリガンドを含む。好ましくは、リガンド結合分子の複合体形成は、リガンド結合分子がその対応する分子又はレセプターに結合する、あるいはセンス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド又はその複合体の細胞への侵入を阻止する能力を実質的に阻害しない。

【0140】

あるいは、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドは、WO 90/10448 に記載されたように、オリゴヌクレオチド - 脂質複合体の形成により標的核酸配列を含む細胞4050

に導入してもよい。センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチド - 脂質複合体は、好ましくは内因性リパーゼにより細胞内で分解される。

また、プローブは、P C R 技術に用いて、密接に関連した F G F - 1 9 コード配列の同定のための配列のプールを作成することができる。

また、F G F - 1 9 をコードするヌクレオチド配列は、その F G F - 1 9 をコードする遺伝子のマッピングのため、及び遺伝子疾患を持つ個体の遺伝子分析のためのハイブリダイゼーションプローブの作成にも用いることができる。ここに提供されるヌクレオチド配列は、インサツハイブリダイゼーション、既知の染色体マーカーに対する結合分析、及びライブラリーでのハイブリダイゼーションスクリーニング等の周知の技術を用いて、染色体及び染色体の特定領域にマッピングすることができる。

10

【 0 1 4 1 】

F G F - 1 9 のコード配列が他のタンパク質に結合するタンパク質をコードする場合（例えば、F G F - 1 9 がレセプターである場合）、F G F - 1 9 は、結合性相互作用に係る他のタンパク質又は分子を同定するアッセイに用いることができる。このような方法により、レセプター／リガンド結合性相互作用のインヒビターを同定することができる。このような結合性相互作用に含まれるタンパク質も、ペプチド又は小分子阻害剤又は結合性相互作用のアゴニストのスクリーニングに用いることができる。また、レセプター F G F - 1 9 は関連するリガンドの単離にも使用できる。スクリーニングアッセイは、天然 F G F - 1 9 又は F G F - 1 9 のレセプターの生物学的活性に似たリード化合物の発見のために設計される。このようなスクリーニングアッセイは、化学的ライブラリーの高スループットスクリーニングにも用いられ、小分子候補薬剤の同定に特に適したものとする。考慮される小分子は、合成有機又は無機化合物を含む。アッセイは、この分野で良く知られ特徴付けられているタンパク質 - タンパク質結合アッセイ、生物学的スクリーニングアッセイ、免疫検定及び細胞ベースのアッセイを含む種々の型式で実施することができる。

20

【 0 1 4 2 】

また、F G F - 1 9 又はその任意の修飾型をコードする核酸は、トランスジェニック動物又は「ノックアウト」動物を產生するのにも使用でき、これらは治療的に有用な試薬の開発やスクリーニングに有用である。トランスジェニック動物（例えばマウス又はラット）とは、出生前、例えば胚段階で、その動物又はその動物の祖先に導入された導入遺伝子を含む細胞を有する動物である。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに組み込まれた D N A である。一実施態様では、F G F - 1 9 をコードする c D N A は、確立された技術により F G F - 1 9 をコードするゲノム D N A をクローン化するために使用することができ、ゲノム配列を、F G F - 1 9 をコードする D N A を発現する細胞を有するトランスジェニック動物を產生するために使用することができる。トランスジェニック動物、特にマウス又はラット等の特定の動物を產生する方法は当該分野において常套的になっており、例えば米国特許第 4 , 7 3 6 , 8 6 6 号や第 4 , 8 7 0 , 0 0 9 号に記述されている。典型的には、特定の細胞を組織特異的エンハンサーでの F G F - 1 9 導入遺伝子の導入の標的にする。胚段階で動物の生殖系列に導入された F G F - 1 9 コード化導入遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物は F G F - 1 9 をコードする D N A の増大した発現の影響を調べるために使用できる。このような動物は、例えばその過剰発現を伴う病理学的状態に対して保護をもたらすと思われる試薬のテスト動物として使用できる。本発明のこの態様においては、動物を試薬で治療し、導入遺伝子を有する未治療の動物に比べ病理学的状態の発症率が低ければ、病理学的状態に対する治療的処置の可能性が示される。

30

【 0 1 4 3 】

あるいは、F G F - 1 9 の非ヒト相同意体は、動物の胚性幹細胞に導入された F G F - 1 9 をコードする変更ゲノム D N A と、F G F - 1 9 をコードする内在性遺伝子との間の相同的組換えによって、F G F - 1 9 をコードする欠陥又は変更遺伝子を有する F G F - 1 9 「ノックアウト」動物を作成するために使用できる。例えば、F G F - 1 9 をコードする c D N A は、確立された技術に従い、F G F - 1 9 をコードするゲノム D N A のクローニ

40

50

ングに使用できる。F G F - 1 9 をコードするゲノムDNAの一部を欠失したり、組み込みを監視するために使用する選択可能なマークターをコードする遺伝子等の他の遺伝子で置換することができる。典型的には、ベクターは無変化のフランкиングDNA(5' と 3' 末端の両方)を数キロベース含む[例えば、相同的組換えベクターについては Thomas 及び Capocchi, Cell, 51: 503 (1987) を参照のこと]。ベクターは胚性幹細胞に(例えばエレクトロポレーションによって)導入し、導入されたDNAが内在性DNAと相同的に組換えられた細胞が選択される[例えば、Lিら, Cell, 69: 915 (1992) 参照]。選択された細胞は次に動物(例えばマウス又はラット)の胚盤胞内に注入されて集合キメラを形成する[例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152 参照]。その後、キメラ性胚を適切な偽妊娠の雌性乳母に移植し、期間を経て「ノックアウト」動物をつくり出す。胚細胞に相同的に組換えられたDNAを有する子孫は標準的な技術により同定され、それらを利用して動物の全細胞が相同的に組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ノックアウト動物は、F G F - 1 9 ポリペプチドが不在であることによるある種の病理的状態及びその病理的状態の進行に対する防御能力によって特徴付けられる。

【0144】

また、F G F - 1 9 ポリペプチドをコードする核酸は遺伝子治療にも使用できる。遺伝子治療用途においては、例えば欠陥遺伝子を置換するため、治療的有効量の遺伝子産物のインビオ合成を達成するために遺伝子が導入される。「遺伝子治療」とは、1回の処理により継続的効果が達成される従来の遺伝子治療と、治療的に有効なDNA又はmRNAの1回又は繰り返し投与を含む遺伝子治療薬の投与の両方を含む。アンチセンスRNA及びDNAは、ある種の遺伝子のインビオ発現を阻止する治療薬として用いることができる。短いアンチセンスオリゴヌクレオチドを、細胞膜による制限された取り込みに起因する低い細胞内濃度にもかかわらず、それが阻害剤として作用する細胞中に移入できることは既に示されている(Zamecnikら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4143-4146 [1986])。オリゴヌクレオチドは、例えばそれらの負に荷電したリン酸ジエステル基を非荷電基で置換することによって取り込みを促進するように修飾してもよい。

【0145】

生存可能な細胞に核酸を導入するための種々の技術が存在する。これらの技術は、核酸が培養細胞にインビトロで、あるいは意図する宿主の細胞においてインビオで移入されるかに応じて変わる。核酸を哺乳動物細胞にインビトロで移入するのに適した方法は、リポソーム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈殿法などを含む。現在好ましいインビオ遺伝子移入技術は、ウイルス(典型的にはレトロウイルス)ベクターでの形質移入及びウイルス被覆タンパク質-リポソーム媒介形質移入である(Dzauら, Trends, in Biotechnology 11, 205-210 [1993])。幾つかの状況では、核酸供給源を、細胞表面膜タンパク質又は標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上のレセプターに対するリガンド等の標的細胞を標的化する薬剤とともに提供するのが望ましい。リポソームを用いる場合、エンドサイトーシスを伴って細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質、例えば、特定の細胞型向性のカプシドタンパク質又はその断片、サイクルにおいて内部移行を受けるタンパク質に対する抗体、細胞内局在化を標的とし細胞内半減期を向上させるタンパク質が、標的化及び/又は取り込みの促進のために用いられる。レセプター媒介エンドサイトーシスの技術は、例えば、Wuら, J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); 及び Wagnerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990) によって記述されている。遺伝子マーキング及び遺伝子治療のプロトコールの概説については、Ander

10

20

30

40

50

s o n l a , S c i e n c e 2 5 6 , 8 0 8 - 8 1 3 (1 9 9 2) を 参 照 の こ と 。

【 0 1 4 6 】

ここに記載した F G F - 1 9 ポリペプチドはまた、タンパク質電気泳動目的の分子量マークーとして用いてもよい。

ここに記載した F G F - 1 9 ポリペプチド又はその断片をコードする核酸分子は染色体同定に有用である。この点において、実際の配列に基づく染色体マーキング試薬は殆ど利用可能ではないため、新規な染色体マークーの同定の必要性が存在している。本発明の各 F G F - 1 9 核酸分子は染色体マークーとして使用できる。

また本発明の F G F - 1 9 ポリペプチド及び核酸分子は組織タイピングに使用でき、本発明の F G F - 1 9 ポリペプチドは一方の組織で他方に比較して異なる発現をする。 F G F - 1 9 核酸分子は、 P C R 、 ノーザン分析、 サザン分析及びウェスタン分析のプローブ生成のための用途が見出されるであろう。

【 0 1 4 7 】

ここに記載した F G F - 1 9 ポリペプチドは治療薬として用いてもよい。本発明の F G F - 1 9 ポリペプチドは、製薬的に有用な組成物を調製するのに知られた方法に従って製剤され、それにより、この F G F - 1 9 生成物は製薬的に許容される担体媒体と混合される。

治療用製剤は、凍結乾燥された製剤又は水性溶液の形態で、任意的な製薬上許容可能なキャリア、賦形剤又は安定剤と、所望の精製度を有する活性成分とを混合することにより (Remington's Pharmaceutical Sciences , 16 t h e d i t i o n , O s o l , A . E d . , (1 9 8 0)) 、調製され保管される。

許容される担体、賦形剤又は安定剤は、用いる投与量及び濃度ではレシピエントに対して無毒性であり、リン酸、クエン酸及び他の有機酸等の緩衝液；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量（残基数 10 個未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性重合体；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース又はデキストリン等の单糖類、二糖類又は他の炭水化物；E D T A 等のキレート剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール類；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び / 又は T W E E N (商品名) 、 P L U R O N I C S (商品名) 又は P E G 等の非イオン性界面活性剤を含む。

【 0 1 4 8 】

インビポ投与に使用される製剤は滅菌されていなくてはならない。これは、凍結乾燥及び再構成の前又は後に、滅菌フィルター膜を通す濾過により容易に達成される。

ここで、治療用組成物は一般に、無菌のアクセスポートを具備する容器、例えば、皮下注射針で貫通可能なストッパーを持つ静脈内バッグ又はバイアル内に配される。

投与経路は周知の方法、例えば、静脈内、腹膜内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内又は病巣内経路での注射又は注入、局所投与、又は徐放系による。

本発明の製薬組成物の用量及び望ましい薬物濃度は、意図する特定の用途に応じて変化する。適切な用量又は投与経路の決定は、通常の内科医の技量の範囲内である。動物実験は、ヒト治療のための有効量の決定についての信頼できるガイドラインを提供する。有効量の種間スケーリングは、 In Toxicokinetics and New Drug Development , Y a c o b i ら , 編 , P e r g a m o n P r e s s , N e w Y o r k 1 9 8 9 , p p . 4 2 - 9 6 の M o r d e n t i , J . 及び C h a p p e l l , W . 「 The use of interspecies scaling in toxicokinetics 」に記載された原理に従って実施できる。

【 0 1 4 9 】

F G F - 1 9 ポリペプチド又はそのアゴニスト又はアンタゴニストのインビポ投与が用いられる場合、正常な投与量は、投与経路に応じて、哺乳動物の体重当たり 1 日に約 1 0 n g / k g から 1 0 0 m g / k g まで、好ましくは約 1 μ g / k g / 日から 1 0 m g / k g / 日である。特定の用量及び輸送方法の指針は文献に与えられている；例えば、米国特許第 4 , 6 5 7 , 7 6 0 号、第 5 , 2 0 6 , 3 4 4 号、又は第 5 , 2 2 5 , 2 1 2 号参照。

10

20

30

30

40

50

異なる製剤が異なる治療用化合物及び異なる疾患に有効であること、例えば一つの器官又な組織を標的とする投与には他の器官又は組織とは異なる方式で輸送することは必要であることが予想される。

【0150】

F G F - 1 9 ポリペプチド又はモジュレーターの投与を必要とする任意の疾患又は疾病的治療に適した放出特性を持つ製剤で F G F - 1 9 ポリペプチド又はモジュレーターの持続放出が望まれる場合、F G F - 1 9 ポリペプチドのマイクロカプセル化が考えられる。持続放出のための組換えタンパク質のマイクロカプセル化は、ヒト成長ホルモン (r h G H) 、インターフェロン (r h I F N -) 、インターロイキン - 2 、及び M N r g p 1 2 0 で成功裏に実施されている。Johnsonら, Nat. Med., 2: 795 - 7 10 99 (1996) ; Yasuda, Biomed. Ther., 27: 1221 - 1223 (1993) ; Horaら, Bio/Technology, 8: 755 - 758 (1990) ; Cleland, 「Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polyactide Polyglycolide Microsphere System」Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell 及び Newman 編, (Plenum Press : New York, 1995) , p. 439 - 462 ; WO 97/03692 , WO 96/40072 , WO 96/07399 ; 及び米国特許第 5,654,010 号。

20

20

30

40

【0151】

これらのタンパク質の持続放出製剤は、ポリ - 乳酸 - コグリコール酸 (P L G A) ポリマーを用い、その生体適合性及び広範囲の生分解特性に基づいて開発された。P L G A の分解生成物である乳酸及びグリコール酸は、ヒト身体内で即座にクリアされる。さらに、このポリマーの分解性は、分子量及び組成に依存して数ヶ月から数年まで調節できる。Lewis, 「Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer」: M. Chasin 及び R. Langer (編), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker : New York, 1990) , pp. 1 - 41.

【0152】

ここで提供されている F G F - 1 9 を含んでなる治療的薬剤及び組成物は、様々に応用することができる。これら応用には、肥満又は肥満に関連した症状を有する個体の治療が含まれる。一側面では、F G F - 1 9 は、この症状を治療するのに有効な量の F G F - 1 9 を必要とする個体へ投与される。好ましくは、この症状とは、次のうちの少なくとも 1 つが治療されることを必要とする: 代謝の増大、体重の減少、体脂肪の減少、トリグリセリドの減少、遊離脂肪酸の減少、脂肪細胞からのグルコース放出の増加及び / 又は脂肪細胞からのレプチン放出の増加。これらパラメーターの各々は、標準的な方法、例えば、酸素消費量を測定して代謝速度を決定するによって、体重計を用いて体重を測定する、そして大きさを測定して脂肪を割り出すことで測定することができる。更には、トリグリセリド、遊離脂肪酸、グルコース及びレプチンの存在と量を、標準的な方法で決定することができる。これら各々のパラメーターは、下記の特定の実施例において例示されている。

【0153】

F G F - 1 9 及び F G F - 1 9 を含んでなる組成物は、インビボにて好んで用いられる。しかし、下記に記載のように、前出にて記載の F G F - 1 9 のモジュレーターをスクリーニングするための方法のように、投与はインビトロで可能である。とはいえ、動物モデル及び患者からの試料を用いて、F G F - 1 9 のモジュレーターもまた同定することができることが理解されている。

【0154】

本発明は、F G F - 1 9 ポリペプチドを模倣又は増大させる (アゴニスト) 、又は F G F 50

- 19 ポリペプチドの効果を予防又は阻害する（アンタゴニスト）を同定するための化合物のスクリーニング方法も包含する。ここでは、アゴニスト及びアンタゴニストはモジュレーターに相当する。アンタゴニスト候補薬のスクリーニングアッセイは、ここに同定した遺伝子にコードされる FGF - 19 ポリペプチドと結合又は複合体形成する化合物、又は他にコード化ポリペプチドの他の細胞性タンパク質との相互作用を阻害する化合物を同定するために設計される。このようなスクリーニングアッセイは、それを特に小分子候補薬の同定に適したものにする、化学的ライブラリーの高スループットスクリーニングに適用可能なアッセイを含む。

【 0 1 5 5 】

このアッセイは、この分野で知られた技術である、タンパク質 - タンパク質結合アッセイ¹⁰、生化学的スクリーニングアッセイ、イムノアッセイ、及び細胞ベースのアッセイを含む種々の方式で実施される。

アンタゴニストについての全てのアッセイは、それらが候補薬をここで同定された核酸にコードされる FGF - 19 ポリペプチドと、これら 2 つの成分が相互作用するのに十分な条件下及び時間で接触させることを必要とすることにおいて共通する。

【 0 1 5 6 】

結合アッセイにおいて、相互作用は結合であり、形成された複合体は単離されるか、又は反応混合物中で検出される。特別な実施態様では、ここに同定された遺伝子にコードされる FGF - 19 ポリペプチド又は候補薬が、共有又は非共有結合により固相、例えばマイクロタイヤープレートに固定化される。非共有結合は、一般的に固体表面をポリペプチドの溶液で被覆し乾燥させることにより達成される。あるいは、固定化される FGF - 19 ポリペプチドに特異的な固定化抗体、例えばモノクローナル抗体を、それを固体表面に固着させるために用いることができる。アッセイは、固定化成分、例えば固着成分を含む被覆表面に、検出可能な標識で標識されていてもよい非固定化成分を添加することにより実施される。反応が完了したとき、未反応成分を例えば洗浄により除去し、固体表面に固着した複合体を検出する。最初の非固定化成分が検出可能な標識を有している場合、表面に固定化された標識の検出は複合体形成が起こったことを示す。最初の非固定化成分が標識を持たない場合は、複合体形成は、例えば、固定化された複合体に特異的に結合する標識抗体によって検出できる。

【 0 1 5 7 】

候補化合物が相互作用するがここに同定した遺伝子にコードされる特定の FGF - 19 ポリペプチドに結合しない場合、そのポリペプチドとの相互作用は、タンパク質 - タンパク質相互作用を検出するために良く知られた方法によってアッセイすることができる。このようなアッセイは、架橋、同時免疫沈降、及び勾配又はクロマトグラフィカラムを通す同時精製などの伝統的な手法を含む。さらに、タンパク質 - タンパク質相互作用は、Fields 及び共同研究者ら (Fields 及び Song, Nature (London) 340, 245 - 246 (1989); Chienら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578 - 9582 (1991)) に記載された酵母菌ベースの遺伝子系を用いることにより、Chevray 及び Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5789 - 5793 (1991) に開示されている酵母菌ベースの系を用いて監視することができる。酵母菌 GAL4 などの多くの転写活性化剤は、2 つの物理的に別個のモジュラードメインからなり、一方は DNA 結合ドメインとして作用し、他方は転写活性化ドメインとして機能する。以前の文献に記載された酵母菌発現系（一般に「2 - ハイブリッド系」と呼ばれる）は、この特性の長所を利用して、2 つのハイブリッドタンパク質を用い、一方では標的タンパク質が GAL4 の DNA 結合ドメインに融合し、他方では、候補となる活性化タンパク質が活性化ドメインに融合している。GAL1 - lacZ リポーター遺伝子の GAL4 活性化プロモーターの制御下での発現は、タンパク質 - タンパク質相互作用を介した GAL4 活性の再構成に依存する。相互作用するポリペプチドを含むコロニーは、- ガラクトシダーゼに対する色素生産性物質で検出される。2 - ハイブリッド技術を用いた 2 つの特定なタンパク質⁴⁰

10

20

30

40

50

間のタンパク質 - タンパク質相互作用を同定するための完全なキット (MATCHMAKER (商品名)) は、Clontech から商業的に入手可能である。この系は、特定のタンパク質相互作用に含まれるタンパク質ドメインのマッピング、並びにこの相互作用にとって重要なアミノ酸残基の特定にも拡張することができる。

【0158】

ここで同定された FGF - 19 ポリペプチドをコードする遺伝子と細胞内又は細胞外成分との相互作用を阻害する化合物は、次のように試験できる：通常は反応混合物は、遺伝子産物と細胞外又は細胞内成分を、それら 2 つの生成物が相互作用及び結合する条件下及び時間で含むように調製される。候補化合物が結合を阻害する能力を試験するために、反応は試験化合物の不存在及び存在下で実施される。さらに、プラシーボを第 3 の反応混合物に添加してポジティブ対照を提供してもよい。混合物中に存在する試験化合物と細胞内又は細胞外成分との結合 (複合体形成) は上記のように監視される。試験化合物を含有する反応混合物ではなく対照反応における複合体の形成は、試験化合物が試験化合物とその結合パートナーとの相互作用を阻害することを示す。

【0159】

アンタゴニストをアッセイするために、FGF - 19 ポリペプチドを特定の活性についてスクリーニングする化合物とともに添加してよく、FGF - 19 ポリペプチド存在下での関心ある活性を阻害する化合物の能力が化合物が FGF - 19 ポリペプチドのアンタゴニストであることを示す。あるいは、アンタゴニストは、FGF - 19 ポリペプチド及び膜結合 FGF - 19 ポリペプチドレセプター又は組換えレセプターを持つ潜在的アンタゴニストを、競合的阻害アッセイに適した条件下で結合させることにより検出してもよい。FGF - 19 ポリペプチドは、放射性等で標識でき、レセプターに結合した FGF - 19 ポリペプチドの数を潜在的アンタゴニストの有効性を決定するのに使用できる。レセプターをコードする遺伝子は、当業者に知られた多くの方法、例えばリガンドパンニング及び FACS ソートにより同定できる。Colligan, Current Protocols in Immun., 1(2) : Chapter 5 (1991)。好ましくは、発現クローニングが用いられ、ポリアデニル化 RNA が FGF - 19 ポリペプチドに反応性的細胞から調製され、この RNA から生成された cDNA ライブライリーがプールに分配され、COS 細胞又は FGF - 19 ポリペプチド反応性でない他の細胞の形質移入に使用される。スライドガラスで成長させた形質移入細胞を標識した FGF - 19 ポリペプチドに暴露する。FGF - 19 ポリペプチドは、ヨウ素化又は部位特異的タンパク質キナーゼの認識部位の包含を含む種々の手段で標識できる。固定及びインキュベーションの後、スライドにオートラジオグラフィ分析を施す。ポジティブプールを同定し、相互作用サブプール化及び再スクリーニング工程を用いてサブプールを調製して再形質移入し、結果的に推定レセプターをコードする単一のクローンを生成する。

【0160】

レセプター同定の代替的方法として、標識 FGF - 19 ポリペプチドをレセプター分子を発現する細胞膜又は抽出調製物に光親和性結合させることができる。架橋材料は PAGE に溶解させ、X 線フィルムに暴露する。レセプターを含む標識複合体を励起し、ペプチド断片に分離し、タンパク質マイクロ配列決定を施すことができる。マイクロ配列決定から得たアミノ酸配列は、推定レセプターをコードする遺伝子を同定する cDNA ライブライリーをスクリーニングする分解性オリゴヌクレオチドプローブの組の設計に用いられる。アンタゴニストの他の検定では、レセプターを発現する哺乳動物細胞又は膜調製物を、候補化合物の存在下で標識 FGF - 19 ポリペプチドとともにインキュベートする。次いで、この相互作用を促進又は阻止する化合物の能力を測定する。

【0161】

潜在的なアンタゴニストのより特別な例は、免疫グロブリンと FGF - 19 ポリペプチドとの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、特に、限られないが、ポリペプチド - 及びモノクローナル抗体及び抗体断片、一本鎖抗体、抗 - イディオタイプ抗体、及びこれらの抗体又は断片のキメラ又はヒト化形態、並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体を含んでい

10

20

30

40

50

る。あるいは、潜在的アンタゴニストは、密接に関連したタンパク質、例えば、レセプターを認識するが効果を与える、従って FGF-19 ポリペプチドの作用を競合的に阻害する FGF-19 ポリペプチドの変異形態であってもよい。

競合的結合アッセイを実施するここでの一実施態様では、FGF レセプター 4 又は FGF-19 に対する抗体を競合物として用いる。

【0162】

他の潜在的な FGF-19 ポリペプチドアンタゴニストは、アンチセンス技術を用いて調製されたアンチセンス RNA 又は DNA 作成物であり、例えば、アンチセンス RNA 又は DNA は、標的 mRNA にハイブリダイゼーションしてタンパク質翻訳を妨害することにより mRNA の翻訳を直接阻止するように作用する。アンチセンス技術は、トリプルヘリックス形成又はアンチセンス DNA 又は RNA を通して遺伝子発現を制御するのに使用でき、それらの方法はともに、ポリヌクレオチドの DNA 又は RNA への結合に基づく。例えば、ここでの成熟 FGF-19 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の 5' コード化部分は、約 10 から 40 塩基対長のアンチセンス RNA オリゴヌクレオチドの設計に使用される。DNA オリゴヌクレオチドは、転写に含まれる遺伝子の領域に相補的であるように設計され (Triplex-Forming Oligonucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: ボーカラトーン, フロリダ, 1988))。10

上記のオリゴヌクレオチドは、細胞に送達され、アンチセンス RNA 又は DNA をインビボで発現させて、FGF-19 ポリペプチドの生産を阻害することもできる。アンチセンス DNA が用いられる場合、翻訳開始部位、例えば標的遺伝子ヌクレオチド配列の -10 から +10 位置の間から誘導されるオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。20

【0163】

潜在的アンタゴニストは、FGF-19 ポリペプチドの活性部位、レセプター結合部位、又は成長因子又は他の関連結合部位に結合し、それにより FGF-19 ポリペプチドの正常な生物学的活性を阻止する小分子を含む。小分子の例は、これらに限られないが、小型ペプチド又はペプチド様分子、好ましくは可溶性ペプチド、及び合成非ペプチド有機又は無機化合物を含む。30

リボザイムは、RNA の特異的切断を触媒できる酵素的 RNA 分子である。リボザイムは、相補的標的 RNA への配列特異的ハイブリダイゼーション、次いでヌクレオチド鎖切断的切断により作用する。潜在的 RNA 標的内の特異的リボザイム切断部位は、既知の技術で同定できる。更なる詳細は、例えば、Rossi, Current Biology 4: 469-471 (1994) 及び PCT 公報、番号 WO 97/33551 (1997 年 9 月 18 日公開) を参照。40

【0164】

転写阻害に用いられるトリプルヘリックス形成における核酸分子は一本鎖でデオキシリボヌクレオチドからなる。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、フーゲスチン塩基対則を介するトリプルヘリックス形成を促進するように設計され、それは一般に二重鎖の一方の鎖上のプリン又はピリミジンのサイズ変更可能な伸展を必要とする。さらなる詳細は、例えば、PCT 公報、番号 WO 97/33551, 上掲を参照。

これらの小分子は、上記で議論したスクリーニングアッセイの 1 つ又は複数の任意のものにより及び / 又は当業者に良く知られた他の任意のスクリーニング技術により同定できる。

【0165】

10

20

30

40

50

ここで提供されているすべてのアッセイは、幅広い種々の候補生物活性剤をスクリーニングすることに用いることができる。ここで用いられている「候補生物活性剤」、「候補薬剤」又は「候補薬」、又はここで用いられている文法的に同等の用語は、例えば、タンパク質、オリゴペプチド、小有機分子、多糖類、ポリヌクレオチド、プリン類似体などの細胞活性表現型、又は核酸配列及びタンパク質配列の双方を含む F G F - 1 9 配列の発現の何れかを直接的又は間接的に変化させることができる生物活性剤のために試験されるすべての分子を表す。

【 0 1 6 6 】

候補薬剤は、主として有機分子であるが、多くの化学物質を包含し、好ましくは 100 を越え、約 2,500 ダルトン (d) より小さい分子量を有する小有機化合物である。小分子は、ここで更に、50 d と 2000 d の間の分子量を有すると定義される。その他の実施態様では、小分子は 1500 より小さい、又は 1200 より小さい、又は 1000 より小さい、又は 750 より小さい、又は 500 d より小さい分子量を有する。一実施態様では、ここで用いられる小分子は、約 100 から 200 d の分子量を有する。候補薬剤は、タンパク質との構造的な相互作用に必要な官能基を含み、特には水素結合、そして主には、少なくともアミン、カルボニル、ヒドロキシ又はカルボキシ基を含む。候補薬剤は、1 つ又は複数の上記の官能基で置換された環状炭素又はヘテロ環状構造及び / 又は芳香族又は多芳香族構造を頻繁に含む。また、候補薬剤は、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、誘導体、構造類似体又はその組み合わせの中に見出される。特に好まれるのはペプチドである。

【 0 1 6 7 】

候補薬剤は、合成又は天然化合物のライプラリを含む幅広い種々のソースから得られる。例えば、ランダム化オリゴヌクレオチドの発現を含む、幅広い種々の化合物及び生物分子のランダム及び直接合成のための多くの手段を利用することができる。あるいは、細菌、糸状菌、植物及び動物抽出物のライプラリを利用することができるか、又は容易に作製することができる。更には、通常の化学的、物理的及び生化学的手段によって、天然又は合成的に作製されたライプラリ及び化合物を容易に修飾できる。構造類似体を作製するために、既知の薬理学的な薬剤にアシル化、アルキル化、エステル化、アミド化などの直接又はランダム化学修飾を施してもよい。

【 0 1 6 8 】

好ましい実施態様では、候補生物活性薬剤はタンパク質である。ここで「タンパク質」によってとは、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド及びペプチドを含む、少なくとも 2 つの共有結合的に結合しているアミノ酸を意味する。このタンパク質は、天然発生アミノ酸及びペプチド結合、又は合成ペプチド模倣構造で構成される。従って、ここで用いられる「アミノ酸」、又は「ペプチド残基」とは、天然発生及び合成アミノ酸の双方を意味する。例えば、ホモフェニルアラニン、シトルリン及びノルロイシンは、本発明の目的のアミノ酸であると考えられている。また、「アミノ酸」は、プロリン及びヒドロキシプロリンのようなイミノ酸残基を含む。その側鎖は、(R) 又は (S) 配置の何れかである。好ましい実施態様では、このアミノ酸は (S) 又は L - 配置である。非天然発生側鎖が用いられる場合には、非アミノ酸置換基が、例えばインビボでの分解を防いだり、遅くしたりすることに用いられてもよい。

【 0 1 6 9 】

好ましい実施態様では、候補生物活性薬剤は、天然発生タンパク質又は天然発生タンパク質の断片である。従って、例えば、タンパク質を含む細胞抽出物、又はタンパク質性細胞抽出物のランダム又は直接消化物を用いてもよい。この方法では、原核生物及び真核生物タンパク質のライプラリは、本発明の方法でのスクリーニングのために作製される。特に、この実施態様で好まれるのは、細菌、糸状菌、ウイルス、及び哺乳動物タンパク質のライプラリであり、後者は好まれており、そしてヒトタンパク質が特に好まれている。

【 0 1 7 0 】

好ましい実施態様では、候補生物活性剤は、約 5 から約 30 アミノ酸のペプチドで、約 5

10

20

30

40

50

から約20アミノ酸が好まれ、そして約7から約15が特に好まれる。このペプチドは、上記で概説したように、ランダムペプチド、又は「偏向」ランダムペプチドで、天然発生タンパク質の消化物でありうる。「ランダム化」又はここで文法的に同等な表現によって、各核酸及びペプチドは、基本的に、各々ランダムヌクレオチド及びアミノ酸で構成されていると言われている。一般的に、これらランダムペプチド（又は核酸、下記にて記載）は化学的に合成されることから、それらは、任意のヌクレオチド又はアミノ酸を任意の位置へ取り入れうる。この合成工程は、ランダム化タンパク質又は核酸を生成し、配列の長さにわたってすべて又は殆どの可能性ある組み合わせの形成を許容するために設計することができ、故にランダム化候補生物活性タンパク質性剤のライブラリを形成する。

【0171】

10

1つの実施態様では、すべての位置において配列優先又は一定さをともなわずに、ライブラリは完全にランダム化される。好ましい実施態様では、ライブラリは偏っている。すなわち、配列内のある位置は、一定に保たれているか、限られたメンバーの可能性から選択されるかの何れかである。例えば、好ましい実施態様では、例えば、疎水性アミノ酸、親水性残基、立体構造的に偏った（小さい又は大きいのどちらか）残基の明確な種類において、核酸結合ドメインの作成、システインの作成、架橋結合のため、SH-3ドメインのプロリン、セリン、スレオニン、チロシン又はヒスチジンのリン酸化部位など、又はブリンに対するなどのために、ヌクレオチド又はアミノ酸残基はランダム化されている。

【0172】

20

好ましい実施態様では、候補生物活性剤は核酸である。「核酸」又は「オリゴヌクレオチド」又はここでの文法的に同等の表現によって、少なくとも2つのヌクレオチドが共有結合的にともに結合していると意味される。本発明の核酸は、概してリン酸ジエステル結合を含んでいるが、下記に概説するように、幾つかの場合は、代替バックボーンを有しする核酸類似体が含まれ、この代替バックボーンは、例えば、ホスホルアミド（Beaucageら., Tetrahedron 49 (10) : 1925 (1993) 及びその参考文献；Letsinger, J. Org. 35 : 3800 (1970) ; Sprinzlら., Eur. J. Biochem. 81 : 579 (1977) ; Letsingerら., Nucl. Acids Res. 14 : 3487 (1986) ; Sawaiら., Chem. Lett. 805 (1984) , Letsingerら., J. Am. Chem. Soc. 110 : 4470 (1988) ; 及びPauwelsら., Chemic a Scripta 26 : 141 91986))、ホスホチオエート（Magら., Nucleic Acids Res. 19 : 1437 (1991) ; 及び米国特許第5,644,048号）、ホスホジチオアート（Briuら., J. Am. Chem. Soc. 111 : 2321 (1989) ）、O-メチルfosfօアミダイト結合（Eckstein, Oligonucleotide and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press参考のこと）、及びペプチド核酸バックボーン及び結合（Egholm, J. Am. Chem. Soc. 114 : 1895 (1992) ; Meierら., Chem. Int. Ed. Engl. 31 : 1008 (1992) ; Nielsen, Nature, 365 : 566 (1993) ; Carlssonら., Nature 380 : 207 (1996) 、すべて参考文献によって取り入れている）を含んでなる。他の類似核酸は、ポジティブ（陽性）バックボーン（Denpcyら., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 : 6027 (1995) ; 非イオンバックボーン（米国特許第5,386,023号、第5,637,684号、第5,602,240号、第5,216,141号及び第4,469,863号；Kiedrowskiら., Angew. Chem. Int'l. Ed. English 30 : 423 (1991) ; Letsingerら., J. Am. Chem. Soc. 110 : 4470 (1988) ; Letsingerら., Nucleoside & Nucleotide 13 : 1597 (1994) ; 第2章及び3章、ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modification 40

40

50

ons in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui 及び P. Dan Cook; Mesmaekerら., Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4: 395 (1994); Jeffsら., J. Biomolecular NMR 34: 17 (1994); Tetrahedron Lett. 37: 743 (1996)) 並びに非リボゾームバックボーンを含み、それらは米国特許第5,235,033号及び第5,034,506号、及び第6及び7章、ACS Symposium Series 580, "Carbohydrate Modification in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui 及び P. Dan Cookに記載のものを含む。1つ又は複数の炭素環糖を含む核酸もまた、核酸の定義に含まれる (Jenkinsら., Chem. Soc. Rev. (1995) pp 169 - 179)。幾つかの核酸類似体は、Rawls, C & E News June 2, 1997 35ページに記載されている。この結果、これら参考文献のすべてが、参考文献によって明らかに取り入れられている。リボース-リン酸バックボーンの修飾は、標識のような付加的物質の付加を容易にするためか、または生理的環境下におけるそのような分子の安定性と半減期を増すために施されるであろう。更には、天然発生核酸と類似体の混合物を作製することができる。あるいは、異なる核酸類似体の混合物、及び天然発生核酸と類似体の混合物を作製してもよい。この核酸は、仕様としては、一本鎖又は二本鎖でもよく、或いは二本鎖又は一本鎖配列の双方の部分を含んでもよい。この核酸が任意のデオキシリボ-及びリボ-ヌクレオチドの組み合わせ、及びウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、イソシトシン、イソグアニンなどを含む任意の塩基の組み合わせを含む場合には、この核酸は、DNA、ゲノム及びcDNAの双方、RNA又はハイブリッドでもよい。

【0173】

タンパク質に関する上記の一般的な記述のように、核酸候補生物活性剤は、天然発生核酸、ランダム核酸、又は「偏向」ランダム核酸でよい。例えば、タンパク質に関して上記にて概説しているように、原核生物又は真核生物ゲノムの消化物を用いてもよい。

好ましい実施態様では、候補生物活性剤は、有機化学的物質であり、その幅広い多くのものを文献から得ることが可能である。

上記にて概説した好ましい実施例では、個々の遺伝子と遺伝子の産物（タンパク質）についてスクリーニングをおこなってもよい。好ましい実施態様では、遺伝子又はタンパク質は、特定の組織と関連した別々に発現した遺伝子であり、よって条件はこれら組織に関連しているとして、下記の実施例に記載されているように同定された。従って、一実施態様では、スクリーニングは、FGF-19へ結合することができる候補薬剤を最初に見出すように設計され、次いで、候補薬剤のFGF-19活性を調節する能力を評価するアッセイに、これら薬剤は用いられる。従って、当該分野において認識されているように、実行しうる異なった数多くの方法がある。

【0174】

FGF-19の活性を調節する薬剤のスクリーニングも実行される。好ましい実施態様では、FGF-19の活性を調節することができる生物活性剤のスクリーニングの方法は、FGF-19の試料へ候補生物活性剤を添加し、FGF-19の生物学的活性の変化を測定する段階を含む。「FGF-19の活性を調節すること」は、活性の増加、活性の低下、又は存在する活性の型や種類の変化を含む。従って、この実施態様では、候補薬剤は、FGF-19へ結合するはずであるし（これは、必修でなくてもよいが）、そしてここで定義される FGF-19 の生物学的又は生化学的活性を変化するはずである。この方法は、上記にて全般的に概説したインビトロスクリーニング法、及び FGF-19 の存在、発現、分布、活性、量での変化に関する細胞のインビオスクリーニング法の両方を含む。

【0175】

従って、この実施態様では、これらの方法は、試料と候補生物活性剤を組み合わせること、並びに FGF-19 活性への効果を評価することを含む。「FGF-19 タンパク質活

10

20

30

30

40

50

性」又はここでの文法的に同等の用語によって、上記に記載した、少なくとも FGF - 19 タンパク質の生物学的活性が表される。

好ましい実施態様では、FGF - 19 タンパク質の活性が上昇する；その他の好ましい実施態様では、FGF - 19 タンパク質の活性が低下する。従って、アンタゴニストである生物活性剤は、ある実施態様で好まれ、アゴニストである生物活性剤は、他の実施態様で好まれうる。

本発明の一側面では、FGF - 19 に対する薬剤候補物質の効果を評価することで、FGF - 19 配列を含む細胞は薬剤スクリーニングアッセイで用いられる。細胞型は、正常細胞、腫瘍細胞、及び脂肪細胞を含む。

【0176】

グルコース取り込み、レプチニン放出、新陳代謝、トリグリセリド及び遊離脂肪酸レベル、体重及び体脂肪の変化のような FGF - 19 活性を評価する方法は、当該分野で知られており、下記の実施例において例示されている。

好ましい実施態様では、上記の定義のように、この方法は、FGF - 19 を含む細胞へ候補生物活性剤を添加することを含む。好ましい細胞型は、殆どすべての細胞を含む。これらの細胞は、好ましくは組み換え体であるが、FGF - 19 タンパク質をコードする核酸を含む。好ましい実施態様では、候補薬剤のライブラリは、多数の細胞で試験される。

【0177】

一側面では、このアッセイは、例えばホルモン、抗体、ペプチド、抗原、サイトカイン、成長因子、活動電位、化学療法剤を含む薬理学的薬剤、放射線、発癌物質、又は他の細胞（すなわち、細胞間接触）などの生理学的シグナルへの存在下又は非存在下での、又は先だっての又は後での曝露で評価される。その他の実施例では、測定は、細胞周期プロセスの異なった段階で確定される。

また、ここで提供される FGF - 19 配列は、診断方法で用いることができる。FGF - 19 の過剰発現は異常に高い代謝速度を示し、発現抑制は肥満の傾向を示す。更には、変異又は機能失調の FGF - 19 に関して、患者からの試料を分析してもよい。一般的には、そのような方法は、患者からの試料を比較すること、及び FGF - 19 の発現をコントロールのそれと比較することを含む。

【0178】

F. 抗 FGF - 19 抗体

本発明は抗 FGF - 19 抗体を更に提供する。抗体の例としては、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性及びヘテロコンジュゲート抗体が含まれる。

【0179】

1. ポリクローナル抗体

抗 FGF - 19 抗体はポリクローナル抗体を含みうる。ポリクローナル抗体の調製方法は当業者に知られている。哺乳動物においてポリクローナル抗体は、例えば免疫化剤、及び所望するのであればアジュバントを、1つ又は複数回注射することで発生させることができる。典型的には、免疫化剤及び/又はアジュバントを複数回皮下又は腹腔内注射により、哺乳動物に注射する。免疫化剤は、FGF - 19 ポリペプチド又はその融合タンパク質を含みうる。免疫化剤を免疫化された哺乳動物において免疫原性が知られているタンパク質に結合させるのが有用である。このような免疫原タンパク質の例は、これらに限られないが、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン及び大豆トリプシンインヒビターが含まれる。使用され得るアジュバントの例には、フロイント完全アジュバント及び MPL - TDM アジュバント（モノホスホリル脂質 A、合成トレハロースジコリノミコラート）が含まれる。免疫化プロトコールは、過度の実験なく当業者により選択されるであろう。

【0180】

2. モノクローナル抗体

あるいは、抗 FGF - 19 抗体はモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は、Kohler 及び Milstein, Nature, 256: 495 (1975)

10

20

30

40

50

5)に記載されているようなハイブリドーマ法を使用することで調製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を典型的には免疫化剤により免疫化することで、免疫化剤に特異的に結合する抗体を生成するかあるいは生成可能なリンパ球を誘発する。また、リンパ球をインビトロで免疫化することもできる。

免疫化剤は、典型的にはFGF-19ポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球(「PBL」)が使用され、あるいは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレングリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]。

不死化株化細胞は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髄腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髄腫株化細胞が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する1つ又は複数の物質を含有する適切な培地で培養される。例えば、親細胞が、酵素のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGprt又はHprt)を欠いていると、ハイブリドーマの培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノブチリン及びチミジンを含み(「HAT培地」)、この物質がHGprt欠乏性細胞の増殖を阻止する。

【0181】

好ましい不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性である。より好ましい不死化株化細胞はマウス骨髄腫株であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴのSalak Institute Cell Distribution Centerやバージニア州マナッサスのアメリカン・タイプ・カルチャーラー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒト異種骨髄腫株化細胞も開示されている [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)、Brodeurら, Monoclonal Antibody production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63]。

次いでハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、FGF-19に対するモノクローナル抗体の存在について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ(RIA)や酵素結合免疫測定法(ELISA)等のインビトロ結合検定法によって測定する。このような技術及びアッセイは、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)によるスキヤッチャード分析法によって測定することができる。

【0182】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを制限希釈工程によりサブクローンングし、標準的な方法で成長させることができる [Goding, 上掲]。この目的のための適当な培地には、例えば、ダルベッコの変形イーグル培地及びRPMI-1640倍地が含まれる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は哺乳動物においてインビボで腹水として成長させることもできる。

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-セファロース法、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー法、ゲル電気泳動法、透析法又はアフィニティークロマトグラフィー等の従来の免疫グロブリン精製方法によって培養培地又は腹水液から単離又は精製される。

【0183】

また、モノクローナル抗体は、組換えDNA法、例えば米国特許第4,816,567号に記載された方法により作成することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードす

10

20

30

40

50

るDNAは、常套的な方法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して)、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、DNAは発現ベクター内に配することができ、これが宿主細胞、例えばサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、あるいは免疫グロブリンタンパク質を生成等しない骨髄腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、DNAは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより[米国特許第4,816,567号;上掲のMorrisonら]、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、あるいは本発明の抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、キメラ性二価抗体を生成する。

【0184】

抗体は一価抗体であってもよい。一価抗体の調製方法は当該分野においてよく知られている。例えば、一つの方法は免疫グロブリン軽鎖と修飾重鎖の組換え発現を含む。重鎖は一般的に、重鎖の架橋を防止するようにFc領域の任意の点で切断される。あるいは、関連するシステイン残基を他のアミノ酸残基で置換するか欠失させて架橋を防止する。一価抗体の調製にはインビトロ法がまた適している。抗体の消化による、その断片、特にFab断片の生成は、当該分野において知られている慣用的技術を使用して達成できる。

【0185】

3. ヒト及びヒト化抗体

本発明の抗FGF-19抗体は、さらにヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖あるいはその断片(例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいはほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいはほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、最適には免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる[Jonesら, *Nature*, 321:522-525(1986); Riechmannら, *Nature*, 332:323-329(1988); 及びPresta, *Curr. Op Struct. Biol.*, 2:593-596(1992)]。

【0186】

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の1つ又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は基本的に、ウインター(Winter)及び共同研究者[Jonesら, *Nature*, 321:522-525(1986); Riechmannら, *Nature*, 332:323-327(1988); Verhoevenら, *Science*, 239:1534-1536(1988)]の方法に従って、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応す

る配列で置換されたキメラ抗体（米国特許第4,816,567号）である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基及び場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

【0187】

また、ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリー [Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marksら, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)] を含むこの分野で知られた種々の方法を用いて作成することもできる。また、Coleら及びBoernerらの技術も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる (Coleら, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss. p. 77 (1985) 及びBoernerら, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)]。同様に、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子は部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することにより産生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似しているヒト抗体の生産が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号；同第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,661,016号、及び次の科学刊行物 : Marksら, Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonbergら, Nature 368 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fischwildら, Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg及びHuszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995) に記載されている。

【0188】

4. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体である。本発明の場合において、結合特異性の一方はFGF-19に対してであり、他方は任意の他の抗原、好ましくは細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットに対してである。

二重特異性抗体を作成する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現に基づく [Milestonein及びCuello, Nature, 305:537-539 (1983)]。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開のWO93/08829、及びTrauneckerら, EMBO J., 10:3655-3659 (1991) に開示されている。

【0189】

所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合できる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ部、CH2及びCH3領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。少なくとも一つの融合には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(CH1)が存在することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするDNA、及び望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。二重特異性抗体を作成するための更なる詳細については、例えばSureshら, Methods in Enzymology, 121:210 (1986) を参照されたい。

【0190】

10

20

30

40

50

WO 96 / 27011 に記載された他の方法によれば、一対の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収される異種二量体の割合を最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインの C H 3 領域の少なくとも一部を含む。この方法では、第 1 抗体分子の界面からの 1 つ又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖（例えばチロシン又はトリプトファン）と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの（例えばアラニン又はスレオニン）と置き換えることにより第 2 の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

【0191】

10

二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片（例えば、 $F(ab') 二重特異性抗体）として調製できる。抗体断片から二重特異性抗体を產生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennanら, Science, 229: 81 (1985) は無傷の抗体をタンパク分解的に切断して $F(ab') 断片を產生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルフィド形成を防止する。產生された $F(ab') 断片はついでチオニトロベンゾアート (TNB) 誘導体に転換される。 $F(ab') - TNB$ 誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元により $F(ab') - \text{チオール}$ に再転換し、他の $F(ab') - TNB$ 誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。$$$

20

【0192】

大腸菌から $F(ab') 断片を直接回収でき、これは化学的に結合して二重特異性抗体を形成することができる。Shalabyら, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992) は完全にヒト化された二重特異性抗体 $F(ab') 分子の製造を記述している。各 $F(ab') 断片は大腸菌から別個に分泌され、インビトロで定方向化学共役を受けて二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、正常なヒト T 細胞及び ErbB2 レセプターを過剰発現する細胞に結合可能で、ヒト乳房腫瘍標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解活性の誘因となる。$$$

30

【0193】

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な方法もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産されている。Kostelnýら, J. Immunol. 148 (5): 1547-1553 (1992)。Foss 及び Jun タンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体の $F(ab') 部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の 2 つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン (V_L) に重鎖可変ドメイン (V_H) を結合してなる。従って、一つの断片の V_H 及び V_L ドメインは他の断片の相補的 V_L 及び V_H ドメインと強制的に対形成させられ、2 つの抗原結合部位を形成する。単鎖 Fv (sFv) ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruberら, J. Immunol. 152: 5368 (1994) を参照されたい。二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tuttら J. Immunol. 147: 60 (1991)。$

40

【0194】

例示的な二重特異性抗体は、ここに与えられた $FGF-19$ ポリペプチドの 2 つの異なるエピトープに結合しうる。あるいは、抗 $FGF-19$ ポリペプチドのアームは、特定の F

50

G F - 1 9 ポリペプチド発現細胞に細胞防御メカニズムを集中させるように、T細胞レセプター分子（例えばCD2、CD3、CD28、又はB7）等の白血球上のトリガー分子、又はFc RI (CD64)、Fc RII (CD32)及びFc RIII (CD16)等のIgG (Fc R)に対するFcレセプターに結合するアームと結合しうる。また、二重特異性抗体は特定のFGF - 1 9 ポリペプチドを発現する細胞に細胞毒性薬を局在化させるためにも使用されうる。これらの抗体はFGF - 1 9 結合アーム及び細胞毒性薬又は放射性キレート化剤、例えばEOTUBE、DPTA、DOTA、又はTETAと結合するアームを有する。関心ある他の二重特異性抗体はFGF - 1 9 ポリペプチドに結合し、そしてさらに組織因子（TF）に結合する。

【0195】

10

5. ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロコンジュゲート抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため[米国特許第4,676,980号]及びHIV感染の治療のために[WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第4,676,980号に開示されているものが含まれる。

【0196】

20

6. エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば癌治療における抗体の有効性を向上させるのが望ましい。例えば、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成させるようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上した内部移行能力及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体依存性細胞性細胞毒性（ADCC）を有しうる。Caronら, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992) 及びShopes, J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992) を参照。向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体はまた、Wolffら, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993) に記載されたような異種二官能性架橋を用いても調製しうる。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びADCC能力を向上させることもできる。Stevensonら, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989) を参照。

30

【0197】

40

7. 免疫複合体

本発明はまた、化学治療薬、毒素（例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片）などの細胞毒性薬、あるいは放射性同位体（即ち、放射性コンジュゲート）にコンジュゲートされた抗体を含む免疫複合体にも関する。

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬は上記した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片は、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、（綠膿菌からの）外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン（modocycin）A鎖、-サルシン、アレウリテス・フォーディ（Aleurites fordii）タンパク質、ジアンチン（dianthrin）タンパク質、フィトラカ・アメリカナ（Phytolaca americana）タンパク質（PAPI、PAPII、及びPAPS）、モモルディカ・チャランチア（momordica charantia）インヒビター、クルシン（curcumin）、クロチン（crotinin）、サバオナリア・オフィシナリス（sapoanaria officinalis）インヒビター、ゲロニン（gelonin）、マイトゲリン（mitogellin）、レストリクトシン（res-

50

trictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricotecene)を含む。様々な放射性又クレオチドが放射性コンジュゲート抗体の生成に利用可能である。例として、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y及び¹⁸⁶Reを含む。

【0198】

抗体及び細胞毒性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPD_P)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHC_L等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスペレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vittetta, Science 238: 1098 (1987)に記載されたように調製することができる。カーボン-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性又クレオチドの抗体へのコンジュゲートのためのキレート剤の例である。WO 94/11026参照。

他の実施態様では、腫瘍の予備標的化で使用するために、抗体は「レセプター」(ストレプトアビジン等)にコンジュゲートされてもよく、抗体-レセプター複合体は患者に投与され、次いで清澄化剤を用いて未結合複合体を循環から除去し、次に細胞毒性薬(例えば、放射性又クレオチド)にコンジュゲートされた「リガンド」(アビジン等)を投与する。

【0199】

8. 免疫リポソーム

また、ここに開示する抗体は、免疫リポソームとして調製してもよい。抗体を含むリポソームは、Epsteinら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwangら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); 及び米国特許第4,485,045号及び第4,544,545号に記載されたような、この分野で知られた方法で調製される。向上した循環時間を持つリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物での逆相蒸発法によって生成される。リポソームは、所定サイズのフィルターを通して押し出され、所望の径を有するリポソームが生成される。本発明の抗体のFab'断片は、Martinら, J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)に記載されているように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームにコンジュゲートされ得る。化学治療薬(ドキソルビシン等)は、場合によってはリポソーム内に包含される。Gabizonら, J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989)参照。

【0200】

9. 抗体の製薬組成物

ここで同定されるFGF-19ポリペプチドに特異的に結合する抗体、並びに上記に開示したスクリーニングアッセイで同定された他の分子は、種々の疾患の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。

【0201】

FGF-19ポリペプチドが細胞内であり、全抗体が阻害剤として用いられる場合、内在化抗体が好ましい。しかし、リポフェクション又はリポソームも抗体、又は抗体断片を細胞に導入するのに使用できる。抗体断片が用いられる場合、標的タンパク質の結合ドメイ

10

20

30

40

50

ンに特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持したペプチド分子が設計できる。このようなペプチドは、化学的に合成でき、及び／又は組換えDNA技術によって生成できる。例えば、Marascoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993) 参照。ここでの製剤は、治療すべき特定の徵候に必要な場合に1つを越える活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。あるいは、又はそれに加えて、組成物は、細胞毒性薬、サイトカイン、化学治療薬又は成長阻害剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

【0202】

10

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル)中、又はマイクロエマルション中に包括されていてもよい。これらの技術は上掲の Remington's Pharmaceutical Scienceに開示されている。インビオ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

【0203】

20

持続放出性製剤を調製してもよい。持続放出性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。除放性マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール))、ポリアクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸及び-L-エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商品名)(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドの注射可能な小球)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に渡って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。カプセル化された抗体が身体内に長時間残ると、それらは37の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。合理的な方法は、含まれる機構に依存する安定化について工夫することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換を通じた分子間S-S結合形成であると発見された場合、安定化はスルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の付加、及び特異的ポリマー-マトリクス組成物の開発によって達成されうる。

30

【0204】

30

G. 抗FGF-19抗体の用途

本発明の抗FGF-19抗体は様々な有用性を有している。例えば、抗FGF-19抗体は、FGF-19の診断アッセイ、例えばその特定細胞、組織、又は血清での発現の検出に用いられる。競合的結合アッセイ、直接又は間接サンドウイッチャッセイ及び不均一又は均一相で行われる免疫沈降アッセイ[Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158]等のこの分野で知られた種々の診断アッセイ技術が使用される。診断アッセイで用いられる抗体は、検出可能な部位で標識される。検出可能な部位は、直接又は間接に、検出可能なシグナルを発生しなければならない。例えば、検出可能な部位は、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S又は¹²⁵I等の放射性同位体、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン又はルシフェリン等の蛍光又は化学発光化合物、あるいはアルカリホスファターゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ又はセイヨウワサビペルオキシダーゼ等の酵素であってよい。抗体に検出可能な部位をコンジュゲートさ

40

50

せるためにこの分野で知られた任意の方法が用いられ、それにはHunterら, *Nature*, 144: 945 (1962); Davidら, *Biochemistry*, 13: 1014 (1974); Painら, *J. Immunol. Meth.*, 40: 219 (1981); 及び Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407 (1982) に記載された方法が含まれる。

【0205】

また、抗FGF-19抗体は組換え細胞培養又は天然供給源からのFGF-19のアフィニティー精製にも有用である。この方法においては、FGF-19に対する抗体を、当該分野でよく知られている方法を使用して、セファデックス樹脂や濾紙のような適当な支持体に固定化する。次に、固定化された抗体を、精製するFGF-19を含む試料と接触させた後、固定化された抗体に結合したFGF-19以外の試料中の物質を実質的に全て除去する適当な溶媒で支持体を洗浄する。最後に、FGF-19を抗体から脱離させる他の適当な溶媒で支持体を洗浄する。

以下の実施例は例示目的でのみ提供されるものであって、決して本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

本明細書で引用した全ての特許及び参考文献の全体を、出典明示によりここに取り込む。

【0206】

実施例

実施例において言及されている市販の試薬は、特段の指示がない限り製造者の説明に従って使用された。以下の実施例及び本明細書全体を通じてATCC登録番号により同定される細胞出所は、アメリカンタイプカルチャーコレクション(American Type Culture Collection), マナス, バージニアである。

【0207】

実施例1

ヒトFGF-19をコードするcDNAクローンの単離

EST配列登録番号AF007268、マウス線維芽細胞成長因子(FGF-15)は種々の公的なESTデータベース(例えば、GenBank、Dayhoff等)を検索するために用いられた。検索は、コンピュータープログラムBLAST又はBLAST2(Altschulら, *Methods in Enzymology*, 266: 460-480 (1996))を利用し、ECDタンパク質配列のEST配列の6フレーム翻訳に対する比較により行われた。検索の結果、GenBankのEST AA220994がヒットし、STRATAGENE NT2の神経前駆体937230として同定されていた。また、AA220994の配列は、ここではDNA47412として言及されている。

【0208】

DNA47412配列に基づき、1)目的の配列を含むcDNAライブラリーをPCRにより同定するために、及び2)FGF-19に対する全長コード化配列のクローンを単離するプローブとして使用するために、オリゴヌクレオチドが合成された。通常、正方向及び逆方向のPCRプライマーは20から30ヌクレオチドの範囲内で、しばしば、約100から1000bpの長さのPCR産物を产生するように設計される。場合によって、コンセンサス配列が約1-1.5kb以上であるとき、さらにオリゴヌクレオチドが合成される。全長クローンについて幾つかのライブラリーをスクリーニングするために、ライブラリー由来のDNAは、AusubelらによるCurrent Protocols in Molecular Biology、上掲に従い、PCRプライマー対を用いてPCR增幅によりスクリーニングされる。その後、陽性ライブラリーは、プローブオリゴヌクレオチド及び一対のプライマーペアを用いて、目的の遺伝子をコードするクローンを単離するために使用された。

【0209】

PCRプライマー(正方向及び逆方向)が合成された:

正方向PCRプライマー 5'-ATCCGCCAGATGGCTACAAATGTTG-

10

20

30

40

50

A - 3 '

(配列番号 : 3)

逆方向 P C R プライマー 5 ' - C C A G T C C G G T G A C A A G C C C A A A - 3 '

(配列番号 : 4)

さらに、合成オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブは、以下に示されるヌクレオチド配列を持つ D N A 4 7 4 1 2 から構築された。

ハイブリダイゼーションプローブ

5 ' - G C C T C C C G G T C T C C C T G A G C A G T G C C A A A C A G C G G C A G T G T A - 3 '

(配列番号 : 5)

10

【 0 2 1 0 】

c D N A ライブライマーの構築のための R N A は、ヒト胎児網膜組織から単離された。 c D N A クローンを単離するために使用される c D N A ライブライマーは、 I n v i t r o g e n , サンディエゴ , カリフォルニアからの市販の試薬を使用し、標準的な方法によって構築された。 c D N A は、 N o t I サイトを含むオリゴ d T から伸長させ、平滑末端にて半リン酸化された S a l I アダプターと連結し、 N o t I にて切断後ゲル電気泳動にて適当なサイズに分離し、ベクターに特有の X h o I サイト及び N o t I サイトを利用し、決まった方向で適当なクローニングベクター (p R K B 又は p R K D など ; p R K 5 B は、 S f i I サイトを含まない p R K 5 D の前駆体である ; H o l m e s r a , S c i e n c e , 2 5 3 : 1 2 7 8 - 1 2 8 0 (1 9 9 1) を参照のこと) にクローン化した。 上述のようにして単離されたクローンの D N A 配列は、全長 F G F - 1 9 ポリペプチドの全長 D N A 配列 (ここでは、 D N A 4 9 4 3 5 - 1 2 1 9 (F i g 1 、配列番号 : 1) と命名されている) 、及び F G F - 1 9 ポリペプチドに対する誘導体のタンパク質配列を示した。

20

【 0 2 1 1 】

上述のように同定された全長クローンは、ヌクレオチド位置 4 6 4 - 4 6 6 に見かけの翻訳開始部位、及びヌクレオチド位置 1 1 1 2 - 1 1 1 4 に停止シグナルを持つ単一の読み枠を含んでいた (配列番号 : 1) 。予想されるポリペプチド前駆体は、 2 1 6 アミノ酸長で、およそ 2 4 , 0 0 3 ダルトンの計算上の分子量、及びおよそ 6 . 9 9 の推定される p I をもつ。 F i g 2 (配列番号 : 2) に示される全長 F G F - 1 9 配列の解析により、 F i g 2 に示されるように様々な重要なポリペプチドドメインの存在が証明されたが、これらの重要なポリペプチドドメインを示す位置は、上述のごとく、おおよそのものである。染色体マッピングにより、 F G F - 1 9 コード化核酸は、ヒトの染色体 1 1 q 1 3 . 1 中バンド q 1 3 . 1 にマップされることが明らかとなっている。クローン D N A 4 9 4 3 5 - 1 2 1 9 は、 1 9 9 7 年 1 1 月 2 1 日に A T C C に寄託されており、 A T C C 寄託番号 2 0 9 4 8 0 が割り当てられている。

30

F i g 2 に示される全長配列 (配列番号 : 2) の A L I G N - 2 配列整列解析を用いた、 D a y h o f f データーベース (バージョン 3 5 . 4 5 S w i s s P r o t 3 5) の解析により、 F G F - 1 9 アミノ酸配列と以下に示す D a y h o f f 配列との間の配列同一性が証明された : A F 0 0 7 2 6 8 _ 1 , S 5 4 4 0 7 , P _ W 5 2 5 9 6 , F G F 2 _ X E N L A , P _ W 5 3 7 9 3 , A B 0 0 2 0 9 7 _ 1 , P _ R 2 7 9 6 6 , H S U 6 7 9 1 8 _ 1 , S 2 3 5 9 5 , 及び P _ R 7 0 8 2 4 。

40

【 0 2 1 2 】

実施例 2

ハイブリダイゼーションプローブとしての F G F - 1 9 の使用

以下の方法では、 F G F - 1 9 をコードするヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションプローブとしての使用について記述する。

全長又は成熟 F G F - 1 9 のコード化配列を含む D N A は、ヒト組織 c D N A ライブライマー又はヒト組織ゲノムライブライマーに存在するホモログ D N A (自然に生じる F G F - 1 9 変異体をコードするようなもの) をスクリーニングするためのプローブとして用いられ

50

る。

いずれか一方のライブラリーDNAを含むフィルターのハイブリダイゼーション及び洗浄は、以下の高い緊縮性条件下にて実施される。フィルターに対する放射標識されたFGF-19由来のプローブのハイブリダイゼーションは、50%ホルムアミド、5×SSC、0.1%SDS、0.1%ピロリン酸ナトリウム、50mMリン酸ナトリウム、pH6.8、2×デンハード溶液、及び10%硫酸デキストラン中で、42、20時間行われた。フィルターの洗浄は、0.1×SSC及び0.1%SDS中、42にて実施される。

その後、全長天然配列FGF-19をコードするDNAと所望の配列同一性をもつDNAは、当該技術分野において既知の標準的技術を使用して同定し得る。

10

【0213】

実施例3

大腸菌中でのFGF-19の発現

本実施例は、大腸菌での組換体の発現によるFGF-19の非グリコシル化形態の調製を示す。

FGF-19をコードするDNA配列は、まず、選択されたPCRプライマーを用いて増幅される。プライマーには、選択される発現ベクター上の制限酵素部位に対応する制限酵素部位が含まれるべきである。種々の発現ベクターが用いられる。適当なベクターの例としては、アンピシリン及びテトラサイクリン耐性遺伝子を含むpBR322(大腸菌由来; *B*o*l**i*v* *a**r**l**a*, *G*ene, 2:95(1977)参照のこと)などである。ベクターは制限酵素で切断し、脱リン酸化する。次いで、このPCRで増幅された配列を、ベクターへライゲーションする。好ましくは、ベクターには、抗生物質耐性遺伝子、*t**r**p*プロモーター、ポリ*his*リーダー(最初の6つのSTIICodon、ポリ*his*配列、及びエンテロキナーゼ切断部位を含む)、FGF-19コード化領域、ラムダ転写停止部位、及び*a**r**g*U遺伝子をコードする配列が含まれる。*

20

【0214】

その後、ライゲーション混合物は、*S*am*b**r**o**o**k*ら, 上掲中に記載されている方法を用いて選択された大腸菌株を形質転換させるのに使用される。形質転換体は、LBプレート上の生育能により同定され、抗生物質耐性コロニーが選択される。プラスミドDNAは単離され、制限酵素分析及びDNA配列決定により配列確認される。

30

選択されたクローンは、抗生物質を添加したLB培地のような液体培養液中で一晩増殖させることが可能である。この一晩かけて培養した産物は、引き続き、大規模培養に植菌するために使用されてもよい。その後、細胞は所望の吸光度になるまで増殖させ、その間に発現プロモーターが始動される。

さらに数時間細胞を培養した後、細胞は遠心により回収することができる。遠心により得られた細胞沈殿物は、当該技術分野において既知の種々の試薬を用いて可溶化することができ、その後、可溶化されたFGF-19タンパク質は、当該タンパク質との強固な結合を可能にする条件下にて金属キレートカラムを用い、精製することができる。

【0215】

FGF-19は、以下の方法に従い、ポリ*his*タグ形態で、大腸菌中で発現される。FGF-19をコードするDNAは、まず、選択されたPCRプライマーを用いて増幅される。プライマーには選択される発現ベクター上の制限酵素部位に対応する制限酵素部位、及び有効かつ信頼性のある翻訳開始部位、金属カラムによる迅速な精製、及びエンテロキナーゼでのタンパク切断的除去を提供する他の有用な配列が含まれている。その後、PCRで増幅され、ポリ*his*でタグ化された配列は、発現ベクターに連結され株52(W3110*fuhA*(*tonA*)*longalE**rpoHts*(*htrP**Rts*)*c1pP*(*lacIq*))由来の大腸菌宿主を形質転換するのに使用される。形質転換体は、最初に、50mg/mlのカルベニシリンを含むLB中で、O.D.600に到達するまで30で3-5時間振盪しながら増殖させる。培養物は50-100倍にCRAP培地(3.57gの(*NH4*)₂*SO4*, 0.71gのクエン酸ナトリウム・2*H2O*, 1.07

40

50

g の K C l , 5 . 3 6 g のディフコ イーストエキストラクト , 5 . 3 6 g の Sheffield hy case SF を 5 0 0 m L の水の溶解し、さらに、 1 1 0 m M M P O S , pH 7 . 3 , 0 . 5 5 % (W / V) グルコース及び 7 m M Mg S O 4 になるように添加する) 中にて希釈し、おおよそ、 2 0 - 3 0 時間、 3 0 にて振盪させながら増殖させる。 S D S - P A G E 分析により発現を検証するために試験サンプルをとり、全培養物は細胞を沈殿させるために遠心する。細胞沈殿は、精製及び巻き戻しまで凍結させる。

【 0 2 1 6 】

0 . 5 から 1 L の発酵槽からの大腸菌のペースト (6 - 1 0 g ペレット) を 1 0 倍量 (W / V) の 7 M グアニジン , 2 0 m M Tris , pH 8 のバッファーに再懸濁させる。 固体の亜硫酸ナトリウム及び四チオニ酸ナトリウムを、各々、最終濃度 0 . 1 M 及び 0 . 0 2 M になるように添加し、溶液は一晩、 4 にて攪拌される。このステップの結果、全てのシステイン残基が亜硫酸化によりブロックされた変性タンパク質が得られる。溶液は、ベックマンの超遠心機にて 4 0 , 0 0 0 r p m 、 3 0 分間遠心される。上清は 3 - 5 倍容量の金属キレートカラムバッファー (6 M グアニジン , 2 0 m M Tris , pH 7 . 4) で希釈され、夾雑物を除くため、 0 . 2 2 μ フィルターを通してろ過される。浄化された抽出液を、金属キレートカラムバッファーで平衡化させた 5 m L のキアゲン N i - N T A 金属キレートカラムにかける。カラムは、 5 0 m M イミダゾール (C a l b i o c h e m , U t r o l g r a d e) , pH 7 . 4 を含む別途のバッファーにより洗浄される。タンパク質は 2 5 0 m M イミダゾールを含むバッファーにて溶出される。所望のタンパク質を含む画分がプールされ 4 にて保存される。タンパク質濃度は、タンパクのアミノ酸配列に基づく計算上の吸光係数を用いて吸光度 2 8 0 n m により見積もられる。 10 20

【 0 2 1 7 】

タンパク質は、次のような構成物で構成される新しく調製された巻戻しバッファー中で、サンプルをゆっくりと希釈することにより巻き戻される ; 2 0 m M Tris , pH 8 . 6 , 0 . 3 M Na C l , 2 . 5 M 尿素 , 5 m M システイン , 2 0 m M グリシン , 及び 1 m M E D T A 。巻戻し容積は、最終的なタンパク質濃度が 5 0 から 1 0 0 m g / m l の間になるように選択される。巻戻し溶液は、 4 にて 1 2 - 3 6 時間穏やかに攪拌される。巻戻し反応は、 T F A を最終濃度 0 . 4 % (pH およそ 3) になるように添加することにより停止される。タンパク質の更なる精製の前に、容積は 0 . 2 2 μ フィルターを通してろ過され、アセトニトリルが最終濃度 2 - 1 0 % になるように添加される。巻戻されたタンパク質は、アセトニトリル濃度勾配が 1 0 から 8 0 % である、 0 . 1 % T F A の溶出バッファーを用いて、 P o r o s R 1 / H 逆相カラムにてクロマトされる。 A 2 8 0 の吸収をもつ画分のアリコットが S D S ポリアクリルアミドゲルで分析され、均一な巻戻しタンパク質を含む画分がプールされる。通常、適切にも巻き戻されたほとんどのタンパク質は、逆相レジンとの相互作用から遮蔽される疎水性内部を有する最もコンパクトなもののため、これらの種のタンパク質は最も低いアセトニトリル濃度にて溶出される。凝縮体は、通常、高いアセトニトリル濃度にて溶出される。望ましい形態から誤って巻き戻されたタンパク質の形態を分離することに加え、逆相のステップは、サンプルからエンドトキシンをも除去する。 30

所望の巻戻された F G F - 1 9 ポリペプチドを含む画分はプールされ、アセトニトリルはタンパク質溶液に直接、窒素を穏やかに吹き付けることにより除去される。タンパク質は、透析又は製剤化バッファーで平衡化された G 2 5 S u p e r f i n e (P h a r m a c i a) レジンを用いたゲルろ過、及び滅菌的にろ過されることにより、 0 . 1 4 M 塩化ナトリウム、及び 4 % マンニトールを含む 2 0 m M H e p e s , pH 6 . 8 中に製剤化される。 40

【 0 2 1 8 】

実施例 4

哺乳類細胞における F G F - 1 9 の発現

本実施例は、哺乳類細胞における組換体発現により F G F - 1 9 の潜在的にグリコシル化された形態の調製を示す。 50

ベクター、pRK5（欧州特許第307,247号、1989年3月15日発行を参照のこと）は、発現ベクターとして用いた。随意に、FGF-19DNAは、FGF-19DNAの挿入を可能にするように選択された酵素により、Sambrookら、上掲中で記載されているような連結方法を用いて、pRK5に連結される。その結果得られるベクターはpRK5-FGF-19と呼ばれる。

一の実施態様において、選択された宿主細胞は293細胞であってもよい。ヒト239細胞（ATCC CCL 1573）は、ウシ胎児血清及び、任意に栄養素構成成分及び/又は抗生物質を添加されたDMEMなどの培養液中、組織培養プレート中でコンフルエントになるまで生育させる。約10μgのpRK5-FGF-19DNAは、VAN RNA遺伝子（Thimmapayaら、Cell, 31:543 (1982)）をコードする約1μgのDNAと混合され、500μlの1mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, 0.227M CaCl₂、に溶解させる。この混合物に対し、500μlの50mM HEPES (pH 7.35), 280mM NaCl, 1.5mM NaPO₄を一滴ずつ添加し、25℃で10分間、沈殿を形成させる。培養液は、アスピレーターで除去し、20%グリセロールを含む2mlのPBSを30秒間添加する。293細胞は、無血清培地で洗浄し、新しい培地を添加し、細胞を約5日間培養する。

【0219】

おおよそ、形質移入24時間後、培養液を除去し、培養液（のみ）、又は200μCi/m³⁵S-システイン及び200μCi/m³⁵S-メチオニンを含む培養液で置換する。培養12時間後、条件培地を回収し、スピンフィルターにて濃縮し、15%SDSゲルで泳動する。泳動後ゲルを乾燥させ、FGF-19ポリペプチドの存在を示すように選択された時間、フィルムを露光させる。軽質移入された細胞を含む培地は、さらに培養され（無血清培地中）、培養液は選択されたバイオアッセイで試験される。

それに代わる技術により、FGF-19はSompanyracら、Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)により記述された硫酸デキストラン法を用い、293細胞へ一過的に導入されてもよい。293細胞はスピナーフラスコ中で最大密度になるように生育させ、700μgのpRK5-FGF-19DNAが添加される。まず、細胞は遠心によりスピナーフラスコから濃縮され、PBSにて洗浄される。DNA-デキストラン沈殿物は、4時間、細胞ペレット上でインキュベートされる。細胞は、90秒間20%グリセロールで処理し、組織培養液で洗浄し、組織培養液、5μg/m³のウシインスリン及び0.1μg/m³のウシトランスフェリンを含むスピナーフラスコへ再び移される。約5日後、条件培地は、遠心され細胞及び細胞片を除去するためにろ過される。その後、発現されたFGF-19を含むサンプルは、濃縮され、透析及び/又はカラムクロマトグラフィーのような選択されたいずれかの方法により精製され得る。

【0220】

他の実施態様において、FGF-19はCHO細胞中にて発現され得る。pRK5-FGF-19は、CaPO₄又はDEAEデキストランなどの既知の試薬を用いてCHO細胞へ形質移入され得る。上述したように、細胞培養物はインキュベートされ、培地は、培養液（のみ）又は³⁵S-メチオニンのような放射標識物を含む培養液に置換される。FGF-19ポリペプチドの存在を定量後、培養液は無血清培地で置換される。好ましくは、培養は約6日間行われ、その後条件培地を回収する。発現されたFGF-19を含む培養液は、いずれか選択された方法により濃縮され、精製される。

また、エピトープタグ化されたFGF-19は、宿主CHO細胞中でも発現される。FGF-19は、pRK5ベクターからサブクローニングされる。サブクローニングされたインサートは、ポリhisタグのような選択されたエピトープタグと共にフレームが合うように、パキュロウイルスの発現ベクターへ融合されるようにPCRを行うことも可能である。ポリhisタグFGF-19インサートは、安定クローニングの選択のためにDHFRのような選択マーカーを含むSV40作動性ベクターへサブクローニングすることができる。最終的に、CHO細胞は、SV40作動性ベクターで形質移入されること（上述のように

10

20

30

40

50

) が可能である。上述のように、発現を確認するために標識化することを行ってもよい。その後、発現されたポリタグ化 FGF - 19 を含む培養液は、濃縮することも可能であり、Ni²⁺ キレートアフィニティークロマトグラフィーのような、いずれか選択された方法で精製される。

【0221】

また、FGF - 19 は CHO 及び / 又は COS 細胞中で一過的発現方法により発現してもよく、CHO 細胞中で、他の安定発現法によってもよい。

CHO 細胞中での安定発現は、以下の方法を用いて実施される。タンパク質は、IgG 構築物 (イムノアドヘシン) として発現され、この場合、各タンパク質の可溶性形態 (例えば、細胞外ドメイン) に対するコード化配列は、ヒンジ、CH2 及び CH2 ドメインを含む IgG1 定常領域配列に融合され、及び又は、ポリ - His タグ化形態である。

PCR 増幅の後、各 DNA は、Ausubelら, Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997) 中に記載の標準的な技術を用いて CHO 発現ベクターへサブクローニングされる。CHO 発現ベクターは、cDNA の簡便なシャトリング (入替え) を可能にするために、目的の DNA の 5' 及び 3' と適合する制限酵素部位をもつよう構築される。CHO 細胞で発現に用いられるベクターは、Lucasら, Nucleic Acids Res. 24:9 (1774 - 1779 (1996)) 中に記載されているように使用され、目的の cDNA 及びジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の発現を誘起するために、SV40 初期プロモーター / エンハンサーを使用する。

【0222】

所望のプラスミド DNA 12 μg を、市販の形質移入試薬、Superfect (登録商標) (Qiagen)、Dosper (登録商標) 又は Fugene (登録商標) (Boehringer Mannheim) を使用して、およそ 10,000,000 の CHO 細胞に導入する。細胞は、Lucasら, 上掲中で記載されているように生育される。およそ 3 × 10⁻⁷ 細胞が、その後の増殖及び後述の產生に使用するため、アンプル中に凍結される。プラスミド DNA を含むアンプルは、水浴中に静置し、ボルテックスを行うことにより解凍される。内容物は、ピペッティングにより 10 ml の培養液を含む遠心用チューブに移され、5 分間、1000 rpm で遠心される。上清はアスピレーターで除去され、細胞は 10 ml の選択培地 (0.2 μm でフィルターろ過された 5% ウシ胎児血清を含し、0.2 μm フィルターでろ過された PS20) に再懸濁される。その後、細胞は、90 ml の選択培地を含む 100 ml のスピナーへ分取される。1 - 2 日後、細胞は、150 ml の選択増殖培地で満たされた 250 ml のスピナーへ移され、37 で培養される。さらに 2 - 3 日後、250 ml、500 ml、及び 2000 ml のスピナーに 3 × 10⁵ 細胞 / ml になるように播種される。細胞培養液は、遠心により新しい培地と交換し產生培地へ再懸濁させる。適切ないずれかの CHO 培地が用いられが、1992 年 6 月 16 日発行の米国特許第 5,122,469 号中に記載の產生培地が実際には使用された。3 L の產生スピナーに 1.2 × 10⁶ 細胞 / ml で播種される。0 日目、細胞数、pH が決定される。1 日目、スピナーからサンプリングされ、ろ過された空気の散布が開始される。2 日目、スピナーからサンプリングされ、温度が 33 へ変更され、500 g / L のグルコース 30 ml 及び 10% 消泡剤 (例えば、35% ポリジメチルシロキサン

エマルジョン、Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion)、0.6 ml が加えられる。生産の過程を通じて、pH は必ず 7.2 付近を保つように調整される。10 日後、又は生存率が 70% 以下に落ち込むまで、細胞培養物は、遠心及び 0.22 μm のフィルターを通してろ過することにより回収される。ろ過産物は、4 で保存されるか、即時に精製用のカラムに通されるかのいずれかとなる。

【0223】

ポリ - His タグ化構築物に関しては、Ni - NTA カラム (Qiagen) を使用してタンパク質の精製が行われる。精製の前に、イミダゾールが 5 mM の濃度になるように条件培地に添加される。条件培地は、0.3 M NaCl 及び 5 mM イミダゾールを含む

10

20

30

40

50

20 mM Hepes、pH 7.4 バッファーで平衡化された 6 ml の Ni-NTA カラムに 4 - 5 ml / min の流速で送り込まれる。カラムに添加後、カラムはさらに平衡化バッファーで洗浄され、タンパク質は 0.25 M イミダゾールを含む平衡化バッファーで溶出される。続いて、高度に精製されたタンパク質は、10 mM Hepes, 0.14 M NaCl 及び 4% マンニトール、pH 6.8 を含む保存用バッファーへ、25 ml G 25 Superfine (Pharmacia) カラムで脱塩され、-80°で保存される。

【0224】

イムノアドヘシン (Fc-包含) 構築物は、以下のように条件培地から精製される。条件培地は 20 mM リン酸ナトリウムバッファー、pH 6.8 で平衡化された 5 ml のプロテイン A カラム (Pharmacia) へ送り込まれる。カラムに添加後、カラムは 100 mM クエン酸、pH 3.5 で溶出される前に平衡化バッファーで大規模に洗浄される。溶出されたタンパク質は、275 μl の 1 M Tris バッファー、pH 9 を含むチューブへ 1 ml 画分を回収することにより、即座に中和される。高度に精製されたタンパク質は、次いで、ポリ-His タグ化タンパク質に関して上述されているように保存用バッファー中で脱塩される。均一性は、SDS ポリアクリルアミドゲル及びエドマン分解法による N 末端アミノ酸配列決定により評価される。

【0225】

実施例 5

酵母における FGF-19 の発現

以下に示す方法は、酵母における組換体 FGF-19 細胞の発現について記述したものである。

まず最初に、酵母の発現ベクターが、ADH2/GAPDH プロモーターからの FGF-19 の細胞内生産又は分泌のために構築される。分泌のために、FGF-19 をコードする DNA は、ADH2/GAPDH プロモーター、天然の FGF-19 シグナルペプチド又は他の哺乳類シグナルペプチド、又は、例えば、酵母 - 因子若しくはインベルターゼ分泌シグナル / リーダー配列、及びリンカー配列 (必要ならば) をコードする DNA と共に選択されたプラスミド中へクローニングすることができる。

【0226】

その後、酵母株 AB110 のような酵母細胞は上述の発現プラスミドで形質転換することができ、選択された発酵培地で培養できる。形質転換された酵母の上清は、10% のトリクロロ酢酸で沈殿化することにより分析することができる、SDS-PAGE で分離し、クマジーブルーによるゲルの染色が行われる。

次いで、組換体 FGF-19 を単離し、発酵培地から遠心にて酵母細胞を除くことにより精製することができ、その後、選択されたカートリッジフィルターを用いて培地を濃縮する。FGF-19 を含む濃縮物は、選択されたカラムクロマトグラフィーレジンを用いて、さらに精製される。

【0227】

実施例 6

バキュロウイルス感染昆虫細胞における FGF-19 の発現

以下の方法は、バキュロウイルス感染昆虫細胞における FGF-19 の発現について記述したものである。

FGF-19 をコードする配列は、バキュロウイルス発現ベクターに含まれるエピトープタグの上流と融合される。このようなエピトープタグは、ポリ-His タグ及びイムノグロブリンタグ (IgG の Fc 領域に類似の) を含む。種々のプラスミドが用いられるが、市販の pVL1393 (Novagen) のようなプラスミド由来のプラスミドが含まれる。大まかには、FGF-19 をコードする配列、又は膜貫通タンパク質の細胞外ドメインをコードする配列のような FGF-19 のコード配列のうち所望の部分、又はタンパク質が細胞外タンパクの場合は成熟タンパク質をコードする配列が、5' 及び 3' 領域に相補的なプライマーにより PCR 法で増幅される。5' プライマーは隣接する制限酵素部位

10

20

30

40

50

(選択された)を含んでいてもよい。その後、増幅産物は、選択された制限酵素により切断され、発現ベクターにサブクローニングされる。

【0228】

組換体バキュロウィルスは、上記のプラスミド及び *Baculo Gold* (商品名) ウィルスDNA (*Pharmingen*) を *Spodoptera frugiperda* (「Sf9」) 細胞 (ATCC CRL 1711) にリポフェクチン (GIBCO-BRL から市販されている) を用いて共形質転換により產生される。28 にて4-5日培養後、放出されたウィルスは回収され、さらに増幅させるため利用される。ウィルス及びタンパク質発現は、上述のように *O'Reillyら, Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)* の方法により行われる。

【0229】

発現されたポリ-hisタグ化FGF-19は、例えば、以下のように Ni^{2+} -キレートアフィニティクロマトグラフィーにより精製することができる。抽出物は、Rupertら, *Nature*, 362: 175-179 (1993)において記載されているように、組換体ウィルスを感染させた Sf9 細胞から調製される。大まかには、Sf9 細胞は洗浄され、超音波処理バッファー (25mL Hepes, pH 7.9; 12.5mM MgCl₂; 0.1mM EDTA; 10% グリセロール; 0.1% NP-40; 0.4M KCl) 中に再懸濁され、氷上にて20秒間2度超音波処理される。超音波処理された産物は、遠心にて夾雑物が除かれ、その上清はローディングバッファー (50mM リン酸、300mM NaCl, 10% グリセロール、pH 7.8) で50倍に希釈され、0.45μmのフィルターでろ過される。 Ni^{2+} -NTAアガロースカラム (*Qiagen* から市販されている) は、総容積5mLで調製され、25mLの水で洗浄され、25mLのローディングバッファーで平衡化される。ろ過された細胞抽出物液は、1分間に0.5mLの流速でカラムに添加される。カラムは、ベースラインの A_{280} になるまでローディングバッファーで洗浄され、その時点で分取が開始される。次に、カラムは第二の洗浄バッファー (50mM リン酸; 300mM NaCl, 10% グリセロール、pH 6.0) で洗浄され、非特異的に結合したタンパク質を溶出させる。 A_{280} がベースラインにまで再度到達した後に、カラムは、第二のバッファー中0から500mMのイミダゾール濃度勾配により展開される。1mLずつ分取され、SDS-PAGE 及び銀染色又は Ni^{2+} -NTA結合アルカリホスファターゼ (*Qiagen*) によるウェスタンプロットにより解析される。溶出された His₁₀ タグ化FGF-19を含む画分がプールされローディングバッファーに対して透析される。

あるいは、IgGタグ化(又はFcタグ化)FGF-19の精製は、既知のクロマトグラフィー技術、例えば、プロテインA又はプロテインGカラムクロマトグラフィーを用いることにより行うことができる。

【0230】

実施例7

FGF-19と結合する抗体の調製

本実施例は、FGF-19と特異的に結合するモノクローナル抗体の調製について示すものである。

モノクローナル抗体を產生するための技術は、当該技術の分野において周知であり、例えば、*Golding*、上掲中に記載されている。用いられる免疫原には、精製された FGF-19、FGF-19を含む融合タンパク質、及び細胞表面上に組換体 FGF-19を発現する細胞が含まれる。免疫原の選択は、過度の実験を行うことなく、当業者により行われ得るものである。

【0231】

Balb/cなどのマウスが、完全フロイトアジュバント中でエマルジョン化された FGF-19免疫原で免疫され、1-100μgの量で皮下又は腹腔内に注射される。あるいは

10

20

30

40

50

は、免疫源はMPL-TDMアジュvant (Ribi Immunochemical Research, ハミルトン, モンタナ) 中でエマルジョン化され、動物の後足のパッド部分に注射される。その後、免疫されたマウスは、10から12日後に選択したアジュvant中でエマルジョン化された追加の免疫原により追加免疫される。その後、数週間の後、マウスはさらに免疫注射により追加免疫される。血清サンプルは、抗FGF-19抗体を検出するためにエライザアッセイによりテストのために定期的にマウスから眼窩球出血により採取される。

【0232】

適当な抗体価が検出された後、抗体に対し「陽性」の動物は最終的にFGF-19の静脈注射によりインジェクトされる。3から4日後、マウスは処理され、脾臓細胞が回収される。脾臓細胞は、ATCC, No. CRL 1597より入手可能なP3X63AgU.1のような選択されたマウスミエローマ細胞株と融合される(35%ポリエチレングリコールを使用)。融合細胞は、その後、非融合細胞、ミエローマ同士のハイブリッド、脾臓細胞同士のハイブリッドの生育を阻害するためにHAT(ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジン)培地を含む96ウェル組織培養プレート中にプレーティングされ得るようなハイブリドーマを产生する。

【0233】

ハイブリドーマ細胞は、FGF-19に対する反応性に関し、エライザによりスクリーニングされることになる。FGF-19に対する所望のモノクローナル抗体を分泌する「陽性」のハイブリドーマ細胞の同定は、当該技術の範囲内のことである。

陽性ハイブリドーマ細胞は、抗FGF-19モノクローナル抗体を含む腹水を产生するために、同系のBalb/cマウスへ腹腔内にインジェクトされる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、組織培養フラスコ又はローラーボトル中で生育させることができる。腹水中に產生されたモノクローナル抗体の精製は、硫安沈殿を用いたのち、ゲルろ過クロマトグラフィーにより行うことができる。あるいは、プロテインA又はプロテインGに対する抗体の結合性に基づくアフィニティーコロマトグラフィーを用いることができる。

【0234】

実施例8

特異的な抗体を用いたFGF-19ポリペプチドの精製

天然又は組換体FGF-19ポリペプチドは、タンパク質精製の分野において様々な標準的な技術により精製される。例えば、pro-FGF-19ポリペプチド、成熟FGF-19ポリペプチド、又はpre-FGF-19ポリペプチドは、目的のFGF-19ポリペプチドに対して特異的な抗体を用いてイムノアフィニティーコロマトグラフィーにより精製される。通常、イムノアフィニティーカラムは活性化されたクロマトグラフィー用の樹脂に抗FGF-19ポリペプチドを共有結合的にカップリングさせることにより構築される。

【0235】

ポリクローナルイムノグロブリンは、免疫された血清から硫安沈殿法、又は固定化プロテインA (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, ニュージャージー) による精製のいずれかの方法により調整される。同様に、モノクローナル抗体はマウス腹水液から硫安沈殿又は固定化プロテインAによるクロマトグラフィーにより精製される。部分精製されたイムノグロブリンは、CnBr-活性化SEPHAROSE(商品名)(Pharmacia LKB Biotechnology)のようなクロマトグラフィー用樹脂に共有結合的に結合される。抗体が樹脂に結合され、樹脂はプロッキングされ、生じた樹脂は製造者の指示に従い洗浄される。

【0236】

このようなイムノアフィニティーカラムは、可溶性形態のFGF-19ポリペプチドを含む細胞から画分を調製することによりFGF-19の精製に用いられる。本精製法は、細胞全体の可溶化又は界面活性剤の添加による分画遠心法により得られる細胞成分分画の可溶化、又は当該技術分野において周知のその他の方法により得られる。あるいは、シグナ

10

20

30

40

50

ル配列を含む可溶性 FGF - 19 ポリペプチドは、細胞が生育する培地中に有効量分泌される。

可溶性 FGF - 19 ポリペプチドを含む調製物は、イムノアフィニティーカラムに通され、カラムは FGF - 19 ポリペプチドの優先的な吸収を可能にする条件下にて洗浄される（例えば、界面活性剤の存在下、高イオン強度のバッファー中）。その後、カラムは抗体 / FGF - 19 ポリペプチドの結合を壊すような条件下にて溶出され（例えば、およそ pH 2 - 3 の低 pH バッファー、又は尿素又はチオシアノ酸イオンのようなカオトロピック因子の高濃度下）、FGF - 19 ポリペプチドが回収される。

【0237】

実施例 9

10

薬物スクリーニング

本発明は、特に、FGF - 19 ポリペプチド又はその結合フラグメントを用い、様々な薬物スクリーニングのいずれかの技術において有用である。そのような試験において用いた FGF - 19 ポリペプチド又はフラグメントは、液体に可溶状態であるか、固体状の支持体に添付されているか、細胞表面上に出現されているか、細胞内に局在している。ある薬物スクリーニング方法においては、FGF - 19 ポリペプチド又はフラグメントを発現する組換体核酸で、安定に形質転換された真核又は原核宿主細胞が利用される。薬物は、そのような形質転換された細胞に対し、競合的結合アッセイにおいてスクリーニングされる。このような細胞は、生きた状態又は固定化形態であり、標準的な結合アッセイに対し使用され得る。例えば、FGF - 19 ポリペプチド又はフラグメントと、試験される薬物との間の複合体形成を測定する。あるいは、試験される薬物によって引き起こされる FGF - 19 ポリペプチドとその標的細胞又は標的レセプターとの複合体形成の減少を調べることができる。

20

【0238】

従って、本発明は、FGF - 19 ポリペプチド関連疾病又は疾患に影響を及ぼし得る薬剤又は他のいずれかの薬物についてのスクリーニング方法を提供する。これらの方法は、そのような薬物を FGF - 19 ポリペプチド又はそのフラグメントに接触させることを含み、（I）薬物と FGF - 19 ポリペプチド又はフラグメント間の複合体の存在、又は（ii） FGF - 19 ポリペプチド又はフラグメントと細胞との複合体の存在を、当該技術分野において周知な方法によりアッセイすることを含む。このような競合結合アッセイにおいて、典型的には、FGF - 19 ポリペプチド又はフラグメントは標識される。適当なインキュベーションの後、遊離型の FGF - 19 ポリペプチド又はフラグメントは結合型で存在するものと分離され、遊離型又は非複合体型の標識の量は、特定の薬物が FGF - 19 ポリペプチドに結合し、FGF - 19 ポリペプチド / 細胞の複合体を阻害する特定の薬物の能力の測定値である。

30

【0239】

薬物スクリーニングのための他の技術は、ポリペプチドと適切な結合親和性を持つ化合物に対するハイスループットのスクリーニングを提供し、1984年9月13日に発行の国際公開第84/03564号において詳細に記載されている。簡単に述べると、大量の異なる小ペプチド試験化合物は、プラスチックピン、又は何らかの表面のような固体基質上で合成される。FGF - 19 ポリペプチドに適用されるとき、ペプチド試験化合物は FGF - 19 ポリペプチドと反応し、洗浄される。結合された FGF - 19 ポリペプチドは、当該分野において周知の方法により検出される。また、精製された FGF - 19 ポリペプチドは、上述の薬物スクリーニング技術において使用するためにプレート上に直接コートされ得る。さらに、非中和抗体はペプチドを捕獲し、固体支持体上に固定化するために用いられる。

40

また、本発明は、FGF - 19 ポリペプチドと結合し得る中和抗体が、試験化合物と FGF - 19 ポリペプチド又はそのフラグメントとの結合に対し競合するような、競合的薬物スクリーニングアッセイの使用においても考慮される。このように、抗体は、FGF - 19 ポリペプチドと 1つ又は複数の抗原決定基を共有するいずれかのペプチドの存在を検出

50

するために使用され得る。

【0240】

実施例10

合理的な薬物デザイン

合理的な薬物デザインのゴールは、目的物（即ち、FGF-19ペプチド）の生物学的な活性ペプチドの構造的類似体、又はそれらが結合する小分子、例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、阻害因子などの構造的類似体を作り出すことである。これらの例の幾つかは、より活性が高く、安定なFGF-19ペプチドの形態である薬物、又はインヴィオにおいてFGF-19ペプチドの機能を促進し又は妨害する薬物を創り出すために使用され得る（Hodgson, Bio/Technology, 9:19-21(1991)）。

1つのアプローチにおいて、FGF-19ペプチド又はFGF-19ペプチド-阻害因子複合体の三次元構造がX線結晶解析により、コンピューターモデリングにより、又は最も典型的には、これら2つのアプローチを組み合わせることによって決定される。FGF-19ペプチドの形態と電荷は、分子の構造を明らかにし、分子の活性部位を決定するために確認されなくてはならない。時には、FGF-19ペプチドに関する有用な情報は、相同なタンパク質の構造に基づくモデリングにより得られることがある。双方の場合において、関連する構造上の情報は、FGF-19ペプチド用類似体分子をデザインするために使用されたり、有効な阻害因子を同定するために使用される。合理的な薬物デザインの有用な例は、Braxton and Wells, Biochemistry, 31:7796-7801(1992)中に示されるように、活性又は安定性を向上させる分子を含み、また、Athaudaら, J. Biochem., 113:742-746(1993)中に示されるように、天然ペプチドの阻害剤、アゴニスト、又はアンタゴニストとして作用する。

【0241】

また、上述の如く、機能的アッセイにより選択された標的特異的抗体を単離し、その結晶構造を解析することも可能である。このアプローチは、原理的には、あとに続く薬物デザインが基礎となし得る薬の核となる物を産み出す。機能的、薬理学的に活性のある抗体に対する抗イディオタイプ抗体を産生することにより、全体としてタンパク質結晶学を迂回することが可能である。鏡像の鏡像として、抗イディオタイプ抗体の結合部位は、オリジナルのレセプターの類似体であることが予測される。抗イディオタイプ抗体は、化学的又は生物学的に産生されたペプチドの貯蔵所からペプチドを同定し、単離するために使用することが可能であろう。そして、単離されたペプチドは薬の核として作用するであろう。当該発明のおかげで、X線結晶解析のような分析的研究を実施するために、十分量のFGF-19ペプチドが、入手可能となる。さらに、ここで提供されるFGF-19ペプチドアミノ酸配列に関する知見は、X線結晶解析の代わりに、又はX線結晶解析に加えてコンピューターモデリング技術を用いる者に対して、手引きを提供するであろう。

【0242】

実施例11

FGF-19遺伝子組換えマウスにおける、体重、レプチンレベル、摂食、尿産生、酸素消費、及びトリグリセリド及び遊離脂肪酸レベルの調査

ここで開示されたように、FGF-19は、線維芽細胞成長因子関連分泌タンパク質の成長因子ファミリーとして新規に同定された。ここにおいて、FGF-19はFGFレセプター4と相互作用することで特徴づけられているが、分裂促進因子としては作用しないようである。本タンパク質の機能をさらに調べるために、ヒトFGF-19を発現する遺伝子組換えマウスが作製された。

特に、ヒトFGF-19をコードするcDNAがミオシン軽鎖に対するプロモーターを含むプラスミド中へクローニングされた。このプロモーターは、移入遺伝子の筋肉特異的な転写に対し十分に機能する。スプライシングのアクセプター及びドナーも、発現レベルを上昇させるために、FGF-19cDNAの5'側に含まれており、転写レベルを上昇させ

10

20

30

40

50

、転写終結サイトを提供するために、ポリA付加シグナルを持つスプライシングのドナー及びアクセプターが、FGF-19 cDNAの3'側に含まれていた。

【0243】

MLCプロモーター、5'スプライシングアクセプター及びドナー部位、FGF-19 cDNA、3'スプライシングアクセプター及びドナー部位、及び転写終結部位を包含するDNA(導入遺伝子)は、適当な制限酵素部位を用い、アガロースゲル上でのサイズ分画により精製された。精製されたDNAは、受精したマウスの一つの前核中へインジェクトされ、遺伝子組換えマウスが産み出され、下記に記載されているように同定された(Genetic Modification of Animals; Tim Stewart; In Exploring Genetic Mechanisms pp 565-598; 1997 Eds M Singer and P Berg; University Science Books; Sausalito, Calif.). 以下に議論されている水の摂取、摂食、尿産生、ヘマトクリット値の測定のためマウスは、6週齢であった。レプチニン、トリグリセリド、及び遊離脂肪酸の測定は、8週齢のマウスであった。

【0244】

以下に考察された結果が示すように、これらのマウスは、摂食の増加、及び酸素消費効率により証明される代謝効率の増加を示す。摂食の増加にもかかわらず、これらのマウスの体重は、遺伝子組換えを行っていない同腹仔の体重に有意に足りなかった。この体重の減少は、ヒト及び齧歯類の脂肪組織質量と密接に関連し、遺伝子組換えマウスにおいて減少するレプチニンによる肥満症の減少の結果のようである。このことを更に裏付けることとして、遺伝子組換えマウスは、鼻部と尻部間の長さを測定することにより評価すると、通常の直線的な成長をする。これらのマウスは、体温、体格(骨の長さ)及び血液学的値に関しては正常である。摂食の増加に付帯的に起こりがちなこととして、遺伝子組換えマウスは尿産生量を増加させた。組換えマウスは、それほど多くの水分摂取を行っているようでもなく、通常のヘマトクリット値による測定した結果、脱水状態でもないので、尿産生の増加は、増加した食餌の代謝に由来するようである。FGF-19は筋肉質量及び長骨形成のいずれかに変化を与えることなく、肥満症を減少させるので、FGF-19は、肥満症及びそれと関連した状態における効果的な治療手段であることが示される。

【0245】

さらに特記するに、MLC-FGF-19遺伝子組換えマウスは、異なる絶食及び摂食の条件で種々の時間において体重が測定された。特に、メスのFGF-19遺伝子組換えマウス及び非遺伝子組換え同腹仔のグループは、無制限の摂食の間、6時間と24時間の絶食後、及び24時間の絶食終了後24時間目の6週齢において体重が測定され。Fig 3 Aに示されるように、全ての条件下においてFGF-19遺伝子組換えマウス(黒塗り棒)は、野生型、つまり非遺伝子組換え同腹仔(斜線棒)より体重は少なかった。

Fig 3 Bは、Fig 3 Aにおいて示されたマウスと同じグループの血清で、レプチニンに対してアッセイされた結果を示す。FGF-19遺伝子組換えマウスにおけるレプチニンの減少は、肥満症の軽減による体重の減少(Fig 3 A)と一致する。

6週齢の遺伝子組換えマウスが、摂食(Fig 4 A)、水分摂取(Fig 4 B)、尿産生(Fig 4 C)及びヘマトクリット値(Fig 4 D)に関し観察された。結果に見られるように、FGF-19遺伝子組換えマウス(黒塗り棒)は、野生型の同腹仔に比べより多くの食餌を消費するが、より多く水分を摂取することはない。水分消費量において変化はないが、遺伝子組換えマウスはより多くの尿を産生する(Fig 4 C)。尿産生の増加に拘わらず、遺伝子組換えマウスは通常のヘマトクリット値により証明されるように(Fig 4 D)脱水状態ではないようである。

【0246】

食餌消費の増加(Fig 4)に伴う体重の減少(Fig 3)は、代謝効率の増加により説明される。代謝効率は酸素消費量を測定することにより決定された。Fig 5に示されるように、FGF-19遺伝子組換えマウスは、24時間の絶食及び24時間の絶食終了後24時間の後の両低カロリー周期の間、代謝速度を増大させていた。肥満症及びトリグリ

10

20

30

40

50

セリド、遊離脂肪酸の上昇は、心血管性疾患の対する危険因子である。F G F - 1 9 は心血管性疾患（肥満症（Fig 3））に対する危険因子の一つを減少させるので、F G F - 1 9 は他の危険因子も低下させるのかどうか調査された。Fig 6 に見られるように、F G F - 1 9 遺伝子組換えマウスにおいて、トリグリセリドのレベル及び遊離脂肪酸（FFA）も低減される。

【0247】

実施例 1 2

F G F - 1 9 の注入により摂食の増加及び酸素消費量の増加が生じる。

F G F - 1 9 遺伝子組換えマウスにおいて観察される効果は、F G F - 1 9 タンパク質により引き起こされるということを確認するために、非遺伝子組換えF v Bマウスの集団により透圧により作動する移植ポンプにより供給される組換体F G F - 1 9 (1 mg / kg / 日、静注)が注入された。Fig 7 A - B に示されるように、組換体ヒトF G F - 1 9 の投与は、担体のみ注入されたマウスに比し、摂食量の増加を引き起こす。さらに、F G F - 1 9 の注入により、酸素消費量により測定される代謝効率の増加が生じる。

【0248】

実施例 1 3

F G F - 1 9 は、グルコースの摂取を減少させ、脂肪細胞からのレプチンの放出を増加させる。

F G F - 1 9 が代謝を変化させるメカニズムをさらに調べるために、組換体ヒトF G F - 1 9 がラット脂肪細胞の初代培養に添加され、グルコースの摂取量及び細胞からのレプチンの放出が測定された。Fig 8 A - B に示されるように、Fig 1 9 はラット脂肪細胞の初代培養からのレプチンの放出を増加させ、初代培養へのグルコースの摂取を減少させる。

【0249】

実施例 1 4

高脂肪食餌を摂取したF G F - 1 9 遺伝子組換えマウスにおける糖耐性及び脂肪パッド重量の調査

通常、高脂肪食のマウス（及びヒト）は、体重が増加し肥満症になるであろうし、糖非耐性又は糖尿病になるであろう。F G F - 1 9 を投与することが、肥満症と遺伝子組換えマウス及びそれらの非遺伝子組換えマウス（年齢、性が一致した）の糖耐性の同齢集団に影響をあたえるかどうか調べるために、基本的には、Rebuffe - Scriverら, Metabolism Vol 42, No 11 1993 pp 1405 - 1409 及び Surwitら, Vol 44, No 5 1955 pp 645 - 651 に記載されており、ナトリウム含量がResearch Diets Inc. Catalog no. D 1 2 3 3 0 Nにより調製される通常の固形試料に関して基準化された点において変更を加えた方法で、同腹仔を高脂肪食状態にした。

【0250】

10週間後、正常なマウス試料または高脂肪食餌によるマウス（メスの遺伝子組換えマウスとそれらの同腹仔である非遺伝子組換えマウス）に対して、糖耐性テストが行われた。従って、各マウスは腹腔内に、体重 kgあたり1.0 mgのグルコースがインジェクトされ、血中に存在するグルコース濃度は次のインジェクションまでのインターバルにおいて測定された。Fig 10 のグラフは、マウスにおけるグルコースレベルを表し、高脂肪食餌を与えられていたメスの非遺伝子組換えマウスの8 / 9 が糖尿病（2時間のグルコースレベルが200 mg / d 1 以上で；（World book of Diabetes in Practice. Vol 3; Ed Kralle, L. P.; Elsevier））と認められ、一方、同一の食餌を与えられた遺伝子組換えマウスの0 / 5 が糖尿病であると思われることを示す。

又は10週間食餌を与えられた後、高脂肪食餌が与えられたオスのマウスが処理され、蓄積脂肪に特異的な体重を測定することにより肥満症が決定された。Fig 9 に示されるように、高脂肪食を与えられていた遺伝子組換えマウスは、非遺伝子組換え同腹仔に比較

10

20

30

40

50

して著しく脂肪は少なかった。

【0251】

材料の寄託

次の材料をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、10801 ユニバーシティー・ブルバード、マナサス、バージニア、20110-2209 アメリカ合衆国 (ATCC) に寄託した：

材料	ATCC 寄託番号	寄託日
DNA 49435-1219	209480	1997年11月21日

この寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則（ブダペスト条約）の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から30年間、寄託の生存可能な培養が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテク社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、どれが最初であろうとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、寄託培養物の後代を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第122条及びそれに従う特許庁長官規則（特に参照番号8860G638の37 CFR 第1.14条を含む）に従って権利を有すると米国特許庁長官が決定した者に後代を入手可能とすることを保証するものである。

【0252】

本出願の譲受人は、寄託した培養物が、適切な条件下で培養されていた場合に死亡もしくは損失又は破壊されたならば、材料は通知時に同一の他のものに即座に取り替えることに同意する。寄託物質の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した態様は、本発明のある側面の一つの説明として意図されており、機能的に等価なあらゆる作成物がこの発明の範囲内にあるため、寄託された作成物により、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの物質の寄託は、文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に改変することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の請求の範囲内に入るものである。

【図面の簡単な説明】

【Fig. 1】天然配列 FGF-19 をコードするヌクレオチド配列（ヌクレオチド 464-11111）を含む cDNA のヌクレオチド配列（配列番号：1）を示し、そのヌクレオチド配列（配列番号：1）は、ここで「DNA 49435-1219」と命名されるクローンである。また、太字及び下線部で示されているのは、各々開始及び終止コドンの位置である。

【Fig. 2】配列番号：1 のコード化配列より由来する天然配列 FGF-19 ポリペプチドのアミノ酸配列（配列番号：2）を示す。また、示されているのは、種々の他の重要なポリペプチドドメインのおおよその位置である。

【Fig. 3 A 及び 3 B】MLC-FGF-19 トランスジェニックマウスが、トランスジェニックではない同腹子より低い体重であり（Fig. 3 A）、低いレベルの循環レプチンを有することを示す（Fig. 3 B）棒グラフである。Fig. 3 A は、6 週齢の自由摂食間（一番左）、6 及び 24 時間の絶食後、及び 24 時間の絶食が終了して 24 時間後（最も右）における、FGF-19 トランスジェニックマウス（無地棒）及びトランスジェニックではない（野生型）同腹子（点線棒）の体重を示す。Fig. 3 B は、レプチンのアッセイにおける、Fig. 3 A に示した同じグループのマウスの血清を示す。

【Fig. 4 A - 4 D】摂食及び尿生産が増加したが、正常なヘマトクリットを有することを示す棒グラフ。マウスのグループは、自由摂食の間及び 24 時間の絶食が終了後の 24 時間（Fig. 4 A）、水分摂取（Fig. 4 B）、尿放出（Fig. 4 C）及びヘマ

トクリットの間に、FGF-19トランスジェニックマウスは摂食をモニターされ、各グラフのFGF-19トランスジェニックマウスの結果は無地の黒棒、並びに野生型の結果は点線棒で示されている。

【Fig. 5】FGF-19トランスジェニックマウスでは、酸素消費量速度が増加していることを示す棒グラフ。24時間の絶食及び24時間の絶食が終了後の24時間が後に続く、両光サイクル（暗又は明）間のFGF-19トランスジェニックマウス（無地の黒棒）及び野生型マウス（点線棒）の酸素消費を示す。

【Fig. 6 A 及び 6 B】FGF-19 トランスジェニックマウス（無地の黒棒）では、野生型マウス（点線棒）に対してトリグリセリド（Fig. 6 A）及び遊離脂肪酸（Fig. 6 B）が減少していることを示す棒線グラフ。

【Fig. 7A 及び 7B】FGF-19 (点線棒) を欠く媒介物を注入したマウスに対して、トランスジェニックでないマウスへ FGF-19 (無地の黒棒) を注入することが、摂食量 (Fig. 7A) の増加及び酸素消費量 (Fig. 7B) の増加につながることを示す棒グラフであり、「n」は夜、そして「d」は昼を示す。

【Fig. 8 A 及び 8 B】 FGF-19 が脂肪細胞からのレプチン放出を増加させ (Fig. 8 A)、脂肪細胞によるグルコース取り込みを減少させる (Fig. 8 B) ことを示す棒グラフ。

【Fig. 9】長期に渡り、高脂肪食（HFD）を与えたFGF-19トランスジェニックマウス（斜線棒）又は野生型マウス（無地の黒棒）の脂肪体重量を示す棒グラフであり、左から始まる水平棒に沿って、精巣上体（HFD_Ep）及び腎周囲をともなう後腹膜（HFD_RP/PR）の6週、そして精巣上体及び腎周囲をともなう後腹膜の10週において結果が示されている。

【Fig. 10】長期に渡る、FGF-19トランスジェニックマウス（斜線棒）又は野生型マウス（無地の黒棒）のグルコース耐性を示す棒グラフ（両方ともに高脂肪食を10週間）。

【図 1】

〔 図 2 〕

MRSQCVVVHVWILAGLWLAVAGRPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRI
RADGVVDCARGQSAHSLLIEKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQGLQYSEEDCAFEI
EIRPDGYNVYSEKHKRPLVSLSSAKRQQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESI
MESSPLTDSMPFGVLTVTGLEAVRSPSFKEK

シグナルペプチド:
アミノ酸 i-22

N-ミリストイル化部位:
アミノ酸 15-21, 54-60, 66-72, 201-207

原核生物膜リボタンパク質脂質結合部位: アミノ酸 48-59

HBGF/FGF ドメイン:

【図 3 A - 3 B】

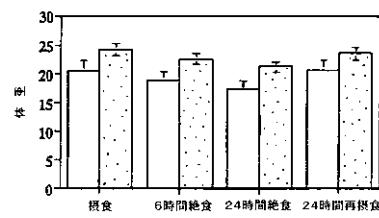


FIG. 3A

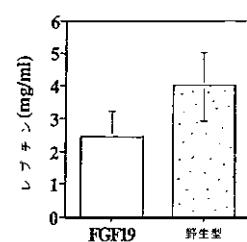
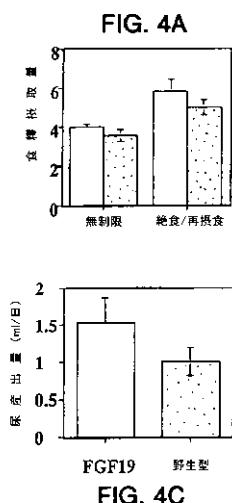
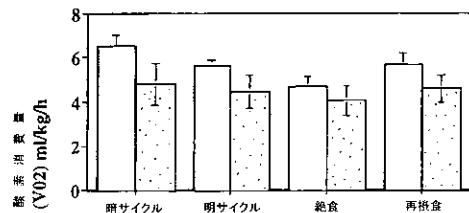


FIG. 3B

【図 4 A - 4 D】



【図 5】



【図 7】

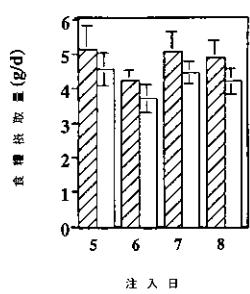


FIG. 7A

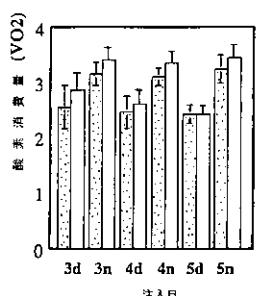
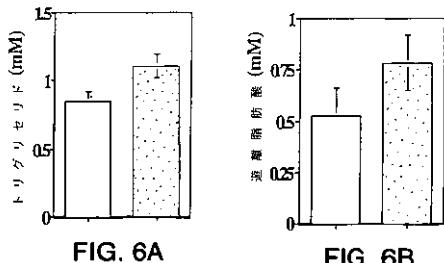


FIG. 7B

【図 6】



【図 8】

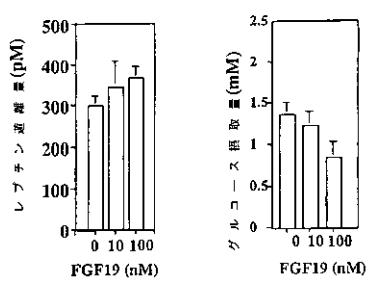
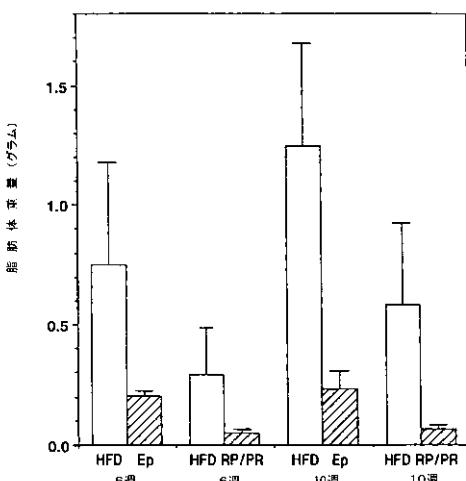
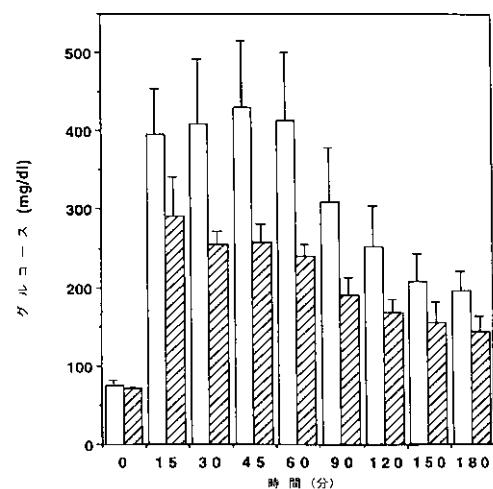


FIG. 8

【図 9】



【図10】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
15 March 2001 (15.03.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/18210 A1

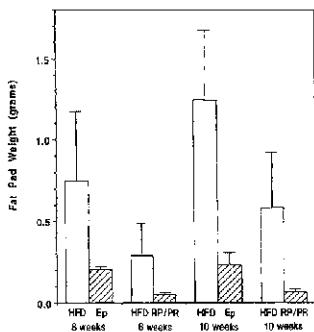
- (51) International Patent Classification⁷: C12N 15/12, C07K 14/50, C12N 15/62, C07K 16/18, G01N 33/53, A61K 38/18, 31/70, A01K 67/027
- (21) International Application Number: PCT/US00/06471
- (22) International Filing Date: 9 March 2000 (09.03.2000)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
- PCT/US99/20594 8 September 1999 (08.09.1999) US
- PCT/US99/21090 15 September 1999 (15.09.1999) US
- PCT/US99/10999 20 December 1999 (20.12.1999) US
- PCT/US00/04414 22 February 2000 (22.02.2000) US
- (71) Applicant: GENENTECH, INC. (USA); 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US).
- (72) Inventors: STEWART, Timothy, A., 465 Douglas Street, San Francisco, CA 94114 (US); TOMLINSON, Elizabeth, 350 Esplanade Avenue, #3, Pacifica, CA 94044 (US).
- (74) Agents: KRENNAK, Mark, T., Genentech, Inc., 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 et al. (US).
- (81) Designated States (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BI, BY, CA, CI, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GL, GM, IIR, ILU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TI, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TI, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BE, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(Continued on next page)

(54) Title: FIBROBLAST GROWTH FACTOR-19 (IGF-19) NUCLEIC ACIDS AND POLYPEPTIDES AND METHODS OF USE FOR THE TREATMENT OF OBESITY



WO 01/18210 A1



(57) Abstract: The present invention is directed to novel polypeptides belonging to the fibroblast growth factor family and to nucleic acid molecules encoding those polypeptides. Also provided herein are vectors and host cells comprising those nucleic acid sequences, chimeric polypeptide molecules comprising the polypeptides of the present invention fused to heterologous polypeptide sequences, antibodies which bind to the polypeptides of the present invention and to methods for producing the polypeptides of the present invention. Furthermore, methods of treating obesity are provided.

WO 01/18210 A1

Published:
— *With international search report.*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

5 **FIBROBLAST GROWTH FACTOR-19 (FGF-19) NUCLEIC ACIDS AND
POLYPEPTIDES AND METHODS OF USE FOR THE TREATMENT OF
OBESITY**

10 **FIELD OF THE INVENTION**

10 The present invention relates generally to the identification and isolation of novel DNA and to the recombinant production of novel polypeptides designated herein as fibroblast growth factor-19 (FGF-19) polypeptides, and to methods, compositions and assays utilizing such polypeptides for the therapeutic treatment of obesity and for producing pharmaceutically active materials having therapeutic and pharmacologic properties including those associated with the treatment of obesity.

15 **BACKGROUND OF THE INVENTION**

15 Obesity is a chronic disease that is highly prevalent in modern society and is associated not only with a social stigma, but also with decreased life span and numerous 20 medical problems, including adverse psychological development, reproductive disorders such as polycystic ovarian disease, dermatological disorders such as infections, varicose veins, Acanthosis nigricans, and eczema, exercise intolerance, diabetes mellitus, insulin resistance, hypertension, hypercholesterolemia, cholelithiasis, osteoarthritis, orthopedic injury, thromboembolic disease, cancer, and coronary heart disease. Rissanen et al., 25 British Medical Journal, 301: 835-837 (1990).

16 Existing therapies for obesity include standard diets and exercise, very low caloric diets, behavioral therapy, pharmacotherapy involving appetite suppressants,

WO 01/18210

PCT/US00/06471

thermogenic drugs, food absorption inhibitors, mechanical devices such as jaw wiring, waist cords and balloons, and surgery. Jung and Chong, *Clinical Endocrinology*, 35: 11-20 (1991); Bray, *Am. J. Clin. Nutr.*, 55: 538S-544S (1992). Protein-sparing modified fasting has been reported to be effective in weight reduction in adolescents. Lee et al., *Clin. Pediatr.*, 31: 234-236 (April 1992). Caloric restriction as a treatment for obesity causes catabolism of body protein stores and produces negative nitrogen balance. Protein-supplemented diets, therefore, have gained popularity as a means of lessening nitrogen loss during caloric restriction. Because such diets produce only modest nitrogen sparing, a more effective way to preserve lean body mass and protein stores is needed. In addition, treatment of obesity would be improved if such a regimen also resulted in accelerated loss of body fat. Various approaches to such treatment include those discussed by Weintraub and Bray, *Med. Clinics N. Amer.*, 73: 237 (1989); Bray, *Nutrition Reviews*, 49: 33 (1991).

Considering the high prevalence of obesity in our society and the serious consequences associated therewith as discussed above, any therapeutic drug potentially useful in reducing weight of obese persons could have a profound beneficial effect on their health. There is a need in the art for a drug that will reduce total body weight of obese subjects toward their ideal body weight without significant adverse side effects and that will help the obese subject maintain the reduced weight level.

It is therefore desirable to provide a treatment regimen that is useful in returning the body weight of obese subjects toward a normal, ideal body weight.

It is further desirable to provide a therapy for obesity that results in maintenance of the lowered body weight for an extended period of time.

It is also desirable prevent obesity and, once treatment has begun, to arrest progression or prevent the onset of diseases that are the consequence of, or secondary to, the obesity, such as arteriosclerosis and polycystic ovarian disease.

Such methods of treatment and related compositions are provided herein. Also provided herein are novel proteins and nucleic acids, and methods for screening for modulators of the same. Other methods, treatments and compositions provided herein will become apparent to the skilled artisan.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

SUMMARY OF THE INVENTION

A cDNA clone (designated herein as DNA49435-1219) has been identified that encodes a novel polypeptide, which has some sequence similarity to members of the fibroblast growth factor family, designated in the present application as "fibroblast growth factor-19" (FGF-19).

5 In one embodiment, the invention provides an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence that encodes a FGF-19 polypeptide.

In one aspect, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid
10 sequence identity, alternatively at least about 83% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least
15 about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity,
20 alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity and alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity to
(a) a DNA molecule encoding a PEACH polypeptide having the sequence of amino acid residues from about 1 or about 23 to about 216, inclusive, of Figure 2 (SEQ ID NO:2),
25 or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

In another aspect, the isolated nucleic acid molecule comprises (a) a nucleotide sequence encoding a FGF-19 polypeptide having the sequence of amino acid residues from about 1 or about 23 to about 216, inclusive, of Figure 2 (SEQ ID NO:2), or (b) the complement of the nucleotide sequence of (a).

WO 01/18210

PCT/US00/06471

In other aspects, the isolated nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity and alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity to (a) a DNA molecule having the sequence of nucleotides from about 464 or about 530 to about 1111, inclusive, of Figure 1 (SEQ ID NO:1), or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

In another aspect, the isolated nucleic acid molecule comprises (a) the nucleotide sequence of from about 464 or about 530 to about 1111, inclusive, of Figure 1 (SEQ ID NO:1), or (b) the complement of the nucleotide sequence of (a).

In a further aspect, the invention concerns an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively

WO 01/18210

PCT/US00/06471

at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity and alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity to (a) a DNA molecule that encodes the same mature polypeptide encoded by the human protein cDNA deposited with the ATCC on November 21, 1997 under ATCC Deposit No. 209480 (DNA49435-1219) or (b) the complement of the DNA molecule of (a). In a preferred embodiment, the isolated nucleic acid molecule comprises (a) a nucleotide sequence encoding the same mature polypeptide encoded by the human protein cDNA deposited with the ATCC on November 21, 1997 under ATCC Deposit No. 209480 (DNA49435-1219) or (b) the complement of the nucleotide sequence of (a).

15 In another aspect, the invention concerns an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence having at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity and alternatively at least about 99%

WO 01/18210

PCT/US00/06471

nucleic acid sequence identity to (a) the full-length polypeptide coding sequence of the human protein cDNA deposited with the ATCC on November 21, 1997 under ATCC Deposit No. 209480 (DNA49435-1219) or (b) the complement of the nucleotide sequence of (a). In a preferred embodiment, the isolated nucleic acid molecule comprises (a) the full-length polypeptide coding sequence of the DNA deposited with 5 the ATCC on November 21, 1997 under ATCC Deposit No. 209480 (DNA49435-1219) or (b) the complement of the nucleotide sequence of (a).

In another aspect, the invention concerns an isolated nucleic acid molecule which encodes an active FGF-19 polypeptide as defined below comprising a nucleotide sequence that hybridizes to the complement of a nucleic acid sequence that encodes 10 amino acids 1 or about 23 to about 216, inclusive, of Figure 2 (SEQ ID NO:2). Preferably, hybridization occurs under stringent hybridization and wash conditions.

In yet another aspect, the invention concerns an isolated nucleic acid molecule which encodes an active FGF-19 polypeptide as defined below comprising a nucleotide sequence that hybridizes to the complement of the nucleic acid sequence between about 15 nucleotides 464 or about 530 and about 1111, inclusive, of Figure 1 (SEQ ID NO:1). Preferably, hybridization occurs under stringent hybridization and wash conditions.

In a further aspect, the invention concerns an isolated nucleic acid molecule having at least about 22 nucleotides and which is produced by hybridizing a test DNA molecule under stringent conditions with (a) a DNA molecule encoding a FGF-19 20 polypeptide having the sequence of amino acid residues from about 1 or about 23 to about 216, inclusive, of Figure 2 (SEQ ID NO:2), or (b) the complement of the DNA molecule of (a), and, if the test DNA molecule has at least about an 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least 25 about 83% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, 30 alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least

WO 01/18210

PCT/US00/06471

- about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity,
5 alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity and alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity to (a) or (b), and isolating the test DNA molecule.

In another aspect, the invention concerns an isolated nucleic acid molecule comprising (a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide scoring at least about 80%
10 positives, alternatively at least about 81% positives, alternatively at least about 82% positives, alternatively at least about 83% positives, alternatively at least about 84% positives, alternatively at least about 85% positives, alternatively at least about 86% positives, alternatively at least about 87% positives, alternatively at least about 88% positives, alternatively at least about 89% positives, alternatively at least about 90%
15 positives, alternatively at least about 91% positives, alternatively at least about 92% positives, alternatively at least about 93% positives, alternatively at least about 94% positives, alternatively at least about 95% positives, alternatively at least about 96% positives, alternatively at least about 97% positives, alternatively at least about 98% positives and alternatively at least about 99% positives when compared with the amino
20 acid sequence of residues about 1 or about 23 to 216, inclusive, of Figure 2 (SEQ ID NO:2), or (b) the complement of the nucleotide sequence of (a).

In a specific aspect, the invention provides an isolated nucleic acid molecule comprising DNA encoding a FGF-19 polypeptide without the N-terminal signal sequence and/or the initiating methionine, or is complementary to such encoding nucleic
25 acid molecule. The signal peptide has been tentatively identified as extending from about amino acid position 1 to about amino acid position 22, inclusive, in the sequence of Figure 2 (SEQ ID NO:2). It is noted, however, that the C-terminal boundary of the signal peptide may vary, but most likely by no more than about 5 amino acids on either side of the signal peptide C-terminal boundary as initially identified herein, wherein the
30 C-terminal boundary of the signal peptide may be identified pursuant to criteria

WO 01/18210

PCT/US00/06471

routinely employed in the art for identifying that type of amino acid sequence element (e.g., Nielsen et al., *Prot. Eng.* 10:1-6 (1997) and von Heinje et al., *Nucl. Acids. Res.* 14:4683-4690 (1986)). Moreover, it is also recognized that, in some cases, cleavage of a signal sequence from a secreted polypeptide is not entirely uniform, resulting in more than one secreted species. These polypeptides, and the polynucleotides encoding them, are contemplated by the present invention. As such, for purposes of the present application, the signal peptide of the FGF-19 polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2) extends from amino acids 1 to X of Figure 2 (SEQ ID NO:2), wherein X is any amino acid from 17 to 27 of Figure 2 (SEQ ID NO:2). Therefore, mature forms of the FGF-19 polypeptide which are encompassed by the present invention include those comprising amino acids X to 216 of Figure 2 (SEQ ID NO:2), wherein X is any amino acid from 17 to 27 of Figure 2 (SEQ ID NO:2) and variants thereof as described below. Isolated nucleic acid molecules encoding these polypeptides are also contemplated.

Another embodiment is directed to fragments of a FGF-19 polypeptide sequence which includes the coding sequence that may find use as, for example, hybridization probes or for encoding fragments of a FGF-19 polypeptide that may optionally encode a polypeptide comprising a binding site for an anti-FGF-19 antibody. Such nucleic acid fragments are usually at least about 20 nucleotides in length, alternatively at least about 30 nucleotides in length, alternatively at least about 40 nucleotides in length, alternatively at least about 50 nucleotides in length, alternatively at least about 60 nucleotides in length, alternatively at least about 70 nucleotides in length, alternatively at least about 80 nucleotides in length, alternatively at least about 90 nucleotides in length, alternatively at least about 100 nucleotides in length, alternatively at least about 110 nucleotides in length, alternatively at least about 120 nucleotides in length, alternatively at least about 130 nucleotides in length, alternatively at least about 140 nucleotides in length, alternatively at least about 150 nucleotides in length, alternatively at least about 160 nucleotides in length, alternatively at least about 170 nucleotides in length, alternatively at least about 180 nucleotides in length, alternatively at least about 190 nucleotides in length, alternatively at least about 200 nucleotides in length, alternatively at least about 250 nucleotides in length, alternatively at least about 300 nucleotides in length, alternatively at least about 350 nucleotides in length, alternatively

WO 01/18210

PCT/US00/06471

at least about 400 nucleotides in length, alternatively at least about 450 nucleotides in length, alternatively at least about 500 nucleotides in length, alternatively at least about 600 nucleotides in length, alternatively at least about 700 nucleotides in length, alternatively at least about 800 nucleotides in length, alternatively at least about 900 nucleotides in length and alternatively at least about 1000 nucleotides in length, wherein
5 in this context the term "about" means the referenced nucleotide sequence length plus or minus 10% of that referenced length. In a preferred embodiment, the nucleotide sequence fragment is derived from any coding region of the nucleotide sequence shown in Figure 1 (SEQ ID NO:1). It is noted that novel fragments of a FGF-19 polypeptide-encoding nucleotide sequence may be determined in a routine manner by aligning the
10 FGF-19 polypeptide-encoding nucleotide sequence with other known nucleotide sequences using any of a number of well known sequence alignment programs and determining which FGF-19 polypeptide-encoding nucleotide sequence fragment(s) are novel. All of such FGF-19 polypeptide-encoding nucleotide sequences are contemplated herein and can be determined without undue experimentation. Also
15 contemplated are the FGF-19 polypeptide fragments encoded by these nucleotide molecule fragments, preferably those FGF-19 polypeptide fragments that comprise a binding site for an anti-FGF-19 antibody.

In another embodiment, the invention provides a vector comprising a nucleotide sequence encoding FGF-19 or its variants. The vector may comprise any of the
20 isolated nucleic acid molecules hereinabove identified.

A host cell comprising such a vector is also provided. By way of example, the host cells may be CHO cells, *E. coli*, baculovirus infected insect cells, or yeast. A process for producing FGF-19 polypeptides is further provided and comprises culturing host cells under conditions suitable for expression of FGF-19 and recovering FGF-19
25 from the cell culture.

In another embodiment, the invention provides isolated FGF-19 polypeptide encoded by any of the isolated nucleic acid sequences hereinabove identified.

In a specific aspect, the invention provides isolated native sequence FGF-19 polypeptide, which in certain embodiments, includes an amino acid sequence
30 comprising residues from about 1 or about 23 to about 216 of Figure 2 (SEQ ID NO:2).

WO 01/18210

PCT/US00/06471

In another aspect, the invention concerns an isolated FGF-19 polypeptide, comprising an amino acid sequence having at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81% amino acid sequence identity, alternatively at least about 82% amino acid sequence identity, alternatively at least about 83% amino acid sequence identity, alternatively at least about 84% amino acid sequence identity, alternatively at least about 85% amino acid sequence identity, alternatively at least about 86% amino acid sequence identity, alternatively at least about 87% amino acid sequence identity, alternatively at least about 88% amino acid sequence identity, alternatively at least about 89% amino acid sequence identity, alternatively at least about 90% amino acid sequence identity, alternatively at least about 91% amino acid sequence identity, alternatively at least about 92% amino acid sequence identity, alternatively at least about 93% amino acid sequence identity, alternatively at least about 94% amino acid sequence identity, alternatively at least about 95% amino acid sequence identity, alternatively at least about 96% amino acid sequence identity, alternatively at least about 97% amino acid sequence identity, alternatively at least about 98% amino acid sequence identity and alternatively at least about 99% amino acid sequence identity to the sequence of amino acid residues from about 1 or about 23 to about 216, inclusive, of Figure 2 (SEQ ID NO:2).

In a further aspect, the invention concerns an isolated FGF-19 polypeptide comprising an amino acid sequence having at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81% amino acid sequence identity, alternatively at least about 82% amino acid sequence identity, alternatively at least about 83% amino acid sequence identity, alternatively at least about 84% amino acid sequence identity, alternatively at least about 85% amino acid sequence identity, alternatively at least about 86% amino acid sequence identity, alternatively at least about 87% amino acid sequence identity, alternatively at least about 88% amino acid sequence identity, alternatively at least about 89% amino acid sequence identity, alternatively at least about 90% amino acid sequence identity, alternatively at least about 91% amino acid sequence identity, alternatively at least about 92% amino acid sequence identity, alternatively at least about 93% amino acid sequence identity, alternatively at least about 94% amino acid sequence identity, alternatively at least about 95% amino acid sequence identity.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

sequence identity, alternatively at least about 96% amino acid sequence identity, alternatively at least about 97% amino acid sequence identity, alternatively at least about 98% amino acid sequence identity and alternatively at least about 99% amino acid sequence identity to an amino acid sequence encoded by the human protein cDNA deposited with the ATCC on November 21, 1997 under ATCC Deposit No. 209480 (DNA49435-1219). In a preferred embodiment, the isolated FGF-19 polypeptide comprises an amino acid sequence encoded by the human protein cDNA deposited with the ATCC on November 21, 1997 under ATCC Deposit No. 209480 (DNA49435-1219).

In a further aspect, the invention concerns an isolated FGF-19 polypeptide comprising an amino acid sequence scoring at least about 80% positives, alternatively at least about 81% positives, alternatively at least about 82% positives, alternatively at least about 83% positives, alternatively at least about 84% positives, alternatively at least about 85% positives, alternatively at least about 86% positives, alternatively at least about 87% positives, alternatively at least about 88% positives, alternatively at least about 89% positives, alternatively at least about 90% positives, alternatively at least about 91% positives, alternatively at least about 92% positives, alternatively at least about 93% positives, alternatively at least about 94% positives, alternatively at least about 95% positives, alternatively at least about 96% positives, alternatively at least about 97% positives, alternatively at least about 98% positives and alternatively at least about 99% positives when compared with the amino acid sequence of residues from about 1 or about 23 to about 216, inclusive, of Figure 2 (SEQ ID NO:2).

In a specific aspect, the invention provides an isolated FGF-19 polypeptide without the N-terminal signal sequence and/or the initiating methionine and is encoded by a nucleotide sequence that encodes such an amino acid sequence as hereinbefore described. Processes for producing the same are also herein described, wherein those processes comprise culturing a host cell comprising a vector which comprises the appropriate encoding nucleic acid molecule under conditions suitable for expression of the FGF-19 polypeptide and recovering the FGF-19 polypeptide from the cell culture.

In yet another aspect, the invention concerns an isolated FGF-19 polypeptide, comprising the sequence of amino acid residues from about 1 or about 23 to about 216,

WO 01/18210

PCT/US00/06471

inclusive, of Figure 2 (SEQ ID NO:2), or a fragment thereof which is biologically active or sufficient to provide a binding site for an anti-FGF-19 antibody, wherein the identification of FGF-19 polypeptide fragments that possess biological activity or provide a binding site for an anti-FGF-19 antibody may be accomplished in a routine manner using techniques which are well known in the art. Preferably, the FGF-19 fragment retains a qualitative biological activity of a native FGF-19 polypeptide, including the ability to therapeutically treat obesity.

In a still further aspect, the invention provides a polypeptide produced by (i) hybridizing a test DNA molecule under stringent conditions with (a) a DNA molecule encoding a FGF-19 polypeptide having the sequence of amino acid residues from about 10 1 or about 23 to about 216, inclusive, of Figure 2 (SEQ ID NO:2), or (b) the complement of the DNA molecule of (a), and if the test DNA molecule has at least about an 80% sequence identity, preferably at least about an 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83% 15 nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively 20 at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence 25 identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity and alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity to (a) or (b), (ii) culturing a host cell comprising the test DNA molecule under conditions suitable for expression of the polypeptide, and (iii) recovering the polypeptide from the cell culture.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

In another embodiment, the invention provides chimeric molecules comprising a FGF-19 polypeptide fused to a heterologous polypeptide or amino acid sequence, wherein the FGF-19 polypeptide may comprise any FGF-19 polypeptide, variant or fragment thereof as hereinbefore described. An example of such a chimeric molecule comprises a FGF-19 polypeptide fused to an epitope tag sequence or a Fc region of an immunoglobulin.

In another embodiment, the invention provides an antibody as defined below which specifically binds to a FGF-19 polypeptide as hereinbefore described. Optionally, the antibody is a monoclonal antibody, an antibody fragment or a single chain antibody.

10 In yet another embodiment, the invention concerns agonists and antagonists of a native FGF-19 polypeptide as defined below. In a particular embodiment, the agonist or antagonist is an anti-FGF-19 antibody or a small molecule.

15 In a further embodiment, the invention concerns a method of identifying agonists or antagonists to a FGF-19 polypeptide which comprise contacting the FGF-19 polypeptide with a candidate molecule and monitoring a biological activity mediated by said FGF-19 polypeptide. Preferably, the FGF-19 polypeptide is a native FGF-19 polypeptide.

20 In a still further embodiment, the invention concerns a composition of matter comprising a FGF-19 polypeptide, or an agonist or antagonist of a FGF-19 polypeptide as herein described, or an anti-FGF-19 antibody, in combination with a carrier. Optionally, the carrier is a pharmaceutically acceptable carrier.

25 Another embodiment of the present invention is directed to the use of a FGF-19 polypeptide, or an agonist or antagonist thereof as herein described, or an anti-FGF-19 antibody, for the preparation of a medicament useful in the treatment of a condition which is responsive to the FGF-19 polypeptide, an agonist or antagonist thereof or an anti-FGF-19 antibody.

In one embodiment, a method for screening for a bioactive agent capable of binding to FGF-19 is provided. In one aspect, the method comprises adding a candidate bioactive agent to a sample of FGF-19 and determining the binding of said

WO 01/18210

PCT/US00/06471

candidate agent to said FGF-19, wherein binding indicates a bioactive agent capable of binding to FGF-19.

Additionally provided herein is a method for screening for a bioactive agent capable of modulating the activity of FGF-19. In one embodiment, a method is provided which comprises the steps of adding a candidate bioactive agent to a sample of FGF-19 and determining an alteration in the biological activity of FGF-19, wherein an alteration indicates a bioactive agent capable of modulating the activity of FGF-19. In one embodiment, FGF-19 activity is decreased uptake of glucose in cells. In another embodiment, FGF-19 activity is increased leptin release from cells. In a preferred embodiment, FGF-19 activity is decreased uptake of glucose and increased leptin release from cells. Preferably the cells are adipocytes. In yet another embodiment, FGF-19 activity is increased oxidation of lipids and carbohydrates. Preferably the cells are liver or muscle cells.

In yet another embodiment, the invention provides a method of identifying a receptor for FGF-19. In a preferred embodiment, the method comprises combining FGF-19 with a composition comprising cell membrane material wherein said FGF-19 complexes with a receptor on said cell membrane material, and identifying said receptor as a FGF-19 receptor. In one embodiment, the method includes a step of crosslinking said FGF-19 and receptor. The cell membrane can be from an intact cell or a cell membrane extract preparation.

20 In a further aspect of the invention, a method is provided for inducing leptin release from cells, preferably adipocytes. In one embodiment, the method comprises administering FGF-19 to cells in an amount effective to induce leptin release.

In the methods provided herein, FGF-19 may be administered as a nucleic acid which expresses FGF-19 or in protein form. As further described below, FGF-19 may 25 be administered by infusion or in a sustained release formulation. Preferably, FGF-19 is administered to an individual with a pharmaceutically acceptable carrier.

Also provided herein is a method for inducing a decrease in glucose uptake in cells, preferably adipocyte cells. In one embodiment the method comprises administering FGF-19 to cells in an amount effective to induce a decrease in glucose 30 uptake.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

In yet another aspect of the invention a method of treating an individual for obesity is provided. In one embodiment the method comprises administering to an individual a composition comprising FGF-19 in an amount effective to treat obesity. In this manner, conditions related to obesity can also be treated such as cardiovascular disease.

5 Also provided herein is a method of reducing total body mass in an individual comprising administering to said individual an effective amount of FGF-19. In a preferred embodiment, adiposity (fat) of an individual is reduced.

Moreover, a method is provided herein for reducing the level of at least one of triglycerides and free fatty acids in an individual comprising administering to said 10 individual an effective amount of FGF-19. Also provided herein is a method of increasing the metabolic rate in an individual comprising administering to said individual an effective amount of FGF-19.

Also provided herein is an animal model for determining the affects of FGF-19 and modulators thereof under varying conditions and states. In one embodiment, an 15 animal, preferably a rodent, is provided which comprises a genome comprising a transgene encoding FGF-19.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows the nucleotide sequence (SEQ ID NO:1) of a cDNA containing 20 a nucleotide sequence (nucleotides 464-1111) encoding native sequence FGF-19, wherein the nucleotide sequence (SEQ ID NO:1) is a clone designated herein as "DNA49435-1219". Also presented in bold font and underlined are the positions of the respective start and stop codons.

Figure 2 shows the amino acid sequence (SEQ ID NO:2) of a native sequence 25 FGF-19 polypeptide as derived from the coding sequence of SEQ ID NO:1. Also shown are the approximate locations of various other important polypeptide domains.

Figures 3A and 3B show bar graphs demonstrating that MLC-FGF-19 transgenic 30 mice weigh less than their non-transgenic littermates (Figure 3A) and have lower circulating leptin levels (Figure 3B). Figure 3A shows the weight of FGF-19 transgenic mice (solid bars) and non transgenic (wild-type) littermates (stippled bar) at 6 weeks of

WO 01/18210

PCT/US00/06471

age during ad libitum feeding (far left), after 6 and 24 hour fasts, and 24 hours after ending a 24 hour fast (far right). Figure 3B shows the sera of the same groups of mice represented in Figure 3A in an assay for leptin (vertical bar).

Figures 4A-4D are bar graphs demonstrating that FGF-19 transgenic mice have increased food intake and urine production but have a normal hematocrit. A group of 5 mice were monitored for food intake during ad libitum feeding and 24 hours after ending a 24 hour fast (Figure 4A), water intake (Figure 4B), urine output (Figure 4C) and hematocrit (Figure 4D) wherein the results for the FGF-19 transgenic mice in each graph are shown by the solid black bar and the results for the wild-type are shown by the stippled bar.

10 Figure 5 is a bar graph demonstrating that FGF-19 transgenic mice have an increased rate of oxygen consumption. Oxygen consumption is shown for FGF-19 transgenic mice (solid black bars) and wild-type (stippled bars) during both light cycles (dark or light), following a 24 hour fast and 24 hours after ending a 24 hour fast.

15 Figures 6A and 6B are bar graphs demonstrating that FGF-19 transgenic mice (solid black bars) have decreased triglycerides (Figure 6A) and free fatty acids (Figure 6B) over wild-type mice (stippled bars).

20 Figures 7A and 7B are bar graphs which demonstrate that infusing non-transgenic mice with FGF-19 (solid black bars) leads to an increase in food intake (Figure 7A) and an increase in oxygen consumption (Figure 7B) over mice infused with vehicle lacking FGF-19 (stippled bars), wherein "n" means night and "d" means day.

Figures 8A and 8B are bar graphs indicating that FGF-19 increases leptin release from adipocytes (Figure 8A) and decreases glucose uptake by adipocytes (Figure 8B).

25 Figure 9 is a bar graph showing the fat pad weight of FGF-19 transgenic mice (shaded bars) or wild-type (solid black bars) each on a high fat diet (HFD) over time, wherein along the horizontal bar starting at the left, the results are shown at 6 weeks for epididymal (HFD Ep) and then for retroperitoneal with peri-renal (HFD RP/PR), and then at 10 weeks for epididymal and then for retroperitoneal with peri-renal.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

Figure 10 is a bar graph showing the glucose tolerance of FGF-19 transgenic mice (shaded bars) or wild-type (solid black bars) over time (both on high fat diets for ten weeks).

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

5

I. Definitions

The terms "FGF-19 polypeptide", "FGF-19 protein" and "FGF-19" when used herein encompass native sequence FGF-19 and FGF-19 polypeptide variants (which are further defined herein). The FGF-19 polypeptide may be isolated from a variety of sources, such as from human tissue types or from another source, or prepared by 10 recombinant and/or synthetic methods.

A "native sequence FGF-19" comprises a polypeptide having the same amino acid sequence as a FGF-19 derived from nature. Such native sequence FGF-19 can be isolated from nature or can be produced by recombinant and/or synthetic means. The term "native sequence FGF-19" specifically encompasses naturally-occurring truncated 15 or secreted forms (e.g., an extracellular domain sequence), naturally-occurring variant forms (e.g., alternatively spliced forms) and naturally-occurring allelic variants of the FGF-19. In one embodiment of the invention, the native sequence FGF-19 is a mature or full-length native sequence FGF-19 comprising amino acids 1 to 216 of Figure 2 (SEQ ID NO:2). Also, while the FGF-19 polypeptide disclosed in Figure 2 (SEQ ID 20 NO:2) is shown to begin with the methionine residue designated herein as amino acid position 1, it is conceivable and possible that another methionine residue located either upstream or downstream from amino acid position 1 in Figure 2 (SEQ ID NO:2) may be employed as the starting amino acid residue for the FGF-19 polypeptide.

"FGF-19 variant polypeptide" means an active FGF-19 polypeptide as defined 25 below having at least about 80% amino acid sequence identity with the amino acid sequence of (a) residues 1 or about 23 to 216 of the FGF-19 polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), (b) X to 216 of the FGF-19 polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), wherein X is any amino acid residue from 17 to 27 of Figure 2 (SEQ ID NO:2), or (c) another specifically derived fragment of the amino acid sequence 30 shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2). Such FGF-19 variant polypeptides include, for

WO 01/18210

PCT/US00/06471

instance, FGF-19 polypeptides wherein one or more amino acid residues are added, or deleted, at the N- and/or C-terminus, as well as within one or more internal domains, of the sequence of Figure 2 (SEQ ID NO:2). Ordinarily, a FGF-19 variant polypeptide will have at least about 80% amino acid sequence identity, alternatively at least about 81% amino acid sequence identity, alternatively at least about 82% amino acid sequence 5 identity, alternatively at least about 83% amino acid sequence identity, alternatively at least about 84% amino acid sequence identity, alternatively at least about 85% amino acid sequence identity, alternatively at least about 86% amino acid sequence identity, alternatively at least about 87% amino acid sequence identity, alternatively at least about 88% amino acid sequence identity, alternatively at least about 89% amino acid 10 sequence identity, alternatively at least about 90% amino acid sequence identity, alternatively at least about 91% amino acid sequence identity, alternatively at least about 92% amino acid sequence identity, alternatively at least about 93% amino acid sequence identity, alternatively at least about 94% amino acid sequence identity, alternatively at least about 95% amino acid sequence identity, alternatively at least 15 about 96% amino acid sequence identity, alternatively at least about 97% amino acid sequence identity, alternatively at least about 98% amino acid sequence identity and alternatively at least about 99% amino acid sequence identity with (a) residues 1 or about 23 to 216 of the FGF-19 polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), (b) X to 216 of the FGF-19 polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), wherein X is any 20 amino acid residue from 17 to 27 of Figure 2 (SEQ ID NO:2), or (c) another specifically derived fragment of the amino acid sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2). FGF-19 variant polypeptides do not encompass the native FGF-19 polypeptide sequence. Ordinarily, FGF-19 variant polypeptides are at least about 10 amino acids in length, alternatively at least about 20 amino acids in length, alternatively at least 25 about 30 amino acids in length, alternatively at least about 40 amino acids in length, alternatively at least about 50 amino acids in length, alternatively at least about 60 amino acids in length, alternatively at least about 70 amino acids in length, alternatively at least about 80 amino acids in length, alternatively at least about 90 amino acids in length, alternatively at least about 100 amino acids in length, alternatively at least about

WO 01/18210

PCT/US00/06471

150 amino acids in length, alternatively at least about 200 amino acids in length, alternatively at least about 300 amino acids in length, or more.

"Percent (%) amino acid sequence identity" with respect to the FGF-19 polypeptide sequences identified herein is defined as the percentage of amino acid residues in a candidate sequence that are identical with the amino acid residues in a FGF-19 sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. Alignment for purposes of determining percent amino acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 or Megalign (DNASTAR) software. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full-length of the sequences being compared. For purposes herein, however, % amino acid sequence identity values are obtained as described below by using the sequence comparison computer program ALIGN-2, wherein the complete source code for the ALIGN-2 program is provided in Table 1 below. The ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc. and the source code shown in Table 1 has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXU510087. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, California or may be compiled from the source code provided in Table 1. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

For purposes herein, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

30

100 times the fraction X/Y

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that 5 where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A. As examples of % amino acid sequence identity calculations, Tables 2 and 3 demonstrate how to calculate the % amino acid sequence identity of the amino acid sequence designated "Comparison Protein" to the amino acid 10 sequence designated "PRO".

Unless specifically stated otherwise, all % amino acid sequence identity values used herein are obtained as described above using the ALIGN-2 sequence comparison computer program. However, % amino acid sequence identity may also be determined using the sequence comparison program NCBI-BLAST2 (Altschul et al., *Nucleic Acids* 15 *Res.* 25:3389-3402 (1997)). The NCBI-BLAST2 sequence comparison program may be downloaded from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> or otherwise obtained from the National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 uses several search parameters, wherein all of those search parameters are set to default values including, for example, unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10, minimum low 20 complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0.01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final gapped alignment = 25 and scoring matrix = BLOSUM62.

In situations where NCBI-BLAST2 is employed for amino acid sequence comparisons, the % amino acid sequence identity of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as 25 a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % amino acid sequence identity to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

100 times the fraction X/Y

WO 01/18210

PCT/US00/06471

where X is the number of amino acid residues scored as identical matches by the sequence alignment program NCBI-BLAST2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % amino acid sequence identity of A to B will not equal the % amino acid sequence identity of B to A.

"FGF-19 variant polynucleotide" or "FGF-19 variant nucleic acid sequence" means a nucleic acid molecule which encodes an active FGF-19 polypeptide as defined below and which has at least about 80% nucleic acid sequence identity with either (a) a nucleic acid sequence which encodes residues 1 or about 23 to 216 of the FGF-19 polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), (b) a nucleic acid sequence which encodes amino acids X to 216 of the FGF-19 polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), wherein X is any amino acid residue from 17 to 27 of Figure 2 (SEQ ID NO:2), or (c) a nucleic acid sequence which encodes another specifically derived fragment of the amino acid sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2). Ordinarily, 5 a FGF-19 variant polynucleotide will have at least about 80% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 81% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 82% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 83% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 84% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 85% nucleic acid sequence identity, alternatively 10 at least about 86% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 87% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 88% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 89% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 90% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 91% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 92% nucleic acid sequence 15 identity, alternatively at least about 93% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 94% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 95% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 96% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 97% nucleic acid sequence identity, alternatively at least about 98% nucleic acid sequence identity and alternatively at least about 99% nucleic acid sequence identity with either (a) a nucleic acid sequence which encodes 20

30

WO 01/18210

PCT/US00/06471

residues 1 or about 23 to 216 of the FGF-19 polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), (b) a nucleic acid sequence which encodes amino acids X to 216 of the FGF-19 polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2), wherein X is any amino acid residue from 17 to 27 of Figure 2 (SEQ ID NO:2), or (c) a nucleic acid sequence which encodes another specifically derived fragment of the amino acid sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2). FGF-19 polynucleotide variants do not encompass the native FGF-19 nucleotide sequence.

Ordinarily, FGF-19 variant polynucleotides are at least about 30 nucleotides in length, alternatively at least about 60 nucleotides in length, alternatively at least about 90 nucleotides in length, alternatively at least about 120 nucleotides in length, alternatively at least about 150 nucleotides in length, alternatively at least about 180 nucleotides in length, alternatively at least about 210 nucleotides in length, alternatively at least about 240 nucleotides in length, alternatively at least about 270 nucleotides in length, alternatively at least about 300 nucleotides in length, alternatively at least about 450 nucleotides in length, alternatively at least about 600 nucleotides in length, alternatively at least about 900 nucleotides in length, or more.

"Percent (%) nucleic acid sequence identity" with respect to the FGF-19 polypeptide-encoding nucleic acid sequences identified herein is defined as the percentage of nucleotides in a candidate sequence that are identical with the nucleotides in a FGF-19 polypeptide-encoding nucleic acid sequence, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity. Alignment for purposes of determining percent nucleic acid sequence identity can be achieved in various ways that are within the skill in the art, for instance, using publicly available computer software such as BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 or Megalign (DNASTAR) software. Those skilled in the art can determine appropriate parameters for measuring alignment, including any algorithms needed to achieve maximal alignment over the full-length of the sequences being compared. For purposes herein, however, % nucleic acid sequence identity values are obtained as described below by using the sequence comparison computer program ALIGN-2, wherein the complete source code for the ALIGN-2 program is provided in Table 1 below. The

WO 01/18210

PCT/US00/06471

ALIGN-2 sequence comparison computer program was authored by Genentech, Inc. and the source code shown in Table 1 has been filed with user documentation in the U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, where it is registered under U.S. Copyright Registration No. TXU510087. The ALIGN-2 program is publicly available through Genentech, Inc., South San Francisco, California or may be compiled from the 5 source code provided in Table 1. The ALIGN-2 program should be compiled for use on a UNIX operating system, preferably digital UNIX V4.0D. All sequence comparison parameters are set by the ALIGN-2 program and do not vary.

For purposes herein, the % nucleic acid sequence identity of a given nucleic acid sequence C to, with, or against a given nucleic acid sequence D (which can 10 alternatively be phrased as a given nucleic acid sequence C that has or comprises a certain % nucleic acid sequence identity to, with, or against a given nucleic acid sequence D) is calculated as follows:

100 times the fraction W/Z.

15

where W is the number of nucleotides scored as identical matches by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of C and D, and where Z is the total number of nucleotides in D. It will be appreciated that where the length of nucleic acid sequence C is not equal to the length of nucleic acid sequence D, the % 20 nucleic acid sequence identity of C to D will not equal the % nucleic acid sequence identity of D to C. As examples of % nucleic acid sequence identity calculations, Tables 4 and 5 demonstrate how to calculate the % nucleic acid sequence identity of the nucleic acid sequence designated "Comparison DNA" to the nucleic acid sequence designated "PRO-DNA".

25 Unless specifically stated otherwise, all % nucleic acid sequence identity values used herein are obtained as described above using the ALIGN-2 sequence comparison computer program. However, % nucleic acid sequence identity may also be determined using the sequence comparison program NCBI-BLAST2 (Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)). The NCBI-BLAST2 sequence comparison program may 30 be downloaded from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> or otherwise obtained from the

WO 01/18210

PCT/US00/06471

National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 uses several search parameters, wherein all of those search parameters are set to default values including, for example, unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10, minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0.01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final gapped alignment = 25 and scoring matrix = BLOSUM62.

5 In situations where NCBI-BLAST2 is employed for sequence comparisons, the % nucleic acid sequence identity of a given nucleic acid sequence C to, with, or against a given nucleic acid sequence D (which can alternatively be phrased as a given nucleic acid sequence C that has or comprises a certain % nucleic acid sequence identity to, with, or against a given nucleic acid sequence D) is calculated as follows:

10

100 times the fraction W/Z

where W is the number of nucleotides scored as identical matches by the sequence alignment program NCBI-BLAST2 in that program's alignment of C and D, and where

15 Z is the total number of nucleotides in D. It will be appreciated that where the length of nucleic acid sequence C is not equal to the length of nucleic acid sequence D, the % nucleic acid sequence identity of C to D will not equal the % nucleic acid sequence identity of D to C.

In other embodiments, FGF-19 variant polynucleotides are nucleic acid 20 molecules that encode an active FGF-19 polypeptide and which are capable of hybridizing, preferably under stringent hybridization and wash conditions, to nucleotide sequences encoding the full-length FGF-19 polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2). FGF-19 variant polypeptides may be those that are encoded by a FGF-19 variant polynucleotide.

25 The term "positives", in the context of the amino acid sequence identity comparisons performed as described above, includes amino acid residues in the sequences compared that are not only identical, but also those that have similar properties. Amino acid residues that score a positive value to an amino acid residue of interest are those that are either identical to the amino acid residue of interest or are

WO 01/18210

PCT/US00/06471

a preferred substitution (as defined in Table 6 below) of the amino acid residue of interest.

For purposes herein, the % value of positives of a given amino acid sequence A to, with, or against a given amino acid sequence B (which can alternatively be phrased as a given amino acid sequence A that has or comprises a certain % positives 5 to, with, or against a given amino acid sequence B) is calculated as follows:

$$100 \text{ times the fraction } X/Y$$

where X is the number of amino acid residues scoring a positive value as defined above 10 by the sequence alignment program ALIGN-2 in that program's alignment of A and B, and where Y is the total number of amino acid residues in B. It will be appreciated that where the length of amino acid sequence A is not equal to the length of amino acid sequence B, the % positives of A to B will not equal the % positives of B to A.

"Isolated," when used to describe the various polypeptides disclosed herein, 15 means polypeptide that has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Preferably, the isolated polypeptide is free of association with all components with which it is naturally associated. Contaminant components of its natural environment are materials that would typically interfere with diagnostic or therapeutic uses for the polypeptide, and may include enzymes, hormones, 20 and other proteinaceous or non-proteinaceous solutes. In preferred embodiments, the polypeptide will be purified (1) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (2) to homogeneity by SDS-PAGE under non-reducing or reducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated polypeptide includes polypeptide 25 *in situ* within recombinant cells, since at least one component of the FGF-19 natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated polypeptide will be prepared by at least one purification step.

An "isolated" nucleic acid molecule encoding a FGF-19 polypeptide is a nucleic acid molecule that is identified and separated from at least one contaminant nucleic acid 30 molecule with which it is ordinarily associated in the natural source of the FGF-19-

WO 01/18210

PCT/US00/06471

encoding nucleic acid. Preferably, the isolated nucleic acid is free of association with all components with which it is naturally associated. An isolated FGF-19-encoding nucleic acid molecule is other than in the form or setting in which it is found in nature. Isolated nucleic acid molecules therefore are distinguished from the FGF-19-encoding nucleic acid molecule as it exists in natural cells. However, an isolated nucleic acid 5 molecule encoding a FGF-19 polypeptide includes FGF-19-encoding nucleic acid molecules contained in cells that ordinarily express FGF-19 where, for example, the nucleic acid molecule is in a chromosomal location different from that of natural cells.

The term "control sequences" refers to DNA sequences necessary for the expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The 10 control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, and a ribosome binding site. Eukaryotic cells are known to utilize promoters, polyadenylation signals, and enhancers.

Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory 15 leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked 20 are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

The term "antibody" is used in the broadest sense and specifically covers, for 25 example, single anti-FGF-19 monoclonal antibodies (including agonist, antagonist, and neutralizing antibodies), anti-FGF-19 antibody compositions with polyepitopic specificity, single chain anti-FGF-19 antibodies, and fragments of anti-FGF-19 antibodies (see below). The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the

WO 01/18210

PCT/US00/06471

individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally-occurring mutations that may be present in minor amounts.

"Stringency" of hybridization reactions is readily determinable by one of ordinary skill in the art, and generally is an empirical calculation dependent upon probe length, washing temperature, and salt concentration. In general, longer probes require 5 higher temperatures for proper annealing, while shorter probes need lower temperatures. Hybridization generally depends on the ability of denatured DNA to reanneal when complementary strands are present in an environment below their melting temperature. The higher the degree of desired homology between the probe and hybridizable sequence, the higher the relative temperature which can be used. As 10 a result, it follows that higher relative temperatures would tend to make the reaction conditions more stringent, while lower temperatures less so. For additional details and explanation of stringency of hybridization reactions, see Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Stringent conditions" or "high stringency conditions", as defined herein, may 15 be identified by those that: (1) employ low ionic strength and high temperature for washing, for example 0.015 M sodium chloride/0.0015 M sodium citrate/0.1% sodium dodecyl sulfate at 50°C; (2) employ during hybridization a denaturing agent, such as formamide, for example, 50% (v/v) formamide with 0.1% bovine serum albumin/0.1% Ficoll/0.1% polyvinylpyrrolidone/50mM sodium phosphate buffer at pH 6.5 with 750 20 mM sodium chloride, 75 mM sodium citrate at 42°C; or (3) employ 50% formamide, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 6.8), 0.1% sodium pyrophosphate, 5 x Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, and 10% dextran sulfate at 42°C, with washes at 42°C in 0.2 x SSC (sodium chloride/sodium citrate) and 50% formamide at 55°C, followed by a 25 high-stringency wash consisting of 0.1 x SSC containing EDTA at 55°C.

"Moderately stringent conditions" may be identified as described by Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, and include the use of washing solution and hybridization conditions (e.g., temperature, ionic strength and %SDS) less stringent than those described above. An 30 example of moderately stringent conditions is overnight incubation at 37°C in a

WO 01/18210

PCT/US00/06471

solution comprising: 20% formamide, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH 7.6), 5 x Denhardt's solution, 10% dextran sulfate, and 20 mg/ml denatured sheared salmon sperm DNA, followed by washing the filters in 1 x SSC at about 37-50°C. The skilled artisan will recognize how to adjust the temperature, ionic strength, etc. as necessary to accommodate factors such as probe length and the like.

5 The term "epitope tagged" when used herein refers to a chimeric polypeptide comprising a FGF-19 polypeptide fused to a "tag polypeptide". The tag polypeptide has enough residues to provide an epitope against which an antibody can be made, yet is short enough such that it does not interfere with activity of the polypeptide to which it is fused. The tag polypeptide preferably also is fairly unique so that the antibody does not substantially cross-react with other epitopes. Suitable tag polypeptides generally have at least six amino acid residues and usually between about 8 and 50 amino acid residues (preferably, between about 10 and 20 amino acid residues).

10 As used herein, the term "immunoadhesin" designates antibody-like molecules which combine the binding specificity of a heterologous protein (an "adhesin") with the effector functions of immunoglobulin constant domains. Structurally, the immunoadhesins comprise a fusion of an amino acid sequence with the desired binding specificity which is other than the antigen recognition and binding site of an antibody (i.e., is "heterologous"), and an immunoglobulin constant domain sequence. The 15 adhesin part of an immunoadhesin molecule typically is a contiguous amino acid sequence comprising at least the binding site of a receptor or a ligand. The immunoglobulin constant domain sequence in the immunoadhesin may be obtained from any immunoglobulin, such as IgG-1, IgG-2, IgG-3, or IgG-4 subtypes, IgA (including IgA-1 and IgA-2), IgE, IgD or IgM.

20 "Active" or "activity" for the purposes herein refers to form(s) of FGF-19 which retain a biological and/or an immunological activity of native or naturally-occurring FGF-19, wherein "biological" activity refers to a biological function (either inhibitory or stimulatory) caused by a native or naturally-occurring FGF-19 other than the ability to induce the production of an antibody against an antigenic epitope possessed by a 25 native or naturally-occurring FGF-19 and an "immunological" activity refers to the

WO 01/18210

PCT/US00/06471

ability to induce the production of an antibody against an antigenic epitope possessed by a native or naturally-occurring FGF-19. A preferred biological activity includes any one or more of the following activities: increases metabolism (or metabolic rate) in an individual, decreases body weight of an individual, decreases adiposity in an individual, decreases glucose uptake into adipocytes, increases leptin release from adipocytes, 5 decreases triglycerides in an individual, and decreases free fatty acids in an individual. It is understood that some of the activities of FGF-19 are directly induced by FGF-19 and some are indirectly induced, however, each are the result of the presence of FGF-19 and would not otherwise have the result in the absence of FGF-19.

The term "antagonist" is used in the broadest sense, and includes any molecule 10 that partially or fully blocks, inhibits, or neutralizes a biological activity of a native FGF-19 polypeptide disclosed herein. In a similar manner, the term "agonist" is used in the broadest sense and includes any molecule that mimics a biological activity of a native FGF-19 polypeptide disclosed herein. Suitable agonist or antagonist molecules specifically include agonist or antagonist antibodies or antibody fragments, fragments 15 or amino acid sequence variants of native FGF-19 polypeptides, peptides, small organic molecules, etc. Methods for identifying agonists or antagonists of a FGF-19 polypeptide may comprise contacting a FGF-19 polypeptide with a candidate agonist or antagonist molecule and measuring a detectable change in one or more biological activities normally associated with the FGF-19 polypeptide.

20 "Treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures, wherein the object is to prevent or slow down (lessen) the targeted pathologic condition or disorder. Those in need of treatment include those already with the disorder as well as those prone to have the disorder or those in whom the disorder is to be prevented.

25 "Chronic" administration refers to administration of the agent(s) in a continuous mode as opposed to an acute mode, so as to maintain the initial therapeutic effect (activity) for an extended period of time. "Intermittent" administration is treatment that is not consecutively done without interruption, but rather is cyclic in nature.

30 "Mammal" for purposes of treatment refers to any animal classified as a mammal, including humans, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet

WO 01/18210

PCT/US00/06471

animals, such as dogs, cats, cattle, horses, sheep, pigs, goats, rabbits, etc. Preferably, the mammal is human.

"Individual" is any subject, preferably a mammal, more preferably a human.

"Obesity" refers to a condition whereby a mammal has a Body Mass Index (BMI), which is calculated as weight (kg) per height² (meters), of at least 25.9.

5 Conventionally, those persons with normal weight have a BMI of 19.9 to less than 25.9. The obesity herein may be due to any cause, whether genetic or environmental. Examples of disorders that may result in obesity or be the cause of obesity include overeating and bulimia, polycystic ovarian disease, craniopharyngioma, the Prader-Willi Syndrome, Fröhlich's syndrome, Type II diabetes, GH-deficient subjects, normal 10 variant short stature, Turner's syndrome, and other pathological conditions showing reduced metabolic activity or a decrease in resting energy expenditure as a percentage of total fat-free mass, e.g., children with acute lymphoblastic leukemia.

"Conditions related to obesity" refer to conditions which are the result of or which are exacerbated by obesity, such as, but not limited to dermatological disorders 15 such as infections, varicose veins, Acanthosis nigricans, and eczema, exercise intolerance, diabetes mellitus, insulin resistance, hypertension, hypercholesterolemia, cholelithiasis, osteoarthritis, orthopedic injury, thromboembolic disease, cancer, and coronary (or cardiovascular) heart disease, particular those cardiovascular conditions associated with high triglycerides and free fatty acids in an individual.

20 Administration "in combination with" one or more further therapeutic agents includes simultaneous (concurrent) and consecutive administration in any order.

"Carriers" as used herein include pharmaceutically acceptable carriers, excipients, or stabilizers which are nontoxic to the cell or mammal being exposed thereto at the dosages and concentrations employed. Often the physiologically 25 acceptable carrier is an aqueous pH buffered solution. Examples of physiologically acceptable carriers include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptide; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, 30 asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates

WO 01/18210

PCT/US00/06471

including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as TWEEN™, polyethylene glycol (PEG), and PLURONICS™.

"Antibody fragments" comprise a portion of an intact antibody, preferably the antigen binding or variable region of the intact antibody. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies (Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

Papain digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments, each with a single antigen-binding site, and a residual "Fc" fragment, a designation reflecting the ability to crystallize readily. Pepsin treatment yields an F(ab')₂ fragment that has two antigen-combining sites and is still capable of cross-linking antigen.

"Fv" is the minimum antibody fragment which contains a complete antigen-recognition and -binding site. This region consists of a dimer of one heavy- and one light-chain variable domain in tight, non-covalent association. It is in this configuration that the three CDRs of each variable domain interact to define an antigen-binding site on the surface of the VH-VL dimer. Collectively, the six CDRs confer antigen-binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three CDRs specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than the entire binding site.

The Fab fragment also contains the constant domain of the light chain and the first constant domain (CH1) of the heavy chain. Fab fragments differ from Fab' fragments by the addition of a few residues at the carboxy terminus of the heavy chain CH1 domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear a free thiol group. F(ab')₂ antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments which have hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

The "light chains" of antibodies (immunoglobulins) from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called kappa and lambda, based on the amino acid sequences of their constant domains.

Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major 5 classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, and IgA2.

"Single-chain Fv" or "sFv" antibody fragments comprise the VH and VL domains of antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. 10 Preferably, the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the VH and VL domains which enables the sFv to form the desired structure for antigen binding. For a review of sFv, see Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

15 The term "diabodies" refers to small antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments comprise a heavy-chain variable domain (VH) connected to a light-chain variable domain (VL) in the same polypeptide chain (VH - VL). By using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains are forced to pair with the complementary domains of another chain 20 and create two antigen-binding sites. Diabodies are described more fully in, for example, EP 404,097; WO 93/11161; and Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

An "isolated" antibody is one which has been identified and separated and/or 25 recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials which would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or nonproteinaceous solutes. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, (2) to a degree 30 sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence

WO 01/18210

PCT/US00/06471

by use of a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes the antibody *in situ* within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

5 The word "label" when used herein refers to a detectable compound or composition which is conjugated directly or indirectly to the antibody so as to generate a "labeled" antibody. The label may be detectable by itself (e.g. radioisotope labels or fluorescent labels) or, in the case of an enzymatic label, may catalyze chemical alteration of a substrate compound or composition which is detectable.

10 By "solid phase" is meant a non-aqueous matrix to which the antibody of the present invention can adhere. Examples of solid phases encompassed herein include those formed partially or entirely of glass (e.g., controlled pore glass), polysaccharides (e.g., agarose), polyacrylamides, polystyrene, polyvinyl alcohol and silicones. In certain embodiments, depending on the context, the solid phase can comprise the well 15 of an assay plate; in others it is a purification column (e.g., an affinity chromatography column). This term also includes a discontinuous solid phase of discrete particles, such as those described in U.S. Patent No. 4,275,149.

19 A "liposome" is a small vesicle composed of various types of lipids, phospholipids and/or surfactant which is useful for delivery of a drug (such as a FGF-20 polypeptide or antibody thereto) to a mammal. The components of the liposome are commonly arranged in a bilayer formation, similar to the lipid arrangement of biological membranes.

25 A "small molecule" is defined herein to have a molecular weight below about 500 Daltons.

25

Table 1

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with step is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M      -8      /* value of a match with a stop */
int day[29][26] = {
/*  A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */ { 2, 0,-2, 0, 0,-4, 1,-1, 0,-1,-2,-1, 0, M, 1, 0,-2, 1, 1, 0, 0,-6, 0,-3, 0 },
/* B */ { 0, 3,-4, 3, 2,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 2, M,-1, 1, 0, 0, 0,-2,-5, 0,-3, 1 },
/* C */ { 2,-4, 15, 5, 5,-4, 3,-3,-2, 0, 5,-6,-5,-4, M,-3, 5,-4, 0,-2, 0,-2,-8, 0, 0,-5 },
/* D */ { 0, 1,-3, 5, 4, 3,-6, 1, 1,-2, 0, 0,-4,-3, 2, M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0, 4, 2 },
/* E */ { 0, 2,-5, 3, 4,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 1, M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0, 4, 3 },
/* F */ { 4,-5,-4, 6,-5, 9,-5, 1, 0,-5, 2, 0,-4, M,-5,-5,-4, 3,-3, 0,-1, 0, 0, 7,-5 },
/* G */ { 1, 0,-5, 1, 0,-5, 3,-2,-1, 0,-2,-4,-3, 0, M,-1,-1, 1, 0, 0,-1, 7, 0,-5, 0 },
/* H */ { 1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0,-2,-2, 2, M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0, 0, 2 },
/* I */ { -1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2, M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-3, 0,-1,-2 },
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 },
/* K */ { -1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-5, 0, 5,-3, 0, 1, M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0, 4, 0 },
/* L */ { 2,-3,-6,-4,-3, 2,-4, 2, 0,-3, 6, 4,-3, M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2,-2, 0,-1, 2 },
/* M */ { -1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2, M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4, 0,-2, 1 },
/* N */ { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2, M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1 },
/* O */ { M, M },
/* P */ { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0, 2, 0,-1,-3,-2,-1, M, 5, 0, 1, 0, 0,-1,-5, 0,-5, 0 },
/* Q */ { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1, M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3 },
/* R */ { 2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0, M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0 },
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1, M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0 },
/* T */ { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0, M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0 },
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 },
/* V */ { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2, M,-1,-2,-2,-1, 0, 4,-6, 0,-2,-2 },
/* W */ { 6,-5, 3,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4, M,-6,-5, 2,-2,-5, 0, 6, 17, 0, 0,-61 },
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 },
/* Y */ { -1,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2, M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0, 0, 0, 0, 0 },
/* Z */ { 0, 1,-5, 2, 2,-3, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1, M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 4, 2 }
};

```

Table 1 (cont'd)

```

/*
 *include <stdio.h>
 *include <ctype.h>
 #define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
 #define MAXGAP 24 /* don't continue to penalize gaps larger than this */
 #define JMP5 1024 /* max jmps in an path */
 #define MX 4 /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */
 #define DMAT 3 /* value of matching bases */
 #define DHIS 0 /* penalty for mismatched bases */
 #define DN90 8 /* penalty for a gap */
 #define DN91 1 /* penalty per base */
 #define PINS 8 /* penalty for a gap */
 #define PINS1 4 /* penalty per residue */
 struct jmp {
    short    n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for delty) */
    unsigned short a[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
    /* limits seq in 2^16-1 */
 };
 struct diag {
    int      score; /* score at last jmp */
    long    offset; /* offset of prev block */
    short    ijmp; /* current jmp index */
    struct jmp jps; /* list of jmps */
 };
 struct path {
    int      spc; /* number of leading spaces */
    short    nJMP5; /* size of jmp (gap) */
    int      xJMP5; /* loc of jmp (last char before gap) */
 };
 char    *ofile; /* output file name */
 char    *names[2]; /* seq names: paseq[0] */
 char    *prog; /* prog name for err msg */
 char    *seqs[2]; /* seqs: seq[0] */
 int      dmxx; /* best diag: nw() */
 int      dmxD; /* final diag */
 int      dm; /* set if dm= maxm() */
 int      endgaps; /* set if penalizing end gaps */
 int      gapx, gapy; /* total gaps in seqs */
 int      lenx, leny; /* seq lens */
 int      ngaps, ngapy; /* total size of gaps */
 int      smax; /* max score: nw() */
 int      *abm; /* bitmap for matching */
 offset; /* current offset in jmp file */
 struct diag *ps; /* holds diagmals */
 struct path *p[2]; /* holds path for seqs */
 char    *alloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
 *getseq(), *g_calloc();

```

Table 1 (cont.)

```

/* Needleman-Wunoch alignment program
 *
 * usage: progs file1 file2
 * where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 * The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
 * Any lines beginning with ';' or '>' are ignored
 * Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 * A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 * Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a jmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "dseq.h"
static jmpval[26] = {
    1, 14, 2, 11, 0, 0, 4, 11, 0, 0, 12, 0, 0, 15, 0, 0, 0, 5, 6, 8, 8, 7, 9, 0, 10, 0
};
static jmpval[26] = {
    1, 2[(1 < CD['A'])]((1 < CD['A']), 4, 8, 16, 32, 64,
    [28, 256, 0xFFFFFFF, 1 < 10, 1 < < 11, 1 < < 12, 1 < < 13, 1 < < 14,
    1 < < 15, 1 < < 16, 1 < < 17, 1 < < 18, 1 < < 19, 1 < < 20, 1 < < 21, 1 < < 22,
    1 < < 23, 1 < < 24, 1 < < 25[(1 < < CE['A'])]((1 < < CE['A']),
    1 < < 26, 1 < < 27];
};

main(ac, av)
    int ac;
    char *av();
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '>' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    names[0] = av[1];
    names[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(names[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(names[1], &len1);
    xlen = (len0) > len1 ? len1 : _phval;
    endgap = 0; /* to penalize endgaps */
    ofile = "align.out"; /* output file */
    mxc(); /* fill in the matrix, get the possible jumps */
    readjmps(); /* get the actual jumps */
    print(); /* print stats, alignment */
    cleanup(); /* unlink any tmp files */
}

```

Page 1 of nw.c

WO 01/18210

PCT/US00/06471

Table 1 (cont'd)

```

/* do the alignment, return best score: main0
 * dpa: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw0
{
    char      *px, *py;      /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely;  /* keep track of dely */
    int       *ndelx, delx;  /* keep track of delx */
    int       *tmp;          /* for swapping row0, row1 */
    int       ms;            /* score for each type */
    int       ins0, ins1;    /* insertion penalties */
    register  id;            /* diagonal index */
    register  ij;            /* jmp index */
    register  *col0, *col1;  /* score for curr, last row */
    register  xx, yy;        /* index into seqs */
    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diag", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    delx = (int *)g_calloc("to get delx", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dpa) DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dpa) DINS1 : PINS1;
    smax = -10000;
    if (endgap) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] + ins1;
            dely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;      /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;
    /* fill in match matrix */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col */
        /* if (endgap) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            delx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ins0 = 0;
        }
    }
}

```

Page 2 of nw.c

WO 01/18210

PCT/US00/06471

```

Table 1 (cont'd)
...-nvr

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= lcol; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dns)
        mis += (xbm[px-'A']&xbm[py-'A'])" DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day*px-'A' || py-'A';

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongoing del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= del[yy]) {
            del[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            del[yy] = ins1;
            ndely[yy] += 1;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= del[yy]) {
            del[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy] += 1;
    }

    /* update penalty for del in y seq;
     * favor new del over ongoing del
     */
    if (endgaps || ndelx[yy] < MAXGAP) {
        if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else {
            delx = ins1;
            ndelx += 1;
        }
    } else {
        if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else
            ndelx += 1;
    }

    /* pick the maximum score; we're favoring
     * mis over any del and delx over delay
     */
}

```

Page 3 of nw.c

38

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

```

Table 1 (cont'd)
..nw

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely(yy))
    col1(yy) = mis;
else if (delsx >= dely(yy)) {
    col1(yy) = delx;
    ij = dx[id].jmp;
    if (dx[id].p.n[0] && (idna || (delsx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].p.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].jmp += t;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmpst(id);
            ij = dx[id].jmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = -delsx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
    }
    else {
        col1(yy) = dely(yy);
        ij = dx[id].jmp;
        if (dx[id].p.n[0] && (idna || (dely(yy) >= MAXJMP
        && xx > dx[id].p.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
            dx[id].jmp += t;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejmpst(id);
                ij = dx[id].jmp = 0;
                dx[id].offset = offset;
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
            }
            dx[id].jp.n[ij] = -dely(yy);
            dx[id].jp.x[ij] = xx;
            dx[id].score = dely(yy);
        }
        if (xx == len0 && yy < len1) {
            /* last col */
            if (endgaps)
                col1(yy) = ins0+ins1*(len1-yy);
            if (col1(yy) > smax) {
                smax = col1(yy);
                dmax = id;
            }
        }
        if (endgaps && xx < len1)
            col1(yy-1) = ins0+ins1*(len0-xx);
        if (col1(yy-1) > smax) {
            smax = col1(yy-1);
            dmax = id;
        }
        tmp = col0, col0 = col1, col1 = tmp;
    }
    (void) free((char *)ndely);
    (void) free((char *)dely);
    (void) free((char *)col0);
    (void) free((char *)col1);
}

```

Page 4 of nw.c

Table 1 (cont'd)

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 *   * print() -- trace back best path, count matches: print()
 *   * pr_align() -- print alignment of described in array p[1]: pr_align()
 *   * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 *   * numline() -- put out a number line: dumpblock()
 *   * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 *   * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 *   * stripname() -- strip any path and prefix from a sequence
 */

#include "nw.h"

#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* maximum output line */
#define P_SPC 3 /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

print()
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s in %s", prog, ofile);
        cleanup();
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len0 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmatch(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

WO 01/18210

PCT/US00/06471

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(int ix, int iy, firstgap, lastgap)
{
    int     i0, i1, siz0, siz1;
    char    outx[32];
    double  pct;
    register int n0, n1;
    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while (*p0 && *p1) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0] + 1;
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1] + 1;
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* put homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        ix = (len0 < len1) ? len0 : len1;
    else
        ix = (ix < iy) ? ix : iy;
    pct = 100.0*(double)nm/(double)ix;
    fprintf(ix, "< %d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
           nm, (nm == 1) ? "es", ix, pct);
}

```

Page 2 of nwprint.c

41

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Table 1 (cont.)

```

fprintf(fx, "< gaps in first sequence: %d", gapx);           ... general
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, "(%d %s%*s)",                                ... general
        ngapx, (dns)? "base" : "residue", (ngapx == 1)? ":" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);

    fprintf(fx, "< gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, "(%d %s%*s)",                                ... general
            ngapy, (dns)? "base" : "residue", (ngapy == 1)? ":" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dns) {
        fprintf(fx, "\n< score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINSO, DINSI);
    } else {
        fprintf(fx, "\n< score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
    }
    if (endgaps) {
        fprintf(fx, "\n< endgaps penalized. left endgap: %d %s%*s, right endgap: %d %s%*s\n",
            firstgap, (dns)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? ":" : "s",
            lastgap, (dns)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? ":" : "s");
    } else {
        fprintf(fx, "\n< endgaps not penalized\n");
    }
}

static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;         /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];        /* jmp index for a path */
static      nc[2];        /* number at start of current line */
static      nl[2];        /* current elem number -- for gapping */
static      sz[2];        /* */
static char *ps[2];      /* ptr to current element */
static char *po[2];      /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by star() */
}

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()          pr_align
{
    int      nn;          /* char count */
    int      more;
    register ij;          ij;

    for (ij = 0, lmax = 0; ij < 2; ij++) {
        nn = strlen(name[ij]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[ij] = 1;
        nl[ij] = 1;
        sz[ij] = ij[1] = 0;
        ps[ij] = seps[ij];
        po[ij] = out[ij];
    }
}

```

Page 3 of nwprint.c

WO 01/18210

PCT/US00/06471

```

Table 1 (cont)

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;
        more++;
        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i] = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i] = ' ';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;
            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (n[i] == pp[i].x[i][i]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[i][i]++;
                while (n[i] == pp[i].x[i][i])
                    siz[i] += pp[i].x[i][i]++;
                n[i]++;
            }
            if (1 + nn == olen || more && nm) {
                dumpblock();
                for (i = 0; i < 2; i++)
                    po[i] = out[i];
                nn = 0;
            }
        }
    }
    /*
     * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
     */
static
dumpblock() dumpblock
{
    register i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i] = '0';
}

```

Page 4 of nwprint.c

Table 1 (cont'd)

```

(void) puts("n", fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ') || *(pol[i]) != ' ') {
        if (i == 0)
            num0();
        if (i == 0 && *out[1])
            start();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, start);
        if (i == 1)
            num1(i);
    }
}
/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
outms(ix)
int      ix;      /* index in out[] holding seq line */
{
    char      nline[P_LINE];
    register int j;
    register char  *pn, *px, *py;
    for (pn = nline, j = 0; j < max+P_SPC; j++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix], *py = pn, pn++; i < nc[i+1]) {
        if (*py == ' ' || *py == ' ')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j > 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = ' ';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline, *pn; pn++) {
        (void) puts(*pn, fx);
        (void) puts("\n", fx);
    }
}
/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
int      ix;
{
    putline(ix);
}

```

Page 5 of nwprint.c

Table 1 (cont')

```

int          i;
register char  *px;

for (px = namefix[i], i = 0; *px && *px != ' '; px++, i++)
  (void) putc(*px, fs);
for (i < lmax+P_SPC; i++)
  (void) putc(' ', fs);
  (void) putc('\n', fs);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static stars() stars
{
  int          i;
  register char  *p0, *p1, cx, *px;

  if (*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(pe[0]) == '?') ||
      (*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(pe[1]) == '?'))
    return;
  px = star;
  for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
    *px++ = '*';

  for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
    if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
      if (shrn[*p0-'A'] & xbn[*p1-'A']) {
        cx = '^';
        dm++;
      }
      else if (tdna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
        cx = '^';
      else
        cx = ' ';
    }
    else
      cx = ' ';
    *px++ = cx;
  }
  *px++ = '\n';
  *px = '\0';
}

```

Page 6 of nwprint.c

Table 1 (cont')

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pr)
    char    *pn;      /* file name (may be path) */
{
    register char    *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}
```

Table 1 (cont*)

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getsq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checking
 * readjmps() -- get the good jmps, from tmp file if necessary
 * writejmps() -- write a filled array of jmps to a tmp file; nwf()
 */
#include "nv.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/phoningXXXXXX";           /* tmp file for jmps */
FILE *fpj;

int cleanup();                                /* cleanup tmp file */

long lseek();                                /* remove any tmp file if we blow */

cleanup() {
    int i;
{
    if (fpj)
        (void) unlink(jname);
    exit(0);
}

/* read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with '<', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len)                         cleanup
{
    char *file, /*file name*/ len; /*seq len*/
{
    char line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int nage, len;
    FILE *fp;
    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    len = nage = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == '<' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                len++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(len+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, len+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '0';
}

```

Page 1 of nwsbr.c

WO 01/18210

PCT/US00/06471

Table I (cont.)

```

...getseq

pseq = pseq + 4;
*len = *len;
rewind(fp);

while ((*getseq, len, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if ((upper(*px)))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            nudge++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = nudge > (*len/3);
    return(pseq-4);
}

char *
g_malloc(msg, nx, sz)                                g_malloc
{
    char *msg;                                     /* program, calling routine */
    int nx, sz;                                     /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();                           /*px, *calloc);

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_malloc failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/* get final jumps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjumps()                                         readjumps
{
    int fd = -1;
    int siz, id, i;
    register i, j, xx;

    if (f) {
        (void) fclose(f);
        if ((fd = open(name, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, name);
            cleanup();
        }
    }
    for (i = id = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].jmp; j >= 0 && dx[dmax].jp[j] >= xx; j--)
                ;
    }
}

```

Page 2 of nwsuhr.c

Table 1 (cont.)

...readjmps

```

if(j < 0 && dx[dmax].offset && f1) {
    (void) flock(fd, dx[dmax].offset, 0);
    (void) read(fd, (char *) &dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
    (void) read(fd, (char *) &dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
    dx[dmax].jmp = MAXJMP-1;
}
else
    break;
}
if(j >= JMPIS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup();
}
if(j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if(siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gaps++;
        ngaps += siz;
    }
    /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
    siz = (siz < MAXGAP || endgaps) ? -siz : MAXGAP;
    i1 += siz;
}
else if(siz > 0) { /* gap in first seq */
    pp[0].n[0] = siz;
    pp[0].x[0] = xx;
    gaps++;
    ngaps += siz;
}
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
siz = (siz < MAXGAP || endgaps) ? siz : MAXGAP;
i0 += siz;
}
else
    break;
}
/* reverse the order of jmps
*/
for(j = 0, i0 -= 1; j < i0; j++) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for(j = 0, i1 -= 1; j < i1; j++) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if(fd > 0)
    (void) close(fd);
if(f1) {
    (void) unlink(jname);
    f1 = 0;
    offset = 0;
}
}

```

Page 3 of nwsub.c

WO 01/18210

PCT/US00/06471

Table 1 (cont'')

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)                                writejmps
    int      ix;
{
    char   *mktemp();

    if(!f) {
        if(mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp(%s)\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if((f = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, f);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, f);
}

```

WO 01/18210

PCT/US00/06471

Table 2

PRO	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	{Length = 15 amino acids}
Comparison Protein	XXXXXXYYYYYYYY	{Length = 12 amino acids}

% amino acid sequence identity =

(the number of identically matching amino acid residues between the two polypeptide sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of amino acid residues of the PRO polypeptide) =

5 divided by 15 = 33.3%

WO 01/18210

PCT/US00/06471

Table 3

PRO	XXXXXXXXXX	(Length = 10 amino acids)
Comparison Protein	XXXXXYYYYYYZZYYZ	(Length = 15 amino acids)

% amino acid sequence identity =

(the number of identically matching amino acid residues between the two polypeptide sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of amino acid residues of the PRO polypeptide) =

5 divided by 10 = 50%

WO 01/18210

PCT/US00/06471

Table 4

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(Length = 14 nucleotides)
Comparison DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(Length = 16 nucleotides)

% nucleic acid sequence identity =

(the number of identically matching nucleotides between the two nucleic acid sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of nucleotides of the PRO-DNA nucleic acid sequence) =

6 divided by 14 = 42.9%

WO 01/18210

PCT/US00/06471

Table 5

PRO-DNA	NNNNNNNNNNNN	(Length = 12 nucleotides)
Comparison DNA	NNNNLLVV	(Length = 9 nucleotides)

% nucleic acid sequence identity =

(the number of identically matching nucleotides between the two nucleic acid sequences as determined by ALIGN-2) divided by (the total number of nucleotides of the PRO-DNA nucleic acid sequence) =

4 divided by 12 = 33.3%

WO 01/18210

PCT/US00/06471

II. Compositions and Methods of the InventionA. Full-length FGF-19 Polypeptide

The present invention provides newly identified and isolated nucleotide sequences encoding polypeptides referred to in the present application as FGF-19 (or also UNQ334). In particular, cDNA encoding a FGF-19 polypeptide has been identified and isolated, as 5 disclosed in further detail in the Examples below. It is noted that proteins produced in separate expression rounds may be given different PRO numbers but the UNQ number is unique for any given DNA and the encoded protein, and will not be changed. However, for sake of simplicity, in the present specification the protein encoded by DNA49435-1219 as well as all further native homologues and variants included in the foregoing 10 definition of FGF-19 (also sometimes referred to as PRO533), will be referred to as "FGF-19", regardless of their origin or mode of preparation.

As disclosed in the Examples below, a cDNA clone designated herein as DNA49435-1219 has been deposited with the ATCC. The actual nucleotide sequence of the clone can readily be determined by the skilled artisan by sequencing of the deposited 15 clone using routine methods in the art. The predicted amino acid sequence can be determined from the nucleotide sequence using routine skill. For the FGF-19 polypeptide and encoding nucleic acid described herein, Applicants have identified what is believed to be the reading frame best identifiable with the sequence information available at the time.

20 Using the ALIGN-2 sequence alignment computer program referenced above, it has been found that the full-length native sequence FGF-19 (shown in Figure 2 and SEQ ID NO:2) has certain amino acid sequence identity with AF007268_1. Accordingly, it is presently believed that the FGF-19 polypeptide disclosed in the present application is a newly identified member of the fibroblast growth factor protein family and may possess 25 one or more biological and/or immunological activities or properties typical of that protein family.

B. FGF-19 Variants

In addition to the full-length native sequence FGF-19 polypeptides described 30 herein, it is contemplated that FGF-19 variants can be prepared. FGF-19 variants can be

WO 01/18210

PCT/US00/06471

prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the FGF-19 DNA, and/or by synthesis of the desired FGF-19 polypeptide. Those skilled in the art will appreciate that amino acid changes may alter post-translational processes of the FGF-19, such as changing the number or position of glycosylation sites or altering the membrane anchoring characteristics.

5 Variations in the native full-length sequence FGF-19 or in various domains of the FGF-19 described herein, can be made, for example, using any of the techniques and guidelines for conservative and non-conservative mutations set forth, for instance, in U.S. Patent No. 5,364,934. Variations may be a substitution, deletion or insertion of one or more codons encoding the FGF-19 that results in a change in the amino acid sequence of 10 the FGF-19 as compared with the native sequence FGF-19. Optionally the variation is by substitution of at least one amino acid with any other amino acid in one or more of the domains of the FGF-19. Guidance in determining which amino acid residue may be inserted, substituted or deleted without adversely affecting the desired activity may be found by comparing the sequence of the FGF-19 with that of homologous known protein 15 molecules and minimizing the number of amino acid sequence changes made in regions of high homology. Amino acid substitutions can be the result of replacing one amino acid with another amino acid having similar structural and/or chemical properties, such as the replacement of a leucine with a serine, i.e., conservative amino acid replacements. Insertions or deletions may optionally be in the range of about 1 to 5 amino acids. The 20 variation allowed may be determined by systematically making insertions, deletions or substitutions of amino acids in the sequence and testing the resulting variants for activity exhibited by the full-length or mature native sequence.

FGF-19 polypeptide fragments are provided herein. Such fragments may be truncated at the N-terminus or C-terminus, or may lack internal residues, for example. 25 when compared with a full length native protein. Certain fragments lack amino acid residues that are not essential for a desired biological activity of the FGF-19 polypeptide.

FGF-19 fragments may be prepared by any of a number of conventional techniques. Desired peptide fragments may be chemically synthesized. An alternative approach involves generating FGF-19 fragments by enzymatic digestion, e.g., by treating 30 the protein with an enzyme known to cleave proteins at sites defined by particular amino

WO 01/18210

PCT/US00/06471

acid residues, or by digesting the DNA with suitable restriction enzymes and isolating the desired fragment. Yet another suitable technique involves isolating and amplifying a DNA fragment encoding a desired polypeptide fragment, by polymerase chain reaction (PCR). Oligonucleotides that define the desired termini of the DNA fragment are employed at the 5' and 3' primers in the PCR. Preferably, FGF-19 polypeptide fragments 5 share at least one biological and/or immunological activity with the native FGF-19 polypeptide shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2).

In particular embodiments, conservative substitutions of interest are shown in Table 6 under the heading of preferred substitutions. If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated exemplary 10 substitutions in Table 6, or as further described below in reference to amino acid classes, are introduced and the products screened.

Table 6

	Original <u>Residue</u>	Exemplary <u>Substitutions</u>	Preferred <u>Substitutions</u>
15	Ala (A)	val; leu; ile	val
	Arg (R)	lys; gln; asn	lys
	Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
	Asp (D)	glu	glu
20	Cys (C)	ser	ser
	Gln (Q)	asn	asn
	Glu (E)	asp	asp
	Gly (G)	pro; ala	ala
	His (H)	asn; glu; lys; arg	arg
25	Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
	Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
	Lys (K)	arg; gln; asn	arg
30	Met (M)	leu; phe; ile	leu

WO 01/18210		PCT/US00/06471
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
5 Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu

Substantial modifications in function or immunological identity of the FGF-19 polypeptide are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties:

- (1) hydrophobic: norleucine, met, ala, val, leu, ile;
- (2) neutral hydrophilic: cys, ser, thr;
- (3) acidic: asp, glu;
- 20 (4) basic: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residues that influence chain orientation: gly, pro; and
- (6) aromatic: trp, tyr, phe.

Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class. Such substituted residues also may be introduced into the conservative substitution sites or, more preferably, into the remaining (non-conserved) sites.

The variations can be made using methods known in the art such as oligonucleotide-mediated (site-directed) mutagenesis, site scanning, and PCR mutagenesis. Site-directed mutagenesis [Carter et al., *Nucl. Acids Res.*, **13**:4331 (1986);

WO 01/18210

PCT/US00/06471

Zoller et al., *Nucl. Acids Res.*, **10**:6487 (1987)], cassette mutagenesis [Wells et al., *Gene*, **34**:315 (1985)], restriction selection mutagenesis [Wells et al., *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A*, **317**:415 (1986)] or other known techniques can be performed on the cloned DNA to produce the FGF-19 variant DNA.

Scanning amino acid analysis can also be employed to identify one or more amino acids along a contiguous sequence. Among the preferred scanning amino acids are relatively small, neutral amino acids. Such amino acids include alanine, glycine, serine, and cysteine. Alanine is typically a preferred scanning amino acid among this group because it eliminates the side-chain beyond the beta-carbon and is less likely to alter the main-chain conformation of the variant [Cunningham and Wells, *Science*, **244**: 1081-1085 (1989)]. Alanine is also typically preferred because it is the most common amino acid. Further, it is frequently found in both buried and exposed positions [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, **150**:1 (1976)]. If alanine substitution does not yield adequate amounts of variant, an isoteric amino acid can be used.

15

C. Modifications of FGF-19

Covalent modifications of FGF-19 are included within the scope of this invention. One type of covalent modification includes reacting targeted amino acid residues of a FGF-19 polypeptide with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected side chains or the N- or C-terminal residues of the FGF-19. Derivatization with bifunctional agents is useful, for instance, for crosslinking FGF-19 to a water-insoluble support matrix or surface for use in the method for purifying anti-FGF-19 antibodies, and vice-versa. Commonly used crosslinking agents include, e.g., 1,1-bis(diazoacetyl)-2-phenylethane, glutaraldehyde, N-hydroxysuccinimide esters, for example, esters with 4-azidosalicylic acid, homobifunctional imidoesters, including disuccinimidyl esters such as 3,3'-dithiobis(succinimidylpropionate), bifunctional maleimides such as bis-N-maleimido-1,8-octane and agents such as methyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propioimidate.

Other modifications include deamidation of glutaminyl and asparaginyl residues to the corresponding glutamyl and aspartyl residues, respectively, hydroxylation of proline and lysine, phosphorylation of hydroxyl groups of seryl or threonyl residues,

WO 01/18210

PCT/US00/06471

methylation of the *N*-amino groups of lysine, arginine, and histidine side chains [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], acetylation of the N-terminal amine, and amidation of any C-terminal carboxyl group.

Another type of covalent modification of the FGF-19 polypeptide included within the scope of this invention comprises altering the native glycosylation pattern of the polypeptide. "Altering the native glycosylation pattern" is intended for purposes herein to mean deleting one or more carbohydrate moieties found in native sequence FGF-19 (either by removing the underlying glycosylation site or by deleting the glycosylation by chemical and/or enzymatic means), and/or adding one or more glycosylation sites that are not present in the native sequence FGF-19. In addition, the phrase includes qualitative changes in the glycosylation of the native proteins, involving a change in the nature and proportions of the various carbohydrate moieties present.

Addition of glycosylation sites to the FGF-19 polypeptide may be accomplished by altering the amino acid sequence. The alteration may be made, for example, by the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the native sequence FGF-19 (for O-linked glycosylation sites). The FGF-19 amino acid sequence may optionally be altered through changes at the DNA level, particularly by mutating the DNA encoding the FGF-19 polypeptide at preselected bases such that codons are generated that will translate into the desired amino acids.

Another means of increasing the number of carbohydrate moieties on the FGF-19 polypeptide is by chemical or enzymatic coupling of glycosides to the polypeptide. Such methods are described in the art, e.g., in WO 87/05330 published 11 September 1987, and in Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981).

Removal of carbohydrate moieties present on the FGF-19 polypeptide may be accomplished chemically or enzymatically or by mutational substitution of codons encoding for amino acid residues that serve as targets for glycosylation. Chemical deglycosylation techniques are known in the art and described, for instance, by Hakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) and by Edge et al., Anal. Biochem., 118:131 (1981). Enzymatic cleavage of carbohydrate moieties on polypeptides

WO 01/18210

PCT/US00/06471

can be achieved by the use of a variety of endo- and exo-glycosidases as described by Thotakura et al., *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

Another type of covalent modification of FGF-19 comprises linking the FGF-19 polypeptide to one of a variety of nonproteinaceous polymers, e.g., polyethylene glycol (PEG), polypropylene glycol, or polyoxyalkylenes, in the manner set forth in U.S. Patent 5 Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 or 4,179,337.

The FGF-19 of the present invention may also be modified in a way to form a chimeric molecule comprising FGF-19 fused to another, heterologous polypeptide or amino acid sequence.

In one embodiment, such a chimeric molecule comprises a fusion of the FGF-19 with a tag polypeptide which provides an epitope to which an anti-tag antibody can selectively bind. The epitope tag is generally placed at the amino- or carboxyl- terminus of the FGF-19. The presence of such epitope-tagged forms of the FGF-19 can be detected using an antibody against the tag polypeptide. Also, provision of the epitope tag enables the FGF-19 to be readily purified by affinity purification using an anti-tag antibody or another type of affinity matrix that binds to the epitope tag. Various tag polypeptides and their respective antibodies are well known in the art. Examples include poly-histidine (poly-his) or poly-histidine-glycine (poly-his-gly) tags; the flu HA tag polypeptide and its antibody 12CA5 [Field et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]; the c-myc tag and the 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 and 9E10 antibodies thereto [Evan et al., *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]; and the Herpes Simplex virus glycoprotein D (gD) tag and its antibody [Paborsky et al., *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)]. Other tag polypeptides include the Flag-peptide [Hopp et al., *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)]; the KT3 epitope peptide [Martin et al., *Science*, 255:192-194 (1992)]; an α -tubulin epitope peptide [Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]; and the T7 gene 10 protein peptide tag [Utz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)].

In an alternative embodiment, the chimeric molecule may comprise a fusion of the FGF-19 with an immunoglobulin or a particular region of an immunoglobulin. For a bivalent form of the chimeric molecule (also referred to as an "immunoadhesin"), such 30 a fusion could be to the Fc region of an IgG molecule. The Ig fusions preferably include

WO 01/18210

PCT/US00/06471

the substitution of a soluble (transmembrane domain deleted or inactivated) form of a FGF-19 polypeptide in place of at least one variable region within an Ig molecule. In a particularly preferred embodiment, the immunoglobulin fusion includes the hinge, CH2 and CH3, or the hinge, CH1, CH2 and CH3 regions of an IgG1 molecule. For the production of immunoglobulin fusions see also US Patent No. 5,428,130 issued June 27, 5 1995.

D. Preparation of FGF-19

The description below relates primarily to production of FGF-19 by culturing cells transformed or transfected with a vector containing FGF-19 nucleic acid. It is, of course, 10 contemplated that alternative methods, which are well known in the art, may be employed to prepare FGF-19. For instance, the FGF-19 sequence, or portions thereof, may be produced by direct peptide synthesis using solid-phase techniques [see, e.g., Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)]. *In vitro* protein synthesis may be 15 performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis may be accomplished, for instance, using an Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) using manufacturer's instructions. Various portions of the FGF-19 may be chemically synthesized separately and combined using chemical or enzymatic methods to produce the full-length FGF-19.

20

1. Isolation of DNA Encoding FGF-19

DNA encoding FGF-19 may be obtained from a cDNA library prepared from tissue believed to possess the FGF-19 mRNA and to express it at a detectable level. Accordingly, human FGF-19 DNA can be conveniently obtained from a cDNA library 25 prepared from human tissue, such as described in the Examples. The FGF-19-encoding gene may also be obtained from a genomic library or by known synthetic procedures (e.g., automated nucleic acid synthesis).

Libraries can be screened with probes (such as antibodies to the FGF-19 or 30 oligonucleotides of at least about 20-80 bases) designed to identify the gene of interest or the protein encoded by it. Screening the cDNA or genomic library with the selected

WO 01/18210

PCT/US00/06471

probe may be conducted using standard procedures, such as described in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). An alternative means to isolate the gene encoding FGF-19 is to use PCR methodology [Sambrook et al., supra; Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

5 The Examples below describe techniques for screening a cDNA library. The oligonucleotide sequences selected as probes should be of sufficient length and sufficiently unambiguous that false positives are minimized. The oligonucleotide is preferably labeled such that it can be detected upon hybridization to DNA in the library being screened. Methods of labeling are well known in the art, and include the use of
10 radiolabels like ^{32}P -labeled ATP, biotinylation or enzyme labeling. Hybridization conditions, including moderate stringency and high stringency, are provided in Sambrook et al., supra.

Sequences identified in such library screening methods can be compared and aligned to other known sequences deposited and available in public databases such as
15 GenBank or other private sequence databases. Sequence identity (at either the amino acid or nucleotide level) within defined regions of the molecule or across the full-length sequence can be determined using methods known in the art and as described herein.

Nucleic acid having protein coding sequence may be obtained by screening selected cDNA or genomic libraries using the deduced amino acid sequence disclosed
20 herein for the first time, and, if necessary, using conventional primer extension procedures as described in Sambrook et al., supra, to detect precursors and processing intermediates of mRNA that may have been reverse-transcribed into cDNA.

2. Selection and Transformation of Host Cells

25 Host cells are transfected or transformed with expression or cloning vectors described herein for FGF-19 production and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing promoters, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences. The culture conditions, such as media, temperature, pH and the like, can be selected by the skilled artisan without undue experimentation. In general, principles, protocols, and practical techniques for
30

WO 01/18210

PCT/US00/06471

maximizing the productivity of cell cultures can be found in Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) and Sambrook et al., supra.

Methods of eukaryotic cell transfection and prokaryotic cell transformation are known to the ordinarily skilled artisan, for example, CaCl_2 , CaPO_4 , liposome-mediated and electroporation. Depending on the host cell used, transformation is performed using standard techniques appropriate to such cells. The calcium treatment employing calcium chloride, as described in Sambrook et al., supra, or electroporation is generally used for prokaryotes. Infection with *Agrobacterium tumefaciens* is used for transformation of certain plant cells, as described by Shaw et al., *Gene*, 23:315 (1983) and WO 89/05859 published 29 June 1989. For mammalian cells without such cell walls, the calcium phosphate precipitation method of Graham and van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978) can be employed. General aspects of mammalian cell host system transfections have been described in U.S. Patent No. 4,399,216. Transformations into yeast are typically carried out according to the method of Van Solingen et al., *J. Bact.*, 130:946 (1977) and Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). However, other methods for introducing DNA into cells, such as by nuclear microinjection, electroporation, bacterial protoplast fusion with intact cells, or polycations, e.g., polybrene, polyornithine, may also be used. For various techniques for transforming mammalian cells, see Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) and Mansour et al., *Nature*, 336:348-352 (1988).

Suitable host cells for cloning or expressing the DNA in the vectors herein include prokaryote, yeast, or higher eukaryote cells. Suitable prokaryotes include but are not limited to eubacteria, such as Gram-negative or Gram-positive organisms, for example, Enterobacteriaceae such as *E. coli*. Various *E. coli* strains are publicly available, such as *E. coli* K12 strain MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); *E. coli* strain W3110 (ATCC 27,325) and K5 772 (ATCC 53,635). Other suitable prokaryotic host cells include Enterobacteriaceae such as *Escherichia*, e.g., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, e.g., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, e.g., *Serratia marcescens*, and *Shigella*, as well as *Bacilli* such as *B. subtilis* and *B. licheniformis* (e.g., *B. licheniformis* 41P disclosed in DD 266,710 published 12 April 1989), *Pseudomonas*

WO 01/18210

PCT/US00/06471

such as *P. aeruginosa*, and *Streptomyces*. These examples are illustrative rather than limiting. Strain W3110 is one particularly preferred host or parent host because it is a common host strain for recombinant DNA product fermentations. Preferably, the host cell secretes minimal amounts of proteolytic enzymes. For example, strain W3110 may be modified to effect a genetic mutation in the genes encoding proteins endogenous to the host, with examples of such hosts including *E. coli* W3110 strain 1A2, which has the complete genotype *tonA*; *E. coli* W3110 strain 9E4, which has the complete genotype *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 strain 27C7 (ATCC 55,244), which has the complete genotype *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kanR*; *E. coli* W3110 strain 37D6, which has the complete genotype *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kanR*; *E. coli* W3110 strain 40B4, which is strain 37D6 with a non-kanamycin resistant *degP* deletion mutation; and an *E. coli* strain having mutant periplasmic protease disclosed in U.S. Patent No. 4,946,783 issued 7 August 1990. Alternatively, *in vitro* methods of cloning, e.g., PCR or other nucleic acid polymerase reactions, are suitable.

In addition to prokaryotes, eukaryotic microbes such as filamentous fungi or yeasts are suitable cloning or expression hosts for PFG-19-encoding vectors. *Saccharomyces cerevisiae* is a commonly used lower eukaryotic host microorganism. Others include *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; EP 139,383 published 2 May 1985); *Kluyveromyces* hosts (U.S. Patent No. 4,943,529; Fleer et al., *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)) such as, e.g., *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., *J. Bacteriol.*, 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickeramii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilorum* (ATCC 36,906; Van den Berg et al., *Bio/Technology*, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans*, and *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070; Sreekrishna et al., *J. Basic Microbiol.*, 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Case et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* such as *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394,538 published 31 October 1990); and filamentous fungi such as, e.g., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 published 10 January 1991), and *Aspergillus* hosts such as *A. nidulans* (Ballance et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289 [1983]; Tilburn et al., *Gene*, 26:205-221 [1983]; Yelton et al., *Prog. Natl. Acad. Sci.*

WO 01/18210

PCT/US00/06471

USA, 81: 1470-1474 [1984]) and *A. niger* (Kelly and Hynes, *EMBO J.*, 4:475-479 [1985]). Methylotrophic yeasts are suitable herein and include, but are not limited to, yeast capable of growth on methanol selected from the genera consisting of *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, and *Rhodotorula*. A list of specific species that are exemplary of this class of yeasts may be found in C. Anthony,

5 The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982).

Suitable host cells for the expression of glycosylated FGF-19 are derived from multicellular organisms. Examples of invertebrate cells include insect cells such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* SF9, as well as plant cells. Examples of useful mammalian host cell lines include Chinese hamster ovary (CHO) and COS cells. More specific 10 examples include monkey kidney CV1 line transformed by SV40 (COS-7, ATCC CRL-1651); human embryonic kidney line (293 or 293 cells subcloned for growth in suspension culture, Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); Chinese hamster ovary cells-DHFR (C10, Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); mouse sertoli cells (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); human lung cells 15 (WI38, ATCC CCL 75); human liver cells (Hep G2, HB 8065); and mouse mammary tumor (MMT 060562, ATCC CCL51). The selection of the appropriate host cell is deemed to be within the skill in the art.

3. Selection and Use of a Replicable Vector

20 The nucleic acid (e.g., cDNA or genomic DNA) encoding FGF-19 may be inserted into a replicable vector for cloning (amplification of the DNA) or for expression. Various vectors are publicly available. The vector may, for example, be in the form of a plasmid, cosmid, viral particle, or phage. The appropriate nucleic acid sequence may be inserted 25 into the vector by a variety of procedures. In general, DNA is inserted into an appropriate restriction endonuclease site(s) using techniques known in the art. Vector components generally include, but are not limited to, one or more of a signal sequence, an origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter, and a transcription termination sequence. Construction of suitable vectors containing one or 30 more of these components employs standard ligation techniques which are known to the skilled artisan.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

The FGF-19 may be produced recombinantly not only directly, but also as a fusion polypeptide with a heterologous polypeptide, which may be a signal sequence or other polypeptide having a specific cleavage site at the N-terminus of the mature protein or polypeptide. In general, the signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of the FGF-19-encoding DNA that is inserted into the vector. The signal sequence may be a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, lpp, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion the signal sequence may be, e.g., the yeast invertase leader, alpha factor leader (including *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* α -factor leaders, the latter described in U.S. Patent No. 5,010,182), or acid phosphatase leader, the *C. albicans* glucoamylase leader (EP 362,179 published 4 April 1990), or the signal described in WO 90/13646 published 15 November 1990. In mammalian cell expression, mammalian signal sequences may be used to direct secretion of the protein, such as signal sequences from secreted polypeptides of the same or related species, as well as viral secretory leaders.

Both expression and cloning vectors contain a nucleic acid sequence that enables the vector to replicate in one or more selected host cells. Such sequences are well known for a variety of bacteria, yeast, and viruses. The origin of replication from the plasmid pBR322 is suitable for most Gram-negative bacteria, the 2 μ plasmid origin is suitable for yeast, and various viral origins (SV40, polyoma, adenovirus, VSV or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells.

Expression and cloning vectors will typically contain a selection gene, also termed a selectable marker. Typical selection genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, e.g., ampicillin, neomycin, methotrexate, or tetracycline, (b) complement auxotrophic deficiencies, or (c) supply critical nutrients not available from complex media, e.g., the gene encoding D-alanine racemase for *Bacilli*.

An example of suitable selectable markers for mammalian cells are those that enable the identification of cells competent to take up the FGF-19-encoding nucleic acid, such as DHFR or thymidine kinase. An appropriate host cell when wild-type DHFR is employed is the CHO cell line deficient in DHFR activity, prepared and propagated as described by Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980). A suitable selection gene for use in yeast is the *trp1* gene present in the yeast plasmid YRp7

WO 01/18210

PCT/US00/06471

[Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)]. The *trp1* gene provides a selection marker for a mutant strain of yeast lacking the ability to grow in tryptophan, for example, ATCC No. 44076 or PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

Expression and cloning vectors usually contain a promoter operably linked to the FGF-19-encoding nucleic acid sequence to direct mRNA synthesis. Promoters recognized by a variety of potential host cells are well known. Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the β -lactamase and lactose promoter systems [Chang et al., *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel et al., *Nature*, 281:544 (1979)], alkaline phosphatase, a tryptophan (*trp*) promoter system [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 10, 36,776], and hybrid promoters such as the tac promoter [deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)]. Promoters for use in bacterial systems also will contain a Shine-Dalgarno (S.D.) sequence operably linked to the DNA encoding FGF-19.

Examples of suitable promoting sequences for use with yeast hosts include the promoters for 3-phosphoglycerate kinase [Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] or other glycolytic enzymes [Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], such as enolase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate isomerase, 3-phosphoglycerate mutase, pyruvate kinase, triosephosphate isomerase, phosphoglucone isomerase, and glucokinase.

Other yeast promoters, which are inducible promoters having the additional advantage of transcription controlled by growth conditions, are the promoter regions for alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase, degradative enzymes associated with nitrogen metabolism, metallothionein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization. Suitable vectors and promoters for use in yeast expression are further described in EP 73,657.

FGF-19 transcription from vectors in mammalian host cells is controlled, for example, by promoters obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus (UK 2,211,504 published 5 July 1989), adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, a retrovirus, hepatitis-B virus and Simian Virus 40 (SV40), from heterologous mammalian promoters, e.g., the

WO 01/18210

PCT/US00/06471

actin promoter or an immunoglobulin promoter, and from heat-shock promoters, provided such promoters are compatible with the host cell systems.

- Transcription of a DNA encoding the FGF-19 by higher eukaryotes may be increased by inserting an enhancer sequence into the vector. Enhancers are *cis*-acting elements of DNA, usually about from 10 to 300 bp, that act on a promoter to increase its transcription. Many enhancer sequences are now known from mammalian genes (globin, elastase, albumin, α -fetoprotein, and insulin). Typically, however, one will use an enhancer from a eukaryotic cell virus. Examples include the SV40 enhancer on the late side of the replication origin (bp 100-270), the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer on the late side of the replication origin, and adenovirus enhancers.
- 10 The enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to the FGF-19 coding sequence, but is preferably located at a site 5' from the promoter.

Expression vectors used in eukaryotic host cells (yeast, fungi, insect, plant, animal, human, or nucleated cells from other multicellular organisms) will also contain sequences necessary for the termination of transcription and for stabilizing the mRNA. Such sequences are commonly available from the 5' and, occasionally 3', untranslated regions of eukaryotic or viral DNAs or cDNAs. These regions contain nucleotide segments transcribed as polyadenylated fragments in the untranslated portion of the mRNA encoding FGF-19.

Still other methods, vectors, and host cells suitable for adaptation to the synthesis 20 of FGF-19 in recombinant vertebrate cell culture are described in Gething et al., *Nature*, 293:620-625 (1981); Manci et al., *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117,060; and EP 117,058.

4. Detecting Gene Amplification/Expression

25 Gene amplification and/or expression may be measured in a sample directly, for example, by conventional Southern blotting, Northern blotting to quantitate the transcription of mRNA [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], dot blotting (DNA analysis), or *in situ* hybridization, using an appropriately labeled probe, based on the sequences provided herein. Alternatively, antibodies may be employed that 30 can recognize specific duplexes, including DNA duplexes, RNA duplexes, and

WO 01/18210

PCT/US00/06471

DNA-RNA hybrid duplexes or DNA-protein duplexes. The antibodies in turn may be labeled and the assay may be carried out where the duplex is bound to a surface, so that upon the formation of duplex on the surface, the presence of antibody bound to the duplex can be detected.

- Gene expression, alternatively, may be measured by immunological methods, such as immunohistochemical staining of cells or tissue sections and assay of cell culture or body fluids, to quantitate directly the expression of gene product. Antibodies useful for immunohistochemical staining and/or assay of sample fluids may be either monoclonal or polyclonal, and may be prepared in any mammal. Conveniently, the antibodies may be prepared against a native sequence FGF-19 polypeptide or against a synthetic peptide based on the DNA sequences provided herein or against exogenous sequence fused to FGF-19 DNA and encoding a specific antibody epitope.

5. Purification of Polypeptide

- Forms of FGF-19 may be recovered from culture medium or from host cell lysates. If membrane-bound, it can be released from the membrane using a suitable detergent solution (e.g. Triton-X 100) or by enzymatic cleavage. Cells employed in expression of FGF-19 can be disrupted by various physical or chemical means, such as freeze-thaw cycling, sonication, mechanical disruption, or cell lysing agents.

- It may be desired to purify FGF-19 from recombinant cell proteins or polypeptides. The following procedures are exemplary of suitable purification procedures: by fractionation on an ion-exchange column; ethanol precipitation; reverse phase HPLC; chromatography on silica or on a cation-exchange resin such as DEAE; chromatofocusing; SDS-PAGE; ammonium sulfate precipitation; gel filtration using, for example, Sephadex G-75; protein A Sepharose columns to remove contaminants such as IgG; and metal chelating columns to bind epitope-tagged forms of the FGF-19. Various methods of protein purification may be employed and such methods are known in the art and described for example in Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). The purification step(s) selected will depend, for example, on the nature of the production process used and the particular FGF-19 produced.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

E. Uses for FGF-19

Nucleotide sequences (or their complement) encoding FGF-19 have various applications in the art of molecular biology, including uses as hybridization probes, in chromosome and gene mapping and in the generation of anti-sense RNA and DNA. FGF-19 nucleic acid will also be useful for the preparation of FGF-19 polypeptides by the 5 recombinant techniques described herein.

The full-length native sequence FGF-19 gene (SEQ ID NO:1), or portions thereof, may be used as hybridization probes for a cDNA library to isolate the full-length FGF-19 cDNA or to isolate still other cDNAs (for instance, those encoding naturally-occurring variants of FGF-19 or FGF-19 from other species) which have a desired sequence identity 10 to the FGF-19 sequence disclosed in Figure 1 (SEQ ID NO:1). Optionally, the length of the probes will be about 20 to about 50 bases. The hybridization probes may be derived from at least partially novel regions of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 wherein those regions may be determined without undue experimentation or from genomic sequences including promoters, enhancer elements and introns of native sequence FGF-19. By way of example, a screening method will comprise isolating the coding region of 15 the FGF-19 gene using the known DNA sequence to synthesize a selected probe of about 40 bases. Hybridization probes may be labeled by a variety of labels, including radionucleotides such as ^{32}P or ^{35}S , or enzymatic labels such as alkaline phosphatase coupled to the probe via avidin/biotin coupling systems. Labeled probes having a 20 sequence complementary to that of the FGF-19 gene of the present invention can be used to screen libraries of human cDNA, genomic DNA or mRNA to determine which members of such libraries the probe hybridizes to. Hybridization techniques are described in further detail in the Examples below.

Any EST sequences disclosed in the present application may similarly be 25 employed as probes, using the methods disclosed herein.

Other useful fragments of the FGF-19 nucleic acids include antisense or sense 30 oligonucleotides comprising a single-stranded nucleic acid sequence (either RNA or DNA) capable of binding to target FGF-19 mRNA (sense) or FGF-19 DNA (antisense) sequences. Antisense or sense oligonucleotides, according to the present invention, comprise a fragment of the coding region of FGF-19 DNA. Such a fragment generally

WO 01/18210

PCT/US00/06471

comprises at least about 14 nucleotides, preferably from about 14 to 30 nucleotides. The ability to derive an antisense or a sense oligonucleotide, based upon a cDNA sequence encoding a given protein is described in, for example, Stein and Cohen (*Cancer Res.* 48:2659, 1988) and van der Krol et al. (*BioTechniques* 6:958, 1988).

Binding of antisense or sense oligonucleotides to target nucleic acid sequences 5 results in the formation of duplexes that block transcription or translation of the target sequence by one of several means, including enhanced degradation of the duplexes, premature termination of transcription or translation, or by other means. The antisense oligonucleotides thus may be used to block expression of FGF-19 proteins. Antisense or sense oligonucleotides further comprise oligonucleotides having modified sugar-10 phosphodiester backbones (or other sugar linkages, such as those described in WO 91/06629) and wherein such sugar linkages are resistant to endogenous nucleases. Such oligonucleotides with resistant sugar linkages are stable *in vivo* (i.e., capable of resisting enzymatic degradation) but retain sequence specificity to be able to bind to target nucleotide sequences.

15 Other examples of sense or antisense oligonucleotides include those oligonucleotides which are covalently linked to organic moieties, such as those described in WO 90/10048, and other moieties that increases affinity of the oligonucleotide for a target nucleic acid sequence, such as poly-(L-lysine). Further still, intercalating agents, such as ellipticine, and alkylating agents or metal complexes may be attached to sense or 20 antisense oligonucleotides to modify binding specificities of the antisense or sense oligonucleotide for the target nucleotide sequence.

25 Antisense or sense oligonucleotides may be introduced into a cell containing the target nucleic acid sequence by any gene transfer method, including, for example, CaPO₄-mediated DNA transfection, electroporation, or by using gene transfer vectors such as Epstein-Barr virus. In a preferred procedure, an antisense or sense oligonucleotide is inserted into a suitable retroviral vector. A cell containing the target nucleic acid sequence is contacted with the recombinant retroviral vector, either *in vivo* or *ex vivo*. Suitable retroviral vectors include, but are not limited to, those derived from the murine retrovirus M-MuLV, N2 (a retrovirus derived from M-MuLV), or the double copy vectors 30 designated DCTS_A, DCTS_B and DCTS_C (see WO 90/13641).

WO 01/18210

PCT/US00/06471

Sense or antisense oligonucleotides also may be introduced into a cell containing the target nucleotide sequence by formation of a conjugate with a ligand binding molecule, as described in WO 91/04753. Suitable ligand binding molecules include, but are not limited to, cell surface receptors, growth factors, other cytokines, or other ligands that bind to cell surface receptors. Preferably, conjugation of the ligand binding molecule

5 does not substantially interfere with the ability of the ligand binding molecule to bind to its corresponding molecule or receptor, or block entry of the sense or antisense oligonucleotide or its conjugated version into the cell.

Alternatively, a sense or an antisense oligonucleotide may be introduced into a cell containing the target nucleic acid sequence by formation of an oligonucleotide-lipid complex, as described in WO 90/10448. The sense or antisense oligonucleotide-lipid complex is preferably dissociated within the cell by an endogenous lipase.

The probes may also be employed in PCR techniques to generate a pool of sequences for identification of closely related FGF-19 coding sequences.

Nucleotide sequences encoding a FGF-19 can also be used to construct hybridization probes for mapping the gene which encodes that FGF-19 and for the genetic analysis of individuals with genetic disorders. The nucleotide sequences provided herein may be mapped to a chromosome and specific regions of a chromosome using known techniques, such as *in situ* hybridization, linkage analysis against known chromosomal markers, and hybridization screening with libraries.

20 When the coding sequences for FGF-19 encode a protein which binds to another protein (example, where the FGF-19 is a receptor), the FGF-19 can be used in assays to identify the other proteins or molecules involved in the binding interaction. By such methods, inhibitors of the receptor/ligand binding interaction can be identified. Proteins involved in such binding interactions can also be used to screen for peptide or small molecule inhibitors or agonists of the binding interaction. Also, the receptor FGF-19 can be used to isolate correlative ligand(s). Screening assays can be designed to find lead compounds that mimic the biological activity of a native FGF-19 or a receptor for FGF-19. Such screening assays will include assays amenable to high-throughput screening of chemical libraries, making them particularly suitable for identifying small molecule drug

25 candidates. Small molecules contemplated include synthetic organic or inorganic

30

WO 01/18210

PCT/US00/06471

compounds. The assays can be performed in a variety of formats, including protein-protein binding assays, biochemical screening assays, immunoassays and cell based assays, which are well characterized in the art.

Nucleic acids which encode FGF-19 or its modified forms can also be used to generate either transgenic animals or "knock out" animals which, in turn, are useful in the development and screening of therapeutically useful reagents. A transgenic animal (e.g., a mouse or rat) is an animal having cells that contain a transgene, which transgene was introduced into the animal or an ancestor of the animal at a prenatal, e.g., an embryonic stage. A transgene is a DNA which is integrated into the genome of a cell from which a transgenic animal develops. In one embodiment, cDNA encoding FGF-19 can be used to clone genomic DNA encoding FGF-19 in accordance with established techniques and the genomic sequences used to generate transgenic animals that contain cells which express DNA encoding FGF-19. Methods for generating transgenic animals, particularly animals such as mice or rats, have become conventional in the art and are described, for example, in U.S. Patent Nos. 4,736,866 and 4,870,009. Typically, particular cells would be targeted for FGF-19 transgene incorporation with tissue-specific enhancers. Transgenic animals that include a copy of a transgene encoding FGF-19 introduced into the germ line of the animal at an embryonic stage can be used to examine the effect of increased expression of DNA encoding FGF-19. Such animals can be used as tester animals for reagents thought to confer protection from, for example, pathological conditions associated with its overexpression. In accordance with this facet of the invention, an animal is treated with the reagent and a reduced incidence of the pathological condition, compared to untreated animals bearing the transgene, would indicate a potential therapeutic intervention for the pathological condition.

Alternatively, non-human homologues of FGF-19 can be used to construct a FGF-19 "knock out" animal which has a defective or altered gene encoding FGF-19 as a result of homologous recombination between the endogenous gene encoding FGF-19 and altered genomic DNA encoding FGF-19 introduced into an embryonic stem cell of the animal. For example, cDNA encoding FGF-19 can be used to clone genomic DNA encoding FGF-19 in accordance with established techniques. A portion of the genomic DNA encoding FGF-19 can be deleted or replaced with another gene, such as a gene

WO 01/18210

PCT/US00/06471

encoding a selectable marker which can be used to monitor integration. Typically, several kilobases of unaltered flanking DNA (both at the 5' and 3' ends) are included in the vector [see e.g., Thomas and Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) for a description of homologous recombination vectors]. The vector is introduced into an embryonic stem cell line (e.g., by electroporation) and cells in which the introduced DNA has homologously recombined 5 with the endogenous DNA are selected [see e.g., Li et al., *Cell*, 69:915 (1992)]. The selected cells are then injected into a blastocyst of an animal (e.g., a mouse or rat) to form aggregation chimeras [see e.g., Bradley, in *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. A chimeric embryo can then be implanted into a suitable pseudopregnant female foster 10 animal and the embryo brought to term to create a "knock out" animal. Progeny harboring the homologously recombined DNA in their germ cells can be identified by standard techniques and used to breed animals in which all cells of the animal contain the homologously recombined DNA. Knockout animals can be characterized for instance, for their ability to defend against certain pathological conditions and for their 15 development of pathological conditions due to absence of the FGF-19 polypeptide.

Nucleic acid encoding the FGF-19 polypeptides may also be used in gene therapy. In gene therapy applications, genes are introduced into cells in order to achieve *in vivo* synthesis of a therapeutically effective genetic product, for example for replacement of a defective gene. "Gene therapy" includes both conventional gene therapy where a lasting 20 effect is achieved by a single treatment, and the administration of gene therapeutic agents, which involves the one time or repeated administration of a therapeutically effective DNA or mRNA. Antisense RNAs and DNAs can be used as therapeutic agents for blocking the expression of certain genes *in vivo*. It has already been shown that short antisense oligonucleotides can be imported into cells where they act as inhibitors, despite their low 25 intracellular concentrations caused by their restricted uptake by the cell membrane. (Zamecnik et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4143-4146 [1986]). The oligonucleotides can be modified to enhance their uptake, e.g. by substituting their negatively charged phosphodiester groups by uncharged groups.

There are a variety of techniques available for introducing nucleic acids into viable 30 cells. The techniques vary depending upon whether the nucleic acid is transferred into

WO 01/18210

PCT/US00/06471

cultured cells *in vitro*, or *in vivo* in the cells of the intended host. Techniques suitable for the transfer of nucleic acid into mammalian cells *in vitro* include the use of liposomes, electroporation, microinjection, cell fusion, DEAE-dextran, the calcium phosphate precipitation method, etc. The currently preferred *in vivo* gene transfer techniques include transfection with viral (typically retroviral) vectors and viral coat protein-liposome mediated transfection (Dzau et al., *Trends in Biotechnology* 11, 205-210 [1993]). In some situations it is desirable to provide the nucleic acid source with an agent that targets the target cells, such as an antibody specific for a cell surface membrane protein or the target cell, a ligand for a receptor on the target cell, etc. Where liposomes are employed, proteins which bind to a cell surface membrane protein associated with endocytosis may be used for targeting and/or to facilitate uptake, e.g. capsid proteins or fragments thereof specific for a particular cell type, antibodies for proteins which undergo internalization in cycling, proteins that target intracellular localization and enhance intracellular half-life. The technique of receptor-mediated endocytosis is described, for example, by Wu et al., *J. Biol. Chem.* 262, 4429-4432 (1987); and Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3410-3414 (1990). For review of gene marking and gene therapy protocols see Anderson et al., *Science* 256, 808-813 (1992).

The FGF-19 polypeptides described herein may also be employed as molecular weight markers for protein electrophoresis purposes.

The nucleic acid molecules encoding the FGF-19 polypeptides or fragments thereof described herein are useful for chromosome identification. In this regard, there exists an ongoing need to identify new chromosome markers, since relatively few chromosome marking reagents, based upon actual sequence data are presently available. Each FGF-19 nucleic acid molecule of the present invention can be used as a chromosome marker.

The FGF-19 polypeptides and nucleic acid molecules of the present invention may also be used for tissue typing, wherein the FGF-19 polypeptides of the present invention may be differentially expressed in one tissue as compared to another. FGF-19 nucleic acid molecules will find use for generating probes for PCR, Northern analysis, Southern analysis and Western analysis.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

The FGF-19 polypeptides and modulators thereof described herein may also be employed as therapeutic agents. The FGF-19 polypeptides and modulators thereof of the present invention can be formulated according to known methods to prepare pharmaceutically useful compositions, whereby the FGF-19 product hereof is combined in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier vehicle. Therapeutic formulations 5 are prepared for storage by mixing the active ingredient having the desired degree of purity with optional physiologically acceptable carriers, excipients or stabilizers (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and 10 include buffers such as phosphate, citrate and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid; low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone, amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, arginine or lysine; monosaccharides, disaccharides and other carbohydrates including glucose, 15 mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; salt-forming counterions such as sodium; and/or nonionic surfactants such as TWEEN™, PLURONICS™ or PEG.

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes, prior to or 20 following lyophilization and reconstitution.

Therapeutic compositions herein generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

The route of administration is in accord with known methods, e.g. injection or 25 infusion by intravenous, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial or intralesional routes, topical administration, or by sustained release systems.

Dosages and desired drug concentrations of pharmaceutical compositions of the present invention may vary depending on the particular use envisioned. The determination of the appropriate dosage or route of administration is well within the skill 30 of an ordinary physician. Animal experiments provide reliable guidance for the

WO 01/18210

PCT/US00/06471

determination of effective doses for human therapy. Interspecies scaling of effective doses can be performed following the principles laid down by Mordini, J. and Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi et al., Eds., Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-96.

When *in vivo* administration of a FGF-19 polypeptide or agonist or antagonist thereof is employed, normal dosage amounts may vary from about 10 ng/kg to up to 100 mg/kg of mammal body weight or more per day, preferably about 1 μ g/kg/day to 10 mg/kg/day, depending upon the route of administration. Guidance as to particular dosages and methods of delivery is provided in the literature; see, for example, U.S. Pat. Nos. 4,657,760; 5,206,344; or 5,225,212. It is anticipated that different formulations will be effective for different treatment compounds and different disorders, that administration targeting one organ or tissue, for example, may necessitate delivery in a manner different from that to another organ or tissue.

Where sustained-release administration of a FGF-19 polypeptide or modulator is desired in a formulation with release characteristics suitable for the treatment of any disease or disorder requiring administration of the FGF-19 polypeptide or modulator, microencapsulation is contemplated. Microencapsulation of recombinant proteins for sustained release has been successfully performed with human growth hormone (rhGH), interferon-(rhIFN- γ), interleukin-2, and MNrgp120. Johnson et al., *Nat. Med.*, 2:795-799 (1996); Yasuda, *Biomed. Ther.*, 27:1221-1223 (1993); Hora et al., *Bio/Technology*, 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell and Newman, eds., (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; and U.S. Pat. No. 5,654,010.

The sustained-release formulations of these proteins were developed using poly-lactic-coglycolic acid (PLGA) polymer due to its biocompatibility and wide range of biodegradable properties. The degradation products of PLGA, lactic and glycolic acids, can be cleared quickly within the human body. Moreover, the degradability of this polymer can be adjusted from months to years depending on its molecular weight and composition. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide

WO 01/18210

PCT/US90/06471

polymer," in: M. Chasin and R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41.

The therapeutic agents and compositions comprising FGF-19 provided herein can be used in a number of applications. The applications include treating an individual with obesity or a condition associated with obesity. In one aspect, FGF-19 is administered to 5 an individual in need thereof in an amount effective to treat the condition. Preferably, the condition is one which requires at least one of the following to be treated: an increase in metabolism, a decrease in body weight, a decrease in body fat, a decrease in triglycerides, a decrease in free fatty acids, an increase in glucose release from adipocytes and/or an increase in leptin release from adipocytes. Each of these parameters can be measured by 10 standard methods, for example, by measuring oxygen consumption to determine metabolic rate, using scales to determine weight, and measuring size to determine fat. Moreover, the presence and amount of triglycerides, free fatty acids, glucose and leptin can be determined by standard methods. Each of these parameters is exemplified below in the specific examples.

15 FGF-19 and compositions comprising FGF-19 are preferably used *in vivo*. However, as discussed below, administration can be *in vitro* such as in the methods described below for screening for modulators of FGF-19. Although, it is understood that modulators of FGF-19 can also be identified by the use of animal models and samples from patients.

20 This invention encompasses methods of screening compounds to identify those that mimic or enhance the FGF-19 polypeptide (agonists) or prevent or inhibit the effect of the FGF-19 polypeptide (antagonists). Agonists and antagonists are referred to as modulators herein. Screening assays for antagonist drug candidates are designed to identify compounds that bind or complex with the FGF-19 polypeptides encoded by the 25 genes identified herein, or otherwise interfere with the interaction of the encoded polypeptides with other cellular proteins. Such screening assays will include assays amenable to high-throughput screening of chemical libraries, making them particularly suitable for identifying small molecule drug candidates.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

The assays can be performed in a variety of formats, including protein-protein binding assays, biochemical screening assays, immunoassays, and cell-based assays, which are well characterized in the art.

All assays for antagonists are common in that they call for contacting the drug candidate with a FGF-19 polypeptide encoded by a nucleic acid identified herein under 5 conditions and for a time sufficient to allow these two components to interact.

In binding assays, the interaction is binding and the complex formed can be isolated or detected in the reaction mixture. In a particular embodiment, the FGF-19 polypeptide encoded by the gene identified herein or the drug candidate is immobilized on a solid phase, e.g., on a microtiter plate, by covalent or non-covalent attachments. 10 Non-covalent attachment generally is accomplished by coating the solid surface with a solution of the FGF-19 polypeptide and drying. Alternatively, an immobilized antibody, e.g., a monoclonal antibody, specific for the FGF-19 polypeptide to be immobilized can be used to anchor it to a solid surface. The assay is performed by adding the non-immobilized component, which may be labeled by a detectable label, to the immobilized 15 component, e.g., the coated surface containing the anchored component. When the reaction is complete, the non-reacted components are removed, e.g., by washing, and complexes anchored on the solid surface are detected. When the originally non-immobilized component carries a detectable label, the detection of label immobilized on the surface indicates that complexing occurred. Where the originally non-immobilized 20 component does not carry a label, complexing can be detected, for example, by using a labeled antibody specifically binding the immobilized complex.

If the candidate compound interacts with but does not bind to a particular FGF-19 polypeptide encoded by a gene identified herein, its interaction with that polypeptide can be assayed by methods well known for detecting protein-protein interactions. Such assays 25 include traditional approaches, such as, e.g., cross-linking, co-immunoprecipitation, and co-purification through gradients or chromatographic columns. In addition, protein-protein interactions can be monitored by using a yeast-based genetic system described by Fields and co-workers (Fields and Song, *Nature (London)*, 340:245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)) as disclosed by Chevray and 30 Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991). Many transcriptional

WO 01/18210

PCT/US00/06471

activators, such as yeast GAL4, consist of two physically discrete modular domains, one acting as the DNA-binding domain, the other one functioning as the transcription-activation domain. The yeast expression system described in the foregoing publications (generally referred to as the "two-hybrid system") takes advantage of this property, and employs two hybrid proteins, one in which the target protein is fused to the DNA-binding domain of GAL4, and another, in which candidate activating proteins are fused to the activation domain. The expression of a GAL4-*lacZ* reporter gene under control of a GAL4-activated promoter depends on reconstitution of GAL4 activity via protein-protein interaction. Colonies containing interacting polypeptides are detected with a chromogenic substrate for β -galactosidase. A complete kit (MATCHMAKERTM) for identifying 10 protein-protein interactions between two specific proteins using the two-hybrid technique is commercially available from Clontech. This system can also be extended to map protein domains involved in specific protein interactions as well as to pinpoint amino acid residues that are crucial for these interactions.

Compounds that interfere with the interaction of a gene encoding a FGF-19 polypeptide identified herein and other intra- or extracellular components can be tested as follows: usually a reaction mixture is prepared containing the product of the gene and the intra- or extracellular component under conditions and for a time allowing for the interaction and binding of the two products. To test the ability of a candidate compound to inhibit binding, the reaction is run in the absence and in the presence of the test 15 compound. In addition, a placebo may be added to a third reaction mixture, to serve as positive control. The binding (complex formation) between the test compound and the intra- or extracellular component present in the mixture is monitored as described hereinabove. The formation of a complex in the control reaction(s) but not in the reaction mixture containing the test compound indicates that the test compound interferes with the 20 interaction of the test compound and its reaction partner.

To assay for antagonists, the FGF-19 polypeptide may be added to a cell along with the compound to be screened for a particular activity and the ability of the compound to inhibit the activity of interest in the presence of the FGF-19 polypeptide indicates that the compound is an antagonist to the FGF-19 polypeptide. Alternatively, antagonists may 25 be detected by combining the FGF-19 polypeptide and a potential antagonist with

WO 01/18210

PCT/US00/06471

membrane-bound FGF-19 polypeptide receptors or recombinant receptors under appropriate conditions for a competitive inhibition assay. The FGF-19 polypeptide can be labeled, such as by radioactivity, such that the number of FGF-19 polypeptide molecules bound to the receptor can be used to determine the effectiveness of the potential antagonist. The gene encoding the receptor can be identified by numerous methods known to those of skill in the art, for example, ligand panning and FACS sorting. Coligan et al., *Current Protocols in Immun.*, 1(2): Chapter 5 (1991). Preferably, expression cloning is employed wherein polyadenylated RNA is prepared from a cell responsive to the FGF-19 polypeptide and a cDNA library created from this RNA is divided into pools and used to transfect COS cells or other cells that are not responsive to the FGF-19 polypeptide. Transfected cells that are grown on glass slides are exposed to labeled FGF-19 polypeptide. The FGF-19 polypeptide can be labeled by a variety of means including iodination or inclusion of a recognition site for a site-specific protein kinase. Following fixation and incubation, the slides are subjected to autoradiographic analysis. Positive pools are identified and sub-pools are prepared and re-transfected using an interactive sub-pooling and re-screening process, eventually yielding a single clone that encodes the putative receptor.

As an alternative approach for receptor identification, labeled FGF-19 polypeptide can be photoaffinity-linked with cell membrane or extract preparations that express the receptor molecule. Cross-linked material is resolved by PAGE and exposed to X-ray film. The labeled complex containing the receptor can be excised, resolved into peptide fragments, and subjected to protein micro-sequencing. The amino acid sequence obtained from micro-sequencing would be used to design a set of degenerate oligonucleotide probes to screen a cDNA library to identify the gene encoding the putative receptor.

In another assay for antagonists, mammalian cells or a membrane preparation expressing the receptor would be incubated with labeled FGF-19 polypeptide in the presence of the candidate compound. The ability of the compound to enhance or block this interaction could then be measured.

More specific examples of potential antagonists include an oligonucleotide that binds to the fusions of immunoglobulin with FGF-19 polypeptide, and, in particular, antibodies including, without limitation, poly- and monoclonal antibodies and antibody

WO 01/18210

PCT/US00/06471

fragments, single-chain antibodies, anti-idiotypic antibodies, and chimeric or humanized versions of such antibodies or fragments, as well as human antibodies and antibody fragments. Alternatively, a potential antagonist may be a closely related protein, for example, a mutated form of the FGF-19 polypeptide that recognizes the receptor but imparts no effect, thereby competitively inhibiting the action of the FGF-19 polypeptide.

5 In one embodiment herein where competitive binding assays are performed, FGF receptor 4 or an antibody to FGF-19 is used as a competitor.

Another potential FGF-19 polypeptide antagonist is an antisense RNA or DNA construct prepared using antisense technology, where, e.g., an antisense RNA or DNA molecule acts to block directly the translation of mRNA by hybridizing to targeted mRNA 10 and preventing protein translation. Antisense technology can be used to control gene expression through triple-helix formation or antisense DNA or RNA, both of which methods are based on binding of a polynucleotide to DNA or RNA. For example, the 5' coding portion of the polynucleotide sequence, which encodes the mature FGF-19 polypeptides herein, is used to design an antisense RNA oligonucleotide of from about 15 10 to 40 base pairs in length. A DNA oligonucleotide is designed to be complementary to a region of the gene involved in transcription (triple helix - see Lee et al., Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney et al., Science, 241: 456 (1988); Dervan et al., Science, 251:1360 (1991)), thereby preventing transcription and the production of the FGF-19 polypeptide. The antisense RNA oligonucleotide hybridizes to the mRNA *in vivo* and 20 blocks translation of the mRNA molecule into the FGF-19 polypeptide (antisense - Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988)). The oligonucleotides described above can also be delivered to cells such that the antisense RNA or DNA may be expressed *in vivo* to inhibit production of the FGF-19 polypeptide. When antisense DNA 25 is used, oligodeoxyribonucleotides derived from the translation-initiation site, e.g., between about -10 and +10 positions of the target gene nucleotide sequence, are preferred.

Potential antagonists include small molecules that bind to the active site, the receptor binding site, or growth factor or other relevant binding site of the FGF-19 polypeptide, thereby blocking the normal biological activity of the FGF-19 polypeptide.

30 Examples of small molecules include, but are not limited to, small peptides or peptide-like

WO 01/18210

PCT/US00/06471

molecules, preferably soluble peptides, and synthetic non-peptidyl organic or inorganic compounds.

Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalyzing the specific cleavage of RNA. Ribozymes act by sequence-specific hybridization to the complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Specific ribozyme 5 cleavage sites within a potential RNA target can be identified by known techniques. For further details see, e.g., Rossi, *Current Biology*, 4:469-471 (1994), and PCT publication No. WO 97/33551 (published September 18, 1997).

Nucleic acid molecules in triple-helix formation used to inhibit transcription should be single-stranded and composed of deoxynucleotides. The base composition of 10 these oligonucleotides is designed such that it promotes triple-helix formation via Hoogsteen base-pairing rules, which generally require sizeable stretches of purines or pyrimidines on one strand of a duplex. For further details see, e.g., PCT publication No. WO 97/33551, *supra*.

These small molecules can be identified by any one or more of the screening 15 assays discussed hereinabove and/or by any other screening techniques well known for those skilled in the art.

It is appreciated that all the assays provided herein can be used to screen a wide variety of candidate bioactive agents. The term "candidate bioactive agent", "candidate 20 agent" or "drug candidate" or grammatical equivalents as used herein describes any molecule, e.g., protein, oligopeptide, small organic molecule, polysaccharide, polynucleotide, purine analog, etc., to be tested for bioactive agents that are capable of directly or indirectly altering either the cellular activity phenotype or the expression of a FGF-19 sequence, including both nucleic acid sequences and protein sequences.

Candidate agents can encompass numerous chemical classes, though typically they 25 are organic molecules, preferably small organic compounds having a molecular weight of more than 100 and less than about 2,500 daltons (d). Small molecules are further defined herein as having a molecular weight of between 50 d and 2000 d. In another embodiment, small molecules have a molecular weight of less than 1500, or less than 1200, or less than 1000, or less than 750, or less than 500 d. In one embodiment, a small 30 molecule as used herein has a molecular weight of about 100 to 200 d. Candidate agents

WO 01/18210

PCT/US00/06471

comprise functional groups necessary for structural interaction with proteins, particularly hydrogen bonding, and typically include at least an amine, carbonyl, hydroxyl or carboxyl group, preferably at least two of the functional chemical groups. The candidate agents often comprise cyclical carbon or heterocyclic structures and/or aromatic or polyaromatic structures substituted with one or more of the above functional groups. Candidate agents 5 are also found among biomolecules including peptides, saccharides, fatty acids, steroids, purines, pyrimidines, derivatives, structural analogs or combinations thereof. Particularly preferred are peptides.

Candidate agents are obtained from a wide variety of sources including libraries of synthetic or natural compounds. For example, numerous means are available for 10 random and directed synthesis of a wide variety of organic compounds and biomolecules, including expression of randomized oligonucleotides. Alternatively, libraries of natural compounds in the form of bacterial, fungal, plant and animal extracts are available or readily produced. Additionally, natural or synthetically produced libraries and compounds are readily modified through conventional chemical, physical and 15 biochemical means. Known pharmacological agents may be subjected to directed or random chemical modifications, such as acylation, alkylation, esterification, amidification to produce structural analogs.

In a preferred embodiment, the candidate bioactive agents are proteins. By "protein" herein is meant at least two covalently attached amino acids, which includes 20 proteins, polypeptides, oligopeptides and peptides. The protein may be made up of naturally occurring amino acids and peptide bonds, or synthetic peptidomimetic structures. Thus "amino acid", or "peptide residue", as used herein means both naturally occurring and synthetic amino acids. For example, homo-phenylalanine, citrulline and noreleucine are considered amino acids for the purposes of the invention. "Amino acid" 25 also includes imino acid residues such as proline and hydroxyproline. The side chains may be in either the (R) or the (S) configuration. In the preferred embodiment, the amino acids are in the (S) or L-configuration. If non-naturally occurring side chains are used, non-amino acid substituents may be used, for example to prevent or retard in vivo degradations.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

In a preferred embodiment, the candidate bioactive agents are naturally occurring proteins or fragments of naturally occurring proteins. Thus, for example, cellular extracts containing proteins, or random or directed digests of proteinaceous cellular extracts, may be used. In this way libraries of prokaryotic and eukaryotic proteins may be made for screening in the methods of the invention. Particularly preferred in this embodiment are 5 libraries of bacterial, fungal, viral, and mammalian proteins, with the latter being preferred, and human proteins being especially preferred.

In a preferred embodiment, the candidate bioactive agents are peptides of from about 5 to about 30 amino acids, with from about 5 to about 20 amino acids being preferred, and from about 7 to about 15 being particularly preferred. The peptides may 10 be digests of naturally occurring proteins as is outlined above, random peptides, or "biased" random peptides. By "randomized" or grammatical equivalents herein is meant that each nucleic acid and peptide consists of essentially random nucleotides and amino acids, respectively. Since generally these random peptides (or nucleic acids, discussed below) are chemically synthesized, they may incorporate any nucleotide or amino acid 15 at any position. The synthetic process can be designed to generate randomized proteins or nucleic acids, to allow the formation of all or most of the possible combinations over the length of the sequence, thus forming a library of randomized candidate bioactive proteinaceous agents.

In one embodiment, the library is fully randomized, with no sequence preferences 20 or constants at any position. In a preferred embodiment, the library is biased. That is, some positions within the sequence are either held constant, or are selected from a limited number of possibilities. For example, in a preferred embodiment, the nucleotides or amino acid residues are randomized within a defined class, for example, of hydrophobic amino acids, hydrophilic residues, sterically biased (either small or large) residues, 25 towards the creation of nucleic acid binding domains, the creation of cysteines, for cross-linking, prolines for SH-3 domains, serines, threonines, tyrosines or histidines for phosphorylation sites, etc., or to purines, etc.

In a preferred embodiment, the candidate bioactive agents are nucleic acids. By 30 "nucleic acid" or "oligonucleotide" or grammatical equivalents herein means at least two nucleotides covalently linked together. A nucleic acid of the present invention will

WO 01/18210

PCT/US00/06471

generally contain phosphodiester bonds, although in some cases, as outlined below, nucleic acid analogs are included that may have alternate backbones, comprising, for example, phosphoramido (Beaucage et al., *Tetrahedron* 49(10):1925 (1993) and references therein; Letsinger, *J. Org. Chem.* 35:3800 (1970); Springl et al., *Eur. J. Biochem.* 81:579 (1977); Letsinger et al., *Nucl. Acids Res.* 14:3487 (1986); Sawai et al., *Chem. Lett.* 805 (1984); Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470 (1988); and Pauwels et al., *Chemica Scripta* 26:141 91986)), phosphorothioate (Mag et al., *Nucleic Acids Res.* 19:1437 (1991); and U.S. Patent No. 5,644,048), phosphorodithioate (Briu et al., *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321 (1989), O-methylphosphoroamidite linkages (see Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press), and peptide nucleic acid backbones and linkages (see Egholm, *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895 (1992); Meier et al., *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008 (1992); Nielsen, *Nature*, 365:566 (1993); Carlsson et al., *Nature* 380:207 (1996), all of which are incorporated by reference). Other analog nucleic acids include those with positive backbones (Denpcy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6097 (1995); non-ionic backbones (U.S. Patent Nos. 5,386,023, 5,637,684, 5,602,240, 5,216,141 and 4,469,863; Kiedrowski et al., *Angew. Chem. Int. Ed. English* 30:423 (1991); Letsinger et al., *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470 (1988); Letsinger et al., *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597 (1994); Chapters 2 and 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook; Mcmacker et al., *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4:395 (1994); Jefls et al., *J. Biomolecular NMR* 34:17 (1994); *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)) and non-ribose backbones, including those described in U.S. Patent Nos. 5,235,033 and 5,034,506, and Chapters 6 and 7, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui and P. Dan Cook. Nucleic acids containing one or more carbocyclic sugars are also included within the definition of nucleic acids (see Jenkins et al., *Chem. Soc. Rev.* (1995) pp 169-176). Several nucleic acid analogs are described in Rawls, C & E News June 2, 1997 page 35. All of these references are hereby expressly incorporated by reference. These modifications of the ribose-phosphate backbone may be done to facilitate the addition of additional moieties such as labels, or to increase the stability and half-life of such molecules in physiological environments. In addition, mixtures of naturally occurring nucleic acids and analogs can

WO 01/18210

PCT/US00/06471

be made. Alternatively, mixtures of different nucleic acid analogs, and mixtures of naturally occurring nucleic acids and analogs may be made. The nucleic acids may be single stranded or double stranded, as specified, or contain portions of both double stranded or single stranded sequence. The nucleic acid may be DNA, both genomic and cDNA, RNA or a hybrid, where the nucleic acid contains any combination of deoxyribo-
5 and ribo-nucleotides, and any combination of bases, including uracil, adenine, thymine, cytosine, guanine, inosine, xanthanine hypoxanthanine, isocytosine, isoguanine, etc.

As described above generally for proteins, nucleic acid candidate bioactive agents may be naturally occurring nucleic acids, random nucleic acids, or "biased" random nucleic acids. For example, digests of prokaryotic or eukaryotic genomes may be used
10 as is outlined above for proteins.

In a preferred embodiment, the candidate bioactive agents are organic chemical moieties, a wide variety of which are available in the literature.

In a preferred embodiment, as outlined above, screens may be done on individual genes and gene products (proteins). In a preferred embodiment, the gene or protein has
15 been identified as described below in the Examples as a differentially expressed gene associated with particular tissues and thus conditions related to those tissues. Thus, in one embodiment, screens are designed to first find candidate agents that can bind to FGF-19, and then these agents may be used in assays that evaluate the ability of the candidate agent to modulate FGF-19 activity. Thus, as will be appreciated by those in the art, there
20 are a number of different assays which may be run.

Screening for agents that modulate the activity of FGF-19 may also be done. In a preferred embodiment, methods for screening for a bioactive agent capable of modulating the activity of FGF-19 comprise the steps of adding a candidate bioactive agent to a sample of FGF-19 and determining an alteration in the biological activity of
25 FGF-19. "Modulating the activity of FGF-19" includes an increase in activity, a decrease in activity, or a change in the type or kind of activity present. Thus, in this embodiment, the candidate agent should both bind to FGF-19 (although this may not be necessary), and alter its biological or biochemical activity as defined herein. The methods include both
30 in vitro screening methods, as are generally outlined above, and in vivo screening of cells for alterations in the presence, expression, distribution, activity or amount of FGF-19.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

Thus, in this embodiment, the methods comprise combining a sample and a candidate bioactive agent, and evaluating the effect on FGF-19 activity. By "FGF-19 protein activity" or grammatical equivalents herein is meant at least one of the FGF-19 protein's biological activities as described above.

In a preferred embodiment, the activity of the FGF-19 protein is increased; in another preferred embodiment, the activity of the FGF-19 protein is decreased. Thus, bioactive agents that are antagonists are preferred in some embodiments, and bioactive agents that are agonists may be preferred in other embodiments.

In one aspect of the invention, cells containing FGF-19 sequences are used in drug screening assays by evaluating the effect of drug candidates on FGF-19. Cell type include normal cells, tumor cells, and adipocytes.

Methods of assessing FGF-19 activity such as changes in glucose uptake, leptin release, metabolism, triglyceride and free fatty acid levels, body weight and body fat, are known in the art and are exemplified below in the examples.

In a preferred embodiment, the methods comprise adding a candidate bioactive agent, as defined above, to a cell comprising FGF-19. Preferred cell types include almost any cell. The cells contain a nucleic acid, preferably recombinant, that encodes a FGF-19 protein. In a preferred embodiment, a library of candidate agents are tested on a plurality of cells.

In one aspect, the assays are evaluated in the presence or absence or previous or subsequent exposure to physiological signals, for example hormones, antibodies, peptides, antigens, cytokines, growth factors, action potentials, pharmacological agents including chemotherapeutics, radiation, carcinogenics, or other cells (i.e. cell-cell contacts). In another example, the determinations are determined at different stages of the cell cycle process.

The FGF-19 sequences provided herein can also be used in methods of diagnosis. Overexpression of FGF-19 may indicate an abnormally high metabolic rate and underexpression may indicate a propensity for obesity. Moreover, a sample from a patient may be analyzed for mutated or dysfunctional FGF-19. Generally, such methods include comparing a sample from a patient and comparing FGF-19 expression to that of a control.

30

WO 01/18210

PCT/US00/06471

F. Anti-FGF-19 Antibodies

The present invention further provides anti-FGF-19 antibodies. Exemplary antibodies include polyclonal, monoclonal, humanized, bispecific, and heteroconjugate antibodies.

5 1. Polyclonal Antibodies

The anti-FGF-19 antibodies may comprise polyclonal antibodies. Methods of preparing polyclonal antibodies are known to the skilled artisan. Polyclonal antibodies can be raised in a mammal, for example, by one or more injections of an immunizing agent and, if desired, an adjuvant. Typically, the immunizing agent and/or adjuvant will 10 be injected in the mammal by multiple subcutaneous or intraperitoneal injections. The immunizing agent may include the FGF-19 polypeptide or a fusion protein thereof. It may be useful to conjugate the immunizing agent to a protein known to be immunogenic in the mammal being immunized. Examples of such immunogenic proteins include but are not limited to keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine thyroglobulin, and 15 soybean trypsin inhibitor. Examples of adjuvants which may be employed include Freund's complete adjuvant and MPL-TDM adjuvant (monophosphoryl Lipid A, synthetic trehalose dicorynomycolate). The immunization protocol may be selected by one skilled in the art without undue experimentation.

20 2. Monoclonal Antibodies

The anti-FGF-19 antibodies may, alternatively, be monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies may be prepared using hybridoma methods, such as those described by Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975). In a hybridoma method, a mouse, hamster, or other appropriate host animal, is typically immunized with an 25 immunizing agent to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the immunizing agent. Alternatively, the lymphocytes may be immunized *in vitro*.

The immunizing agent will typically include the FGF-19 polypeptide or a fusion protein thereof. Generally, either peripheral blood lymphocytes ("PBLs") are used if cells 30 of human origin are desired, or spleen cells or lymph node cells are used if non-human

WO 01/18210

PCT/US00/06471

mammalian sources are desired. The lymphocytes are then fused with an immortalized cell line using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]. Immortalized cell lines are usually transformed mammalian cells, particularly myeloma cells of rodent, bovine and human origin. Usually, rat or mouse myeloma cell lines are employed. The hybridoma cells may be cultured in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, immortalized cells. For example, if the parental cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine ("HAT medium"), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred immortalized cell lines are those that fuse efficiently, support stable high level expression of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. More preferred immortalized cell lines are murine myeloma lines, which can be obtained, for instance, from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California and the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63].

The culture medium in which the hybridoma cells are cultured can then be assayed for the presence of monoclonal antibodies directed against FGF-19. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by the hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Such techniques and assays are known in the art. The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by the Scatchard analysis of Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

After the desired hybridoma cells are identified, the clones may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods [Goding, supra]. Suitable

WO 01/18210

PCT/US00/06471

culture media for this purpose include, for example, Dulbecco's Modified Eagle's Medium and RPMI-1640 medium. Alternatively, the hybridoma cells may be grown *in vivo* as ascites in a mammal.

The monoclonal antibodies secreted by the subclones may be isolated or purified from the culture medium or ascites fluid by conventional immunoglobulin purification

- 5 procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

The monoclonal antibodies may also be made by recombinant DNA methods, such as those described in U.S. Patent No. 4,816,567. DNA encoding the monoclonal antibodies of the invention can be readily isolated and sequenced using conventional

- 10 procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells of the invention serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. The DNA also may be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant domains in place of the homologous murine sequences [U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison et al., *supra*] or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. Such a non-immunoglobulin polypeptide can be substituted for the constant domains of an antibody of the invention, or can be substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody of the invention to create a chimeric bivalent antibody.

- 15 The antibodies may be monovalent antibodies. Methods for preparing monovalent antibodies are well known in the art. For example, one method involves recombinant expression of immunoglobulin light chain and modified heavy chain. The heavy chain is truncated generally at any point in the Fc region so as to prevent heavy chain crosslinking. Alternatively, the relevant cysteine residues are substituted with another amino acid residue or are deleted so as to prevent crosslinking.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

In vitro methods are also suitable for preparing monovalent antibodies. Digestion of antibodies to produce fragments thereof, particularly, Fab fragments, can be accomplished using routine techniques known in the art.

3. Human and Humanized Antibodies

5 The anti-FGF-19 antibodies of the invention may further comprise humanized antibodies or human antibodies. Humanized forms of non-human (e.g., murine) antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')₂; or other antigen-binding subsequences of antibodies) which contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. Humanized 10 antibodies include human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a complementary determining region (CDR) of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit having the desired specificity, affinity and capacity. In some instances, Fv framework residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. 15 Humanized antibodies may also comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those 20 of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art.

25 Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323- 30 327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)], by substituting rodent

WO 01/18210

PCT/US00/06471

CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (U.S. Patent No. 4,816,367), wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some CDR residues and 5 possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

Human antibodies can also be produced using various techniques known in the art, including phage display libraries [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, **227**:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **222**:581 (1991)]. The techniques of Cole *et al.* and 10 Boerner *et al.* are also available for the preparation of human monoclonal antibodies (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) and Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, **147**(1):86-95 (1991)). Similarly, human antibodies can be made by introducing of human immunoglobulin loci into transgenic animals, e.g., mice in which the endogenous immunoglobulin genes have been partially or completely 15 inactivated. Upon challenge, human antibody production is observed, which closely resembles that seen in humans in all respects, including gene rearrangement, assembly, and antibody repertoire. This approach is described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, and in the following scientific publications: Marks *et al.*, *Bio/Technology* **10**, 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, 20 *Nature* **368** 856-859 (1994); Morrison, *Nature* **368**, 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* **14**, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* **14**, 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* **13** 65-93 (1995).

4. Bispecific Antibodies

25 Bispecific antibodies are monoclonal, preferably human or humanized, antibodies that have binding specificities for at least two different antigens. In the present case, one of the binding specificities is for the FGF-19, the other one is for any other antigen, and preferably for a cell-surface protein or receptor or receptor subunit.

Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditionally, the 30 recombinant production of bispecific antibodies is based on the co-expression of two

WO 01/18210

PCT/US00/06471

immunoglobulin heavy-chain/light-chain pairs, where the two heavy chains have different specificities [Milstein and Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)]. Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of ten different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. The purification of the correct molecule is usually 5 accomplished by affinity chromatography steps. Similar procedures are disclosed in WO 93/08829, published 13 May 1993, and in Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

Antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) can be fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion 10 preferably is with an immunoglobulin heavy-chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light-chain binding present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy-chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, 15 and are co-transfected into a suitable host organism. For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

According to another approach described in WO 96/27011, the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of 20 heterodimers which are recovered from recombinant cell culture. The preferred interface comprises at least a part of the CH3 region of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (e.g. tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the large side chain(s) are created on the interface 25 of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (e.g. alanine or threonine). This provides a mechanism for increasing the yield of the heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers.

Bispecific antibodies can be prepared as full length antibodies or antibody 30 fragments (e.g. F(ab')₂ bispecific antibodies). Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have been described in the literature. For example,

WO 01/18210

PCT/US00/06471

bispecific antibodies can be prepared can be prepared using chemical linkage. Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985) describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate $F(ab')_2$ fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent sodium arsenite to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The Fab' fragments generated are then 5 converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-thiol by reduction with mercaptoethylanine and is mixed with an equimolar amount of the other Fab'-TNB derivative to form the bispecific antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of enzymes.

10 Fab' fragments may be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form bispecific antibodies. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) describe the production of a fully humanized bispecific antibody $F(ab')_2$ molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from *E. coli* and subjected to directed chemical coupling *in vitro* to form the bispecific antibody. The bispecific antibody thus formed was able to 15 bind to cells overexpressing the ErbB2 receptor and normal human T cells, as well as trigger the lytic activity of human cytotoxic lymphocytes against human breast tumor targets.

Various technique for making and isolating bispecific antibody fragments directly 20 from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers. Kostelnik *et al.*, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992). The leucine zipper peptides from the Fos and Jun proteins were linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to 25 form the antibody heterodimers. This method can also be utilized for the production of antibody homodimers. The "diabody" technology described by Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) has provided an alternative mechanism for making bispecific antibody fragments. The fragments comprise a heavy-chain variable domain (V_H) connected to a light-chain variable domain (V_L) by a linker which is too 30 short to allow pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the V_H and V_L domains of one fragment are forced to pair with the complementary V_L and V_H

WO 01/18210

PCT/US00/06471

domains of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific antibody fragments by the use of single-chain Fv (sFv) dimers has also been reported. See, Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

Antibodies with more than two valencies are contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147:60 (1991).

5 Exemplary bispecific antibodies may bind to two different epitopes on a given FGF-19 polypeptide herein. Alternatively, an anti-FGF-19 polypeptide arm may be combined with an arm which binds to a triggering molecule on a leukocytic such as a T-cell receptor molecule (e.g. CD2, CD3, CD28, or B7), or Fc receptors for IgG (Fc γ R), such as Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) and Fc γ RIII (CD16) so as to focus cellular defense mechanisms to the cell expressing the particular FGF-19 polypeptide. Bispecific antibodies may also be used to localize cytotoxic agents to cells which express a particular FGF-19 polypeptide. These antibodies possess a FGF-19-binding arm and an arm which binds a cytotoxic agent or a radionuclide chelator, such as EOTUBE, DPTA, DOTA, or TETA. Another bispecific antibody of interest binds the FGF-19 polypeptide and further binds tissue factor (TF).

5. Heteroconjugate Antibodies

Heteroconjugate antibodies are also within the scope of the present invention. Heteroconjugate antibodies are composed of two covalently joined antibodies. Such antibodies have, for example, been proposed to target immune system cells to unwanted cells [U.S. Patent No. 4,676,980], and for treatment of HIV infection [WO 91/00360; WO 92/20037; EP 03089]. It is contemplated that the antibodies may be prepared *in vitro* using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins may be constructed using a disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptopbutyrimidate and those disclosed, for example, in U.S. Patent No. 4,676,980.

6. Effector Function Engineering

WO 01/18210

PCT/US00/06471

It may be desirable to modify the antibody of the invention with respect to effector function, so as to enhance, e.g., the effectiveness of the antibody in treating cancer. For example, cysteine residue(s) may be introduced into the Fc region, thereby allowing interchain disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody thus generated may have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). See Caron *et al.*, *J. Exp. Med.*, **176**: 1191-1195 (1992) and Shopes, *J. Immunol.*, **148**: 2918-2922 (1992). Homodimeric antibodies with enhanced anti-tumor activity may also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as described in Wolff *et al.* *Cancer Research*, **53**: 2560-2565 (1993). Alternatively, an antibody can be engineered that has dual Fc regions and may thereby have enhanced complement lysis and ADCC capabilities. See Stevenson *et al.* *Anti-Cancer Drug Design*, **3**: 219-230 (1989).

7. Immunoconjugates

The invention also pertains to immunoconjugates comprising an antibody conjugated to a cytotoxic agent such as a chemotherapeutic agent, toxin (e.g., an enzymatically active toxin of bacterial, fungal, plant, or animal origin, or fragments thereof), or a radioactive isotope (i.e., a radioconjugate).

Chemotherapeutic agents useful in the generation of such immunoconjugates have been described above. Enzymatically active toxins and fragments thereof that can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, *Aleurites fordii* proteins, dianthin proteins, *Phytolaca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crin, saponaria officinalis inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the trichothecenes. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include ³²Bi, ¹³¹I, ¹¹³In, ⁹⁰Y, and ¹⁸⁶Re.

Conjugates of the antibody and cytotoxic agent are made using a variety of bifunctional protein-coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP), iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl)

WO 01/18210

PCT/US00/06471

hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(*p*-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) 5 is an exemplary chelating agent for conjugation of radionuclotide to the antibody. See WO94/11026.

In another embodiment, the antibody may be conjugated to a "receptor" (such as streptavidin) for utilization in tumor pretargeting wherein the antibody-receptor conjugate is administered to the patient, followed by removal of unbound conjugate from the 10 circulation using a clearing agent and then administration of a "ligand" (e.g., avidin) that is conjugated to a cytotoxic agent (e.g., a radionuclotide).

8. Immunoliposomes

The antibodies disclosed herein may also be formulated as immunoliposomes.

15 Liposomes containing the antibody are prepared by methods known in the art, such as described in Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980); and U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545. Liposomes with enhanced circulation time are disclosed in U.S. Patent No. 5,013,556.

20 Particularly useful liposomes can be generated by the reverse-phase evaporation method with a lipid composition comprising phosphatidylcholine, cholesterol, and PEG-derivatized phosphatidylethanolamine (PEG-PE). Liposomes are extruded through filters of defined pore size to yield liposomes with the desired diameter. Fab' fragments of the antibody of the present invention can be conjugated to the liposomes as described in

25 Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 257: 286-288 (1982) via a disulfide-interchange reaction. A chemotherapeutic agent (such as Doxorubicin) is optionally contained within the liposome. See Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.*, 81(19): 1484 (1989).

9. Pharmaceutical Compositions of Antibodies

WO 01/18210

PCT/US00/06471

Antibodies specifically binding a FGF-19 polypeptide identified herein, as well as other molecules identified by the screening assays disclosed hereinbefore, can be administered for the treatment of various disorders in the form of pharmaceutical compositions.

If the FGF-19 polypeptide is intracellular and whole antibodies are used as inhibitors, internalizing antibodies are preferred. However, lipofections or liposomes can also be used to deliver the antibody, or an antibody fragment, into cells. Where antibody fragments are used, the smallest inhibitory fragment that specifically binds to the binding domain of the target protein is preferred. For example, based upon the variable-region sequences of an antibody, peptide molecules can be designed that retain the ability to bind the target protein sequence. Such peptides can be synthesized chemically and/or produced by recombinant DNA technology. See, e.g., Marasco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893 (1993). The formulation herein may also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. Alternatively, or in addition, the composition may comprise an agent that enhances its function, such as, for example, a cytotoxic agent, cytokine, chemotherapeutic agent, or growth-inhibitory agent. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The active ingredients may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles, and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 25 *supra*.

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, e.g., films, or

WO 01/18210

PCT/US00/06471

microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), poly(lactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and γ ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOTTM (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(γ -3-hydroxybutyric acid). While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods. When encapsulated antibodies remain in the body for a long time, they may denature or aggregate as a result of exposure to moisture at 37°C, resulting in a loss of biological activity and possible changes in immunogenicity. Rational strategies can be devised for stabilization depending on the mechanism involved. For example, if the aggregation mechanism is discovered to be intermolecular S-S bond formation through thio-disulfide interchange, stabilization may be achieved by modifying sulphydryl residues, lyophilizing from acidic solutions, controlling moisture content, using appropriate additives, and developing specific polymer matrix compositions.

G. Uses for anti-FGF-19 Antibodies

The anti-FGF-19 antibodies of the invention have various utilities. For example, anti-FGF-19 antibodies may be used in diagnostic assays for FGF-19, e.g., detecting its expression in specific cells, tissues, or serum. Various diagnostic assay techniques known in the art may be used, such as competitive binding assays, direct or indirect sandwich assays and immunoprecipitation assays conducted in either heterogeneous or homogeneous phases [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158]. The antibodies used in the diagnostic assays can be labeled with a detectable moiety. The detectable moiety should be capable of producing, either directly or indirectly, a detectable signal. For example, the detectable moiety may be a radioisotope, such as ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , or ^{125}I , a fluorescent or chemiluminescent compound, such as fluorescein isothiocyanate, rhodamine, or luciferin, or an enzyme, such as alkaline phosphatase, beta-galactosidase or horseradish peroxidase. Any method known in the art for conjugating the antibody to the detectable moiety may be employed,

WO 01/18210

PCT/US00/06471

including those methods described by Hunter et al., *Nature*, **144**:945 (1962); David et al., *Biochemistry*, **13**:1014 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Meth.*, **40**:219 (1981); and Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, **30**:407 (1982).

Anti-FGF-19 antibodies also are useful for the affinity purification of FGF-19 from recombinant cell culture or natural sources. In this process, the antibodies against FGF-19 are immobilized on a suitable support, such as a Sephadex resin or filter paper, using methods well known in the art. The immobilized antibody then is contacted with a sample containing the FGF-19 to be purified, and thereafter the support is washed with a suitable solvent that will remove substantially all the material in the sample except the FGF-19, which is bound to the immobilized antibody. Finally, the support is washed with another suitable solvent that will release the FGF-19 from the antibody.

The following examples are offered for illustrative purposes only, and are not intended to limit the scope of the present invention in any way.

All patent and literature references cited in the present specification are hereby incorporated by reference in their entirety.

15

EXAMPLES

Commercially available reagents referred to in the examples were used according to manufacturer's instructions unless otherwise indicated. The source of those cells identified in the following examples, and throughout the specification, by ATCC accession numbers is the American Type Culture Collection, Manassas, VA.

EXAMPLE 1

Isolation of cDNA Clones Encoding a Human FGF-19

The EST sequence accession number AF007268, a murine fibroblast growth factor (FGF-15) was used to search various public EST databases (e.g., GenBank, Dayhoff, etc.). The search was performed using the computer program BLAST or BLAST2 [Altschul et al., *Methods in Enzymology*, **266**:460-480 (1996)] as a comparison of the ECD protein sequences to a 6 frame translation of the EST sequences. The search resulted in a hit with GenBank EST AA220994, which has been identified as STRATAGENE NT2 neuronal precursor 937230. The sequence of AA220994 is also referred to herein as DNA47412.

102

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/18210

PCT/US00/06471

Based on the DNA47412 sequence, oligonucleotides were synthesized: 1) to identify by PCR a cDNA library that contained the sequence of interest, and 2) for use as probes to isolate a clone of the full-length coding sequence for FGF-19. Forward and reverse PCR primers generally range from 20 to 30 nucleotides and are often designed to give a PCR product of about 100-1000 bp in length. The probe sequences are typically 5 40-55 bp in length. In some cases, additional oligonucleotides are synthesized when the consensus sequence is greater than about 1-1.5 kbp. In order to screen several libraries for a full-length clone, DNA from the libraries was screened by PCR amplification, as per Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, *supra*, with the PCR primer pair. A positive library was then used to isolate clones encoding the gene of interest using the 10 probe oligonucleotide and one of the primer pairs.

PCR primers (forward and reverse) were synthesized:
forward PCR primer 5'-ATCCGCCAGATGGCTACAATGTGTA-3' (SEQ ID NO:3),
and
reverse PCR primer 5'-CCAGTCCGGTGACAAGCCCCAA-3' (SEQ ID NO:4)
15 Additionally, a synthetic oligonucleotide hybridization probe was constructed from the DNA47412 sequence which had the following nucleotide sequence:
hybridization probe
5'-GCCCTCCGGTCTCCCTGAGCAGTGCCAAACAGCGGCAGTGTGA-3' (SEQ ID NO:5).

20 RNA for construction of the cDNA libraries was isolated from human fetal retina tissue. The cDNA libraries used to isolate the cDNA clones were constructed by standard methods using commercially available reagents such as those from Invitrogen, San Diego, CA. The cDNA was primed with oligo dT containing a NotI site, linked with blunt to Sall hemikinased adaptors, cleaved with NotI, sized appropriately by gel electrophoresis, 25 and cloned in a defined orientation into a suitable cloning vector (such as pRK8 or pRK5D; pRK5B is a precursor of pRK5D that does not contain the SflI site; see, Holmes et al., *Science*, 253:1278-1280 (1991)) in the unique XbaI and NotI sites.

DNA sequencing of the clones isolated as described above gave the full-length DNA sequence for a full-length FGF-19 polypeptide (designated herein as DNA49435-

WO 01/18210

PCT/US00/06471

1219 [Figure 1, SEQ ID NO: 1]) and the derived protein sequence for that FGF-19 polypeptide.

The full length clone identified above contained a single open reading frame with an apparent translational initiation site at nucleotide positions 464-466 and a stop signal at nucleotide positions 1112-1114 (Figure 1, SEQ ID NO:1). The predicted polypeptide 5 precursor is 216 amino acids long, has a calculated molecular weight of approximately 24,003 daltons and an estimated pI of approximately 6.99. Analysis of the full-length FGF-19 sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2) evidences the presence of a variety of important polypeptide domains as shown in Figure 2, wherein the locations given for those important polypeptide domains are approximate as described above. Chromosome 10 mapping evidences that the FGF-19-encoding nucleic acid maps to chromosome 11q13.1, band q13.1, in humans. Clone DNA49435-1219 has been deposited with ATCC on November 21, 1997 and is assigned ATCC deposit no. 209480.

An analysis of the Dayhoff database (version 35.45 SwissProt 35), using the ALIGN-2 sequence alignment analysis of the full-length sequence shown in Figure 2 15 (SEQ ID NO:2), evidenced sequence identity between the FGF-19 amino acid sequence and the following Dayhoff sequences: AF007268_1, S54407, P_W52596, FGF2_XENLA, P_W53793, AB002097_1, P_R27966, HSU67918_1, S23595, and P_R70824.

20 EXAMPLE 2

Use of FGF-19 as a hybridization probe

The following method describes use of a nucleotide sequence encoding FGF-19 as a hybridization probe.

DNA comprising the coding sequence of full-length or mature FGF-19 is 25 employed as a probe to screen for homologous DNAs (such as those encoding naturally-occurring variants of FGF-19) in human tissue cDNA libraries or human tissue genomic libraries.

Hybridization and washing of filters containing either library DNAs is performed 30 under the following high stringency conditions. Hybridization of radiolabeled FGF-19-derived probe to the filters is performed in a solution of 50% formamide, 5x SSC, 0.1%

WO 01/18210

PCT/US00/06471

SDS, 0.1% sodium pyrophosphate, 50 mM sodium phosphate, pH 6.8, 2x Denhardt's solution, and 10% dextran sulfate at 42°C for 20 hours. Washing of the filters is performed in an aqueous solution of 0.1x SSC and 0.1% SDS at 42°C.

DNAs having a desired sequence identity with the DNA encoding full-length native sequence FGF-19 can then be identified using standard techniques known in the art.

EXAMPLE 3

Expression of FGF-19 in *E. coli*

This example illustrates preparation of an unglycosylated form of FGF-19 by recombinant expression in *E. coli*.

The DNA sequence encoding FGF-19 is initially amplified using selected PCR primers. The primers should contain restriction enzyme sites which correspond to the restriction enzyme sites on the selected expression vector. A variety of expression vectors may be employed. An example of a suitable vector is pBR322 (derived from *E. coli*; see Bolivar et al., *Gene*, 2,95 (1977)) which contains genes for ampicillin and tetracycline resistance. The vector is digested with restriction enzyme and dephosphorylated. The PCR amplified sequences are then ligated into the vector. The vector will preferably include sequences which encode for an antibiotic resistance gene, a trp promoter, a polyhis leader (including the first six STII codons, polyhis sequence, and enterokinase cleavage site), the FGF-19 coding region, lambda transcriptional terminator, and an argU gene.

The ligation mixture is then used to transform a selected *E. coli* strain using the methods described in Sambrook et al., *supra*. Transformants are identified by their ability to grow on LB plates and antibiotic resistant colonies are then selected. Plasmid DNA can be isolated and confirmed by restriction analysis and DNA sequencing.

Selected clones can be grown overnight in liquid culture medium such as LB broth supplemented with antibiotics. The overnight culture may subsequently be used to inoculate a larger scale culture. The cells are then grown to a desired optical density, during which the expression promoter is turned on.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

After culturing the cells for several more hours, the cells can be harvested by centrifugation. The cell pellet obtained by the centrifugation can be solubilized using various agents known in the art, and the solubilized FGF-19 protein can then be purified using a metal chelating column under conditions that allow tight binding of the protein.

FGF-19 may be expressed in *E. coli* in a poly-His tagged form, using the following procedure. The DNA encoding FGF-19 is initially amplified using selected PCR primers. The primers will contain restriction enzyme sites which correspond to the restriction enzyme sites on the selected expression vector, and other useful sequences providing for efficient and reliable translation initiation, rapid purification on a metal chelation column, and proteolytic removal with enterokinase. The PCR-amplified, poly-His tagged sequences are then ligated into an expression vector, which is used to transform an *E. coli* host based on strain 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoBts(htpRts) clpP(lacIq)). Transformants are first grown in LB containing 50 mg/ml carbenicillin at 30°C with shaking until an O.D.600 of 3-5 is reached. Cultures are then diluted 50-100 fold into CRAP media (prepared by mixing 3.57 g (NH₄)₂SO₄, 0.71 g sodium citrate•2H₂O, 1.07 g KCl, 5.36 g Difco yeast extract, 5.36 g Sheffield hycase SF in 500 mL water, as well as 110 mM MPOS, pH 7.3, 0.55% (w/v) glucose and 7 mM MgSO₄) and grown for approximately 20-30 hours at 30°C with shaking. Samples are removed to verify expression by SDS-PAGE analysis, and the bulk culture is centrifuged to pellet the cells. Cell pellets are frozen until purification and refolding.

20 *E. coli* paste from 0.5 to 1 L fermentations (6-10 g pellets) is resuspended in 10 volumes (w/v) in 7 M guanidine, 20 mM Tris, pH 8 buffer. Solid sodium sulfite and sodium tetrathionate is added to make final concentrations of 0.1M and 0.02 M, respectively, and the solution is stirred overnight at 4°C. This step results in a denatured protein with all cysteine residues blocked by sulfitolization. The solution is centrifuged at 40,000 rpm in a Beckman Ultracentrifuge for 30 min. The supernatant is diluted with 3-5 volumes of metal chelate column buffer (6 M guanidine, 20 mM Tris, pH 7.4) and filtered through 0.22 micron filters to clarify. The clarified extract is loaded onto a 5 ml Qiagen Ni-NTA metal chelate column equilibrated in the metal chelate column buffer. The column is washed with additional buffer containing 50 mM imidazole (Calbiochem, 30 Utrol grade), pH 7.4. The protein is eluted with buffer containing 250 mM imidazole.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

Fractions containing the desired protein are pooled and stored at 4°C. Protein concentration is estimated by its absorbance at 280 nm using the calculated extinction coefficient based on its amino acid sequence.

The proteins are refolded by diluting the sample slowly into freshly prepared refolding buffer consisting of: 20 mM Tris, pH 8.6, 0.3 M NaCl, 2.5 M urea, 5 mM cysteine, 20 mM glycine and 1 mM EDTA. Refolding volumes are chosen so that the final protein concentration is between 50 to 100 micrograms/ml. The refolding solution is stirred gently at 4°C for 12-36 hours. The refolding reaction is quenched by the addition of TFA to a final concentration of 0.4% (pH of approximately 3). Before further purification of the protein, the solution is filtered through a 0.22 micron filter and acetonitrile is added to 2-10% final concentration. The refolded protein is chromatographed on a Poros RI/H reversed phase column using a mobile buffer of 0.1% TFA with elution with a gradient of acetonitrile from 10 to 80%. Aliquots of fractions with A280 absorbance are analyzed on SDS polyacrylamide gels and fractions containing homogeneous refolded protein are pooled. Generally, the properly refolded species of most proteins are eluted at the lowest concentrations of acetonitrile since those species are the most compact with their hydrophobic interiors shielded from interaction with the reversed phase resin. Aggregated species are usually eluted at higher acetonitrile concentrations. In addition to resolving misfolded forms of proteins from the desired form, the reversed phase step also removes endotoxin from the samples.

20 Fractions containing the desired folded FGF-19 polypeptide are pooled and the acetonitrile removed using a gentle stream of nitrogen directed at the solution. Proteins are formulated into 20 mM Hepes, pH 6.8 with 0.14 M sodium chloride and 4% mannitol by dialysis or by gel filtration using G25 Superfine (Pharmacia) resins equilibrated in the formulation buffer and sterile filtered.

25

EXAMPLE 4

Expression of FGF-19 in mammalian cells

This example illustrates preparation of a potentially glycosylated form of FGF-19 by recombinant expression in mammalian cells.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

The vector, pRK5 (see EP 307,247, published March 15, 1989), is employed as the expression vector. Optionally, the FGF-19 DNA is ligated into pRK5 with selected restriction enzymes to allow insertion of the FGF-19 DNA using ligation methods such as described in Sambrook et al., *supra*. The resulting vector is called pRK5-FGF-19.

In one embodiment, the selected host cells may be 293 cells. Human 293 cells (ATCC CCL 1573) are grown to confluence in tissue culture plates in medium such as DMEM supplemented with fetal calf serum and optionally, nutrient components and/or antibiotics. About 10 μ g pRK5-FGF-19 DNA is mixed with about 1 μ g DNA encoding the VA RNA gene [Thimmappaya et al., *Cell*, 31:543 (1982)] and dissolved in 500 μ l of 1 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.227 M CaCl₂. To this mixture is added, dropwise, 500 μ l of 50 mM HEPES (pH 7.35), 280 mM NaCl, 1.5 mM NaPO₄, and a precipitate is allowed to form for 10 minutes at 25°C. The precipitate is suspended and added to the 293 cells and allowed to settle for about four hours at 37°C. The culture medium is aspirated off and 2 ml of 20% glycerol in PBS is added for 30 seconds. The 293 cells are then washed with serum free medium, fresh medium is added and the cells are incubated for about 5 days.

Approximately 24 hours after the transfections, the culture medium is removed and replaced with culture medium (alone) or culture medium containing 200 μ Ci/ml ³⁵S-cysteine and 200 μ Ci/ml ³⁵S-methionine. After a 12 hour incubation, the conditioned medium is collected, concentrated on a spin filter, and loaded onto a 15% SDS gel. The processed gel may be dried and exposed to film for a selected period of time to reveal the presence of FGF-19 polypeptide. The cultures containing transfected cells may undergo further incubation (in serum free medium) and the medium is tested in selected bioassays.

In an alternative technique, FGF-19 may be introduced into 293 cells transiently using the dextran sulfate method described by Somparyrac et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78:7575 (1981). 293 cells are grown to maximal density in a spinner flask and 700 μ g pRK5-FGF-19 DNA is added. The cells are first concentrated from the spinner flask by centrifugation and washed with PBS. The DNA-dextran precipitate is incubated on the cell pellet for four hours. The cells are treated with 20% glycerol for 90 seconds, washed with tissue culture medium, and re-introduced into the spinner flask containing tissue culture medium, 5 μ g/ml bovine insulin and 0.1 μ g/ml bovine transferrin. After about

WO 01/18210

PCT/US00/06471

four days, the conditioned media is centrifuged and filtered to remove cells and debris. The sample containing expressed FGF-19 can then be concentrated and purified by any selected method, such as dialysis and/or column chromatography.

In another embodiment, FGF-19 can be expressed in CHO cells. The pRK5-FGF-19 can be transfected into CHO cells using known reagents such as CaPO₄ or DEAE-dextran. As described above, the cell cultures can be incubated, and the medium replaced with culture medium (alone) or medium containing a radiolabel such as ³⁵S-methionine. After determining the presence of FGF-19 polypeptide, the culture medium may be replaced with serum free medium. Preferably, the cultures are incubated for about 6 days, and then the conditioned medium is harvested. The medium containing the expressed FGF-19 can then be concentrated and purified by any selected method.

Epitope-tagged FGF-19 may also be expressed in host CHO cells. The FGF-19 may be subcloned out of the pRK5 vector. The subclone insert can undergo PCR to fuse in frame with a selected epitope tag such as a poly-his tag into a Baculovirus expression vector. The poly-his tagged FGF-19 insert can then be subcloned into a SV40 driven vector containing a selection marker such as DHFR for selection of stable clones. Finally, the CHO cells can be transfected (as described above) with the SV40 driven vector. Labeling may be performed, as described above, to verify expression. The culture medium containing the expressed poly-His tagged FGF-19 can then be concentrated and purified by any selected method, such as by Ni²⁺-chelate affinity chromatography.

FGF-19 may also be expressed in CHO and/or COS cells by a transient expression procedure or in CHO cells by another stable expression procedure.

Stable expression in CHO cells is performed using the following procedure. The proteins are expressed as an IgG construct (immunoadhesin), in which the coding sequences for the soluble forms (e.g. extracellular domains) of the respective proteins are fused to an IgG1 constant region sequence containing the hinge, CH2 and CH2 domains and/or a poly-His tagged form.

Following PCR amplification, the respective DNAs are subcloned in a CHO expression vector using standard techniques as described in Ausubel et al., *Current Protocols of Molecular Biology*, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997). CHO expression vectors are constructed to have compatible restriction sites 5' and 3' of the

WO 01/18210

PCT/US00/06471

DNA of interest to allow the convenient shuttling of cDNA's. The vector used expression in CHO cells is as described in Lucas et al., *Nucl. Acids Res.* 24:9 (1774-1779 (1996), and uses the SV40 early promoter/enhancer to drive expression of the cDNA of interest and dihydrofolate reductase (DHFR). DHFR expression permits selection for stable maintenance of the plasmid following transfection.

- 5 Twelve micrograms of the desired plasmid DNA is introduced into approximately 10 million CHO cells using commercially available transfection reagents Superfect® (Qiagen), Dospel® or Fugene® (Boehringer Mannheim). The cells are grown as described in Lucas et al., *supra*. Approximately 3×10^7 cells are frozen in an ampule for further growth and production as described below.
- 10 The ampules containing the plasmid DNA are thawed by placement into water bath and mixed by vortexing. The contents are pipetted into a centrifuge tube containing 10 mLs of media and centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes. The supernatant is aspirated and the cells are resuspended in 10 mL of selective media (0.2 μ m filtered PS20 with 5% 0.2 μ m diafiltered fetal bovine serum). The cells are then aliquoted into a 100 mL spinner
- 15 containing 90 mL of selective media. After 1-2 days, the cells are transferred into a 250 mL spinner filled with 150 mL selective growth medium and incubated at 37°C. After another 2-3 days, 250 mL, 500 mL and 2000 mL spinners are seeded with 3×10^5 cells/mL. The cell media is exchanged with fresh media by centrifugation and resuspension in production medium. Although any suitable CHO media may be
- 20 employed, a production medium described in U.S. Patent No. 5,122,469, issued June 16, 1992 may actually be used. A 3L production spinner is seeded at 1.2×10^6 cells/mL. On day 0, the cell number pH is determined. On day 1, the spinner is sampled and sparging with filtered air is commenced. On day 2, the spinner is sampled, the temperature shifted to 33°C. and 30 mL of 500 g/L glucose and 0.6 mL of 10% antifoam (e.g., 35% 25 polydimethylsiloxane emulsion, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion) taken. Throughout the production, the pH is adjusted as necessary to keep it at around 7.2. After 10 days, or until the viability dropped below 70%, the cell culture is harvested by centrifugation and filtering through a 0.22 μ m filter. The filtrate was either stored at 4°C or immediately loaded onto columns for purification.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

For the poly-His tagged constructs, the proteins are purified using a Ni-NTA column (Qiagen). Before purification, imidazole is added to the conditioned media to a concentration of 5 mM. The conditioned media is pumped onto a 6 ml Ni-NTA column equilibrated in 20 mM Hepes, pH 7.4, buffer containing 0.3 M NaCl and 5 mM imidazole at a flow rate of 4-5 ml/min. at 4°C. After loading, the column is washed with additional 5 equilibration buffer and the protein eluted with equilibration buffer containing 0.25 M imidazole. The highly purified protein is subsequently desalted into a storage buffer containing 10 mM Hepes, 0.14 M NaCl and 4% mannitol, pH 6.8, with a 25 ml G25 Superfine (Pharmacia) column and stored at -80°C.

Immunoadhesin (Fe-containing) constructs are purified from the conditioned 10 media as follows. The conditioned medium is pumped onto a 5 ml Protein A column (Pharmacia) which had been equilibrated in 20 mM Na phosphate buffer, pH 6.8. After loading, the column is washed extensively with equilibration buffer before elution with 100 mM citric acid, pH 3.5. The eluted protein is immediately neutralized by collecting 15 1 ml fractions into tubes containing 275 μ L of 1 M Tris buffer, pH 9. The highly purified protein is subsequently desalted into storage buffer as described above for the poly-His tagged proteins. The homogeneity is assessed by SDS polyacrylamide gels and by N-terminal amino acid sequencing by Edman degradation.

EXAMPLE 5

20 Expression of FGF-19 in Yeast

The following method describes recombinant expression of FGF-19 in yeast.

First, yeast expression vectors are constructed for intracellular production or 25 secretion of FGF-19 from the ADH2/GAPDH promoter. DNA encoding FGF-19 and the promoter is inserted into suitable restriction enzyme sites in the selected plasmid to direct intracellular expression of FGF-19. For secretion, DNA encoding FGF-19 can be cloned into the selected plasmid, together with DNA encoding the ADH2/GAPDH promoter, a native FGF-19 signal peptide or other mammalian signal peptide, or, for example, a yeast alpha-factor or invertase secretory signal/leader sequence, and linker sequences (if needed) for expression of FGF-19.

111

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/18210

PCT/US00/06471

Yeast cells, such as yeast strain AB110, can then be transformed with the expression plasmids described above and cultured in selected fermentation media. The transformed yeast supernatants can be analyzed by precipitation with 10% trichloroacetic acid and separation by SDS-PAGE, followed by staining of the gels with Coomassie Blue stain.

5 Recombinant FGF-19 can subsequently be isolated and purified by removing the yeast cells from the fermentation medium by centrifugation and then concentrating the medium using selected cartridge filters. The concentrate containing FGF-19 may further be purified using selected column chromatography resins.

10 EXAMPLE 6

Expression of FGF-19 in Baculovirus-Infected Insect Cells

The following method describes recombinant expression of FGF-19 in Baculovirus-infected insect cells.

15 The sequence coding for FGF-19 is fused upstream of an epitope tag contained within a baculovirus expression vector. Such epitope tags include poly-his tags and immunoglobulin tags (like Fc regions of IgG). A variety of plasmids may be employed, including plasmids derived from commercially available plasmids such as pVL1393 (Novagen). Briefly, the sequence encoding FGF-19 or the desired portion of the coding sequence of FGF-19 such as the sequence encoding the extracellular domain of a 20 transmembrane protein or the sequence encoding the mature protein if the protein is extracellular is amplified by PCR with primers complementary to the 5' and 3' regions. The 5' primer may incorporate flanking (selected) restriction enzyme sites. The product is then digested with those selected restriction enzymes and subcloned into the expression vector.

25 Recombinant baculovirus is generated by co-transfecting the above plasmid and BaculoGoldTM virus DNA (Pharmingen) into *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") cells (ATCC CRL 1711) using lipofectin (commercially available from GIBCO-BRL). After 4 - 5 days of incubation at 28°C, the released viruses are harvested and used for further amplifications. Viral infection and protein expression are performed as described by

WO 01/18210

PCT/US00/06471

O'Reiley et al., Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

Expressed poly-his tagged FGF-19 can then be purified, for example, by Ni^{2+} -chelate affinity chromatography as follows. Extracts are prepared from recombinant virus-infected SF9 cells as described by Rupert et al., Nature, 362:175-179 (1993).

5 Briefly, SF9 cells are washed, resuspended in sonication buffer (25 mL Hepes, pH 7.9; 12.5 mM MgCl_2 ; 0.1 mM EDTA; 10% glycerol; 0.1% NP-40; 0.4 M KCl), and sonicated twice for 20 seconds on ice. The sonicates are cleared by centrifugation, and the supernatant is diluted 50-fold in loading buffer (50 mM phosphate, 300 mM NaCl, 10% glycerol, pH 7.8) and filtered through a 0.45 μm filter. A Ni^{2+} -NTA agarose column 10 (commercially available from Qiagen) is prepared with a bed volume of 5 mL, washed with 25 mL of water and equilibrated with 25 mL of loading buffer. The filtered cell extract is loaded onto the column at 0.5 mL per minute. The column is washed to baseline A_{280} with loading buffer, at which point fraction collection is started. Next, the column is washed with a secondary wash buffer (50 mM phosphate; 300 mM NaCl, 10% 15 glycerol, pH 6.0), which elutes nonspecifically bound protein. After reaching A_{280} baseline again, the column is developed with a 0 to 500 mM Imidazole gradient in the secondary wash buffer. One mL fractions are collected and analyzed by SDS-PAGE and silver staining or Western blot with Ni^{2+} -NTA-conjugated to alkaline phosphatase (Qiagen). Fractions containing the eluted His₁₀-tagged FGF-19 are pooled and dialyzed 20 against loading buffer.

Alternatively, purification of the IgG tagged (or Fc tagged) FGF-19 can be performed using known chromatography techniques, including for instance, Protein A or protein G column chromatography.

25 EXAMPLE 7

Preparation of Antibodies that Bind FGF-19

This example illustrates preparation of monoclonal antibodies which can specifically bind FGF-19.

Techniques for producing the monoclonal antibodies are known in the art and are 30 described, for instance, in Goding, supra. Immunogens that may be employed include

WO 01/18210

PCT/US00/06471

purified FGF-19, fusion proteins containing FGF-19, and cells expressing recombinant FGF-19 on the cell surface. Selection of the immunogen can be made by the skilled artisan without undue experimentation.

Mice, such as Balb/c, are immunized with the FGF-19 immunogen emulsified in complete Freund's adjuvant and injected subcutaneously or intraperitoneally in an amount 5 from 1-100 micrograms. Alternatively, the immunogen is emulsified in MPL-TDM adjuvant (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) and injected into the animal's hind foot pads. The immunized mice are then boosted 10 to 12 days later with additional immunogen emulsified in the selected adjuvant. Thereafter, for several weeks, the mice may also be boosted with additional immunization injections. Serum samples may be 10 periodically obtained from the mice by retro-orbital bleeding for testing in ELISA assays to detect anti-FGF-19 antibodies.

After a suitable antibody titer has been detected, the animals "positive" for antibodies can be injected with a final intravenous injection of FGF-19. Three to four days later, the mice are sacrificed and the spleen cells are harvested. The spleen cells are 15 then fused (using 35% polyethylene glycol) to a selected murine myeloma cell line such as P3X63AgU.1, available from ATCC, No. CRL 1597. The fusions generate hybridoma cells which can then be plated in 96 well tissue culture plates containing HAT (hypoxanthine, aminopterin, and thymidine) medium to inhibit proliferation of non-fused cells, myeloma hybrids, and spleen cell hybrids.

20 The hybridoma cells will be screened in an ELISA for reactivity against FGF-19. Determination of "positive" hybridoma cells secreting the desired monoclonal antibodies against FGF-19 is within the skill in the art.

The positive hybridoma cells can be injected intraperitoneally into syngeneic 25 Balb/c mice to produce ascites containing the anti-FGF-19 monoclonal antibodies. Alternatively, the hybridoma cells can be grown in tissue culture flasks or roller bottles. Purification of the monoclonal antibodies produced in the ascites can be accomplished using ammonium sulfate precipitation, followed by gel exclusion chromatography. Alternatively, affinity chromatography based upon binding of antibody to protein A or protein G can be employed.

30

WO 01/18210

PCT/US00/06471

EXAMPLE 8

Purification of FGF-19 Polypeptides Using Specific Antibodies

Native or recombinant FGF-19 polypeptides may be purified by a variety of standard techniques in the art of protein purification. For example, pro-FGF-19 polypeptide, mature FGF-19 polypeptide, or pre-FGF-19 polypeptide is purified by 5 immunoaffinity chromatography using antibodies specific for the FGF-19 polypeptide of interest. In general, an immunoaffinity column is constructed by covalently coupling the anti-FGF-19 polypeptide antibody to an activated chromatographic resin.

Polyclonal immunoglobulins are prepared from immune sera either by precipitation with ammonium sulfate or by purification on immobilized Protein A 10 (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Likewise, monoclonal antibodies are prepared from mouse ascites fluid by ammonium sulfate precipitation or chromatography on immobilized Protein A. Partially purified immunoglobulin is covalently attached to a chromatographic resin such as CNBr-activated SEPHAROSE™ (Pharmacia LKB Biotechnology). The antibody is coupled to the resin, the resin is blocked, and the 15 derivative resin is washed according to the manufacturer's instructions.

Such an immunoaffinity column is utilized in the purification of FGF-19 polypeptide by preparing a fraction from cells containing FGF-19 polypeptide in a soluble form. This preparation is derived by solubilization of the whole cell or of a subcellular fraction obtained via differential centrifugation by the addition of detergent or by other 20 methods well known in the art. Alternatively, soluble FGF-19 polypeptide containing a signal sequence may be secreted in useful quantity into the medium in which the cells are grown.

A soluble FGF-19 polypeptide-containing preparation is passed over the immunoaffinity column, and the column is washed under conditions that allow the 25 preferential absorbance of FGF-19 polypeptide (e.g., high ionic strength buffers in the presence of detergent). Then, the column is eluted under conditions that disrupt antibody/FGF-19 polypeptide binding (e.g., a low pH buffer such as approximately pH 2-3, or a high concentration of a chaotropic such as urea or thiocyanate ion), and FGF-19 polypeptide is collected.

30

115

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

EXAMPLE 9
Drug Screening

- This invention is particularly useful for screening compounds by using FGF-19 polypeptides or binding fragment thereof in any of a variety of drug screening techniques. The FGF-19 polypeptide or fragment employed in such a test may either be free in solution, affixed to a solid support, borne on a cell surface, or located intracellularly. One method of drug screening utilizes eukaryotic or prokaryotic host cells which are stably transformed with recombinant nucleic acids expressing the FGF-19 polypeptide or fragment. Drugs are screened against such transformed cells in competitive binding assays. Such cells, either in viable or fixed form, can be used for standard binding assays.
- 10 One may measure, for example, the formation of complexes between FGF-19 polypeptide or a fragment and the agent being tested. Alternatively, one can examine the diminution in complex formation between the FGF-19 polypeptide and its target cell or target receptors caused by the agent being tested.

Thus, the present invention provides methods of screening for drugs or any other agents which can affect a FGF-19 polypeptide-associated disease or disorder. These methods comprise contacting such an agent with an FGF-19 polypeptide or fragment thereof and assaying (i) for the presence of a complex between the agent and the FGF-19 polypeptide or fragment, or (ii) for the presence of a complex between the FGF-19 polypeptide or fragment and the cell, by methods well known in the art. In such competitive binding assays, the FGF-19 polypeptide or fragment is typically labeled. After suitable incubation, free FGF-19 polypeptide or fragment is separated from that present in bound form, and the amount of free or uncomplexed label is a measure of the ability of the particular agent to bind to FGF-19 polypeptide or to interfere with the FGF-19 polypeptide/cell complex.

25 Another technique for drug screening provides high throughput screening for compounds having suitable binding affinity to a polypeptide and is described in detail in WO 84/03564, published on September 13, 1984. Briefly stated, large numbers of different small peptide test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. As applied to a FGF-19 polypeptide, the peptide test

30 compounds are reacted with FGF-19 polypeptide and washed. Bound FGF-19 polypeptide

WO 01/18210

PCT/US00/06471

is detected by methods well known in the art. Purified FGF-19 polypeptide can also be coated directly onto plates for use in the aforementioned drug screening techniques. In addition, non-neutralizing antibodies can be used to capture the peptide and immobilize it on the solid support.

This invention also contemplates the use of competitive drug screening assays in which neutralizing antibodies capable of binding FGF-19 polypeptide specifically compete with a test compound for binding to FGF-19 polypeptide or fragments thereof. In this manner, the antibodies can be used to detect the presence of any peptide which shares one or more antigenic determinants with FGF-19 polypeptide.

10

EXAMPLE 10

Rational Drug Design

The goal of rational drug design is to produce structural analogs of biologically active polypeptide of interest (*i.e.*, a FGF-19 polypeptide) or of small molecules with which they interact, *e.g.*, agonists, antagonists, or inhibitors. Any of these examples can be used to fashion drugs which are more active or stable forms of the FGF-19 polypeptide or which enhance or interfere with the function of the FGF-19 polypeptide *in vivo* (*c.f.*, Hodgson, *Bio/Technology*, 9: 19-21 (1991)).

In one approach, the three-dimensional structure of the FGF-19 polypeptide, or of an FGF-19 polypeptide-inhibitor complex, is determined by x-ray crystallography, by computer modeling or, most typically, by a combination of the two approaches. Both the shape and charges of the FGF-19 polypeptide must be ascertained to elucidate the structure and to determine active site(s) of the molecule. Less often, useful information regarding the structure of the FGF-19 polypeptide may be gained by modeling based on the structure of homologous proteins. In both cases, relevant structural information is used to design analogous FGF-19 polypeptide-like molecules or to identify efficient inhibitors. Useful examples of rational drug design may include molecules which have improved activity or stability as shown by Braxton and Wells, *Biochemistry*, 31:7796-7801 (1992) or which act as inhibitors, agonists, or antagonists of native peptides as shown by Athauda *et al.*, *J. Biochem.*, 113:742-746 (1993).

117

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/18210

PCT/US00/06471

It is also possible to isolate a target-specific antibody, selected by functional assay, as described above, and then to solve its crystal structure. This approach, in principle, yields a pharmacore upon which subsequent drug design can be based. It is possible to bypass protein crystallography altogether by generating anti-idiotypic antibodies (anti-ids) to a functional, pharmacologically active antibody. As a mirror image of a mirror image, 5 the binding site of the anti-ids would be expected to be an analog of the original receptor. The anti-id could then be used to identify and isolate peptides from banks of chemically or biologically produced peptides. The isolated peptides would then act as the pharmacore.

By virtue of the present invention, sufficient amounts of the FGF-19 polypeptide 10 may be made available to perform such analytical studies as X-ray crystallography. In addition, knowledge of the FGF-19 polypeptide amino acid sequence provided herein will provide guidance to those employing computer modeling techniques in place of or in addition to x-ray crystallography.

15 **EXAMPLE 11**

Investigation of Weight, Leptin Levels, Food Intake, Urine Production, Oxygen Consumption, and Triglyceride and Free Fatty Acid Levels in FGF-19 Transgenic Mice

As described herein, FGF-19 has been newly identified as a member of a growing 20 family of secreted proteins related to fibroblast growth factor. FGF-19 has been characterized herein as interacting with FGF receptor 4 and does not appear to act as a mitogen. To further investigate the functions of this protein, transgenic mice have been generated that express human FGF-19.

In particular, the cDNA encoding human FGF-19 was cloned into a plasmid that 25 contains the promoter for myosin light chain. This promoter is sufficient for muscle specific transcription of the transgene. A splice acceptor and donor was also included 5' to the FGF-19 cDNA to increase the level of expression and a splice donor and acceptor with a poly A addition signal was included 3' to the FGF-19 cDNA to increase the level of transcription and to provide a transcription termination site.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

The DNA encompassing the MLC promoter, the 5' splice acceptor and donor, the FGF-19 cDNA and the 3' splice acceptor and donor and the transcription termination site (the transgene) was released from the bacterial vector sequences using appropriate restriction enzymes and purified following size fractionation on agarose gels. The purified DNA was injected into one pronucleus of fertilized mouse eggs and transgenic mice 5 generated and identified as described (Genetic Modification of Animals; Tim Stewart; In Exploring Genetic Mechanisms pp565-598; 1997 Eds M Singer and P Berg; University Science Books; Sausalito, Calif). The mice were 6 weeks of age for the measurements discussed below for water intake, food consumption, urine output and hematocrit. The leptin, triglycerides and free fatty acid measurements were on the same animals at 8 10 weeks of age.

As the results discussed below show, these mice demonstrate increased food intake and increased metabolic rate as evidenced by their rate of oxygen consumption. Despite the increased food intake, these mice weigh significantly less than their non-transgenic littermates. This decreased body weight appears to be a consequence of 15 decreased adiposity as leptin which correlates closely with adipose tissue mass in humans and rodents and which is decreased in the transgenic mice. In further support of this, the transgenic mice have normal linear growth as assessed by nose to rump length measurements. They are normal with respect to body temperature, body (bone length) and hematological values. Co-incident with the increased food intake, the 20 transgenic mice have increased urine output. As the mice do not appear to drink more and are not dehydrated as determined by a normal hematocrit, the increased urine output may be derived from the metabolism of the increased food. As FGF-19 decreases adiposity without altering either of muscle mass or long bone formation, FGF-19 is indicated as an effective therapeutic in the treatment of obesity and related 25 conditions.

More particularly, MLC-FGF-19 transgenic mice were weighed at various times under different fasting and feeding conditions. More particularly, groups of female FGF-19 transgenic mice and their non-transgenic littermates were weighed at 6 weeks of age during ad libitum feeding, after 6 and 24 hour fasts and 24 hours after ending 30 a 24 hour fast. As shown in Figure 3A, under all conditions, the FGF-19 transgenic

WO 01/18210

PCT/US00/06471

mice (solid bars) weighed less than their wild type, non transgenic littermates (stippled bars).

Figure 3B shows the sera of the same groups of mice represented in Figure 3A, assayed for leptin. The decreased leptin in the FGF-19 transgenic mice is consistent with the lower body weights (Figure 3A) being due to decreased adiposity.

5 A group of 6 week old transgenic mice were monitored for food intake (Figure 4A), water intake (Figure 4B), urine output (Figure 4C) and hematocrit (Figure 4D). As can be seen, the FGF-19 transgenic mice (solid bars) consume more food than their wild type littermates but do not drink more. Although there is no change in water consumption, the transgenic mice do produce more urine (Figure 4C). Despite the
10 increase in urine production, the transgenic mice do not appear to be dehydrated as evidenced by the normal hematocrit (Figure 4D).

The decrease in body weight (Figure 3) with an increase in food consumption (Figure 4) could be explained by an increase in metabolic rate. The metabolic rate was determined by measuring oxygen consumption. As shown in Figure 5, the FGF-19
15 transgenic mice have an increased metabolic rate during both light cycles, following a 24 hour fast and 24 hours after ending a 24 hour fast.

Obesity and elevated triglycerides and free fatty acids are risk factors for cardiovascular disease. As FGF-19 decreases one of the risk factors for cardiovascular disease (obesity (Figure 3)), it was investigated whether FGF-19 could also lower other
20 risk factors. As can be seen in Figure 6, the level of triglycerides and free fatty acids (FFA) is also lower in the FGF-19 transgenic mice.

EXAMPLE 12

FGF-19 Infusion Leads to an Increase in Food Uptake and an Increase in Oxygen

Consumption

To confirm that the effects seen in the FGF-19 transgenic mice were caused by the FGF-19 protein, groups of non-transgenic FvB mice were infused with recombinant FGF-19 (1 mg/kg/day, iv) delivered by an osmotically driven implanted pump. As shown in Figures 7A-B, administration of recombinant human FGF-19 causes an
30 increase in food intake as compared to the mice infused with the carrier alone. In

WO 01/18210

PCT/US00/06471

addition, FGF-19 infusion leads to an increase in metabolic rate as measured by oxygen consumption.

EXAMPLE 13**FGF-19 Decreases Glucose Uptake and Increases Leprin Release from Adipocytes**

5 To further investigate the mechanism by which FGF-19 alters metabolism, recombinant human FGF-19 was added to cultures of primary rat adipocytes and glucose uptake and leptin release by the cells was measured. As shown in Figures 8A-B, FGF-19 increases the release of leptin from and decreases the uptake of glucose into primary rat adipocytes.

10

EXAMPLE 14**Investigation of Glucose Tolerance and Fat Pad Weights on FGF-19 Transgenic Mice Fed High Fat Diets**

Generally, mice (and humans) on a high fat diet will gain weight and adiposity 15 and will become either glucose intolerant or diabetic. To examine whether exposure to FGF-19 will impact on the adiposity and glucose tolerance cohorts of the transgenic mice and their non transgenic (age and sex matched), littermates were put onto a high fat diet essentially as described by Rebuffet-Scrive et al Metabolism Vol 42, No 11 1993 pp1405-1409 and Surwit et al Metabolism, Vol 44, No 5 1995 pp 645-651 with the 20 modification that the sodium content was normalized with respect to the normal chow (diets prepared by Research Diets Inc. Catalog no. D12330N).

After ten weeks on the either normal mouse chow or on the high fat diet the mice 25 (female transgenic and their non transgenic littermates) were subjected to a glucose tolerance test. Thus each mouse was injected intraperitoneally with 1.0 mg glucose per kg of body weight and the concentration of glucose present in the blood was measured at intervals following the injection. The graph in Figure 10 shows the glucose levels in the mice and demonstrates that 8/9 of the female non transgenic mice that has been fed high fat diet would be defined as diabetic (2 hour glucose levels greater than 200 mg/dl; (World Book of Diabetes in Practice, Vol 3; Ed Krall, L.P.; Elsevier)) whereas 0/5 of the 30 transgenic mice fed a comparable diet would be considered diabetic.

121

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/18210

PCT/US00/06471

The male mice that were fed the high fat diet were sacrificed after being on the diet for either 6 or 10 weeks and the adiposity determined by measuring the weights of specific fat depots. As is shown in Figure 9 the transgenic mice that had been fed a high fat diet were significantly less fat than the non transgenic littermates.

5 Deposit of Material

The following materials have been deposited with the American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

<u>Material</u>	<u>ATCC Dep. No.</u>	<u>Deposit Date</u>
DNA49435-1219	209480	November 21, 1997

10

This deposit was made under the provisions of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder (Budapest Treaty). This assures maintenance of a viable culture of the deposit for 30 years from the date of deposit. The deposit will 15 be made available by ATCC under the terms of the Budapest Treaty, and subject to an agreement between Genentech, Inc. and ATCC, which assures permanent and unrestricted availability of the progeny of the culture of the deposit to the public upon issuance of the pertinent U.S. patent or upon laying open to the public of any U.S. or foreign patent application, whichever comes first, and assures availability of the 20 progeny to one determined by the U.S. Commissioner of Patents and Trademarks to be entitled thereto according to 35 USC §122 and the Commissioner's rules pursuant thereto (including 37 CFR §1.14 with particular reference to 886 OG 638).

The assignee of the present application has agreed that if a culture of the materials on deposit should die or be lost or destroyed when cultivated under suitable 25 conditions, the materials will be promptly replaced on notification with another of the same. Availability of the deposited material is not to be construed as a license to practice the invention in contravention of the rights granted under the authority of any government in accordance with its patent laws.

The foregoing written specification is considered to be sufficient to enable one 30 skilled in the art to practice the invention. The present invention is not to be limited

WO 01/18210

PCT/US00/06471

in scope by the construct deposited, since the deposited embodiment is intended as a single illustration of certain aspects of the invention and any constructs that are functionally equivalent are within the scope of this invention. The deposit of material herein does not constitute an admission that the written description herein contained is inadequate to enable the practice of any aspect of the invention, including the best mode 5 thereof, nor is it to be construed as limiting the scope of the claims to the specific illustrations that it represents. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and fall within the scope of the appended claims.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated nucleic acid molecule which comprises DNA having at least about 80% sequence identity to (a) a DNA molecule encoding a FGF-19 polypeptide comprising the sequence of amino acid residues from about 1 or about 23 to about 216 of Figure 2 (SEQ ID NO:2), or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

5

2. The isolated nucleic acid molecule of Claim 1 comprising the sequence of nucleotide positions from about 464 or about 530 to about 1111 of Figure 1 (SEQ ID NO:1).

10 3. The isolated nucleic acid molecule of Claim 1 comprising the nucleotide sequence of Figure 1 (SEQ ID NO:1).

15 4. The isolated nucleic acid molecule of Claim 1 comprising a nucleotide sequence that encodes the sequence of amino acid residues from about 1 or about 23 to about 216 of Figure 2 (SEQ ID NO:2).

20 5. An isolated nucleic acid molecule comprising DNA which comprises at least about 80% sequence identity to (a) a DNA molecule encoding the same mature polypeptide encoded by the human protein cDNA deposited with the ATCC on November 21, 1997 under ATCC Deposit No. 209480 (DNA49435-1219), or (b) the complement of the DNA molecule of (a).

25 6. The isolated nucleic acid molecule of Claim 5 comprising DNA encoding the same mature polypeptide encoded by the human protein cDNA deposited with the ATCC on November 21, 1997 under ATCC Deposit No. 209480 (DNA49435-1219).

7. An isolated nucleic acid molecule comprising DNA which comprises at least about 80% sequence identity to (a) the full-length polypeptide coding sequence of the human protein cDNA deposited with the ATCC on November 21, 1997 under

WO 01/18210

PCT/US00/06471

ATCC Deposit No. 209480 (DNA49435-1219), or (b) the complement of the coding sequence of (a).

8. The isolated nucleic acid molecule of Claim 7 comprising the full-length 5 polypeptide coding sequence of the human protein cDNA deposited with the ATCC on November 21, 1997 under ATCC Deposit No. 209480 (DNA49435-1219).

9. An isolated nucleic acid molecule encoding a FGF-19 polypeptide comprising DNA that hybridizes to the complement of the nucleic acid sequence that 10 encodes amino acids 1 or about 23 to about 216 of Figure 2 (SEQ ID NO:2).

10. The isolated nucleic acid molecule of Claim 9, wherein the nucleic acid 15 that encodes amino acids 1 or about 23 to about 216 of Figure 2 (SEQ ID NO:2) comprises nucleotides 464 or about 530 to about 1111 of Figure 1 (SEQ ID NO:1).

11. The isolated nucleic acid molecule of Claim 9, wherein the hybridization occurs under stringent hybridization and wash conditions.

12. An isolated nucleic acid molecule comprising (a) DNA encoding a 20 polypeptide scoring at least 80% positives when compared to the sequence of amino acid residues of from 1 or about 23 to about 216 of Figure 2 (SEQ ID NO:2), or (b) the complement of the DNA of (a).

13. An isolated nucleic acid molecule comprising at least about 22 25 nucleotides and which is produced by hybridizing a test DNA molecule under stringent hybridization conditions with (a) a DNA molecule which encodes a FGF-19 polypeptide comprising a sequence of amino acid residues from 1 or about 23 to about 216 of Figure 2 (SEQ ID NO:2), or (b) the complement of the DNA molecule of (a), and isolating the test DNA molecule.

30

125

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/18210

PCT/US00/06471

14. The isolated nucleic acid molecule of Claim 13, which has at least about 80% sequence identity to (a) or (b).

15. A vector comprising the nucleic acid molecule of any one of Claims 1 to 14.

5

16. The vector of Claim 15, wherein said nucleic acid molecule is operably linked to control sequences recognized by a host cell transformed with the vector.

10 17. A nucleic acid molecule deposited with the ATCC under accession number 209480 (DNA49435-1219).

18. A host cell comprising the vector of Claim 15.

15 19. The host cell of Claim 18, wherein said cell is a CHO cell.

20. The host cell of Claim 18, wherein said cell is an *E. coli*.

21. The host cell of Claim 18, wherein said cell is a yeast cell.

20 22. A process for producing a FGF-19 polypeptide comprising culturing the host cell of Claim 18 under conditions suitable for expression of said FGF-19 polypeptide and recovering said FGF-19 polypeptide from the cell culture.

25 23. An isolated FGF-19 polypeptide comprising an amino acid sequence comprising at least about 80% sequence identity to the sequence of amino acid residues from about 1 or about 23 to about 216 of Figure 2 (SEQ ID NO:2).

30 24. The isolated FGF-19 polypeptide of Claim 23 comprising amino acid residues 1 or about 23 to about 216 of Figure 2 (SEQ ID NO:2).

126

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/18210

PCT/US00/06471

25. An isolated FGF-19 polypeptide having at least about 80% sequence identity to the polypeptide encoded by the cDNA insert of the vector deposited with the ATCC on November 21, 1997 as ATCC Deposit No. 209480 (DNA49435-1219).

26. The isolated FGF-19 polypeptide of Claim 25 which is encoded by the 5 cDNA insert of the vector deposited with the ATCC on November 21, 1997 as ATCC Deposit No. 209480 (DNA49435-1219).

27. An isolated FGF-19 polypeptide scoring at least 80% positives when compared to the sequence of amino acid residues from 1 or about 23 to about 216 of 10 Figure 2 (SEQ ID NO:2).

28. An isolated PGF-19 polypeptide comprising the sequence of amino acid residues from 1 or about 23 to about 216 of Figure 2 (SEQ ID NO:2), or a fragment thereof sufficient to provide a binding site for an anti-FGF-19 antibody.

15 29. An isolated polypeptide produced by (i) hybridizing a test DNA molecule under stringent conditions with (a) a DNA molecule encoding a FGF-19 polypeptide comprising the sequence of amino acid residues from 1 or about 23 to about 216 of Figure 2 (SEQ ID NO:2), or (b) the complement of the DNA molecule of (a), (ii) 20 culturing a host cell comprising said test DNA molecule under conditions suitable for the expression of said polypeptide, and (iii) recovering said polypeptide from the cell culture.

30. The isolated polypeptide of Claim 29, wherein said test DNA has at least 25 about 80% sequence identity to (a) or (b).

31. A chimeric molecule comprising a PGF-19 polypeptide fused to a heterologous amino acid sequence.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

32. The chimeric molecule of Claim 31, wherein said heterologous amino acid sequence is an epitope tag sequence.

33. The chimeric molecule of Claim 31, wherein said heterologous amino acid sequence is a Fc region of an immunoglobulin.

5

34. An antibody which specifically binds to a FGF-19 polypeptide.

35. The antibody of Claim 34, wherein said antibody is a monoclonal antibody.

10

36. The antibody of Claim 34, wherein said antibody is a humanized antibody.

15

37. The antibody of Claim 34, wherein said antibody is an antibody fragment.

38. An agonist to a FGF-19 polypeptide.

39. An antagonist to a FGF-19 polypeptide.

20

40. A composition of matter comprising (a) a FGF-19 polypeptide, (b) an agonist to a FGF-19 polypeptide, (c) an antagonist to a FGF-19 polypeptide, or (d) an anti-FGF-19 antibody in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier.

25

41. A method for screening for a bioactive agent capable of binding to FGF-19 comprising:

- a) adding a candidate bioactive agent to a sample of FGF-19; and
- b) determining the binding of said candidate agent to said FGF-19, wherein binding indicates a bioactive agent capable of binding to FGF-19.

30

WO 01/18210

PCT/US00/06471

42. A method for screening for a bioactive agent capable of modulating the activity of FGF-19, said method comprising the steps of:

- a) adding a candidate bioactive agent to a sample of FGF-19; and
- (b) determining an alteration in the biological activity of FGF-19, wherein an alteration indicates a bioactive agent capable of modulating the activity of FGF-19.

5

43. A method according to Claim 42, wherein said biological activity is decreased uptake of glucose in adipocytes.

44. A method according to Claim 42, wherein said biological activity is increased leptin release from adipocytes.

45. A method of identifying a receptor for FGF-19, said method comprising combining FGF-19 with a composition comprising cell membrane material wherein said FGF-19 complexes with a receptor on said cell membrane material, and identifying said receptor as a FGF-19 receptor.

46. The method of Claim 45 wherein FGF-19 binds to said receptor, and said method further includes a step of crosslinking said FGF-19 and receptor.

20 47. The method of Claim 45, wherein said composition is a cell.

48. The method of Claim 45, wherein said composition is a cell membrane extract preparation.

25 49. A method of inducing leptin release from adipocyte cells, said method comprising administering FGF-19 to said cells in an amount effective to induce leptin release.

50. The method of Claim 49, wherein said FGF-19 is administered as a
30 protein.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

51. The method of Claim 49, wherein said FGF-19 is administered as a nucleic acid.

52. A method of inducing a decrease in glucose uptake in adipocyte cells, said method comprising administering FGF-19 to said cells in an amount effective to 5 induce a decrease in glucose uptake.

53. The method of Claim 52, wherein said FGF-19 is administered as a protein.

10 54. The method of Claim 52, wherein said FGF-19 is administered as a nucleic acid.

55. A method of treating an individual for obesity, said method comprising administering to said individual a composition comprising FGF-19 in an amount 15 effective to treat said obesity.

56. The method of Claim 55, wherein said treatment of obesity further results in the treatment of a condition related to obesity.

20 57. The method of Claim 55, wherein said FGF-19 is administered as a protein.

58. The method of Claim 55, wherein said FGF-19 is administered as a nucleic acid.

25 59. The method of Claim 55, wherein said composition further comprises a pharmaceutical acceptable carrier.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

60. The method according to Claim 55, whererin said FGF-19 has at least about 85% amino acid sequence identity to the amino acid sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2).

61. A method of reducing total body mass in an individual, said method comprising administering to said individual an effective amount of FGF-19.

62. The method of Claim 61, wherein said FGF-19 is administered as a protein.

10 63. The method of Claim 61, wherein said FGF-19 is administered as a nucleic acid.

64. The method of Claim 61, wherein said FGF-19 is administered with a pharmaceutical acceptable carrier.

15 65. The method of Claim 61, wherein said reduction in total body mass includes a reduction in fat of said individual.

66. The method according to Claim 61, whererin said FGF-19 has at least about 85% amino acid sequence identity to the amino acid sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2).

20 67. A method of reducing the level of at least one of triglycerides and free fatty acids in an individual, said method comprising administering to said individual an effective amount of FGF-19.

25 68. The method of Claim 67, wherein said FGF-19 is administered as a protein.

WO 01/18210

PCT/US00/06471

69. The method of Claim 67, wherein said FGF-19 is administered as a nucleic acid.

70. The method of Claim 67, wherein said FGF-19 is administered with a pharmaceutical acceptable carrier.

5

71. The method according to Claim 67, whererin said FGF-19 has at least about 85% amino acid sequence identity to the amino acid sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2).

10 72. A method of increasing the metabolic rate in an individual, said method comprising administering to said individual an effective amount of FGP-19.

73. The method of Claim 72, wherein said FGF-19 is administered as a protein.

15

74. The method of Claim 72, wherein said FGF-19 is administered as a nucleic acid.

75. The method of Claim 72, wherein said FGF-19 is administered with a 20 pharmaceutical acceptable carrier.

25

76. The method according to Claim 72, whererin said FGF-19 has at least about 85% amino acid sequence identity to the amino acid sequence shown in Figure 2 (SEQ ID NO:2).

77. A rodent comprising a genome comprising a transgene encoding FGF-19.

GCTCCCAGCCAAGAACCTGGGGCCGTCGCGGGTGGGGAGGAGTCCCCGAAACCCGGCG
 CTAACGGAGGGCTCCCTCCCGCAGATCCCAGGGCTGGGGGGGTCAACCCGGCTGGGA
 CAAGAAGCCCCCGCCTGCCCTGCCCGGCCCGGGAGGGGCTGGGGGTGGGGCCGGAGCGG
 GGTGTGAAGTGGGTGTGCGGGGGGGAGGCTTGATGCAATCCCATAAGAAATGCTCGG
 TGCTTGGGACACTTACCCGCTGGGCGCTAAGGGGCTACTATATAAGGCTGCCGGCCGGAG
 CGCGCGCGCGTCAAGAGCAGGAGCCTGCCCTCAGGATCTAGGGCCACGACCATCCACCC
 GGCACATCACAGCCCCGAGCAGCATCCCGTCGCCGCCAGCCTCCGCACCCCCATCGCCG
 AGCTGCCAGAGAGCCCCAGGGAGGTGCCATGCCAGGGGGTGTGGTGTCCACGTATGG
 ATCCCTGGCCGCGCTCTGCCCTGGCCGCGGCCCGCTGCCCTCTCGGACCCGGGGCC
 CCACGTGCACTACGGCTGGGGGACCCCATCCGCCTGCCGACCTGTACACCTCCGGCCCC
 ACGGCTCTCCAGCTGCCGATCCCGTGGCAGGGCTGTGACTGCCGGGGGG
 CAGAGCGGACACAGTTGCTGGAGATCAAGGACGTGCTCTGGGACCGTGGGATCAAGGG
 CGTGGCACCGTGGGTACCTCTGATGGGGCCGACGCCAAGATGCAAGGGCTGCTTCAGT
 ACTCGGAGGAAGACTGCTCTGAGGGAGATGCCAGTGGCTACATGTGACCGA
 TCCGAGAAAGCACCCTCCCGTCTCCCTGAGCACTGCCAAACAGCGCAGCTGACAAAGAA
 CAGAGGCTTCTCCACTCTCATTTCTGCCCATGCTGCCCATGGTCCCAGAGGGAGCTG
 AGGACCTCAGGGACTCTGGAAATCTGACATGTTCTCGCCCGTGGAGACGACAGCATG
 GACCCATTGGCTTGTCAGGACTGGGGCTGTGAGACTCCACGTTGAGAGTAACT
 GAGACCATGCCGGCCCTTCACTGCTGCCAGGGCTGTGGTACCTGCAAGGTGGGAGC
 TGCTTCAAGAGAACAGTCTGAGCTCCACGGTCTGTTAGCTTAAAGAGAACATCTGAA
 GTTGTACATATTAGACTTTCCATTCGCACTGGCAGTTCTGACCAATAGACTGTCGAT
 CATAACATTGTAAGCCTGTAGCTTGCCCAAGCTGCTGCCCTGGGCCCCCATCTGCTCCCTCGA
 GTGCTGGACAGCTGCTGCACTGCTCATGTTCTGCTGAATACCTCATGATGGGAAAC
 TCACITCCTTGGAAAATTCTTATGTCAGCTGAAATTCTCATATTCTCATCACTTC
 CCCAGGGAGGGAGAACAGCAGGCACTGTTAAATTCAAGGACAGGTGATCCACTCTGTA
 AACACGCAAGTAAATTCACTCAACCCCATGTCAGGAAATTGATCTATCTCATCTCCAGGG
 ACCATTGGCTTCCAAATCCCTCAGGCCAGAACTGACTGAGGAGCAGGATGGCCACAG
 GCTTCAGGAGTAGGGGAAGCCCTGGAGCCCCACTCCAGGCCCTGGGACAACTTGAGAATTCCCC
 CTGAGGCCACTTCTGTCATGGATGCTCTCTGAGATAACTTGTGTCCTGGTGTGCTCCCGTGTACCTG
 TTCCATCTCCAGGCCACCCAGCCCTCTGCCACCTCACATGCCCTCCCACTGGATTGGGCGCT
 CCCAGGCCACCCACCTTATGTAACCTGCACTTCTGTTCAAAAATCAAGGAAAAGAAAAGAT
 TTGAAGACCCCAAGTCTGTCATAAACTGATGTTGAGTAATTATTTGATATGTACA
 CCTTCCCCAGCACTTGGTTTCAACATGATAATTATGAGTAATTATTTGATATGTACA
 TCTCTTATTCTTACATTATTTATGCCAAAATTATATTATGATGATGAAAGTCAAGGTTG
 TTTGATATTAAATGGACTTGTGTTG

FIG. 1

WO 01/18210

PCT/US00/06471

2/9

MRSGCVVVHVWILAGLWLAVAGRPLAFSDAGPHVHYGWDPIRLRHLYTSGPHGLSSCFLRI
RADGVVDCARGQSAHSLEIKAVALRTVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQQLQYSEEDCAFEET
EIRPDGYNVYRSEKHLPLVSLSSAKQRQLYKNRGFLPLSHFLPMLPMVPEEPEDLRGHLESD
MFSSPLETDSMDPFGLVTGLEAVRSPSPFKEK

signal peptide:
amino acids 1-22

N-myristoylation sites:
amino acids 15-21, 54-60, 66-72, 201-207

Prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site:
amino acids 48-59

HBGF/FGF domain:
amino acids 80-131

FIG. 2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

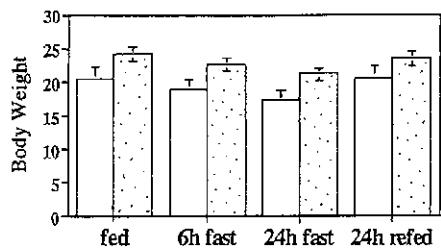
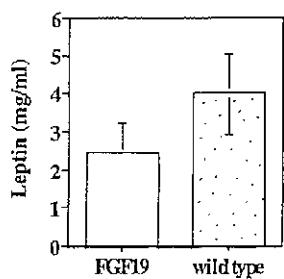
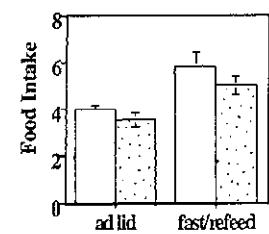
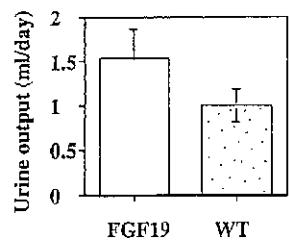
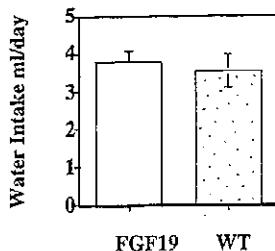
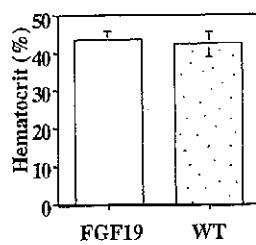
**FIG. 3A****FIG. 3B**

FIG. 4A**FIG. 4B****FIG. 4C****FIG. 4D**

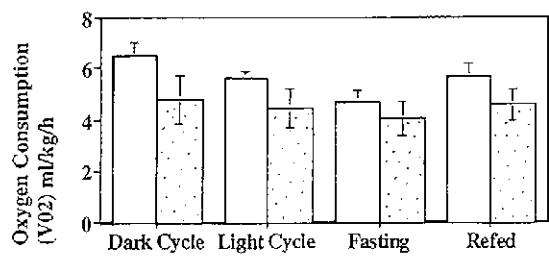
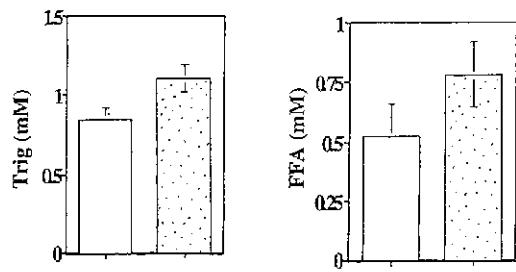


FIG. 5



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

6 / 9

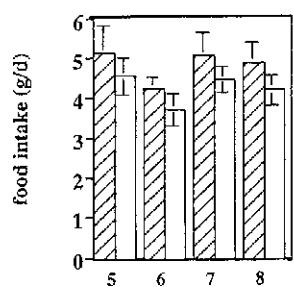


FIG. 7A

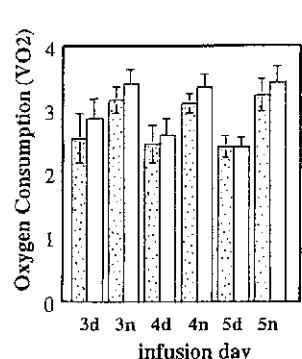


FIG. 7B

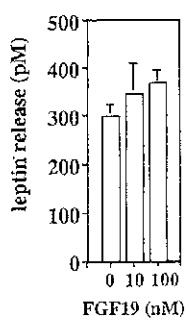


FIG. 8A

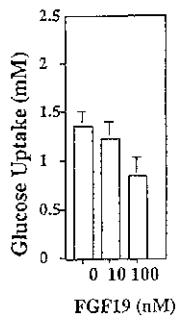


FIG. 8B

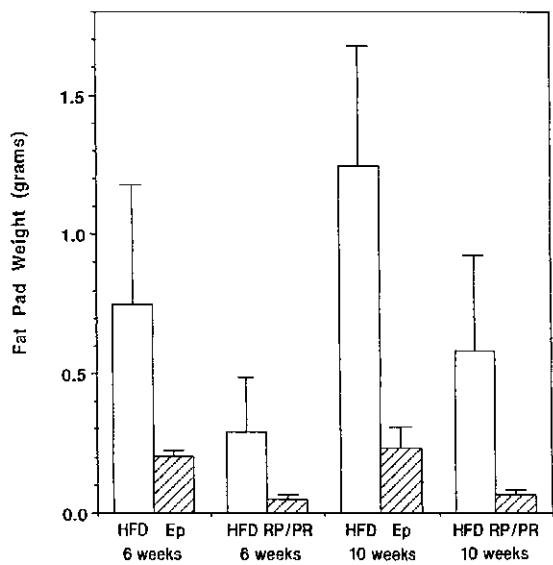


FIG. 9

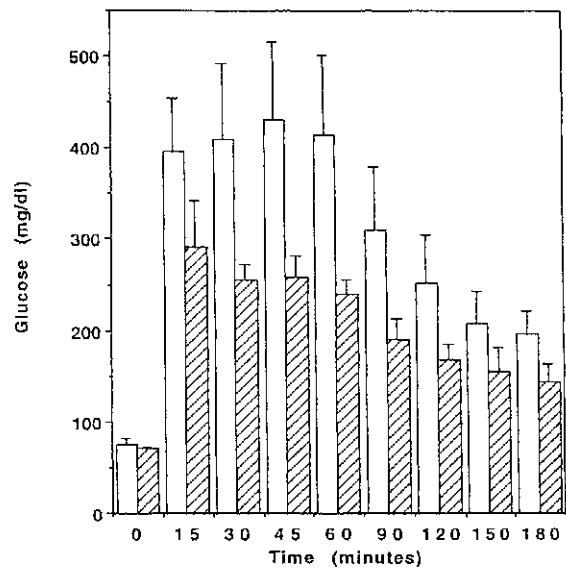


FIG. 10

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l. Appl. No. PCT/US 00/06471
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/50 C12N15/62 C07K16/18 G01N33/53 A61K38/18 A61K31/70 A01K67/027		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K G01N A61K A01K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) STRAND, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevant to claim No.
X	XIE M -H ET AL: "FGF-19, A NOVEL FIBROBLAST GROWTH FACTOR WITH UNIQUE SPECIFICITY FOR FGFR4", CYTOKINE, US, ACADEMIC PRESS LTD, PHILADELPHIA, PA, vol. 11, no. 10, 1999, pages 729-735, XP000909423 ISSN: 1043-4666 the whole document -----	1-41, 45-48 -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on, or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *D* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *R* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
11 August 2000	18/08/2000	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. SB16 Patentean 2 NL-2280 HAGA Tel. (+31-70) 340-3010, Tx. 31 651 epo nl Fax. (+31-70) 340-3018		Authorized officer Smalt, R

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inte nal Application No PCT/US 00/06471
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ¹	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>NISHIMURA ET AL: "Structure and expression of a novel human FGF, FGF-19, expressed in fetal brain" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, NL, AMSTERDAM, vol. 1444, no. 1444, 18 January 1999 (1999-01-18), pages 148-151, XP002099435 ISSN: 0006-3002 the whole document</p> <p>---</p>	1-41
X,L	<p>WO 99 27100 A (GENENTECH INC ;BOTSTEIN DAVID (US); GODDARD AUDREY (US); GURNEY AU) 3 June 1999 (1999-06-03) L: priority. the whole document</p> <p>---</p>	1-41,77
X,L	<p>WO 99 14327 A (GENENTECH INC ;GURNEY AUSTIN (US); BOTSTEIN DAVID (US); GODDARD AU) 25 March 1999 (1999-03-25) See whole document, particularly passages relating to PRO533. L: priority.</p> <p>---</p>	1-41,77
X,L	<p>WO 99 14328 A (CHEN JIAN ;GENENTECH INC (US); PENNICA DIANE (US); YUAN JEAN (US);) 25 March 1999 (1999-03-25) See whole document, particularly passages relating to PRO533. L: priority.</p> <p>---</p>	1-41,77

Form PCT/ISA210 (continuation of record sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			
Information on patent family members			
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9927100 A	03-06-1999	US 6000943 A 14-12-1999 AU 1703399 A 15-06-1999 AU 9312198 A 05-04-1999 WO 9914327 A 25-03-1999 WO 9914328 A 25-03-1999	
WO 9914327 A	25-03-1999	AU 9312198 A 05-04-1999 AU 9317898 A 05-04-1999 AU 9484398 A 05-04-1999 WO 9914234 A 25-03-1999 WO 9914328 A 25-03-1999 AU 9395998 A 05-04-1999 WO 9914241 A 25-03-1999 AU 1126099 A 17-05-1999 AU 1288399 A 17-05-1999 WO 9921998 A 06-05-1999 WO 9921999 A 06-05-1999 AU 1703399 A 15-06-1999 WO 9927100 A 03-06-1999	
WO 9914328 A	25-03-1999	AU 9317898 A 05-04-1999 ZA 9808460 A 19-03-1999 AU 9312198 A 05-04-1999 AU 9484398 A 05-04-1999 WO 9914327 A 25-03-1999 WO 9914234 A 25-03-1999 AU 9395998 A 05-04-1999 WO 9914241 A 25-03-1999 AU 9317498 A 05-04-1999 AU 1126099 A 17-05-1999 AU 1288399 A 17-05-1999 WO 9921998 A 06-05-1999 WO 9921999 A 06-05-1999 AU 1532499 A 15-06-1999 WO 9927098 A 03-06-1999 AU 1703399 A 15-06-1999 WO 9927100 A 03-06-1999	

Form PCT/ISA/2.19 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 3/00	A 6 1 P 3/04	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 3/06	4 H 0 4 5
A 6 1 P 3/06	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 7/02	
A 6 1 P 7/02	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 15/00	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 19/00	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/46	
C 0 7 K 16/46	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	C 1 2 N 5/00	B
G 0 1 N 33/50	A 6 1 K 37/24	
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 P 21/08	

(31) 優先権主張番号 PCT/US00/04414

(32) 優先日 平成12年2月22日(2000.2.22)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW), EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM), EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE), OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

UNIX

(72) 発明者 トムリンソン,エリザベス

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94044, パシフィカ, エスプラネード アヴェニュー

3 350

F ターム(参考) 2G045 AA40 DA12 DA13 DA36 FB02 FB03

4B024 AA01 AA11 BA21 CA04 DA02 DA06 DA12 HA01 HA03 HA14

HA17

