

(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2004-502418

(P2004-502418A)

(43) 公表日 平成16年1月29日(2004.1.29)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 4
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 3/10	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 241 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-507876 (P2002-507876)	(71) 出願人	500056297 キュラジェン コーポレイション アメリカ合衆国 コネチカット州 065 11 ニュー ヘイブン ロング ウォー フ ドライブ 555
(86) (22) 出願日	平成13年7月3日 (2001.7.3)	(74) 代理人	100107489 弁理士 大塩 竹志
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月26日 (2002.12.26)	(72) 発明者	ジェファーズ, マイケル アメリカ合衆国 コネチカット 0640 5, ブランフォード, フラックス ミ ル ホロー 14
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/021191	(72) 発明者	シムケッツ, リチャード エイ. アメリカ合衆国 コネチカット 0651 6, ウエスト ヘイブン, リート ス トリート 191
(87) 国際公開番号	W02002/002625		
(87) 国際公開日	平成14年1月10日 (2002.1.10)		
(31) 優先権主張番号	09/609, 543		
(32) 優先日	平成12年7月3日 (2000.7.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規の線維芽細胞増殖因子およびそれをコードする核酸

(57) 【要約】

本発明は、新規の単離されたポリペプチドおよびこれらをコードするポリヌクレオチドを提供し、これらのポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体、またはこれらのポリペプチド、ポリヌクレオチドもしくは抗体の、任意の誘導体、改変体、変異体もしくはフラグメントを提供する。本発明はさらに、これらのポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび抗体を、広い範囲の病理学的状態の検出および処置に利用する方法、ならびに他の使用を提供する。

```

1
ATGGCTCCCTTAGCCGAAAGTCGGGGCTTTCTGGGCGGCTGGAG
MetAlaProLeuAlaGluValGlyGlyPheLeuGlyLeuGlu
46
GGCTTCGGCCAGGAGTGGATTCGCAATTCCTGTGCTCCTCC
GlyLeuGlyGlnGlnValGlySerHisPheLeuLeuProProAla
91
GGGAGCGGTCGGCCCTGTGGCTGAGCCAGGACCCGGCCGAG
GlyGluArgProProLeuLeuGlyGluArgArgSerAlaAlaGlu
136
CGAGCCCGCCCGGGGTCGGGGCTGGCAGCTGGCCGACCTC
ArgSerAlaArgGlyGlyProGlyAlaAlaGlnLeuAlaHisLeu
181
CACGGCAATCCTGGCCGCGGCGGCTCTATTCGCCACCCGGCTC
HisClyIleLeuArgArgGlnLeuLeuTyrCysArgThrGlyPhe
226
CACCTGCAGATCCTGCCCCACGGCAGCTGCAGGCCACCCGGCAG
HisLeuGlnIleLeuProAspGlySerValGlnGlyThrArgGln
271
GACCACAGCCATTCGGTATCAGAAATTCCTCAGTGTGGCAGTG
AspHisSerLeuPheClyIleLeuGluIleSerValAlaVal
316
CGACTGGTCAATATTAGAGGTCGGACAGTGGTCTCTATCTTGG
GlyLeuValSerIleArgGlyValPheSerGlyLeuTyrLeuGly
361
ATGAATGACAAAGGAGACTCTATGATCAGAGAAACTTACTTCC
MetAsnAspLysGlyIleLeuTyrGlySerIleLeuLeuThrLcr
406
CAATCCACTCTTACCGAGCAGTTTCAAGACAACCTGGTATAACCC
GluCysIlePheArgGluGlnPheGluGluAsnTyrTyrAsnThr
451
TATTCAATTAACATATATAAACATGGAGACTGGCCGCGAGTAT
TyrSerSerAsnIleTyrLysHisGlyAsnThrGlyArgArgTyr
496
TTTGTGCCACTTAACAAGACGGAACTCCAACAGATGGCCGAGG
PheValAlaLeuAsnLysAspGlyThrProArgAspGlyAlaArg
541
TCCAAAGACATCAGAAATTCACACTTTCTTAACTAAJACUAGG
SerLysArgHisGlnLysPheThrHisIleLeuProArgProVal
586
GATCCAGATACCTTCCGAATTCATACAGCACTACTGATGTAC
AspProGluArgValProGluLeuTyrLysAspLeuLeuMetTyr
631
ACT
Thr
    
```

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

単離されたポリペプチドであって、以下：

- (a) 配列番号 2 または 27 により規定されるアミノ酸配列；
- (b) 配列番号 2 または 27 により規定されるアミノ酸配列の改変体であって、ここで、選択された配列において特定される任意のアミノ酸が、異なるアミノ酸に変化しており、ただし、該配列のうちの 15% 以下のアミノ酸残基が、このように変化している、改変体；
- (c) 配列番号 2 または 27 により規定されるアミノ酸配列の成熟形態；
- (d) 配列番号 2 または 27 により規定されるアミノ酸配列の成熟形態の改変体であって、ここで該選択された配列の成熟形態における任意のアミノ酸が、異なるアミノ酸配列に変化しており、ただし、該成熟形態の配列のうちの 15% 以下のアミノ酸残基が、このように変化している、改変体；ならびに
- (e) (a) ~ (d) の段落に記載されるアミノ酸配列のフラグメント、
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

10

【請求項 2】

請求項 1 に記載のポリペプチドのフラグメント。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のポリペプチドであって、ここで、該ポリペプチドが、配列番号 2 または 27 の天然に存在する対立遺伝子改変体である、ポリペプチド。

20

【請求項 4】

請求項 3 に記載のポリペプチドであって、ここで、前記改変体が、単一のヌクレオチドの多型の翻訳産物である、ポリペプチド。

【請求項 5】

請求項 1 に記載のポリペプチドであって、該ポリペプチド、は、改変体ポリペプチドであり、ここで、配列番号 2 または 27 において特定される 1 つ以上の任意のアミノ酸が、保存的置換を提供するよう変化される、ポリペプチド。

【請求項 6】

単離された核酸分子であって、該核酸分子が、以下：

- (a) 配列番号 2 または 27 に含まれるポリペプチド；
- (b) 配列番号 2 または 27 の改変体であって、ここで、選択された配列において特定される任意のアミノ酸が、異なるアミノ酸に変化しており、ただし、配列のうちの 15% 以下のアミノ酸残基が、このように変化している、改変体；
- (c) 配列番号 2 または 27 により規定されるアミノ酸配列の成熟形態；
- (d) 配列番号 2 または 27 により規定されるアミノ酸配列の成熟形態の改変体であって、選択された配列の成熟形態中の任意のアミノ酸が、異なるアミノ酸に変化しており、ただし、該成熟形態の配列のうちの 15% 以下のアミノ酸残基が、このように変化している、改変体；
- (e) (a) ~ (d) において記載されるアミノ酸配列のフラグメント；ならびに
- (f) (a) ~ (e) の段落中に記載される該核酸分子のいずれかの相補体、からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む、核酸分子。

30

40

【請求項 7】

請求項 6 に記載の核酸分子であって、ここで、該核酸分子が天然に存在する対立遺伝子核酸改変体のヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の核酸分子であって、ここで、該核酸分子が、天然に存在するポリペプチド改変体のポリペプチド配列を含む改変体ポリペプチドをコードする、核酸分子。

【請求項 9】

請求項 6 に記載の核酸分子であって、ここで、該核酸分子が、前記改変体ポリペプチドを

50

コードする、単一のヌクレオチドの多型を含む、核酸分子。

【請求項 10】

請求項 6 に記載の核酸分子であって、ここで、該核酸分子が以下：

- (a) 配列番号 1 または 26 により規定されるヌクレオチド配列；
 - (b) ヌクレオチド配列であって、ここで、配列番号 1 によって規定されるヌクレオチド配列における 1 つ以上のヌクレオチドが、選択された配列によって与えられるヌクレオチドから異なるヌクレオチドに変化しており、ただし、20% 以下のヌクレオチドが、このように変化している、ヌクレオチド配列；
 - (c) (a) に記載の配列の核酸フラグメント；
 - (d) (b) に記載の配列の核酸フラグメント；ならびに
 - (e) 該核酸分子のいずれかの相補体
- からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

10

【請求項 11】

請求項 6 に記載の核酸分子であって、ここで、該核酸分子が、ヌクレオチド配列を含み、ここで、該ヌクレオチド配列において、選択されたヌクレオチド配列のコード配列において特定される任意のヌクレオチドが、選択された配列によって規定されるヌクレオチドから異なるヌクレオチドに変化しており、ただし、選択された該コード配列における 20% 以下のヌクレオチドが、このように変化している、核酸分子。

【請求項 12】

F G F - C X ポリペプチドのフラグメントをコードする単離された核酸分子。

20

【請求項 13】

前記 F G F - C X ポリペプチドが、配列番号 2 または 27 の改変体である、請求項 12 に記載の核酸分子。

【請求項 14】

前記 F G F - C X ポリペプチドが、成熟 F G F - C X ポリペプチドである、請求項 12 に記載の核酸分子。

【請求項 15】

前記 F G F - C X ポリペプチドが、配列番号 2 または 27 の成熟形態の改変体である、請求項 12 に記載の核酸分子。

【請求項 16】

請求項 6 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

30

【請求項 17】

請求項 16 に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項 18】

請求項 1 に記載のポリペプチドに免疫特異的に結合する、抗体。

【請求項 19】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 18 に記載の抗体。

【請求項 20】

前記抗体がヒト化抗体または抗体である、請求項 18 に記載の抗体。

【請求項 21】

サンプル中の請求項 1 に記載のポリペプチドの存在または量を決定するための方法であって、該方法は、以下：

40

- (a) 該サンプルを提供する工程；
 - (b) 該サンプルを、該ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体と接触させる工程；および
 - (c) 該ポリペプチドに結合した抗体の存在または量を決定して、それによって該サンプル中のポリペプチドの存在または量を決定する工程、
- を包含する、方法。

【請求項 22】

サンプル中の請求項 6 に記載の核酸分子の存在または量を決定するための方法であって、

50

該方法は、以下：

(a) 該サンプルを提供する工程；

(b) 該サンプルを、該核酸分子に結合するプローブと接触させる工程；および

(c) 該核酸分子に結合した該プローブの存在または量を決定して、それによって該サンプル中の該核酸分子の存在または量を決定して、それによって該サンプル中のポリペプチドの存在または量を決定する工程、

を包含する、方法。

【請求項 2 3】

請求項 1 に記載のポリペプチドに結合する因子を同定する方法であって、該方法は、以下

10

(a) 該ポリペプチドを候補物質と接触させる工程；および

(b) 該候補物質が該ポリペプチドに結合するか否かを決定し、ここで結合する候補物質が該因子である工程；

を包含する、方法。

【請求項 2 4】

前記候補物質が、約 1 5 0 0 D a 以下の分子量を有する、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

請求項 1 に記載のポリペプチドの活性を調節するための方法であって、該方法は、該ポリペプチドと、該ポリペプチドの活性を調節するのに十分な量で、該ポリペプチドに結合する化合物とを接触させる工程を包含する、方法。

20

【請求項 2 6】

病理を処置する際に使用するための潜在的な治療剤を同定するための方法であって、ここで、該病理が、請求項 1 に記載のポリペプチドの異常な発現、異常なプロセッシングまたは異常な生理学的相互作用に関連しており、該方法が、以下：

(a) 該ポリペプチドを発現し、かつ該ポリペプチドに起因する特性または機能を有する、細胞を提供する工程；

(b) 工程 (a) において提供される該細胞を、試験因子と接触させる工程；および

(c) 該試験因子が該ポリペプチドに起因する特性または機能を変化させるか否かを決定し、これによって、該試験因子の存在下で観察される該ポリペプチドの特性または機能の変更が、該試験因子が、潜在的な治療剤であることを示す、工程

30

を包含する、方法。

【請求項 2 7】

請求項 2 6 に記載の方法であって、前記潜在的治療因子を、前記治療的因子を同定するためのさらなる試験に提供する工程をさらに包含する、方法。

【請求項 2 8】

前記候補物質が抗体であるか、または、約 1 5 0 0 D a 以下の分子量を有する、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記特性または機能が細胞の成長もしくは増殖を含む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 0】

40

前記試験因子が前記ポリペプチドに結合する、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

請求項 2 6 に記載の方法に従って同定される治療的因子。

【請求項 3 2】

請求項 2 7 に記載の方法を用いて同定される治療的因子。

【請求項 3 3】

前記因子が、抗体であるかまたは約 1 5 0 0 D a 以下の分子量を有する、請求項 3 1 に記載の治療的因子。

【請求項 3 4】

請求項 1 に記載されるポリペプチド関連障害を処置または予防する方法であって、ここで

50

該障害は、細胞または組織の不十分もしくは非効率的な増殖により特徴付けられ、該方法は、被験体における該ポリペプチド関連障害を処置または予防するに十分な量および期間で、請求項 1 に記載のポリペプチドを、該被験体に投与する工程を包含し、ここで該被験体が、該障害に罹患しているかまたは該障害易発性であると考えられる、方法。

【請求項 3 5】

前記被験体がヒトである、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

請求項 1 に記載されるタンパク質の、異常な発現、異常なプロセッシングまたは異常な生理学的相互作用に関連する障害を処置または予防する方法であって、ここで該障害は、細胞または組織の不十分もしくは非効率的な増殖により特徴付けられ、該方法は、被験体における該障害を処置または予防するに十分な量および期間で、請求項 6 に記載の核酸を、該被験体に投与する工程を包含し、ここで該被験体が、該障害に罹患しているかまたは該障害易発性であると考えられる、方法。

10

【請求項 3 7】

前記被験体がヒトである、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

請求項 1 に記載されるタンパク質の、異常な発現、異常なプロセッシングまたは異常な生理学的相互作用に関連する障害を処置または予防する方法であって、ここで該障害は、細胞または組織の過形成もしくは新形成により特徴付けられ、該方法は、被験体における該障害を処置または予防するに十分な量で、治療剤を、該被験体に投与する工程を包含し、ここで該被験体が、該障害に罹患しているかまたは該障害易発性であると考えられる、方法。

20

【請求項 3 9】

前記治療剤が、請求項 1 8 に記載される抗体である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記被験体がヒトである、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 1】

請求項 1 に記載のポリペプチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含有する、薬学的組成物。

【請求項 4 2】

請求項 6 に記載の核酸分子および薬学的に受容可能なキャリアを含有する、薬学的組成物。

30

【請求項 4 3】

請求項 1 8 に記載の抗体および薬学的に受容可能なキャリアを含有する、薬学的組成物。

【請求項 4 4】

請求項 3 1 に記載の治療的因子および薬学的に受容可能なキャリアを含有する、薬学的組成物。

【請求項 4 5】

前記治療的因子が、約 1 5 0 0 D a 以下の分子量を有する、請求項 4 4 に記載の薬学的組成物。

40

【請求項 4 6】

請求項 4 1 に記載の薬学的組成物を 1 つ以上の容器に含む、キット。

【請求項 4 7】

請求項 4 2 に記載の薬学的組成物を 1 つ以上の容器に含む、キット。

【請求項 4 8】

請求項 4 3 に記載の薬学的組成物を 1 つ以上の容器に含む、キット。

【請求項 4 9】

請求項 1 に記載されるポリペプチドの、異常な発現、異常なプロセッシングまたは異常な生理学的相互作用に関連する障害に対する潜在性もしくは素因性のモジュレーターをスクリーニングするための方法であって、該方法は、以下の工程：

50

- a) 該障害に対するリスクの増大した試験動物を提供し、ここで、該試験動物が、請求項 1 に記載のポリペプチドを組換え発現する、工程；
- b) 試験化合物を、該試験動物に投与する工程；
- c) 工程 (a) の化合物を投与した後、該試験動物における該ポリペプチドの活性を測定する工程；および
- d) 該試験動物における該タンパク質の活性を、該化合物を投与していないコントロール動物における該ポリペプチドの活性と比較し、ここで、該試験動物における該ポリペプチドの活性の、該コントロール動物と比較した変化が、該試験化合物が該障害に対する潜在性もしくは素因性のモジュレーターであることを示す工程、
- を包含する、方法。

10

【請求項 50】

請求項 49 に記載の方法であって、ここで、前記試験動物が、野生型試験動物に対して増加したレベルで、試験タンパク質導入遺伝子を発現するかまたはプロモーターの制御下で該導入遺伝子を発現する、組換え試験動物であり、ここで、該プロモーターは、該導入遺伝子のネイティブな遺伝子プロモーターではない、方法。

【請求項 51】

第 1 の哺乳動物被験体における請求項 1 に記載のポリペプチドの変化したレベルと関連する疾患の存在または素因を決定するための方法であって、該方法が、以下：

a) 該第 1 の哺乳動物被験体由来のサンプル中の該ポリペプチドの発現レベルを測定する工程；および

20

b) 工程 (a) の該サンプル中の該ポリペプチドの量を、該疾患を有さないことが既知であるかまたは該疾患にかかりにくいことが既知の、第 2 の哺乳動物被験体由来のコントロールサンプル中に存在する該ポリペプチドの量と比較する工程であって、ここで、該コントロールサンプルと比較した場合の該第 1 の被験体における該ポリペプチドの発現レベルにおける変化が、該疾患の存在または素因を示す、工程

を包含する、方法。

【請求項 52】

第 1 の哺乳動物被験体における請求項 6 に記載の核酸分子の変化したレベルと関連する疾患の存在または素因を決定するための方法であって、該方法が、以下：

a) 該第 1 の哺乳動物被験体由来のサンプル中の該核酸の量を測定する工程；および

30

b) 工程 a) の該サンプル中の該核酸の量を、該疾患を有さないことが既知であるかまたは該疾患にかかりにくいことが既知の、第 2 の哺乳動物被験体由来のコントロールサンプル中に存在する該核酸の量と比較する工程であって、ここで、該コントロールサンプルと比較した場合の該第 1 の被験体における該核酸のレベルにおける変化が、該疾患の存在または素因を示す、工程

を包含する、方法。

【請求項 53】

哺乳動物において病理学的状態を処置する方法であって、ここで、該病理が請求項 1 に記載されるポリペプチドの、異常な発現、異常なプロセッシングまたは異常な生理学的相互作用に関連し、該方法は、該病理状態を緩和するに十分な量でポリペプチドを該哺乳動物に投与する工程を包含し、ここで、該ポリペプチドが、配列番号 2 または 27 のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはそれらの生物学的に活性なフラグメントと、少なくとも 95 % 同一なアミノ酸配列を有するポリペプチドである、方法。

40

【請求項 54】

哺乳動物において病理学的状態を処置する方法であって、ここで、該病理が FGF - CX ポリペプチドの、異常な発現、異常なプロセッシングまたは異常な生理学的相互作用に関連し、該方法は、該病理学的状態を緩和するに十分な量および期間で、請求項 18 に記載の抗体を該哺乳動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 55】

被験体における細胞の増殖を促進する方法であって、請求項 1 に記載されるポリペプチド

50

の投与が必要である被験体に、該ポリペプチドを、細胞の増殖を促進するのに有効な量および期間で投与する工程を包含する、方法。

【請求項56】

前記被験体がヒトである、請求項55に記載の方法。

【請求項57】

請求項55に記載の方法であって、ここで増殖が促進される前記細胞が、以下：創傷の近傍にある細胞、血管系の細胞、造血に関する細胞、赤血球形成に関する細胞、胃腸管の内側にある細胞および毛包中の細胞からなる群から選択される、方法。

【請求項58】

被験体における細胞増殖を阻害する方法であって、ここで該増殖が、請求項1に記載されるポリペプチドの発現に関連し、該被験体に組成物を、該被験体中の細胞増殖を阻害するのに十分な量で投与する工程を包含する、方法。

【請求項59】

前記組成物が、FGF-CXポリペプチドの切断を阻害する、請求項58に記載の方法。

【請求項60】

前記組成物が、antFGF-CX抗体またはFGF-CX治療的因子を含む、請求項58に記載の方法。

【請求項61】

前記被験体がヒトである、請求項58に記載の方法。

【請求項62】

請求項58に記載の方法であって、ここで増殖が阻害される前記細胞が、以下：形質転換細胞、過形成細胞、腫瘍細胞および新形成細胞からなる群から選択される、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、一般に、核酸およびポリペプチドに関連する。本発明は、より詳細には、線維芽細胞増殖因子ファミリーのメンバーに関連するポリペプチドをコードする核酸に関連する。

【0002】

(発明の背景)

サイトカインの線維芽細胞増殖因子(FGF)の群としては、多岐にわたる細胞性機能(例えば、増殖、生存、アポトーシス、運動性、および分化)を調節する、少なくとも21のメンバーが挙げられる。これらの分子は、細胞表面チロシンキナーゼFGFレセプター(FGFR)との高い親和性の相互作用を介してシグナルを形質導入する。これらのFGFレセプターは、組織培養物中のほとんどの細胞型において発現される。リガンド結合の際のFGFレセプターモノマーの二量体化は、レセプターリン酸基転移に導く、キナーゼドメインの活性化に不可欠なものであると報告されている。FGFレセプター-1(FGFR-1)は、4つのFGFレセプターのうちで最も広範な発現パターンを示し、少なくとも7つのチロシンリン酸化部位を備える。多くのシグナル伝達分子が、これらのリン酸化部位に異なる親和性で結合することによって影響を受ける。

【0003】

正常な増殖および発生に関与することに加えて、公知のFGFはまた、癌を含む病理状態の発生にも関連する。FGFは、腫瘍細胞の増殖を直接的に増大することによって悪性疾患に寄与し得る。例えば、同じ細胞中でのFGFとFGFRとの同時発現を介するオートクライン増殖刺激は、細胞形質転換に至ることが報告されている。

【0004】

(発明の要旨)

本発明は、タンパク質の線維芽細胞増殖因子(FGF)ファミリーのメンバーに対して相同性を有する新規のポリペプチドをコードする核酸の発見に、部分的に基づく。線維芽細胞増殖因子-CX(FGF-CX)と呼称されるポリヌクレオチド配列が本発明に包含さ

10

20

30

40

50

れ、そしてその核酸配列にコードされる F G F - C X ポリペプチド、ならびにそのフラグメント、ホモログ、アナログ、および誘導体が、本発明において特許請求される。F G F - C X 核酸の例は、配列番号 (S E Q I D N O :) 1 であり、F G F - C X ポリペプチドの例は、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。このアミノ酸配列は、配列番号 1 の核酸配列にコードされる。

【 0 0 0 5 】

1 局面において、本発明は、単離された F G F - C X ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、この単離されたポリペプチドは、配列番号 2 または配列番号 2 7 のアミノ酸を含む。他の実施形態において、本発明は、配列番号 2 の改変体を含み、この改変体において、いくつかのアミノ酸残基 (例えば、配列番号 2 または配列番号 2 7 のアミノ酸配列のうち 1 % 以下、2 % 以下、3 % 以下、5 % 以下、1 0 % 以下、または 1 5 % 以下) が、変更される。いくつかの実施形態において、この単離された F G F - C X ポリペプチドとしては、配列番号 2 または配列番号 2 7 で与えられるアミノ酸配列の成熟形態のアミノ酸配列、または配列番号 2 または配列番号 2 7 で与えられるアミノ酸配列の成熟形態の改変体が挙げられる。好ましくは、配列番号 2 または配列番号 2 7 のアミノ酸配列のうち 1 % 以下、2 % 以下、3 % 以下、5 % 以下、1 0 % 以下、または 1 5 % 以下が、このアミノ酸配列の成熟形態の改変体において変更される。

10

【 0 0 0 6 】

F G F - C X ポリペプチドのフラグメントが、本発明に包含され、このフラグメントは、改変体 F G F - C X ポリペプチド、成熟 F G F - C X ポリペプチドおよび成熟 F G F - C X ポリペプチドの改変体、ならびに F G F - C X 核酸の対立遺伝子改変体および一塩基多型 (S N P) にコードされる F G F - C X ポリペプチドのフラグメントを含む。

20

【 0 0 0 7 】

別の局面において、本発明は、単離された F G F - C X 核酸分子を含む。F G F - C X 核酸分子は、上記の F G F - C X ポリペプチド、F G F - C X 改変体、または F G F - C X フラグメントのいずれかをコードする配列、またはこのような核酸配列に対する相補体を含み得る。1 実施形態において、この配列は、配列番号 1 に開示された配列を含む。他の実施形態において、この配列は、配列番号 2 6 に開示された配列を含む。さらに他の実施形態において、この F G F - C X 核酸は、配列番号 1 または配列番号 2 6 で与えられた配列とは異なるヌクレオチドが組み込まれ得る配列を含む。好ましくは、これらのヌクレオチドのうち 1 % 以下、2 % 以下、3 % 以下、5 % 以下、1 0 % 以下、1 5 % 以下または 2 0 % 以下が、そのように変更される。他の実施形態において、本発明は、これらの核酸配列のフラグメントまたは相補体を含む。F G F - C X 核酸を組み込む、ベクターおよび細胞もまた、本発明に包含される。

30

【 0 0 0 8 】

本発明はまた、本明細書中に記載の F G F - C X ポリペプチドのいずれかに免疫特異的に結合する抗体を含む。種々の実施形態における F G F - C X 抗体としては、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、および/またはヒト抗体が挙げられる。

【 0 0 0 9 】

本発明は、さらに、本発明の、F G F - C X ポリペプチド、F G F - C X 核酸、または F G F - C X 抗体を含有する薬学的組成物を提供する。本発明にまた含まれるものは、例えば、F G F - C X ポリペプチド、F G F - C X 核酸、または F G F - C X 抗体を含むキットである。

40

【 0 0 1 0 】

いくつかの方法が、本発明に含まれる。例えば、サンプル中の本発明の F G F - C X ポリペプチドの存在または量を決定するための方法が開示される。この方法は、このサンプルを、このポリペプチドに免疫特異的に結合する F G F - C X 抗体と接触させる工程 ; およびこのポリペプチドに結合した抗体の存在または量を決定し、その結果、この抗体が、このサンプル中のポリペプチドの存在または量を示す工程を包含する。

50

【0011】

同様に、本発明は、サンプル中のFGF-CX核酸分子の存在または量を決定するための方法を開示する。この方法は、このサンプルを、この核酸分子に結合するプローブと接触させる工程；およびこの核酸分子に結合した抗体の存在または量を決定し、その結果、このプローブが、このサンプル中のFGF-CX核酸分子の存在または量を示す工程を包含する。

【0012】

FGF-CXポリペプチドに結合する薬物を同定するための方法がまた、本発明によって提供される。この方法は、候補物質が、FGF-CXポリペプチドに結合するか否かを決定する工程を包含する。候補物質との結合は、この薬物がFGF-CXポリペプチド結合剤であることを示す。

10

【0013】

本発明はまた、病状を処置する用途の潜在的治療剤を同定するための方法を包含する。この病状は、例えば、本発明のFGF-CXポリペプチドの、異常発現、異常プロセッシング、または異常な生理学的相互作用に関連する。この方法は、以下の工程を包含する：FGF-CXポリペプチドを発現し、そしてこのポリペプチドに起因する特性または機能を有する細胞を提供する工程；この提供された細胞を候補物質を含む組成物に接触させる工程；およびコントロール細胞と比較してこの物質がこのポリペプチドに起因する特性または機能を変更するか否かを決定する工程。任意のこのような物質が、潜在的治療剤として同定される。さらに、治療剤は、このように同定された任意の潜在的治療剤をさらなる試験に供し、この病状を処置する用途のための治療剤を同定することによって、同定され得る。

20

【0014】

いくつかの実施形態において、この特性または機能が、細胞増殖 (cell growth) または細胞増殖 (cell proliferation) に関連し、そしてこの物質は、このポリペプチドに結合し、これによって、このポリペプチドの活性を調節する。いくつかの実施形態において、この候補物質は、約1500Daを超えない分子量を有している。いくつかの実施形態において、この候補物質は、抗体である。本発明は、さらに、本明細書中に記載されるような方法を使用して同定される任意の治療剤を提供する。

【0015】

本発明のさらに重要な局面は、FGF-CXポリペプチドに関連する障害を処置または予防する方法に関連する。この障害は、細胞もしくは組織の不十分もしくは非効率的な増殖、または細胞もしくは組織の過形成もしくは新形成によって特徴付けられる。この方法は、被験体の障害を処置または予防するのに十分な量および持続時間で、本発明のFGF-CXポリペプチドまたは本発明のFGF-CX核酸あるいは本発明の任意の他の治療剤を、この被験体に投与する工程を包含する。重要な実施形態において、この被験体はヒトである。

30

【0016】

本発明はまた、FGF-CXポリペプチドの、異常発現、異常プロセッシング、または異常な生理学的相互作用に関連する障害に対する潜伏期または素因の調節因子についてスクリーニングする方法を包含する。この方法は、以下の工程を包含する：本発明のFGF-CXポリペプチドを組換えによって発現し、そして障害に対する危険性が増大した試験動物を提供する工程；試験化合物をこの試験動物に投与する工程；この化合物を投与した後の試験動物におけるこのポリペプチドの活性を測定する工程；および試験動物におけるFGF-CXポリペプチドの活性と、この化合物が投与されていないコントロール動物におけるFGF-CXポリペプチドの活性とを比較する工程。このコントロール動物に対して、この試験動物におけるこのポリペプチドの活性に変化が存在する場合、この試験化合物は、この障害の潜伏期または素因の調節因子である。

40

【0017】

本発明はまた、第一の哺乳動物被験体における本発明の、FGF-CXポリペプチドまたはFGF-CX核酸のレベルの変更と関連する疾患の存在またはそれに対する素因を決定

50

する方法を提供する。本方法は、以下の工程を包含する：第一の哺乳動物被験体由来のサンプル中における、このポリペプチドの発現レベルまたは核酸の量を測定する工程；およびサンプル中のその量と、この疾患に罹患していないか、またはこの疾患に罹患する傾向を有していないことが既知の第二の哺乳動物被験体由来コントロールサンプル中に存在する量とを比較する工程。コントロールサンプルと比較した場合の、第一の被験体中の、このポリペプチドの発現レベルまたは、この核酸の量のレベルにおける変更は、この疾患の存在またはこの疾患に対する素因を示す。

【0018】

哺乳動物における病状を処置するための方法が、本発明によってまた提供され、ここで、この病状は、本発明のFGF-CXポリペプチドの、異常発現、異常プロセッシング、または異常な生理学的相互作用に関連する。この方法は、この病状を緩和するのに十分な量の本発明のポリペプチドをこの哺乳動物に対して投与する工程を包含し、ここで、このFGF-CXポリペプチドは、配列番号2または配列番号27のアミノ酸配列を含むポリペプチド、またはその生物学的に活性なフラグメントに、少なくとも、85%、90%、95%、96%、97%、98%またはさらに99%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。別の関連する方法において、本発明の抗体は、哺乳動物に対して投与される。

10

【0019】

別の局面において、本発明は、被験体における細胞の増殖を促進する方法を含む。この方法は、細胞増殖を促進するのに効果的な量および持続時間で本発明のFGF-CXポリペプチドを被験体に投与する工程を包含する。いくつかの実施形態において、この被験体はヒトであり、そして増殖が促進される細胞は、創傷の周辺の細胞、血管系の細胞、造血に関連する細胞、赤血球生成に関連する細胞、胃腸管の上皮における細胞、および毛包の細胞から選択され得る。

20

【0020】

さらなる局面において、本発明は、被験体における細胞増殖を阻害する方法を提供し、ここで、この増殖は本発明のFGF-CXポリペプチドの発現に関連する。この方法は、細胞増殖を阻害する組成物を被験体に投与する工程を包含する。大変重要な実施形態において、この組成物は、本発明の抗体または別の治療剤を含有する。注目に値すべきは、被験体はヒトであり、そして増殖が阻害される細胞は、形質転換された細胞、過形成性の細胞、腫瘍細胞、および新生細胞(neoplastic cell)から選択される。

30

【0021】

なおさらなる局面において、本発明は、組織増殖関連障害を処置または予防または遅延する方法を提供する。この方法は、被験体における、組織増殖関連障害を処置、予防、または遅延するのに十分な量で、FGF-CX核酸、FGF-CXポリペプチド、またはFGF-CX抗体を、このような処置または予防または遅延が所望される被験体に投与する工程を包含する。

【0022】

FGF-CX核酸分子、FGF-CXポリペプチド、またはFGF-CX抗体を使用して、診断、処置、予防、または遅延される、組織増殖関連障害は、上皮細胞(例えば、外科手術後の眼の前方部の(anterior eye)における線維芽細胞およびケラチノサイト)を含み得る。他の組織増殖関連障害としては、例えば、腫瘍、再狭窄、乾癬、デュブイトラン拘縮、糖尿病、カポジ肉腫、の合併症および慢性関節リウマチが挙げられる。

40

【0023】

別段規定されない限り、本明細書中に使用される全ての専門用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有す。本発明に記載されるような方法および材料に類似または等価な方法および材料は、本発明の実施または試験において使用され得るが、適切な方法および材料が以下に記載される。本明細書中で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および参考文献は、それらの全体が参考として援

50

用される。対立する場合は、本発明の明細書（定義を含む）が統制する。さらに、材料、方法、および実施例は、例示的であるのみで、限定を意図しない。

【0024】

本発明の他の特徴および利益は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかである。

【0025】

（発明の詳細な説明）

本発明は、新規のFGF-CX核酸配列の発見に、部分的に基づき、この配列は線維芽細胞増殖因子（FGF）ファミリーのメンバーであるポリペプチドをコードする。本明細書中で使用される場合、表示「FGF-CX」とは、核酸、ポリヌクレオチド、タンパク質、およびこれらのうちの任意の、改変体、誘導体、およびフラグメント、ならびにこれらのクラスの化合物に免疫特異的に結合する抗体をいう。

10

【0026】

FGFファミリーの以前に記載されたメンバーは、様々な細胞機能（例えば、増殖、生存、アポトーシス、運動性および分化）を調節する（Szabenyi, G. および Fallon, J. F. (1999) *Int. Rev. Cytol.* 185, 45-106）。これらの分子は、細胞表面のチロシンキナーゼFGFレセプター（FGFR）との高い親和性の相互作用を介して、シグナルを細胞内に伝達し、これらのうち4つは、現在までに同定されている（Xu, X., Weinstein, M., Li, C. および Deng, C. (1999) *Cell Tissue Res.* 296, 33-43; Klint, P. および Claesson-Welsh, L. (1999) *Front. Biosci.* 4, 165-177）。これらのFGFレセプターは、組織培養物中のほとんどの細胞型で発現される。リガンドの結合に際したFGFレセプター単量体の二量体化は、キナーゼドメインの活性化に必要であり、レセプターのトランスリン酸化を生じることが報告されている。4つのFGFレセプターの中で最も広い発現パターンを示すFGFレセプター-1（FGFR-1）は、少なくとも7つのチロシンリン酸化部位を含む。多数のシグナル伝達分子は、これらのリン酸化部位に対して、異なる親和性で結合することによって影響される。

20

【0027】

FGFはまた、低い親和性にもかかわらず、ほとんどの細胞表面および細胞外マトリックス（ECM）に存在するヘパリン硫酸プロテオグリカン（HSPG）に結合する。FGFとHSPGとの間の相互作用は、FGF/FGFR相互作用を安定化し、そしてFGFを隔離しそしてこれらを分解から保護するように働く（Szabenyi, G. および Fallon, J. F. (1999)）。その増殖促進能力に起因して、FGFファミリーの1つのメンバーであるFGF-7は、現在、化学療法誘導された粘膜炎（mucositis）の処置のための臨床試験中である（Danilenko, D. M. (1999) *Toxicol. Pathol.* 27, 64-71）。

30

【0028】

正常な増殖および発達に加えて、既知のFGFはまた、病理学的状態（癌を含む）の発生に関与した（Basilica, C. および Moscatelli, D. (1992) *Adv. Cancer Res.* 59, 115-165）。FGFは、腫瘍細胞の増殖を直接増強することによって、悪性疾患に寄与し得る。例えば、同じ細胞におけるFGFおよびFGFRの同時発現を介したオートクライン増殖刺激は、細胞の形質転換を生じる（Matsumoto-Yoshitomi, S., Habashita, J., Nomura, C., Kuroshima, K. および Kurokawa, T. (1997) *Int. J. Cancer* 71, 442-450）。同様に、変異誘発または再編成を介したFGFRの構成的活性化は、制御されない増殖を生じる（Lorenzi, M., Horii, Y., Yamanaka, R., Sakaguchi, K. および Miki, T. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8956-8961; Li, Y., Mangasarian, K., Mansukhani,

40

50

A. および Basilio, C. (1997) *Oncogene* 14, 1397-1406)。さらに、いくつかの FGF は、脈管形成性である (Gerwins, P., Skoldenberg, E. および Claesson-Welsh, L. (2000) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 34, 185-194)。このような FGF は、腫瘍増殖の維持のために必要な血液供給の発達を容易にすることによって、腫瘍形成プロセスに寄与し得る。驚くことではないが、少なくとも1つの FGF は、現在、癌治療の潜在的な標的として調査中である (Gasparini, G. (1999) *Drugs* 58, 17-38)。

【0029】

出生時および成体のマウスの脳における FGF およびそれらのレセプターの発現が、試験されている。FGF-4 以外の全ての FGF 遺伝子のメッセンジャー RNA は、これらの組織において検出される。FGF-3、FGF-6、FGF-7 および FGF-8 遺伝子は、出生後の段階よりも後期胚段階におけるより高い発現を実証し、これらのメンバーが、脳発達の後期段階に関与することを示唆する。対照的に、FGF-1 および FGF-5 の発現は、誕生後に増大した。特に、出生時のマウスにおける FGF-6 の発現は、胚の発達中の大脳での強いシグナル、5日齢の新生仔の小脳での強いシグナルを伴って、中枢神経系および骨格筋に限定されていることが報告されている。FGF-6 の同族のレセプターである FGFレセプター (FGFR) -4 は、類似の時空間的発現を実証し、FGF-6 および FGFR-4 が、リガンド-レセプター系として、神経系の成熟において重要な役割を果たすことを示唆する。Ozawara に従って、これらの結果は、種々の FGF およびそれらのレセプターが、脳の種々の発達プロセス (例えば、神経前駆体細胞の増殖および移動、神経分化およびグリア分化、神経突起伸長ならびにシナプス形成) の調節に関与することを強く示唆する。

【0030】

別の FGF ファミリーメンバーであるグリア活性化因子 (GAF) は、ヒトグリオーマ細胞株の培養物上清から精製されたヘパリン結合増殖因子である。Miyamoto ら、1993、*Mol Cell Biol* 13 (7): 4251-4259 を参照のこと。GAF は、他の既知の増殖因子とは僅かに異なる活性範囲を示し、そして FGF-9 と称される。ヒト FGF-9 cDNA は、208 アミノ酸のポリペプチドをコードする。FGF ファミリーの他のメンバーとの配列類似性は、約 30% と概算された。他のファミリーメンバーにおいて見出された2つのシステイン残基および他のコンセンサス配列もまた、FGF-9 配列に十分保存されていた。FGF-9 は、酸性 FGF および塩基性 FGF に見出されるように、N 末端の代表的なシグナル配列を有さないことが見出された。

【0031】

酸性 FGF および塩基性 FGF は、従来の様式で細胞から分泌されないことが知られている。しかし、FGF-9 は、代表的なシグナル配列を欠くにもかかわらず、cDNA がトランスフェクトされた COS 細胞から効率的に分泌されることが見出された。これは、この細胞の培養培地中で排他的に検出され得た。この分泌されたタンパク質は、開始メチオニンを除いて、cDNA 配列によって予測された残基に対して、N 末端のアミノ酸残基を欠かなかった。ラット FGF-9 cDNA もまたクローニングされ、そして構造分析は、FGF-9 遺伝子が高度に保存されていることを示した。

【0032】

本発明は、新規ヒト FGF およびその対応する cDNA を提供する。この遺伝子のタンパク質産物は、増殖刺激および腫瘍形成特性を示すことが示された。さらに、FGF mRNA の過剰発現は、特定の癌細胞株において注目された。これらの観察は、新規 FGF が、ヒト悪性疾患の処置において優れた標的として働くことによって、使用され得ることを示唆する。

【0033】

本発明はまた、成熟 FGF-CX ポリペプチド、成熟 FGF-CX ポリペプチドの改変体、成熟 FGF-CX ポリペプチドおよび成熟改変体 FGF-CX ポリペプチドのフラグメ

ント、ならびにこれらのポリペプチドおよびフラグメントをコードする核酸を含む。本明細書中で使用される場合、本発明に開示される FGF - CX ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態は、天然に存在するポリペプチドあるいは前駆体形態またはプロタンパク質の産物である。天然に存在するポリペプチド、前駆体またはプロタンパク質としては、非限定的な例として、対応する遺伝子によってコードされる全長遺伝子産物が挙げられる。いくつかの実施形態において、成熟形態は、本明細書中で記載されるオープンリーディングフレームによってコードされる、FGF - CX ポリペプチド、前駆体またはプロタンパク質を含む。産物「成熟」形態は、遺伝子産物が生じる細胞、または宿主細胞中で発生し得る場合、1以上の天然に存在するプロセッシング工程の結果として発生し得る。

【0034】

「成熟」形態のポリペプチドまたはタンパク質を生じるそのようなプロセッシング工程の例としては、オープンリーディングフレームの開始コドンによってコードされる N 末端メチオニン残基の切断、またはシグナルペプチドもしくはリーダー配列のタンパク質分解切断が挙げられる。従って、残基 1 ~ N (ここで、残基 1 は、N 末端メチオニンである) を有する、FGF - CX 前駆体ポリペプチドまたは前駆体タンパク質から生じる成熟形態は、N 末端メチオニンの除去後に、残存する残基 2 ~ N を有する。あるいは、残基 1 ~ N (ここで、残基 1 ~ 残基 M の N 末端シグナル配列が、切断される) を有する、前駆体ポリペプチドまたは前駆体タンパク質から生じる成熟形態は、残存する残基 M + 1 ~ 残基 N の残基を有する。さらに、「成熟」タンパク質またはフラグメントは、開始メチオニンの除去またはシグナルペプチドの除去以外の切断事象から生じ得る。さらに本明細書中に使用される場合、FGF - CX ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態は、タンパク質分解切断事象以外の翻訳後修飾の工程から生じ得る。このようなさらなるプロセスとしては、非限定的な例として、グリコシル化、ミリスチル化またはリン酸化が挙げられる。一般的に、成熟ポリペプチドまたは成熟タンパク質は、これらのプロセスのうちの 1 つのみ、またはこれらのいずれかの組み合わせの操作から生じ得る。

【0035】

本明細書中で使用する場合、「同一な」残基は、2つの配列のアラインメント中の等価なヌクレオチド塩基またはアミノ酸残基が同じ残基である場合、2つの配列間の比較においてこれらの残基に対応する。あるいは、残基は、アラインメントにおける2つの配列間の比較が、比較における等価な位置の残基が、以下に定義されるような同じアミノ酸または保存されたアミノ酸のいずれかであることを示す場合、「類似」または「ポジティブ」として記載される。

【0036】

FGF - CX 核酸、FGF - CX ポリペプチドまたはその一部をコードする単離された核酸、FGF - CX ポリペプチド、これらの核酸を含むベクター、FGF - CX 核酸を用いて形質転換された宿主細胞、抗 FGF - CX 抗体および薬学的組成物が、本発明の範囲内に含まれる。FGF - CX ポリペプチドを作製する方法、ならびにこれらの化合物を使用して状態をスクリーニング、診断、処置する方法、および FGF - CX ポリペプチド活性を調節する化合物をスクリーニングする方法もまた開示される。以下の表 1 は、本発明全体を通して使用される配列記述子を描写する。

【0037】

表 1

配列番号	配列記述子
1	ヒト FGF - CX ヌクレオチド配列
2	ヒト FGF - CX ポリペプチド配列
3	FGF - CX 順方向プライマー
4	FGF - CX 逆方向プライマー
5	グリア活性化因子 (GAF)
6	ヒトゲノムフラグメント - b p 1 5 9 2 7 - 1 6 2 1 4
7	ヒトゲノムフラグメント - b p 7 2 5 7 - 7 5 1 1

10

20

30

40

50

8	ヒトゲノムフラグメント - b p	9 8 3 7 - 9 9 4 2	
9	ヒト F G F - 9		
1 0	マウス F G F - 9		
1 1	ラット F G F - 9		
1 2	X e n o p u s F G F - C X		
1 3	ヒト F G F - C X 疎水性ドメイン (a a 9 0 - 1 1 5)		
1 4	P S e c - V 5 - H i s 順方向		
1 5	P S e c - V 5 - H i s 逆方向		
1 6	P S E T A リンカー		
1 7	P S E T A リンカー		10
1 8	T a q M a n 発現分析順方向プライマー		
1 9	T a q M a n 発現分析逆方向プライマー		
2 0	T a q M a n 発現分析プローブ		
2 1	T a q M a n 発現分析順方向プライマー		
2 2	T a q M a n 発現分析逆方向プライマー		
2 3	T a q M a n 発現分析プローブ		
2 4	P C R オリゴヌクレオチド		
2 5	P C R オリゴヌクレオチド		
2 6	繊維芽細胞増殖因子 - 2 0 様ポリヌクレオチド配列		
2 7	繊維芽細胞増殖因子 - 2 0 様ポリペプチド配列。		20

【 0 0 3 8 】

本明細書中で考察される F G F - C X 核酸およびポリペプチド、ならびに F G F - C X 抗体、治療剤および薬学的組成物は、組織増殖関連の障害を処置する際に特に有用である。これらの組織増殖関連の障害としては、上皮細胞に影響を与える障害（例えば、手術後の眼の前方の繊維芽細胞およびケラチノサイト）が挙げられ得る。他の組織増殖関連の障害としては、例えば、腫瘍、再狭窄、乾癬、デュブユイトラン拘縮、糖尿病合併症、カボージ肉腫および慢性関節リュウマチが挙げられる。

【 0 0 3 9 】

繊維芽細胞増殖因子 - 2 0 X (F G F - C X) と称される新規繊維芽細胞増殖因子をコードするヌクレオチド配列（配列番号 1 および配列番号 2 6 ）が、本発明に含まれる。図 1 は、配列番号 1 によって記載される F G F - C X を示す。このコード配列は、ヒトゲノム D N A 配列において同定された。この開示された D N A 配列は、2 1 1 アミノ酸残基を有することが予測されたポリペプチド（配列番号 2 ）をコードする、6 3 3 塩基を有する。図 1 および配列番号 2 に示される配列に基づいた、F G F - C X の予測された分子量は、2 3 4 9 8 . 4 D a である。

【 0 0 4 0 】

この F G F - C X 核酸配列を、B L A S T N 検索において問い合わせヌクレオチド配列として使用して、関連の核酸配列を同定した。この F G F - C X ヌクレオチド配列は、マウス繊維芽細胞増殖因子 9 (F G F - 9) (5 4 3 塩基のうち 3 2 9 塩基同一、すなわち 7 2 % ; G e n B a n k 登録番号 S 8 2 0 2 3) およびグリア活性化因子 (G A F) をコードするヒト D N A (5 5 4 塩基のうち 3 8 5 塩基同一、すなわち 6 9 % ; G e n B a n k 登録番号 E 0 5 8 2 2 、 F G F - 9 と同称される) に対して、高い類似性を有する。さらに、F G F - C X は、N a r u o ら、日本国特許：J P 1 9 9 3 3 0 1 8 9 3 、表題「G l i a - A c t i v a t i n g F a c t o r A n d I t s P r o d u c t i o n 」によって開示された G A F 配列（配列番号 5 ）に対して、匹敵する同一性の程度（4 2 4 塩基のうち 3 1 1 塩基同一、すなわち 7 3 % ）を有することが見出された（図 2 を参照のこと）。

【 0 0 4 1 】

ゲノム探掘 (m i n i n g) によって同定されたオープンリーディングフレーム (O R F) が正しいことを確認するため、P C R 増幅を使用して予測されたゲノムクローンに対応

する cDNA を獲得した。獲得された産物のヌクレオチド配列は、予測された遺伝子の配列と正確に一致する（実施例 1 を参照のこと）。

【0042】

この cDNA によってコードされたタンパク質は、Xenopus FGF - 20X（本明細書中で XFGF - CX または XFGF - 20X と称される）ならびにヒト FGF - 9 およびヒト FGF - 16 に、最も密接に関連する（それぞれ、80%、70% および 64% のアミノ酸同一性；図 4 および 5 を参照のこと）。XFGF - CX との強い相同性に基づき、本発明の開示において同定された遺伝子は、そのヒトオルソログを示すと考えられ、そして本明細書中で FGF - CX と称される。

【0043】

FGF - CX ポリペプチド配列（配列番号 2）の最初の 208 アミノ酸の、ヒト FGF - 9（配列番号 9）との BLASTP アラインメントを、図 6 に示す。グリア活性化因子前駆体（GAF）（繊維芽細胞増殖因子 - 9）については、SWISSPROT 登録番号 P31371；Miyamoto ら、1993 Mol. Cell. Biol. 13：4251 - 4259；および Naruo ら、1993 J. Biol. Chem. 268：2857 - 2864 を参照のこと。FGF - CX ポリペプチド（配列番号 1 から翻訳される配列番号 2）の最初の 208 アミノ酸の、マウス FGF - 9 配列（配列番号 10）およびラット FGF - 9 配列（配列番号 11）との BLASTX アラインメントを、それぞれ、図 7 および 8 に示す。グリア活性化因子前駆体（GAF）（繊維芽細胞増殖因子 - 9）については、SWISSPROT 登録番号 P54130、マウス FGF - 9 については、Santos - Ocampo ら、1996 J. Biol. Chem. 271：1726 - 1731；そしてラット FGF - 9 については、SWISSPROT 登録番号 P36364、グリア活性化因子前駆体（GAF）（繊維芽細胞増殖因子 - 9）（FGF - 9）、Miyamoto、1993 Mol. Cell. Biol. 13：4251 - 4259 を参照のこと。図 5 ~ 7 において棒（「|」）で示されるように、3 つ全ての種の FGF - 9 配列は、FGF - CX（配列番号 2）と 208 残基のうち 147 残基の同一性、配列全体について 70% の同一性を有する。さらに、208 残基のうち 170 残基が、FGF - CX（配列番号 2）の配列に対してポジティブであり、ポジティブ残基の全体の割合は 81% である。ポジティブ残基は、同一（「|」）であるか、または整列された場合に比較された配列の同じ相対位置に保存的アミノ酸置換（「+」）を有するかのいずれかである残基を含む。以下を参照のこと。

【0044】

全長の FGF - CX ポリペプチド（配列番号 2）をまた、Xenopus XFGF - CX（配列番号 12）と共に、BLASTX によって整列させた。図 9 に示すように、FGF - CX は、Xenopus XFGF - CX と比較して、211 のうち 170 の同一な残基（80%）および 211 のうち 189 のポジティブな残基（89%）を有する。Xenopus XFGF - CX を、プローブとして哺乳動物の FGF - 9 に基づくプライマーを用いて実行される変性 PCR の産物を使用して、尾芽（tail bud）段階で調製した cDNA ライブラリーから、最近獲得した。Koga ら、1999 Biochem Biophys Res Commun 261（3）：756 - 765 を参照のこと。XFGF - CX のオープンリーディングフレームの推定 208 アミノ酸の配列は、FGF ファミリーに特長的なモチーフを含む。XFGF - CX は、XFGF - 9 に対して 73.1% の全体的類似性を有するが、そのアミノ末端領域で XFGF - 9 とは異なる（33.3% の類似性）。これは、ヒトを含む種々の哺乳動物 FGF - 9 および FGF - 16 の配列に関して、開示された配列番号 2 について現在見られる類似に類似している（上を参照のこと）。図 4、5 および 7 ~ 9 を参照のこと。

【0045】

図 1 のポリペプチド配列（配列番号 2）は、プログラム PSORT によって、小胞体および微小体（ペルオキシソーム）の膜を介して分類するための高い可能性を有すると予測される。さらに、これは、その N 末端に、予測された切断可能なシグナル配列を有さないが

10

20

30

40

50

、図10のハイドロパシープロットは、FGF-CXが、約90～約115のアミノ酸位置（配列番号13）で顕著な疎水性セグメントを有することを示す。この単一の疎水性領域は、FGFファミリーの他のメンバーにおける分類シグナルであることが知られている。従って、配列番号13のアミノ酸を含むポリペプチドは、分類シグナルとして有用であり、種々の細胞の膜（例えば、小胞体、ゴルジ膜または原形質膜）を介した分泌を可能にする。

【0046】

FGF-CXは、最も近縁のヒトファミリーメンバー（例えば、FGF-9およびFGF-16）のいくつかについてちょうど見出されるように、P S O R Tコンピュータアルゴリズム（Nakai, K. および Kanehisa, M. (1992) *Genomics* 14, 897-911）およびS I G N A L Pコンピュータアルゴリズム（Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. および von Heijne, G. (1997) *Protein Eng.* 10, 1-6）によって予測されるように、典型的なアミノ末端シグナル配列を欠く。それにもかかわらず、FGF-9およびFGF-16の両方は分泌される（Matsumoto-Yoshitomi, S., Habashita, J., Nomura, C., Kuroshita, K. および Kurokawa, T. (1997) *Int. J. Cancer* 71, 442-450; Miyake, A., Konishi, M., Martin, F.H., Hernday, N.A., Ozaki, K., Yamamoto, S., Mikami, T., Arakawa, T. および Itoh, N. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 243, 148-152; Miyakawa, K., Hatsuizawa, K., Kurokawa, T., Asada, M., Kuroiwa, T. および Inamura, T. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 29352-29357; Revest, J.-M., DeMoerlooze, L. および Dickson, C. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 8083-8090）。FGF-CXもまた分泌されるか否かを決定するために、全長のFGF-CXタンパク質をコードするcDNAを、pFGF-CXと称される哺乳動物発現ベクターにサブクローニングした。ヒト胚性腎臓293細胞がこのベクターでトランスフェクトされる場合に発現されるタンパク質は、馴化培地中に見出され、そしてウェスタンブロットにおいて約27kDaの見かけの分子量を有して、C末端V5エピトープに対する抗体によって検出されるバンドを示す（図11、実施例7）。発現されたタンパク質のさらなる部分は、ヘパリン硫酸プロテオグリカン（HSPG）との相互作用を阻害する基質を用いて処理することによって、293細胞上の隔離（sequestration）から放出される。このように放出されるタンパク質もまた、類似のウェスタンブロットパターンを示す（図11）。同様に、このタンパク質が、Igシグナル配列を組み込む組換えプラスミドからHEK293細胞において発現される場合、バンドが、約34kDaの適切な分子量を伴って、ウェスタンブロットによって検出される（図12、実施例5）。

【0047】

いくつかの脊椎動物FGF様タンパク質（配列番号2によって記載されるFGF-CXを含む）についてのClustalW複数タンパク質アラインメント（Thompson, J.D., Higgins, D.G. および Gibson, T.J. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680）を、図4および5に示す。3つの哺乳動物タンパク質（配列番号9～11）は、互いに密接に類似するが、本発明のFGF-CXタンパク質（配列番号2）とはかなり異なる。また、Xenopus XFGF-CX（配列番号12）および配列番号2の配列は、FGF-9の配列よりも、互いに密接に類似する。FGF-9分泌に関与する内部疎水性ドメイン（Miyakawa, K., Hatsuizawa, K., Kurokawa, T., Asada, M., Kuroiwa, T. および Inamura, T. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 29352-29357）は、FGF-9配列の残基95～120にわたる。（配列番号2によって記載されるFGF-CXのハイドロパシープロットについては、図10を

参照のこと)。

【0048】

XFGF-20およびXenopus FGF-9の発現は、互いに異なる。XFGF-20 mRNAは、二倍体細胞において、胞胚期の胚および胞胚期後の胚において、ならびに成体の胃および精巣において特異的に発現される；一方、XFGF-9 mRNAは、卵において母性発現され、多くの成体組織において発現される。Kogara、上記。原腸形成の間のXFGF-20の正確な発現は、Xenopus幼生において正常な頭部構造の形成に必要であるようである。XFGF-20 mRNAが初期胚で過剰発現される場合、原腸形成は異常であり、そして前方構造の発達は抑制された。Kogara、上記を参照のこと。このような胚において、試験されたなかでもとりわけ、Xbra転写物の発現は、原腸形成の間に抑制され、Xbra遺伝子の発現がXFGF-CXの効果を媒介することを示した。Kogara、上記を参照のこと。

10

【0049】

増殖中の組織(例えば、卵、精巣、胃および母カエル中の複数の組織を含む)における、関連のFGF-9ポリペプチドの発現パターンは、機能している器官において通常は再生を受ける組織の維持における、XFGF-20についての役割を示唆する。

【0050】

実施例8において、FGF-CX mRNAが、正常な小脳ならびにいくつかのヒト腫瘍細胞株(肺、胃および結腸の癌腫を含む)において発現されるが、対応する正常組織においては発現されないことが示される。正常な肺、胃および結腸におけるFGF-CX発現の欠如、ならびにこれらの組織由来の腫瘍株におけるFGF-CX発現の存在は、これらの癌細胞株が不適切な様式でFGF-CXを明らかに過剰発現することを示す。FGF-CXがマップされる染色体領域は、結腸直腸、肺および胃の癌腫において共通に変更される(Emi, M., Fujiwara, Y., Nakajima, T., Tsuchiya, E., Tsuda, H., Hirohashi, S., Maeda, Y., Tsuruta, K., Miyaki, M.およびNakamura, Y. (1992) Cancer Res, 52, 5368-5372; Baffa, R., Santoro, R., Bullrich, F., Mandes, B., Ishii, H.およびCroce, C. M. (2000) Clin. Cancer Res. 6, 1372-1377)。これらの細胞における、FGF-CX駆動のオートクライン増殖ループの確立が、それらの最初の腫瘍形成変換および/または引き続き拡大に寄与することが可能である。このシナリオは、NIH 3T3細胞におけるFGF-CX駆動のオートクラインループの生成が、それらの腫瘍形成能を活性化するという発見によって、支持される(実施例11を参照のこと)。腫瘍細胞によって分泌されるFGF-CXが、間質細胞に対するパラクリン効果を介してインビボでそれらの増殖を刺激することもまた可能である。

20

30

【0051】

NIH 3T3細胞における異種FGF-CXの発現は、これらの形質転換および腫瘍形成能を誘導することが見出されている(実施例11を参照のこと)。これらの効果は、ネイティブなFGF-CX(構築物pFGF-CX)およびアミノ末端で異種Igシグナル配列を有して発現されるFGF-CX(構築物pIg-FGF-CX)の両方によって媒介される。しかし、より高いインビトロの形質転換能(データは示さず)およびインビボの腫瘍形成能(図19)によって明らかのように、pIg-FGF-CXが、pFGF-CXよりも腫瘍形成的に活性であることに注目すべきである。pFGF-CXに対するpIg-FGF-CXの優れた腫瘍形成能は、pIg-FGF-CXが、NIH 3T3細胞中でpFGF-CXが生成するよりも、より多くの分泌されたFGF-CXタンパク質を有意に生成するという事実起因する可能性が高い(図11B)。

40

【0052】

FGF-CXのように、他のFGFは、異所的発現後に細胞を形質転換することが示されており、そしていくつかの場合には、FGFシグナル伝達のブロックが、細胞の形質転換を抑制することが示されている(Matsumoto-Yoshitomi, S., Ha

50

bashita, J., Nomura, C., Kuroshima, K. および Kurokawa, T. (1997) Int. J. Cancer 71, 442 - 450; Li, Y., Basilico, C. および Mansukhani, A. (1994) Mol. Cell. Biol. 14, 7660 - 7669).

【0053】

本明細書中に記載される FGF - CX の特性、および関連の FGF タンパク質について見出された効果との類似性に基づいて、FGF - CX は、ヒトの悪性疾患において重要な役割を果たすと考えられる。これらの理由のために、本明細書中に開示される FGF - CX ポリペプチド、核酸および抗体は、これらの組成物の存在または量を診断する方法、FGF - CX 関連の病理学に関する治療剤のスクリーニングおよび同定において、ならびに種々の種類の悪性疾患の処置の方法において、有用である。 10

【0054】

(FGF 20 X クローン、機能的改変体およびホモログ)

繊維芽細胞増殖因子 - 20 様タンパク質をコードする本発明の新規核酸は、その配列が配列番号 1 もしくは配列番号 26 によって記載される核酸またはそれらのフラグメントを含む。本発明はまた、その塩基のいずれかが表 4 および 5 に示される対応する塩基から変化され得るが、なおその繊維芽細胞増殖因子 - 20 様の活性および生理学的機能を維持するタンパク質をコードする、変異体または改変体の核酸あるいはこのような核酸のフラグメントを含む。本発明はさらに、その配列が Cura Gen 登録番号 CG53153 - 02 および CG53135 - 01 の配列に相補的である核酸を含み、まさに記載された核酸のいずれかに相補的である核酸フラグメントを含む。本発明はさらに、その構造が化学的な改変を含む、核酸もしくは核酸フラグメントまたはその相補体を含む。このような改変としては、非限定的な例として、改変された塩基および核酸を含み、これらの糖リン酸骨格は、改変または誘導体化されている。これらの改変は、少なくとも一部は、改変された核酸の化学的安定性を増強するために実行され、その結果、これらを、例えば、被験体における治療的適用において、アンチセンス結合核酸として使用し得る。変異体または改変体の核酸およびこれらの相補体において、約 3 % までの塩基が、このように変化され得る。 20

【0055】

本発明の新規のタンパク質は、配列番号 2 および配列番号 27 によって記載される配列の線維芽細胞増殖因子 - 20 様タンパク質を含む。本発明はまた、そのいずれかの塩基が配列番号 2 および配列番号 27 の配列に示される対応する残基から変更され得るが、線維芽細胞増殖因子 - 20 様タンパク質の線維芽細胞増殖因子 - 20 様の活性および生理的機能を維持するタンパク質をなおコードする変異タンパク質または改変タンパク質、あるいはそれらのフラグメントを含む。変異タンパク質または改変タンパク質において、アミノ残基の約 2 % までが変更され得る。 30

【0056】

(キメラタンパク質および融合タンパク質)

本発明は、線維芽細胞増殖因子 - 20 様タンパク質のキメラタンパク質または融合タンパク質を含み、ここで、本発明の線維芽細胞増殖因子 - 20 様タンパク質は、第 2 のポリペプチドまたは本発明の新規なタンパク質と実質的に相同でないタンパク質と連結される。第 2 のポリペプチドは、本発明の CG53135 - 02 ポリペプチドまたは CG53135 - 01 ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかに融合され得る。特定の実施形態において、第 3 の非相同なポリペプチドまたはタンパク質はまた、新規の線維芽細胞増殖因子 - 20 様タンパク質に融合され得、その結果第 2 の非相同なポリペプチドまたはタンパク質がアミノ末端で連結され、そして第 3 の非相同なポリペプチドまたはタンパク質が、CG53135 - 02 ポリペプチドまたは CG53135 - 01 ポリペプチドのカルボキシル末端で連結される。第 2 または第 3 のポリペプチドあるいはタンパク質のいずれかが組み込まれ得る非相同配列の例としては、グルタチオン S - トランスフェラーゼ、線維芽細胞増殖因子 - 20 様タンパク質のアミノ末端で融合される異種シグナル配列、免疫グロブリン配列またはドメイン、血清タンパク質またはそのドメイン (血清 40 50

アルブミンのような)、抗原性エピトープ、および(H i s)₆のような特異的部分が挙げられる。

【0057】

本発明はさらに、上の段落で記載された任意のキメラタンパク質または融合タンパク質をコードする核酸を含む。

【0058】

(抗体)

本発明はさらに、本発明の任意のタンパク質に免疫特異的に結合する抗体および抗体フラグメント(F a b、(F a b)₂または単鎖F V構築物のような)を含む。本発明はまた、本発明の任意のタンパク質に対して高い結合親和性を有する配列を含むペプチドおよびポリペプチドを含む。このようなペプチドおよびポリペプチドとしては、バクテリオファージ粒子のような任意のキャリア粒子に融合される(またはキャリアの表面上に生物学的に発現される)ペプチドおよびポリペプチドが挙げられる。

10

【0059】

(本発明の組成物の使用)

本明細書中に開示されるタンパク質類似性の情報、発現パターン、細胞の局在、ならびにタンパク質および核酸についての地図上の位置は、この線維芽細胞増殖因子-20様タンパク質が、重要な構造および/または線維芽細胞増殖因子ファミリーに特有な生理的機能を有し得ることを示唆する。したがって、本発明の核酸およびタンパク質は、潜在的な診断適用および治療適用において、そして調査道具として有用である。これらは、特異的または選択的な核酸またはタンパク質の診断マーカーおよび/または予後マーカーとして作用することを含み、ここで、核酸またはタンパク質の存在または量が評価される。これらとしてはまた、以下のような潜在的な治療適用が挙げられる:(i)タンパク質治療剤、(ii)低分子薬物標的、(iii)抗体標的(治療抗体、診断抗体、薬物標的化/細胞傷害性抗体)、(iv)遺伝子治療において有用な核酸(遺伝子送達/遺伝子除去)、(v)インビトロおよびインビボでの組織再生の促進剤、ならびに(vi)生物防御兵器。

20

【0060】

本発明の核酸およびタンパク質は、種々の疾患および障害の診断ならびに/または処置における適用を有する。例えば、本発明の組成物は、以下を患う患者の処置にとって有効性を有する:ヒルシュスプルング病、クローン病、虫垂炎、炎症性腸疾患、憩室性疾患、全身性エリテマトーデス、自己免疫疾患、喘息、気腫、強皮症、アレルギー、ARDS、フォン・ヒッペル-リンドウ(V H L)症候群、肝硬変、移植、高カルシウム血症、潰瘍、心筋症、アテローム性動脈硬化症、高血圧症、先天性心欠陥症(heart defect)、大動脈狭窄症、心房中隔欠損症(A S D)、房室(A - V)管欠損症、動脈管、肺狭窄、大動脈弁下部狭窄、心室中隔欠損症(V S D)、弁疾患、結節硬化症、強皮症、肥満症、糖尿病、自己免疫疾患、腎動脈狭窄症、間質性腎炎、糸球体腎炎、多嚢胞性腎疾患、全身性エリテマトーデス、尿細管性アシドーシス、I g A腎症、高カルシウム血症、アルツハイマー病、発作、結節硬化症、高カルシウム血症、パーキンソン病、ハンティングトン病、脳性麻痺、癲癇、レッシュ-ナイハン症候群、多発性硬化症、毛細血管拡張性運動失調、白質萎縮症、行動障害、嗜癪、不安、疼痛、神経変性、ならびに他の疾患、障害および状態。

30

40

【0061】

これらの材料は、診断方法および/または治療方法において用いるための、本発明の新規の物質に対して免疫特異的に結合する抗体の生成においてさらに有用である。

【0062】

(F G F - C X核酸)

本発明の核酸としては、F G F - C Xタンパク質またはF G F - C X様タンパク質をコードする核酸が挙げられる。とりわけこれらの核酸は、図1(配列番号1、配列番号26)に提供される配列の核酸またはそれらのフラグメントである。F G F - C X核酸は、ゲノムF G F - C X核酸またはc D N Aのヌクレオチド配列を有し得る。さらに、本発明とし

50

ては、配列番号1または配列番号26の核酸の変異核酸または改変核酸、あるいはそれらのフラグメントが挙げられ、任意のこれらの塩基は、配列番号1または配列番号26の配列に示される対応する塩基から変更され得るが、FGF-CX様の活性および生理的機能を維持するタンパク質をなおコードする。本発明としては、配列番号1または配列番号26の核酸配列の相補体（それらのフラグメント、誘導體、アナログおよびホモログを含む）がさらに挙げられる。一部分のFGF-CXの相補鎖の例が、図3に示される。本発明は、その構造が化学的改変を含む、核酸または核酸フラグメントあるいはそれらの相補体をさらに含む。

【0063】

本発明の1つの局面は、FGF-CXタンパク質またはそれらの生物学的に活性な部分をコードする単離された核酸分子に関する。また、FGF-CXコード核酸（例えば、FGF-CX mRNA）を同定するためにハイブリダイゼーションプローブとして使用されるのに十分な核酸フラグメントおよびFGF-CX核酸分子の増幅または変異のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）プライマーとして使用されるフラグメントも含まれる。本明細書中で使用されるように、用語「核酸分子」は、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）、RNA分子（例えば、mRNA）、ヌクレオチドアナログを使用して産生されたDNAまたはRNAのアナログ、ならびにそれらの誘導體、フラグメントおよびホモログを含むことが意図される。この核酸分子は、一本鎖であっても二本鎖であってもよいが、好ましくは二本鎖DNAである。

【0064】

「プローブ」とは、種々の長さの核酸配列をいい、好ましくは、使用に依存して、少なくとも約10ヌクレオチド（nt）、100nt、または例えば、約6,000ntほどの大きさの間である。プローブは、同一、類似または相補的な核酸配列の検出において使用される。より長い長さのプローブは、通常、天然供給源または組換え供給源から入手され、非常に特異的であり、そしてオリゴマーよりもはるかに遅くハイブリダイズする。プローブは、一本鎖または二本鎖であり得、そしてPCR、メンブレンベースのハイブリダイゼーション技術またはELISAのような技術において特異性を有するように設計される。

【0065】

「単離された」核酸分子は、この核酸の天然の供給源中に存在するその他の核酸分子から分離されているものである。単離された核酸分子の例としては、ベクター中に含まれる組換えDNA分子、異種宿主細胞中に維持される組換えDNA分子、部分的または実質的に精製された核酸分子、および合成DNA分子または合成RNA分子が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、「単離された」核酸は、この核酸が由来する生物のゲノムDNA中でこの核酸分子に天然に隣接する配列（すなわち、この核酸の5'末端および3'末端に位置する配列）を含まない。例えば、種々の実施形態で、単離されたFGF-CX核酸分子は、この核酸が由来する細胞のゲノムDNA中でこの核酸分子に天然で隣接する、約50kb未満、25kb未満、5kb未満、4kb未満、3kb未満、2kb未満、1kb未満、0.5kb未満、または0.1kb未満のヌクレオチド配列を含み得る。さらに、「単離された」核酸分子、例えば、cDNA分子は、組換え技術により産生される場合、他の細胞物質または培養培地を実質的に含まないか、または化学的に合成される場合、化学物質前駆体もしくはその他の化学物質を実質的に含まないものであり得る。

【0066】

本発明の核酸分子、例えば、配列番号1、配列番号26のヌクレオチド配列を有する核酸分子、またはこれらのヌクレオチド配列の任意の相補体は、標準的な分子生物学的技法および本明細書で提供される配列情報を用いて単離され得る。ハイブリダイゼーションプローブとして、配列番号1または配列番号26の核酸配列の全部または一部を使用して、FGF-CX核酸配列は、標準的なハイブリダイゼーションおよびクロニング技術（例えば、Sambrookら編、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL第2版、Cold Spring Harbor Laboratory

10

20

30

40

50

ory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; および Ausubelら、編、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY, 1993に記載されるようなもの)を用いて単離され得る。

【0067】

本発明の核酸は、標準的なPCR増幅技法に従って、テンプレートとしてcDNA、mRNAあるいはゲノムDNA、および適切なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅され得る。このように増幅された核酸は、適切なベクター中にクローン化され、そしてDNA配列分析により特徴付けられ得る。さらに、FGF-CXヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、標準的な合成技術、例えば、自動化DNA合成機を用いることにより調製され得る。

10

【0068】

本明細書で用いられる用語「オリゴヌクレオチド」は、一連の連結されたヌクレオチド残基をいい、このオリゴヌクレオチドは、PCR反応で用いられ得る十分な数のヌクレオチド塩基を有する。短いオリゴヌクレオチド配列は、ゲノム配列もしくはcDNA配列に基づき得るか、またはそれから設計され得、そして特定の細胞もしくは組織において、同一、類似もしくは相補的DNAまたはRNAを増幅し、確認し、もしくはそれらの存在を示すために用いられる。オリゴヌクレオチドは、約10nt、50nt、または100ntの長さ、好ましくは約15nt~30ntの長さを有する核酸配列の部分を含む。1つの実施形態では、100ntより少ない長さの核酸分子を含むオリゴヌクレオチドは、さらに、配列番号1または配列番号26の少なくとも6個連続するヌクレオチド、またはその相補体を含む。オリゴヌクレオチドは、化学的に合成され得、そしてプローブとして用いられ得る。

20

【0069】

別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1または配列番号26に示されるヌクレオチド配列の相補体である核酸分子を含む。別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1または配列番号26に示されるヌクレオチド配列あるいはそのヌクレオチド配列の一部の相補体である核酸分子を含む。配列番号1または配列番号26に示されるヌクレオチド配列に相補的である核酸分子は、配列番号1または配列番号26に示されるヌクレオチド配列に十分相補的である核酸分子であり、配列番号1または配列番号26に示されるヌクレオチド配列に対し mismatches がほとんどまたは全くなく水素結合し得、それによって安定な二重鎖を形成する。

30

【0070】

本明細書で用いる用語「相補的」は、核酸分子のヌクレオチド単位間のWatson-CrickまたはHoogsteen塩基対形成をいい、そして用語「結合」は、2つのポリペプチドもしくは化合物または関連ポリペプチドもしくは化合物またはそれらの組合せ間の、物理的または化学的相互作用を意味する。結合は、イオン性、非イオン性、ファンデルワールス性、疎水性相互作用などを含む。物理的相互作用は直接的または間接的のいずれかであり得る。間接的相互作用は、別のポリペプチドまたは化合物を介するか、またはその効果に起因し得る。直接的結合は、別のポリペプチドもしくは化合物を介しなくても、その効果に起因して生じもしない、その他の実質的な化学的中間体がない相互作用をいう。

40

【0071】

さらに、本発明の核酸分子は、配列番号1または配列番号26の核酸配列の一部のみ(例えば、プローブまたはプライマーとして使用され得るフラグメント、あるいはFGF-CXの生物学的に活性な部分をコードするフラグメント)を含み得る。本明細書中に提供されるフラグメントは、少なくとも6個の(連続する)核酸配列または少なくとも4個の(連続する)アミノ酸配列(それぞれ、核酸の場合には、特異的なハイブリダイゼーションを可能にし、またはアミノ酸の場合には、エピトープの特異的な認識を可能にするに十分な長さ)として規定され、そして全長配列よりも短いせいぜいいくらかの部分である。フ

50

ラグメントは、選択された核酸配列またはアミノ酸配列の任意の連続する部分に由来し得る。誘導体は、直接的にかまたは改変もしくは部分的置換によってかのいずれかでネイティブな化合物から形成される核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、ネイティブな化合物に類似する構造を有する（しかし、同一ではない）が、特定の成分または側鎖に関してネイティブな化合物とは異なる核酸配列またはアミノ酸配列である。アナログは、合成物であり得るか、または進化的に異なる起源に由来し得、そして野生型と比較して、類似の代謝活性または反対の代謝活性を有し得る。

【0072】

誘導体およびアナログは、以下に記載のように、誘導体またはアナログが、改変された核酸またはアミノ酸を含む場合、全長、または全長以外のものであり得る。本発明の核酸またはタンパク質の誘導体またはアナログは、種々の実施形態において、本発明の核酸もしくはタンパク質に、同一の大きさの核酸配列またはアミノ酸配列にわたって、または整列した配列と比較した場合（この整列は、当該分野で公知であるコンピューター相同性プログラムによって実施される）、少なくとも約70%、80%、85%、90%、95%、98%、もしくは99%もの同一性（好ましい同一性は、80~99%）で実質的に相同であるか、あるいはそのコードする核酸がストリンジェントの、中程度にストリンジェントの、または低いストリンジェントの条件下で上記のタンパク質をコードする配列の相補体にハイブリダイズし得る、領域を含む分子を包含するが、これらに限定されない。例えば、Ausubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、New York、NY、1993、および以下を参照のこと。例示のプログラムは、Gapプログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package、Version 8 for UNIX（登録商標）、Genetics Computer Group、University Research Park、Madison、WI）（デフォルト設定を使用、これは、SmithおよびWatermanのアルゴリズム（Adv. Appl. Math.、1981、2:482-489、これらは、その全体が参考として本明細書中に援用される）を使用する）を参照のこと。

【0073】

「相同な核酸配列」もしくは「相同なアミノ酸配列」、またはその改変体とは、上記で考察したように、ヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルにおける相同性によって特徴付けられる配列をいう。相同なヌクレオチド配列は、FGF-CXポリペプチドのアイソフォームをコードする配列をコードする。アイソフォームは、例えば、RNAの選択的スプライシングの結果として、同一の生物の異なる組織において発現され得る。あるいは、アイソフォームは、異なる遺伝子によってコードされ得る。本発明において、相同なヌクレオチド配列は、ヒト以外の種（哺乳動物が挙げられるが、これに限定されず、従って、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマおよび他の生物が挙げられ得る）のFGF-CXポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。相同なヌクレオチド配列はまた、天然に生じる対立遺伝子改変体および本明細書に記載されるヌクレオチド配列の変異体が挙げられるが、これらに限定されない。しかし、相同的ヌクレオチド配列は、ヒトFGF-CXタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含まない。相同核酸配列は、配列番号2または配列番号27の保存的アミノ酸置換（以下を参照のこと）、およびFGF-CX活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む。FGF-CXタンパク質の生物学的活性は以下に記載されている。相同的アミノ酸配列は、ヒトFGF-CXポリペプチドのアミノ酸配列をコードしない。

【0074】

ヒトFGF-CX遺伝子のクローニングから決定されたヌクレオチド配列は、他の細胞型（例えば、他の組織由来）におけるFGF-CXホモログ、ならびに他の哺乳動物由来のFGF-CXホモログを同定および/またはクローニングする際の使用のために設計されるプローブおよびプライマーの作製を可能にする。このプローブ/プライマーは、代表的には、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。このオリゴヌクレオチドは、代表

10

20

30

40

50

的には、配列番号1または配列番号26の少なくとも約12個、約25個、約50個、約100個、約150個、約200個、約250個、約300個、約350個または約400個以上の連続するセンス鎖ヌクレオチド配列；または配列番号1または配列番号26のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列；あるいは配列番号1または配列番号26の天然に存在する変異体に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。

【0075】

ヒトFGF-CXヌクレオチド配列に基づくプローブは、同じかまたは相同なタンパク質をコードする転写物またはゲノム配列を検出するために使用され得る。種々の実施形態において、このプローブはさらに、プローブに付着した標識基を含み、例えば、この標識基は放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子であり得る。このようなプローブは、FGF-CXタンパク質を誤って発現する細胞または組織を同定するための診断試験キットの一部として、例えば、被験体由来の細胞のサンプル中のFGF-CXコード核酸のレベルを測定すること（例えば、FGF-CX mRNAレベルを検出すること、またはゲノムFGF-CX遺伝子の変異しているかまたは欠失しているか否かを決定すること）によって使用され得る。

10

【0076】

「FGF-CXの生物学的に活性な部分を有するポリペプチド」は、本発明のポリペプチドの活性に類似するが必ずしも同一ではない活性を示すポリペプチドをいい、用量依存性の有無に関わらず、特定の生物学的アッセイにおいて測定されるような成熟形態を含む。「FGF-CXの生物学的に活性な部分」をコードする核酸フラグメントは、FGF-CXの生物学的活性（FGF-CXタンパク質の生物学的活性は、以下に記載される）を有するポリペプチドをコードする、配列番号1または配列番号26の一部を単離し、FGF-CXタンパク質のコードされた部分を発現させ（例えば、インビトロでの組換え発現によって）、そしてFGF-CXのコードされた部分の活性を評価することによって調製され得る。例えば、FGF-CXの生物学的に活性な部分をコードする核酸フラグメントは、必要に応じて、ATP結合ドメインを含み得る。別の実施形態において、FGF-CXの生物学的に活性な部分をコードする核酸フラグメントは、1つ以上の領域を含む。

20

【0077】

（FGF-CXの改変体）

本発明はさらに、遺伝コードの縮重に起因して、配列番号1または配列番号26に示されるヌクレオチド配列とは異なる核酸分子を包含する。それにより、これらの核酸は、配列番号1または配列番号26に示されるヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質と同じFGF-CXタンパク質をコードする。別の実施形態において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号2または配列番号27に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。

30

【0078】

配列番号1または配列番号26に示されるヒトFGF-CXヌクレオチド配列に加えて、FGF-CXのアミノ酸配列における変化を導くDNA配列多型は、集団（例えば、ヒト集団）内に存在し得ることが、当業者によって理解される。FGF-CX遺伝子中のこのような遺伝的多型は、天然の対立遺伝子のバリエーションに起因して、集団内の個体間に存在し得る。本明細書中で使用される場合、用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」は、FGF-CXタンパク質、好ましくは哺乳動物のFGF-CXタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含む核酸分子をいう。このような天然の対立遺伝子のバリエーションは、代表的には、FGF-CX遺伝子のヌクレオチド配列において1～5%の変動性を生じ得る。天然の対立遺伝子バリエーションの結果であり、そしてFGF-CXの機能的活性を変化させない、FGF-CX内の任意および全てのこのようなヌクレオチドのバリエーションならびに得られるアミノ酸多型は、本発明の範囲内であると意図される。

40

【0079】

50

さらに、他の種由来の FGF - CX タンパク質をコードし、従って、配列番号 1 もしくは配列番号 26 のヒト配列とは異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子は、本発明の範囲内にあることが意図される。本発明の FGF - CX cDNA の天然の対立遺伝子改変体およびホモログに対応する核酸分子は、本明細書中に開示されるヒト FGF - CX 核酸に対するその相同性に基づいて、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で、標準的なハイブリダイゼーション技術に従うハイブリダイゼーションプローブとしてヒト cDNA またはその一部を用いて単離され得る。例えば、可溶性ヒト FGF - CX cDNA は、ヒトの膜結合 FGF - CX に対するその相同性に基づいて単離され得る。同様に、膜結合ヒト FGF - CX cDNA は、可溶性ヒト FGF - CX に対するその相同性に基づいて単離され得る。

10

【0080】

従って、別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、少なくとも 6 ヌクレオチド長であり、そしてストリンジェント条件下で配列番号 1 または 26 のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズする。別の実施形態では、この核酸は、少なくとも 10、25、50、100、250、500 または 750 ヌクレオチド長である。別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、コード領域にハイブリダイズする。本明細書中で用いられる場合、用語「ストリンジェント条件下でハイブリダイズする」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関して、互いに少なくとも 60% 相同なヌクレオチド配列が代表的には互いにハイブリダイズしたままである条件を記載することを意図する。

20

【0081】

ホモログ（すなわち、ヒト以外の種由来の FGF - CX タンパク質をコードする核酸）または他の関連配列（例えば、パラログ（paralogs））は、特定のヒト配列の全てまたは一部をプローブとし、核酸ハイブリダイゼーションおよびクローニングに関して当該分野で周知の方法を使用して、低い、中程度の、または高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションによって入手され得る。

【0082】

本明細書で用いられる場合、語句「ストリンジェントハイブリダイゼーション条件」は、その条件下で、プローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドが、その標的配列にハイブリダイズするが、その他の配列にはハイブリダイズしない条件をいう。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、そして異なる状況で異なる。より長い配列は、より短い配列より高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジェントな条件は、規定されたイオン強度および pH で、特定の配列の熱融解点（ T_m ）より約 5 低いように選択される。この T_m は、標的配列に相補的なプローブの 50% が、平衡状態で標的配列にハイブリダイズする（規定されたイオン強度、pH および核酸濃度下）温度である。標的配列は一般に過剰で存在するので、 T_m では、50% のプローブが平衡状態で占有されている。代表的には、ストリンジェントな条件は、pH 7.0 ~ 8.3 で、塩濃度が約 1.0 M ナトリウムイオンより少なく、代表的には約 0.01 ~ 1.0 M ナトリウムイオン（またはその他の塩）、そして温度が、短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド（例えば、10 nt ~ 50 nt）について少なくとも約 30、そしてより長いプローブ、プライマーおよびオリゴヌクレオチドについて少なくとも約 60 であるような条件である。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドのような、脱安定化剤の添加で達成され得る。

30

40

【0083】

上記のようなストリンジェント条件は、当業者に公知であり、そして CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1 - 6.3.6 に見出され得る。好ましくは、この条件は、互いに少なくとも約 65%、約 70%、約 75%、約 85%、約 90%、約 95%、約 98% または約 99% 相同な配列が、代表的には互いにハイブリダイズしたままであるような条件である。ストリンジェントハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、6xSSC、50 mM Tris - HCl (pH 7.5)、1 mM EDTA

50

、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.02% BSA、および500 mg/ml 変性サケ精子DNAを含む高塩緩衝液中での65 °Cでのハイブリダイゼーションである。このハイブリダイゼーション後に、0.2×SSC、0.01% BSA中で50 °Cにて、1回以上洗浄する。ストリンジェント条件下で配列番号1の配列にハイブリダイズする、本発明の単離された核酸分子は、天然に存在する核酸分子に対応する。本明細書中で使用される場合、「天然に存在する」核酸分子とは、天然に存在する（例えば、天然のタンパク質をコードする）ヌクレオチド配列を有する、RNA分子またはDNA分子をいう。

【0084】

ホモログ（すなわち、ヒト以外の種由来のFGF-CXタンパク質をコードする核酸）または他の関連配列（例えば、パラログ）は、特定のヒト配列の全てまたは一部をプローブとし、核酸ハイブリダイゼーションおよびクローニングに関して当該分野で周知の方法を使用して、低い、中程度の、または高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションによって入手され得る。 10

【0085】

第2の実施形態では、配列番号1もしくは26またはそれらのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子に、中程度のストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得る核酸配列が提供される。中程度のストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、55 °Cでの6×SSC、5×デンハルト溶液、0.5% SDSおよび100 mg/ml 変性サケ精子DNA中でのハイブリダイゼーション、続いて1×SSC、0.1% SDS中37 °Cで、1回以上洗浄する。用いられ得る中程度のストリンジェンシーの他の条件は、当該分野で周知である。例えば、Ausubelら（編）、1993、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NYおよびKriegler, 1990、GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NYを参照のこと。 20

【0086】

第3の実施形態では、配列番号1もしくは26、またはそれらのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子に、低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得る核酸が提供される。低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、35%ホルムアミド、5×SSC、50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.2% BSA、100 mg/mlの変性サケ精子DNA、10%（重量/容量）デキストラン硫酸中40 °Cでのハイブリダイゼーション、続いて2×SSC、25 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM EDTAおよび0.1% SDS中50 °Cで、1回以上洗浄する。用いられ得る低ストリンジェンシーの他の条件は、当該分野で周知である（例えば、種交差ハイブリダイゼーションについて用いられるように）。例えば、Ausubelら（編）、1993、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NYならびにKriegler, 1990、GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY; ShiloおよびWeinberg, 1981, Proc Natl Acad Sci USA 78:6789-6792を参照のこと。 30 40

【0087】

（保存的変異）

集団中に存在し得る、FGF-CX配列の天然に存在する対立遺伝子改変体に加えて、当業者は、配列番号1もしくは26のヌクレオチド配列への変異によって変化が導入され得、それによって、FGF-CXタンパク質の機能的能力を変更することなく、コードされるFGF-CXタンパク質のアミノ酸配列に変化がもたらされることをさらに理解する。例えば、「非必須」アミノ酸残基にてアミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換は、配列 50

番号1または26の配列において行われ得る。「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を変更することなく、FGF-CXの野生型配列から、変更され得る残基であり、一方、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性に必要とされる。例えば、本発明のFGF-CXタンパク質の間で保存されているアミノ酸残基は、特に変更を受け入れ難いと予測される。

【0088】

さらに、図4として表される整列によって示されるように、FGFファミリーメンバー間で保存されるアミノ酸残基は、変更に対して敏感に反応しないと予想される。例えば、本発明のFGF-CXタンパク質は、FGFファミリーのメンバー（すなわち、FGF-9およびXF-GF-CXタンパク質、ならびにFGF-CXホモログ）において代表的に保存される領域である少なくとも1つのドメインを含み得る。このようなものとして、これらの保存されるドメインは、変異に対して敏感に反応しそうにない。しかし、他のアミノ酸残基（例えば、FGFタンパク質のメンバー間で保存的でないかまたは単に半保存的であるアミノ酸残基）は、活性について必須でなくてもよく、従って、変更に対してより敏感に反応するようである。

10

【0089】

本発明の別の局面は、活性に必須ではないアミノ酸残基における変化を含む、FGF-CXタンパク質をコードする核酸分子に関する。このようなFGF-CXタンパク質は、アミノ酸配列が、配列番号2または27とは異なるが、生物学的活性をなお保持する。1つの実施形態では、単離された核酸分子は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含み、ここで、このタンパク質は、配列番号2または27のアミノ酸配列に少なくとも約75%相同であるアミノ酸配列を含む。好ましくは、この核酸によってコードされるタンパク質は、配列番号2または27に少なくとも約80%相同であり、より好ましくは少なくとも約90%、約95%、約98%相同であり、そして最も好ましくは配列番号2に対して少なくとも約99%相同である。

20

【0090】

配列番号2のタンパク質に相同なFGF-CXタンパク質をコードする単離された核酸分子は、配列番号1もしくは26のヌクレオチド配列に1以上のヌクレオチドの置換、付加または欠失を導入することにより作製され得、その結果、1以上のアミノ酸の置換、付加または欠失が、コードされるタンパク質に導入される。

30

【0091】

変異は、標準的な技術（例えば、部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発）によって配列番号1または26に導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換が、1以上の推定非必須アミノ酸残基にて作製される。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される、アミノ酸置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で定義されている。特定のアミノ酸は、1より多くの分類可能な特徴を有する側鎖を参照のこととする。これらのファミリーとしては、以下が挙げられる：塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アルパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、トリプトファン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、チロシン、トリプトファン）、分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）。従って、増殖因子中の推定された非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖のファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換される。あるいは、別の実施形態では、変異は、増殖因子コード配列の全てまたは一部に沿って（例えば、飽和変異誘発（saturation mutagenesis）によって）ランダムに導入され得、そして得られる変異体は、増殖因子の生物学的活性についてスクリーニングされて、活性を維持する変異体を同定し得る。配列番号1、3、および26の変異誘発に

40

50

続いて、コードされるタンパク質は、当該分野で公知の任意の組換え技術によって発現され得、そしてこのタンパク質の活性が決定され得る。

【0092】

1つの重要な実施形態では、変異FGF-CXタンパク質は、以下についてアッセイされ得る：(1)他のFGF-CXタンパク質、他の細胞表面タンパク質、または生物学的に活性なそれらの部分と、タンパク質：タンパク質相互作用を形成する能力、(2)変異FGF-CXタンパク質と、FGF-CXのレセプターとの間の複合体形成；(3)変異FGF-CXタンパク質が細胞内標的タンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合する能力；(例えば、アビジンタンパク質)；あるいは(4)抗FGF-CXタンパク質抗体に特異的に結合する能力。

10

【0093】

(アンチセンス)

本発明の別の局面は、配列番号1もしくは配列番号26またはそのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子にハイブリダイズし得るかまたは相補的である、単離されたアンチセンス核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸に相補的である(例えば、二本鎖cDNA分子のコード鎖に相補的であるかまたはmRNA配列に相補的である)ヌクレオチド配列を含む。特定の局面では、少なくとも約10、約25、約50、約100、約250もしくは約500ヌクレオチドまたは全体のFGF-CXコード鎖、またはそれらの一部のみ相補的な配列を含む、アンチセンス核酸分子が提供される。配列番号2もしくは27のFGF-CXタンパク質のフラグメント、ホモログ、誘導体およびアナログをコードする核酸分子、または配列番号1もしくは26のFGF-CXの核酸配列に相補的なアンチセンス核酸がさらに提供される。

20

【0094】

1つの実施形態では、アンチセンス核酸分子は、FGF-CXをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対してアンチセンスである。用語「コード領域」とは、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含む、ヌクレオチド配列の領域をいう(例えば、配列番号2または27に対応する、ヒトFGF-CXのタンパク質コード領域)。別の実施形態では、このアンチセンス核酸分子は、FGF-CXをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対してアンチセンスである。用語「非コード領域」とは、コード領域に隣接する、アミノ酸に翻訳されない、5'配列および3'配列をいう(すなわち、5'非翻訳領域および3'非翻訳領域ともいわれる)。

30

【0095】

本明細書中に開示されるFGF-CXをコードするコード鎖配列(例えば、配列番号1または26)を考慮すれば、本発明のアンチセンス核酸は、WatsonおよびCrickまたはHoogsteenの塩基対合の規則に従って設計され得る。アンチセンス核酸分子は、FGF-CX mRNAのコード領域全体に相補的であり得るが、より好ましくは、FGF-CX mRNAのコード領域または非コード領域の一部にのみアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、FGF-CX mRNAの翻訳開始部位を取り囲む領域に相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約5、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45または約50ヌクレオチド長であり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で公知の手順を用いて、化学的合成または酵素連結反応を用いて構築され得る。例えば、アンチセンス核酸(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド)は、天然に存在するヌクレオチド、またはこの分子の生物学的安定性を増大させるように、もしくはアンチセンス核酸とセンス核酸との間で形成される二重鎖の物理的安定性を増大させるように設計された種々に改変されたヌクレオチドを用いて化学的に合成され得る(例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドが用いられ得る)。

40

【0096】

アンチセンス核酸を作製するために用いられ得る改変されたヌクレオチドの例としては以

50

下が挙げられる：5 - フルオロウラシル、5 - ブロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 β - D - ガラクトシルキユーオシン、イノシン、N6 - イソペンテニルアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2, 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、 β - D - マンノシルキユーオシン、5' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、ワイプトキソシン、シュードウラシル、キユーオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、および 2, 6 - ジアミノプリン。あるいは、このアンチセンス核酸は、核酸がアンチセンス方向でサブクロニングされた発現ベクターを用いて生物学的に生成され得る (すなわち、挿入された核酸から転写されたRNAは、以下の小節にさらに記載される、目的の標的核酸に対してアンチセンス方向である)。

【0097】

本発明のアンチセンス核酸分子は、代表的には被験体に投与されるか、またはインサイチュで生成され、その結果それらは、FGF - CXタンパク質をコードする細胞性mRNAおよび/またはゲノムDNAとハイブリダイズするか、またはそれに結合し、それによってこのタンパク質の発現を、例えば転写および/または翻訳を阻害することによって阻害する。ハイブリダイゼーションは、安定な二重鎖を形成する従来のヌクレオチド相補性によってか、または例えばDNA二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんのメジャーグループ (major groove) における特異的相互作用を介してであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位での直接的注射が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的化するように改変され得、次いで全身に投与される。例えば、全身投与のために、アンチセンス分子は、それらが選択された細胞表面上に発現されたレセプターまたは抗原に特異的に結合するように改変され得る。これは、例えば、そのアンチセンス核酸分子を細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に連結することによる。このアンチセンス核酸分子はまた、本明細書中に記載されるベクターを用いて細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が強力なp01 IIPプロモーターまたはp01 IIIプロモーターの制御下に置かれているベクター構築物が、好ましい。

【0098】

なお別の実施形態において、本発明のアンチセンス核酸分子は、 β - アノマー核酸分子である。 β - アノマー核酸分子は、相補的RNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成する。ここで、通常の β - ユニットとは対照的に、鎖は、互いに平行に走行する (Gaultierら (1987) Nucleic Acids Res 15: 6625 ~ 6641)。このアンチセンス核酸分子はまた、2' - o - メチルリボヌクレオチド (Inoueら、(1987) Nucleic Acids Res 15: 6131 ~ 6148) またはキメラRNA - DNAアナログ (Inoueら (1987) FEBS Lett 215: 327 ~ 330) を含み得る。

【0099】

(リボザイムおよびPNA部分)

このような改変としては、非制限的な例として、改変塩基、および糖リン酸骨格が改変または誘導体化された核酸が挙げられる。これらの改変は、少なくとも一部は、改変された核酸の化学的安定性を増強するために実施され、その結果、それらは、例えば、被験体で

の治療的適用におけるアンチセンス結合核酸として使用され得る。

【0100】

なお別の実施形態において、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザイムは、一本鎖核酸（例えば、mRNA）を切断し得るリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNA分子であり、これらは、その一本鎖核酸に対して相補領域を有する。従って、リボザイム（例えば、ハンマーヘッド型リボザイム（HaselehoffおよびGerlach（1988）Nature 334:585~591に記載される））を使用して、FGF-CX mRNA転写物を触媒的に切断し、それによってFGF-CX mRNAの翻訳を阻害し得る。FGF-CXをコードする核酸に特異性を有するリボザイムは、本明細書中に開示されるFGF-CX DNAのヌクレオチド配列（すなわち、配列番号1）に基づいて設計され得る。例えば、活性部位のヌクレオチド配列が、FGF-CXをコードするmRNA内で切断されるヌクレオチド配列に相補的である、テトラヒメナL-19 IVS RNAの誘導体が構築され得る。例えば、Cechら、米国特許第4,987,071号；およびCechら、米国特許第5,116,742号を参照のこと。あるいは、FGF-CX mRNAを使用して、RNA分子のプールから、特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNAを選択し得る。例えば、Bartelら（1993）Science 261:1411~1418を参照のこと。

10

【0101】

あるいは、FGF-CX遺伝子発現は、FGF-CXの調節領域（例えば、FGF-CXのプロモーターおよび/またはエンハンサー）に相補的なヌクレオチド配列を標的化し、標的細胞中でFGF-CX遺伝子の転写を妨害する三重らせん構造を形成することによって阻害され得る。一般には、Helene.（1991）Anticancer Drug Des. 6:569~84；Heleneら（1992）Ann. N. Y. Acad. Sci. 660:27~36；およびMaher（1992）Bioassays 14:807~15を参照のこと。

20

【0102】

種々の実施形態において、FGF-CXの核酸は、塩基部分、糖部分またはリン酸骨格で改変され、例えば、その分子の安定性、ハイブリダイゼーションまたは可溶性を改善し得る。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸骨格を改変して、ペプチド核酸を生成し得る（Hyrupら（1996）Bioorg Med Chem 4:5~23を参照のこと）。本明細書中で使用される場合、用語「ペプチド核酸」または「PNA」は、デオキシリボースリン酸骨格が偽ペプチド骨格によって置換され、そして4つの天然の核酸塩基のみが保持されている核酸模倣物（例えば、DNA模倣物）をいう。PNAの中性の骨格は、低いイオン強度の条件下でDNAおよびRNAに対する特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。PNAオリゴマーの合成は、上記のHyrupら（1996）；Perry-O'Keefeら（1996）PNAS 93:14670~675において記載されるような標準的固相ペプチド合成プロトコルを用いて行われ得る。

30

【0103】

FGF-CXのPNAは、治療的適用および診断的適用において使用され得る。例えば、PNAは、例えば転写または翻訳の停止を誘導することまたは複製を阻害することによる、遺伝子発現の配列特異的調節のためのアンチセンスまたは抗遺伝子剤として使用され得る。FGF-CXのPNAはまた、例えばPNA指向性PCRクランピングによる遺伝子における一塩基対変異の分析において；他の酵素（例えば、S1ヌクレアーゼ）と組み合わせて使用される場合の人工制限酵素として（Hyrup B.（1996）上記）；またはDNA配列およびハイブリダイゼーションのプロープもしくはプライマーとして（Hyrupら（1996）上記；Perry-O'Keefe（1996）、上記）、使用され得る。

40

【0104】

別の実施形態において、FGF-CXのPNAは、例えば、それらの安定性または細胞性

50

取り込みを増強するために、PNAに脂溶性基または他のヘルパー基を結合することによって、PNA-DNAキメラの形成によって、またはリポソームもしくは当該分野において公知の薬物送達の他の技術の使用によって改変され得る。例えば、PNAおよびDNAの有利な特性を組合せ得る、FGF-CXのPNA-DNAキメラが生成され得る。PNA部分が高い結合親和性および特異性を提供する一方で、そのようなキメラは、DNA認識酵素（例えば、RNase HおよびDNAポリメラーゼ）がDNA部分と相互作用するのを可能にする。PNA-DNAキメラは、塩基のスタッキング、核塩基間の結合数および方向を考慮して選択される適切な長さのリンカーを使用して連結され得る（Hyrup（1996）上記）。PNA-DNAキメラの合成は、Hyrup（1996）上記およびFinnら（1996）Nucl Acids Res 24：3357～63において記載されるように行われ得る。例えば、DNA鎖は、標準的なホスホラミダイトカップリング化学を用いて固体支持体上で合成され得、そして改変されたヌクレオシドアナログ（例えば、5'-(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシ-チミジンホスホラミダイト）が、PNAとDNAの5'末端との間に使用され得る（Magら（1989）Nucl Acid Res 17：5973～88）。次いで、PNAモノマーが段階様式でカップリングされ、5'PNAセグメントおよび3'DNAセグメントを有するキメラ分子を生成する（Finnら（1996）上記）。あるいは、5'DNAセグメントおよび3'PNAセグメントを用いて、キメラ分子が合成され得る。Peterseなら（1975）Bioorg Med Chem Lett 5：1119～1124を参照のこと。

10

20

【0105】

他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、以下のような他の付属の基を含み得る：ペプチド（例えば、インピボで宿主細胞レセプターを標的化するため）、または細胞膜を横切る輸送を容易にする因子（例えば、Letsingerら、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86：6553～6556；Lemaitreら、1987、Proc. Natl. Acad. Sci. 84：648～652；PCT公開番号WO88/09810を参照のこと）、または血液脳関門（例えば、PCT公開番号WO89/10134を参照のこと）。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション誘発切断剤（例えば、Krolら、1988、BioTechniques 6：958～976を参照のこと）、またはインターカレート剤（例えば、Zon, 1988、Pharm. Res. 5：539～549を参照のこと）で改変され得る。この目的のために、オリゴヌクレオチドは、別の分子（例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発架橋剤（hybridization triggered cleavage agent）、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘発切断剤など）に結合され得る。

30

【0106】

（FGF-CXポリペプチド）

本発明の新規のタンパク質は、配列が図1（配列番号2）または配列番号27に提供されるFGF-CX様タンパク質を含む。本発明はまた、その任意の残基が図1に示される対応する残基から変化しているが、そのFGF-CX様活性および生理学的機能を維持するタンパク質、またはその機能的フラグメントをなおコードする、変異体または改変体タンパク質を含む。この変異体または改変体タンパク質において、残基の20%以上までが、このように変化され得る。

40

【0107】

一般に、FGF-CX様機能を保持するFGF-CX様改変体は、配列中の特定位置の残基が他のアミノ酸により置換され、そしてさらに、元のタンパク質の2つの残基間にさらなる残基を挿入する可能性、および元の配列から1つ以上の残基を欠失する可能性を含む任意の改変体を含む。任意のアミノ酸置換、挿入または欠失が、本発明に包含される。好適な状況では、この置換は、上記で規定されるような保存的置換である。さらに、本発明の範囲を限定することなく、表2中の以下の位置（配列番号2において規定される番号付けを用いる）は、提示されるように置換され得て、その結果、変異体または改変体タンバ

50

ク質は、提示される置換を1つ以上含み得る。示唆される置換は、所定の位置において作られ得る可能性のある置換の範囲を限定しない。

【0108】

(表2)

位置 可能性のある置換

6 : Gluから Asp	
9 : Glyから Ser、Thr、または Asn	
10 : Pheから Tyr	
11 : Leuから Pheまたは Ile	
15 : Gluから Asp	10
16 : Glyから Ala	
17 : Leuから Ileまたは Val	
19 : Glnが欠失し得る	
21 : Valから Pheまたは Ile	
31 : Glyから Lys、Arg、Ser、または Ala	
33 : Argから Lysまたは Ser	
35 : Proから Leuまたは Val	
38 : Glyから Asnまたは Ser	
39 : Gluから Asp	
40 : Argから Lys、His、または Pro	20
42 : Serから Thr、Ala、または Gly	
43 : Alaから Gln、Asn、または Ser	
48 : Alaから Serまたは Gly	
51 : Glyから Ala	
53 : Glyから Alaまたは欠失	
54 : Alaから Gly、Val、または欠失	
55 : Alaから Serまたは Thr	
56 : Glnから Asp、Glu、または Asn	
58 : Alaから Ser、Thr、Asn、Gln、Asp、または Glu	
61 : Hisから Gln、Asn、Lys、または Arg	30
78 : Glnから Asn、Glu、または Asp	
80 : Leuから Pheまたは Ile	
82 : Aspから Glu、Asn、または Gln	
84 : Serから Asn、Thr、または Gln	
85 : Valから Ile	
90 : Glnから Asnまたは Lys	
103 : Valから Ile	
115 : Serから Thr	
123 : Aspから Glu	
128 : Tyrから Phe	40
135 : Serから Thr、Gln、または Asn	
138 : Ileから Valまたは Leu	
155 : Ileから Leu	
159 : Glyから Valまたは Ala	
161 : Thrから Ser	
166 : Pheから Tyr	
177 : Aspから Glu	
181 : Serから Alaまたは Thr	
198 : Gluから Asp	
199 : Argから Lys	50

207 : Leu から Ile または Val

209 : Met から任意の残基

211 : Thr から Ser

本発明の1つの局面は、単離されたFGF-CXタンパク質、およびその生物学的に活性な部分、またはそれらの誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログに関する。抗FGF-CX抗体を惹起するための免疫原としての使用のために適切なポリペプチドフラグメントもまた提供される。1つの実施形態において、ネイティブなFGF-CXタンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を用いる適切な精製スキームによって、細胞または組織供給源から単離され得る。別の実施形態において、FGF-CXタンパク質は、組換えDNA技術によって産生される。組換え発現の代わりに、FGF-CXタンパク質またはポリペプチドは、標準的なペプチド合成技術を用いて化学合成され得る。 10

【0109】

「単離された」または「精製された」タンパク質あるいはその生物学的に活性な部分は、FGF-CXタンパク質の由来する細胞または組織供給源由来の細胞性物質または他の夾雑タンパク質を実質的に含まないか、あるいは化学合成される場合に化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。用語「細胞性物質を実質的に含まない」は、FGF-CXタンパク質が、単離または組換え産生される細胞の細胞性成分から、分離されているFGF-CXタンパク質の調製物を含む。1つの実施形態において、用語「細胞性物質を実質的に含まない」は、非FGF-CXタンパク質（本明細書中において「夾雑タンパク質」とも呼ばれる）を約30%未満（乾燥重量にて）、より好ましくは非FGF-CXタンパク質を約20%未満、なおより好ましくは非FGF-CXタンパク質を約10%未満、そして最も好ましくは非FGF-CXタンパク質を約5%未満有する、FGF-CXタンパク質の調製物を含む。FGF-CXタンパク質またはその生物学的に活性な部分が組換え産生される場合、好ましくは、調製物はまた培養培地を実質的に含まない。すなわち、培養培地は、そのタンパク質調製物の容量の約20%未満、より好ましくは約10%未満、そして最も好ましくは約5%未満を示す。 20

【0110】

用語「化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」は、タンパク質が、そのタンパク質の合成に關与する化学前駆体または他の化学物質から分離されているFGF-CXタンパク質の調製物を含む。1つの実施形態において、用語「化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」は、化学前駆体または非FGF-CXの化学物質を約30%未満（乾燥重量にて）、より好ましくは化学前駆体または非FGF-CX化学物質を約20%未満、なおより好ましくは化学前駆体または非FGF-CX化学物質を約10%未満、そして最も好ましくは化学前駆体または非FGF-CX化学物質を約5%未満有する、FGF-CXタンパク質の調製物を含む。 30

【0111】

FGF-CXタンパク質の生物学的に活性な部分は、全長FGF-CXタンパク質より少ないアミノ酸を含み、そしてFGF-CXタンパク質の少なくとも1つの活性を示す、FGF-CXタンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号2に示されるアミノ酸配列）に十分に相同なアミノ酸配列、またはFGF-CXタンパク質のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列を含むペプチドを含む。代表的には、生物学的に活性な部分は、FGF-CXタンパク質の少なくとも1つの活性を有するドメインまたはモチーフを含む。FGF-CXタンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、長さが10、25、50、100またはそれより多いアミノ酸残基であるポリペプチドであり得る。 40

【0112】

本発明のFGF-CXタンパク質の生物学的に活性な部分は、FGFファミリータンパク質間で実質的に保存される、少なくとも1つの上記で同定されるドメインを含み得る。さらに、他の領域が欠失している他の生物学的に活性な部分が、組換え技術によって調製され得、そしてネイティブなFGF-CXタンパク質の機能的活性のうちの1つ以上について評価され得る。

【0113】

1つの実施形態において、FGF-CXタンパク質は、配列番号2または27に示されるアミノ酸配列を有する。他の実施形態において、FGF-CXタンパク質は、配列番号2または27に実質的に相同であり、そして以下に詳細に記載されるように、天然の対立遺伝子改変体または変異誘発に起因してアミノ酸配列が異なるが、配列番号2または27のタンパク質の機能的活性を保持する。従って、別の実施形態において、このFGF-CXタンパク質は、配列番号2または27のアミノ酸配列に少なくとも約45%の相同性を有するアミノ酸を含むタンパク質であり、そして配列番号2または27のFGF-CXタンパク質の機能的活性を保持するタンパク質である。FGF-CXタンパク質は、別の実施形態において、FGF-CXタンパク質は、配列番号2または27のアミノ酸配列に少なくとも約45%、そしてより好ましくは55%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%またはさらに99%相同なアミノ酸配列を含むタンパク質であり、そして、配列番号2または27の配列を有する対応するポリペプチドのFGF-CXタンパク質の機能的活性を保持するタンパク質である。

10

【0114】

(2つ以上の配列間の相同性の決定)

2つのアミノ酸配列または2つの核酸の相同性の百分率を決定するために、配列は、至適な比較の目的のために整列される(例えば、ギャップは、配列間の最適な整列のために、比較されるいずれかの配列に導入され得る)。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置でのアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第1の配列中の位置が、第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められる場合、分子はその位置で相同である(すなわち、本明細書中で使用される場合、アミノ酸または核酸の「相同性」は、アミノ酸または核酸の「同一性」と等価である)。

20

【0115】

核酸配列の相同性は、2つの配列間の同一性の程度として決定され得る。相同性は、当該分野において公知のコンピュータープログラム(例えば、GCGプログラムパッケージにおいて提供されるGAPソフトウェア)を用いて決定され得る。NeedlemanおよびWunsch, 1970 J Mol Biol 48:443~453を参照のこと。核酸配列比較のための以下の設定(GAP作製ペナルティー、5.0、およびGAP伸長ペナルティー、0.3)を用いてGCG GAPソフトウェアを使用すると、上記で言及される類似の核酸配列のコード領域は、配列番号1または26に示されるDNA配列のCDS(コード)部分と、好ましくは少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%の同一性の程度を示す。

30

【0116】

用語「配列同一性」は、2つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列が、特定の比較領域にわたって、残基毎を基準として同一である程度をいう。用語「配列同一性のパーセンテージ」は、以下により算出される:この比較領域にわたって最適に整列された2つの配列を比較すること、両方の配列において同一の核酸塩基(例えば、核酸の場合にはA、T、C、G、U、またはI)が存在する位置の数を決定し、一致した位置の数を導くこと、この一致した位置の数を、比較領域の内の位置の総数(すなわち、ウィンドウサイズ)で除算すること、およびその結果を100で乗算して、配列同一性のパーセンテージを導くこと。用語「実質的な同一性」は、本明細書中で使用される場合、ポリヌクレオチド配列の特徴を示し、ここでこのポリヌクレオチドは、比較領域にわたり参照配列と比較して、少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも85%の配列同一性、そして頻繁には90~95%の配列同一性、より通常には少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。用語「陽性(positive)残基のパーセンテージ」は、以下により算出される:その比較領域にわたって最適に整列された2つの配列を比較すること、上記のように同一のアミノ酸および保存的アミノ酸置換が、両方の配列において存在する位置の数を決定し、一致した位置の数を導くこと、この一致した位置の数を、比較領域中の位置の総数(すなわち、ウィンドウサイズ)で除算すること、およびその結果を100で

40

50

乗算して、陽性残基のパーセンテージを導くこと。

【0117】

(キメラタンパク質および融合タンパク質)

本発明はまた、FGF-CXキメラタンパク質または融合タンパク質を提供する。本明細書中で使用される場合、FGF-CX「キメラタンパク質」またはFGF-CX「融合タンパク質」は、非FGF-CXポリペプチドに作動可能に連結された、FGF-CXポリペプチドを含む。「FGF-CXポリペプチド」は、FGF-CXに対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいい、「非FGF-CXポリペプチド」は、FGF-CXタンパク質に対して実質的に相同ではないタンパク質(例えば、FGF-CXタンパク質とは異なり、かつ同一でかまたは異なる生物体に由来するタンパク質)に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。FGF-CX融合タンパク質において、このFGF-CXポリペプチドは、FGF-CXタンパク質のすべてまたは一部分に対応し得る。1つの実施形態では、FGF-CX融合タンパク質は、FGF-CXタンパク質の少なくとも1つの生物学的に活性な部分を含む。別の実施形態では、FGF-CX融合タンパク質は、FGF-CXタンパク質の少なくとも2つの生物学的に活性な部分を含む。別の実施形態においてFGF-CX融合タンパク質は、少なくとも2つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質において、用語「作動可能に連結された」は、FGF-CXポリペプチドおよび非FGF-CXポリペプチドが、インフレームで互いに融合されていることを示すことが意図される。非FGF-CXポリペプチドは、FGF-CXポリペプチドのN末端またはC末端に融合され得る。

10

20

【0118】

例えば、1つの実施形態において、FGF-CX融合タンパク質は、第2のタンパク質の細胞外ドメインに作動可能に連結されたFGF-CXポリペプチドを含む。このような融合タンパク質はさらに、FGF-CX活性を調節する化合物についてのスクリーニングアッセイに使用され得る(このようなアッセイは、以下に詳細に記載される)。

【0119】

別の実施形態においては、この融合タンパク質は、GST-FGF-CX融合タンパク質であり、ここではFGF-CX配列が、GST(すなわち、グルタチオンS-トランスフェラーゼ)配列のC末端に融合される。このような融合タンパク質は、組換えFGF-CXの精製を容易にし得る。

30

【0120】

なお別の実施形態において、この融合タンパク質は、N末端に異種シグナル配列を含むFGF-CXタンパク質である。例えば、ネイティブFGF-CXシグナル配列(すなわち、配列番号2または27のアミノ酸1~20)は、除かれて、別のタンパク質由来のシグナル配列に置き換えられ得る。特定の宿主細胞(例えば、哺乳動物宿主細胞)において、FGF-CXの発現および/または分泌は、異種シグナル配列の使用を介して増加され得る。

【0121】

別の実施形態において、この融合タンパク質は、FGF-CX-免疫グロブリン融合タンパク質であり、ここで、FGF-CX配列が、免疫グロブリンタンパク質ファミリーのメンバーに由来する配列に融合された一つ以上のドメインを含む。本発明のこのFGF-CX-免疫グロブリン融合タンパク質は、薬学的組成物中に取り込まれ、そして被験体に投与されて、細胞の表面上でFGF-CXリガントとFGF-CXタンパク質との間の相互作用を阻害し、それによってインビボのFGF-CX媒介シグナル伝達を抑制し得る。1つの限定しない例において、考え得るFGF-CXリガントは、FGF-CXレセプターである。このFGF-CX-免疫グロブリン融合タンパク質を用い、FGF-CX同族リガントの生体利用性に影響を与え得る。FGF-CXリガント/FGF-CXの相互作用の阻害は、増殖障害ならびに分化障害の両方の処置、および細胞生存を調節(例えば、促進または阻害)することに、治療的に有用であり得る。さらに、本発明のこのFGF-CX-免疫グロブリン融合タンパク質は、被験体中で抗FGF-CX抗体を産生するための

40

50

免疫原として用いられ得、FGF-CXリガンドを精製し、そしてFGF-CXリガンドとのFGF-CXの相互作用を阻害する分子を同定するスクリーニングアッセイで用いられ得る。

【0122】

本発明のFGF-CXキメラまたは融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技法により産生され得る。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNAフラグメントを、従来の技法に従って、例えば、連結のための平滑末端または粘着(stagger)末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要に応じて粘着(cohesive)末端の埋め込み(fill-in)、所望しない連結を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的連結により、インフレームで一つに連結される。別の実施形態では、融合遺伝子を、自動化DNA合成機を含む従来技法により合成し得る。あるいは、遺伝子フラグメントのPCR増幅を、2つの連続遺伝子フラグメント間の相補的オーバハングを生じるアンカプライマーを用いて実施しこれらのフラグメントは次いでキメラ遺伝子配列を生成するためにアニールおよび再増幅され得る(例えば、Ausubelら(編)CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、1992を参照のこと)。さらに、融合成分(例えば、GSTポリペプチド)をすでにコードした多くの発現ベクターが市販されている。FGF-CXをコードする核酸は、この融合成分がFGF-CXタンパク質にインフレーム連結されるように、このような発現ベクター中にクローン化され得る。

10

【0123】

(FGF-CXアゴニストおよびアンタゴニスト)

本発明はまた、FGF-CXアゴニスト(模倣物)として、またはFGF-CXアンタゴニストとして機能するFGF-CXタンパク質の改変体に関する。FGF-CXタンパク質の改変体は、変異誘発(例えば、FGF-CXタンパク質の離散した点変異または短縮)により生成され得る。FGF-CXタンパク質のアゴニストは、天然に存在する形態のFGF-CXタンパク質と実質的に同じ生物学的活性、またはその生物学的活性のサブセットを保持し得る。FGF-CXタンパク質のアンタゴニストは、天然に存在する形態のFGF-CXタンパク質の1つ以上の活性を、例えば、FGF-CXタンパク質を含む細胞シグナル伝達カスケードの下流または上流メンバーに競合的に結合することにより阻害し得る。従って、特異的生物学的効果が、限られた機能の改変体を用いた処理により誘導され得る。1つの実施形態では、このタンパク質の天然に存在する形態の生物学活性のサブセットを有する改変体を用いた被験体の処置は、FGF-CXタンパク質の天然に存在する形態を用いた処置に対して被験体におけるより少ない副作用を有する。

20

30

【0124】

FGF-CXアゴニスト(模倣物)として、またはFGF-CXアンタゴニストのいずれかとして機能するFGF-CXタンパク質の改変体は、FGF-CXタンパク質アゴニストまたはアンタゴニスト活性についてのFGF-CXタンパク質の変異体(例えば短縮型変異体)のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより同定され得る。1つの実施形態では、FGF-CX改変体の多彩なライブラリーは、核酸レベルのコンビナトリアル変異誘発により生成され、そして多彩な遺伝子ライブラリーによりコードされる。FGF-CX改変体の多彩なライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を、潜在的なFGF-CX配列の縮重セットが、個々のポリペプチドとして、あるいは、その中にFGF-CX配列のセットを含む(例えば、ファージディスプレイのための)より大きな融合タンパク質のセットとして発現可能であるように、遺伝子配列に酵素的に連結することにより産生され得る。縮重オリゴヌクレオチド配列から潜在的なFGF-CX改変体のライブラリーを産生するために用いられ得る種々の方法がある。縮重遺伝子配列の化学的合成は、自動化DNA合成機中で実施され得、次いでこの合成遺伝子は、適切な発現ベクター中に連結される。遺伝子の縮重セットの使用は、1つの混合物において、潜在的なFGF-CX配列の所望のセットをコードする配列のすべての供給を可能にする。縮重オリゴヌクレオチドを合成する方法は当該分野で周知である(例えば、Nar

40

50

ang (1983) Tetrahedron 39:3; Itakuraら (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakuraら (1984) Science 198:1056; Ikeら (1983) Nucl. Acid Res. 11:477を参照のこと。

【0125】

(ポリペプチドライブラリー)

さらに、FGF-CXタンパク質コード配列のフラグメントのライブラリーを用いて、FGF-CXタンパク質の改変体のスクリーニングおよび引き続く選択のためのFGF-CXフラグメントの多彩な集団を生成し得る。1つの実施形態では、コード配列フラグメントのライブラリーは、FGF-CXコード配列の二本鎖PCRフラグメントを、1分子あたり約1つのみのニックが生じる条件下、ヌクレアーゼで処理すること、二本鎖DNAを変性させること、異なるニック産物からのセンス/アンチセンス対を含み得る二本鎖DNAを形成するためにこのDNAを再生すること、S1ヌクレアーゼを用いた処理により再形成された二本鎖から一本鎖部分を除去すること、および得られるフラグメントライブラリーを発現ベクター中に連結することにより生成され得る。この方法により、FGF-CXタンパク質の種々のサイズのN末端および内部フラグメントをコードする発現ライブラリーが獲得され得る。

10

【0126】

点変異または短縮により作成されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするため、および選択された性質を有する遺伝子産物のcDNAライブラリーをスクリーニングするための種々の技術が当該分野で公知である。このような技法は、FGF-CXタンパク質のコンビナトリアル変異誘発により生成された遺伝子ライブラリーの迅速スクリーニングに適用可能である。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための、高スループット分析に適した最も広く用いられる技法は、代表的には、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクター中にクローニングすること、得られるベクターのライブラリーで適切な細胞を形質転換すること、およびこのコンビナトリアル遺伝子を、所望の活性の検出が、その産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下で発現することを含む。ライブラリー中の機能的変異体の頻度を増大する新規技法であるリクルーシブエンセムブル変異誘発(Recursive ensemble mutagenesis)(REM)を、スクリーニングアッセイと組み合わせて用い、FGF-CX改変体を同定し得る(例えば、ArkinおよびYouvan(1992)PNAS 89:7811-7815; Delgraveら(1993)Protein Engineering 6:327-331を参照のこと)。

20

30

【0127】

(抗FGF-CX抗体)

本明細書中で使用される場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン(Ig)分子の免疫学的に活性な部分(すなわち、抗原に特異的に結合する(免疫反応する)抗原結合部位を含む分子)をいう。このような抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、単鎖抗体、Fabフラグメント、Fab'フラグメントおよびF(ab')₂フラグメント、ならびにF_ab_b。発現ライブラリーが挙げられるが、これらに限定されない。一般的に、ヒト由来の抗体分子は、IgG、IgM、IgA、IgEおよびIgDの任意のクラスに関連し、これらは分子内に存在する重鎖の性質によって互いに異なる。特定のクラスは、同様に、サブクラス(例えば、IgG1、IgG2など)を有する。さらに、ヒトにおいては、軽鎖は鎖または鎖であり得る。本明細書中で抗体に対する参照は、ヒト抗体種のすべてのこのようなクラス、サブクラスおよび型に対する参照を含む。

40

【0128】

抗原、またはその一部もしくはフラグメントとして役立つことが意図される本発明の単離されたタンパク質を免疫原として使用して、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の調製のための標準的な技術を用いて、抗原に免疫特異的に結合する抗体を生成し得る

50

。全長タンパク質が使用され得るか、あるいは本発明は、免疫原として使用するための抗原の抗原性ペプチドフラグメントを提供する。抗原性ペプチドフラグメントは、全長タンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号 2 または配列番号 27 に示されるアミノ酸配列）の少なくとも 6 個のアミノ酸残基を含み、そしてそれらのエピトープを含み、その結果、このペプチドに対して惹起された抗体は、全長タンパク質またはこのエピトープを含む任意のフラグメントと特定の免疫複合体を形成する。好ましくは、抗原性ペプチドは、少なくとも 10 個のアミノ酸残基、または少なくとも 15 個のアミノ酸残基、または少なくとも 20 個のアミノ酸残基、または少なくとも 30 個のアミノ酸残基を含む。この抗原性ペプチドにより含まれる好ましいエピトープは、その表面上に位置するタンパク質の領域であり；通常、これらは親水性領域である。

10

【0129】

本発明の特定の実施形態において、抗原性ペプチドにより包含される少なくとも 1 つのエピトープは、タンパク質の表面上に位置する FGF-CX の領域、例えば、親水性領域である。ヒト FGF-CX タンパク質配列の疎水性分析は、FGF-CX ポリペプチドのどの領域が特に親水性であるか、そしてそれによって、どの領域が抗体産生を標的にするために有用な表面残基をコードするようであることを示す。抗体産生を標的にする手段として、親水性および疎水性の領域を示すヒドロパシープロットを、例えば、フーリエ変換を使用してかまたは使用しないかのいずれかで、Kyte Doolittle または Hopp Woods 法を含む、当該分野で周知の任意の方法により生成し得る。例えば、それらの全体が本明細書に参考として援用される、Hopp および Woods、1981、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78:3824-3828；Kyte および Doolittle 1982, J. Mol. Biol. 157:105-142 を参照のこと。抗原性タンパク質またはその誘導體、フラグメント、アナログもしくはホモログ内の 1 つ以上のドメインに特異的な抗体もまた、本明細書中で提供される。

20

【0130】

本発明のタンパク質、またはその誘導體、フラグメント、アナログ、ホモログもしくはオルソログは、これらのタンパク質成分に免疫特異的に結合する抗体の産生における免疫原として利用され得る。

【0131】

当該分野において公知の種々の手順が、本発明のタンパク質、またはその誘導體、フラグメント、アナログ、ホモログもしくはオルソログに対して指向されるポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の産生のために使用され得る（例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, および Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (本明細書中に参考として援用される) を参照のこと)。これらの抗体のうちいくつかは、以下で考察される。

30

【0132】

(1. ポリクローナル抗体)

ポリクローナル抗体の産生のために、種々の適切な宿主動物（例えば、ウサギ、ヤギ、マウスまたは他の動物）は、FGF-CX のネイティブなタンパク質、その合成改変体、または前記の誘導體での 1 回以上の注射によって免疫され得る。適切な免疫原性調製物は、例えば、天然に存在する免疫原性タンパク質、免疫原性タンパク質を提示する化学的に合成されたポリペプチド、または組換え的に発現される免疫原性タンパク質を含み得る。さらに、この FGF-CX タンパク質は、免疫されている哺乳動物において免疫原性であることが知られている第 2 のタンパク質に結合体化され得る。このような免疫原性タンパク質の例としては、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、および大豆トリプシンインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。この調製物はさらに、アジュバントを含み得る。種々のアジュバントが免疫学的応答を増加させるために使用され、このようなアジュバントとしては、フロイント（完全および不完全）、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性物質（例えば、リゾレシ

40

50

チン、プルロニック (pluronic) ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、ジニトロフェノールなど)、ヒトにおいて使用可能なアジュバント (例えば、Bacille Calmette - Guerin および Corynebacterium parvum) または類似の免疫刺激剤が挙げられるが、これらに限定されない。使用され得るアジュバントのさらなる例としては、MPL - TDM アジュバント (モノホスホリルリピド A、合成トレハロースジコリノミコレート) が挙げられる。

【0133】

免疫原性 FGF - CX タンパク質に対して指向されるポリクローナル抗体分子は、哺乳動物から (例えば、血液から) 単離され得、そして周知の技術 (例えば、プロテイン A またはプロテイン G を用いるアフィニティークロマトグラフィー (これは、主に免疫血清の IgG 画分を提供する)) によってさらに精製され得る。続いて、または代替的に、求められている免疫グロブリンの標的である特定の抗原またはその抗原のエピトープがカラムに固定され、免疫アフィニティークロマトグラフィーによって免疫特異的抗体を精製し得る。免疫グロブリンの精製は、例えば、D. Wilkinson (The Scientist (The Scientist, Inc., Philadelphia PA より発行)、第 14 巻、第 8 号 (2000 年 4 月 17 日)、25 ~ 28 頁) によって考察される。

10

【0134】

(2. モノクローナル抗体)

本明細書で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」(MAb) または「モノクローナル抗体組成物」は、特有の軽鎖遺伝子産物および特有の重鎖遺伝子産物からなる抗体分子の唯一の分子種を含む抗体分子の集団をいう。特に、モノクローナル抗体の相補性決定領域 (CDR) は、すべての分子の集団において同一である。従って、MAb は、抗原に対する特有の結合親和性によって特徴付けられる抗原の特定のエピトープと免疫反応可能な抗原結合部位を含む。

20

【0135】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ方法 (例えば、Kohler および Milstein, Nature, 256: 495 (1975) により記載される方法) を使用して調製され得る。ハイブリドーマ方法において、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物を、代表的に、免疫剤で免疫して、この免疫剤に特異的に結合する抗体を産生するか、またはこれらの抗体を産生し得るリンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫され得る。

30

【0136】

免疫剤としては、代表的に、FGF - CX タンパク質抗原、そのフラグメントまたはその融合タンパク質が挙げられる。一般的には、ヒト起源の細胞が望まれる場合に、末梢血リンパ球が使用されるか、または非ヒト哺乳動物供給源が望まれる場合に、脾臓細胞もしくはリンパ節細胞が使用されるかのいずれかである。次いで、適切な融合因子 (例えば、ポリエチレングリコール) を使用して、リンパ球を不死化細胞株に融合し、ハイブリドーマ細胞を形成する (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press (1986) 59 ~ 103 頁)。不死化細胞株は、通常、形質転換された哺乳動物細胞、特にげっ歯類、ウシおよびヒト起源の骨髄腫細胞である。通常、ラットまたはマウスの骨髄腫細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、1 以上の物質 (融合されていない不死化細胞の増殖も生存も阻害する) を含む適切な培養培地中で培養され得る。例えば、親細胞が酵素 (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 または HPR T)) を欠く場合、ハイブリドーマのための培養培地は、代表的に、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含み (「HAT 培地」)、それらの物質は、HGPRT 欠失細胞の増殖を阻害する。

40

【0137】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合する細胞株であり、それらは選択された抗体産生

50

細胞による安定な高レベルの抗体発現を支持し、そしてHAT培地のような培地に感受性である。より好ましい不死化細胞株はマウス骨髄腫株であり、それらを、例えば、Sal k Institute Cell Distribution Center, San Diego, CaliforniaおよびAmerican Type Culture Collection, Manassas, Virginiaから得ることが可能である。ヒト骨髄腫およびマウス-ヒト骨髄腫細胞株はまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載される(Kozbor: J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur: Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York (1987) 51~63頁)。

10

【0138】

次いで、ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地は、抗原に対して指向されるモノクローナル抗体の存在についてアッセイされ得る。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって決定されるか、またはインビトロ結合アッセイ(例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)または酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA))によって決定される。このような技術およびアッセイは、当該分野で公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、MunsonおよびPollard, Anal. Biochem., 107: 220 (1980)のスクッチャード分析によって決定され得る。標的抗原に対する高い程度の特異性および高い結合親和性を有する抗体を同定することが、目的であり、モノクローナル抗体の治療学的適用において特に重要である。

20

【0139】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、希釈手順を限定することによって、クローンをサブクロニングし得、そして標準方法によって増殖し得る(Goding, 1986)。例えば、この目的のために適切な培養培地としては、Dulbecco's Modified Eagle's MediumおよびRPMI-1640培地が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物内の腹水としてインビボで増殖され得る。

【0140】

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、従来の免疫グロブリン精製手順(例えば、プロテインAセファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーなど)によって、培養培地または腹水から、単離または精製され得る。

30

【0141】

モノクローナル抗体はまた、組換えDNA方法(例えば、米国特許第4,816,567号に記載される方法)によって作製され得る。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)容易に単離および配列決定され得る。本発明のハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源として役立つ。一旦単離されると、DNAは、発現ベクターに配置され得、次いでそれらは、宿主細胞(例えば、さもなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しないサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または骨髄腫細胞)にトランスフェクトされ、組換え宿主細胞内でのモノクローナル抗体の合成を得る。DNAはまた、例えば、コードする配列を相同なマウス配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖の定常ドメインと置換することによって(米国特許第4,816,567号; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994))か、または非免疫グロブリンポリペプチドについてのコード配列のすべてもしくは一部の配列をコードする免疫グロブリンへの共有結合的な連結によって、改変され得る。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と置換されるか、または本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変領域と置換されて、キメラ二価抗体を作製し得る。

40

【0142】

50

(3 . ヒト化抗体)

本発明の F G F - C X タンパク質抗原に対して指向される抗体は、ヒト化抗体またはヒト抗体をさらに含み得る。これらの抗体は、投与された免疫グロブリンに対するヒトの免疫応答を引き起こさないヒトへの投与に適する。抗体のヒト化形態は、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそれらのフラグメント（例えば、F v、F a b、F a b'、F (a b')₂ または抗体の他の抗原結合配列）であり、それらは主にヒト免疫グロブリンの配列から構成され、そして非ヒト免疫グロブリンに由来する最小の配列を含む。ヒト化は、ヒト抗体の対応する配列についてのげっ歯類 C D R（単数または複数）配列の置換によって、W i n t e r および共働研究者らの方法（J o n e s ら、N a t u r e , 3 1 : 5 2 2 - 5 2 5 (1 9 8 6) ; R i e c h m a n n ら、N a t u r e , 3 3 2 : 3 2 3 - 3 2 7 (1 9 8 8) ; V e r h o e y e n ら、S c i e n c e , 2 3 9 : 1 5 3 4 - 1 5 3 6 (1 9 8 8)）の後に達成され得る（米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号もまた参照のこと）。いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンの F v 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る。ヒト化抗体はまた、レシピエントの抗体においても、移入された C D R またはフレームワーク配列においても見出されない残基を含み得る。一般に、ヒト化抗体は、すべての少なくとも 1 つの可変領域、および代表的には 2 つの可変領域を実質的に含む。これらの領域内で、すべてのまたは実質的にすべての C D R 領域は非ヒト免疫グロブリンの領域に対応し、そしてすべてまたは実質的にすべてのフレームワーク領域はヒト免疫グロブリンコンセンサス配列の領域に対応する。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域（F c）、代表的には、ヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を必要に応じて含む（J o n e s ら、1 9 8 6 ; R i e c h a m a n n ら、1 9 8 8 ; および P r e s t a , C u r r . O p . S t r u c t . B i o l . , 2 : 5 9 3 - 5 9 6 (1 9 9 2)）。

【 0 1 4 3 】

(4 . ヒト抗体)

完全なヒト抗体は、本質的に、C D R を含む軽鎖および重鎖の両方の配列全体がヒト遺伝子から生じる抗体分子に関連する。このような抗体を、本明細書中で「ヒト抗体」、または「完全なヒト抗体」と呼ぶ。F G F - C X タンパク質に対して指向されるヒトモノクローナル抗体は、トリオーマ（t r i o m a）技術によって調製され得る；ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術（K o z b o r ら、1 9 8 3 I m m u n o l T o d a y 4 : 7 2 を参照のこと）およびヒトモノクローナル抗体を産生するための E B V ハイブリドーマ技術（C o l e ら、1 9 8 5 : M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s a n d C a n c e r T h e r a p y , A l a n R . L i s s , I n c . , 7 7 ~ 9 6 頁を参照のこと）。ヒトモノクローナル抗体は、本発明の実施において使用され得、そしてヒトハイブリドーマの使用によってか（C o t e ら、1 9 8 3 . P r o c N a t l A c a d S c i U S A 8 0 : 2 0 2 6 ~ 2 0 3 0 を参照のこと）、またはインビトロでの E p s t e i n B a r r V i r u s を用いたヒト B 細胞による形質転換によって（C o l e ら、1 9 8 5 : M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s a n d C a n c e r T h e r a p y , A l a n R . L i s s , I n c . , 7 7 ~ 9 6 頁）産生され得る。

【 0 1 4 4 】

さらに、ヒト抗体はまた、さらなる技術（ファージディスプレイライブラリー（H o o g e n b o o m および W i n t e r , J . M o l . B i o l . , 2 2 7 : 3 8 1 (1 9 9 1) ; M a r k s ら、J . M o l . B i o l . , 2 2 2 : 5 8 1 (1 9 9 1)）を含む）を使用して産生され得る。同様に、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物（例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が、部分的または完全に不活化されているマウス）に導入することによって、ヒト抗体が作製され得る。チャレンジの際に、ヒト抗体産生が観察され、このことは、すべての点で（遺伝子再配列、アセンブリ、および抗体レパートリーを含む）ヒトにおいて観察されたものに密接に類似する。このアプローチは、例えば、以下に記載される：米国特許第 5 , 5 4 5 , 8 0 7 号；同第 5 , 5 4 5 , 8 0 6 号；同第 5 , 5 6 9 , 8 2 5 号；同第 5 , 6 2 5 , 1 2 6 号；同第 5 , 6 3 3 , 4 2 5 号；同

第5,661,016号、およびMarksら(Bio/Technology 10, 779-783(1992)); Lonbergら(Nature 368 856-859(1994)); Morrison(Nature 368, 812-13(1994)); Fishwildら(Nature Biotechnology 14, 845-51(1996)); Neuberger(Nature Biotechnology 14, 826(1996)); ならびにLonbergおよびHuszar(Intern. Rev. Immunol. 13 65~93(1995))。

【0145】

FGF-CXタンパク質に特異的に結合するヒト抗体は、抗原によるチャレンジにตอบสนองして動物の内因性抗体ではなく完全なヒト抗体を産生するように改変されたトランスジェニック非ヒト動物を使用して、さらに産生され得る(PCT刊行物WO94/02602を参照のこと)。非ヒト宿主における重鎖免疫グロブリンおよび軽鎖免疫グロブリンをコードする内因性遺伝子は、耐えられなくなっており、そしてヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードする活性な遺伝子座が、宿主のゲノムに挿入される。例えば、要求性ヒトDNAセグメントを含む酵母人工染色体を使用して、ヒト遺伝子が組み込まれる。次いで、すべての所望の改変を提供する動物を、完全な改変の相補体よりもより少ない改変の相補体を含む中間トランスジェニック動物を雑種することによって、子孫として得る。このような非ヒト動物の好ましい実施形態は、マウスであり、PCT刊行物WO96/33735およびWO96/34096に開示されるようにXenomousTMと呼ばれる。この動物は、ヒト免疫グロブリンを十分に分泌するB細胞を産生する。目的のFGF-CX免疫原での免疫後の動物から(例えば、ポリクローナル抗体の調製)、あるいは動物由来の不死化されたB細胞(例えば、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ)から、抗体を直接得ることが可能である。さらに、ヒト可変領域を有する免疫グロブリンをコードする遺伝子は、抗体を直接得るために回復され、そして発現され得るか、または抗体のアナログ(例えば、1本鎖Fv分子)を得るために、さらに改変され得る。

10

20

【0146】

内因性免疫グロブリン重鎖の発現を欠く非ヒト宿主(マウスとして例示される)を作製する方法の例は、米国特許第5,939,598号に記載される。それを、以下の工程を包含する方法によって得ることが可能である: 遺伝子座の再配列を防ぎ、そして再配列された免疫グロブリン重鎖遺伝子座の転写物の形成、および選択マーカーをコードする遺伝子を含む標的ベクターによって影響される欠失を防ぐために、胚性幹細胞において少なくとも1つの内因性重鎖遺伝子座由来のJセグメント遺伝子を欠失させる工程; ならびにトランスジェニックマウス(その体細胞および生殖細胞は、選択マーカーをコードする遺伝子を含む)を、胚性幹細胞から作製する工程。

30

【0147】

目的の抗体(例えば、ヒト抗体)を産生するための方法は、米国特許第5,916,771号に開示される。これは、以下の工程を包含する: 重鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを、培養中の1つの哺乳動物宿主細胞に導入する工程、軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを、別の哺乳動物宿主細胞に導入する工程、およびハイブリッド細胞を形成するために2つの細胞融合する工程。ハイブリッド細胞は、重鎖および軽鎖を含む抗体を発現する。

40

【0148】

この手順のさらなる改善において、免疫原上の臨床的に関連するエピトープを同定するための方法、および関連するエピトープに高い親和性で免疫特異的に結合する抗体を選択するための関連する方法は、PCT刊行物WO99/53049に開示される。

【0149】

(5. Fabフラグメントおよび単鎖抗体)

本発明に従って、技術は、本発明の抗原性FGF-CXタンパク質に特異的な単鎖抗体の産生に適用され得る(例えば、米国特許第4,946,778号を参照のこと)。さらに、方法は、Fab発現ライブラリーの構築に適用され得(例えば、Huseら、1989

50

Science 246:1275~1281を参照のこと)、タンパク質またはその誘導体、フラグメント、アナログまたはホモログについての所望の特異性を有するモノクローナルFabフラグメントの迅速かつ効果的な同定を可能にする。タンパク質抗原に対するイディオタイプを含む抗体フラグメントは、(i)抗体分子のペプシン消化によって産生されるF(ab')₂フラグメント;(ii)F(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって産生されたFabフラグメント;(iii)パパインおよび還元剤を用いた抗体分子の処理によって産生されたFabフラグメント、ならびに(iv)Fvフラグメント、を含むがこれらに限定されない、当該分野で公知の技術によって産生され得る。

【0150】

10

(6. 二重特異的抗体)

二重特異的抗体は、モノクローナル抗体(好ましくは、ヒトモノクローナル抗体またはヒト化モノクローナル抗体)であって、これは、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有する。この場合において、結合特異性の1つは、本発明の抗原性タンパク質に対してである。第2の結合標的は、任意の他の抗原であり、そして有利には、細胞表面タンパク質あるいはレセプターまたはレセプターサブユニットである。

【0151】

二重特異的抗体を作製するための方法は、当該分野で公知である。伝統的に、二重特異的抗体の組換え産生は、2つの免疫グロブリンの重鎖/軽鎖の対の同時発現に基づき、ここで、これら2つの重鎖は、異なる特異性を有する(MilsteinおよびCuello、Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖のランダムな組み合わせのために、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10個の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、このうち1つのみが正確な二重特異的構造を有する。この正確な分子の精製は、通常、アフィニティークロマトグラフィー工程によって達成される。同様の手順は、1993年5月13日公開のWO93/08829、およびTraunckerら、EMBO J., 10:3655~3659(1991)において開示される。

20

【0152】

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は、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合され得る。この融合は、好ましくは、免疫グロブリン重鎖定常ドメインを有し、ヒンジ領域の少なくとも一部、CH₂領域およびCH₃領域を含む。この融合物中の少なくとも1つに存在する軽鎖結合のために、必要な部位を含む第1の重鎖定常領域(CH₁)を有することが好ましい。この免疫グロブリン重鎖融合体、および所望の場合、この免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAは、別々の発現ベクターに挿入され、そして適切な宿主生物体に同時トランスフェクトされる。二重特異的抗体の作製のさらなる詳細については、例えば、Sureshら、Methods in Enzymology, 121:210(1986)を参照のこと。

30

【0153】

WO96/27011に記載される別のアプローチに従って、抗体分子対の間の界面を操作して、組換え細胞培養物から回収されるヘテロダイマーの割合を最大化し得る。好ましい界面は、抗体定常ドメインのCH₃領域の少なくとも一部を含む。この方法において、第1の抗体分子の界面からの1つ以上の小さなアミノ酸側鎖は、より大きな側鎖(例えば、チロシンまたはトリプトファン)で置換される。大きな側鎖に対して同一のサイズまたは同様のサイズの代償的な「空洞」は、大きなアミノ酸側鎖を小さなアミノ酸側鎖(例えば、アラニンまたはスレオニン)で置換することによって、第2の抗体分子の界面上に生成される。このことは、ホモダイマーのような他の不必要な最終生成物よりも、ヘテロダイマーの収量を増加するための機構を提供する。

40

【0154】

二重特異的抗体は、全長抗体または抗体フラグメント(例えば、F(ab')₂二重特異的抗体)として調製され得る。抗体フラグメントから二重特異的抗体を作製するための技

50

術は、文献に記載されている。例えば、二重特異的抗体は、化学結合を使用して調製され得る。Brennanら、*Science* 229: 81 (1985)は、インタクトな抗体をタンパク分解的に切断し、F(ab')₂フラグメントを作製する手順を記載する。これらのフラグメントは、ピシナルジチオールを安定化し、そして分子間ジスルフィド形成を阻止するために、ジチオール錯化剤ナトリウム亜ヒ酸塩の存在下で還元される。次いで、この作製されたFab'フラグメントは、チオニトロベンゾエート(TNB)誘導体に変換される。次いで、Fab'-TNB誘導体の1つは、メルカプトエチルアミンでの還元によってFab'-チオールに再変換され、そしてこれは等モル量の他のFab'-TNB誘導体と混合されて二重特異的抗体を形成する。生成された二重特異的抗体は、酵素の選択的固定化のための薬剤として使用され得る。

10

【0155】

さらに、Fab'フラグメントは、*E. coli*から直接回収され得、そして化学的にカップリングされて二重特異的抗体を形成する。Shalabyら、*J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992)は、完全にヒト化された二重特異的抗体F(ab')₂分子の生成を記載する。各Fab'フラグメントは、*E. coli*から別々に分泌され、そしてインピトロでの直接的な化学的カップリングに供され、二重特異的抗体を形成する。これにより形成された二重特異的抗体は、ErbB2レセプターを過剰発現する細胞および正常なヒトT細胞に結合し得、そしてヒト胸部腫瘍標的に対するヒト細胞毒性リンパ球の溶解性活性を誘因し得る。

【0156】

組換え細胞培養物から直接的に二重特異的抗体フラグメントを作製し、単離するための種々の技術が記載されている。例えば、二重特異的抗体は、ロイシンジッパーを使用して生成される。Kostelnyら、*J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992)。FosおよびJunタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって2つの異なる抗体のFab'部分に結合される。このホモダイマー抗体は、ヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、次いで再酸化されてヘテロダイマー抗体を形成する。この方法はまた、ホモダイマー抗体の産生のために使用され得る。Hollingerら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)に記載されるこの「ジアボディ(diabody)」技術は、二重特異的抗体フラグメントを作製するための代替的な機構を提供した。このフラグメントは、同一鎖上の2つのドメインの間で対形成するには短すぎるリンカーによって軽鎖可変領域(VL)に接続された重鎖可変領域(VH)を含む。従って、1つのフラグメントのVHおよびVLドメインは、別のフラグメントの相補的なVLおよびVHドメインと対を形成し、それによって2つの抗原結合部位が形成される。単鎖Fv(sFv)ダイマーの使用によって二重特異的抗体フラグメントを作製するための別の戦略もまた、報告されている。Gruberら、*J. Immunol.* 152: 5368 (1994)を参照のこと。

20

30

【0157】

2つより多い結合価を有する抗体が意図される。例えば、三重特異的抗体が調製され得る。Tuttlら、*J. Immunol.* 147: 60 (1991)。

40

【0158】

例示的な二重特異的抗体は、2つの異なるエピトープに結合し得、このうち少なくとも1つは、本発明のタンパク質抗原に起源を有する。あるいは、免疫グロブリン分子の抗抗原性アームは、特定の抗原を発現する細胞に対する細胞の防御機構に注目して、白血球(例えば、T細胞レセプター分子(例えば、CD2、CD3、CD28、またはB7))、またはIgGに対するFcレセプター(FcR)(例えば、FcRI(CD64)、FcRII(CD32)およびFcRIII(CD16))上の誘引分子(triggerring molecule)に結合するアームと合わされ得る。二重特異的抗体はまた、特定の抗原を発現する細胞に対する細胞毒性因子に指向するために使用され得る。これらの抗体は抗原結合アーム、および細胞毒性因子または放射性核種キレーター(例えば

50

、EOTUBE、DPTA、DOTA、またはTETA)に結合するアームを保有する。目的の別の二重特異的抗体は、本明細書中に記載のタンパク質抗原に結合し、そしてさらに組織因子(TF)に結合する。

【0159】

(7. ヘテロ結合体抗体)

ヘテロ結合体抗体もまた、本発明の範囲内である。ヘテロ結合体抗体は、2つの共有結合した抗体で構成される。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を要求されない細胞に標的化するために(米国特許第4,676,980号)、およびHIV感染の処置のために(WO91/00360; WO92/200373; EP03089)提案されてきた。この抗体(架橋剤を含む抗体を含む)は、インビトロで、合成タンパク質化学において公知の方法を使用して調製され得ることが意図される。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応の使用またはチオエーテル結合の形成によって構築され得る。この目的のための適切な試薬の例としては、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデート、ならびに例えば米国特許第4,676,980号において開示される試薬が挙げられる。

10

【0160】

(8. エフェクター機能の操作)

本発明のFGF-CX抗体を、エフェクター機能について、例えば癌の処置における抗体の効力を増大するように改変することが望ましくあり得る。例えば、システイン残基は、Fc領域に導入され得、それによってこの領域内での鎖間ジスルフィド結合の形成を可能にする。このように作製されたホモダイマー抗体は、改良されたインターナリゼーションの可能性および/または増加した補体媒介細胞殺傷、ならびに抗体依存性細胞毒性(ADCC)を有し得る。Caronら、J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1192)およびShopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)を参照のこと。増強された抗腫瘍活性を有するホモダイマー抗体はまた、Wolfら、Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993)に記載されるヘテロ二官能性架橋剤を使用して調製され得る。あるいは、2つのFc領域を有し、それによって増強された補体溶解およびADCCの可能性を有し得る抗体は操作され得る。Stevensonら、Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)を参照のこと。

20

30

【0161】

(9. 免疫結合体)

本発明はまた、細胞毒性剤(例えば、化学療法剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物、または動物起源の酵素学的に活性な毒素、あるいはそれらのフラグメント)、または放射性同位体(すなわち、放射性結合体))に結合したFGF-CX抗体を含む免疫結合体に関する。

【0162】

このような免疫結合体の作製において有用な化学療法剤は、上記に記載される。使用され得る酵素学的に活性な毒素およびそれらのフラグメントとしては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素A鎖(Pseudomonas aeruginosa由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、-サルシン、Aleurites fordiiタンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、Phytolacca americanaタンパク質(PAPI、PAPII、およびPAP-S)、momordica charantiaインヒビター、クルシン(curcumin)、クロチン(crocin)、sepaonaria officinalisインヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)、およびトリコセセン(tricothecene)が挙げられる。種々の放射性核種は、放射性結合した抗体の作製のために利用可能である。例として、212Bi、131I、131In、90Y、およ

40

50

び 186 Re が挙げられる。

【0163】

抗体および細胞毒性因子の結合体は、種々の二官能性タンパク質結合因子（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 (SPDP)、イミノチオラン (iminothiolane) (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピミデート HCL）、活性エステル（例えば、ジスクシンイミジルスベレート）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド (glutaraldehyde)）、ビスアジド化合物（例えば、ビス (p - アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン）、ビス - ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トリエン 2, 6 - ジイソシアネート）、およびビス - 活性フッ素化合物（例えば、1, 5 - ジフルオロ - 2, 4 - ジニトロベンゼン））を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Vitettaら、Science, 238: 1098 (1987)に記載されるように調製され得る。炭素 - 14 - 標識された 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、放射性ヌクレオチドの抗体への結合のための例示的なキレート剤である。WO94/11026を参照のこと。

10

【0164】

別の実施形態において、腫瘍の前標的化における利用のために、この抗体は、「レセプター」（例えば、ストレプトアビジン）に結合され得、ここで抗体 - レセプター結合体は患者に投与され、続いて除去剤を使用して結合していない結合体が循環から除去され、次いで細胞毒性因子に順に結合する「リガンド」（例えば、アビジン）が投与される。

20

【0165】

(10. 免疫リポソーム)

本明細書中に開示される抗体はまた、免疫リポソームとして処方され得る。抗体を含むリポソームは、当該分野で公知の方法（例えば、Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); ならびに米国特許第 4, 485, 045号および同第 4, 544, 545号に記載される方法）によって調製される。増強された循環時間を有するリポソームは、米国特許第 5, 013, 556号に記載されている。

30

【0166】

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、およびPEG - 誘導体化ホスファチジルエタノールアミン (PEG-PE) を含む脂質組成物を用いる逆相エバポレーション法によって生成され得る。リポソームは、所定の穿孔サイズのフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームが得られる。本発明の抗体の Fab ' フラグメントは、Martinら、J. Biol. Chem., 257: 286 - 288 (1982)に記載されるようにジスルフィド交換反応を介してリポソームに結合体化され得る。化学療法剤（例えば、ドキソルビシン）が、必要に応じてリポソーム内に含まれる。Gabizonら、J. National Cancer Inst., 81 (19): 1484 (1989)を参照のこと。

40

【0167】

(11. 本発明のタンパク質に対する抗体の診断適用)

本発明の FGF - CXタンパク質に対する抗体は、タンパク質の局在化および/または定量化に関連する分野で公知の方法（例えば、適切な生理学的サンプル内のタンパク質のレベルを測定するための使用、診断方法における使用、タンパク質を画像化する上での使用など）において使用され得る。所定の実施形態において、タンパク質または抗原結合ドメインを含むその誘導体、フラグメントもしくはホモログに対する抗体は、薬理的に活性な化合物として利用される（以下を参照のこと）。

【0168】

本発明の FGF - CXタンパク質に対して特異的な抗体は、標準的な技術（例えば、免疫

50

アフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降)によりタンパク質を単離するために使用され得る。このような抗体は、細胞からの天然のタンパク質抗原の精製、および宿主細胞において発現された組換え産生された抗体の精製を容易にし得る。さらに、このような抗体は、抗原タンパク質の生成量および発現パターンを評価するために、(例えば、細胞溶解物または細胞上清中の)抗原タンパク質を検出するために使用され得る。FGF-CXタンパク質に対する抗体を診断的に使用して、例えば、所定の処置レジメンの有効性を決定するために、臨床試験手順の一部として組織中のタンパク質レベルをモニタリングし得る。検出は、検出可能な物質に抗体をカップリングする(すなわち、物理学的に連結することによって容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ;適切な補欠分子族の複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ;適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられ;発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ;生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられ、そして適切な放射性物質の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H が挙げられる。

10

【0169】

20

(12. 抗体治療剤)

本発明のFGF-CX抗体(ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体および完全ヒト抗体を含む)は、治療剤として使用され得る。このような薬剤は、一般に被験体の疾患または病理を処置または予防するために使用される。抗体調製物(好ましくは、標的抗原に対して高度な特異性および高度な親和性を有する抗体)は、被験体に投与され、そして一般に標的との結合に起因して効果を有する。このような効果は、所定の抗体分子と問題の標的抗原との間の特異的な相互作用の性質に依存して、2種類の効果があり得る。第1の場合、抗体の投与は、天然で結合する内因性リガンドと標的との結合を抑制または阻害し得る。この場合、この抗体は、標的に結合し、そして天然に存在するリガンドの結合部位をマスクし、ここで、このリガンドはエフェクター分子として役立つ。従って、レセプターは、リガンドが応答するシグナル伝達経路を媒介する。

30

【0170】

あるいは、この効果は、この抗体が標的分子上でエフェクター結合部位と結合することによって生理学的結果を惹起する効果であり得る。この場合、この標的(疾患または病理において不在または欠損し得る内因性リガンドを有するレセプター)は、代替エフェクターリガンドとして抗体と結合し、レセプターによってレセプターベースのシグナル伝達事象を開始する。

【0171】

本発明の抗体の治療有効量は、一般に、治療目的を達成するために必要とされる量に関連する。上記のように、これは、抗体とその標的抗体との間の結合相互作用であり得、特定の場合にこの標的の機能を妨害し、そして別の場合に生理学的応答を促進する。投与されるべき必要量は、さらに、特異的抗原に対する抗体の結合親和性に依存し、そして投与された抗体が投与される他の被験体の自由体積から除去される速度にも依存する。本発明の抗体または抗体フラグメントの治療有効用量の一般的な範囲は、非制限例であるが、約0.1mg/kg体重~約50mg/kg体重であり得る。一般的な用量頻度は、例えば、1日に2回~1週間に1回までの範囲であり得る。

40

【0172】

(13. 抗体の薬学的組成物)

本発明のFGF-CXタンパク質と特異的に結合する抗体および本明細書中に開示されるスクリーニングアッセイによって同定される他の分子は、薬学的組成物の形態で種々の障

50

害の処置のために投与され得る。このような組成物の調製に関する原理および考察、ならびに成分の選択における手引きは、例えば、以下に提供される：Remington：The Science And Practice Of Pharmacy 19版（Alfonso R. Gennaroら編）Mack Pub. Co., Easton, Pa. 1995；Drug Absorption Enhancement：Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Hawood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994；およびPeptide And Protein Drug Delivery（Advances In Parenteral Science, 第4巻）1991, M. Dekker, New York。

10

【0173】

抗原タンパク質が細胞内に存在し、そして全抗体がインヒビターとして使用される場合、抗体を内在化することが好ましい。しかし、リポソームはまた、抗体または抗体フラグメントを細胞に送達するために使用され得る。抗体フラグメントを使用する場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最も小さい阻害フラグメントが好ましい。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と結合する能力を保持するペプチド分子が設計され得る。このようなペプチドは、化学的に合成され得るかおよび/または組換えDNA技術によって産生され得る。例えば、Marascoら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7889-7893(1993)を参照のこと。本明細書中の処方物はまた、必要な場合、特定の徴候を処置するのに必要とされる、1つより多い活性化合物、好ましくは、互いに不利な影響を及ぼさない相補的活性を有する1つより多い活性化合物を含み得る。あるいは、またはさらに、この組成物は、その機能を強化する薬剤（例えば、細胞毒性剤、サイトカイン、化学療法剤または増殖阻害剤）を含み得る。このような分子は、意図される目的のために有効な量の組合せで適切に存在する。

20

【0174】

この活性成分は、例えば、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）またはマイクロエマルジョンにおいて、それぞれ従来の技術または界面重合化（それぞれ、例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルによって調製されるマイクロカプセル中に包埋され得る。

30

【0175】

インビボ投与に使用されるべき処方物は、滅菌されなければならない。これは、滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。

【0176】

（FGF-CX組換え発現ベクターおよび宿主細胞）

本発明の別の局面は、FGF-CXタンパク質、またはその誘導體、フラグメント、アナログ、もしくはホモログをコードする核酸を含むベクター、好ましくは発現ベクターに関する。本明細書中で使用される場合、用語「ベクター」は、連結された別の核酸を輸送し得る核酸分子をいう。ベクターの1つの型は「プラスミド」であり、これはさらなるDNAセグメントが連結され得る環状の二本鎖DNAループをいう。ベクターの別の型はウイルスベクターであり、ここでさらなるDNAセグメントはこのウイルスゲノムに連結され得る。特定のベクターは導入された宿主細胞中で自律的に複製し得る（例えば、細菌の複製起源を有する細菌ベクターおよびエピソーム性哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム性哺乳動物ベクター）は、宿主細胞に導入される際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それによって宿主のゲノムと共に複製される。さらに、特定のベクターは、作動可能に連結された遺伝子の発現を指向し得る。このようなベクターは、本明細書中で「発現ベクター」といわれる。一般的に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、このプラスミドはベクターの最も一般的に使用される形態であるため、交

40

50

換可能に使用され得る。しかし、本発明は、等価な機能を果たす、ウイルス性ベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）のような発現ベクターのこのような他の形態を含むことを意図する。

【0177】

本発明の組換え発現ベクターは、本発明の核酸を、宿主細胞における核酸の発現に適切な形態で含む。これはこの組換え発現ベクターが、発現のために使用される宿主細胞に基づいて選択される1つ以上の調節配列を含むこと、および発現される核酸配列に作動可能に連結されることを意味する。組換え発現ベクターにおいて、「作動可能に連結される」は、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を可能にする様式（例えば、インビトロ転写/翻訳系において、またはこのベクターが宿主細胞に導入される場合は宿主細胞において）で調節配列に連結されることを意味することを意図する。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことを意図する。このような調節配列は、例えば、Goeddel、GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185、Academic Press、San Diego、Calif. (1990)に記載されている。調節配列として、多くの型の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指向する配列、および特定の宿主細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を指向する配列（例えば、組織特異的調節配列）が挙げられる。発現ベクターの設計が形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどのような因子に依存し得ることは当業者に理解されている。本発明の発現ベクターは、宿主細胞に導入され、それにより、本明細書に記載されるような核酸によりコードされるタンパク質またはペプチド（融合タンパク質または融合ペプチドを含む）（例えば、FGF-CXタンパク質、FGF-CXタンパク質の変異形態、融合タンパク質など）を生成し得る。

【0178】

本発明の組換え発現ベクターは、原核生物細胞または真核生物細胞における、FGF-CXの発現のために設計され得る。例えば、FGF-CXは、細菌細胞（例えば、E. coli）、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを用いる）、酵母細胞または哺乳動物細胞において発現され得る。適切な宿主細胞は、Goeddel、GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185、Academic Press、San Diego、Calif. (1990)においてさらに考察される。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを用いて、インビトロで転写および翻訳され得る。

【0179】

原核生物におけるタンパク質の発現は、最も頻繁には、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向する構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むベクターを有するE. coliにおいて実行される。融合ベクターは、コードされるタンパク質に（通常、組換えタンパク質のアミノ末端に）、多くのアミノ酸を付加する。このような融合ベクターは、代表的に、以下の3つの目的のために役立つ：（1）組換えタンパク質の発現を増加させるため；（2）組換えタンパク質の溶解度を増加させるため；および（3）アフィニティー精製においてリガンドとして作用することにより、組換えタンパク質を精製する上で補助するため。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解的切断部位は、融合タンパク質の精製後に組換えタンパク質が融合部分から分離され得るように、融合部分および組換えタンパク質の結合部分に導入される。このような酵素、およびその同族の認識配列として、第Xa因子、トロンピン、およびエンテロキナーゼが挙げられる。代表的な融合発現ベクターとして、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトースE結合タンパク質、またはプロテインAを、標的の組換えタンパク質に融合する、それぞれ、pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson (1988) Gene 67:31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.)および

p R I T 5 (P h a r m a c i a , P i s c a t a w a y , N . J .) が挙げられる。

【0180】

適切な誘導性非融合 E . c o l i 発現ベクターの例として、p T r c (A m r a n n ら (1 9 8 8) G e n e 6 9 : 3 0 1 - 3 1 5) および p E T 1 1 d (S t u d i e r ら、G E N E E X P R E S S I O N T E C H N O L O G Y : M E T H O D S I N E N Z Y M O L O G Y 1 8 5 , A c a d e m i c P r e s s , S a n D i e g o , C a l i f . (1 9 9 0) 6 0 - 8 9) が挙げられる。

【0181】

E . c o l i における組換えタンパク質発現を最大化するための1つの戦略は、組換えタンパク質をタンパク質分解的に切断する能力が損なわれた宿主細菌中でタンパク質を発現させることである。例えば、G o t t e s m a n , G E N E E X P R E S S I O N T E C H N O L O G Y : M E T H O D S I N E N Z Y M O L O G Y 1 8 5 , A c a d e m i c P r e s s , S a n D i e g o , C a l i f . (1 9 9 0) 1 1 9 - 1 2 8 を参照のこと。別の戦略は、各アミノ酸についての個々のコドンが、E . c o l i において優先的に利用されるように、発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を変更することである(例えば、W a d a ら (1 9 9 2) N u c l . A c i d s R e s . 2 0 : 2 1 1 1 - 2 1 1 8 を参照のこと)。本発明の核酸配列のこのような変更は、標準的なDNA合成技術によって実行され得る。

【0182】

別の実施形態において、F G F - C X 発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母 S . c e r i v i s a e における発現のためのベクターの例には、p Y e p S e c 1 (B a l d a r i ら、(1 9 8 7) E M B O J 6 : 2 2 9 - 2 3 4)、p M F a (K u r j a n および H e r s k o w i t z、(1 9 8 2) C e l l 3 0 : 9 3 3 - 9 4 3)、p J R Y 8 8 (S c h u l t z ら、(1 9 8 7) G e n e 5 4 : 1 1 3 - 1 2 3)、p Y E S 2 (I n v i t r o g e n C o r p o r a t i o n , S a n D i e g o , C a l i f .)、および p i c Z (I n v i t r o g e n C o r p . , S a n D i e g o , C a l i f .) が挙げられる。

【0183】

あるいは、F G F - C X は、バキュロウイルス発現ベクターを使用して、昆虫細胞中で発現され得る。培養された昆虫細胞(例えば、S F 9 細胞)中でタンパク質の発現のために利用可能なバキュロウイルスベクターには、p A c シリーズ (S m i t h ら (1 9 8 3) M o l C e l l B i o l 3 : 2 1 5 6 - 2 1 6 5) および p V L シリーズ (L u c k l o w および S u m m e r s (1 9 8 9) V i r o l o g y 1 7 0 : 3 1 - 3 9) が挙げられる。

【0184】

なお別の実施形態において、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを使用して、哺乳動物細胞中で発現される。哺乳動物発現ベクターの例には、p C D M 8 (S e e d (1 9 8 7) N a t u r e 3 2 9 : 8 4 0) および p M T 2 P C (K a u f m a n ら (1 9 8 7) E M B O J 6 : 1 8 7 - 1 9 5) が挙げられる。哺乳動物細胞中で使用される場合、発現ベクターの制御機能は、しばしば、ウイルスの調節エレメントによって提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40に由来する。原核生物細胞および真核生物細胞の両方のための他の適切な発現系については、例えば、S a m b r o o k ら、M O L E C U L A R C L O N I N G : A L A B O R A T O R Y M A N U A L . 第2版、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g H a r b o r , N . Y . , 1 9 8 9 の第16章および第17章を参照のこと。

【0185】

別の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型中で優先的に核酸の発現を指向し得る(例えば、組織特異的調節エレメントを使用して核酸を発現する)。

10

20

30

40

50

組織特異的調節エレメントは、当該分野で公知である。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Pinkertら（1987）*Genes Dev* 1:268-277）、リンパ特異的プロモーター（CalameおよびEaton（1988）*Adv Immunol* 43:235-275）、特に、T細胞レセプタープロモーター（WinotoおよびBaltimore（1989）*EMBO J* 8:729-733）および免疫グロブリン（Banerjiら（1983）*Cell* 33:729-740；QueenおよびBaltimore（1983）*Cell* 33:741-748）のプロモーター、ニューロン特異的プロモーター（例えば、ニューロフィラメントプロモーター；ByrneおよびRuddle（1989）*PNAS* 86:5473-5477）、膵臓特異的プロモーター（Edlundら（1985）*Science* 230:912-916）、および乳腺特異的プロモーター（例えば、ミルク乳清プロモーター；米国特許第4,873,316号および欧州出願公開第264,166号）が挙げられる。発生調節性プロモーターもまた含まれる（例えば、マウス*hox*プロモーター（KesselおよびGruss（1990）*Science* 249:374-379）および - フェトプロテインプロモーター（CampeasおよびTilghman（1989）*Genes Dev* 3:537-546）。

【0186】

本発明はさらに、アンチセンス方向で発現ベクターにクローニングされた本発明のDNA分子を含む組換え発現ベクターを提供する。すなわち、そのDNA分子は、FGF-CX mRNAに対してアンチセンスであるRNA分子の発現（DNA分子の転写によって）を可能にする様式で調節配列に作動可能に連結される。種々の細胞型におけるアンチセンスRNA分子の連続的な発現を指向する、アンチセンス方向でクローニングされた核酸に作動可能に連結される調節配列が選択され得る。例えば、アンチセンスRNAの構成的発現、組織特異的発現、または細胞型特異的発現を指向する、ウイルスプロモーターおよび/もしくはエンハンサー、または調節配列が選択され得る。アンチセンス発現ベクターは、組換えプラスミド、ファージミド、または弱毒化されたウイルスの形態であり得、ここではアンチセンス核酸は、高効率調節領域の制御下で産生され、その活性は、ベクターが導入される細胞型によって決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発現の調節の議論については、例えば、Weintraubら、「Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis」、*Reviews - Trends in Genetics*、第1巻（1）1986を参照のこと。

【0187】

本発明の別の局面は、本発明の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は、本明細書中で、交換可能に使用される。このような用語は、特定の対象の細胞をいうのみでなく、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫をいうことが理解される。変異または環境的影響のいずれかに起因して、特定の改変は次の世代において存在し得るので、このような子孫は、実際、親の細胞と同一でないかもしれないが、なお、本明細書中で使用されるような用語の範囲内に含まれる。

【0188】

宿主細胞は、任意の原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。例えば、FGF-CXタンパク質は、細菌細胞（例えば、*E. coli*）、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞（例えば、ヒトチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）またはCOS細胞）で発現され得る。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。

【0189】

ベクターDNAは、従来的な形質転換またはトランスフェクション技術を介して原核生物細胞または真核生物細胞に導入され得る。本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」とは、外来性の核酸（例えば、DNA）を宿主細胞中に導入するための当該分野で認識される種々の技術をいうことを意図し、これらには、リ

ン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、D E A E デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが含まれる。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするための適切な方法は、Sambrookら(MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989) および他の実験室マニュアルに見出され得る。

【0190】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクションについては、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション技術に依存して、細胞のほんの一部のみが外来DNAをそのゲノム中に組み込み得ることが知られている。これらの要素を同定および選択するために、選択マーカー(例えば、抗生物質に対する耐性)をコードする遺伝子が、一般的には目的の遺伝子とともに宿主細胞に導入される。種々の選択マーカーには、薬物に対する耐性を付与するマーカー(例えば、G418、ハイグロマイシン、およびメトトレキセート)が含まれる。選択マーカーをコードする核酸は、増殖プロモーターをコードするベクターと同じベクター上で宿主細胞に導入され得るか、あるいは別々のベクター上で導入され得る。導入された核酸とともに安定にトランスフェクトされる細胞は、薬物選択によって同定され得る(例えば、選択マーカー遺伝子を取り込んだ細胞は生存するが、他の細胞は死滅する)。

10

【0191】

本発明の宿主細胞(例えば、培養中の原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞)は、FGF-CXタンパク質を産生(すなわち、発現)するために使用され得る。従って、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を使用して、FGF-CXタンパク質を産生するための方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、FGF-CXタンパク質が産生されるような適切な培地中で、本発明の宿主細胞(ここに、FGF-CXをコードする組換え発現ベクターが導入されている)を培養する工程を包含する。別の実施形態において、この方法はさらに、培地または宿主細胞からFGF-CXを単離する工程を包含する。

20

【0192】

(トランスジェニック動物)

本発明の宿主細胞はまた、非ヒトトランスジェニック動物を作製するために使用され得る。例えば、1つの実施形態において、本発明の宿主細胞は、FGF-CXコード配列が導入される、受精した卵母細胞または胚性幹細胞である。次いで、このような宿主細胞は、非ヒトトランスジェニック動物を作製するために使用され得、ここで外因性のFGF-CX配列は、それらのゲノムまたは相同組換え動物(ここで内因性のFGF-CX配列が変更されている)に導入される。このような動物は、FGF-CXの機能および/または活性を研究するため、およびFGF-CXの活性のモジュレーターを同定および/または評価するために有用である。本明細書中で使用される場合、「トランスジェニック動物」とは、非ヒト動物、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくは、ラットまたはマウスのような齧歯動物であり、ここでこれらの動物の1つ以上の細胞は、導入遺伝子を含む。トランスジェニック動物の他の例には、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などを含む。導入遺伝子は、細胞のゲノムに組み込まれ(この細胞からトランスジェニック動物が発生する)、そして成熟動物のゲノムに残存する外因性のDNAであり、それによって、このトランスジェニック動物の1つ以上の細胞型または組織においてコード遺伝子産物の発現を指向する。本明細書中で使用される場合、「相同組換え動物」とは、非ヒト動物であり、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスであり、ここで、内因性FGF-CX遺伝子は、この内因性の遺伝子と、動物の発生の前に動物の細胞(例えば、動物の胚細胞)に導入された外因性DNA分子との間の相同組換えによって、変更されている。

30

40

【0193】

本発明のトランスジェニック動物は、FGF-CXをコードする核酸を、(受精した卵母

50

細胞の雄性前核に導入することによって例えば、マイクロインジェクション、レトロウイルス感染によって)、およびこの卵母細胞が偽妊娠雌性フォスター動物 (foster animal) 中で発生することを可能にすることによって作製され得る。配列番号1のヒトFGF-CX DNA配列は、非ヒト動物のゲノムに導入遺伝子として導入され得る。あるいは、ヒトFGF-CX遺伝子の非ヒトホモログ(例えば、マウスFGF-CX遺伝子)は、ヒトFGF-CX cDNAに対するハイブリダイゼーションに基づいて単離され得(上述にさらに記載される)、そして導入遺伝子として使用され得る。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルもまた導入遺伝子中に含まれ、その導入遺伝子の発現の効率を増大させ得る。組織特異的調節配列は、特定の細胞に対して、FGF-CXタンパク質の発現を指向するために、FGF-CX導入遺伝子に作動可能に連結される。胚の操作およびマイクロインジェクションを介するトランスジェニック動物(特に、マウスのような動物)を生成するための方法は、当該分野で従来的になっており、そして例えば、米国特許第4,736,866号;同第4,870,009号;および同第4,873,191号;ならびにHogan 1986、MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.に記載されている。同様の方法は、他のトランスジェニック動物の作製のために使用される。トランスジェニック初代動物は、そのゲノムにおけるFGF-CX導入遺伝子の存在および/またはその動物の組織または細胞中のFGF-CX mRNAの発現に基づいて同定され得る。次いで、トランスジェニック初代動物は、導入遺伝子を有するさらなる動物を繁殖させるために使用され得る。さらに、FGF-CXをコードする導入遺伝子を有するトランスジェニック動物は、さらに、他の導入遺伝子を有する他のトランスジェニック動物へと繁殖させ得る。

【0194】

相同組換え動物を作製するために、欠失、付加、または置換が導入されて、それによってFGF-CX遺伝子が変化(例えば、機能的に破壊)されている、少なくとも、FGF-CX遺伝子の一部を含むベクターを調製する。FGF-CX遺伝子は、ヒト遺伝子(例えば、配列番号1)であり得るが、より好ましくは、ヒトFGF-CX遺伝子の非ヒトホモログである。例えば、配列番号1のヒトFGF-CX遺伝子のマウスホモログは、マウスゲノムにおいて内因性FGF-CX遺伝子を変更するのに適切な相同組換えベクターを構築するために使用され得る。1つの実施形態において、そのベクターは、相同組換えに際して、内因性FGF-CX遺伝子が、機能的に破壊される(すなわち、機能的タンパク質をもはやコードしない;「ノックアウト」ベクターともいわれる)ように設計される。

【0195】

あるいは、このベクターは、相同組換えの際に、内因性FGF-CX遺伝子が発現されるか、あるいはさもなければ、変更されるが、なお機能性タンパク質をコードするように設計される(例えば、上流の調節領域を変更して、それによって内因性FGF-CXタンパク質の発現を変更し得る)。相同組換えベクターにおいて、FGF-CX遺伝子の変更された部分は、FGF-CX遺伝子のさらなる核酸によって、その5'末端および3'末端で隣接され、相同組換えが、ベクターによって運ばれる外因性FGF-CXタンパク質と胚幹細胞中の内因性FGF-CXタンパク質との間で起こることを可能にする。さらなる隣接するFGF-CXタンパク質核酸は、内因性遺伝子との首尾よい相同組換えに十分な長さである。代表的に、数千ベースの隣接するDNA(5'末端および3'末端の両方)が、ベクターに含まれる。例えば、相同組換えベクターの記載について、Thomasら(1987)Cell 51:503を参照のこと。このベクターは、胚幹細胞株に導入され(例えば、エレクトロポレーションによって)、この導入されたFGF-CX遺伝子が、内因性FGF-CX遺伝子と相同組換えされた細胞が、選択される(例えば、Liraら(1992)Cell 69:915を参照のこと)。

【0196】

次いで、この選択された細胞を、動物(例えば、マウス)の胚盤胞へ注入して、凝集キメ

ラを形成する。例えば、Bradley (1987) の TERA TO CARCINOMA S AND EMBRYONIC STEM CELLS: A PRACTICAL APPROACH、Robertson 編、IRL、Oxford 113頁～152頁を参照のこと。次いで、キメラ胚を、適切な偽妊娠雌性フオスター動物に移植し得、そしてこの胚を、一定期間置く。それらの生殖細胞中に相同組換えDNAを保有する子孫を使用して、動物を繁殖し得、ここで、この動物の全ての細胞は、導入遺伝子の生殖系列伝達によって、この相同組換えDNAを含む。相同的組換えベクターおよび相同的組換え動物を構築するための方法が、さらに以下に記載される；Bradley (1991) Curr. Opin. Biotechnol. 2: 823 - 829；PCT国際公開番号：WO90/11354；WO91/01140；WO92/0968；およびWO93/04169。 10

【0197】

別の実施形態において、導入遺伝子の調節された発現を可能にする選択された系を含む、非ヒトトランスジェニック動物が産生され得る。このような系の1つの例は、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系である。cre/loxPリコンビナーゼ系の記載については、例えば、Laksora、1992、PNAS 89: 6232 - 6236を参照のこと。リコンビナーゼ系の別の例は、Saccharomyces cerevisiaeのFLPリコンビナーゼ系である(O'Gormanら(1991) Science 251: 1351 - 1355を参照のこと)。cre/loxPリコンビナーゼ系が導入遺伝子の発現を調節するために使用される場合、Creリコンビナーゼおよび選択されたタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含む動物が、必要となる。このような動物は、例えば、2種のトランスジェニック動物(一方は選択されたタンパク質をコードした導入遺伝子を含み、他方はリコンビナーゼをコードした導入遺伝子を含む)を交配することによる、「二重の」トランスジェニック動物の構築によって提供され得る。 20

【0198】

本明細書中に記載されるトランスジェニック非ヒト動物のクローンがまた、Wilmutら(1997) Nature 385: 810 - 813に記載される方法に従って、産生され得る。簡単には、トランスジェニック動物由来の細胞(例えば、体細胞)を、単離し、増殖周期から抜け出し、そしてG₀期に入ることを誘導し得る。次いで、この静止細胞を、例えば、電気パルスの使用により、静止細胞が単離される同種動物由来の、摘出された卵母細胞へ融合し得る。次いで、この再構築された卵母細胞を培養し、これにより、これは桑実胚または未分化胚芽細胞に発達し、次いで、偽妊娠雌性フオスター動物に移される。この雌性フオスター動物の産生子孫は、この細胞(例えば、体細胞)が単離される動物のクローンである。 30

【0199】

(薬学的組成物)

本発明のFGF-CX核酸分子、FGF-CXタンパク質、および抗FGF-CX抗体(本明細書中で「活性化化合物」といわれる)、ならびにそれらの誘導體、フラグメント、アナログ、およびホモログは、投与に適切な薬学的組成物に組み込まれ得る。このような組成物は、代表的に、核酸分子、タンパク質、または抗体、ならびに薬学的に受容可能なキャリアを含む。本明細書中で使用される場合、「薬学的に受容可能なキャリア」は、薬学的な投与に適合した、任意および全ての溶媒、分散液、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤(delaying agent)などを含むことが意図される。適切なキャリアは、当該分野における標準的な参考書である、Remington's Pharmaceutical Sciencesの最新版(本明細書中で参考として援用される)に記載される。このようなキャリアまたは賦形薬の好ましい例としては、水、生理食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンを含むが、これらに限定されない。リポソームおよび非水性ビヒクル(例えば、揮発性油)はまた、使用され得る。薬学的に活性物質である、このような媒体および薬剤の使 40 50

用は、当該分野で周知である。この活性化化合物と不適合性である任意の従来の媒体または薬剤の範囲を除いて、組成物におけるその使用は、企図される。補足的な活性化化合物はまた、この組成物に組み込まれ得る。

【0200】

本発明の薬学的組成物は、その意図される投与の経路と適合可能に処方される。投与経路の例としては、非経口（例えば、静脈内、皮内、皮下）、経口（例えば、吸入）、経皮的（すなわち、局所的）、経粘膜、および直腸投与が挙げられる。非経口、皮内、または皮下適用のために使用される溶液または懸濁液としては、以下の成分が挙げられ得る：滅菌賦形薬（注射のための水、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒）；抗菌性剤（例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン）；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウム）；キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸）；緩衝液（例えば、アセテート、シتراتまたはホスフェート）；および張度の調整のための薬剤（例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース）。pHは、酸または塩基（例えば、塩酸または水酸化ナトリウム）を用いて調整され得る。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンブル、使い捨てシリンジまたは複数用量バイアルに封入され得る。

10

【0201】

注射使用に適した薬学的組成物は、滅菌の水溶液（ここで、水溶性）または分散液および滅菌注射可能な溶液または分散液の即席調製のための滅菌粉末を含む。静脈内投与について、適切なキャリアには、生理食塩水、静菌性水、Cremophor ELTM（BAS F, Parsippany, N. J.）またはリン酸塩緩衝化生理食塩水（PBS）が挙げられる。全ての場合において、組成物は、滅菌性であるべきであり、そして容易な注入性（syringeability）が存在する程度に流動的であるべきである。これは、製造および保存の条件下で安定でなければならず、そして、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されるべきである。このキャリアは、例えば、以下を含む溶媒または分散媒体であり得る：例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）ならびにそれらの適切な混合物。適切な流動性が、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散に関しては、要求される粒子サイズを維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持され得る。微生物の作用の予防は、種々の抗菌および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなど）によって達成され得る。多くの場合、組成物中に等張剤（例えば、糖、マンニトール（mannitol）、ソルビトールなどのポリアルコール、塩化ナトリウム）を含むことが好ましい。注射可能組成物の長期の吸収は、吸収を遅らせる薬剤（例えば、アルミニウムモノステアレートおよびゼラチン）を組成物に含ませることによってもたらされ得る。

20

30

【0202】

滅菌注射可能溶液は、必要量のこの活性化化合物（例えば、FGF-CXタンパク質あるいは抗FGF-CX抗体）を、適切な溶媒中に、上記で列挙される成分の1つまたは組み合わせと共に組み込み、必要な場合、続いて濾過滅菌することによって調製され得る。一般的に、分散液は、活性化化合物を、基本分散媒体および上記で列挙される成分から必要とされる他の成分を含む滅菌ビヒクル中へ組み込むことによって調製される。滅菌注射可能溶液の調製のための滅菌粉末の場合において、調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、これにより、活性成分および予め滅菌濾過されたその溶液からの任意のさらなる所望の成分の粉末を得る。

40

【0203】

経口組成物は、一般的に、不活性希釈剤または食用キャリアを含む。これらは、ゼラチンカプセルに封入され得るか、または錠剤へ圧縮され得る。経口治療投与の目的のために、この活性化化合物は、賦形剤とともに組み込まれ得、そして錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤の形態で使用され得る。経口組成物はまた、マウスウォッシュ（mouthwash）としての使用のために流体キャリアを使用して調製され得、ここで、この流体キャリ

50

ア中のこの化合物は、経口的に適用され、そして素早く動かされ（スイッシュ）（*swish*）、そして吐き出されるか、または飲み込まれる。薬学的に適合性の結合剤、および/またはアジュバント材料が、この組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などが、以下のいずれかの成分または同様の性質を有する化合物を含み得る：結合剤（例えば、微結晶セルロース、ガムトラガントまたはゼラチン）；賦形剤（例えば、デンプンまたはラクトース）、崩壊剤（例えば、アルギン酸）、*Primogel*、またはコーンスターチ；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウムまたは*Sterotes*）；グライダント（*glidant*）（例えば、コロイド状二酸化ケイ素）；甘味剤（例えば、スクロースまたはサッカリン）；あるいは香味剤（例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバー）。

10

【0204】

吸入による投与について、この化合物は、適切な噴霧剤（例えば、二酸化炭素のような気体）を含む圧縮容器またはディスペンサー、あるいは噴霧器から、エアロゾルスプレーの形態で送達される。

【0205】

全身的投与はまた、経粘膜手段または経皮手段により得る。経粘膜投与または経皮投与について、浸透されるバリアに対して適切な浸透剤が、処方において使用される。このような浸透剤は、一般的に、当該分野で公知であり、そして、例えば、経粘膜投与については、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体が挙げられる。経粘膜投与は、鼻スプレーまたは坐剤によって達成され得る。経皮投与については、この活性化化合物は、当該分野で一般的に公知である軟膏剤、軟膏、ゲル、またはクリーム剤へ処方される。

20

【0206】

この化合物はまた、直腸送達のための坐剤の使用（例えば、ココアバターおよび他のグリセリドのような従来坐剤ベースと共に）または保持浣腸の形態で調製され得る。

【0207】

1つの実施形態において、この活性化化合物は、身体からの迅速な排出に対してこの化合物を保護するキャリアを用いて調製され（例えば、制御放出処方物）、これには、移植片およびマイクロカプセル化された送達系が挙げられる。酢酸エチレンビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のような、生分解性、生体適合性ポリマーが使用され得る。このような処方物の調製のための方法は、当該業者には明らかである。これらの材料はまた、*Alza Corporation*および*Nova Pharmaceuticals, Inc.*から市販されている。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を含む、感染させた細胞へ標的化されるリポソームを含む）がまた、薬学的に受容可能なキャリアとして使用され得る。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されるような、当業者に公知の方法に従って調製され得る。

30

【0208】

投与の容易さおよび投薬量の均一性のために、投薬単位形態で、経口組成物または非経口組成物を処方することが、特に有益である。本明細書で使用される投薬単位形態は、処置される被験体のための単位投薬量として適切な、物理的に個々の単位をいい；各単位は、必要とされる薬学的キャリアと関連して、所望の治療的効果を生じるように計算された所定量の活性化化合物を含む。本発明の投薬単位形態についての詳細は、この活性化化合物の固有の特性、および達成される特定の治療効果によって決定されるか、あるいはこれらに直接依存する。

40

【0209】

本発明の核酸分子は、ベクターに挿入され得、そして遺伝子治療ベクターとして使用され得る。遺伝子治療ベクターは、被験体へ、任意の複数の経路（例えば、米国特許第5,703,055号に記載される）に送達され得る。従って、送達は、例えば、静脈内注射、局所投与（米国特許第5,328,470号を参照のこと）または定位注射（例えば、*Chenら*（1994）*PNAS* 91:3054-3057を参照のこと）が挙げられる

50

。遺伝子治療ベクターの薬学的調製物には、受容可能な希釈剤中の遺伝子治療ベクターが挙げられ得、または遺伝子送達ビヒクルが組み込まれる徐放性マトリックスを含み得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターが、組換え細胞からインタクトで産生され得（例えば、レトロウイルスベクター）、この薬学的調製物は、遺伝子送達系を産生する1以上の細胞を含み得る。

【0210】

薬学的組成物は、投与のための使用説明書をとともに、キット（例えば、容器、包装、またはディスペンサー）に含まれ得る。

【0211】

（本発明の使用および方法）

本明細書中で記載される核酸分子、タンパク質、タンパク質ホモログ、および抗体が、以下の1つ以上の方法において使用され得る：（a）スクリーニングアッセイ；（b）検出アッセイ（例えば、染色体マッピング、組織タイピング、法医学生物学）；（c）予測医学（例えば、診断アッセイ、予後アッセイ、臨床試験モニタリング、および薬理ゲノミクス）；ならびに（d）処置の方法（例えば、治療および予防）。本明細書中に記載されるように、1つの実施形態において、本発明のFGF-CXタンパク質は、ATPを結合する能力を有する。

【0212】

本発明の単離された核酸分子は、以下にさらに説明されるように、FGF-CXタンパク質を（例えば、遺伝子治療用途における宿主細胞中の組換え発現ベクターを介して）発現するため、FGF-CX mRNA（例えば、生物学的サンプルにおいて）またはFGF-CX遺伝子における遺伝子損傷を検出するため、ならびにFGF-CX活性を調節するために使用され得る。さらに、FGF-CXタンパク質は、FGF-CXの活性または発現を調節する薬物または化合物をスクリーニングするために、ならびにFGF-CXタンパク質の不十分なもしくは過剰な産生によって特徴付けられる障害、あるいはFGF-CX野生型タンパク質と比較して減少したかもしくは異常な活性を有するFGF-CXタンパク質形態の産生によって特徴付けられる障害（例えば、増殖障害または分化障害）を処置するために使用され得る。さらに、本発明の抗FGF-CX抗体が、FGF-CXタンパク質を検出して単離するため、およびFGF-CX活性を調節するために使用され得る。

【0213】

本発明は、さらに、上述のスクリーニングアッセイによって同定される新規の薬剤、および本明細書中で記載されるような処置のためのそれらの使用に関する。

【0214】

（スクリーニングアッセイ）

本発明は、調節因子、すなわち、FGF-CXタンパク質に結合するか、あるいは例えば、FGF-CX発現またはFGF-CX活性に対して刺激効果または阻害効果を有する、候補物または試験化合物もしくは薬剤（例えば、ペプチド、ペプチド模倣物、低分子または他の薬物）を同定するための方法（本明細書中において「スクリーニングアッセイ」とも称される）を提供する。

【0215】

1つの実施形態において、本発明は、FGF-CXのタンパク質またはポリペプチド、あるいはその生物学的に活性な部分に結合するか、またはそれらの活性を調節する、候補化合物もしくは試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。本発明の試験化合物は、当該分野において公知のコンビナトリアルライブラリー法における任意の多数のアプローチを使用して得られ得、これらのライブラリーには、以下が挙げられる：生物学的ライブラリー；空間的にアドレス可能な平行固相もしくは溶液相ライブラリー；デコンボリューションを要する合成ライブラリー法；「1ピース1化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法。生物学的ライブラリーアプローチはペプチドライブラリーに限定されるが、他の4つのアプローチ

10

20

30

40

50

は、ペプチド、非ペプチドオリゴマーもしくは化合物の低分子ライブラリーに適用可能である (Lam (1997) *Anticancer Drug Design* 12:145)。

【0216】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当該分野において、例えば以下に見出され得る：DeWittら (1993) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90:6909；Erbら (1994) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 91:11422；Zuckermannら (1994) *J Med Chem* 37:2678；Choら (1993) *Science* 261:1303；Carrellら (1994) *Angew Chem Int Ed Engl* 33:2059；Carellら (1994) *Angew Chem Int Ed Engl* 33:2061；およびGallopら (1994) *J Med Chem* 37:1233。

【0217】

化合物のライブラリーは、溶液中で (例えば、Houghten (1992) *Biotechniques* 13:412~421)、あるいはビーズ上 (Lam (1991) *Nature* 354:82~84)、チップ上 (Fodor (1993) *Nature* 364:555~556)、細菌 (Ladner 米国特許第5,223,409号)、胞子 (Ladner 米国特許第5,233,409号)、プラスミド (Cullら (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865~1869) またはファージ上 (ScottおよびSmith (1990) *Science* 249:386~390；Devlin (1990) *Science* 249:404~406；Cwirllaら (1990) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 87:6378~6382；Felici (1991) *J Mol Biol* 222:301~310；Ladner (上述)) において示され得る。

【0218】

1つの実施形態において、アッセイは細胞ベースのアッセイであり、ここで、膜結合形態のFGF-CXタンパク質、またはその生物学的に活性な部分を細胞表面上に発現する細胞が、試験化合物と接触され、そしてこの試験化合物が、FGF-CXタンパク質に結合する能力が、決定される。例えば、細胞は、哺乳動物起源または酵母細胞であり得る。この試験化合物がFGF-CXタンパク質に結合する能力の決定は、例えば、その試験化合物を放射性同位体標識または酵素標識とカップリングさせることによって達成され得る。その結果、この試験化合物のFGF-CXタンパク質またはその生物学的に活性な部分に対する結合が、複合体中のその標識化合物を検出することによって決定され得る。例えば、試験化合物は、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³Hで直接的または間接的のいずれかで標識され得、そしてその放射性同位体が、放射線放射の直接の計数により、またはシンチレーション計数により、検出され得る。あるいは、試験化合物は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識され得、そしてこの酵素的標識が、適切な基質の生成物への転換を決定することにより、検出され得る。1つの実施形態において、このアッセイは、膜結合形態のFGF-CXタンパク質、またはその生物学的に活性な部分をその細胞表面上に発現する細胞を、FGF-CXと結合する公知の化合物と接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物に試験化合物を接触させる工程、およびこの試験化合物がFGF-CXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がFGF-CXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程が、この試験化合物が、公知の化合物と比較して、FGF-CXまたはその生物学的に活性な部分と優先的に結合する能力を決定する工程を包含する。

【0219】

別の実施形態において、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、これは、膜結合形態のFGF-CXタンパク質またはその生物学的に活性な部分を細胞表面上で発現する細胞を、試験化合物と接触させる工程、およびこの試験化合物が、FGF-CXタンパク質ま

たはその生物学的に活性な部分の活性を調節（例えば、刺激または阻害）する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物が、FGF-CXまたはその生物学的に活性な部分の活性を調節する能力の決定は、例えば、FGF-CXタンパク質が、FGF-CX標的分子に結合するか、またはこれら標的分子と相互作用する能力を決定することによって、達成され得る。本明細書中において使用する場合には、「標的分子」とは、FGF-CXタンパク質が自然に結合または相互作用する分子であり、例えば、FGF-CX相互作用タンパク質を発現する細胞表面上の分子、第二の細胞の表面上の分子、細胞外環境中の分子、細胞膜の内部表面と会合する分子、または細胞質分子である。FGF-CX標的分子は、本発明の非FGF-CX分子あるいはFGF-CXタンパク質またはポリペプチドであり得る。1つの実施形態において、FGF-CX標的分子は、シグナル伝達経路の構成要素であり、これは、細胞膜を介した細胞内への細胞外シグナル（例えば、化合物が膜結合FGF-CX分子に結合することにより発生するシグナル）の伝達を促進する。その標的は、例えば、触媒活性を有する第二の細胞内タンパク質、または下流シグナル伝達分子のFGF-CXとの会合を容易にするタンパク質であり得る。

10

【0220】

FGF-CXタンパク質がFGF-CX標的分子に結合するかまたはその標的分子と相互作用する能力の決定は、直接的結合を決定するための上記方法の1つにより、達成され得る。1つの実施形態において、FGF-CXタンパク質がFGF-CX標的分子に結合するかまたはその標的分子と相互作用する能力の決定は、その標的分子の活性を決定することにより、達成され得る。例えば、この標的分子の活性は、その標的の細胞セカンドメッセンジャー（すなわち、細胞内Ca²⁺、ジアシルグリセロール、IP₃など）の誘導を検出すること、適切な基質への標的の触媒活性/酵素活性を検出すること、レポーター遺伝子（検出可能なマーカー（例えば、ルシフェラーゼ）をコードする核酸に作動可能に連結されたFGF-CX応答性調節エレメントを含む）の誘導を検出すること、または細胞応答（例えば、細胞生存度、細胞分化、または細胞増殖）を検出することにより、決定され得る。

20

【0221】

なお別の実施形態において、本発明のアッセイは、無細胞アッセイであり、これは、FGF-CXタンパク質またはその生物学的に活性な部分と試験化合物とを接触させる工程、およびその試験化合物がFGF-CXタンパク質またはその生物学的に活性な部分と結合する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物のFGF-CXタンパク質への結合は、上記のように、直接的または間接的にかのいずれかで決定され得る。1つの実施形態において、このアッセイは、FGF-CXタンパク質またはその生物学的に活性な部分と、FGF-CXに結合する公知の化合物とを接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物と試験化合物とを接触させる工程、およびその試験化合物がFGF-CXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がFGF-CXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程は、この試験化合物が、公知の化合物と比較して、FGF-CXまたはその生物学的に活性な部分に優先的に結合する能力を決定する工程を包含する。

30

【0222】

別の実施形態において、アッセイは、無細胞アッセイであり、これは、FGF-CXタンパク質またはその生物学的に活性な部分を試験化合物と接触させる工程、およびその試験化合物がFGF-CXタンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節（例えば、刺激または阻害）する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物がFGF-CXの活性を調節する能力の決定は、例えば、FGF-CXタンパク質が、FGF-CX標的分子に結合する能力を、直接的結合の決定のための上記方法の1つによって決定することにより、達成され得る。代替の実施形態において、この試験化合物がFGF-CXの活性を調節する能力の決定は、FGF-CXタンパク質が、FGF-CX標的分子をさらに調節する能力を決定することにより、達成され得る。例えば、この標的分子の適切な基質に対する触媒活性/酵素活性は、上に記載のように決定され得る。

40

50

【0223】

なお別の実施形態において、無細胞アッセイは、FGF-CXタンパク質またはその生物学的に活性な部分と、FGF-CXに結合する公知の化合物とを接触させてアッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物を試験化合物と接触させる工程、およびこの試験化合物がFGF-CXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がFGF-CXタンパク質と相互作用する能力の決定は、FGF-CXタンパク質が、FGF-CX標的分子と優先的に結合するか、またはその標的分子の活性を優先的に調節する能力を決定する工程を包含する。

【0224】

本発明の無細胞アッセイは、FGF-CXの可溶性形態または膜結合形態の両方の使用を受け入れる。膜結合形態のFGF-CXを含む無細胞アッセイの場合には、膜結合形態のFGF-CXが溶液中に維持されるように、可溶化剤を利用することが望ましくあり得る。このような可溶化剤の例には、非イオン性界面活性剤が挙げられ、例えば、n-オクチルグルコシド、n-ドデシルグルコシド、n-ドデシルマルチド、オクタノイル-N-メチルグルカミド、デカノイル-N-メチルグルカミド、Triton(登録商標)X-100、Triton(登録商標)X-114、Thesit(登録商標)、イソトリデシルポリ(エチレングリコールエーテル)_n(Isotridecypoly(ethylene glycol ether)_n)、N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート、3-(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ-1-プロパンスルホネート(3-(3-cholamidopropyl)dime 20
thylamminiol-1-propane sulfonate)(CHAPS)、または3-(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート(3-(3-cholamidopropyl)dimethylamminiol-2-hydroxy-1-propane sulfonate)(CH 20
APSO)である。

【0225】

本発明の上記アッセイ方法の1つ以上の実施形態において、FGF-CXまたはその標的分子のいずれかを固定して、そのタンパク質の一方または両方の非複合体化形態からの複合体化形態の分離を促進し、そしてそのアッセイの自動化に適用させることが、望ましくあり得る。試験化合物のFGF-CXへの結合、または候補化合物の存在下および非存在 30
下でのFGF-CXの標的分子との相互作用は、これらの反応物を収容するのに適切な任意の容器内で、達成され得る。このような容器の例には、マイクロタイタープレート、試験管、および微小遠心管が挙げられる。1つの実施形態において、そのタンパク質の一方または両方がマトリックスに結合することを可能にするドメインを付加する融合タンパク質が、提供され得る。例えば、GST-FGF-CX融合タンパク質またはGST標的融 30
合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ(Sigma Chemical, St. Louis, MO)またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着され得、次いで、これらは、試験化合物と合わせられるか、あるいは試験化合物および非 30
吸着の標的タンパク質またはFGF-CXタンパク質のいずれかと合わせられ、そしてこの混合物が、複合体形成を導く条件下(例えば、塩およびpHについての生理学的条件) 40
でインキュベートされる。インキュベーションに続いて、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄して、結合していないあらゆる成分を除去し、ビーズの場合にはマトリックスを固定し、例えば、上記のように、複合体を直接的または間接的のいずれかで決定する。あるいは、複合体がマトリックスから解離され得、そしてFGF-CXの結合 40
レベルまたは活性レベルを、標準的な技術を使用して決定し得る。

【0226】

タンパク質をマトリックス上に固定するための他の技術もまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。例えば、FGF-CXまたはその標的分子のいずれかが、ビオチンとストレプトアビジンとの複合体化を利用して固定され得る。ビオチン化され 50
たFGF-CXまたは標的分子は、当該分野において周知の技術(例えば、ビオチン化キ

ット、Pierce Chemicals、Rockford、Ill.)を使用して、
ビオチン-NHS (N-ヒドロキシスクシンイミド) から調製され得、そしてストレプト
アビジンで被覆した96ウェルのプレート (Pierce Chemical) のウェル
に固定され得る。あるいは、FGF-CXまたは標的分子と反応性であるが、FGF-C
Xタンパク質のその標的分子への結合を妨害しない抗体が、そのプレートのウェルに誘導
体化され得、そして結合していない標的またはFGF-CXが、抗体の結合体化によって
ウェル内にトラップされ得る。このような複合体を検出するための方法には、GST固定
複合体に関しての上記のものに加えて、FGF-CXまたは標的分子と反応性の抗体を使用
する複合体の免疫検出、ならびにFGF-CXまたは標的分子に付随する酵素活性の検
出に依存する酵素結合アッセイが挙げられる。

10

【0227】

別の実施形態において、FGF-CXの発現のモジュレーターは、細胞が候補化合物と接
触され、そして細胞中におけるFGF-CX mRNAまたはFGF-CXタンパク質の
発現が決定される方法で同定される。候補化合物の存在下での、FGF-CX mRNA
またはFGF-CXタンパク質の発現のレベルは、候補化合物の不在下でのFGF-CX
mRNAまたはFGF-CXタンパク質の発現のレベルと比較される。次いで、候補化
合物は、この比較に基づいて、FGF-CXの発現のモジュレーターとして同定され得る
。例えば、FGF-CX mRNAまたはFGF-CXタンパク質の発現が、候補化合物
の存在下で、その候補化合物の不在下よりも大きい (統計的に有意に大きい) 場合、この
候補化合物は、FGF-CX mRNAまたはFGF-CXタンパク質の発現の刺激因子
として同定される。あるいは、FGF-CX mRNAまたはFGF-CXタンパク質の
発現が、候補化合物の存在下でその候補化合物の不在下よりも小さい (統計的に有意に小
さい) 場合、この候補化合物は、FGF-CX mRNAまたはFGF-CXタンパク質
の発現のインヒビターとして同定される。細胞中におけるFGF-CX mRNAまたは
FGF-CXタンパク質の発現のレベルは、FGF-CX mRNAまたはFGF-CX
タンパク質を検出するための本明細書中に記載される方法によって決定され得る。

20

【0228】

本発明のなお別の局面において、FGF-CXタンパク質は、ツーハイブリッドアッセイ
またはスリーハイブリッドアッセイにおける「ベイト (bait) タンパク質」として使
用され得 (例えば、米国特許第5,283,317号; Zervosら、(1993) C
ell 72:223-232; Maduraら、(1993) J Biol Chem
268:12046-12054; Bartelら、(1993) Biotechni
ques 14:920-924; Iwabuchiら、(1993) Oncogene
8:1693-1696; およびBrent WO94/10300を参照のこと)、
FGF-CXに結合するかまたはそれと相互作用する他のタンパク質 (「FGF-CX結
合タンパク質」または「FGF-CX-bp」)、ならびにFGF-CXの活性を調節す
る他のタンパク質を同定する。このようなFGF-CX結合タンパク質はまた、例えば、
FGF-CX経路の上流または下流のエレメントとして、FGF-CXタンパク質による
シグナルの伝達に關与するようである。

30

【0229】

ツーハイブリッドシステムは、分離可能なDNA結合ドメインおよび活性化ドメインから
なる、大部分の転写因子の調節 (modular) 性質に基づく。手短には、このアッセ
イは、2つの異なるDNA構築物を使用する。1つの構築物において、FGF-CXをコ
ードする遺伝子は、公知の転写因子 (例えば、GAL-4) のDNA結合ドメインをコ
ードする遺伝子に融合される。他方の構築物において、DNA配列のライブラリー由来の、
未同定タンパク質 (「プレイ (prey)」または「サンプル」) をコードするDNA配
列は、公知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合される。「ベイト」タ
ンパク質および「プレイ」タンパク質がインビボで相互作用し得る場合、FGF-CX依
存性複合体を形成して、転写因子のDNA結合ドメインおよび活性化ドメインが、密接に
近接される。この近接は、転写因子に応答性の転写調節部位に作動可能に連結されるレポ

40

50

ーター遺伝子（例えば、L a c Z）の転写を可能にする。レポーター遺伝子の発現が検出され得、そしてこの機能性転写因子を含む細胞コロニーを単離および使用して、F G F - C X と相互作用するタンパク質をコードするクローン化遺伝子を獲得し得る。

【0230】

本発明は、さらに、上記スクリーニングアッセイによって同定される新規試薬および本明細書中に記載されるような処置のためのこれらの使用に関する。

【0231】

（検出アッセイ）

本明細書中で同定される c D N A 配列の部分またはフラグメント（および対応する完全遺伝子配列）は、ポリヌクレオチド試薬として多くの方法で使用され得る。例えば、これらの配列は、（i）それぞれの遺伝子を染色体上にマッピングし；従って、遺伝性疾患に関連する遺伝子領域を位置決めする；（ii）わずかな生物学的サンプルから個体を同定する（組織型決定）；そして（iii）生物学的サンプルの法医学的同定において補助するために使用され得る。

10

【0232】

本発明の F G F - C X 配列はまた、わずかな生物学的サンプルから個体を識別するために使用され得る。この技術において、個体のゲノム D N A は、1つ以上の制限酵素で消化され、そして同定のための独特のバンドを得るためにサザンプロット上で調査される。本発明の配列は、R F L P（米国特許第5,272,057号に記載の「制限フラグメント長多型」）のためのさらなる D N A マーカーとして有用である。

20

【0233】

さらに、本発明の配列を用いて、個体ゲノムの選択された部分について実際の塩基ごとに D N A 配列を決定する代替的技術を提供し得る。従って、本明細書中に記載される F G F - C X 配列を用いて、配列の5'末端および3'末端から2つの P C R プライマーを調製し得る。次いで、これらのプライマーを使用して、個体の D N A を増幅し得、引き続いて、配列決定し得る。

【0234】

この様式において調製された個体由来の対応する D N A 配列のパネルは、各個体が、対立遺伝子差異に起因するこのような D N A 配列の独特のセットを有するので、独特の個体同定を提供し得る。本発明の配列は、個体由来および組織由来のこのような同定配列を得るために使用され得る。本発明の F G F - C X 配列は、ヒトゲノムの部分を独特に表す。対立遺伝子変異は、これらの配列のコード領域においてある程度生じ、そして非コード領域においてより大きな程度に生じる。個々のヒトの間での対立遺伝子変異は、各500塩基につき約1回の頻度で生じると推定される。対立遺伝子変異の多くは、制限フラグメント長多型（R F L P）を含む単一ヌクレオチド多型（S N P）に起因する。

30

【0235】

本明細書中で記載の配列の各々は、ある程度、標準物質（これに対して個体由来の D N A が同定の目的で比較され得る）として使用され得る。より多くの多型が非コード領域で生じるので、個体を区別するために、それほど多くの配列が必要であるわけではない。配列番号1または配列番号26の非コード配列は、上記のように、おそらく10~1,000プライマーのパネルを用いてポジティブな個体識別を不自由なく提供し得る。これらのプライマーは、各々が100塩基の増幅された非コード配列を生じる。推定コード配列が使用される場合、ポジティブな個体識別のためのプライマーのより適切な数は、500~2,000である。

40

【0236】

（予測医療）

本発明はまた、診断アッセイ、予後アッセイ、薬理ゲノム学（p h a r m a c o g e n o m i c s）およびモニタリング臨床試験が、予後（予測）の目的に使用され、これによって個体を予防的に処置する、予測医療の分野に関する。従って、本発明の1つの局面は、F G F - C X タンパク質および/または核酸の発現、ならびに F G F - C X の活性を、生

50

物学的サンプル（例えば、血液、血清、細胞、組織）の関連で決定し、これによって、個体が、異常な FGF - CX の発現または活性に関連する疾患または障害に罹患しているかどうか、あるいは障害を発症する危険性があるかどうかを決定するための診断アッセイに関する。本発明はまた、個体が、FGF - CX のタンパク質、核酸の発現または活性と関連した障害を発症する危険性があるかどうかを決定するための予後的（または予測的）アッセイを提供する。例えば、FGF - CX の遺伝子における変異が、生物学的サンプルにおいてアッセイされ得る。このようなアッセイは、予後的または予測的な目的に使用され得、これによって FGF - CX タンパク質、核酸の発現もしくは活性によって特徴付けられるか、またはそれらに関連した障害の発病の前に個体を予防的に処置する。

【0237】

本発明の別の局面は、個体における FGF - CX タンパク質、核酸の発現あるいは FGF - CX の活性を決定するための方法を提供し、これによって、その個体についての適切な治療的または予防的薬剤（本明細書において「薬理ゲノム学」とよばれる）を選択する。薬理ゲノム学は、個体の遺伝型（例えば、特定の薬剤に対して応答する個体の能力を決定するために試験された個体の遺伝型）に基づいて個体の治療的または予防的処置のための薬剤（例えば、薬物）の選択を可能にする。

【0238】

本発明のなお別の局面は、臨床試験における FGF - CX の発現または活性に対する薬剤（例えば、薬物、化合物）の影響をモニタリングすることに関する。

【0239】

これらおよび他の薬剤は、以下の節でさらに詳細に記載される。

【0240】

（診断アッセイ）

線維芽細胞増殖因子 FGF - 1 ~ FGF - 9 は、一般に、特定の増殖因子レセプターを有する細胞において細胞増殖を促進する。FGF 増殖因子の例としては、手術後の目の前部における上皮細胞（例えば、線維芽細胞およびケラチノサイト）が挙げられる。細胞増殖が役割を果たす他の状態としては、腫瘍、再狭窄、乾癬、デュプイットラン拘縮、糖尿病合併症、カポジ肉腫および慢性関節リウマチが挙げられる。

【0241】

FGF - CX は、サンプル中または組織中のその対応する線維芽細胞増殖因子レセプター CX (FGFR CX) を検出するための、本発明の方法において使用され得る。この方法は、サンプルまたは組織を FGF - CX と接触させる工程、レセプター - リガンド対を形成させる工程、および任意の FGFRCX : FGF - CX 対を検出する工程、を包含する。FGF - CX を含む組成物は、FGFR CX 活性を増加させて、例えば、軟骨または骨の修復を刺激するために使用され得る。FGF - CX アンタゴニストまたは FGF - CX 結合因子（例えば、抗 FGF - CX 抗体）を含む組成物は、過剰の FGF - CX または FGF - CX の過剰な活性によって引き起こされる疾患（特に、孤立性または遺伝性の多発性外骨腫症、外反母趾変形、軟骨無形成症、滑液膜軟骨腫症および軟骨腫）を処置するために使用され得る。

【0242】

グリア活性化因子 (GAF) および GAF をコードする DNA は、グリア細胞の増殖を特異的に促進するように作用する。GAF を用いてグリア細胞活性を調節し得る、グリア関連障害のいくつかの例は、脳損傷、脳水腫、老年痴呆、アルツハイマー病、糖尿病性ニューロパシーなどである。同様に、FGF - CX が、グリア細胞関連障害の診断および処置に使用され得る。FGF - CX のグリア細胞調節活性は、神経保護様活性であり得、そして FGF - CX は、神経保護因子として使用され得る。FGF - 9（これは、本来、グリア活性化因子として同定された）に対する FGF - CX の密接な相同性に起因して、FGF - CX 配列もまた、グリア活性化因子であることが推測され得る。従って、FGF - CX は、グリア細胞の増殖を刺激するために使用され得、そして脳損傷の治療を促進するために使用され得るか、あるいは脳水腫、老年痴呆、アルツハイマー病または糖尿病性ニュー

10

20

30

40

50

ーロパシーを処置するために使用され得る。

【0243】

F G F - C X はまた、線維芽細胞（火傷、創傷、潰瘍などの治癒を促進するため）、巨核球（血小板数を増加するため）、造血細胞、免疫系細胞、および血管平滑筋細胞を刺激するために使用され得る。F G F - C X はまた、骨形成促進活性を有することが予測され、そして骨折および骨粗しょう症を処置するために使用され得る。F G F - C X のポリペプチド部分または核酸部分のアッセイは、脳腫瘍の診断において有用であり得、そしてこれらに対する抗体は、このような腫瘍を処置するために使用され得る。これはまた、培養細胞の増殖を刺激するための試薬として使用され得る。推定投薬量は、1 ng ~ 0.1 mg / kg / 日であるが、処置は、処置される障害の型または重篤度に依存して変化し得る。F G F - C X ポリペプチドは、血小板増加因子、骨形成促進因子として使用され得るか、あるいは、脳神経疾患または肝障害（例えば、肝硬変）を処置するために使用され得る。これらはまた、抗癌剤と併用される場合、癌を処置するために使用され得る。F G F - C X ポリペプチド、あるいはそのフラグメント、誘導體またはアナログに対する抗体は、F G F - C X ポリペプチドの生物学的活性を検出または決定するために使用され得るか、あるいは、F G F - C X ポリペプチドを精製するために使用され得る。F G F - C X の細胞増殖活性を中和もするこれらの抗体は、抗癌剤として使用され得る。

10

【0244】

多くの（全てではないとしても）相同タンパク質が、密接に関連する機能または同一の機能を有することが当該分野で公知である。例えば、Lewin、「Chapter 21 : Structural Genes Belong to Families」: Gene II、1985、John Wiley and Sons, Inc.、New Yorkを参照のこと。F G F - C X ポリペプチドは、アフリカツメガエル X F G F - C X タンパク質に非常に類似する。この X F G F - C X タンパク質は、高度に増殖性の組織において特異的に発現されることが以前に示されている（例えば、Kogaら、上記、を参照のこと）。従って、F G F - C X はまた、高度に増殖性の組織において細胞活性を調節することが推測される。従って、F G F - C X は、増殖性障害の診断において、ならびに、細胞および組織の増殖が抑制または阻害されている病理学的状態を克服するための、このような細胞および組織の増殖の刺激において、特に有用であり得る。配列番号1または配列番号26のF G F - C X 核酸の任意の一部に対応するオリゴヌクレオチドが、F G F - C X 様遺伝子の発現を検出するために使用され得る。本発明のタンパク質は、これらのタンパク質に特異的に結合する抗体の産生を刺激するために使用され得る。このような抗体は、サンプル中のタンパク質の存在を検出するための免疫診断手順において使用され得る。本発明のタンパク質は、細胞増殖が望ましい状態において、このような細胞増殖を刺激するために使用され得る。一例は、例えば、造血および血小板形成、胃腸管の内臓、ならびに毛包に対する、化学療法剤の毒性の副作用を相殺することである。これらはまた、神経学的障害（例えば、アルツハイマー病を含む）において、新たな細胞増殖を刺激するために使用され得る。あるいは、アンタゴニスト処置が投与され得、ここでは、本発明のF G F - C X 様タンパク質に特異的に結合する抗体が、これらのタンパク質の特定の増殖誘導効果を抑止する。このような抗体は、例えば、増殖性障害（例えば、種々の腫瘍および良性の過形成を含む）の処置において有用であり得る。

20

30

40

【0245】

生物学的サンプルにおいてF G F - C X の存在または非存在を検出するための例示的方法は、試験被験体から生物学的サンプルを得る工程、およびF G F - C X タンパク質またはF G F - C X タンパク質をコードするF G F - C X 核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）を検出し得る化合物または因子を、生物学的サンプルに接触させる工程を包含し、その結果、F G F - C X の存在が、生物学的サンプル中で検出される。F G F - C X のmRNAまたはゲノムDNAを検出するための因子は、F G F - C X のmRNAまたはゲノムDNAにハイブリダイズし得る、標識された核酸プローブである。この核酸プローブは、例えば、全長F G F - C X 核酸（例えば、配列番号1または配列番号26の核酸）あるい

50

はその一部（例えば、少なくとも15、30、50、100、250または500ヌクレオチド長であり、かつ上記のように、FGF-CXのmRNAまたはゲノムDNAにストリンジントな条件下で特異的にハイブリダイズするのに十分である、オリゴヌクレオチド）であり得る。本発明の診断アッセイにおける使用のための他の適切なプローブは、本明細書中に記載される。

【0246】

FGF-CXタンパク質を検出するための因子は、FGF-CXタンパク質に結合し得る抗体、好ましくは、検出可能な標識を有する抗体である。抗体は、ポリクローナル抗体であり得るか、またはより好ましくは、モノクローナル抗体であり得る。インタクトな抗体またはそのフラグメント（例えば、FabまたはF(ab')₂）が使用され得る。プローブまたは抗体に関して、用語「標識（された）」とは、プローブまたは抗体の直接的な標識（検出可能な物質をプローブまたは抗体にカップリングさせる（すなわち、物理的に連結することによる）、ならびに、プローブまたは抗体の間接的な標識（直接標識される別の試薬との反応性による）を包含することが意図される。間接的な標識の例としては、蛍光標識された二次抗体を用いる一次抗体の検出、およびビオチンでのDNAプローブの末端標識（その結果、これは、蛍光標識されたストレプトアビジンを用いて検出され得る）が挙げられる。用語「生物学的サンプル」とは、被験体から単離された、組織、細胞および生物学的流体、ならびに被験体内に存在する組織、細胞および流体を含むことが意図される。すなわち、本発明の検出方法を使用して、インビトロおよびインビボにて、生物学的サンプル中のFGF-CXのmRNA、タンパク質またはゲノムDNAを検出し得る。例えば、FGF-CX mRNAの検出のためのインビトロ技術としては、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。FGF-CXタンパク質の検出のためのインビトロ技術としては、酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）、ウェスタンブロット、免疫沈降および免疫蛍光が挙げられる。FGF-CXゲノムDNAを検出するためのインビトロ技術としては、サザンハイブリダイゼーションが挙げられる。さらに、FGF-CXタンパク質の検出のためのインビボ技術としては、被験体への標識された抗FGF-CX抗体の導入が挙げられる。例えば、抗体は、放射性マーカーを用いて標識され得る。被験体における放射性マーカーの存在および位置は、標準的な画像化技術によって検出され得る。

10

20

【0247】

1つの実施形態において、生物学的サンプルは、試験被験体由来のタンパク質分子を含む。あるいは、生物学的サンプルは、試験被験体由来のmRNA分子または試験被験体由来のゲノムDNA分子を含み得る。好ましい生物学的サンプルは、被験体から従来的手段によって単離された、末梢血白血球サンプルである。

30

【0248】

別の実施形態において、本発明の方法は、コントロールの被験体からコントロールの生物学的サンプルを得る工程、FGF-CXのタンパク質、mRNAもしくはゲノムを検出し得る化合物または因子を、コントロールサンプルに接触させる工程であって、その結果、FGF-CXのタンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在が、その生物学的サンプルにおいて検出される、工程、およびコントロールサンプルにおけるFGF-CXのタンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在を、試験サンプルにおけるFGF-CXのタンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在と比較する工程、を包含する。

40

【0249】

本発明はまた、生物学的サンプル中のFGF-CXの存在を検出するためのキットを包含する。例えば、このキットは、以下を備え得る：生物学的サンプル中のFGF-CXのタンパク質またはmRNAを検出し得る、標識された化合物もしくは因子；そのサンプル中のFGF-CXの量を決定するための手段；およびそのサンプル中のFGF-CXの量と標準とを比較するための手段。この化合物または因子は、適切な容器内に包装され得る。このキットは、さらに、FGF-CXのタンパク質または核酸を検出するキットを使用するための指示書を備え得る。

50

【0250】

(予後アッセイ)

本明細書において記載された診断方法をさらに利用して、異常なFGF-CX発現または活性に関連した疾患もしくは障害を有するかまたはその発症の危険にある被験体を同定し得る。例えば、本明細書に記載されるアッセイ(例えば、上述の診断アッセイまたは下記のアッセイ)を利用して、例えば、増殖障害または分化障害(例えば、過形成、腫瘍、再狭窄、乾癬、デュブイトラン拘縮、糖尿病性合併症、または慢性関節リウマチなど)およびグリア関連障害(例えば、大脳損傷、糖尿病性神経障害、脳水腫、老年痴呆、アルツハイマー病など)において、FGF-CXのタンパク質、核酸の発現または活性に関連する障害を有するかまたはその発症の危険に有る被験体を同定し得る。あるいは、この予後アッセイを利用して、疾患または障害を有するかまたはその発症の危険に有る被験体を同定し得る。従って、本発明は、異常なFGF-CX発現または活性に関連する疾患もしくは障害を同定するための方法を提供する。ここで、試験サンプルは、被験体から得られ、そしてFGF-CXタンパク質または核酸(例えば、mRNA、ゲノムDNA)が検出され、ここで、FGF-CXタンパク質または核酸の存在は、異常なFGF-CX発現または活性に関連する疾患または障害を有するかまたはその発症の危険にある被験体についての診断指標である。本明細書において使用される場合、「試験サンプル」とは、目的の被験体から得られた生物学的サンプルをいう。例えば、試験サンプルは、生物学的流体(例えば、血清)、細胞サンプル、または組織であり得る。

10

【0251】

さらに、本明細書に記載される予後アッセイを使用して、被験体が薬剤(例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子、または他の薬物候補物)が投与されて、異常なFGF-CX発現または活性に関連する疾患または障害が処置され得るか否かを決定し得る。例えば、そのような方法を用いて、被験体が障害(例えば、増殖障害、分化障害グリア関連障害など)のための薬剤を用いて有効に処置され得るか否かを決定し得る。従って、本発明は、異常なFGF-CX発現または活性に関連する障害のための薬剤を用いて被験体が有効に処置され得るか否かを決定するための方法を提供する。ここで、試験サンプルが得られ、そしてFGF-CXタンパク質または核酸が検出される(例えば、ここで、FGF-CXのタンパク質または核酸の存在は、異常なFGF-CX発現または活性に関連する障害を処置するための薬剤を投与され得る被験体についての診断指標である)。

20

30

【0252】

本発明の方法はまた、FGF-CX遺伝子における遺伝的損傷を検出し、それによって、その損傷遺伝子を有する被験体が増殖障害、分化障害、グリア関連障害などの危険性を有するかまたはこれらの障害に罹患しているか否かを決定するためにも使用され得る。種々の実施形態において、本発明の方法は、その被験体からの細胞のサンプルにおいて、FGF-CXタンパク質をコードする遺伝子の統合性に影響を与える変更の少なくとも1つによって特徴付けられる遺伝的損傷、あるいはFGF-CXの遺伝子の誤発現の存在または非存在を検出する工程を包含する。例えば、そのような遺伝的損傷は、以下の少なくとも1つの存在を確認することによって検出され得る：(1) FGF-CX遺伝子からの1つ以上のヌクレオチドの欠失；(2) FGF-CX遺伝子への1つ以上のヌクレオチドの付加；(3) FGF-CX遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換、(4) FGF-CX遺伝子の染色体再配置；(5) FGF-CX遺伝子のメッセンジャーRNA転写物のレベルにおける変更、(6) FGF-CX遺伝子の異常な改変(例えば、ゲノムDNAのメチル化パターンの異常な改変)、(7) FGF-CX遺伝子のメッセンジャーRNA転写物の非野生型スプライシングパターンの存在、(8) FGF-CXタンパク質の非野生型レベル、(9) FGF-CX遺伝子の対立遺伝子の欠失、ならびに(10) FGF-CXタンパク質の不適切な翻訳後修飾。本明細書において記載されるように、当該分野において、多数の公知のアッセイ技術が存在し、これらは、FGF-CXの遺伝子における損傷を検出するために使用され得る。好ましい生物学的サンプルは、従来手段によって被験体か

40

50

ら単離された末梢血白血球サンプルである。しかし、有核細胞を含む任意の生物学的サンプルが使用され得、これには、例えば、頬粘膜細胞が挙げられる。

【0253】

特定の実施形態において、損傷の検出は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（例えば、アンカーPCRまたはRACE PCR）あるいは、連結連鎖反応（LCR）（例えば、米国特許第4,683,195号および同4,683,202号を参照のこと）におけるプローブ/プライマーの使用を包含する（例えば、Landegranら（1988）*Science* 241:1077-1080；およびNakazawaら（1994）*PNAS* 91:360-364を参照のこと）。後者は、FGF-CXの遺伝子における点変異を検出するために特に有用であり得る（Abravayaら（1995）*Nucleic Acids Res* 23:675-682を参照のこと）。この方法は、患者から細胞のサンプルを収集する工程、核酸（例えば、ゲノム、mRNAまたはその両方）をそのサンプルの細胞から単離する工程、FGF-CX遺伝子に特異的にハイブリダイズする1つ以上のプライマーとその核酸サンプルとを、FGF-CX遺伝子（存在する場合）のハイブリダイゼーションおよび増幅が生じるような条件下で、接触させる工程、ならびに増幅産物の存在もしくは非存在を検出する工程、またはその増幅産物の大きさを検出する工程およびその長さをコントロールサンプルと比較する工程を包含し得る。PCRおよび/またはLCRは、本明細書に記載される変異を検出するために使用される技術のいずれかとともに予備的増幅工程として使用されるために所望され得ることが予想される。

【0254】

代替的な増幅方法としては、以下が挙げられる：自己維持配列複製（Guatelliら、1990、*Proc Natl Acad Sci USA* 87:1874-1878）、転写増幅系（Kwoh、ら、1989、*Proc Natl Acad Sci USA* 86:1173-1177）、Q-レプリカーゼ（Lizardiら、1988、*BioTechnology* 6:1197）、または他の任意の核酸増幅方法、それに続いて、当業者に周知な技術を用いたその増幅された分子の検出。これらの検出スキームは、そのような分子が非常に極少数で存在する場合、核酸分子の検出のために特に有用である。

【0255】

代替の実施形態において、サンプル細胞由来のFGF-CX遺伝子における変異は、制限酵素切断パターンにおける変更によって同定され得る。例えば、サンプルおよびコントロールのDNAが単離され、増幅され（必要に応じて）、1つ以上の制限エンドヌクレアーゼで消化され、そしてフラグメント長の大きさがゲル電気泳動によって決定され、そして比較される。サンプルDNAとコントロールDNAとの間のフラグメント長の大きさにおける差違は、そのサンプルDNAにおける変異を示す。さらに、配列特異的なリボザイムの使用（例えば、米国特許第5,493,531号を参照のこと）を使用して、リボザイム切断部位の発生または喪失によって特異的な変異の存在についてスコア付けし得る。

【0256】

他の実施形態において、FGF-CXにおける遺伝的変異は、サンプル核酸およびコントロール核酸（例えば、DNAまたはRNA）を、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含む高密度アレイに対してハイブリダイズさせることによって同定され得る（Croninら（1996）*Human Mutation* 7:244-255；Kozalら（1996）*Nature Medicine* 2:753-759）。例えば、FGF-CXにおける遺伝的変異は、Croninら（上記）において記載されるような光生成DNAプローブを含む二次元アレイにおいて同定され得る。手短には、第一のプローブのハイブリダイゼーションアレイを用いて、サンプルおよびコントロールにおける長いストレッチのDNAにわたって走査して、連続的に重複するプローブの線形アレイを作成することによってその配列の間の塩基変化を同定し得る。この工程は、点変異の同定を可能にする。この工程に続いて、検出される全ての改変体または変異体に相補的な、より小さな特化されたプローブアレイを用いることによって、特定の変異の特徴付けを可能に

する第二のハイブリダイゼーションアレイがある。各変異アレイは、一方が野生型遺伝子に対して相補的であり、そして他方が変異遺伝子に対して相補である並行プローブセットから構成される。

【0257】

なお別の実施形態において、当該分野で公知の種々の配列決定反応のいずれかを使用して、FGF-CX遺伝子を直接配列決定し得、そしてサンプルのFGF-CX配列と対応する野生型(コントロール)配列とを比較することによって、変異を検出し得る。配列決定反応の例としては、MaximおよびGilbert(1977)PNAS 74:560またはSanger(1977)PNAS 74:5463によって開発された技術に基づくものが挙げられる。診断アッセイを実施する場合、種々の自動化配列決定手順のいずれかを利用し得ることもまた意図される(Naeveら、(1995)Biotechniques 19:448)。これらには、質量分析法による配列決定法(例えば、PCT国際公開番号WO 94/16101; Cohenら(1996)Adv Chromatogr 36:127-162; およびGriffinら(1993)Appl Biochem Biotechnol 38:147-159を参照のこと)が含まれる。

10

【0258】

FGF-CX遺伝子における変異を検出するための他の方法としては、切断薬剤からの保護を使用して、RNA/RNAもしくはRNA/DNAのヘテロ二重鎖におけるミスマッチ塩基を検出する方法が挙げられる(Myersら(1985)Science 230:1242)。一般に、「ミスマッチ切断」の当該分野の技術は、野生型のFGF-CX配列を含む(標識された)RNAまたはDNAを、組織サンプルから得られた潜在的な変異体RNAまたはDNAとハイブリダイズさせることによって形成されるヘテロ二重鎖を提供する工程によって始まる。この二本鎖の二重鎖を、二重鎖の一本鎖領域(例えば、そのコントロール鎖とサンプルの鎖との間の塩基対ミスマッチに起因して存在するもの)を切断する薬剤を用いて処理する。例えば、RNA/DNA二重鎖を、RNaseを用いて処理し得、そしてDNA/DNAハイブリッドを、S1ヌクレアーゼを用いて処理して、そのミスマッチ領域を酵素的に消化し得る。他の実施形態において、DNA/DNAまたはRNA/DNAのいずれかの二重鎖を、ミスマッチ領域を消化するために、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウム、およびピペリジンを用いて処理し得る。次いで、そのミスマッチ領域の消化後、得られた材料を変性ポリアクリルアミドゲル上で、大きさで分離して、変異の部位を決定する。例えば、Cottonら(1988)Proc Natl Acad Sci USA 85:4397; Saleebaら(1992)Methods Enzymol 217:286-295を参照のこと。1つの実施形態において、コントロールのDNAまたはRNAは、検出のために標識され得る。

20

30

【0259】

なお別の実施形態において、ミスマッチ切断反応は、二本鎖DNAにおけるミスマッチ塩基対を認識する1つ以上のタンパク質(いわゆる「DNAミスマッチ修復」酵素)を、細胞のサンプルから得られたFGF-CX cDNAにおける点変異を検出およびマッピングするために規定された系において使用する。例えば、E. coliのmutY酵素は、G/AミスマッチでAを切断し、そしてHeLa細胞からのチミジンDNAグリコシラーゼは、G/TミスマッチでTを切断する(Hsuら(1994)Carcinogenesis 15:1657-1662)。例示的な実施形態に従って、FGF-CX配列(例えば、野生型FGF-CX配列)に基づくプローブは、試験細胞由来のcDNAまたは他のDNA産物にハイブリダイズされる。二重鎖は、DNAミスマッチ修復酵素を用いて処理され、そしてその切断産物(もしあれば)は、電気泳動プロトコルなどから検出され得る。例えば、米国特許第5,459,039号を参照のこと。

40

【0260】

他の実施形態において、電気泳動の移動度における変化は、FGF-CX遺伝子における変異を同定するために使用される。例えば、一本鎖配座多型(SSCP)は、変異体と野

50

生型核酸との間の電気泳動の移動度における差異を検出するために使用され得る (Ortalaら (1989) Proc Natl Acad Sci USA : 86 : 2766、また Cotton (1993) Mutat Res 285 : 125 ~ 144 ; Hayaishi (1992) Genet Anal Tech Appl 9 : 73 ~ 79 を参照のこと)。サンプルおよびコントロール FGF - CX 核酸の一本鎖 DNA フラグメントは、変性され、そして再生される。一本鎖核酸の二次構造は、配列に従って変化し、電気泳動の移動度において得られる変化は、1つの塩基変化の検出さえも可能にする。DNA フラグメントは、標識され得るか、または標識されたプローブを用いて検出され得る。アッセイの感度は、二次構造が、配列の変化に対してより感受的である、(DNA よりもむしろ) RNA を使用することによって増強され得る。1つの実施形態において、本発明の方法は、ヘテロ二重鎖分析を利用して、電気泳動の移動度における変化に基づいて二本鎖のヘテロ二重鎖分子を分離する (例えば、Keenら (1991) Trends Genet 7 : 5 を参照のこと)。

10

【0261】

なお別の実施形態において、一定勾配の変性剤を含有するポリアクリルアミドゲルにおける変異体または野生型フラグメントの移動は、変性勾配ゲル電気泳動 (DGGE) を使用してアッセイされる (例えば、Myersら (1985) Nature 313 : 495 を参照のこと)。DGGE が分析の方法として使用される場合、DNA は、例えば、PCR により約 40 bp の高融点 GC リッチ DNA の GC クランプを付加することによって、完全には変性されないことを確実に改変される。さらなる実施形態において、温度勾配は、コントロール DNA およびサンプル DNA の移動度における差異を同定するために、変性勾配の代わりに使用される (例えば、Rosenbaum および Reissner (1987) Biophys Chem 265 : 12753 を参照のこと)。

20

【0262】

点変異を検出するための他の技術の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー伸長。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーは、既知の変異が中心的に配置されるように調製され得、次いで、完全なマッチが見出される場合にのみハイブリダイゼーションを許容する条件下で標的 DNA にハイブリダイズされる (例えば、Saikiら (1986) Nature 324 : 163) ; Saikiら (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86 : 6230 を参照のこと)。このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、このオリゴヌクレオチドがハイブリダイズ膜に付着され、そして標識された標的 DNA がハイブリダイズされる場合に、PCR 増幅された標的 DNA または多くの異なる変異にハイブリダイズされる。

30

【0263】

あるいは、選択的 PCR 増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術は、本発明と合わせて使用され得る。特異的増幅についてのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中心において (その結果、増幅は、差次的ハイブリダイゼーションに依存する) (Gibbsら (1989) Nucleic Acids Res 17 : 2437 ~ 2448) か、あるいは適切な条件下で mismatches が妨げられ得るかまたはポリメラーゼ伸長を減少し得る、1つのプライマーの 3' の最末端で、目的の変異を保有し得る (Prossner (1993) Tibtech 11 : 238)。さらに、変異の領域において新規な制限部位を導入することは、切断に基づく検出を行うために望ましくあり得る (例えば、Gaspariniら (1992) Mol Cell Probes 6 : 1 を参照のこと)。特定の実施形態において、増幅はまた、増幅用 Taq リガーゼを使用して実施され得ることが予測される (例えば、Barany (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88 : 189 を参照のこと)。このような場合において、連結は、5' 配列の 3' 末端に完全なマッチが存在する場合にのみ生じ、増幅の存在または非存在を探索することによって、特定の部位で既知の変異の存在を検出することを可能にする。

40

50

【0264】

本明細書中に記載される方法は、例えば、本明細書中に記載される少なくとも1つのプローブ核酸または抗体試薬を含む、予めパッケージングされた診断キットを利用することによって実施され得、これは、例えば、FGF-CX遺伝子を含む疾患または疾病の症状または家族病歴を示す患者を診断するための臨床的設定において簡便に使用され得る。

【0265】

さらに、FGF-CXが発現される任意の細胞型または組織（好ましくは、末梢血白血球）は、本明細書中に記載される予後アッセイにおいて利用され得る。しかし、有核細胞を含む任意の生物学的サンプル（例えば、頬粘膜細胞を含む）が、使用され得る。

【0266】

（薬理ゲノム学（Pharmacogenomics））
FGF-CX活性（例えば、FGF-CX遺伝子発現）に対する刺激性または阻害性の影響を有する因子、すなわちモジュレーターは、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定されるように、異常なFGF-CX活性に関連する障害（例えば、神経障害、癌関連障害または妊娠障害）を処置（予防的または治療的に）するために個体に投与され得る。このような処置と合わせて、個体の薬理ゲノム学（すなわち、個体の遺伝子型と外来化合物または薬物に対するその個体の応答との間の関係についての研究）が、考慮され得る。治療剤の代謝における差異は、薬理的に活性な薬物の用量と血中濃度との間の関係を変更することによって、重篤な毒性または治療の失敗を導き得る。従って、個体の薬理ゲノム学は、個体の遺伝子型の考慮に基づく予防的または治療的処置のために有効な薬剤（例えば、薬物）の選択を許容する。このような薬理ゲノム学は、さらに、適切な投薬量および治療剤レジメンを決定するために使用され得る。従って、FGF-CXタンパク質の活性、FGF-CX核酸の発現、あるいは個体におけるFGF-CX遺伝子の変異内容が決定されて、それによって個体の治療的または予防的処置のために適切な薬剤を選択し得る。

【0267】

薬理ゲノム学は、罹患された人において変更された薬物の性質および異常な作用に起因する、薬物に応答する臨床的に有意な遺伝的变化を扱う。例えば、Eichelbaum、1996、Clin Exp Pharmacol Physiol、23:983~985およびLinder、1997、Clin Chem、43:254~266を参照のこと。一般に、2つの型の薬理ゲノム学状態が、区別され得る。遺伝的状态は、薬物が身体に作用する方法を変更する1つの因子として伝達されるか（変更された薬物作用）、または遺伝的状态は、身体が薬物に作用する方法を変更する1つの因子として伝達される（変更された薬物代謝）。これらの薬理ゲノム学状態は、稀な欠損としてか、または多型としてのいずれかで生じ得る。例えば、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ（G6PD）欠損は、一般的な遺伝性酵素病であり、この主な臨床的合併症は、酸化剤薬物（抗マラリア剤、スルホンアミド、鎮痛薬、ニトロフラン）の摂取およびソラマメの摂取後の溶血である。

【0268】

例示的な実施形態として、薬物代謝酵素の活性は、薬物作用の強度および期間の両方の主要な決定因子である。薬物代謝酵素（例えば、N-アセチルトランスフェラーゼ2（NAT2）ならびにシトクロムP450酵素CYP2D6およびCYP2C19）の遺伝的多型の発見は、幾人かの患者が予期される薬物効果を得ないか、または標準的かつ安全な用量の薬物を摂取した後に過大な薬物応答および深刻な毒性を示すことに関しての説明を提供した。これらの多型は、集団において2つの表現型（高い代謝能を持つ人（extensive metabolizer）（EM）および低い代謝能を持つ人（poor metabolizer）（PM））で表現される。PMの罹患率は、異なる集団の間で異なる。例えば、CYP2D6をコードする遺伝子は高度に多型であり、そしていくらかの変異がPMにおいて同定されており、この全ては機能的CYP2D6の非存在に至る。CYP2D6およびCYP2C19の低い代謝能を持つ人は、彼らが標準的な用量を受ける

10

20

30

40

50

場合に、かなり頻繁に過大な薬物応答および副作用を経験する。代謝産物が活性な治療的部分である場合、そのCYP2D6形成代謝産物であるモルヒネによって媒介されるコデインの鎮痛効果について実証されるように、PMは治療的応答を示さない。他の極端なものは、標準的な用量に応答しない、いわゆる超迅速な代謝能を持つ人である。最近、超迅速な代謝の基準となる分子は、CYP2D6遺伝子増幅に起因していることが同定されている。

【0269】

従って、FGF-CXのタンパク質の活性、FGF-CXの核酸の発現、あるいは個体におけるFGF-CXの遺伝子の変異内容を決定されて、それによって、その個体の治療的または予防的処置のために適切な薬剤を選択し得る。さらに、薬理ゲノム学の研究を使用して、個体の薬物応答性の表現型の同定に対して薬物代謝酵素をコードする多型対立遺伝子の遺伝子型を適用し得る。この知見は、投薬または薬物選択に適用される場合、有害な反応または治療の失敗を回避し得、従って、被験体をFGF-CXの調節因子（例えば、本明細書中に記載される例示的なスクリーニングアッセイの1つによって同定される調節因子）を用いて処置する場合に治療的または予防的効率を増強し得る。

10

【0270】

（臨床的効果のモニタリング）

FGF-CXの発現または活性（例えば、異常な細胞増殖および/または分化を調節する能力）に対する薬剤（例えば、薬物、化合物）の影響をモニタリングすることは、基本的な薬物スクリーニングおよび臨床試験においてもまた適用され得る。例えば、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイによって決定される薬剤が、FGF-CXの遺伝子発現、タンパク質レベルを増加、またはFGF-CX活性をアップレギュレートする効力を、減少されたFGF-CXの遺伝子発現、タンパク質レベル、またはダウンレギュレートされたFGF-CXの活性を示す被験体の臨床試験においてモニターし得る。あるいは、スクリーニングアッセイによって決定される薬剤が、FGF-CXの遺伝子発現、タンパク質レベルを減少、またはFGF-CXの活性をダウンレギュレートする効力を、増加されたFGF-CXの遺伝子発現、タンパク質レベル、またはアップレギュレートされたFGF-CXの活性を示す被験体の臨床試験においてモニターし得る。このような臨床試験において、FGF-CXの発現または活性、および好ましくは、例えば、増殖障害または神経障害に関連した他の遺伝子が、「リードアウト（読み出し）（read out）」、すなわち、特定の細胞の応答性のマーカーとして使用され得る。

20

30

【0271】

例えば、FGF-CXを含む遺伝子（これは、FGF-CX活性（例えば、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイにおいて同定される）を調節する薬剤（例えば、化合物、薬物または低分子）を用いる処置によって、細胞内で調節される）が、同定され得る。従って、細胞性増殖障害に対する薬剤の効果を研究するために、例えば、臨床試験において、細胞が単離され得、そしてRNAが調製され得、そしてFGF-CXおよびこの障害に関連する他の遺伝子の発現のレベルについて分析され得る。遺伝子発現のレベル（すなわち、遺伝子発現パターン）は、本明細書中に記載されるように、ノーザンブロット分析もしくはRT-PCRによるか、あるいは産生されるタンパク質の量を測定することによるか、本明細書中に記載されるような方法の1つによるか、あるいはFGF-CXまたは他の遺伝子の活性のレベルを測定することによって、定量され得る。この様式で、この遺伝子発現パターンは、この薬剤に対する細胞の生理学的応答の指標であるマーカーとして作用し得る。従って、この応答状態は、この薬剤を用いる個体の処置の前、および処置の間の種々の時点で、決定され得る。

40

【0272】

1つの実施形態において、本発明は、薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、タンパク質、ペプチド、核酸、ペプチド模倣物、低分子、または本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される他の薬物候補物）を用いる、被験体の処置の効力をモニタリングするための方法を提供し、これは、以下の工程を包含する：（i）薬剤の

50

投与の前に、被験体から投与前サンプルを得る工程；(ii)この投与前サンプルにおいて、FGF-CXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現のレベルを検出する工程；(iii)この被験体から1つ以上の投与後サンプルを得る工程；(iv)この投与後サンプルにおいて、FGF-CXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性のレベルを検出する工程；(v)この投与前サンプルにおけるFGF-CXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現または活性のレベルを、この投与後サンプルにおけるFGF-CXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAと比較する工程；ならびに(vi)この比較に従って、この被験体に対する薬剤の投与を変更する工程。例えば、この薬剤の増加した投与は、検出されるよりも高いレベルにFGF-CXの発現または活性を増加するために(すなわち、この薬剤の効力を増加するために)望ましくあり得る。あるいは、この薬剤の減少した投与は、検出されるよりも低いレベルにFGF-CXの発現または活性を減少するために(すなわち、この薬剤の効力を減少するために)望ましくあり得る。

10

【0273】

(処置の方法)

本発明は、FGF-CXの異常な発現または活性に関連する障害の危険性がある(または感受性)か、またはこの障害を有する被験体を処置する予防的および治療的の両方の方法を提供する。

【0274】

(その疾患または障害に罹患していない被験体と比較して)増加したレベルまたは生物学的活性によって特徴付けられる疾患および障害は、活性を拮抗する(すなわち、低減または阻害する)治療剤を用いて処置され得る。活性を拮抗する治療剤は、治療的または予防的な様式で、投与され得る。利用され得る治療剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：(i)FGF-CXポリペプチド、またはそのアナログ、誘導體、フラグメントもしくはホモログ；(ii)FGF-CXペプチドに対する抗体；(iii)FGF-CXペプチドをコードする核酸；(iv)アンチセンス核酸および「機能不全性」である(すなわち、FGF-CXペプチドに対するコード配列のコード配列内の異種挿入に起因する)核酸の投与が、相同組換えによってFGF-CXペプチドの内因性機能を「ノックアウトする」ために利用される(例えば、Capecci、1989、Science 244:1288~1292を参照のこと)；または(v)FGF-CXペプチドとその結合パートナーとの間の相互作用を変化させる、調節因子(すなわち、インヒビター、アゴニストおよびアンタゴニスト(本発明のさらなるペプチド模倣物または本発明のペプチドに対して特異的な抗体を含む))。

20

30

【0275】

(その疾患または障害に罹患していない被験体と比較して)減少したレベルまたは生物学的活性によって特徴付けられる疾患および障害は、活性を増加させる(すなわち、活性に対するアゴニストである)治療剤を用いて処置され得る。活性をアップレギュレートする治療剤は、治療的または予防的な様式で、投与され得る。利用され得る治療剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：FGF-CXペプチド、またはそのアナログ、誘導體、フラグメントもしくはホモログ；あるいはバイオアベイラビリティを増加させるアゴニスト。

40

【0276】

増加したレベルまたは減少したレベルは、ペプチドおよび/またはRNAを定量することによって、容易に検出され得る。この定量は、患者の組織サンプルを(例えば、生検組織から)入手し、そしてそのサンプルを、その発現したペプチド(またはFGF-CXペプチドのmRNA)のRNAレベルまたはペプチドレベル、構造および/または活性をインビトロでアッセイすることによる。当該分野において周知の方法としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：イムノアッセイ(例えば、ウェスタンブロット分析、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)ポリアクリルアミドゲル電気泳動が後に続く免疫沈降、免疫細胞化学などによる)および/またはmRNAの発現を検出するためのハイブリダイ

50

ゼーションアッセイ（例えば、ノーザンアッセイ、ドットプロット、インサイチュハイブリダイゼーションなど）。

【0277】

1つの局面において、本発明は、被験体においてFGF-CXの異常な発現または活性と関連する疾患または状態を、FGF-CXの発現または少なくとも1つのFGF-CX活性を調節する薬剤をこの被験体に投与することによって予防するための方法を提供する。FGF-CXの異常な発現または活性によって引き起こされるかまたはこれらに起因する、疾患にかかる危険がある被験体は、例えば、本明細書中に記載の診断アッセイまたは予後アッセイのいずれか、またはそれらの組み合わせによって、同定され得る。予防薬剤の投与は、疾患または障害が予防されるか、あるいはその進行を遅らせられるように、このFGF-CX異常の特徴である症状の発現の前に行い得る。このFGF-CX異常の型に依存して、例えば、FGF-CXアゴニスト薬剤またはFGF-CXアンタゴニスト薬剤が、その被験体を処置するために使用され得る。その適切な薬剤は、本明細書中に記載のスクリーニングアッセイに基づいて決定され得る。

10

【0278】

本発明の別の局面は、治療目的のためにFGF-CX発現または活性を調節する方法に関する。本発明の調節方法は、細胞を、その細胞に関するFGF-CXタンパク質活性の活性のうち1つ以上を調節する薬剤と接触させる工程を包含する。FGF-CXタンパク質活性を調節する薬剤は、核酸またはタンパク質、FGF-CXタンパク質の天然に存在する同族リガンド、ペプチド、FGF-CXペプチド模倣物、または他の低分子のような、本明細書中に記載されるような薬剤であり得る。1つの実施形態において、この薬剤は、1つ以上のFGF-CXタンパク質活性を刺激する。このような刺激薬剤の例としては、活性なFGF-CXタンパク質、およびその細胞に導入されたFGF-CXをコードする核酸分子が挙げられる。別の実施形態において、この薬剤は、1つ以上のFGF-CXタンパク質活性を阻害する。このような阻害薬剤の例としては、アンチセンスFGF-CX核酸分子、および抗FGF-CX抗体が挙げられる。これらの調節方法は、インビトロで（例えば、その薬剤とともにその細胞を培養することによって）、あるいはインビボで（例えば、被験体にその薬剤を投与することによって）実施され得る。このように、本発明は、FGF-CXのタンパク質または核酸分子の、異常な発現または異常な活性によって特徴付けられる、疾患または障害に罹患した個体を処置する方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、FGF-CXの発現または活性を調節する（例えば、アップレギュレートまたはダウンレギュレートする）薬剤（例えば、本明細書中に記載のスクリーニングアッセイによって同定される薬剤）あるいはそのような薬剤の組み合わせを投与する工程を包含する。別の実施形態において、この方法は、FGF-CXのタンパク質または核酸分子を、低減したかまたは異常な、FGF-CXの発現または活性を補償するための治療として、投与する工程を包含する。

20

30

【0279】

本発明はさらに、以下の非限定的な実施例において記載される。

【0280】

（実施例）

40

（実施例1．FGF-CX遺伝子の同定）

FGF-CX遺伝子を、*Xenopus* FGF-CX (Koga, C., Adati, N., Nakata, K., Mikoshiba, K., Furuhashi, Y., Sata, S., Tei, H., Sakati, Y., Kurokawa, T., Shiohara, K. および Yokoyama, K. K. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 261, 756-765; 登録番号 AB012615) を問い合わせとして用いて、Genbank ヒトゲノムDNA配列の TBLASTN (Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. および Lipman, D. J. (1990) *J. Mol. Biol.* 215, 403-410) 検索に従って、同定した。この検索は、第8染色体における高い相同性の遺伝子座 (

50

登録番号 AB020858) を同定した。イントロン/エキソン境界を、標準的なコンセンサスプライミングパラメータ (Mount, S. M. (1996) Science 271, 1690-1692) を既知の FGF 由来の相同性と共に使用して、推定した。FGF-CX 開始コドンは、AB020858 の配列の bp16214 に局在しており、そしてこのエキソンの残りの 3' 部分は、bp15930 まで続く。FGF-CX の 5' UTR を、公共の EST (登録番号 AA232729、AA236522、AI272876 および AI272878) を使用して、この開始コドンの上流にさらに 606 bp だけ伸長させた。FGF-CX 遺伝子の残りの構造は、遺伝子座 AB020858 に関連する場合に、以下の通りである：イントロン 1 (bp15929~9942)；エキソン 2 (bp9941~9838)；イントロン 2 (bp9837~7500)；エキソン 3 (bp7499 で開始し、そして図 13 に示すように続く；3' 未翻訳領域の構造は、未決定である)。

10

【0281】

前段落の手順によって発見された遺伝子は、3つのエキソンおよび2つのイントロンを含む(図13)。DNA配列は、開始メチオニンの117bp上流にインフレーム終止コドンを有する、211アミノ酸残基のORFを推定する。この遺伝子が由来したDNAセグメントは、染色体8p21.3-p22(放射線ハイブリッド分析によって確認された位置)にマッピングされる(実施例2を参照のこと)。

【0282】

アミノ酸残基125~148の間に位置する、PROSITE検索(Bucher, P. & Baairoch, A. (1994) Ismb. 2, 53-61)によって同定したFGFシグネチャーモチーフ(G-X-[LI]-X-[STAGP]-X(6,7)-[DE]-C-X-[FLM]-X-E-X(6)-Y)に二重下線を引き、そしてイントロン/エキソン境界を、矢印で示す。イントロン1およびイントロン2は、それぞれ、5988bp長および2338bp長である。5'UTR配列を、公開のESTから誘導し、そして、その全体は示していない。

20

【0283】

(実施例2.FGF-CXの照射ハイブリッドマッピング)

ヒト染色体マーカーを用いた照射ハイブリッドマッピングを、FGF-CXについて実行した。使用した手順は、Steen, R.G.ら(A High-Density Integrated Genetic Linkage and Radiation Hybrid Map of the Laboratory Rat, Genome Research 1999 (1999年5月21日にオンラインで公開された) Vol. 9, AP1-AP8, 1999)に記載される手順と同様である。無作為化した照射誘導ヒト染色体フラグメントを含む93個の細胞クローンのパネルを、特有の様式で探索しているクローンを同定するように設計したPCRプライマーを用いて、96ウェルプレートにおいてスクリーニングした。FGF-CXをコードするヌクレオチド配列が同定されるDNAセグメントを、染色体8p21.3-p22に対するマッピングとして印をつけた。FGF-CXが、マーカーAFM177XB10と重複する座位であり、かつマーカーWI-5104から1.6cR、マーカーWI-9262から3.2cRである座位において、染色体8にマッピングすることを見出すことによって、本分析によりこの結果を正確にした。

30

40

【0284】

(実施例3.FGF-CXタンパク質をコードする配列の分子クローニング) 全長FGF-CXをコードするオープンリーディングフレームを示すDNAセグメントのPCRによる増幅のために、オリゴヌクレオチドプライマーを設計した。順方向プライマーは、BglII制限部位(AGATCT)およびコンセンサスKozak配列(CCACCC)を含む。逆方向プライマーは、さらなるサブクローニング目的のためにインフレームのXhoI制限部位を含む。順方向プライマーおよび逆方向プライマーの両方が、5'クランプ配列(CTCGTC)を含む。プライマーの配列は、以下である：

50

【0285】

【化1】

FGF-CX-順方向 5'-CTCGTC AGATCT CCACC ATG GCT CCC TTA GCC GAA
GTC -3' (配列番号3)

FGF-CX-逆方向 5'-CTCGTC CTCGAG AGT GTA CAT CAG TAG GTC CTT G -
3' (配列番号4)

【0286】

10

50 μl 容量中、総量 5 ng のヒト前立腺 cDNA テンプレート、各 1 μM の FGF - C X 順方向プライマーおよび FGF - C X 逆方向プライマー、5 μM dNTP (Clontech Laboratories, Palo Alto CA) および 1 μl の 50 x Advantage - HF 2 ポリメラーゼ (Clontech Laboratories) を用いて、PCR 反応を実行した。以下の PCR 反応条件を使用した:

- a) 96 3 分間
- b) 96 30 秒間 変性
- c) 70 30 秒間、プライマーアニーリング (この温度は、1 / サイクルずつ徐々に低下させた。)
- d) 72 1 分間 伸長。

20

【0287】

工程 (b) ~ (d) を 10 回繰り返す。

【0288】

- e) 96 30 秒間 変性
- f) 60 30 秒間 アニーリング
- g) 72 1 分間 伸長

工程 (e) ~ (g) を 25 回繰り返す。

【0289】

- h) 72 5 分間 最終伸長。

【0290】

30

約 640 bp の予想サイズを有する単一 PCR 産物を、アガロースゲル上での電気泳動後に単離し、そして pCR2.1 ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA) に連結した。クローン化した挿入物を、ベクター特異的 M13 順方向プライマー (-40) および M13 逆方向プライマーを用いて配列決定し、これによって、このヌクレオチド配列が、上流 Bgl I I クローニング部位と下流 Xho I クローニング部位との間に直接挿入された図 1 (配列番号 1) の配列に 100% 同一であることを確認した。クローン化された配列は、推定 FGF - C X 全長タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを構成する。このクローンを、TA - AB02085 - S274 - F19 と呼ぶ。

【0291】

40

(実施例 4 . 哺乳動物発現ベクター pCEP4 / Sec の調製)

オリゴヌクレオチドプライマー、pSec - V5 - His 順方向 (CTCGT CCTC G AGGGT AAGCC TATCC CTAAC (配列番号 14)) および pSec - V5 - His 逆方向 (CTCGT CGGGC CCTTG ATCAG CGGG T TTA A C (配列番号 15)) を、V5 および His 6 を含む pcDNA3.1 - V5 His (Invitrogen, Carlsbad, CA) 発現ベクターからフラグメントを増幅するように設計した。PCR 産物を、Xho I および Apa I で消化し、そして Xho I / Apa I で消化した Ig リーダー配列を保有する pSec Tag 2 B ベクター (Invitrogen, Carlsbad CA) に連結した。インフレームで Ig リーダーおよび V5 - His 6 を含む生じたベクター (pSec V5 His) 50

の正確な構造を、DNA配列分析によって確認した。このベクターpSecV5Hisを、PmeIおよびNheIで消化して、正確なフレームで上記の元素を維持するフラグメントを提供した。PmeI-NheIフラグメントを、BamHI/KlenowおよびNheIで処理したベクターpCEP4(Invitrogen, Carlsbad, CA)に連結した。生じるベクターをpCEP4/Secと命名し、そしてこのベクターは、インフレームでIgリーダー、目的のクローン挿入のための部位、ならびにV5エピトープおよび6xHisをPCMVおよび/またはPT7プロモーターの制御下で含む。pCEP4/Secは、任意のタンパク質をIg鎖シグナルペプチドに続くマルチクロニング部位に融合させることによって、異種タンパク質の発現および分泌を可能にする発現ベクターである。C末端のV5エピトープタグおよび6xHis tag(Invitrogen, Carlsbad, CA)の存在を補助として、発現されたタンパク質を検出および精製する。

10

【0292】

(実施例5. ヒト胚性腎臓(HEK)293細胞におけるFGF-CXの発現)
FGF-CX配列を含むBglII-XhoIフラグメントを、TA-AB02085-S274-F19(実施例3)から単離し、そしてBamHI-XhoIで消化したpCEP4/Secにサブクロニングして、発現ベクターpCEP4/Sec-FGF-CXを作製した。このpCEP4/Sec-FGF-CXベクターを、製造業者の指示書に従ってLipofectamine Plus試薬(Gibco/BRL/Life Technologies, Rockville, MD)を用いて293細胞にトランスフェクトした。細胞ペレットおよび上清を、トランスフェクションの72時間後に収集し、抗V5抗体を用いたウエスタンブロッティング(還元条件)によってFGF-CX発現について調べた。図12は、FGF-CXが293細胞によって分泌された約34kDaの見かけの分子量(Mr)を有するポリペプチドとして発現されることを示す。さらに、主要でないバンドが、約31kaに観察される。

20

【0293】

(実施例6. E. coli.におけるFGF-CXの発現)
ベクターpRSETA(Invitrogen Inc., Carlsbad, CA)を、XhoIおよびNcoI制限酵素で消化した。配列 5' CATGGTCAGCCTAC 3' (配列番号16)および5' TCGAGTAGGCTGAC 3' (配列番号17)のオリゴヌクレオチドリンカーを、37°Cでアニーリングし、そしてXhoI-NcoIで処理したpRSETAに連結した。生じるベクターを、制限分析および配列決定によって確認し、そしてpETMYと命名した。FGF-CXをコードする配列のBglII-XhoIフラグメント(実施例3を参照のこと)を、BamHIおよびXhoI制限酵素で消化したベクターpETMYに連結した。発現ベクターを、pETMY-FGF-CXと命名する。このベクターにおいて、hFGF-CXは、そのN末端が6xHisタグおよびT7エピトープに融合していた。次いで、プラスミドpETMY-FGF-CXを、E. coli発現宿主BL21(DE3, pLys)(Novagen, Madison, WI)にトランスフェクトし、タンパク質FGF-CXの発現を、製造業者の指示書に従って誘導した。誘導後、総細胞を収集し、そしてタンパク質を、抗HisGly抗体(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いたウエスタンブロッティングによって分析した。図14は、FGF-CXが約32kDaのタンパク質として発現されたことを示す。

30

40

【0294】

(実施例7. クローン化されたシグナルペプチド有りおよび無しでの、組み換えFGF-CXタンパク質の発現比較)

a) シグナルペプチド無しでの発現

発明の詳細な説明中で記載したように、FGF-CXは古典的アミノ末端シグナル配列を明らかに欠く。FGF-CXが哺乳動物細胞から分泌されるか否かを決定するために、全長FGF-CXタンパク質をコードするBglII-XhoIフラグメントとして得られ

50

る cDNA を、T A - A B 0 2 0 8 5 - S 2 7 4 - F 1 9 (実施例 3) から B a m H I / X h o I 消化 p c D N A 3 . 1 (I n v i t r o g e n) にサブクローニングした。これは、p F G F - C X と称される哺乳動物発現ベクターを提供する。この構築物は、V 5 エピトープタグおよびポリヒスチジンタグをタンパク質のカルボキシ末端に組み込み、それぞれ、このタンパク質の同定および精製を補助し、そして約 2 7 k D a のポリペプチドを生成するはずである。2 9 3 ヒト胚性腎臓細胞に一過性トランスフェクションした後、馴化培地をトランスフェクションの 4 8 時間後に収集した。

【 0 2 9 5 】

馴化培地への F G F - C X の分泌に加えて、F G F - C X が細胞ペレット / E C M と会合することもまた、見出された (データには示さず) 。 F G F は、細胞表面上および細胞外マトリックス (E C M) 中に存在する硫酸ヘパリンプロテオグリカン (H S P G) に結合することが公知であり、本発明者らは、F G F - C X がこのように隔離される可能性を調査した。このために、F G F - C X をトランスフェクトした細胞を、1 0 0 M スラミン (s u r a m i n) (増殖因子と H S P G との間の低親和性相互作用を破壊することが公知の化合物 (L a R o c c a , R . V . , S t e i n , C . A . & M y e r s , C . E . (1 9 9 0) C a n c e r C e l l s 2 , 1 0 6 - 1 1 5)) を含む 0 . 5 m l D M E M で、3 0 分間 4 で処理することによって抽出した。次いで、スラミン抽出した馴化培地を、収集し、そして遠心分離 (5 分間 ; 2 0 0 0 x g) で清澄した。

10

【 0 2 9 6 】

次いで、馴化培地およびスラミン抽出物を等容量の 2 x ゲルローディング緩衝液と混合した。サンプルを 1 0 分間煮沸し、還元条件下、4 ~ 2 0 % 勾配ポリアクリルアミドゲル (N o v e x , D a n D i e g o , C A) 上での S D S - P A G E によって分解し、そしてニトロセルロースフィルター (N o v e x) に転写した。ウエスタン分析を、H R P 結合体化抗 V 5 抗体 (I n v i t r o g e n) および E C L 検出システム (A m e r s h a m P h a n n a c i a B i o t e c h , P i s c a t a w a y , N J) を用いて標準的な手順に従って実行した。

20

【 0 2 9 7 】

予想 M r を有する 1 つのバンドを、p F G F - C X でトランスフェクトした 2 9 3 細胞からの馴化培地中で同定した (図 1 1 A 、レーン 1) 。コントロールベクターでトランスフェクトした細胞からの馴化培地は、抗体と反応しなかった (図 1 1 A 、レーン 5) 。スラミン処理後、有意な量の F G F - C X が実際に細胞表面 / E C M から放出され得たことが見出され、このことは、H S P G がおそらくこのタンパク質の分離に役割を果たすことを示す (図 1 1 A 、レーン 2) 。これらの結果は、F G F - C X が古典的シグナルペプチド無しで分泌され得ることを示す。

30

【 0 2 9 8 】

組換え F G F - C X タンパク質は、DNA 合成および細胞増殖 (おそらく細胞表面レセプターへの F G F - C X の高い親和性結合を介して媒介され、そして H S P G との低い親和性相互作用を介して調節される効果) を刺激する。スラミン抽出データは、F G F - C X が細胞表面上および / または E C M に存在する H S P G に結合することを示唆する。

【 0 2 9 9 】

b) シグナルペプチド有りでの発現
タンパク質分泌を増強させる目的のために、F G F - C X c D N A が I g 遺伝子由来の切断可能なアミノ末端分泌シグナル配列とインフレームで融合している構築物 (p C E P 4 / S e c - F G F - C X) を作製した。生じるタンパク質もまた、p F G F - C X について上記で記載したようなカルボキシ末端 V 5 およびポリヒスチジンタグを含んだ。2 9 3 細胞へのトランスフェクション後、約 3 1 k D a の予想 M r を有するタンパク質産物を得て、そしてスラミンが有意な量の分離 F G F - C X タンパク質を放出することをまた見出した (図 1 1 A ; レーン 3 および 4) 。予想したように、p C E P 4 / S e c - F G F - C X は、p F G F - C X よりも、多くの可溶性 F G F - C X タンパク質を生成した。

40

【 0 3 0 0 】

50

293細胞についての上記の結果と類似した結果を、NIH 3T3細胞で得た(図11B)。

【0301】

(実施例8. PCRによる、FGF-CX核酸のリアルタイム定量発現分析) 種々のクローンの定量発現を、Perkin-Elmer Biosystems ABI PRISM (登録商標) 7700 Sequence Detection System で実行したリアルタイム定量PCR (TAQMAN (登録商標) 分析) によって、41個の正常サンプルおよび55個の腫瘍サンプルにおいて評価した(ほとんどの場合、図15のパネルAおよびBに示すサンプルは、表3中に同定されるサンプルである)。表3において、以下の略語を使用する:

ca. = 癌腫、

* = 転移から樹立された、

met = 転移、

s cell var = 小細胞変異体、

non-s = non-sm = 非小、

squam = 扁平上皮、

pl. eff = pl effusion = 胸水、

glio = 神経膠腫、

astro = 星状細胞腫、および

neuro = 神経芽細胞腫。

【0302】

第1に、96RNAサンプルをアクチンおよびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)に対して正規化した。RNA(合計約50ngまたは約1ngポリA+)を、TAQMAN(登録商標)逆転写酵素キット(PE Biosystems, Foster City, CA; カタログ番号N808-0234)および製造者のプロトコールに従ったランダムな6量体を使用してcDNAに変換した。反応を、20μlで実施し、そして30分間48°Cでインキュベートした。次いで、cDNA(5μl)を、製造業者のプロトコールに従って、アクチンおよびGAPDH TAQMAN(登録商標)アッセイ試薬(PE Biosystems; 各々、カタログ番号4310881Eおよび4310884E)およびTAQMAN(登録商標)ユニバーサルPCRマスターミックス(PE Biosystems; カタログ番号4304447)を使用するTAQMAN(登録商標)反応のために、別々のプレートに移した。反応を、以下のパラメータを使用して25μlで実施した: 50°Cで2分; 95°Cで10分; 95°Cで15秒/60°Cで1分(40サイクル)。結果を、logスケールを使用するCT値(所与のサンプルが、蛍光の閾値レベルを超えるサイクル)として記録し、所与のサンプルと最も低いCT値を有するサンプルとの間のRNA濃度の差は、2のCT乗として示した。次いで、相対発現パーセントを、このRNAの差の逆数をとって100を掛けることにより得る。アクチンおよびGAPDHについて得られたCTの平均値は、RNAサンプルを正規化するために使用した。最も高いCT値を生じるRNAサンプルは、さらなる希釈を必要としないが、他の全てのサンプルは、-アクチン/GAPDHの平均CT値に従ってこのサンプルと比較して希釈した。

【0303】

正規化RNA(5μl)を、cDNAに転換し、製造者の指示に従って、One Step RT-PCR Master Mix Reagents(PE Biosystems; カタログ番号4309169)および遺伝子特異的プライマーを使用するTAQMAN(登録商標)によって分析した。プローブおよびプライマーを、インプットとしてクローン10326230.0.38の配列を使用する、Perkin Elmer BiosystemのPrimer Express Softwareパッケージ(Apple ComputerのMacintosh Power PC用のバージョンI)に従って、各アッセイに対して設定した。デフォルトの設定を、反応条件に対して使用し

10

20

30

40

50

、そして以下のパラメータを、プライマーを選択する前に設計した：プライマーの濃度 = 250 nM、プライマーの融解温度 (T_m) 範囲 = 58 ~ 60、プライマーの最適 T_m = 59、プライマーの最大差 = 2、プローブは、5' G を有さず、プローブ T_m は、プライマー T_m よりも 10 高くなければならない、アンプリコンサイズ 75 bp ~ 100 bp。選択されるプローブおよびプライマー（以下を参照のこと）を、Synthegen (Houston, TX, USA) によって合成した。プローブを、未反応の色素を除去するために 2 回 HPLC 精製し、プローブのそれぞれ 5' 末端および 3' 末端へのレポーター色素およびクエンチャー色素のカップリングを実証するために、質量分析法によって評価した。順方向プライマーおよび逆方向プライマーの最終濃度は、各々 900 nM であり、そしてプローブの濃度は、200 nM であった。

10

【0304】

PCR について、各組織および各細胞株からの正規化 RNA を、96 ウェル PCR プレート (Perkin Elmer Biosystems) の各ウェルにスポットした。2 つのプローブ (FGF-CX に特異的なプローブおよび内部標準として作用するための第 2 の遺伝子特異的プローブ) を含む PCR カクテルを、5 mM $MgCl_2$ 、dNTP (1:1:1:2 の比率の dA、dG、dC、dU)、0.25 U/ml AmpliTaq GoldTM (PE Biosystems)、および 0.4 U/ μ l RNase インヒビター、および 0.25 U/ μ l 逆転写酵素と共に、1x TaqManTM PCR Master Mix を用いて、PE Biosystems 7700 に対して設定した。逆転写を、48 で 30 分間実施し、続いて、以下のように PCR 増幅した：95 10 分間、次いで、95 15 秒間、60 1 分間を 40 サイクル。

20

【0305】

(表 3. TaqMan 発現分析において使用した組織サンプル)

番号 組織サンプル

- 1 内皮細胞
- 2 内皮細胞 (処理)
- 3 膵臓
- 4 膵臓 ca. CAPAN 2
- 5 脂肪
- 6 副腎
- 7 甲状腺
- 8 唾液腺
- 9 下垂体
- 10 脳 (胎児)
- 11 脳 (全体)
- 12 脳 (小脳扁桃)
- 13 脳 (小脳)
- 14 脳 (海馬)
- 15 脳 (視床下部)
- 16 脳 (黒質)
- 17 脳 (視床)
- 18 脊髄
- 19 CNS ca. (glia/astro) U87-MG
- CNS ca. (glia/astro) U-118-
- 20 MG
- 21 CNS ca. (astro) SW1783
- CNS ca. * (neuro;met) SK-N
- 22 AS
- 23 CNS ca. (astro) SF-539
- 24 CNS ca. (astro) SNB-75

30

40

50

25	CNS	ca. (glio) SNB - 19	
26	CNS	ca. (glio) U251	
27	CNS	ca. (glio) SF - 295	
28	心臓		
29	骨格筋		
30	骨髄		
31	胸腺		
32	脾臓		
33	リンパ節		
34	結腸 (上行)		10
35	胃		
36	小腸		
37	結腸	ca. SW480	
結腸	ca. *	(SW480	
38	met)	SW620	
39	結腸	ca. HT29	
40	結腸	ca. HCT - 116	
41	結腸	ca. CaCo - 2	
42	結腸	ca. HCT - 15	
43	結腸	ca. HCC - 2998	20
胃	ca. *	(肝臓 met) NCI -	
44	N87		
45	膀胱		
46	気管		
47	腎臓		
48	腎臓 (胎児)		
49	腎臓	ca. 786 - 0	
50	腎臓	ca. A498	
51	腎臓	ca. RXF 393	
52	腎臓	ca. ACHN	30
53	腎臓	ca. UO - 31	
54	腎臓	ca. TK - 10	
55	肝臓		
56	肝臓 (胎児)		
57	肝臓	ca. (肝芽腫) Hep G2	
58	肺		
59	肺 (胎児)		
60	肺	ca. (小細胞) LX - 1	
61	肺	ca. (小細胞) NCI - H69	
62	肺	ca. (s. cell var.) SHP - 77	40
63	肺	ca. (大細胞) NCI - H460	
64	肺	ca. (non-sm. cell) A549	
65	肺	ca. (non-s. cell) NCI - H23	
66	肺	ca. (non-s. cell) HOP - 62	
67	肺	ca. (non-s. cl) NCI - H522	
68	肺	ca. (squam.) SW 900	
69	肺	ca. (squam.) NCI - H596	
70	乳腺		
71	胸部	ca. * (pl. effusion) MCF - 7	
72	胸部	ca. * (pl. ef) MDA - MB - 231	50

73	胸部	ca . * (p l . e f f u s i o n)	T 4 7 D	
74	胸部	ca . B T - 5 4 9		
75	胸部	ca . M D A - N		
76	卵巣			
77	卵巣	ca . O V C A R - 3		
78	卵巣	ca . O V C A R - 4		
79	卵巣	ca . O V C A R - 5		
80	卵巣	ca . O V C A R - 8		
81	卵巣	ca . I G R O V - 1		
82	卵巣	ca . * (腹水) S K - O V - 3		10
83	子宮筋層			
84	子宮			
85	胎盤			
86	前立腺			
87	前立腺	ca . * (骨 m e t) P C - 3		
88	精巣			
89	黒色腫	H s 6 8 8 (A) . T		
90	黒色腫*	(m e t) H s 6 8 8 (B) . T		
91	黒色腫	U A C C - 6 2		
92	黒色腫	M 1 4		20
93	黒色腫	L O X I M V I		
94	黒色腫*	(m e t) S K - M E L - 5		
95	黒色腫	S K - M E L - 2 8		
96	黒色腫	U A C C - 2 5 7		

以下のプライマーおよびプローブを設計した。各々は、F G F - C X に特異的であるように、非常に相同性であるヒト F G F - 9 遺伝子およびヒト F G F - 1 6 遺伝子の対応する領域に、最少 3 つのミスマッチを保有する。セット A g 8 1 b は、図 1 (配列番号 1) の塩基 2 7 0 ~ 塩基 3 4 3 の領域をカバーする。これらは、他の公知の F G F ファミリーのメンバーを検出すべきではない。使用したプライマーおよびプローブは以下であった。

A g 8 1 b (F) : 5 ' - G G A C C A C A G C C T C T T C G G T A - 3 ' (配列番号 1 8) ; 30
A g 8 1 b (R) : 5 ' - T G T C C A C A C C T C T A A T A C T G A C C A G - 3 ' (配列番号 1 9) ;
A g 8 1 b (P) : 5 ' - F A M - C C C A C T G C C A C A C T G A T G A A T T C C A A - T A M R A - 3 ' (配列番号 2 0) 。

【 0 3 0 6 】

代表的な実験からの結果を、図 1 5 パネル A および図 1 5 パネル B に示す。発現を、最高レベルの発現を示すサンプルのパーセンテージとしてプロットする。四連の泳動を行い、これを、種々に陰影を付けたバーで表した。試験された 3 9 個の正常ヒト組織において、F G F - C X は、脳、特に小脳において最も高度に発現されることが見出された (図 1 5 40
パネル A および図 1 5 パネル B) 。中枢神経系の他の組織は、はるかにより弱いレベルの F G F - C X を発現した。試験された 5 4 個のヒト腫瘍細胞株のうち、F G F - C X は、肺癌腫細胞株 (L X - 1) 、結腸癌腫細胞株 (S W - 4 8 0) 、結腸癌細胞株および転移 (S W 4 8 0) 、ならびに胃癌腫細胞株 (N C I - N 8 7 ; 図 1 5 パネル A および図 1 5 パネル B を参照のこと) において、最も高度に発現されることが見出された。

【 0 3 0 7 】

さらなるリアルタイム (実時間) の発現分析を、外科手術の間に得られた腫瘍組織の広範なパネルにおいて実施した。これらの組織は、それ自体実際の腫瘍由来の部分、ならびに代表的に既に炎症しており、そして形成異常の組織学的証拠を示す、「正常隣接組織 (N A T) 」と称される部分を含む。F G F - C X に特異的であるように選択されたプライマ 50

ー - プローブセット (Ag 81) を、このような外科組織サンプルと共に TaqMan 実験において使用した。ここでは、二連の泳動を実施した：

Ag 81 (F) : 5' - AGGCAGAAAGCGGGAGATAGAT - 3' (配列番号 21) ;

Ag 81 (R) : 5' - AGCAGCTTTACCTCATTCACCAATG - 3' (配列番号 22) ; および

Ag 81 (P) : TET - 5' - CCATCTACATCCACCACCCAGTTGCA
GAA - 3' - TAMRA (配列番号 23) 。

Set Ag 81 は、図 1 (配列番号 1) の塩基 477 ~ 塩基 554 の領域をカバーする。この複製物は、図 15 パネル C および 図 15 パネル D において、灰色および黒の陰影をつけたバーとして示される。この結果は、腫瘍およびその形成異常性 NAT サンプルの多くの一致した対について、FGF - CX が、腫瘍自体ではなく NAT において；より詳細には、腫瘍に隣接した実質細胞において、高度に発現されることを劇的に示す。この一致したパターンを生じる例としては、卵巣癌、膀胱癌、子宮癌、肺癌、前立腺癌、および肝臓癌が挙げられる。

10

【0308】

理論によって限定されないが、図 15 パネル C および 図 15 パネル D の結果から、FGF - CX が、宿主組織 (内皮細胞、間質線維芽細胞、浸潤リンパ球および類似の細胞型) における腫瘍上皮および / または他の成分のパラクリン刺激による腫瘍進行に寄与し得ると考えられる。同様に、FGF - CX は、オートクライン様式で FGF - CX を合成または分泌する宿主組織中の成分を刺激するように機能し得る。これらの宿主成分細胞は、引き続いて、腫瘍画分において作用し得る。

20

【0309】

一致しない正常組織と比較した、FGF - CX の発現プロファイルの上昇によって、FGF - CX が、腫瘍進行における予定的 (prospectively) または促進的な役割を果たすことが示唆される。従って、多くの標的化アプローチ (制限することのない例として、モノクローナル抗体、リボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチド、FGF - CX と同族 (cognate) レセプターとの相互作用を中和するペプチド、および FGF - CX についての未同定レセプターを調節する小分子の薬物を含む) のいずれかを使用する FGF - CX の治療的標的化は、疾患進行に対してポジティブな治療的影響を有すると予期される。同様に、腫瘍進行における FGF - CX の生物活性を調節するためのこのような薬剤の使用は、従来の化学療法および放射線療法に相乗作用を与えるか、またはそれらを増強すると予期される。FGF - CX の治療的標的化が適用され得る特定の疾患適用としては、結腸、前立腺、肺、腎臓、子宮、乳房、膀胱、卵巣の腺癌が挙げられる。

30

【0310】

(実施例 9 . 組換え FGF - CX によって取りこまれるプロモデオキシウリジンの刺激) 293 - EBNA 細胞 (Invitrogen) を、Lipofectamine 2000 を製造業者のプロトコール (Life Technologies, Gaithersburg, MD) に従って使用してトランスフェクトした。細胞に、トランスフェクションの 5 時間後、10% 胎仔ウシ血清 (FBS; Life Technologies) を補充した。BrdU および増殖アッセイ (実施例 10) のためのタンパク質を生成するために、細胞を洗浄し、そしてトランスフェクションの 18 時間後、Dulbecco 改変 Eagle 培地 (DMEM; Life Technologies) で給餌した。48 時間後、この培地を捨て、そしてこの細胞単層を、0.5 ml の DMED 中で 30 分間 4 で、100 μM スラミン (Sigma, St. Louis, MO) と共にインキュベートした。次いで、このスラミン抽出馴化培地を取り出し、遠心分離 (5 分間; 2000 × g) によって清澄化し、そしてカルボキシ末端ポリヒスチジンタグを利用して TALON 金属アフィニティークロマトグラフィーに、製造業者の指示書 (Clontech, Palo Alto, CA) に従って供した。保持された融合タンパク質を、イミダゾールでカラムを洗浄することによって放出した。

40

50

【0311】

FGF-CXタンパク質濃度を、既知の濃度のV5タグ化タンパク質を用いて作成された検量線を使用するウェスタン分析によって推定した。ウェスタン分析のために、馴化培地をトランスフェクションの48時間後に収集し、次いで、細胞単層を、4で30分間、100 μ Mスラミンを含有する0.5ml DMEMでインキュベートした。次いで、このスラミン含有馴化培地を収集した。

【0312】

コントロールタンパク質を生成するために、293-EBNA細胞に、pCEP4プラスミド(Invitrogen)をトランスフェクトし、そして上記に概要を述べた精製手順に供した。

【0313】

組換えFGF-CXを、プロモデオキシウリジン(BrdU)取り込みアッセイにおいてDNA合成を誘導するその能力について試験した。NIH 3T3細胞(ATCC番号CRL-1658, American Type Culture Collection, Manassas, VA)、CCD-1070Sk細胞(ATCC番号CRL-2091)、またはMG-63細胞(ATCC番号CRL-1427)を、96ウェルプレートにおいて、約100%コンフルエントまで培養し、DMEMで洗浄し、そして24時間(NIH 3T3)または48時間(CCD-1070SkおよびMG-63)、DMEM中で血清飢餓(serum-starved)させた。次いで、組換えFGF-CXまたはコントロールタンパク質を、細胞に18時間添加した。BrdUアッセイは、5時間のBrdU取り込み時間を使用して、製造業者の仕様書(Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN)に従って実施した。

【0314】

FGF-CXは、約5ng/mlの最大半減濃度で、NIH 3T3マウス線維芽細胞においてDNA合成を誘導することが見出された(図16A)。対照的に、コントロールベクターでトランスフェクトされた細胞から精製されたタンパク質は、DNA合成を誘導しなかった。BrdU取り込みによって測定された場合、FGF-CXが種々のヒト細胞株(CCD-1070Sk正常ヒト皮膚線維芽細胞(図16B)、CCD-1106ケラチノサイト(図16C)、MG-63骨肉腫細胞(データを示さず)および乳房上皮細胞を含む)において比較できる用量レベルで、DNA合成を誘導することもまた見出された。

【0315】

(実施例10. 組換えFGF-CXによる細胞増殖の誘導)

組換えFGF-CXが細胞増殖を誘導するか否かを決定するために、NIH 3T3細胞を約50%コンフルエンスまで6ウェルプレート中で培養し、DMEMで洗浄し、そして組換えFGF-CXまたはコントロールタンパク質を含有するDMEMで48時間給餌し、次いでカウントした。細胞をトリプシン処理し、そしてそれらをBeckman Coulter Z1シリーズ計数器(Beckman Coulter, Fullerton, CA)でカウントすることによって、細胞数を決定した。FGF-CXは、このアッセイにおいて、コントロールタンパク質と相対的に、約3倍の細胞数増加を誘導することが見出された(図17)。

【0316】

増殖における形態学的変化事象を詳述するために、NIH 3T3細胞を、DMEM/2%仔ウシ血清中で組換えFGF-CXまたはコントロールタンパク質で48時間処理し、そしてZeiss Axiovert 100顕微鏡(Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY)で写真撮影した。

【0317】

より高い細胞密度を達成することに加えて(図17)、実施例9に記載のように調製されたFGF-CXの存在下で培養されたNIH 3T3細胞は、無秩序な増殖パターンを示した。これは、接触障害の欠損を示す(図18)。さらに、個々の細胞は、細長くかつ屈曲性であることが見出された。これらの結果は、FGF-CXが、増殖因子として作用す

10

20

30

40

50

ることを示し、そして組換え FGF - CX が、NIH 3T3 細胞の形態学的トランスフォーメーションを媒介することを示唆する。

【0318】

(実施例 11 . ノードマウスにおける、異所性 FGF - CX トランスフェクト NIH 3T3 細胞による腫瘍形成)

NIH 3T3 細胞を、製造業者 (Life Technologies) のプロトコールに従って Lipofectamine Plus を用いて、pCEP4 / Sec - FGF - CX またはコントロールベクターでトランスフェクトした。細胞に、トランスフェクションの 5 時間後、10% 仔ウシ血清 (CS; Life Technologies) を補充した。pCEP4 / Sec - FGF - CX トランスフェクト細胞は、トランスフェクションの 48 時間後までに形態学的にトランスフォーメーションされ、そしてその形態学的トランスフォーメーションを、ハイグロマイシン含有増殖培地中での 2 週間の選択後に維持した。対照的に、コントロールベクターでトランスフェクトされた細胞は、その正常な形態を維持した (データは示さず)。従って、トランスフェクトされた細胞は、例えば、実施例 10 に報告された実験に基づいて予期されたように挙動する。

10

【0319】

異所性腫瘍の誘導を研究するために、NIH 3T3 細胞を、種々の実験ベクターおよびコントロールベクターでトランスフェクトした。トランスフェクションの 2 日後、細胞を、DMEM / 5% CS (pFGF - CX トランスフェクト細胞に対して) または 500 μg / ml ハイグロマイシン B を補充した DMEM / 10% CS (pCEP4 / Sec - FGF - CX トランスフェクト細胞に対して) のいずれかに配置した。2 週間の培養後、サブコンフルエントな細胞をトリプシン処理し、DMEM / 10% CS で中和し、PBS で洗浄し、そしてカウントした。PBS 中の 100 万個の細胞を、雌性無胸腺症ノードマウス (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) の側方皮下組織中に注射した。

20

【0320】

NIH 3T3 細胞に、FGF - CX 発現プラスミド (pFGF - CX および pIg - FGF - CX) またはそれらの適切なコントロールベクターでトランスフェクトした。本発明者らは、いずれかの FGF - CX 発現ベクターでトランスフェクトされた細胞が、トランスフェクションの 48 時間後までに形態学的にトランスフォーメーションされ (データは示さず)、そして組換え FGF - CX への NIH 3T3 細胞の曝露後に生じる表現型と類似の表現型を有すること (図 17) を見出した。対照的に、コントロールベクターでトランスフェクトされた細胞は、その正常な形態を維持した (データは示さず)。

30

【0321】

インビボでの FGF - CX の異所性発現が NIH 3T3 細胞の腫瘍形成性を誘導するかどうかを決定するために、安定なトランスフェクト体を作製し、そしてノードマウス中に皮下注射した。11 日目までに、pFGF - CX トランスフェクト細胞または pIg - FGF - CX トランスフェクト細胞のいずれかを注射された全ての動物は、14 日目までサイズを増大させる急速増殖性腫瘍を有していたが、コントロール細胞を注射された動物はいずれも、2 週間目までに腫瘍を発生しなかった (図 19)。これらの結果は、FGF - CX 遺伝子を保有するベクターでのトランスフェクションによって形質転換された細胞が、インビボでの腫瘍の発生および増殖を促進することを示す。

40

【0322】

(実施例 12 . 線維芽細胞増殖因子 - 20 様タンパク質をコードする核酸を同定する方法)

本発明のさらなる線維芽細胞増殖因子 - 20 様タンパク質配列 (FGF 20X) (本明細書においてクローン CG53135 - 02 と呼ぶ) を、この配列のインシリコ予想によって、cDNA フラグメントの実験的クローニングによって誘導した。この DNA 配列の全長またはこの配列の一部のいずれか、または両方をカバーする cDNA フラグメントをクローニングした。インシリコ予想は、CuraGen の自社の配列データベースにおい

50

て、または公的なヒト配列データベースにおいて利用可能な配列に基づき、そして全長DNA配列またはそのいくつかの部分のいずれかを提供された。

【0323】

実験的クローニングは、以下にまとめられる方法の1つ以上を用いて実施された：

Seq CallingTM Technology：cDNAは、複数の組織型、正常状態および疾患状態、病的状態、ならびに異なるドナーからの発生状態を示す種々のヒトサンプルに由来する。サンプルは組織全体、初代細胞または組織、培養された初代細胞または細胞株として得た。細胞および細胞株は、遺伝子発現を調節する生化学的因子または化学的因子（化合物）（例えば、増殖因子、ケモカインまたはステロイド）で処理されていてもよい。従って誘導されたcDNAを、次に、CuraGenの自社のSeq Calling技術を用いて配列決定した。配列トレースを、手動で評価し、そして必要に応じて補正のために編集した。各アセンブリについてコンセンサス配列を生成するためのバイオインフォマティクスのプログラムを用いて、時には公的なヒト配列を含む、全てのサンプル由来のcDNA配列を一緒にアセンブルした。各アセンブリは、CuraGen Corporationのデータベースに含まれる。別の成分との同一性の程度が50bpにわたって少なくとも95%であった場合、配列をアセンブリのための成分として含んだ。各アセンブリは、遺伝子またはその部分を示し、そして改変体についての情報（例えば、スプライシング形態、一ヌクレオチド多形態（SNP）、挿入、欠失、および他の配列バリエーション）を含む。

10

【0324】

エキソン連結（Linking）：CG53135-02配列についてのcDNAコードを以下のプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によってクローニングした：5'-AGGTCAACCATGGCTGTATAATTGGC-3'（配列番号24）、および5'-CTGTCTGTCTCCTCAGAAAGAAAGTTCTTGAATC-3'（配列番号25）。本発明のcDNA/タンパク質配列の全長部分またはいくつかの部分（1つ以上のエキソン）のインシリコ予測に基づいてプライマーを設計した。これらのプライマーを用いて、以下の組織由来の、発現されたヒト配列を含むプールからcDNAを増幅した：副腎、骨髄、脳-扁桃、脳-小脳、脳-海馬、脳-黒質、脳-視床、脳-全脳、胎児脳、胎児腎臓、胎児肝臓、胎児肺、心臓、腎臓、リンパ腫-ラージ、乳腺、膵臓、下垂体、胎盤、前立腺、唾液腺、骨格筋、小腸、脊髄、脾臓、胃、精巣、甲状腺、気管、および子宮。

20

30

【0325】

各アセンブリについてコンセンサス配列を生成するためのバイオインフォマティクスのプログラムを用いて、時には公的なヒト配列を含む、複数のクローンを配列決定して、これらのフラグメントを一緒にアセンブルした。各アセンブリは、CuraGen Corporationのデータベースに含まれる。別の成分との同一性の程度が50bpにわたって少なくとも95%であった場合、配列をアセンブリのための成分として含んだ。各アセンブリは、遺伝子またはその部分を示し、そして改変体についての情報（例えば、スプライシング形態、一ヌクレオチド多形態（SNP）、挿入、欠失、および他の配列バリエーション）を含む。

40

【0326】

物理的クローン：エキソン連結によって誘導されたPCR産物（オープンリーディングフレーム全体をカバーする）を、Invitrogen由来のpCR2.1ベクターにクローニングして、137627::160083874.1043010.A9を得た。

【0327】

改変体配列はまた、本出願に含まれる。改変体配列は、一ヌクレオチド多形態（SNP）を含み得る。SNPは、SNPを含有するヌクレオチド配列がcDNAに由来することを示すために、ある場合には、「cSNP」と呼ばれ得る。SNPは、いくつかの方法で生じ得る。例えば、SNPは、多様な部位における1ヌクレオチドの別のヌクレオチドでの置換に起因し得る。このような置換は、トランジションまたはトランスバージョンのいづ

50

れかであり得る。SNPはまた、基準の対立遺伝子に対する、ヌクレオチドの欠失またはヌクレオチドの挿入から生じ得る。この場合、1つの対立遺伝子が、別の対立遺伝子において特定のヌクレオチドに関してギャップを保有する部位は、多様な部位である。遺伝子内に生じるSNPは、このSNPの位置でこの遺伝子によってコードされるアミノ酸の変更を生じ得る。遺伝子内のSNPはまた、SNPを含むコドンが、この遺伝子コードの冗長性の結果として同じアミノ酸をコードする場合、サイレントであり得る。遺伝子の領域の外側に生じるSNP、または遺伝子内のイントロンに生じるSNPは、タンパク質のいずれのアミノ酸配列における変化も生じないが、発現パターンの調節の変化を生じ得る。例としては、一時的発現、生理学的反応調節、細胞型発現調節、発現の強度、および転写されたメッセージの安定性における変化が挙げられる。

10

【0328】

新規な線維芽細胞増殖因子 - 20様遺伝子のDNA配列およびタンパク質配列は、エキソン連結によって得られ、そして本明細書においてクローンCG53135-02として報告され、そして以下の表4および表5に示される。

【0329】

(表4 . 本発明の線維芽細胞増殖因子 - 20様タンパク質をコードするヌクレオチド配列 (配列番号26))

【0330】

【化2】

```
>CG53135-02
ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGGCTTCTGGGGCGGCCTGGAGGGCTTGGGCCAGCCG      60
GGGCAGCGCAGCTGGCGCACCTGCACGGCATCCTGCGCCGCCCGGCAGCTCTATTGCCGC      120
ACCGGCTTCCACCTGCAGATCCTGCCCGACGGCAGCGCGCAGGGCACCCGGCAGGACCAC      180
AGCCTCTTCGGTATCTTGGAAATTCATCAGTGTGGCAGTGGGACTGGTCAGTATTAGAGGT      240
GTGGACAGTGGTCTCTATCTTGGAAATGAATGACAAAGGAGAACTCTATGGATCAGAGAAA      300
CTTACTTCCGAATGCATCTTTAGGGAGCAGTTTGAAGAGAACTGGTATAACACCTATTCA      360
TCTAACATATATAAACATGGAGACACTGGCCGAGGTATTTTGTGGCACCTAACAAAGAC      420
GGAACTCCAAGAGATGGCGCCAGGTCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCT      480
AGACCAGTGGATCCAGAAAGAGTTCCAGAATTGTACAAGGACCTACTGATGTACACTTAG      540
```

20

(表5 . 配列番号26によってコードされるタンパク質配列 (配列番号27))

【0331】

【化3】

```
>CG53135-02
MAPLAEVGGFGLGGLGQPGAAQLAHLHGILRRRQLYCRGTFHLQILPDGSAQGTRQDH      60
SLFGILEFISVAVGLVSIKVDGSLYLGMDKGLYKSEKLTSECFREQFEENWYNTYS      120
SNLYKHGDTGRRYFVALNKDGTFRDGAARSRKRFTHFLPRPVDPERVPELYKDLLMYT      179
```

30

新規な線維芽細胞増殖因子 - 20様タンパク質をコードする540ヌクレオチドの新規な核酸(クローンCG53135-02)を、表4に示す。ヌクレオチド1~3で始まりそしてヌクレオチド538~540で終わるオープンリーディングフレームが同定された。このポリペプチドは、新規の機能的な線維芽細胞増殖因子 - 20様タンパク質を示す。オープンリーディングフレームの開始コドンおよび終止コドンを、太字で強調する。推定非翻訳領域(下線部)(存在する場合)は、開始コドンの上流および終止コドンの下流に見出される。179アミノ酸残基を有するコードされたタンパク質を、表5に一文字コードを使用して示す。

40

【0332】

(類似性)

配列データベースの検索において、例えば、本発明の核酸が、506塩基のうちHomo sapiens由来のgb:GENBANK-ID:AB044277|acc:AB044277.1 mRNA(FGF-20についてのHomo sapiens mRNA:完全なcds)に同一な495塩基(97%)を有することが見出された。本発明のタンパク質の全長アミノ酸配列は、162アミノ酸残基のうちHomo sapiens(ヒト)(線維芽細胞増殖因子-20(FGF-20))由来の211アミノ酸残基の

50

p t n r : S W I S S N E W - A C C : Q 9 N P 9 5 タンパク質に同一な160残基(98%)、そして162アミノ酸残基のうちこれに類似した160残基(98%)を有することが見出された。さらなる相同性を以下の表6に提供する。

【0333】

【表1】

表6. FGF20XについてのBLAST結果					
遺伝子指標/識別子	タンパク質/生物	長さ (nt/aa)	同一性 (%)	ポジティブ (%)	期待値
gb:GENBANK- ID:AB044277 acc:A B044277.1	Homo sapiens FGF-20について のmRNA、完全 (残基:262- 767)	1016 nt	495/506 (97%)	495/506 (97%)	1.6e- 103
ptnr:SWISSNEW- ACC:Q9NP95	線維芽細胞増殖 因子-20 (FGF-20) - Homo sapiens(残基 50-211)	211 aa	160/162 (98%)	160/162 (98%)	1.6e- 93

10

複数配列整列を表7に与え、本発明のタンパク質を、本発明のタンパク質と関連タンパク質配列とを比較するClustalW分析において第1列に示す。この配列は、20~51位に示されるように、線維芽細胞増殖因子-20のスプライス形態を示すことに注意すること。上に示される整列において、黒い輪郭のアミノ酸残基は、配列間で同様に保存された残基(すなわち、構造的または機能的な特性を保存することが必要とされ得る残基)を示す;灰色の背景を有するアミノ酸残基(タンパク質の構造または機能を変更することなく、同等の物理的および/または化学的特性を保有する)(例えば、群L、V、I、およびMは類似であると考えられ得る)は、配列間で互いに類似している;そして、白色の背景を有するアミノ酸残基は、配列間で保存されていないし類似もしていない。

20

【0334】

(表7. CG53135-02タンパク質と関連タンパク質とのClustalW整列)

【0335】

【表2】

30

- 1 CG53135-02 novel Fibroblast Growth Factor-20-like protein 179
- 2 CG53135-01 FGF-20X 211
- 3 Q9NP95 FGFK_HUMAN, FIBROBLAST GROWTH FACTOR-20 (FGF-20). 211

```
CG53135-02  MAPFLAEVGGFLGGLGGLGQ-----FGAAQLAHL
CG53135-01  MAPFLAEVGGFLGGLGGLGQQVGSHPFLPACGERPPLLGERRSAEERSARGGFGAAQLAHL
FGFK_HUMAN  MAPFLAEVGGFLGGLGGLGQQVGSHPFLPACGERPPLLGERRSAEERSARGGFGAAQLAHL
```

```
CG53135-02  HGI LRRRQLYCRTCGFHLQI LPDGS AQGTRQDHS LFG I LEF I SVAVGLVS IRGVD SGLV LG
CG53135-01  HGI LRRRQLYCRTCGFHLQI LPDGS VQGTRQDHS LFG I LEF I SVAVGLVS IRGVD SGLV LG
FGFK_HUMAN  HGI LRRRQLYCRTCGFHLQI LPDGS VQGTRQDHS LFG I LEF I SVAVGLVS IRGVD SGLV LG
```

```
CG53135-02  MNDKRGELYGSEKLTSECI FREQFEENWYNTYSSNIYKHGDTGRRYFVALNKDGTPRD GAR
CG53135-01  MNDKRGELYGSEKLTSECI FREQFEENWYNTYSSNIYKHGDTGRRYFVALNKDGTPRD GAR
FGFK_HUMAN  MNDKRGELYGSEKLTSECI FREQFEENWYNTYSSNIYKHGDTGRRYFVALNKDGTPRD GAR
```

40

```
CG53135-02  SKRHQKFTHFLPRPVDPERVPELYKDL LMYT
CG53135-01  SKRHQKFTHFLPRPVDPERVPELYKDL LMYT
FGFK_HUMAN  SKRHQKFTHFLPRPVDPERVPELYKDL LMYT
```

本明細書中に開示されたタンパク質における同定可能なドメインの存在は、Pfam、PROSITE、ProDom、BlockまたはPrintのようなドメインデータベースに対する検索によって決定され、次いでInterproドメイン登録番号によって同定される。重要なドメインを表8に要約する。

【0336】

【表3】

50

モデル	ドメイン	配列-f	配列-l	hmm-f	hmm-t	スコア	期待値
FGF	1/1	31	162 ..	1	146 []	280.8	2e-81

IPR002209; (HBGF_FGF)

ペパリン結合増殖因子IおよびII (HBGF) [1, 2] (酸性および塩基性の線維芽細胞増殖因子 (FGF) としてもまた公知である) は、広範な種々の中胚葉起源または神経外胚葉起源の細胞の増殖または分化を刺激する構造的に関連した分裂促進因子である。これらの2つのタンパク質は、インターロイキン-1タンパク質、Kunitz型ダイズトリプシンインヒビター (STI) (参照) およびヒスタクトフィリン (histactophilin) もまた含むスーパーファミリーのメンバーである増殖因子およびオンコジーンに属する。全てが非常に類似した構造を有し、HBGFおよびインターロイキン-1ファミリーは、いくらかの配列類似性 (約25% [1]) を共有するが、これらは、STIに対して全く類似性を示さない。

10

【0337】

HBGFは、細胞の分化および増殖の制御に関連する多数の異なるプロセスに関与する [1]。HBGF1およびHBGF2は、同様の効果を有する：これらは、胚発生において中胚葉の形成を誘導し、そして創傷修復、血管形成および神経増殖を媒介する；これらはまた、線維芽細胞、内皮細胞および大グリア細胞の増殖および移動を誘導する。HBGF3 (int-2) およびHBGF4 (hst/ks) は、それぞれ胃の腫瘍およびカボネジ肉腫由来の公知のオンコジーンである。HBGF5およびHBGF6はまた、オンコジーン産物である。HBGF7 (ケラチノサイト増殖因子) は、おそらく、正常な上皮細胞増殖の主要なパラクリンエフェクターである。

20

【0338】

これらの増殖因子は、細胞内シグナル伝達を生じるこれらのチロシンキナーゼレセプターの二量体化を引き起こす。現在、線維芽細胞増殖因子について4つの既知のチロシンキナーゼレセプターが存在する。これらのレセプターは各々、このファミリー [3] のいくつかの異なるメンバーに結合し得る。

【0339】

HBGF1およびHBGF2の結晶構造 [4] が解析され、これらがインターロイキン-1およびKunitz型ダイズトリプシンインヒビターの両方と同一の12鎖のシート構造を有することが示された [5]；HBGF1およびインターロイキン-1は、類似していることが見出され、そしてこれらは、類似の構造を有することが推定された [6]。

30

シートは、中央軸の周りに3つの類似の葉において配置され、6つの鎖が逆平行のバレルを形成する。HBGF1のいくつかの領域 (主に、鎖1~3および鎖8と9との間のループ) は、レセプター結合に関与する。鎖10と11との間のループは、結合ペパリンに関与すると考えられる。

【0340】

(表9: CuraGen登録番号CG53135-02についてのPSORT、SignalPおよびヒドロパシー結果)

40

【0341】

【表4】

小胞体(膜) --- 確率度 =0.8500 (肯定的)) < succ>
 原形質膜 --- 確率度 =0.7900 (肯定的)) < succ>
 微小体(ペルオキシソーム) --- 確率度 =0.7478 (肯定的)) < succ>
 ミトコンドリア内膜 --- 確率度 =0.1000 (肯定的)) < succ>

内在性可能性 = -6.42 膜貫通 62 - 78 (60 - 81)

II型(Ncyf Cexo) 膜タンパク質である方がである。

配列はシグナルペプチドであるか？

#	測定	位置	値	カットオフ	結論
	最大 C	54	0.441	0.37	はい
	最大 Y	54	0.137	0.34	いいえ
	最大 S	1	0.622	0.88	いいえ
	平均 S	1-53	0.170	0.48	いいえ

10

本発明の F G F 2 0 X タンパク質をコードする新規な F G F 2 0 X 核酸またはそのフラグメントは、診断用途においてさらに有用であり得、ここで、この核酸またはタンパク質の存在または量が評価される。これらの物質は、治療方法または診断方法における使用のための本発明の新規な物質に免疫特異的に結合する抗体の産生においてさらに有用である。これらの抗体は、以下の「抗 F G F 2 0 X 抗体」の節において記載されるように、疎水性チャートからの推定を使用して、当該分野で公知の方法に従って産生され得る。開示された F G F 2 0 X タンパク質は、複数の親水性領域を有し、その各々が免疫原として使用され得る。1つの実施形態において、意図される F G F 2 0 X エピトープは、およそアミノ酸 2 0 ~ 6 5 に由来する。別の特異的な実施形態において、F G F 2 0 X エピトープは、

20

【0342】

このことは、本発明の F G F 2 0 X 配列が、この / これらのドメインを含むことが知られている他のタンパク質の特性と類似の特性およびこれらのドメインの特性と類似の特性を有することを示す。

【0343】

(染色体情報)

本発明において開示された F G F 2 0 X 遺伝子は、染色体 8 p 2 1 . 3 - p 2 2 にマッピングされる。この割り当ては、開示された配列と配列同一性を共有する、ゲノムクローン、公の遺伝子および E S T と関連する情報、および C u r a G e n C o r p o r a t i o n ' s E l e c t r o n i c N o r t h e r n 生命情報工学ツールを使用して行なった。

30

【0344】

(組織発現)

本発明において開示される線維芽細胞増殖因子 - 2 0 様遺伝子は、少なくとも以下の組織において発現される：哺乳動物組織、結腸、肺、脳、肝臓、腎臓、および胃。発現情報は、クローン C G 5 3 1 3 5 - 0 2 の配列の誘導物に含まれる配列の組織供給源に由来する。

【0345】

【数1】

40

参考文献

1. Burgess, W.H., Maciag, T., The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58: 575-606 [MEDLINE:89372809] [PUB00000068]
2. Thomas, K.A., Transforming potential of fibroblast growth factor genes. (1988) *Trends Biochem. Sci.* 13: 327-328 [MEDLINE:89223029] [PUB00005334]
3. Heath, J.K., Jones, B.Y., Wilkie, A.O.M., Morriss-Kay, G.M., Functions of fibroblast growth factors and their receptors. (1995) *Curr. Biol.* 5: 500-507 [MEDLINE:96059371] [PUB00001036] 10
4. Matthews, B.W., Weaver, L.H., Eriksson, A.E., Cousens, L.S., Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 3441-3445 [MEDLINE:91195367] [PUB00004736]
5. Murzin, A.G., Chothia, C., Lesk, A.M., Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors, interleukins-1 beta and 1 alpha and fibroblast growth factors. (1992) *J. Mol. Biol.* 223: 531-543 [MEDLINE:92148835] [PUB00003281]
6. Gimenez-Gallego, G., Rodkey, J., Bennett, C., Rios-Candelore, M., Disalvo, J., Thomas, K., Brain-derived acidic fibroblast growth factor: complete amino acid sequence and homologies. (1985) *Science* 230: 1385-1388 [MEDLINE:86070224] [PUB00005097] 20
7. Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Macke, J.P., Nathans, J., Smallwood, P.M., Munoz-Sanjuan, I., Tong, P., Hendry, S.H., Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new members of the FGF family implicated in nervous system development. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 9850-9857 [MEDLINE:96382556] [PUB00004904]
8. Ayres, M.D., Howard, S.C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M., Possee, R.D., The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. (1994) *Virology* 202: 586-605 [MEDLINE:94303173] [PUB00005600] 30

(等価物)

本発明の特定の実施形態に関する前述の詳細な説明から、核酸、ポリペプチド、抗体を含む特定の新規の組成物ならびに方法、検出そして処置が記載されていることは明らかである。これらの特定の実施形態が、本明細書中で詳細に開示されたが、これは例示目的のためだけに例としてなされ、そして上記の添付した特許請求の範囲に関して制限することを意図されない。特に、種々の置換、変更、および改変が、特許請求の範囲によって規定される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、当業者に慣用的事象であるとして、本発明に対してなされ得ることは、本発明者らによって意図される。実際に、本明細書中に記載されるものに加えて、本発明の種々の改変は、前述の説明および添付の図面により当業者に明らかとなる。このような改変は、添付の特許請求の範囲内であることが意図される。 40

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、本発明の新規の FGF - CX ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列 (配列番号 1) および本発明の新規の FGF - CX タンパク質の翻訳されたアミノ酸配列 (配列番号 2) の説明である。

【図 2】

図 2 は、配列番号 1 の核酸配列と FGF - 9 様グリア活性因子 (GAF) 配列 (配列番号 50

5) との B L A S T N アライメントである。

【図 3】

図 3 は、配列番号 1 の核酸配列の相補鎖とヒト第 8 染色体の長いゲノムフラグメント (G e n B a n k 登録番号 A B 0 2 0 8 5 8) の 3 つの不連続なセグメント (それぞれ A ~ C における、配列番号 6 ~ 配列番号 8) の B L A S T N アライメントである。

【図 4】

図 4 は、4 つの脊椎動物 F G F 様タンパク質 (配列番号 9 ~ 12) と、本発明の F G F - C X タンパク質 (配列番号 2) との C l u s t a l W アライメントである。黒、灰、および白の表現は、それぞれ、アライメント中での、同一の残基、保存された残基、非保存残基である。

10

【図 5】

図 5 は、F G F - C X と、3 つの他の F G F ファミリーメンバーとの C l u s t a l W である。F G F - C X は、ヒト F G F - 9、ヒト F G F - 16、および X e n o p u s F G F - C X (それぞれ、登録番号は、D 1 4 8 3 8、A B 0 0 9 3 9 1 および A B 0 1 2 6 1 5 である) とアライメントされた。

【図 6】

図 6 は、F G F - C X ポリペプチド配列 (配列番号 2) とヒト F G F - 9 (配列番号 9) との B L A S T P アライメントであり、同一 (「|」) およびポジティブ (「+」) である残基を示す。

【図 7】

図 7 は、F G F - C X ポリペプチド配列 (配列番号 2) と、マウス F G F - 9 (配列番号 10) との B L A S T X アライメントであり、同一 (「|」) およびポジティブ (「+」) である残基を示す。

20

【図 8】

図 8 は、F G F - C X ポリペプチド配列 (配列番号 2) と、ラット F G F - 9 (配列番号 11) との B L A S T X アライメントであり、同一 (「|」) およびポジティブ (「+」) である残基を示す。

【図 9】

図 9 は、F G F - C X ポリペプチド配列 (配列番号 2) と、X e n o p u s X F G F - C X (配列番号 12) との B L A S T X アライメントであり、同一 (「|」) およびポジティブ (「+」) である残基を示す。

30

【図 10】

図 10 は、19 残基のウィンドウで生成された、配列番号 2 の F G F - C X ポリペプチドのハイドロパシープロット (h y d r o p a t h y) の表現である。

【図 11】

図 11 は、F G F - C X のウエスタン分析を示す。指定された構築物で、一過的にトランスフェクトされた、293 細胞 (パネル A) または N I H 3 T 3 細胞 (パネル B) からのサンプルを、抗 V 5 抗体を使用するウエスタン分析によって調べた。C M = 訓化培地、S E = スラミン抽出訓化培地。分子量マーカを、左に示す。

【図 12】

図 12 は、293 細胞によって分泌された F G F - C X タンパク質のウエスタン分析を示す。

40

【図 13】

図 13 は、F G F - C X 遺伝子の分析を表し、これは、F G F - C X のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列 (配列番号 2) を含む。この開始コドンおよび終止コドンは、太字であり、そして 5' U T R 中に存在するインフレーム (i n - f l a m e) 終止コドンが下線で示される。

【図 14】

図 14 は、E . c o l i で発現される F G F - C X (配列番号 2) タンパク質のウエスタン分析を示す。

50

【図15】

図15は、FGF-CX特異的TaqMan試薬を使用するリアルタイム定量PCRによって得られるFGF-CXの発現の分析を表す。正常なヒト組織サンプル由来の規格化されたRNAについての結果を、パネルAに示し、そして腫瘍細胞株由来の規格化されたRNAについての結果を、パネルBに示す。外科手術の間に直接的に得られた腫瘍組織を使用して得られた結果を、パネルCおよびパネルDに示す。

【図16】

図16は、組換えFGF-CXのDNA合成に与える影響によって表される、組換えFGF-CXの生物学的活性を提示する。細胞は、血清飢餓にし、指定された因子と共に18時間インキュベートし、BruU取り込みアッセイによって分析した。サンプルは、三連で実施された。パネルAは、NIH 3T3マウス線維芽細胞である。パネルBは、CCD-1070ヒト線維芽細胞である。パネルCは、CCD-1106ヒトケラチノサイトである。

10

【図17】

図17は、細胞増殖に与える組換えFGF-CXの影響によって表される、組換えFGF-CXの生物学的活性を示す。NIH 3T3細胞を、指定される因子を補充した無血清培地と共にインキュベートし、48時間後に計数した。サンプルは、二連で実施された。

【図18】

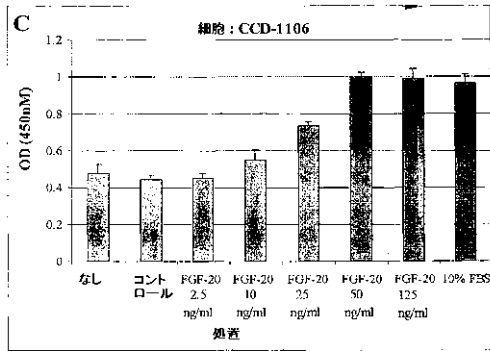
図18は、細胞形態に与える組換えFGF-CXの影響によって表される組換えFGF-CXの生物学的活性を表す。NIH 3T3細胞を、FGF-CXタンパク質またはコントロールタンパク質と共に48時間インキュベートし、そして倍率×25で写真撮影した。

20

【図19】

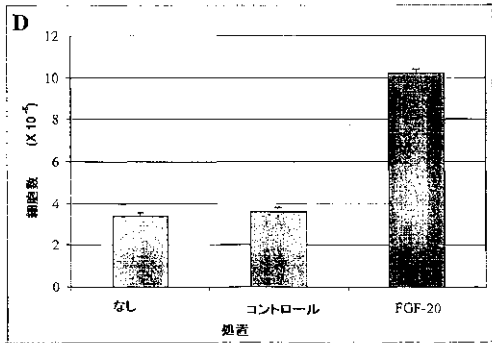
図19は、FGF-CXの腫瘍形成活性を表すグラフを表す。指定された構築物で安定にトランスフェクトされたNIH 313細胞を、胸腺欠損ヌードマウスに皮下組織に注入し、そして2週間の期間にわたって腫瘍形成について調べた。4動物の最小値を、各データポイントとして使用した。

FIGURE 16 (続き)



【 図 17 】

FIGURE 17.

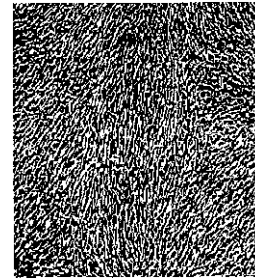


【 図 18 】

FIGURE 18. コントロール

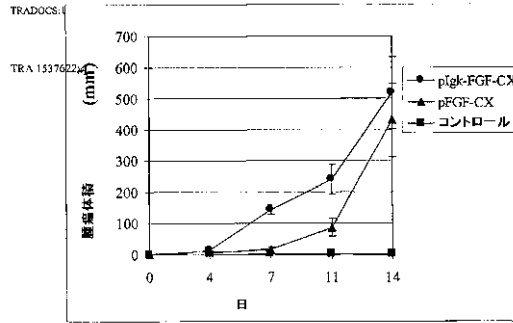


FGF-20



【 図 19 】

FIGURE 19.



【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
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/02625 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/475
- (21) International Application Number: PCT/US01/21191
- (22) International Filing Date: 3 July 2001 (03.07.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (36) Priority Data: 09/609,543 3 July 2000 (03.07.2000) US
- (63) Related to continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: US 09/609,543 (CIP) filed on 3 July 2000 (03.07.2000)
- (71) Applicant (for all designated States except US): **CORNING CORPORATION** (US/US), 355 Long Walk Drive, 11th floor, New Haven, CT 06511 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **JEFFERS, Michael** (US/US); 14 Flax Mill Hollow, Branford, CT 06405 (US); **SHIMKETS, Richard, A.** (US/US); 191 Lasee Street, West Haven, CT 06516 (US); **PRAVAGA, Sudbirdas, K.** (IN/US); 140 Mill Street, Apartment 18 136, East Haven, CT 06512 (US); **BOLDOG, Ferenc, L.** (HU/US); 1687 Hartford Turnpike, North Haven, CT 06473 (US); **YANG, Meijia** (CN/US); 6 Catbird Lane, East Lyme, CT 06333 (US); **BURGESS, Catherine** (US/US); 90 Carriage Hill Drive, Waterbury, CT 06409 (US); **FERNANDES, Edna** (US/US); 77 Florence Road #2B, Branford, CT 06405 (US); **HERMANN, John, L.** (DE/US); 78 Burnshed Lane, Guilford, CT 06437 (US); **LAROCHELLE, William, J.** (US/US); 15 Desondre Lane, Madison, CT 06443 (US); **LICHENSTEIN, Henri** (US/US); 88 Greenbrier Drive, Guilford, CT 06437 (US).
- (74) Agent: **ELRIE, Ivor, R.**; Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky and Popeo, P.C. One Financial Center, Boston, MA 02111 (US).

[Continued on next page]



WO 02/02625 A2

(54) Title: NOVEL FIBROBLAST GROWTH FACTORS AND NUCLEIC ACIDS ENCODING SAME

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200

(57) Abstract: The present invention provides novel isolated polypeptides, polynucleotides encoding them, antibodies that immunospecifically bind to them, or any derivative, variant, mutant, or fragment of the polypeptide, polynucleotide, or antibody. The invention additionally provides methods in which the polypeptide, polynucleotide and antibody are used in detection and treatment of a broad range of pathological states, as well as other uses.

WO 02/02625 A2



- (81) Designated States (*optional*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, 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, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
without international search report and to be republished upon receipt of that report.
- (84) Designated States (*optional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European
- 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.*

WO 02/02625

PCT/US01/21191

NOVEL FIBROBLAST GROWTH FACTORS AND NUCLEIC ACIDS ENCODING SAME**FIELD OF THE INVENTION**

The present invention generally relates to nucleic acids and polypeptides. The invention
5 relates more particularly to nucleic acids encoding polypeptides related to members of the
fibroblast growth factor family.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The fibroblast growth factor (FGF) group of cytokines includes at least 21 members that
regulate diverse cellular functions such as growth, survival, apoptosis, motility and
10 differentiation. These molecules transduce signals via high affinity interactions with cell surface
tyrosine kinase FGF receptors (FGFRs). These FGF receptors are expressed on most types of
cells in tissue culture. Dimerization of FGF receptor monomers upon ligand binding has been
reported to be a requisite for activation of the kinase domains, leading to receptor trans
phosphorylation. FGF receptor-1 (FGFR-1), which shows the broadest expression pattern of the
15 four FGF receptors, contains at least seven tyrosine phosphorylation sites. A number of signal
transduction molecules are affected by binding with different affinities to these phosphorylation
sites.

In addition to participating in normal growth and development, known FGFs have also
been implicated in the generation of pathological states, including cancer. FGFs may contribute
20 to malignancy by directly enhancing the growth of tumor cells. For example, autocrine growth
stimulation through the co-expression of FGF and FGFR in the same cell has been reported to
lead to cellular transformation.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is based, in part, upon the discovery of nucleic acids encoding
25 novel polypeptides having homology to members of the Fibroblast Growth Factor (FGF) family
of proteins. Included in the invention are polynucleotide sequences, which are named Fibroblast
Growth Factor-CX (FGF-CX), and the FGF-CX polypeptides encoded by these nucleic acid
sequences, and fragments, homologs, analogs, and derivatives thereof, are claimed in the
30 invention. An example of an FGF-CX nucleic acid is SEQ ID NO:1, and an example of an FGF-

WO 02/02625

PCT/US01/21191

CX polypeptide is a polypeptide including the amino acid sequence of SEQ ID NO:2. This amino acid sequence is encoded by the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1.

In one aspect, the invention includes an isolated FGF-CX polypeptide. In some embodiments, the isolated polypeptide includes the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27. In other embodiments, the invention includes a variant of SEQ ID NO:2, in which some amino acids residues, e.g., no more than 1%, 2%, 3%, 5%, 10% or 15% of the amino acid sequences of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27 are changed. In some embodiments, the isolated FGF-CX polypeptide includes the amino acid sequence of a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27, or a variant of a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27. Preferably, no more than 1%, 2%, 3%, 5%, 10% or 15% of the amino acid sequences of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27 are changed in the variant of the mature form of the amino acid sequence.

Also included in the invention is a fragment of an FGF-CX polypeptide, including fragments of variant FGF-CX polypeptides, mature FGF-CX polypeptides and variants of mature FGF-CX polypeptides, as well as FGF-CX polypeptides encoded by allelic variants and single nucleotide polymorphisms of FGF-CX nucleic acids.

In another aspect, the invention includes an isolated FGF-CX nucleic acid molecule. The FGF-CX nucleic acid molecule can include a sequence encoding any of the FGF-CX polypeptides, variants, or fragments disclosed above, or a complement to any such nucleic acid sequence. In one embodiment, the sequences include those disclosed in SEQ ID NO:1. In other embodiments, the sequences include those disclosed in or SEQ ID NO:26. In still other embodiments, the FGF-CX nucleic acids include a sequence wherein nucleotides different from those given in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26 may be incorporated. Preferably, no more than 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, or 20% of the nucleotides are so changed. In other embodiments, the invention includes fragments or complements of these nucleic acid sequences. Vectors and cells incorporating FGF-CX nucleic are also included in the invention.

The invention also includes antibodies that bind immunospecifically to any of the FGF-CX polypeptides described herein. The FGF-CX antibodies in various embodiments include, e.g., polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, humanized antibodies and/or human antibodies.

The invention additionally provides pharmaceutical compositions that include a FGF-CX polypeptide, a FGF-CX nucleic acid or an FGF-CX antibody of the invention. Also included in

WO 02/02625

PCT/US01/21191

the invention are kits that include, *e.g.*, a FGF-CX polypeptide, a FGF-CX nucleic acid or a FGF-CX antibody.

Several methods are included in the invention. For example, a method is disclosed for determining the presence or amount of a FGF-CX polypeptide of the invention in a sample. The method includes contacting the sample with a FGF-CX antibody that binds immunospecifically to the polypeptide; and determining the presence or amount of antibody bound to said polypeptide, such that the antibody indicates the presence or amount of polypeptide in the sample.

Similarly, the invention discloses a method for determining the presence or amount of a FGF-CX nucleic acid molecule in a sample. The method includes contacting the sample with a probe that binds to the nucleic acid molecule; and determining the presence or amount of the probe bound to the nucleic acid molecule, such that the probe indicates the presence or amount of the FGF-CX nucleic acid molecule in the sample.

Also provided by the invention is a method for identifying an agent that binds to a FGF-CX polypeptide. The method includes determining whether a candidate substance binds to a FGF-CX polypeptide. Binding of a candidate substance indicates the agent is an FGF-CX polypeptide binding agent.

The invention also includes a method for identifying a potential therapeutic agent for use in treatment of a pathology. The pathology is, *e.g.*, related to aberrant expression, aberrant processing, or aberrant physiological interactions of a FGF-CX polypeptide of the invention. This method includes providing a cell which expresses the FGF-CX polypeptide and has a property or function ascribable to the polypeptide; contacting the provided cell with a composition comprising a candidate substance; and determining whether the substance alters the property or function ascribable to the polypeptide, in comparison to a control cell. Any such substance is identified as a potential therapeutic agent. Furthermore, therapeutic agents may be identified by subjecting any potential therapeutic agent identified in this way to additional tests to identify a therapeutic agent for use in treating the pathology.

In some embodiments, the property or function relates to cell growth or cell proliferation, and the substance binds to the polypeptide, thereby modulating an activity of the polypeptide. In some embodiments, the candidate substance has a molecular weight not more than about 1500 Da. In some embodiments, the candidate substance is an antibody. The invention additionally provides any therapeutic agent identified using a method such as those described herein.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

Additional important aspects of the invention relate to methods of treating or preventing a disorder associated with a FGF-CX polypeptide. The disorder may be characterized by insufficient or ineffective growth of a cell or a tissue, or by hyperplasia or neoplasia of a cell or a tissue. The method includes administering to a subject a FGF-CX polypeptide of the invention, 5 or a FGF-CX nucleic acid of the invention, or any other Therapeutic of the invention, in an amount and for a duration sufficient to treat or prevent the disorder in said subject. In significant embodiments, the subject is a human.

The invention also includes a method for screening for a modulator of latency or predisposition to a disorder associated with aberrant expression, aberrant processing, or aberrant 10 physiological interactions of a FGF-CX polypeptide. The method includes providing a test animal that recombinantly expresses the FGF-CX polypeptide of the invention and is at increased risk for the disorder; administering a test compound to the test animal; measuring an activity of the polypeptide in the test animal after administering the compound; and comparing the activity of the FGF-CX polypeptide in the test animal with the activity of the FGF-CX 15 polypeptide in a control animal not administered the compound. If there is a change in the activity of the polypeptide in the test animal relative to the control animal, the test compound is a modulator of latency of or predisposition to the disorder.

The invention also provides a method for determining the presence of or predisposition to a disease associated with altered levels of a FGF-CX polypeptide or of a FGF-CX nucleic acid 20 of the invention in a first mammalian subject. The method includes measuring the level of expression of the polypeptide or the amount of the nucleic acid in a sample from the first mammalian subject; and comparing its amount in the sample to its amount present in a control sample from a second mammalian subject known not to have, or not to be predisposed to, the disease. An alteration in the expression level of the polypeptide or the amount of the nucleic 25 acid in the first subject as compared to the control sample indicates the presence of or predisposition to the disease.

Also provided by the invention is a method of treating a pathological state in a mammal, wherein the pathology is related to aberrant expression, aberrant processing, or aberrant 30 physiological interactions of a FGF-CX polypeptide of the invention. The method includes administering to the mammal a polypeptide of the invention in an amount that is sufficient to alleviate the pathological state, wherein the FGF-CX polypeptide is a polypeptide having an amino acid sequence at least 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, or even 99% identical to a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27, or a

WO 02/02625

PCT/US01/21191

biologically active fragment thereof. In another related method, an antibody of the invention is administered to the mammal.

In another aspect, the invention, the invention includes a method of promoting growth of cells in a subject. The method includes administering to the subject a FGF-CX polypeptide of
5 the invention in an amount and for a duration that are effective to promote cell growth. In some embodiments, the subject is a human, and the cells whose growth is to be promoted may be chosen from among cells in the vicinity of a wound, cells in the vascular system, cells involved in hematopoiesis, cells involved in erythropoiesis, cells in the lining of the gastrointestinal tract, and cells in hair follicles.

10 In a further aspect, the invention provides a method of inhibiting growth of cells in a subject, wherein the growth is related to expression of a FGF-CX polypeptide of the invention. This method includes administering to the subject a composition that inhibits growth of the cells. In a highly important embodiment, the composition includes an antibody or another therapeutic agent of the invention. Significantly, the subject is a human, and the cells whose growth is to be
15 inhibited are chosen from among transformed cells, hyperplastic cells, tumor cells, and neoplastic cells.

In a still further aspect, the invention provides method of treating or preventing or delaying a tissue proliferation-associated disorder. The method includes administering to a subject in which such treatment or prevention or delay is desired a FGF-CX nucleic acid, a FGF-
20 CX polypeptide, or a FGF-CX antibody in an amount sufficient to treat, prevent, or delay a tissue proliferation-associated disorder in the subject.

The tissue proliferation-associated disorders diagnosed, treated, prevented or delayed using the FGF-CX nucleic acid molecules, polypeptides or antibodies can involve epithelial cells, e.g., fibroblasts and keratinocytes in the anterior eye after surgery. Other tissue
25 proliferation-associated disorder include, e.g., tumors, restenosis, psoriasis, Dupuytren's contracture, diabetic complications, Kaposi sarcoma, and rheumatoid arthritis.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be
30 used in the practice or testing of the present invention, suitable methods and materials are described below. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In the case of conflict, the present

WO 02/02625

PCT/US01/21191

specification, including definitions, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description and claims.

5 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- Figure 1 is a representation of the nucleotide sequence (SEQ ID NO:1) and translated amino acid sequence (SEQ ID NO:2) of a novel FGF-CX polynucleotide and protein of the invention.
- Figure 2 is a BLASTN alignment of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1 with a FGF-9-like Gli3-Activating factor (GAF) sequence (SEQ ID NO:5).
- 10 Figure 3 is a BLASTN alignment of the complementary strand of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1 with three discontinuous segments (SEQ ID NOs:6-8 in panels A-C, respectively) of an extended genomic fragment of human chromosome 8 (GenBank Accession Number AB020858).
- 15 Figure 4 is a ClustalW alignment of four vertebrate FGF-like proteins (SEQ ID NO:9-12) with the FGF-CX protein (SEQ ID NO:2) of the present invention. Black, gray and white represent identical, conserved and nonconserved residues in the alignment, respectively.
- Figure 5 is a ClustalW alignment of FGF-CX with three other FGF family members. FGF-CX was aligned with human FGF-9, human FGF-16 and *Xenopus* FGF-CX (Accession Numbers D14838, AB009391 and AB012615, respectively).
- 20 Figure 6 is a BLASTP alignment of the FGF-CX polypeptide sequence (SEQ ID NO:2) with a human FGF-9 (SEQ ID NO:9) indicating identical ("I") and positive ("+") residues.
- 25 Figure 7 is a BLASTX alignment of the FGF-CX polypeptide sequence (SEQ ID NO:2) with murine FGF-9 (SEQ ID NO:10) indicating identical ("I") and positive ("+") residues.
- Figure 8 is a BLASTX alignment of the FGF-CX polypeptide sequence (SEQ ID NO:2) with rat FGF-9 (SEQ ID NO:11) indicating identical ("I") and positive ("+") residues.
- 30 Figure 9 is a BLASTX alignment of the FGF-CX polypeptide sequence (SEQ ID NO:2) with *Xenopus* XFGF-CX (SEQ ID NO:12) indicating identical ("I") and positive ("+") residues.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

- Figure 10 is a representation of a hydropathy plot of the FGF-CX polypeptide of SEQ ID NO:2, generated with a nineteen residue window.
- Figure 11 shows a Western analysis of FGF-CX. Samples from 293 cells (Panel A) or NIH 3T3 cells (Panel B) transiently transfected with the indicated construct were examined by Western analysis using anti-V5 antibody. CM=conditioned media, SE=suramin-extracted conditioned media. Molecular mass markers are indicated on the left.
- Figure 12 shows a Western analysis of FGF-CX protein secreted by 293 cells.
- Figure 13 presents an analysis of the FGF-CX gene, including the nucleotide and deduced amino acid sequence of FGF-CX (SEQ ID NO:2). The initiation and stop codons are in bold, and an in frame stop codon residing in the 5' UTR is underlined.
- Figure 14 shows a Western analysis of FGF-CX (SEQ ID NO:2) protein expressed in *E. coli* cells.
- Figure 15 presents an analysis of the expression of FGF-CX obtained by real-time quantitative PCR using FGF-CX-specific TaqMan reagents. Results for normalized RNA derived from normal human tissue samples are shown in Panel A, and from tumor cell lines in Panel B. Results obtained using tumor tissues obtained directly during surgery are shown in Panels C and D.
- Figure 16 displays the biological activity of recombinant FGF-CX as represented by its effects on DNA synthesis. Cells were serum-starved, incubated with the indicated factor for 18 hr, and analyzed by a BrdU incorporation assay. Samples were performed in triplicate. Panel A, NIH 3T3 mouse fibroblasts. Panel B, CCD-1070 human fibroblasts. Panel C, CCD-1106 human keratinocytes.
- Figure 17 displays the biological activity of recombinant FGF-CX as represented by its effects on cell growth. NIH 3T3 cells were incubated with serum-free media supplemented with the indicated factor and counted after 48 hr. Samples were performed in duplicate.
- Figure 18 presents the biological activity of recombinant FGF-CX as represented by its effects on cell morphology. NIH 3T3 cells were incubated with FGF-CX or control protein for 48 hr and photographed at a magnification of X 25.
- Figure 19 presents a graph representing the tumorigenic activity of FGF-CX. NIH 3T3 cells stably transfected with the indicated constructs were injected into the subcutis of

WO 02/02625

PCT/US01/21191

athymic nude mice and examined for tumor formation over a two week period. A minimum of 4 animals was used for each data point.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

This invention is based in part on the discovery of novel FGF-CX nucleic acid
5 sequences, which encode polypeptides that are members of the fibroblast growth factor (FGF)
family. As used herein the designation "FGF-CX" relates to nucleic acids, polynucleotides,
proteins, polypeptides, and variants, derivatives and fragments of any of them, as well as to
antibodies that bind immunospecifically to any of these classes of compounds.

Previously described members of the FGF family regulate diverse cellular functions such
10 as growth, survival, apoptosis, motility and differentiation (Szebenyi, G. & Fallon, J. F. (1999)
Int. Rev. Cytol. 185, 45-106). These molecules transduce signals intracellularly via high affinity
interactions with cell surface tyrosine kinase FGF receptors (FGFRs), four of which have been
identified to date (Xu, X., Weinstein, M., Li, C. & Deng, C. (1999) *Cell Tissue Res.* 296, 33-43;
Klint, P. & Claesson-Welsh, L. (1999) *Front. Biosci.* 4, 165-177). These FGF receptors are
15 expressed on most types of cells in tissue culture. Dimerization of FGF receptor monomers
upon ligand binding has been reported to be a requisite for activation of the kinase domains,
leading to receptor trans phosphorylation. FGF receptor-1 (FGFR-1), which shows the broadest
expression pattern of the four FGF receptors, contains at least seven tyrosine phosphorylation
sites. A number of signal transduction molecules are affected by binding with different affinities
20 to these phosphorylation sites.

FGFs also bind, albeit with low affinity, to heparin sulfate proteoglycans (HSPGs)
present on most cell surfaces and extracellular matrices (ECM). Interactions between FGFs and
HSPGs serve to stabilize FGF/FGFR interactions, and to sequester FGFs and protect them from
degradation (Szebenyi, G. & Fallon, J. F. (1999)). Due to its growth-promoting capabilities, one
25 member of the FGF family, FGF-7, is currently in clinical trials for the treatment of
chemotherapy-induced mucositis (Danilenko, D. M. (1999) *Toxicol. Pathol.* 27, 64-71).

In addition to participating in normal growth and development, known FGFs have also
been implicated in the generation of pathological states, including cancer (Basilico, C &
Moscattelli, D. (1992) *Adv. Cancer Res.* 59, 115-165). FGFs may contribute to malignancy by
30 directly enhancing the growth of tumor cells. For example, autocrine growth stimulation
through the co-expression of FGF and FGFR in the same cell leads to cellular transformation
(Matsumoto-Yoshitomi, S., Habashita, J., Nomura, C., Kuroshima, K. & Kurokawa, T. (1997)

WO 02/02625

PCT/US01/21191

- Int. J. Cancer* 71, 442-450). Likewise, the constitutive activation of FGFR via mutation or rearrangement leads to uncontrolled proliferation (Lorcuzi, M., Horii, Y., Yamataka, R., Sakaguchi, K. & Miki, T. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8956-8961; Li, Y., Mangasarian, K., Mansukhani, A. & Basilico, C. (1997) *Oncogene* 14, 1397-1406).
- 5 Furthermore, some FGFs are angiogenic (Gerwins, P., Skoldenberg, E. & Claesson-Welsh, L. (2000) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 34, 185-194). Such FGFs may contribute to the tumorigenic process by facilitating the development of the blood supply needed to sustain tumor growth. Not surprisingly, at least one FGF is currently under investigation as a potential target for cancer therapy (Gasparini, G. (1999) *Drugs* 58, 17-38).
- 10 Expression of FGFs and their receptors in the brains of perinatal and adult mice has been examined. Messenger RNA all FGF genes, with the exception of FGF-4, is detected in these tissues. FGF-3, FGF-6, FGF-7 and FGF-8 genes demonstrate higher expression in the late embryonic stages than in postnatal stages, suggesting that these members are involved in the late stages of brain development. In contrast, expression of FGF-1 and FGF-5 increased after birth.
- 15 In particular, FGF-6 expression in perinatal mice has been reported to be restricted to the central nervous system and skeletal muscles, with intense signals in the developing cerebrum in embryos but in cerebellum in 5-day-old neonates. FGF-receptor (FGFR)-4, a cognate receptor for FGF-6, demonstrate similar spatiotemporal expression, suggesting that FGF-6 and FGFR-4 plays significant roles in the maturation of nervous system as a ligand-receptor system.
- 20 According to Ozawa et al., these results strongly suggest that the various FGFs and their receptors are involved in the regulation of a variety of developmental processes of brain, such as proliferation and migration of neuronal progenitor cells, neuronal and glial differentiation, neurite extensions, and synapse formation.
- Glia-activating factor (GAF), another FGF family member, is a heparin-binding growth factor that was purified from the culture supernatant of a human glioma cell line. See, Miyamoto et al., 1993, *Mol Cell Biol* 13(7): 4251-4259. GAF shows a spectrum of activity slightly different from those of other known growth factors, and is designated as FGF-9. The human FGF-9 cDNA encodes a polypeptide of 208 amino acids. Sequence similarity to other members of the FGF family was estimated to be around 30%. Two cysteine residues and other consensus sequences found in other family members were also well conserved in the FGF-9 sequence. FGF-9 was found to have no typical signal sequence in its N terminus like those in acidic FGF and basic FGF.
- 25
30

WO 02/02625

PCT/US01/21191

Acidic FGF and basic FGF are known not to be secreted from cells in a conventional manner. However, FGF-9 was found to be secreted efficiently from cDNA-transfected COS cells despite its lack of a typical signal sequence. It could be detected exclusively in the culture medium of cells. The secreted protein lacked no amino acid residues at the N terminus with
5 respect to those predicted by the cDNA sequence, except the initiation methionine. The rat FGF-9 cDNA was also cloned, and the structural analysis indicated that the FGF-9 gene is highly conserved.

The present invention provides a novel human FGF as well as its corresponding cDNA. The protein product of this gene has been shown to exhibit growth stimulatory and oncogenic
10 properties. Furthermore, overexpression of the FGF mRNA was noted in certain specific cancer cell lines. These observations suggest that the novel FGF may be of use by serving as an excellent target in the treatment of human malignancy.

The invention also includes mature FGF-CX polypeptides, variants of mature FGF-CX polypeptides, fragments of mature and mature variant FGF-CX polypeptides, and nucleic acids
15 encoding these polypeptides and fragments. As used herein, a "mature" form of a FGF-CX polypeptide or protein disclosed in the present invention is the product of a naturally occurring polypeptide or precursor form or proprotein. The naturally occurring polypeptide, precursor or proprotein includes, by way of nonlimiting example, the full length gene product, encoded by the corresponding gene. In some embodiments, the mature form include an FGF-CX
20 polypeptide, precursor or proprotein encoded by an open reading frame described herein. The product "mature" form can arise, e.g., as a result of one or more naturally occurring processing steps as they may take place within the cell, or host cell, in which the gene product arises.

Examples of such processing steps leading to a "mature" form of a polypeptide or protein include the cleavage of the N-terminal methionine residue encoded by the initiation codon of an
25 open reading frame, or the proteolytic cleavage of a signal peptide or leader sequence. Thus a mature form arising from an FGF-CX precursor polypeptide or protein that has residues 1 to N, where residue 1 is the N-terminal methionine, would have residues 2 through N remaining after removal of the N-terminal methionine. Alternatively, a mature form arising from a precursor polypeptide or protein having residues 1 to N, in which an N-terminal signal sequence from
30 residue 1 to residue M is cleaved, would have the residues from residue M+1 to residue N remaining. Additionally, a "mature" protein or fragment may arise from a cleavage event other than removal of an initiating methionine or removal of a signal peptide. Further as used herein, a "mature" form of an FGF-CX polypeptide or protein may arise from a step of post-

WO 02/02625

PCT/US01/21191

translational modification other than a proteolytic cleavage event. Such additional processes include, by way of non-limiting example, glycosylation, myristoylation or phosphorylation. In general, a mature polypeptide or protein may result from the operation of only one of these processes, or a combination of any of them.

5 As used herein, "identical" residues correspond to those residues in a comparison between two sequences where the equivalent nucleotide base or amino acid residue in an alignment of two sequences is the same residue. Residues are alternatively described as "similar" or "positive" when the comparisons between two sequences in an alignment show that residues in an equivalent position in a comparison are either the same amino acid or a conserved
10 amino acid as defined below.

Included within the invention are FGF-CX nucleic acids, isolated nucleic acids that encode FGF-CX polypeptide or a portion thereof, FGF-CX polypeptides, vectors containing these nucleic acids, host cells transformed with the FGF-CX nucleic acids, anti-FGF-CX antibodies, and pharmaceutical compositions. Also disclosed are methods of making FGF-CX
15 polypeptides, as well as methods of screening, diagnosing, treating conditions using these compounds, and methods of screening compounds that modulate FGF-CX polypeptide activity. Table 1 below delineates the sequence descriptors that are used throughout the invention.

20

TABLE 1

SEQ ID NO	SEQUENCE DESCRIPTOR
1	Human FGF-CX nucleotide sequence
2	Human FGF-CX polypeptide sequence
3	FGF-CX Forward primer
4	FGF-CX Reverse primer
5	Glia Activating Factor (GAF)
6	Human genomic fragment - bp 15927-16214
7	Human genomic fragment - bp 7257-7511
8	Human genomic fragment - bp 9837-9942
9	Human FGF-9
10	Mouse FGF-9
11	Rat FGF-9
12	Xenopus FGF-CX
13	Human FGF-CX hydrophobic domain (aa 90-115)
14	PSec-V5-His Forward
15	PSec-V5-His Reverse
16	PSETA linker
17	PSETA linker

WO 02/02625

PCT/US01/21191

18	TaqMan expression analysis forward primer
19	TaqMan expression analysis reverse primer
20	TaqMan expression analysis probe
21	TaqMan expression analysis forward primer
22	TaqMan expression analysis reverse primer
23	TaqMan expression analysis probe
24	PCR Oligonucleotide
25	PCR Oligonucleotide
26	Fibroblast Growth Factor-20-like polynucleotide sequence
27	Fibroblast Growth Factor-20-like polypeptide sequence

The FGF-CX nucleic acids and polypeptides, as well as FGF-CX antibodies, therapeutic agents and pharmaceutical compositions discussed herein, are useful, *inter alia*, in treating tissue proliferation-associated disorders. These tissue proliferation-associated disorders can include disorders affecting epithelial cells, *e.g.*, fibroblasts and keratinocytes in the anterior eye after surgery. Other tissue proliferation-associated disorders include, *e.g.*, tumors, restenosis, psoriasis, Dupuytren's contracture, diabetic complications, Kaposi sarcoma, and rheumatoid arthritis.

Included in the invention are nucleotide sequences (SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:26) encoding novel fibroblast growth factors designated fibroblast growth factor-20X (FGF-CX). FIG. 1 depicts the FGF-CX described by SEQ ID NO:1. This coding sequence was identified in human genomic DNA sequences. The disclosed DNA sequence has 633 bases that encode a polypeptide predicted to have 211 amino acid residues (SEQ ID NO:2). The predicted molecular weight of FGF-CX, based on the sequence shown in Fig. 1 and SEQ ID NO:2, is 23498.4 Da.

The FGF-CX nucleic acid sequence was used as a query nucleotide sequence in a BLASTN search to identify related nucleic acid sequences. The FGF-CX nucleotide sequence has a high similarity to murine fibroblast growth factor 9 (FGF-9) (392 of 543 bases identical, or 72%; GenBank Accession Number S82023) and to human DNA encoding glia activating factor (GAF) (385 of 554 bases identical, or 69%; GenBank Accession Number E05822, also termed FGF-9). In addition, FGF-CX was found to have a comparable degree of identity (311 of 424 bases identical, or 73%) to a GAF sequence (SEQ ID NO:5) disclosed by Naruo *et al.* in Japanese Patent: JP 1993301893 entitled "Glia-Activating Factor And Its Production" (see Fig. 2).

To verify that the open reading frame (ORF) identified by genomic mining was correct, PCR amplification was used to obtain a cDNA corresponding to the predicted genomic clone.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

The nucleotide sequence of the obtained product precisely matches that of the predicted gene (see Example 1).

The protein encoded by the cDNA is most closely related to *Xenopus* FGF-20X (designated XF₁GF-CX or XF₁GF-20X herein), as well as to human FGF-9 and human FGF-16 (80%, 70% and 64% amino acid identity, respectively; see Figs. 4 and 5). Based on the strong homology with XF₁GF-CX, the gene identified in the present disclosure is believed to represent its human ortholog, and is named FGF-CX herein.

A BLASTP alignment of the first 208 amino acids of the FGF-CX polypeptide sequence (SEQ ID NO:2) with a human FGF-9 (SEQ ID NO:9) is shown in Fig. 6. See, SWISSPROT Accession Number P31371 for Glia-Activating Factor Precursor (GAF) (Fibroblast Growth Factor-9); Miyamoto *et al.* 1993 *Mol. Cell. Biol.* 13:4251-4259; and Naruo *et al.* 1993 *J. Biol. Chem.* 268:2857-2864. BLASTX alignments of the first 208 amino acids of the FGF-CX polypeptide (SEQ ID NO:2, translated from SEQ ID NO:1) with the mouse FGF-9 (SEQ ID NO:10) and rat FGF-9 (SEQ ID NO:11) sequences are shown in Figs. 7 and 8, respectively. See, SWISSPROT Accession Number P54130 for Glia-Activating Factor Precursor (GAF) (Fibroblast Growth Factor-9), Santos-Ocampo *et al.*, 1996 *J. Biol. Chem.* 271:1726-1731, for mouse FGF-9; and SWISSPROT Accession Number P36364 Glia-Activating Factor Precursor (GAF) (Fibroblast Growth Factor-9) (FGF-9), Miyamoto, 1993 *Mol. Cell. Biol.* 13:4251-4259, for rat FGF-9. As indicated by the bars ("") in Figs. 5-7, FGF-9 sequences of all three species have 147 of 208 residues identical with FGF-CX (SEQ ID NO:2), for an overall sequence identity of 70%. In addition, 170 of 208 residues are positive to the sequence of FGF-CX (SEQ ID NO:2), for an overall percentage of positive residues of 81%. Positive residues include those residues that are either identical ("") or have a conservative amino acid substitution ("+" in the same relative position of the compared sequences when aligned, see below.

The full length FGF-CX polypeptide (SEQ ID NO:2) was also aligned by BLASTX with *Xenopus* XF₁GF-CX (SEQ ID NO:12). As shown in Fig. 9, FGF-CX has 170 of 211 (80%) identical residues, and 189 of 211 (89%) positive residues compared with *Xenopus* XF₁GF-CX. *Xenopus* XF₁GF-CX was obtained recently from a cDNA library prepared at the tailbud stage using the product of degenerate PCR performed with primers based on mammalian FGF-9s as a probe. See, Koga *et al.*, 1999 *Biochem Biophys Res Commun* 261(3):756-765. The deduced 208 amino acid sequence of the XF₁GF-CX open reading frame contains a motif characteristic of the FGF family. XF₁GF-CX has a 73.1% overall similarity to XF₁GF-9 but differs from XF₁GF-9 in its amino-terminal region (33.3% similarity). This resembles the similarity seen for the presently

WO 02/02625

PCT/US01/21191

disclosed SEQ ID NO:2 with respect to various mammalian FGF-9 and FGF-16 sequences, including human (see above). See, Figs. 4, 5 and 7-9.

The polypeptide sequence in Fig. 1 (SEQ ID NO:2) is predicted by the program PSORT to have high probabilities for sorting through the membrane of the endoplasmic reticulum and of the microbody (peroxisome). In addition, although it does not have a predicted cleavable signal sequence at its N-terminus, the hydropathy plot in Fig. 10 shows that FGF-CX has a prominent hydrophobic segment at amino acid positions about 90 to about 115 (SEQ ID NO:13). This single hydrophobic region is known to be a sorting signal in other members of the FGF family. Accordingly, a polypeptide that includes the amino acids of SEQ ID NO:13 is useful as a sorting signal, allowing secretion through various cellular membranes, such as the endoplasmic reticulum, the Golgi membrane or the plasma membrane.

FGF-CX lacks a classical amino-terminal signal sequence as predicted by PSORT (Nakai, K. & Kanohisa, M. (1992) *Genomics* 14, 897-911) and SIGNALP (Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. & von Heijne, G. (1997) *Protein Eng.* 10, 1-6) computer algorithms, just as found for some of its closest human family members (e.g. FGF-9 and FGF-16). Nonetheless, both FGF-9 and FGF-16 are secreted (Matsumoto-Yoshitomi, S., Habashita, J., Nomura, C., Kuroshima, K. & Kurokawa, T. (1997) *Int. J. Cancer* 71, 442-450; Miyake, A., Konishi, M., Martin, F. H., Hernday, N. A., Ozaki, K., Yamamoto, S., Mikami, T., Arakawa, T. & Itoh, N. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 243, 148-152; Miyakawa, K., Hatsuzawa, K., Kurokawa, T., Asada, M., Kuroiwa, T. & Inamura, T. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 29352-29357; Revest, J.-M., DeMoerlooze, L. & Dickson, C. (2000) *J Biol. Chem.* 275, 8083-8090). To determine whether FGF-CX is also secreted, the cDNA encoding the full length FGF-CX protein was subcloned into a mammalian expression vector designated pFGF-CX. The protein expressed when human embryonic kidney 293 cells are transfected with this vector is found in the conditioned medium, and exhibits a band detected by an antibody to a C-terminal V5 epitope, with an apparent molecular weight in a Western blot of ~27 kDa (Fig. 11, Example 7). An additional portion of the expressed protein is released from sequestration on the 293 cells by treatment with a substance that inhibits interaction with heparin sulfate proteoglycan (HSPG). The protein released in this way also exhibits a similar Western blot pattern (Fig. 11). Similarly when the protein is expressed in HEK293 cells from a recombinant plasmid incorporating an Ig Kappa signal sequence, a band is detected by Western blot with an apparent molecular weight of approximately 34 kDa (Fig. 12, Example 5).

WO 02/02625

PCT/US01/21191

ClustalW multiple protein alignments (Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680) for several vertebrate FGF-like proteins, including the FGF-CX described by SEQ ID NO:2, are shown in Figs. 4 and 5. The three mammalian proteins (SEQ ID NOs:9-11) resemble each other very closely but differ considerably from the FGF-CX protein of the present invention (SEQ ID NO:2). Also, the *Xenopus* XFGF-CX (SEQ ID NO:12) and the sequence of SEQ ID NO:2 resemble each other more closely than those of FGF-9. The internal hydrophobic domain involved in FGF-9 secretion (Miyakawa, K., Hatsuzawa, K., Kurokawa, T., Asada, M., Kuroiwa, T. & Inamura, T. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 29352-29357) spans residues 95-120 of the FGF-9 sequence. (See Fig. 10 for a hydropathy plot of the FGF-CX described by SEQ ID NO:2)

The expression of XFGF-20 and of *Xenopus* FGF-9 are distinct from each other. XFGF-20 mRNA is expressed in diploid cells, in embryos at and after the blastula stage, and specifically in the stomach and testis of adults; whereas XFGF-9 mRNA is expressed maternally in eggs and in many adult tissues. Koga *et al.*, above. Correct expression of XFGF-20 during gastrulation appears to be required for the formation of normal head structures in *Xenopus laevis*. When XFGF-20 mRNA was overexpressed in early embryos, gastrulation was abnormal and development of anterior structures was suppressed. See, Koga *et al.*, above. In such embryos, expression of the *Xbra* transcript, among those tested, was suppressed during gastrulation, indicating that expression of the *Xbra* gene mediates XFGF-CX effects. See, Koga *et al.*, above.

The expression patterns of the related XFGF-9 polypeptide in proliferating tissues, (including, *e.g.*, ova, testis, stomach, and multiple tissues in the maternal frog), suggests a role for XFGF-20 in the maintenance of tissues that normally undergo regeneration in a functioning organism.

It is shown in Example 8 that FGF-CX mRNA is expressed in normal cerebellum, as well as in several human tumor cell lines including carcinomas of the lung, stomach and colon but not in the corresponding normal tissues. The lack of FGF-CX expression in normal lung, stomach and colon, and its presence in tumor lines from these tissues, indicates that these cancer cell lines apparently overexpress FGF-CX in an inappropriate fashion. The chromosomal region to which FGF-CX maps is commonly altered in colorectal, lung and gastric carcinomas (Emi, M., Fujiwara, Y., Nakajima, T., Tsuchiya, E., Tsuda, H., Hirohashi, S., Maeda, Y., Tsuruta, K., Miyaki, M. & Nakamura, Y. (1992) *Cancer Res.* 52, 5368-5372; Baiffa, R., Santoro, R., Bullrich, F., Mandes, B., Ishii, H. & Croce, C. M. (2000) *Clin. Cancer Res.* 6, 1372-1377). It is possible

WO 02/02625

PCT/US01/21191

that the establishment of an FGF-CX-driven autocrine growth loop in these cells contributes to their initial tumorigenic conversion and/or to their subsequent expansion. This scenario is supported by the finding that the generation of an FGF-CX-driven autocrine loop in NIH 3T3 cells activates their tumorigenic potential (see Example 11). It is also possible that FGF-CX secretion by tumor cells stimulates their in vivo growth via paracrine effects on stromal cells.

Expression of heterologous FGF-CX in NIH 3T3 cells is found to induce their transformation and tumorigenicity (see Example 11). These effects are mediated by both native FGF-CX (construct pFGF-CX) and FGF-CX expressed with a heterologous Igk signal sequence at its amino-terminus (construct pIgk-FGF-CX). However, it should be noted that pIgk-FGF-CX is more oncogenically active than pFGF-CX, as evidenced by its greater in vitro transforming ability (data not shown) and in vivo tumorigenicity (Fig. 19). The superior oncogenicity of pIgk-FGF-CX relative to pFGF-CX is likely due to the fact that pIgk-FGF-CX produces significantly more secreted FGF-CX protein than does pFGF-CX in NIH 3T3 cells (Fig. 11B).

Like FGF-CX, other FGFs have been shown to transform cells following ectopic expression, and in some cases the blockade of FGF signaling has been shown to suppress cell transformation (Matsumoto-Yoshitomi, S., Habashita, J., Nomura, C., Kuroshima, K. & Kurokawa, T. (1997) *Int. J. Cancer* 71, 442-450; Li, Y., Basilico, C. & Mansukhani, A. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 7660-7669).

Based on the properties of FGF-CX described herein, as well as on the similarities with the effects found for related FGF proteins, it is believed that FGF-CX plays an important role in human malignancy. For these reasons, the FGF-CX polypeptides, nucleic acids and antibodies disclosed herein are useful in methods of diagnosing the presence or amounts of these compositions, in screening for and identifying therapeutic agents related to FGF-CX-associated pathologies, and in methods of treatment of various kinds of malignancy.

FGF20X Clone, Functional Variants and Homologs

The novel nucleic acid of the invention encoding a Fibroblast Growth Factor-20-like protein includes the nucleic acid whose sequence described by SEQ ID NO:1 or described by SEQ ID NO:26, or a fragment thereof. The invention also includes a mutant or variant nucleic acid any of whose bases may be changed from the corresponding base shown in Tables 4 and 5 while still encoding a protein that maintains its Fibroblast Growth Factor-20-like activities and physiological functions, or a fragment of such a nucleic acid. The invention further includes

WO 02/02625

PCT/US01/21191

nucleic acids whose sequences are complementary to the sequence of CuraGen Acc. No. CG53135-02 and CG53135-01, including nucleic acid fragments that are complementary to any of the nucleic acids just described. The invention additionally includes nucleic acids or nucleic acid fragments, or complements thereto, whose structures include chemical modifications. Such modifications include, by way of non-limiting example, modified bases, and nucleic acids whose sugar phosphate backbones are modified or derivatized. These modifications are carried out at least in part to enhance the chemical stability of the modified nucleic acid, such that they may be used, for example, as antisense binding nucleic acids in therapeutic applications in a subject. In the mutant or variant nucleic acids, and their complements, up to about 3% of the bases may be so changed.

The novel protein of the invention includes the Fibroblast Growth Factor-20-like proteins whose sequences are described by SEQ ID NO:2 and SEQ ID NO:27. The invention also includes a mutant or variant protein any of whose residues may be changed from the corresponding residue shown in these sequences while still encoding a protein that maintains its Fibroblast Growth Factor-20-like activities and physiological functions, or a functional fragment thereof. In the mutant or variant protein, up to about 2% of the amino acid residues may be so changed.

Chimeric and Fusion Proteins

The present invention includes chimeric or fusion proteins of the Fibroblast Growth Factor-20-like protein, in which the Fibroblast Growth Factor-20-like protein of the present invention is joined to a second polypeptide or protein that is not substantially homologous to the present novel protein. The second polypeptide can be fused to either the amino-terminus or carboxyl-terminus of the present CG53135-02 or CG53135-01 polypeptide. In certain embodiments a third nonhomologous polypeptide or protein may also be fused to the novel Fibroblast Growth Factor-20-like protein such that the second nonhomologous polypeptide or protein is joined at the amino terminus, and the third nonhomologous polypeptide or protein is joined at the carboxyl terminus, of the CG53135-02 or CG53135-01 polypeptide. Examples of nonhomologous sequences that may be incorporated as either a second or third polypeptide or protein include glutathione S-transferase, a heterologous signal sequence fused at the amino terminus of the Fibroblast Growth Factor-20-like protein, an immunoglobulin sequence or domain, a serum protein or domain thereof (such as a serum albumin), an antigenic epitope, and a specificity motif such as (Lis).

WO 02/02625

PCT/US01/21191

The invention further includes nucleic acids encoding any of the chimeric or fusion proteins described in the preceding paragraph.

Antibiotics

The invention further encompasses antibodies and antibody fragments, such as Fab, (Fab)₂ or single chain FV constructs, that bind immunospecifically to any of the proteins of the invention. Also encompassed within the invention are peptides and polypeptides comprising sequences having high binding affinity for any of the proteins of the invention, including such peptides and polypeptides that are fused to any carrier particle (or biologically expressed on the surface of a carrier) such as a bacteriophage particle.

10 Uses of the Compositions of the Invention

The protein similarity information, expression pattern, cellular localization, and map location for the protein and nucleic acid disclosed herein suggest that this Fibroblast Growth Factor-20-like protein may have important structural and/or physiological functions characteristic of the Fibroblast Growth Factor family. Therefore, the nucleic acids and proteins of the invention are useful in potential diagnostic and therapeutic applications and as a research tool. These include serving as a specific or selective nucleic acid or protein diagnostic and/or prognostic marker, wherein the presence or amount of the nucleic acid or the protein are to be assessed. These also include potential therapeutic applications such as the following: (i) a protein therapeutic, (ii) a small molecule drug target, (iii) an antibody target (therapeutic, diagnostic, drug targeting/cytotoxic antibody), (iv) a nucleic acid useful in gene therapy (gene delivery/gene ablation), (v) an agent promoting tissue regeneration *in vitro* and *in vivo*, and (vi) a biological defense weapon.

The nucleic acids and proteins of the invention have applications in the diagnosis and/or treatment of various diseases and disorders. For example, the compositions of the present invention will have efficacy for the treatment of patients suffering from: Hirschsprung's disease, Crohn's Disease, appendicitis, inflammatory bowel disease, diverticular disease, systemic lupus erythematosus, autoimmune disease, asthma, emphysema, scleroderma, allergy, ARDS, Von Hippel-Lindau (VHL) syndrome, cirrhosis, transplantation, hypercalcemia, ulcers, cardiomyopathy, atherosclerosis, hypertension, congenital heart defects, aortic stenosis, atrial septal defect (ASD), atrioventricular (A-V) canal defect, ductus arteriosus, pulmonary stenosis, subaortic stenosis, ventricular septal defect (VSD), valve diseases, tuberous sclerosis, scleroderma, obesity, diabetes, autoimmune disease, renal artery stenosis, interstitial nephritis,

WO 02/02625

PCT/US01/21191

glomerulonephritis, polycystic kidney disease, systemic lupus erythematosus, renal tubular acidosis, IgA nephropathy, hypercalcaemia, Alzheimer's disease, stroke, tuberous sclerosis, hypercalcaemia, Parkinson's disease, Huntington's disease, cerebral palsy, epilepsy, Lesch-Nyhan syndrome, multiple sclerosis, ataxia-telangiectasia, leukodystrophics, behavioral disorders, 5 addiction, anxiety, pain, neurodegeneration as well as other diseases, disorders and conditions.

These materials are further useful in the generation of antibodies that bind immunospecifically to the novel substances of the invention for use in diagnostic and/or therapeutic methods.

10 FGF-CX Nucleic Acids

The nucleic acids of the invention include those that encode a FGF-CX or FGF-CX-like protein. Among these nucleic acids is the nucleic acid whose sequence is provided in FIG. 1, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:26, or a fragment thereof. The FGF-CX nucleic acid can have the nucleotide sequence of a genomic FGF-CX nucleic acid, or of a cDNA. Additionally, the 15 invention includes mutant or variant nucleic acids of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26, or a fragment thereof, any of whose bases may be changed from the corresponding base shown in these sequences while still encoding a protein that maintains its FGF-CX-like activities and physiological functions. The invention further includes the complement of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26, including fragments, derivatives, analogs and 20 homolog thereof. Examples of the complementary strand of portions of FGF-CX are shown in FIG. 3. The invention additionally includes nucleic acids or nucleic acid fragments, or complements thereto, whose structures include chemical modifications.

One aspect of the invention pertains to isolated nucleic acid molecules that encode FGF-CX proteins or biologically active portions thereof. Also included are nucleic acid fragments 25 sufficient for use as hybridization probes to identify FGF-CX-encoding nucleic acids (e.g., FGF-CX mRNA) and fragments for use as polymerase chain reaction (PCR) primers for the amplification or mutation of FGF-CX nucleic acid molecules. As used herein, the term "nucleic acid molecule" is intended to include DNA molecules (e.g., cDNA or genomic DNA), RNA molecules (e.g., mRNA), analogs of the DNA or RNA generated using nucleotide analogs, and 30 derivatives, fragments and homologs thereof. The nucleic acid molecule can be single-stranded or double-stranded, but preferably is double-stranded DNA.

"Probes" refer to nucleic acid sequences of variable length, preferably between at least about 10 nucleotides (nt), 100 nt, or as many as about, e.g., 6,000 nt, depending on use. Probes

WO 02/02625

PCT/US01/21191

are used in the detection of identical, similar, or complementary nucleic acid sequences. Longer length probes are usually obtained from a natural or recombinant source, are highly specific and much slower to hybridize than oligomers. Probes may be single- or double-stranded and designed to have specificity in PCR, membrane-based hybridization technologies, or ELISA-like technologies.

5 An "isolated" nucleic acid molecule is one that is separated from other nucleic acid molecules that are present in the natural source of the nucleic acid. Examples of isolated nucleic acid molecules include, but are not limited to, recombinant DNA molecules contained in a vector, recombinant DNA molecules maintained in a heterologous host cell, partially or substantially purified nucleic acid molecules, and synthetic DNA or RNA molecules.

10 Preferably, an "isolated" nucleic acid is free of sequences which naturally flank the nucleic acid (i.e., sequences located at the 5' and 3' ends of the nucleic acid) in the genomic DNA of the organism from which the nucleic acid is derived. For example, in various embodiments, the isolated FGF-CX nucleic acid molecule can contain less than about 50 kb, 25 kb, 5 kb, 4 kb, 3

15 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb or 0.1 kb of nucleotide sequences which naturally flank the nucleic acid molecule in genomic DNA of the cell from which the nucleic acid is derived. Moreover, an "isolated" nucleic acid molecule, such as a cDNA molecule, can be substantially free of other cellular material or culture medium when produced by recombinant techniques, or of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized.

20 A nucleic acid molecule of the present invention, e.g., a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:26, or a complement of any of these nucleotide sequence, can be isolated using standard molecular biology techniques and the sequence information provided herein. Using all or a portion of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26 as a hybridization probe, FGF-CX nucleic acid sequences can

25 be isolated using standard hybridization and cloning techniques (e.g., as described in Sambrook et al., eds., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989; and Ausubel, et al., eds., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY, 1993.)

A nucleic acid of the invention can be amplified using cDNA, mRNA or alternatively,

30 genomic DNA, as a template and appropriate oligonucleotide primers according to standard PCR amplification techniques. The nucleic acid so amplified can be cloned into an appropriate vector and characterized by DNA sequence analysis. Furthermore, oligonucleotides corresponding to

WO 02/02625

PCT/US01/21191

FGF-CX nucleotide sequences can be prepared by standard synthetic techniques, e.g., using an automated DNA synthesizer.

As used herein, the term "oligonucleotide" refers to a series of linked nucleotide residues, which oligonucleotide has a sufficient number of nucleotide bases to be used in a PCR reaction. A short oligonucleotide sequence may be based on, or designed from, a genomic or cDNA sequence and is used to amplify, confirm, or reveal the presence of an identical, similar or complementary DNA or RNA in a particular cell or tissue. Oligonucleotides comprise portions of a nucleic acid sequence having about 10 nt, 50 nt, or 100 nt in length, preferably about 15 nt to 30 nt in length. In one embodiment, an oligonucleotide comprising a nucleic acid molecule less than 100 nt in length would further comprise at least 6 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26, or a complement thereof. Oligonucleotides may be chemically synthesized and may be used as probes.

In another embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention comprises a nucleic acid molecule that is a complement of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26. In another embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention comprises a nucleic acid molecule that is a complement of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26, or a portion of this nucleotide sequence. A nucleic acid molecule that is complementary to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26 is one that is sufficiently complementary to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26 that it can hydrogen bond with little or no mismatches to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26, thereby forming a stable duplex.

As used herein, the term "complementary" refers to Watson-Crick or Hoogsteen base pairing between nucleotides units of a nucleic acid molecule, and the term "binding" means the physical or chemical interaction between two polypeptides or compounds or associated polypeptides or compounds or combinations thereof. Binding includes ionic, non-ionic, van der Waals, hydrophobic interactions, etc. A physical interaction can be either direct or indirect. Indirect interactions may be through or due to the effects of another polypeptide or compound. Direct binding refers to interactions that do not take place through, or due to, the effect of another polypeptide or compound, but instead are without other substantial chemical intermediates.

Moreover, the nucleic acid molecule of the invention can comprise only a portion of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26, e.g., a fragment that can be used as a probe or primer, or a fragment encoding a biologically active portion of FGF-CX. Fragments

WO 02/02625

PCT/US01/21191

provided herein are defined as sequences of at least 6 (contiguous) nucleic acids or at least 4 (contiguous) amino acids, a length sufficient to allow for specific hybridization in the case of nucleic acids or for specific recognition of an epitope in the case of amino acids, respectively, and are at most some portion less than a full length sequence. Fragments may be derived from any contiguous portion of a nucleic acid or amino acid sequence of choice. Derivatives are nucleic acid sequences or amino acid sequences formed from the native compounds either directly or by modification or partial substitution. Analogs are nucleic acid sequences or amino acid sequences that have a structure similar to, but not identical to, the native compound but differs from it in respect to certain components or side chains. Analogs may be synthetic or from a different evolutionary origin and may have a similar or opposite metabolic activity compared to wild type.

Derivatives and analogs may be full length or other than full length, if the derivative or analog contains a modified nucleic acid or amino acid, as described below. Derivatives or analogs of the nucleic acids or proteins of the invention include, but are not limited to, molecules comprising regions that are substantially homologous to the nucleic acids or proteins of the invention, in various embodiments, by at least about 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, or even 99% identity (with a preferred identity of 80-99%) over a nucleic acid or amino acid sequence of identical size or when compared to an aligned sequence in which the alignment is done by a computer homology program known in the art, or whose encoding nucleic acid is capable of hybridizing to the complement of a sequence encoding the aforementioned proteins under stringent, moderately stringent, or low stringent conditions. See e.g. Ausubel, et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, NY, 1993, and below. An exemplary program is the Gap program (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI) using the default settings, which uses the algorithm of Smith and Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2: 482-489, which is incorporated herein by reference in its entirety).

A "homologous nucleic acid sequence" or "homologous amino acid sequence," or variations thereof, refer to sequences characterized by a homology at the nucleotide level or amino acid level as discussed above. Homologous nucleotide sequences encode those sequences coding for isoforms of EGF-CX polypeptide. Isoforms can be expressed in different tissues of the same organism as a result of, for example, alternative splicing of RNA. Alternatively, isoforms can be encoded by different genes. In the present invention, homologous nucleotide sequences include nucleotide sequences encoding for a EGF-CX polypeptide of species other

WO 02/02625

PCT/US01/21191

than humans, including, but not limited to, mammals, and thus can include, e.g., mouse, rat, rabbit, dog, cat, cow, horse, and other organisms. Homologous nucleotide sequences also include, but are not limited to, naturally occurring allelic variations and mutations of the nucleotide sequences set forth herein. A homologous nucleotide sequence does not, however, include the nucleotide sequence encoding human FGF-CX protein. Homologous nucleic acid sequences include those nucleic acid sequences that encode conservative amino acid substitutions (see below) in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27, as well as a polypeptide having FGF-CX activity. Biological activities of the FGF-CX proteins are described below. A homologous amino acid sequence does not encode the amino acid sequence of a human FGF-CX polypeptide.

The nucleotide sequence determined from the cloning of the human FGF-CX gene allows for the generation of probes and primers designed for use in identifying and/or cloning FGF-CX homologues in other cell types, e.g., from other tissues, as well as FGF-CX homologues from other mammals. The probe/primer typically comprises a substantially purified oligonucleotide. The oligonucleotide typically comprises a region of nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions to at least about 12, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 or 400 or more consecutive sense strand nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26; or an anti-sense strand nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26; or of a naturally occurring mutant of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26.

Probes based on the human FGF-CX nucleotide sequence can be used to detect transcripts or genomic sequences encoding the same or homologous proteins. In various embodiments, the probe further comprises a label group attached thereto, e.g., the label group can be a radioisotope, a fluorescent compound, an enzyme, or an enzyme co-factor. Such probes can be used as a part of a diagnostic test kit for identifying cells or tissue which misexpress a FGF-CX protein, such as by measuring a level of a FGF-CX-encoding nucleic acid in a sample of cells from a subject e.g., detecting FGF-CX mRNA levels or determining whether a genomic FGF-CX gene has been mutated or deleted.

"A polypeptide having a biologically active portion of FGF-CX" refers to polypeptides exhibiting activity similar, but not necessarily identical to, an activity of a polypeptide of the present invention, including mature forms, as measured in a particular biological assay, with or without dose dependency. A nucleic acid fragment encoding a "biologically active portion of FGF-CX" can be prepared by isolating a portion of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26, that encodes a polypeptide having a FGF-CX biological activity (biological activities of the FGF-CX

WO 02/02625

PCT/US01/21191

proteins are described below), expressing the encoded portion of FGF-CX protein (e.g., by recombinant expression *in vitro*) and assessing the activity of the encoded portion of FGF-CX. For example, a nucleic acid fragment encoding a biologically active portion of FGF-CX can optionally include an ATP-binding domain. In another embodiment, a nucleic acid fragment
5 encoding a biologically active portion of FGF-CX includes one or more regions.

FGF-CX variants

The invention further encompasses nucleic acid molecules that differ from the nucleotide sequences shown in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26 due to degeneracy of the genetic code. These nucleic acids thus encode the same FGF-CX protein as that encoded by the nucleotide
10 sequence shown in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26. In another embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention has a nucleotide sequence encoding a protein having an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27.

In addition to the human FGF-CX nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:26, it will be appreciated by those skilled in the art that DNA sequence polymorphisms
15 that lead to changes in the amino acid sequences of FGF-CX may exist within a population (e.g., the human population). Such genetic polymorphism in the FGF-CX gene may exist among individuals within a population due to natural allelic variation. As used herein, the terms "gene" and "recombinant gene" refer to nucleic acid molecules comprising an open reading frame encoding a FGF-CX protein, preferably a mammalian FGF-CX protein. Such natural allelic
20 variations can typically result in 1-5% variance in the nucleotide sequence of the FGF-CX gene. Any and all such nucleotide variations and resulting amino acid polymorphisms in FGF-CX that are the result of natural allelic variation and that do not alter the functional activity of FGF-CX are intended to be within the scope of the invention.

Moreover, nucleic acid molecules encoding FGF-CX proteins from other species, and
25 thus that have a nucleotide sequence that differs from the human sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26, are intended to be within the scope of the invention. Nucleic acid molecules corresponding to natural allelic variants and homologues of the FGF-CX cDNAs of the invention can be isolated based on their homology to the human FGF-CX nucleic acids disclosed
herein using the human cDNAs, or a portion thereof, as a hybridization probe according to
30 standard hybridization techniques under stringent hybridization conditions. For example, a soluble human FGF-CX cDNA can be isolated based on its homology to human membrane-bound FGF-CX. Likewise, a membrane-bound human FGF-CX cDNA can be isolated based on its homology to soluble human FGF-CX.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

Accordingly, in another embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention is at least 6 nucleotides in length and hybridizes under stringent conditions to the nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26. In another embodiment, the nucleic acid is at least 10, 25, 50, 100, 250, 500 or 750 nucleotides in length.

- 5 In another embodiment, an isolated nucleic acid molecule of the invention hybridizes to the coding region. As used herein, the term "hybridizes under stringent conditions" is intended to describe conditions for hybridization and washing under which nucleotide sequences at least 60% homologous to each other typically remain hybridized to each other.

- Homologs (i.e., nucleic acids encoding FGF-CX proteins derived from species other than human) or other related sequences (e.g., paralogs) can be obtained by low, moderate or high stringency hybridization with all or a portion of the particular human sequence as a probe using methods well known in the art for nucleic acid hybridization and cloning.

- As used herein, the phrase "stringent hybridization conditions" refers to conditions under which a probe, primer or oligonucleotide will hybridize to its target sequence, but to no other sequences. Stringent conditions are sequence-dependent and will be different in different circumstances. Longer sequences hybridize specifically at higher temperatures than shorter sequences. Generally, stringent conditions are selected to be about 5 °C lower than the thermal melting point (T_m) for the specific sequence at a defined ionic strength and pH. The T_m is the temperature (under defined ionic strength, pH and nucleic acid concentration) at which 50% of the probes complementary to the target sequence hybridize to the target sequence at equilibrium. Since the target sequences are generally present at excess, at T_m, 50% of the probes are occupied at equilibrium. Typically, stringent conditions will be those in which the salt concentration is less than about 1.0 M sodium ion, typically about 0.01 to 1.0 M sodium ion (or other salts) at pH 7.0 to 8.3 and the temperature is at least about 30 °C for short probes, primers or oligonucleotides (e.g., 10 nt to 50 nt) and at least about 60 °C for longer probes, primers and oligonucleotides. Stringent conditions may also be achieved with the addition of destabilizing agents, such as formamide.

- Stringent conditions such as described above are known to those skilled in the art and can be found in CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Preferably, the conditions are such that sequences at least about 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98%, or 99% homologous to each other typically remain hybridized to each other. A non-limiting example of stringent hybridization conditions is hybridization in a high salt buffer comprising 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02%

WO 02/02625

PCT/US01/21191

Ficoll, 0.02% BSA, and 500 mg/ml denatured salmon sperm DNA at 65 °C. This hybridization is followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.01% BSA at 50 °C. An isolated nucleic acid molecule of the invention that hybridizes under stringent conditions to the sequence of SEQ ID NO:1 corresponds to a naturally occurring nucleic acid molecule. As used herein, a

5 "naturally-occurring" nucleic acid molecule refers to an RNA or DNA molecule having a nucleotide sequence that occurs in nature (e.g., encodes a natural protein).

Homologs (*i.e.*, nucleic acids encoding FGF-CX proteins derived from species other than human) or other related sequences (*e.g.*, paralogs) can be obtained by low, moderate or high stringency hybridization with all or a portion of the particular human sequence as a probe using
10 methods well known in the art for nucleic acid hybridization and cloning.

In a second embodiment, a nucleic acid sequence that is hybridizable to the nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26, or fragments, analogs or derivatives thereof, under conditions of moderate stringency is provided. A non-limiting example of moderate stringency hybridization conditions are hybridization in 6X
15 SSC, 5X Denhardt's solution, 0.5% SDS and 100 mg/ml denatured salmon sperm DNA at 55 °C, followed by one or more washes in 1X SSC, 0.1% SDS at 37 °C. Other conditions of moderate stringency that may be used are well known in the art. See, *e.g.*, Ausubel et al. (eds.), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY, and Kriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY.

In a third embodiment, a nucleic acid that is hybridizable to the nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26, or fragments, analogs or derivatives thereof, under conditions of low stringency, is provided. A non-limiting example of low stringency hybridization conditions are hybridization in 35% formamide, 5X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.2% BSA, 100 mg/ml
20 denatured salmon sperm DNA, 10% (w/vol) dextran sulfate at 40 °C, followed by one or more washes in 2X SSC, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA, and 0.1% SDS at 50 °C. Other conditions of low stringency that may be used are well known in the art (*e.g.*, as employed for cross-species hybridizations). See, *e.g.*, Ausubel et al. (eds.), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY, and Kriegler, 1990, GENE TRANSFER AND
25 EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY; Shilo and Weinberg, 1981, Proc Natl Acad Sci USA 78: 6789-6792.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

Conservative mutations

In addition to naturally-occurring allelic variants of the FGF-CX sequence that may exist in the population, the skilled artisan will further appreciate that changes can be introduced by mutation into the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26, thereby leading to
5 changes in the amino acid sequence of the encoded FGF-CX protein, without altering the functional ability of the FGF-CX protein. For example, nucleotide substitutions leading to amino acid substitutions at "non-essential" amino acid residues can be made in the sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26. A "non-essential" amino acid residue is a residue that can be altered from the wild-type sequence of FGF-CX without altering the biological activity, whereas
10 an "essential" amino acid residue is required for biological activity. For example, amino acid residues that are conserved among the FGF-CX proteins of the present invention, are predicted to be particularly unamenable to alteration.

In addition, amino acid residues that are conserved among FGF family members, as indicated by the alignment presented as FIG. 4, are predicted to be less amenable to alteration.
15 For example, FGF-CX proteins of the present invention can contain at least one domain that is a typically conserved region in FGF family members, *i.e.*, bFGF-9 and XFGF-CX proteins, and FGF-CX homologs. As such, these conserved domains are not likely to be amenable to mutation. Other amino acid residues, however, (e.g., those that are not conserved or only semi-conserved among members of the FGF proteins) may not be as essential for activity and thus are more
20 likely to be amenable to alteration.

Another aspect of the invention pertains to nucleic acid molecules encoding FGF-CX proteins that contain changes in amino acid residues that are not essential for activity. Such FGF-CX proteins differ in amino acid sequence from SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27, yet retain biological activity. In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule comprises a
25 nucleotide sequence encoding a protein, wherein the protein comprises an amino acid sequence at least about 75% homologous to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27. Preferably, the protein encoded by the nucleic acid is at least about 80% homologous to SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27, more preferably at least about 90%, 95%, 98%, and most preferably at least about 99% homologous to SEQ ID NO:2.

30 An isolated nucleic acid molecule encoding a FGF-CX protein homologous to the protein of SEQ ID NO:2 can be created by introducing one or more nucleotide substitutions, additions or deletions into the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26, such that one or more amino acid substitutions, additions or deletions are introduced into the encoded protein.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

Mutations can be introduced into SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26 by standard techniques, such as site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Preferably, conservative amino acid substitutions are made at one or more predicted non-essential amino acid residues. A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue

5 is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. Certain amino acids have side chains with more than one classifiable characteristic. These families include amino acids with basic side chains (e.g., lysine, arginine, histidine), acidic side chains (e.g., aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine,

10 tyrosine, tryptophan, cysteine), nonpolar side chains (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tyrosine, tryptophan), beta-branched side chains (e.g., threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Thus, a predicted nonessential amino acid residue in a growth factor is replaced with another amino acid residue from the same side chain family. Alternatively, in another

15 embodiment, mutations can be introduced randomly along all or part of a growth factor coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for growth factor biological activity to identify mutants that retain activity. Following mutagenesis of SEQ ID NOS:1, 3, and 26 the encoded protein can be expressed by any recombinant technology known in the art and the activity of the protein can be determined.

20 In an important embodiment, a mutant FGF-CX protein can be assayed for (1) the ability to form protein:protein interactions with other FGF-CX proteins, other cell-surface proteins, or biologically active portions thereof; (2) complex formation between a mutant FGF-CX protein and a FGF-CX receptor; (3) the ability of a mutant FGF-CX protein to bind to an intracellular target protein or biologically active portion thereof; (e.g., avidin proteins); or (4) the ability to

25 specifically bind an anti-FGF-CX protein antibody.

Antisense

Another aspect of the invention pertains to isolated antisense nucleic acid molecules that are hybridizable to or complementary to the nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26, or fragments, analogs or derivatives thereof. An

30 "antisense" nucleic acid comprises a nucleotide sequence that is complementary to a "sense" nucleic acid encoding a protein, e.g., complementary to the coding strand of a double-stranded cDNA molecule or complementary to an mRNA sequence. In specific aspects, antisense nucleic acid molecules are provided that comprise a sequence complementary to at least about 10, 25,

WO 02/02625

PCT/US01/21191

50, 100, 250 or 500 nucleotides or an entire FGF-CX coding strand, or to only a portion thereof. Nucleic acid molecules encoding fragments, homologs, derivatives and analogs of a FGF-CX protein of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27 or antisense nucleic acids complementary to a FGF-CX nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26 are additionally provided.

5 In one embodiment, an antisense nucleic acid molecule is antisense to a "coding region" of the coding strand of a nucleotide sequence encoding FGF-CX. The term "coding region" refers to the region of the nucleotide sequence comprising codons which are translated into amino acid residues (e.g., the protein coding region of human FGF-CX corresponds to SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27). In another embodiment, the antisense nucleic acid molecule is
10 antisense to a "noncoding region" of the coding strand of a nucleotide sequence encoding FGF-CX. The term "noncoding region" refers to 5' and 3' sequences which flank the coding region that are not translated into amino acids (i.e., also referred to as 5' and 3' untranslated regions).

Given the coding strand sequences encoding FGF-CX disclosed herein (e.g., SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26), antisense nucleic acids of the invention can be designed according to
15 the rules of Watson and Crick or Hoogsteen base pairing. The antisense nucleic acid molecule can be complementary to the entire coding region of FGF-CX mRNA, but more preferably is an oligonucleotide that is antisense to only a portion of the coding or noncoding region of FGF-CX mRNA. For example, the antisense oligonucleotide can be complementary to the region surrounding the translation start site of FGF-CX mRNA. An antisense oligonucleotide can be,
20 for example, about 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 or 50 nucleotides in length. An antisense nucleic acid of the invention can be constructed using chemical synthesis or enzymatic ligation reactions using procedures known in the art. For example, an antisense nucleic acid (e.g., an antisense oligonucleotide) can be chemically synthesized using naturally occurring nucleotides or variously modified nucleotides designed to increase the biological stability of the molecules
25 or to increase the physical stability of the duplex formed between the antisense and sense nucleic acids, e.g., phosphorothioate derivatives and acridine substituted nucleotides can be used.

Examples of modified nucleotides that can be used to generate the antisense nucleic acid include: 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-chlorouracil, 5-iodouracil, hypoxanthine, xanthine,
4-acetylcytosine, 5-(carboxyhydroxymethyl) uracil, 5-carboxymethylaminomethyl-
30 2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, beta-D-galactosylquosine, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil,

WO 02/02625

PCT/US01/21191

beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarbonylmethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid (v), wybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid (v), 5-methyl-2-thiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracil, (acp3)w, and 2,6-diaminopurine. Alternatively, the antisense nucleic acid can be produced biologically using an expression vector into which a nucleic acid has been subcloned in an antisense orientation (i.e., RNA transcribed from the inserted nucleic acid will be of an antisense orientation to a target nucleic acid of interest, described further in the following subsection).

10 The antisense nucleic acid molecules of the invention are typically administered to a subject or generated in situ such that they hybridize with or bind to cellular mRNA and/or genomic DNA encoding a FGF-CX protein to thereby inhibit expression of the protein, e.g., by inhibiting transcription and/or translation. The hybridization can be by conventional nucleotide complementarity to form a stable duplex, or, for example, in the case of an antisense nucleic acid 15 molecule that binds to DNA duplexes, through specific interactions in the major groove of the double helix. An example of a route of administration of antisense nucleic acid molecules of the invention includes direct injection at a tissue site. Alternatively, antisense nucleic acid molecules can be modified to target selected cells and then administered systemically. For example, for systemic administration, antisense molecules can be modified such that they 20 specifically bind to receptors or antigens expressed on a selected cell surface, e.g., by linking the antisense nucleic acid molecules to peptides or antibodies that bind to cell surface receptors or antigens. The antisense nucleic acid molecules can also be delivered to cells using the vectors described herein. To achieve sufficient intracellular concentrations of antisense molecules, vector constructs in which the antisense nucleic acid molecule is placed under the control of a 25 strong pol II or pol III promoter are preferred.

In yet another embodiment, the antisense nucleic acid molecule of the invention is an α -anomeric nucleic acid molecule. An α -anomeric nucleic acid molecule forms specific double-stranded hybrids with complementary RNA in which, contrary to the usual β -units, the strands run parallel to each other (Gaultier et al. (1987) *Nucleic Acids Res* 15: 6625-6641). The 30 antisense nucleic acid molecule can also comprise a 2'-o-methylribonucleotide (Inoue et al. (1987) *Nucleic Acids Res* 15: 6131-6148) or a chimeric RNA-DNA analogue (Inoue et al. (1987) *FEBS Lett* 215: 327-330).

WO 02/02625

PCT/US01/21191

Ribozymes and PNA moieties

Such modifications include, by way of nonlimiting example, modified bases, and nucleic acids whose sugar phosphate backbones are modified or derivatized. These modifications are carried out at least in part to enhance the chemical stability of the modified nucleic acid, such that they may be used, for example, as antisense binding nucleic acids in therapeutic applications in a subject.

In still another embodiment, an antisense nucleic acid of the invention is a ribozyme. Ribozymes are catalytic RNA molecules with ribonuclease activity that are capable of cleaving a single-stranded nucleic acid, such as an mRNA, to which they have a complementary region. Thus, ribozymes (e.g., hammerhead ribozymes (described in Haselhoff and Gerlach (1988) Nature 334:585-591)) can be used to catalytically cleave FGF-CX mRNA transcripts to thereby inhibit translation of FGF-CX mRNA. A ribozyme having specificity for a FGF-CX-encoding nucleic acid can be designed based upon the nucleotide sequence of a FGF-CX DNA disclosed herein (i.e., SEQ ID NO:1). For example, a derivative of a Tetrahymena L-19 IVS RNA can be constructed in which the nucleotide sequence of the active site is complementary to the nucleotide sequence to be cleaved in a FGF-CX-encoding mRNA. See, e.g., Cech et al. U.S. Pat. No. 4,987,071; and Cech et al. U.S. Pat. No. 5,116,742. Alternatively, FGF-CX mRNA can be used to select a catalytic RNA having a specific ribonuclease activity from a pool of RNA molecules. See, e.g., Bartel et al., (1993) Science 261:1411-1418.

Alternatively, FGF-CX gene expression can be inhibited by targeting nucleotide sequences complementary to the regulatory region of the FGF-CX (e.g., the FGF-CX promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the FGF-CX gene in target cells. See generally, Helene, (1991) Anticancer Drug Des. 6: 569-84; Helene, et al. (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:27-36; and Maher (1992) Bioassays 14: 807-15.

In various embodiments, the nucleic acids of FGF-CX can be modified at the base moiety, sugar moiety or phosphate backbone to improve, e.g., the stability, hybridization, or solubility of the molecule. For example, the deoxyribose phosphate backbone of the nucleic acids can be modified to generate peptide nucleic acids (see Hyrup et al. (1996) Bioorg Med Chem 4: 5-23). As used herein, the terms "peptide nucleic acids" or "PNAs" refer to nucleic acid mimics, e.g., DNA mimics, in which the deoxyribose phosphate backbone is replaced by a pseudopeptide backbone and only the four natural nucleobases are retained. The neutral backbone of PNAs has been shown to allow for specific hybridization to DNA and RNA under conditions of low ionic strength. The synthesis of PNA oligomers can be performed using

WO 02/02625

PCT/US01/21191

standard solid phase peptide synthesis protocols as described in Hyrup et al. (1996) above; Perry-O'Keefe et al. (1996) PNAS 93: 14670-675.

PNAs of FGF-CX can be used in therapeutic and diagnostic applications. For example, PNAs can be used as antisense or antigene agents for sequence-specific modulation of gene
5 expression by, e.g., inducing transcription or translation arrest or inhibiting replication. PNAs of FGF-CX can also be used, e.g., in the analysis of single base pair mutations in a gene by, e.g., PNA directed PCR clamping; as artificial restriction enzymes when used in combination with other enzymes, e.g., S1 nucleases (Hyrup B. (1996) above); or as probes or primers for DNA sequence and hybridization (Hyrup et al. (1996), above; Perry-O'Keefe (1996), above).

10 In another embodiment, PNAs of FGF-CX can be modified, e.g., to enhance their stability or cellular uptake, by attaching lipophilic or other helper groups to PNA, by the formation of PNA-DNA chimeras, or by the use of liposomes or other techniques of drug delivery known in the art. For example, PNA-DNA chimeras of FGF-CX can be generated that may combine the advantageous properties of PNA and DNA. Such chimeras allow DNA
15 recognition enzymes, e.g., RNase H and DNA polymerases, to interact with the DNA portion while the PNA portion would provide high binding affinity and specificity. PNA-DNA chimeras can be linked using linkers of appropriate lengths selected in terms of base stacking, number of bonds between the nucleobases, and orientation (Hyrup (1996) above). The synthesis of PNA-DNA chimeras can be performed as described in Hyrup (1996) above and Finn et al.
20 (1996) Nucl Acids Res 24: 3357-63. For example, a DNA chain can be synthesized on a solid support using standard phosphoramidite coupling chemistry, and modified nucleoside analogs, e.g., 5'-(4-methoxytrityl)amino-3'-deoxy-thymidine phosphoramidite, can be used between the PNA and the 5' end of DNA (Mag et al. (1989) Nucl Acid Res 17: 5973-88). PNA monomers are then coupled in a stepwise manner to produce a chimeric molecule with a 5' PNA segment
25 and a 3' DNA segment (Finn et al. (1996) above). Alternatively, chimeric molecules can be synthesized with a 5' DNA segment and a 3' PNA segment. See, Petersen et al. (1975) Bioorg Med Chem Lett 5: 1119-1124.

In other embodiments, the oligonucleotide may include other appended groups such as peptides (e.g., for targeting host cell receptors in vivo), or agents facilitating transport across the
30 cell membrane (see, e.g., Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556; Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; PCT Publication No. W088/09810) or the blood-brain barrier (see, e.g., PCT Publication No. W089/10134). In addition, oligonucleotides can be modified with hybridization triggered cleavage agents (See, e.g., Krol et

WO 02/02625

PCT/US01/21191

al., 1988, *BioTechniques* 6:958-976) or intercalating agents. (See, e.g., Zon, 1988, *Pharm. Res.* 5: 539-549). To this end, the oligonucleotide may be conjugated to another molecule, e.g., a peptide, a hybridization triggered cross-linking agent, a transport agent, a hybridization-triggered cleavage agent, etc.

5 FGF-CX polypeptides

The novel protein of the invention includes the FGF-CX-like protein whose sequence is provided in FIG. 1 (SEQ ID NO:2) or SEQ ID NO:27. The invention also includes a mutant or variant protein any of whose residues may be changed from the corresponding residue shown in FIG. 1 while still encoding a protein that maintains its FGF-CX-like activities and physiological functions, or a functional fragment thereof. In the mutant or variant protein, up to 20% or more of the residues may be so changed.

In general, an FGF-CX-like variant that preserves FGF-CX-like function includes any variant in which residues at a particular position in the sequence have been substituted by other amino acids, and further include the possibility of inserting an additional residue or residues between two residues of the parent protein as well as the possibility of deleting one or more residues from the parent sequence. Any amino acid substitution, insertion, or deletion is encompassed by the invention. In favorable circumstances, the substitution is a conservative substitution as defined above. Furthermore, without limiting the scope of the invention, the following positions in Table 2 (using the numbering provided in SEQ ID NO:2) may be substituted as indicated, such that a mutant or variant protein may include one or more than one of the substitutions indicated. The suggested substitutions do not limit the range of possible substitutions that may be made at a given position.

TABLE 2.

	Position	Possible Substitution
25	6:	Glu to Asp
	9:	Gly to Ser, Thr, or Asa
	10:	Phe to Tyr
	11:	Leu to Phe or Ile
	15:	Glu to Asp
30	16:	Gly to Ala
	17:	Leu to Ile or Val
	19:	Gln may be deleted
	21:	Val to Phe or Ile
	31:	Gly to Lys, Arg, Ser, or Ala
35	33:	Arg to Lys or Ser
	35:	Pro to Leu or Val

WO 02/02625

PCT/US01/21191

	38:	Gly to Asn or Ser
	39:	Glu to Asp
	40:	Arg to Lys, His, or Pro
	42:	Ser to Thr, Ala, or Gly
5	43:	Ala to Gln, Asn, or Ser
	48:	Ala to Ser or Gly
	51:	Gly to Ala
	53:	Gly to Ala or deleted
10	54:	Ala to Gly, Val, or deleted
	55:	Ala to Ser or Thr
	56:	Gln to Asp, Glu, or Asn
	58:	Ala to Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, or Glu
	61:	His to Gln, Asn, Lys, or Arg
	78:	Gln to Asn, Glu, or Asp
15	80:	Leu to Phe or Ile
	82:	Asp to Gln, Asn, or Gln
	84:	Ser to Asn, Thr, or Glu
	85:	Val to Ile
	90:	Gln to Asn or Lys
20	103:	Val to Ile
	115:	Ser to Thr
	123:	Asp to Glu
	128:	Tyr to Phe
	135:	Ser to Thr, Gln, or Asn
25	138:	Ile to Val or Leu
	155:	Ile to Leu
	159:	Gly to Val or Ala
	161:	Thr to Ser
	166:	Phe to Tyr
30	177:	Asp to Glu
	181:	Ser to Ala or Thr
	198:	Glu to Asp
	199:	Arg to Lys
	207:	Leu to Ile or Val
35	209:	Met to any residue
	211:	Thr to Ser

One aspect of the invention pertains to isolated FGF-CX proteins, and biologically active portions thereof, or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof. Also provided are polypeptide fragments suitable for use as immunogens to raise anti-FGF-CX antibodies. In one embodiment, native FGF-CX proteins can be isolated from cells or tissue sources by an appropriate purification scheme using standard protein purification techniques. In another embodiment, FGF-CX proteins are produced by recombinant DNA techniques. Alternative to recombinant expression, a FGF-CX protein or polypeptide can be synthesized chemically using standard peptide synthesis techniques.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

An "isolated" or "purified" protein or biologically active portion thereof is substantially free of cellular material or other contaminating proteins from the cell or tissue source from which the FGF-CX protein is derived, or substantially free from chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. The language "substantially free of cellular material" includes preparations of FGF-CX protein in which the protein is separated from cellular components of the cells from which it is isolated or recombinantly produced. In one embodiment, the language "substantially free of cellular material" includes preparations of FGF-CX protein having less than about 30% (by dry weight) of non-FGF-CX protein (also referred to herein as a "contaminating protein"), more preferably less than about 20% of non-FGF-CX protein, still more preferably less than about 10% of non-FGF-CX protein, and most preferably less than about 5% non-FGF-CX protein. When the FGF-CX protein or biologically active portion thereof is recombinantly produced, it is also preferably substantially free of culture medium, *i.e.*, culture medium represents less than about 20%, more preferably less than about 10%, and most preferably less than about 5% of the volume of the protein preparation.

The language "substantially free of chemical precursors or other chemicals" includes preparations of FGF-CX protein in which the protein is separated from chemical precursors or other chemicals that are involved in the synthesis of the protein. In one embodiment, the language "substantially free of chemical precursors or other chemicals" includes preparations of FGF-CX protein having less than about 30% (by dry weight) of chemical precursors or non-FGF-CX chemicals, more preferably less than about 20% chemical precursors or non-FGF-CX chemicals, still more preferably less than about 10% chemical precursors or non-FGF-CX chemicals, and most preferably less than about 5% chemical precursors or non-FGF-CX chemicals.

Biologically active portions of a FGF-CX protein include peptides comprising amino acid sequences sufficiently homologous to or derived from the amino acid sequence of the FGF-CX protein, *e.g.*, the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 that include fewer amino acids than the full length FGF-CX proteins, and exhibit at least one activity of a FGF-CX protein. Typically, biologically active portions comprise a domain or motif with at least one activity of the FGF-CX protein. A biologically active portion of a FGF-CX protein can be a polypeptide which is, for example, 10, 25, 50, 100 or more amino acids in length.

A biologically active portion of a FGF-CX protein of the present invention may contain at least one of the above-identified domains substantially conserved between the FGF family of proteins. Moreover, other biologically active portions, in which other regions of the protein are

WO 02/02625

PCT/US01/21191

deleted, can be prepared by recombinant techniques and evaluated for one or more of the functional activities of a native FGF-CX protein.

In an embodiment, the FGF-CX protein has an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27. In other embodiments, the FGF-CX protein is substantially
5 homologous to SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27 and retains the functional activity of the protein of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27, yet differs in amino acid sequence due to natural allelic variation or mutagenesis, as described in detail below. Accordingly, in another embodiment, the FGF-CX protein is a protein that comprises an amino acid sequence at least about 45% homologous to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27 and retains the
10 functional activity of the FGF-CX proteins of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27. In another embodiment, the FGF-CX is a protein that contains an amino acid sequence at least about 45% homologous, and more preferably about 55, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 or even 99% homologous to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27 and retains the functional activity of the FGF-CX proteins of the corresponding polypeptide having the
15 sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27.

Determining homology between two or more sequences

To determine the percent homology of two amino acid sequences or of two nucleic acids, the sequences are aligned for optimal comparison purposes (e.g., gaps can be introduced in either of the sequences being compared for optimal alignment between the sequences). The
20 amino acid residues or nucleotides at corresponding amino acid positions or nucleotide positions are then compared. When a position in the first sequence is occupied by the same amino acid residue or nucleotide as the corresponding position in the second sequence, then the molecules are homologous at that position (*i.e.*, as used herein amino acid or nucleic acid "homology" is equivalent to amino acid or nucleic acid "identity").

The nucleic acid sequence homology may be determined as the degree of identity
25 between two sequences. The homology may be determined using computer programs known in the art, such as GAP software provided in the GCG program package. See, Needleman and Wunsch 1970 *J Mol Biol* 48: 443-453. Using GCG GAP software with the following settings for nucleic acid sequence comparison: GAP creation penalty of 5.0 and GAP extension penalty
30 of 0.3, the coding region of the analogous nucleic acid sequences referred to above exhibits a degree of identity preferably of at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, or 99%, with the CDS (encoding) part of the DNA sequence shown in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

The term "sequence identity" refers to the degree to which two polynucleotide or polypeptide sequences are identical on a residue-by-residue basis over a particular region of comparison. The term "percentage of sequence identity" is calculated by comparing two optimally aligned sequences over that region of comparison, determining the number of
5 positions at which the identical nucleic acid base (e.g., A, T, C, G, U, or I, in the case of nucleic acids) occurs in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the total number of positions in the region of comparison (*i.e.*, the window size), and multiplying the result by 100 to yield the percentage of sequence identity. The term "substantial identity" as used herein denotes a characteristic of a polynucleotide
10 sequence, wherein the polynucleotide comprises a sequence that has at least 80 percent sequence identity, preferably at least 85 percent identity and often 90 to 95 percent sequence identity, more usually at least 99 percent sequence identity as compared to a reference sequence over a comparison region. The term "percentage of positive residues" is calculated by comparing two optimally aligned sequences over that region of comparison, determining the number of
15 positions at which the identical and conservative amino acid substitutions, as defined above, occur in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the total number of positions in the region of comparison (*i.e.*, the window size), and multiplying the result by 100 to yield the percentage of positive residues.

Chimeric and fusion proteins

The invention also provides FGF-CX chimeric or fusion proteins. As used herein, a FGF-CX "chimeric protein" or "fusion protein" comprises a FGF-CX polypeptide operatively linked to a non-FGF-CX polypeptide. A "FGF-CX polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to FGF-CX, whereas a "non-FGF-CX polypeptide" refers to a polypeptide having an amino acid sequence corresponding to a protein that is not
20 substantially homologous to the FGF-CX protein, *e.g.*, a protein that is different from the FGF-CX protein and that is derived from the same or a different organism. Within a FGF-CX fusion protein the FGF-CX polypeptide can correspond to all or a portion of a FGF-CX protein. In one embodiment, a FGF-CX fusion protein comprises at least one biologically active portion of a FGF-CX protein. In another embodiment, a FGF-CX fusion protein comprises at least two
25 biologically active portions of a FGF-CX protein. Within the fusion protein, the term "operatively linked" is intended to indicate that the FGF-CX polypeptide and the non-FGF-CX polypeptide are fused in-frame to each other. The non-FGF-CX polypeptide can be fused to the N-terminus or C-terminus of the FGF-CX polypeptide.
30

WO 02/02625

PCT/US01/21191

For example, in one embodiment a FGF-CX fusion protein comprises a FGF-CX polypeptide operably linked to the extracellular domain of a second protein. Such fusion proteins can be further utilized in screening assays for compounds that modulate FGF-CX activity (such assays are described in detail below).

5 In another embodiment, the fusion protein is a GST-FGF-CX fusion protein in which the FGF-CX sequences are fused to the C-terminus of the GST (i.e., glutathione S-transferase) sequences. Such fusion proteins can facilitate the purification of recombinant FGF-CX.

In yet another embodiment, the fusion protein is a FGF-CX protein containing a heterologous signal sequence at its N-terminus. For example, the native FGF-CX signal
10 sequence (i.e., amino acids 1 to 20 of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27) can be removed and replaced with a signal sequence from another protein. In certain host cells (e.g., mammalian host cells), expression and/or secretion of FGF-CX can be increased through use of a heterologous signal sequence.

In another embodiment, the fusion protein is a FGF-CX-immunoglobulin fusion protein
15 in which the FGF-CX sequences comprising one or more domains are fused to sequences derived from a member of the immunoglobulin protein family. The FGF-CX-immunoglobulin fusion proteins of the invention can be incorporated into pharmaceutical compositions and administered to a subject to inhibit an interaction between a FGF-CX ligand and a FGF-CX
20 protein on the surface of a cell, to thereby suppress FGF-CX-mediated signal transduction *in vivo*. In one nonlimiting example, a contemplated FGF-CX ligand of the invention is the FGF-CX receptor. The FGF-CX-immunoglobulin fusion proteins can be used to affect the bioavailability of a FGF-CX cognate ligand. Inhibition of the FGF-CX ligand/FGF-CX interaction may be useful therapeutically for both the treatment of proliferative and differentiative disorders, as well as modulating (e.g., promoting or inhibiting) cell survival.
25 Moreover, the FGF-CX-immunoglobulin fusion proteins of the invention can be used as immunogens to produce anti-FGF-CX antibodies in a subject, to purify FGF-CX ligands, and in screening assays to identify molecules that inhibit the interaction of FGF-CX with a FGF-CX ligand.

A FGF-CX chimeric or fusion protein of the invention can be produced by standard
30 recombinant DNA techniques. For example, DNA fragments coding for the different polypeptide sequences are ligated together in-frame in accordance with conventional techniques, e.g., by employing blunt-ended or stagger-ended termini for ligation, restriction enzyme digestion to provide for appropriate termini, filling-in of cohesive ends as appropriate, alkaline

WO 02/02625

PCT/US01/21191

phosphatase treatment to avoid undesirable joining, and enzymatic ligation. In another embodiment, the fusion gene can be synthesized by conventional techniques including automated DNA synthesizers. Alternatively, PCR amplification of gene fragments can be carried out using anchor primers that give rise to complementary overhangs between two consecutive gene fragments that can subsequently be annealed and reamplified to generate a chimeric gene sequence (see, for example, Ausubel et al. (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Moreover, many expression vectors are commercially available that already encode a fusion moiety (e.g., a GST polypeptide). A FGF-CX-encoding nucleic acid can be cloned into such an expression vector such that the fusion moiety is linked in-frame to the FGF-CX protein.

FGF-CX agonists and antagonists

The present invention also pertains to variants of the FGF-CX proteins that function as either FGF-CX agonists (mimetics) or as FGF-CX antagonists. Variants of the FGF-CX protein can be generated by mutagenesis, e.g., discrete point mutation or truncation of the FGF-CX protein. An agonist of the FGF-CX protein can retain substantially the same, or a subset of, the biological activities of the naturally occurring form of the FGF-CX protein. An antagonist of the FGF-CX protein can inhibit one or more of the activities of the naturally occurring form of the FGF-CX protein by, for example, competitively binding to a downstream or upstream member of a cellular signaling cascade which includes the FGF-CX protein. Thus, specific biological effects can be elicited by treatment with a variant of limited function. In one embodiment, treatment of a subject with a variant having a subset of the biological activities of the naturally occurring form of the protein has fewer side effects in a subject relative to treatment with the naturally occurring form of the FGF-CX proteins.

Variants of the FGF-CX protein that function as either FGF-CX agonists (mimetics) or as FGF-CX antagonists can be identified by screening combinatorial libraries of mutants, e.g., truncation mutants, of the FGF-CX protein for FGF-CX protein agonist or antagonist activity. In one embodiment, a variegated library of FGF-CX variants is generated by combinatorial mutagenesis at the nucleic acid level and is encoded by a variegated gene library. A variegated library of FGF-CX variants can be produced by, for example, enzymatically ligating a mixture of synthetic oligonucleotides into gene sequences such that a degenerate set of potential FGF-CX sequences is expressible as individual polypeptides, or alternatively, as a set of larger fusion proteins (e.g., for phage display) containing the set of FGF-CX sequences therein. There are a variety of methods which can be used to produce libraries of potential FGF-CX variants from a

WO 02/02625

PCT/US01/21191

degenerate oligonucleotide sequence. Chemical synthesis of a degenerate gene sequence can be performed in an automatic DNA synthesizer, and the synthetic gene then ligated into an appropriate expression vector. Use of a degenerate set of genes allows for the provision, in one mixture, of all of the sequences encoding the desired set of potential FGF-CX sequences.

- 5 Methods for synthesizing degenerate oligonucleotides are known in the art (see, e.g., Narang (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura *et al.* (1984) *Annu Rev Biochem* 53:323; Itakura *et al.* (1984) *Science* 198:1056; Ike *et al.* (1983) *Nucl Acid Res* 11:477).

Polypeptide libraries

- In addition, libraries of fragments of the FGF-CX protein coding sequence can be used to generate a variegated population of FGF-CX fragments for screening and subsequent selection of variants of a FGF-CX protein. In one embodiment, a library of coding sequence fragments can be generated by treating a double stranded PCR fragment of a FGF-CX coding sequence with a nuclease under conditions wherein nicking occurs only about once per molecule, denaturing the double stranded DNA, renaturing the DNA to form double stranded DNA that can include sense/antisense pairs from different nicked products, removing single stranded portions from reformed duplexes by treatment with S1 nuclease, and ligating the resulting fragment library into an expression vector. By this method, an expression library can be derived which encodes N-terminal and internal fragments of various sizes of the FGF-CX protein.
- 10
15

- Several techniques are known in the art for screening gene products of combinatorial libraries made by point mutations or truncation, and for screening cDNA libraries for gene products having a selected property. Such techniques are adaptable for rapid screening of the gene libraries generated by the combinatorial mutagenesis of FGF-CX proteins. The most widely used techniques, which are amenable to high throughput analysis, for screening large gene libraries typically include cloning the gene library into replicable expression vectors, transforming appropriate cells with the resulting library of vectors, and expressing the combinatorial genes under conditions in which detection of a desired activity facilitates isolation of the vector encoding the gene whose product was detected. Recursive ensemble mutagenesis (REM), a new technique that enhances the frequency of functional mutants in the libraries, can be used in combination with the screening assays to identify FGF-CX variants (Arkin and Youvan (1992) *PNAS* 89:7811-7815; Delgrave *et al.* (1993) *Protein Engineering* 6:327-331).
- 20
25
30

WO 02/02625

PCT/US01/21191

Anti-FGF-CX Antibodies

The term "antibody" as used herein refers to immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin (Ig) molecules, i.e., molecules that contain an antigen binding site that specifically binds (immunoreacts with) an antigen. Such antibodies include, but are not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, Fab, Fab' and F(ab')₂ fragments, and an Fab expression library. In general, antibody molecules obtained from humans relates to any of the classes IgG, IgM, IgA, IgE and IgD, which differ from one another by the nature of the heavy chain present in the molecule. Certain classes have subclasses as well, such as IgG1, IgG2, and others. Furthermore, in humans, the light chain may be a kappa chain or a lambda chain. Reference herein to antibodies includes a reference to all such classes, subclasses and types of human antibody species.

An isolated protein of the invention intended to serve as an antigen, or a portion or fragment thereof, can be used as an immunogen to generate antibodies that immunospecifically bind the antigen, using standard techniques for polyclonal and monoclonal antibody preparation. The full-length protein can be used or, alternatively, the invention provides antigenic peptide fragments of the antigen for use as immunogens. An antigenic peptide fragment comprises at least 6 amino acid residues of the amino acid sequence of the full length protein, such as an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27, and encompasses an epitope thereof such that an antibody raised against the peptide forms a specific immune complex with the full length protein or with any fragment that contains the epitope. Preferably, the antigenic peptide comprises at least 10 amino acid residues, or at least 15 amino acid residues, or at least 20 amino acid residues, or at least 30 amino acid residues. Preferred epitopes encompassed by the antigenic peptide are regions of the protein that are located on its surface; commonly these are hydrophilic regions.

In certain embodiments of the invention, at least one epitope encompassed by the antigenic peptide is a region of the FGF-CX that is located on the surface of the protein, e.g., a hydrophilic region. A hydrophobicity analysis of the human FGF-CX protein sequence will indicate which regions of a FGF-CX polypeptide are particularly hydrophilic and, therefore, are likely to encode surface residues useful for targeting antibody production. As a means for targeting antibody production, hydropathy plots showing regions of hydrophilicity and hydrophobicity may be generated by any method well known in the art, including, for example, the Kyte Doolittle or the Hopp Woods methods, either with or without Fourier transformation. See, e.g., Hopp and Woods, 1981, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: 3824-3828; Kyte and Doolittle

WO 02/02625

PCT/US01/21191

1982, *J. Mol. Biol.* 157: 105-142, each incorporated herein by reference in their entirety.

Antibodies that are specific for one or more domains within an antigenic protein, or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof, are also provided herein.

A protein of the invention, or a derivative, fragment, analog, homolog or ortholog thereof, may be utilized as an immunogen in the generation of antibodies that immunospecifically bind these protein components.

Various procedures known within the art may be used for the production of polyclonal or monoclonal antibodies directed against a protein of the invention, or against derivatives, fragments, analogs homologs or orthologs thereof (see, for example, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, incorporated herein by reference). Some of those antibodies are discussed below.

1. Polyclonal Antibodies

For the production of polyclonal antibodies, various suitable host animals (e.g., rabbit, goat, mouse or other mammal) may be immunized by one or more injections with the FGF-CX native protein, a synthetic variant thereof, or a derivative of the foregoing. An appropriate immunogenic preparation can contain, for example, the naturally occurring immunogenic protein, a chemically synthesized polypeptide representing the immunogenic protein, or a recombinantly expressed immunogenic protein. Furthermore, the FGF-CX protein may be conjugated to a second 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 soybean trypsin inhibitor. The preparation can further include an adjuvant. Various adjuvants used to increase the immunological response include, but are not limited to, Freund's (complete and incomplete), mineral gels (e.g., aluminum hydroxide), surface active substances (e.g., lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, dinitrophenol, etc.), adjuvants usable in humans such as Bacille Calmette-Guerin and *Corynebacterium parvum*, or similar immunostimulatory agents. Additional examples of adjuvants which can be employed include MPL-TDM adjuvant (monophosphoryl Lipid A, synthetic trehalose dicorynomycolate).

The polyclonal antibody molecules directed against the immunogenic FGF-CX protein can be isolated from the mammal (e.g., from the blood) and further purified by well known techniques, such as affinity chromatography using protein A or protein G, which provide primarily the IgG fraction of immune serum. Subsequently, or alternatively, the specific antigen which is the target of the immunoglobulin sought, or an epitope thereof, may be immobilized on

WO 02/02625

PCT/US01/21191

a column to purify the immune specific antibody by immunoaffinity chromatography. Purification of immunoglobulins is discussed, for example, by D. Wilkinson (*The Scientist*, published by The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28).

2. Monoclonal Antibodies

5 The term "monoclonal antibody" (MAb) or "monoclonal antibody composition", as used herein, refers to a population of antibody molecules that contain only one molecular species of antibody molecule consisting of a unique light chain gene product and a unique heavy chain gene product. In particular, the complementarity determining regions (CDRs) of the monoclonal antibody are identical in all the molecules of the population. MAbs thus contain an antigen
10 binding site capable of immunoreacting with a particular epitope of the antigen characterized by a unique binding affinity for it.

Monoclonal antibodies can 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 immunizing agent to
15 elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the immunizing agent. Alternatively, the lymphocytes can be immunized in vitro.

The immunizing agent will typically include the FGF-CX protein antigen, a fragment thereof or a fusion protein thereof. Generally, either peripheral blood lymphocytes are used if cells of human origin are desired, or spleen cells or lymph node cells are used if non-human
20 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
25 hybridoma cells can 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-
30 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

WO 02/02625

PCT/US01/21191

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.:

5 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 the antigen. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by the hybridoma cells is determined by
10 immunoprecipitation or by an in vitro binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunosorbent 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). It is an objective, especially important in therapeutic applications of monoclonal antibodies, to identify antibodies
15 having a high degree of specificity and a high binding affinity for the target antigen.

After the desired hybridoma cells are identified, the clones can be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods (Goding, 1986). Suitable culture media for this purpose include, for example, Dulbecco's Modified Eagle's Medium and RPMI-1640 medium. Alternatively, the hybridoma cells can be grown in vivo as ascites in a mammal.

20 The monoclonal antibodies secreted by the subclones can be isolated or purified from the culture medium or ascites fluid by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

The monoclonal antibodies can also be made by recombinant DNA methods, such as
25 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 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 can be placed into expression vectors, which are
30 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 can be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant domains

WO 02/02625

PCT/US01/21191

in place of the homologous murine sequences (U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994)) 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
5 be substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody of the invention to create a chimeric bivalent antibody.

3. Humanized Antibodies

The antibodies directed against the FGF-CX protein antigens of the invention can further comprise humanized antibodies or human antibodies. These antibodies are suitable for
10 administration to humans without engendering an immune response by the human against the administered immunoglobulin. Humanized forms of antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ or other antigen-binding subsequences of antibodies) that are principally comprised of the sequence of a human immunoglobulin, and contain minimal sequence derived from a non-human immunoglobulin.
15 Humanization can be performed following the method of Winter and co-workers (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), by substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. (See also U.S. Patent No. 5,225,539.) In some instances, Fv framework residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding
20 non-human residues. Humanized antibodies can 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 framework regions are those of a
25 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., 1986; Riechmann et al., 1988; and Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)).

4. Human Antibodies

30 Fully human antibodies essentially relate to antibody molecules in which the entire sequence of both the light chain and the heavy chain, including the CDRs, arise from human genes. Such antibodies are termed "human antibodies", or "fully human antibodies" herein. Human monoclonal antibodies directed against a FGF-CX protein can be prepared by the trioma

WO 02/02625

PCT/US01/21191

technique, the human B-cell hybridoma technique (see Kozbor, et al., 1983 *Immunol Today* 4: 72) and the EBV hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (see Cole, et al., 1985 In: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Human monoclonal antibodies may be utilized in the practice of the present invention and may be
5 produced by using human hybridomas (see Cote, et al., 1983. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2026-2030) or by transforming human B-cells with Epstein Barr Virus in vitro (see Cole, et al., 1985 In: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

In addition, human antibodies can also be produced using additional techniques, including phage display libraries (Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991);
10 Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). Similarly, human antibodies can be made by introducing human immunoglobulin loci into transgenic animals, e.g., mice in which the endogenous immunoglobulin genes have been partially or completely 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
15 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 Marks et al. (*Bio/Technology* 10, 779-783 (1992)); Lonberg et al. (*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)); and Lonberg and Huszar (*Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995)).

Human antibodies that specifically bind a FGF-CX protein may additionally be produced
20 using transgenic nonhuman animals which are modified so as to produce fully human antibodies rather than the animal's endogenous antibodies in response to challenge by an antigen. (See publication WO 94/02602). The endogenous genes encoding the heavy and light immunoglobulin chains in the nonhuman host have been incapacitated, and active loci encoding
25 human heavy and light chain immunoglobulins are inserted into the host's genome. The human genes are incorporated, for example, using yeast artificial chromosomes containing the requisite human DNA segments. An animal which provides all the desired modifications is then obtained as progeny by crossbreeding intermediate transgenic animals containing fewer than the full complement of the modifications. The preferred embodiment of such a nonhuman animal is a
30 mouse, and is termed the Xenomouse™ as disclosed in PCT publications WO 96/33735 and WO 96/34096. This animal produces B cells which secrete fully human immunoglobulins. The antibodies can be obtained directly from the animal after immunization with a FGF-CX immunogen of interest, as, for example, a preparation of a polyclonal antibody, or alternatively

WO 02/02625

PCT/US01/21191

from immortalized B cells derived from the animal, such as hybridomas producing monoclonal antibodies. Additionally, the genes encoding the immunoglobulins with human variable regions can be recovered and expressed to obtain the antibodies directly, or can be further modified to obtain analogs of antibodies such as, for example, single chain Fv molecules.

5 An example of a method of producing a nonhuman host, exemplified as a mouse, lacking expression of an endogenous immunoglobulin heavy chain is disclosed in U.S. Patent No. 5,939,598. It can be obtained by a method including deleting the J segment genes from at least one endogenous heavy chain locus in an embryonic stem cell to prevent rearrangement of the locus and to prevent formation of a transcript of a rearranged immunoglobulin heavy chain
10 locus, the deletion being effected by a targeting vector containing a gene encoding a selectable marker; and producing from the embryonic stem cell a transgenic mouse whose somatic and germ cells contain the gene encoding the selectable marker.

A method for producing an antibody of interest, such as a human antibody, is disclosed in U.S. Patent No. 5,916,771. It includes introducing an expression vector that contains a
15 nucleotide sequence encoding a heavy chain into one mammalian host cell in culture, introducing an expression vector containing a nucleotide sequence encoding a light chain into another mammalian host cell, and fusing the two cells to form a hybrid cell. The hybrid cell expresses an antibody containing the heavy chain and the light chain.

In a further improvement on this procedure, a method for identifying a clinically relevant
20 epitope on an immunogen, and a correlative method for selecting an antibody that binds immunospecifically to the relevant epitope with high affinity, are disclosed in PCT publication WO 99/53049.

5. Fab Fragments and Single Chain Antibodies

According to the invention, techniques can be adapted for the production of single-chain
25 antibodies specific to an antigenic FGF-CX protein of the invention (see e.g., U.S. Patent No. 4,946,778). In addition, methods can be adapted for the construction of Fab expression libraries (see e.g., Huse, et al., 1989 Science 246: 1275-1281) to allow rapid and effective identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity for a protein or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof. Antibody fragments that contain the idiotypes to a protein antigen
30 may be produced by techniques known in the art including, but not limited to: (i) an F(ab')₂ fragment produced by pepsin digestion of an antibody molecule; (ii) an Fab fragment generated by reducing the disulfide bridges of an F(ab')₂ fragment; (iii) an Fab fragment generated by the treatment of the antibody molecule with papain and a reducing agent and (iv) Fv fragments.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

6. Bispecific Antibodies

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 an antigenic protein of the invention. The second binding target is
5 any other antigen, and advantageously is a cell-surface protein or receptor or receptor subunit.

Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditionally, the recombinant production of bispecific antibodies is based on the co-expression of two 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
10 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 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).

15 Antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) can be fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion 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.
20 DNAs encoding the immunoglobulin heavy-chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, 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
25 of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of 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
30 chain(s) are created on the interface 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.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

Bispecific antibodies can be prepared as full length antibodies or antibody fragments (e.g. F(ab')₂ bispecific antibodies). Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan et al., *Science* 229:81 (1985) describe a procedure
5 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 converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-thiol by reduction with mercaptoethylamine and is
10 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.

Additionally, Fab' fragments can be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form bispecific antibodies. Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) describe
15 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 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.

20 Various techniques for making and isolating bispecific antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers. Kostelny 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
25 to form monomers and then re-oxidized to 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 (VH) connected to a light-chain variable domain (VL) by a linker
30 which is too short to allow pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the VH and VL domains of one fragment are forced to pair with the complementary VL and VH domains of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for

WO 02/02625

PCT/US01/21191

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 can bind to two different epitopes, at least one of which originates in the protein antigen of the invention. Alternatively, an anti-antigenic arm of an immunoglobulin molecule can be combined with an arm which binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a T-cell receptor molecule (e.g. CD2, CD3, CD28, or B7), or Fc receptors for IgG (FcγR), such as FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) and FcγRIII (CD16) so as to focus
10 cellular defense mechanisms to the cell expressing the particular antigen. Bispecific antibodies can also be used to direct cytotoxic agents to cells which express a particular antigen. These antibodies possess an antigen-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 protein antigen described herein and further binds tissue factor (TF).

15 7. 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 92/200373; EP 03089).
20 It is contemplated that the antibodies can be prepared in vitro using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins can 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-mercaptobutyrimidate and those disclosed, for example, in U.S. Patent No. 4,676,980.

25 8. Effector Function Engineering

It can be desirable to modify the FGF-CX 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) can be introduced into the Fc region, thereby allowing interchain disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody thus generated can have
30 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 can also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as

WO 02/02625

PCT/US01/21191

described in Wolff et al. *Cancer Research*, 53: 2560-2565 (1993). Alternatively, an antibody can be engineered that has dual Fc regions and can thereby have enhanced complement lysis and ADCC capabilities. See Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design*, 3: 219-230 (1989).

9. Immunoconjugates

5 The invention also pertains to immunoconjugates comprising a FGF-CX 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).

10 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, *Phytolacca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcun, crofin, *saponaria officinalis* inhibitor, gelonin, 15 mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, and the tricothecenes. A variety of radionuclides are available for the production of radioconjugated antibodies. Examples include 212Bi, 131I, 131In, 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-pyridyldithiol) propionate (SPDP), 20 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) hexamethyamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniobenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a 25 ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta et al., *Science*, 238: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyl-diethylene triamine-pentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionuclide to the antibody. See WO94/11026.

30 In another embodiment, the antibody can 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 circulation using a clearing agent and then administration of a "ligand" (e.g., avidin) that is in turn conjugated to a cytotoxic agent.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

10. Immunoliposomes

The antibodies disclosed herein can also be formulated as immunoliposomes. 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.

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 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).

11. Diagnostic Applications of Antibodies Directed Against the Proteins of the Invention

Antibodies directed against a FGF-CX protein of the invention may be used in methods known within the art relating to the localization and/or quantitation of the protein (e.g., for use in measuring levels of the protein within appropriate physiological samples, for use in diagnostic methods, for use in imaging the protein, and the like). In a given embodiment, antibodies against the proteins, or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof, that contain the antigen binding domain, are utilized as pharmacologically-active compounds (see below).

An antibody specific for a FGF-CX protein of the invention can be used to isolate the protein by standard techniques, such as immunoaffinity chromatography or immunoprecipitation. Such an antibody can facilitate the purification of the natural protein antigen from cells and of recombinantly produced antigen expressed in host cells. Moreover, such an antibody can be used to detect the antigenic protein (e.g., in a cellular lysate or cell supernatant) in order to evaluate the abundance and pattern of expression of the antigenic protein. Antibodies directed against the FGF-CX protein can be used diagnostically to monitor protein levels in tissue as part of a clinical testing procedure, e.g., to, for example, determine the efficacy of a given treatment regimen. Detection can be facilitated by coupling (i.e., physically linking) the antibody to a detectable substance. Examples of detectable substances include

WO 02/02625

PCT/US01/21191

various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, and radioactive materials. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, β -galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable
5 fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material includes luminol; examples of bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin, and examples of suitable radioactive material include ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S or ^3H .

12. Antibody Therapeutics

10 FGF-CX antibodies of the invention, including polyclonal, monoclonal, humanized and fully human antibodies, may be used as therapeutic agents. Such agents will generally be employed to treat or prevent a disease or pathology in a subject. An antibody preparation, preferably one having high specificity and high affinity for its target antigen, is administered to the subject and will generally have an effect due to its binding with the target. Such an effect may be one of two
15 kinds, depending on the specific nature of the interaction between the given antibody molecule and the target antigen in question. In the first instance, administration of the antibody may abrogate or inhibit the binding of the target with an endogenous ligand to which it naturally binds. In this case, the antibody binds to the target and masks a binding site of the naturally occurring ligand, wherein the ligand serves as an effector molecule. Thus the receptor mediates
20 a signal transduction pathway for which ligand is responsible.

Alternatively, the effect may be one in which the antibody elicits a physiological result by virtue of binding to an effector binding site on the target molecule. In this case the target, a receptor having an endogenous ligand which may be absent or defective in the disease or pathology, binds the antibody as a surrogate effector ligand, initiating a receptor-based signal
25 transduction event by the receptor.

A therapeutically effective amount of an antibody of the invention relates generally to the amount needed to achieve a therapeutic objective. As noted above, this may be a binding interaction between the antibody and its target antigen that, in certain cases, interferes with the functioning of the target, and in other cases, promotes a physiological response. The amount
30 required to be administered will furthermore depend on the binding affinity of the antibody for its specific antigen, and will also depend on the rate at which an administered antibody is depleted from the free volume other subject to which it is administered. Common ranges for therapeutically effective dosing of an antibody or antibody fragment of the invention may be, by

WO 02/02625

PCT/US01/21191

way of nonlimiting example, from about 0.1 mg/kg body weight to about 50 mg/kg body weight. Common dosing frequencies may range, for example, from twice daily to once a week.

13. Pharmaceutical Compositions of Antibodies

Antibodies specifically binding a FGF-CX protein of the invention, as well as other
5 molecules identified by the screening assays disclosed herein, can be administered for the treatment of various disorders in the form of pharmaceutical compositions. Principles and considerations involved in preparing such compositions, as well as guidance in the choice of components are provided, for example, in Remington : The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Genaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa. : 1995; Drug
10 Absorption Enhancement : Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; and Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

If the antigenic protein is intracellular and whole antibodies are used as inhibitors, internalizing antibodies are preferred. However, liposomes can also be used to deliver the
15 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,
20 e.g., Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993). The formulation herein can 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 can comprise an agent that enhances its function, such as, for example, a cytotoxic agent, cytokine, chemotherapeutic agent, or growth-inhibitory
25 agent. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The active ingredients can 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
30 drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nanoparticles, and nanocapsules) or in macroemulsions.

The formulations to be used for in vivo administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

FGF-CX Recombinant Expression Vectors and Host Cells

Another aspect of the invention pertains to vectors, preferably expression vectors, containing a nucleic acid encoding FGF-CX protein, or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof. As used herein, the term "vector" refers to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid", which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments can be ligated. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments can be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (e.g., bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (e.g., non-episomal mammalian vectors) are integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "expression vectors". In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In the present specification, "plasmid" and "vector" can be used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector. However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors, such as viral vectors (e.g., replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses), which serve equivalent functions.

The recombinant expression vectors of the invention comprise a nucleic acid of the invention in a form suitable for expression of the nucleic acid in a host cell, which means that the recombinant expression vectors include one or more regulatory sequences, selected on the basis of the host cells to be used for expression, that is operatively linked to the nucleic acid sequence to be expressed. Within a recombinant expression vector, "operably linked" is intended to mean that the nucleotide sequence of interest is linked to the regulatory sequence(s) in a manner that allows for expression of the nucleotide sequence (e.g., in an *in vitro* transcription/translation system or in a host cell when the vector is introduced into the host cell). The term "regulatory sequence" is intended to include promoters, enhancers and other expression control elements (e.g., polyadenylation signals). Such regulatory sequences are described, for example, in Gooddel; *GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Regulatory sequences include those that direct constitutive expression of a nucleotide sequence in many types of host cell and those that direct expression of the nucleotide sequence only in certain host cells (e.g.,

WO 02/02625

PCT/US01/21191

tissue-specific regulatory sequences). It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector can depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, etc. The expression vectors of the invention can be introduced into host cells to thereby produce proteins or peptides, including
5 fusion proteins or peptides, encoded by nucleic acids as described herein (e.g., FGF-CX proteins, mutant forms of FGF-CX, fusion proteins, etc.).

The recombinant expression vectors of the invention can be designed for expression of FGF-CX in prokaryotic or eukaryotic cells. For example, FGF-CX can be expressed in bacterial cells such as *E. coli*, insect cells (using baculovirus expression vectors) yeast cells or mammalian
10 cells. Suitable host cells are discussed further in Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Alternatively, the recombinant expression vector can be transcribed and translated *in vitro*, for example using T7 promoter regulatory sequences and T7 polymerase.

Expression of proteins in prokaryotes is most often carried out in *E. coli* with vectors
15 containing constitutive or inducible promoters directing the expression of either fusion or non-fusion proteins. Fusion vectors add a number of amino acids to a protein encoded therein, usually to the amino terminus of the recombinant protein. Such fusion vectors typically serve three purposes: (1) to increase expression of recombinant protein; (2) to increase the solubility of the recombinant protein; and (3) to aid in the purification of the recombinant protein by acting as
20 a ligand in affinity purification. Often, in fusion expression vectors, a proteolytic cleavage site is introduced at the junction of the fusion moiety and the recombinant protein to enable separation of the recombinant protein from the fusion moiety subsequent to purification of the fusion protein. Such enzymes, and their cognate recognition sequences, include Factor Xa, thrombin and enterokinase. Typical fusion expression vectors include pGEX (Pharmacia Biotech Inc;
25 Smith and Johnson (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) and pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) that fuse glutathione S-transferase (GST), maltose E binding protein, or protein A, respectively, to the target recombinant protein.

Examples of suitable inducible non-fusion *E. coli* expression vectors include pTrc (Amrann *et al.*, (1988) *Gene* 69:301-315) and pET 11d (Studier *et al.*, GENE EXPRESSION
30 TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89).

One strategy to maximize recombinant protein expression in *E. coli* is to express the protein in a host bacteria with an impaired capacity to proteolytically cleave the recombinant

WO 02/02625

PCT/US01/21191

protein. See, Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128. Another strategy is to alter the nucleic acid sequence of the nucleic acid to be inserted into an expression vector so that the individual codons for each amino acid are those preferentially utilized in *E. coli* (Wada *et al.*, (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Such alteration of nucleic acid sequences of the invention can be carried out by standard DNA synthesis techniques.

In another embodiment, the FGF-CX expression vector is a yeast expression vector. Examples of vectors for expression in yeast *S. cerevisiae* include pYepSec1 (Baldari, *et al.*, (1987) *EMBO J* 6:229-234), pMFa (Kunjan and Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz *et al.*, (1987) *Gene* 54:113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.), and picZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.).

Alternatively, FGF-CX can be expressed in insect cells using baculovirus expression vectors. Baculovirus vectors available for expression of proteins in cultured insect cells (*e.g.*, SP9 cells) include the pAc series (Smith *et al.* (1983) *Mol Cell Biol* 3:2156-2165) and the pVL series (Lucklow and Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

In yet another embodiment, a nucleic acid of the invention is expressed in mammalian cells using a mammalian expression vector. Examples of mammalian expression vectors include pCDM8 (Seed (1987) *Nature* 329:840) and pMT2PC (Kaufman *et al.* (1987) *EMBO J* 6: 187-195). When used in mammalian cells, the expression vector's control functions are often provided by viral regulatory elements. For example, commonly used promoters are derived from polyoma, Adenovirus 2, cytomegalovirus and Simian Virus 40. For other suitable expression systems for both prokaryotic and eukaryotic cells. See, *e.g.*, Chapters 16 and 17 of Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

In another embodiment, the recombinant mammalian expression vector is capable of directing expression of the nucleic acid preferentially in a particular cell type (*e.g.*, tissue-specific regulatory elements are used to express the nucleic acid). Tissue-specific regulatory elements are known in the art. Non-limiting examples of suitable tissue-specific promoters include the albumin promoter (liver-specific; Pinkert *et al.* (1987) *Genes Dev* 1:268-277), lymphoid-specific promoters (Calame and Eaton (1988) *Adv Immunol* 43:235-275), in particular promoters of T cell receptors (Winoto and Baltimore (1989) *EMBO J* 8:729-733) and immunoglobulins (Banerji *et al.* (1983) *Cell* 33:729-740; Queen and Baltimore (1983) *Cell* 33:741-748), neuron-specific promoters (*e.g.*, the neurofilament promoter; Byrne and Ruddle

WO 02/02625

PCT/US01/21191

(1989) *PNAS* 86:5473-5477), pancreas-specific promoters (Eklund *et al.* (1985) *Science* 230:912-916), and mammary gland-specific promoters (*e.g.*, milk whey promoter; U.S. Pat. No. 4,873,316 and European Application Publication No. 264,166). Developmentally-regulated promoters are also encompassed, *e.g.*, the murine hox promoters (Kessel and Gruss (1990) *Science* 249:374-379) and the α -fetoprotein promoter (Campes and Tilghman (1989) *Genes Dev* 3:537-546).

The invention further provides a recombinant expression vector comprising a DNA molecule of the invention cloned into the expression vector in an antisense orientation. That is, the DNA molecule is operatively linked to a regulatory sequence in a manner that allows for expression (by transcription of the DNA molecule) of an RNA molecule that is antisense to FGF-CX mRNA. Regulatory sequences operatively linked to a nucleic acid cloned in the antisense orientation can be chosen that direct the continuous expression of the antisense RNA molecule in a variety of cell types, for instance viral promoters and/or enhancers, or regulatory sequences can be chosen that direct constitutive, tissue specific or cell type specific expression of antisense RNA. The antisense expression vector can be in the form of a recombinant plasmid, phagemid or attenuated virus in which antisense nucleic acids are produced under the control of a high efficiency regulatory region, the activity of which can be determined by the cell type into which the vector is introduced. For a discussion of the regulation of gene expression using antisense genes see Weintraub *et al.*, "Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis," *Reviews-Trends in Genetics*, Vol. 1(1) 1986.

Another aspect of the invention pertains to host cells into which a recombinant expression vector of the invention has been introduced. The terms "host cell" and "recombinant host cell" are used interchangeably herein. It is understood that such terms refer not only to the particular subject cell but to the progeny or potential progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term as used herein.

A host cell can be any prokaryotic or eukaryotic cell. For example, FGF-CX protein can be expressed in bacterial cells such as *E. coli*, insect cells, yeast or mammalian cells (such as Chinese hamster ovary cells (CHO) or COS cells). Other suitable host cells are known to those skilled in the art.

Vector DNA can be introduced into prokaryotic or eukaryotic cells via conventional transformation or transfection techniques. As used herein, the terms "transformation" and

WO 02/02625

PCT/US01/21191

"transfection" are intended to refer to a variety of art-recognized techniques for introducing foreign nucleic acid (e.g., DNA) into a host cell, including calcium phosphate or calcium chloride co-precipitation, DEAE-dextran-mediated transfection, lipofection, or electroporation. Suitable methods for transforming or transfecting host cells can be found in Sambrook, *et al.*

5 (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), and other laboratory manuals.

For stable transfection of mammalian cells, it is known that, depending upon the expression vector and transfection technique used, only a small fraction of cells may integrate the foreign DNA into their genome. In order to identify and select these integrants, a gene that encodes a selectable marker (e.g., resistance to antibiotics) is generally introduced into the host cells along with the gene of interest. Various selectable markers include those that confer resistance to drugs, such as G418, hygromycin and methotrexate. Nucleic acid encoding a selectable marker can be introduced into a host cell on the same vector as that encoding FGF-CX or can be introduced on a separate vector. Cells stably transfected with the introduced nucleic acid can be identified by drug selection (e.g., cells that have incorporated the selectable marker gene will survive, while the other cells die).

A host cell of the invention, such as a prokaryotic or eukaryotic host cell in culture, can be used to produce (*i.e.*, express) FGF-CX protein. Accordingly, the invention further provides methods for producing FGF-CX protein using the host cells of the invention. In one embodiment, the method comprises culturing the host cell of invention (into which a recombinant expression vector encoding FGF-CX has been introduced) in a suitable medium such that FGF-CX protein is produced. In another embodiment, the method further comprises isolating FGF-CX from the medium or the host cell.

25 Transgenic animals

The host cells of the invention can also be used to produce nonhuman transgenic animals. For example, in one embodiment, a host cell of the invention is a fertilized oocyte or an embryonic stem cell into which FGF-CX-coding sequences have been introduced. Such host cells can then be used to create non-human transgenic animals in which exogenous FGF-CX sequences have been introduced into their genome or homologous recombinant animals in which endogenous FGF-CX sequences have been altered. Such animals are useful for studying the function and/or activity of FGF-CX and for identifying and/or evaluating modulators of FGF-CX activity. As used herein, a "transgenic animal" is a non-human animal, preferably a

WO 02/02625

PCT/US01/21191

mammal, more preferably a rodent such as a rat or mouse, in which one or more of the cells of the animal includes a transgene. Other examples of transgenic animals include non-human primates, sheep, dogs, cows, goats, chickens, amphibians, etc. A transgene is exogenous DNA that is integrated into the genome of a cell from which a transgenic animal develops and that
5 remains in the genome of the mature animal, thereby directing the expression of an encoded gene product in one or more cell types or tissues of the transgenic animal. As used herein, a "homologous recombinant animal" is a non-human animal, preferably a mammal, more preferably a mouse, in which an endogenous FGF-CX gene has been altered by homologous recombination between the endogenous gene and an exogenous DNA molecule introduced into a
10 cell of the animal, e.g., an embryonic cell of the animal, prior to development of the animal.

A transgenic animal of the invention can be created by introducing FGF-CX-encoding nucleic acid into the male pronuclei of a fertilized oocyte, e.g., by microinjection, retroviral infection, and allowing the oocyte to develop in a pseudopregnant female foster animal. The human FGF-CX DNA sequence of SEQ ID NO:1 can be introduced as a transgene into the
15 genome of a non-human animal. Alternatively, a nonhuman homologue of the human FGF-CX gene, such as a mouse FGF-CX gene, can be isolated based on hybridization to the human FGF-CX cDNA (described further above) and used as a transgene. Intronic sequences and polyadenylation signals can also be included in the transgene to increase the efficiency of expression of the transgene. A tissue-specific regulatory sequence(s) can be operably linked to
20 the FGF-CX transgene to direct expression of FGF-CX protein to particular cells. Methods for generating transgenic animals via embryo manipulation and microinjection, particularly animals such as mice, have become conventional in the art and are described, for example, in U.S. Pat. Nos. 4,736,866; 4,870,009; and 4,873,191; and Hogan 1986, in: MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Similar methods are
25 used for production of other transgenic animals. A transgenic founder animal can be identified based upon the presence of the FGF-CX transgene in its genome and/or expression of FGF-CX mRNA in tissues or cells of the animals. A transgenic founder animal can then be used to breed additional animals carrying the transgene. Moreover, transgenic animals carrying a transgene encoding FGF-CX can further be bred to other transgenic animals carrying other transgenes.

To create a homologous recombinant animal, a vector is prepared which contains at least
30 a portion of a FGF-CX gene into which a deletion, addition or substitution has been introduced to thereby alter, e.g., functionally disrupt, the FGF-CX gene. The FGF-CX gene can be a human gene (e.g., SEQ ID NO:1), but more preferably, is a non-human homologue of a human FGF-

WO 02/02625

PCT/US01/21191

CX gene. For example, a mouse homologue of human FGF-CX gene of SEQ ID NO:1 can be used to construct a homologous recombination vector suitable for altering an endogenous FGF-CX gene in the mouse genome. In one embodiment, the vector is designed such that, upon homologous recombination, the endogenous FGF-CX gene is functionally disrupted (*i.e.*, no longer encodes a functional protein; also referred to as a "knock out" vector).

Alternatively, the vector can be designed such that, upon homologous recombination, the endogenous FGF-CX gene is mutated or otherwise altered but still encodes functional protein (*e.g.*, the upstream regulatory region can be altered to thereby alter the expression of the endogenous FGF-CX protein). In the homologous recombination vector, the altered portion of the FGF-CX gene is flanked at its 5' and 3' ends by additional nucleic acid of the FGF-CX gene to allow for homologous recombination to occur between the exogenous FGF-CX gene carried by the vector and an endogenous FGF-CX gene in an embryonic stem cell. The additional flanking FGF-CX nucleic acid is of sufficient length for successful homologous recombination with the endogenous gene. Typically, several kilobases of flanking DNA (both at the 5' and 3' ends) are included in the vector. See *e.g.*, Thomas *et al.* (1987) *Cell* 51:503 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 FGF-CX gene has homologously recombined with the endogenous FGF-CX gene are selected (see *e.g.*, Li *et al.* (1992) *Cell* 69:915).

The selected cells are then injected into a blastocyst of an animal (*e.g.*, a mouse) to form aggregation chimeras. See *e.g.*, Bradley 1987, In: TERATOCARCINOMAS AND EMBRYONIC STEM CELLS: A PRACTICAL APPROACH, Robertson, ed. IRL, Oxford, pp. 113-152. A chimeric embryo can then be implanted into a suitable pseudopregnant female foster animal and the embryo brought to term. Progeny harboring the homologously recombined DNA in their germ cells can be used to breed animals in which all cells of the animal contain the homologously recombined DNA by germline transmission of the transgene. Methods for constructing homologous recombination vectors and homologous recombinant animals are described further in Bradley (1991) *Curr Opin Biotechnol* 2:823-829; PCT International Publication Nos.: WO 90/11354; WO 91/01140; WO 92/0968; and WO 93/04169.

In another embodiment, transgenic non-humans animals can be produced that contain selected systems that allow for regulated expression of the transgene. One example of such a system is the cre/loxP recombinase system of bacteriophage P1. For a description of the cre/loxP recombinase system, see, *e.g.*, Lakso *et al.* (1992) *PNAS* 89:6232-6236. Another

WO 02/02625

PCT/US01/21191

example of a recombinase system is the FLP recombinase system of *Saccharomyces cerevisiae* (O'Gorman *et al.* (1991) *Science* 251:1351-1355. If a cre/loxP recombinase system is used to regulate expression of the transgene, animals containing transgenes encoding both the Cre recombinase and a selected protein are required. Such animals can be provided through the
5 construction of "double" transgenic animals, e.g., by mating two transgenic animals, one containing a transgene encoding a selected protein and the other containing a transgene encoding a recombinase.

Clones of the non-human transgenic animals described herein can also be produced according to the methods described in Wilmot *et al.* (1997) *Nature* 385:810-813. In brief, a cell,
10 e.g., a somatic cell, from the transgenic animal can be isolated and induced to exit the growth cycle and enter G₀ phase. The quiescent cell can then be fused, e.g., through the use of electrical pulses, to an enucleated oocyte from an animal of the same species from which the quiescent cell is isolated. The reconstructed oocyte is then cultured such that it develops to morula or blastocyte and then transferred to pseudopregnant female foster animal. The offspring borne of
15 this female foster animal will be a clone of the animal from which the cell, e.g., the somatic cell, is isolated.

Pharmaceutical Compositions

The FGF-CX nucleic acid molecules, FGF-CX proteins, and anti-FGF-CX antibodies (also referred to herein as "active compounds") of the invention, and derivatives, fragments,
20 analogs and homologs thereof, can be incorporated into pharmaceutical compositions suitable for administration. Such compositions typically comprise the nucleic acid molecule, protein, or antibody and a pharmaceutically acceptable carrier. As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" is intended to include any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like,
25 compatible with pharmaceutical administration. Suitable carriers are described in the most recent edition of Remington's Pharmaceutical Sciences, a standard reference text in the field, which is incorporated herein by reference. Preferred examples of such carriers or diluents include, but are not limited to, water, saline, Ringer's solutions, dextrose solution, and 5% human serum albumin. Liposomes and non-aqueous vehicles such as fixed oils may also be
30 used. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active compound, use thereof in the compositions is contemplated. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

A pharmaceutical composition of the invention is formulated to be compatible with its intended route of administration. Examples of routes of administration include parenteral, *e.g.*, intravenous, intradermal, subcutaneous, oral (*e.g.*, inhalation), transdermal (topical), transmucosal, and rectal administration. Solutions or suspensions used for parenteral, 5 intradermal, or subcutaneous application can include the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; antioxidants such as ascorbic acid or sodium bisulfite; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid; buffers such as acetates, citrates or phosphates, and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. The pH can be adjusted with 10 acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

Pharmaceutical compositions suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of 15 sterile injectable solutions or dispersion. For intravenous administration, suitable carriers include physiological saline, bacteriostatic water, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) or phosphate buffered saline (PBS). In all cases, the composition must be sterile and should be fluid to the extent that easy syringeability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of 20 microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prevention of the 25 action of microorganisms can be achieved by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, ascorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent which delays 30 absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound (*e.g.*, a FGF-CX protein or anti-FGF-CX antibody) in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filtered

WO 02/02625

PCT/US01/21191

sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle that contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying that yields a powder of
5 the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

Oral compositions generally include an inert diluent or an edible carrier. They can be enclosed in gelatin capsules or compressed into tablets. For the purpose of oral therapeutic administration, the active compound can be incorporated with excipients and used in the form of
10 tablets, troches, or capsules. Oral compositions can also be prepared using a fluid carrier for use as a mouthwash, wherein the compound in the fluid carrier is applied orally and swished and expectorated or swallowed. Pharmaceutically compatible binding agents, and/or adjuvant materials can be included as part of the composition. The tablets, pills, capsules, troches and the like can contain any of the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder
15 such as microcrystalline cellulose, gum tragacanth or gelatin; an excipient such as starch or lactose, a disintegrating agent such as alginic acid, Primogel, or corn starch; a lubricant such as magnesium stearate or Sterotes; a glidant such as colloidal silicon dioxide; a sweetening agent such as sucrose or saccharin; or a flavoring agent such as peppermint, methyl salicylate, or orange flavoring.

20 For administration by inhalation, the compounds are delivered in the form of an aerosol spray from pressured container or dispenser which contains a suitable propellant, e.g., a gas such as carbon dioxide, or a nebulizer.

Systemic administration can also be by transmucosal or transdermal means. For transmucosal or transdermal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated
25 are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art, and include, for example, for transmucosal administration, detergents, bile salts, and fusidic acid derivatives. Transmucosal administration can be accomplished through the use of nasal sprays or suppositories. For transdermal administration, the active compounds are formulated into ointments, salves, gels, or creams as generally known in the art.

30 The compounds can also be prepared in the form of suppositories (e.g., with conventional suppository bases such as cocoa butter and other glycerides) or retention enemas for rectal delivery.

In one embodiment, the active compounds are prepared with carriers that will protect the compound against rapid elimination from the body, such as a controlled release formulation,

WO 02/02625

PCT/US01/21191

including implants and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Methods for preparation of such formulations will be apparent to those skilled in the art. The materials can also be obtained commercially
5 from Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Liposomal suspensions (including liposomes targeted to infected cells with monoclonal antibodies to viral antigens) can also be used as pharmaceutically acceptable carriers. These can be prepared according to methods known to those skilled in the art, for example, as described in U.S. Pat. No. 4,522,811.

It is especially advantageous to formulate oral or parenteral compositions in dosage unit
10 form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subject to be treated, each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on the unique
15 characteristics of the active compound and the particular therapeutic effect to be achieved.

The nucleic acid molecules of the invention can be inserted into vectors and used as gene therapy vectors. Gene therapy vectors can be delivered to a subject by any of a number of routes, e.g., as described in U.S. Patent Nos. 5,703,055. Delivery can thus also include, e.g., intravenous injection, local administration (see U.S. Pat. No. 5,328,470) or stereotactic injection
20 (see e.g., Chen *et al.* (1994) *PNAS* 91:3054-3057). The pharmaceutical preparation of the gene therapy vector can include the gene therapy vector in an acceptable diluent, or can comprise a slow release matrix in which the gene delivery vehicle is imbedded. Alternatively, where the complete gene delivery vector can be produced intact from recombinant cells, e.g., retroviral vectors, the pharmaceutical preparation can include one or more cells that produce the gene
25 delivery system.

The pharmaceutical compositions can be included in a container, pack, or dispenser together with instructions for administration.

Uses and Methods of the Invention

The nucleic acid molecules, proteins, protein homologues, and antibodies described
30 herein can be used in one or more of the following methods: (a) screening assays; (b) detection assays (e.g., chromosomal mapping, tissue typing, forensic biology), (c) predictive medicine (e.g., diagnostic assays, prognostic assays, monitoring clinical trials, and pharmacogenomics);

WO 02/02625

PCT/US01/21191

and (d) methods of treatment (e.g., therapeutic and prophylactic). As described herein, in one embodiment, a FGF-CX protein of the invention has the ability to bind ATP.

The isolated nucleic acid molecules of the invention can be used to express FGF-CX protein (e.g., via a recombinant expression vector in a host cell in gene therapy applications), to
5 detect FGF-CX mRNA (e.g., in a biological sample) or a genetic lesion in a FGF-CX gene, and to modulate FGF-CX activity, as described further below. In addition, the FGF-CX proteins can be used to screen drugs or compounds that modulate the FGF-CX activity or expression as well as to treat disorders characterized by insufficient or excessive production of FGF-CX protein, for
10 example proliferative or differentiative disorders, or production of FGF-CX protein forms that have decreased or aberrant activity compared to FGF-CX wild type protein. In addition, the anti-FGF-CX antibodies of the invention can be used to detect and isolate FGF-CX proteins and modulate FGF-CX activity.

This invention further pertains to novel agents identified by the above described screening assays and uses thereof for treatments as described herein.

15 Screening Assays

The invention provides a method (also referred to herein as a "screening assay") for identifying modulators, *i.e.*, candidate or test compounds or agents (e.g., peptides, peptidomimetics, small molecules or other drugs) that bind to FGF-CX proteins or have a
20 stimulatory or inhibitory effect on, for example, FGF-CX expression or FGF-CX activity.

In one embodiment, the invention provides assays for screening candidate or test compounds which bind to or modulate the activity of a FGF-CX protein or polypeptide or
25 biologically active portion thereof. The test compounds of the present invention can be obtained using any of the numerous approaches in combinatorial library methods known in the art, including: biological libraries; spatially addressable parallel solid phase or solution phase
libraries; synthetic library methods requiring deconvolution; the "one-bead one-compound"
library method; and synthetic library methods using affinity chromatography selection. The
biological library approach is limited to peptide libraries, while the other four approaches are
applicable to peptide, non-peptide oligomer or small molecule libraries of compounds (Lan
(1997) *Anticancer Drug Des* 12:145).

30 Examples of methods for the synthesis of molecular libraries can be found in the art, for example in: DeWitt *et al.* (1993) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90:6909; Erb *et al.* (1994) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 91:11422; Zuckermann *et al.* (1994) *J Med Chem* 37:2678; Cho *et al.* (1993)

WO 02/02625

PCT/US01/21191

Science 261:1303; Carrell *et al.* (1994) *Angew Chem Int Ed Engl* 33:2059; Carrell *et al.* (1994) *Angew Chem Int Ed Engl* 33:2061; and Gallop *et al.* (1994) *J Med Chem* 37:1233.

Libraries of compounds may be presented in solution (*e.g.*, Houghten (1992) *Biotechniques* 13:412-421), or on beads (Lam (1991) *Nature* 354:82-84), on chips (Fodor (1993) *Nature* 364:555-556), bacteria (Ladner U.S. Pat. No. 5,223,409), spores (Ladner USP '409), plasmids (Cull *et al.* (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865-1869) or on phage (Scott and Smith (1990) *Science* 249:386-390; Devlin (1990) *Science* 249:404-406; Cwirla *et al.* (1990) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 87:6378-6382; Felici (1991) *J Mol Biol* 222:301-310; Ladner *above.*).

In one embodiment, an assay is a cell-based assay in which a cell which expresses a membrane-bound form of FGF-CX protein, or a biologically active portion thereof, on the cell surface is contacted with a test compound and the ability of the test compound to bind to a FGF-CX protein determined. The cell, for example, can be of mammalian origin or a yeast cell. Determining the ability of the test compound to bind to the FGF-CX protein can be accomplished, for example, by coupling the test compound with a radioisotope or enzymatic label such that binding of the test compound to the FGF-CX protein or biologically active portion thereof can be determined by detecting the labeled compound in a complex. For example, test compounds can be labeled with ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , or ^3H , either directly or indirectly, and the radioisotope detected by direct counting of radioemission or by scintillation counting. Alternatively, test compounds can be enzymatically labeled with, for example, horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, or luciferase, and the enzymatic label detected by determination of conversion of an appropriate substrate to product. In one embodiment, the assay comprises contacting a cell which expresses a membrane-bound form of FGF-CX protein, or a biologically active portion thereof, on the cell surface with a known compound which binds FGF-CX to form an assay mixture, contacting the assay mixture with a test compound, and determining the ability of the test compound to interact with a FGF-CX protein, wherein determining the ability of the test compound to interact with a FGF-CX protein comprises determining the ability of the test compound to preferentially bind to FGF-CX or a biologically active portion thereof as compared to the known compound.

In another embodiment, an assay is a cell-based assay comprising contacting a cell expressing a membrane-bound form of FGF-CX protein, or a biologically active portion thereof, on the cell surface with a test compound and determining the ability of the test compound to modulate (*e.g.*, stimulate or inhibit) the activity of the FGF-CX protein or biologically active portion thereof. Determining the ability of the test compound to modulate the activity of FGF-

WO 02/02625

PCT/US01/21191

CX or a biologically active portion thereof can be accomplished, for example, by determining the ability of the FGF-CX protein to bind to or interact with a FGF-CX target molecule. As used herein, a "target molecule" is a molecule with which a FGF-CX protein binds or interacts in nature, for example, a molecule on the surface of a cell which expresses a FGF-CX interacting
5 protein, a molecule on the surface of a second cell, a molecule in the extracellular milieu, a molecule associated with the internal surface of a cell membrane or a cytoplasmic molecule. A FGF-CX target molecule can be a non-FGF-CX molecule or a FGF-CX protein or polypeptide of the present invention. In one embodiment, a FGF-CX target molecule is a component of a signal transduction pathway that facilitates transduction of an extracellular signal (e.g., a signal
10 generated by binding of a compound to a membrane-bound FGF-CX molecule) through the cell membrane and into the cell. The target, for example, can be a second intercellular protein that has catalytic activity or a protein that facilitates the association of downstream signaling molecules with FGF-CX.

Determining the ability of the FGF-CX protein to bind to or interact with a FGF-CX
15 target molecule can be accomplished by one of the methods described above for determining direct binding. In one embodiment, determining the ability of the FGF-CX protein to bind to or interact with a FGF-CX target molecule can be accomplished by determining the activity of the target molecule. For example, the activity of the target molecule can be determined by detecting induction of a cellular second messenger of the target (i.e. intracellular Ca^{2+} , diacylglycerol, IP_3 ,
20 etc.), detecting catalytic/enzymatic activity of the target on an appropriate substrate, detecting the induction of a reporter gene (comprising a FGF-CX-responsive regulatory element operatively linked to a nucleic acid encoding a detectable marker, e.g., luciferase), or detecting a cellular response, for example, cell survival, cellular differentiation, or cell proliferation.

In yet another embodiment, an assay of the present invention is a cell-free assay
25 comprising contacting a FGF-CX protein or biologically active portion thereof with a test compound and determining the ability of the test compound to bind to the FGF-CX protein or biologically active portion thereof. Binding of the test compound to the FGF-CX protein can be determined either directly or indirectly as described above. In one embodiment, the assay
30 comprises contacting the FGF-CX protein or biologically active portion thereof with a known compound which binds FGF-CX to form an assay mixture, contacting the assay mixture with a test compound, and determining the ability of the test compound to interact with a FGF-CX protein, wherein determining the ability of the test compound to interact with a FGF-CX protein

WO 02/02625

PCT/US01/21191

comprises determining the ability of the test compound to preferentially bind to FGF-CX or biologically active portion thereof as compared to the known compound.

In another embodiment, an assay is a cell-free assay comprising contacting FGF-CX protein or biologically active portion thereof with a test compound and determining the ability of
5 the test compound to modulate (e.g., stimulate or inhibit) the activity of the FGF-CX protein or biologically active portion thereof. Determining the ability of the test compound to modulate the activity of FGF-CX can be accomplished, for example, by determining the ability of the FGF-CX protein to bind to a FGF-CX target molecule by one of the methods described above for determining direct binding. In an alternative embodiment, determining the ability of the test
10 compound to modulate the activity of FGF-CX can be accomplished by determining the ability of the FGF-CX protein further modulate a FGF-CX target molecule. For example, the catalytic/enzymatic activity of the target molecule on an appropriate substrate can be determined as previously described.

In yet another embodiment, the cell-free assay comprises contacting the FGF-CX protein
15 or biologically active portion thereof with a known compound which binds FGF-CX to form an assay mixture, contacting the assay mixture with a test compound, and determining the ability of the test compound to interact with a FGF-CX protein, wherein determining the ability of the test compound to interact with a FGF-CX protein comprises determining the ability of the FGF-CX protein to preferentially bind to or modulate the activity of a FGF-CX target molecule.

The cell-free assays of the present invention are amenable to use of both the soluble form
20 or the membrane-bound form of FGF-CX. In the case of cell-free assays comprising the membrane-bound form of FGF-CX, it may be desirable to utilize a solubilizing agent such that the membrane-bound form of FGF-CX is maintained in solution. Examples of such solubilizing agents include non-ionic detergents such as n-octylglucoside, n-dodecylglucoside,
25 n-dodecylmaltoside, octanoyl-N-methylglucamide, decanoyl-N-methylglucamide, Triton[®] X-100, Triton[®] X-114, Thesit[®], Isotridecylpoly(ethylene glycol ether)_m, N-dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane sulfonate, 3-(3-cholanidopropyl)dimethylamminol-1-propane sulfonate (CHAPS), or 3-(3-cholanidopropyl)dimethylamminol-2-hydroxy-1-propane sulfonate (CHAPSO).

In more than one embodiment of the above assay methods of the present invention, it
30 may be desirable to immobilize either FGF-CX or its target molecule to facilitate separation of complexed from uncomplexed forms of one or both of the proteins, as well as to accommodate automation of the assay. Binding of a test compound to FGF-CX, or interaction of FGF-CX

WO 02/02625

PCT/US01/21191

with a target molecule in the presence and absence of a candidate compound, can be accomplished in any vessel suitable for containing the reactants. Examples of such vessels include microtiter plates, test tubes, and micro-centrifuge tubes. In one embodiment, a fusion protein can be provided that adds a domain that allows one or both of the proteins to be bound to a matrix. For example, GST-FGF-CX fusion proteins or GST-target fusion proteins can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, MO) or glutathione derivatized microtiter plates, that are then combined with the test compound or the test compound and either the non-adsorbed target protein or FGF-CX protein, and the mixture is incubated under conditions conducive to complex formation (e.g., at physiological conditions for salt and pH). Following incubation, the beads or microtiter plate wells are washed to remove any unbound components, the matrix immobilized in the case of beads, complex determined either directly or indirectly, for example, as described above. Alternatively, the complexes can be dissociated from the matrix, and the level of FGF-CX binding or activity determined using standard techniques.

Other techniques for immobilizing proteins on matrices can also be used in the screening assays of the invention. For example, either FGF-CX or its target molecule can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated FGF-CX or target molecules can be prepared from biotin-NHS (N-hydroxy-succinimide) using techniques well known in the art (e.g., biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.), and immobilized in the wells of streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemical). Alternatively, antibodies reactive with FGF-CX or target molecules, but which do not interfere with binding of the FGF-CX protein to its target molecule, can be derivatized to the wells of the plate, and unbound target or FGF-CX trapped in the wells by antibody conjugation. Methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized complexes, include immunodetection of complexes using antibodies reactive with the FGF-CX or target molecule, as well as enzyme-linked assays that rely on detecting an enzymatic activity associated with the FGF-CX or target molecule.

In another embodiment, modulators of FGF-CX expression are identified in a method wherein a cell is contacted with a candidate compound and the expression of FGF-CX mRNA or protein in the cell is determined. The level of expression of FGF-CX mRNA or protein in the presence of the candidate compound is compared to the level of expression of FGF-CX mRNA or protein in the absence of the candidate compound. The candidate compound can then be identified as a modulator of FGF-CX expression based on this comparison. For example, when

WO 02/02625

PCT/US01/21191

expression of FGF-CX mRNA or protein is greater (statistically significantly greater) in the presence of the candidate compound than in its absence, the candidate compound is identified as a stimulator of FGF-CX mRNA or protein expression. Alternatively, when expression of FGF-CX mRNA or protein is less (statistically significantly less) in the presence of the candidate
5 compound than in its absence, the candidate compound is identified as an inhibitor of FGF-CX mRNA or protein expression. The level of FGF-CX mRNA or protein expression in the cells can be determined by methods described herein for detecting FGF-CX mRNA or protein.

In yet another aspect of the invention, the FGF-CX proteins can be used as "bait proteins" in a two-hybrid assay or three hybrid assay (see, e.g., U.S. Pat. No. 5,283,317; Zervos
10 *et al.* (1993) *Cell* 72:223-232; Madura *et al.* (1993) *J Biol Chem* 268:12046-12054; Bartel *et al.* (1993) *Biotechniques* 14:920-924; Iwabuchi *et al.* (1993) *Oncogene* 8:1693-1696; and Brent WO94/10300), to identify other proteins that bind to or interact with FGF-CX ("FGF-CX-binding proteins" or "FGF-CX-bp") and modulate FGF-CX activity. Such FGF-CX-binding proteins are also likely to be involved in the propagation of signals by the FGF-CX proteins as,
15 for example, upstream or downstream elements of the FGF-CX pathway.

The two-hybrid system is based on the modular nature of most transcription factors, which consist of separable DNA-binding and activation domains. Briefly, the assay utilizes two different DNA constructs. In one construct, the gene that codes for FGF-CX is fused to a gene encoding the DNA binding domain of a known transcription factor (e.g., GAL-4). In the other
20 construct, a DNA sequence, from a library of DNA sequences, that encodes an unidentified protein ("prey" or "sample") is fused to a gene that codes for the activation domain of the known transcription factor. If the "bait" and the "prey" proteins are able to interact, *in vivo*, forming a FGF-CX-dependent complex, the DNA-binding and activation domains of the transcription factor are brought into close proximity. This proximity allows transcription of a reporter gene
25 (e.g., LacZ) that is operably linked to a transcriptional regulatory site responsive to the transcription factor. Expression of the reporter gene can be detected and cell colonies containing the functional transcription factor can be isolated and used to obtain the cloned gene that encodes the protein which interacts with FGF-CX.

This invention further pertains to novel agents identified by the above-described
30 screening assays and uses thereof for treatments as described herein.

Detection Assays

Portions or fragments of the cDNA sequences identified herein (and the corresponding complete gene sequences) can be used in numerous ways as polynucleotide reagents. For

WO 02/02625

PCT/US01/21191

example, these sequences can be used to: (i) map their respective genes on a chromosome; and, thus, locate gene regions associated with genetic disease; (ii) identify an individual from a minute biological sample (tissue typing); and (iii) aid in forensic identification of a biological sample.

5 The FGF-CX sequences of the present invention can also be used to identify individuals from minute biological samples. In this technique, an individual's genomic DNA is digested with one or more restriction enzymes, and probed on a Southern blot to yield unique bands for identification. The sequences of the present invention are useful as additional DNA markers for RFLP ("restriction fragment length polymorphisms," described in U.S. Pat. No. 5,272,057).

10 Furthermore, the sequences of the present invention can be used to provide an alternative technique that determines the actual base-by-base DNA sequence of selected portions of an individual's genome. Thus, the FGF-CX sequences described herein can be used to prepare two PCR primers from the 5' and 3' ends of the sequences. These primers can then be used to amplify an individual's DNA and subsequently sequence it.

15 Panels of corresponding DNA sequences from individuals, prepared in this manner, can provide unique individual identifications, as each individual will have a unique set of such DNA sequences due to allelic differences. The sequences of the present invention can be used to obtain such identification sequences from individuals and from tissue. The FGF-CX sequences of the invention uniquely represent portions of the human genome. Allelic variation occurs to
20 some degree in the coding regions of these sequences, and to a greater degree in the noncoding regions. It is estimated that allelic variation between individual humans occurs with a frequency of about once per each 500 bases. Much of the allelic variation is due to single nucleotide polymorphisms (SNPs), which include restriction fragment length polymorphisms (RFLPs).

Each of the sequences described herein can, to some degree, be used as a standard
25 against which DNA from an individual can be compared for identification purposes. Because greater numbers of polymorphisms occur in the noncoding regions, fewer sequences are necessary to differentiate individuals. The noncoding sequences of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26, as described above, can comfortably provide positive individual identification with a panel of perhaps 10 to 1,000 primers that each yield a noncoding amplified sequence of 100
30 bases. If predicted coding sequences are used, a more appropriate number of primers for positive individual identification would be 500-2,000.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

Predictive Medicine

The present invention also pertains to the field of predictive medicine in which diagnostic assays, prognostic assays, pharmacogenomics, and monitoring clinical trials are used for prognostic (predictive) purposes to thereby treat an individual prophylactically.

5 Accordingly, one aspect of the present invention relates to diagnostic assays for determining FGF-CX protein and/or nucleic acid expression as well as FGF-CX activity, in the context of a biological sample (*e.g.*, blood, serum, cells, tissue) to thereby determine whether an individual is afflicted with a disease or disorder, or is at risk of developing a disorder, associated with aberrant FGF-CX expression or activity. The invention also provides for prognostic (or
10 predictive) assays for determining whether an individual is at risk of developing a disorder associated with FGF-CX protein, nucleic acid expression or activity. For example, mutations in a FGF-CX gene can be assayed in a biological sample. Such assays can be used for prognostic or predictive purpose to thereby prophylactically treat an individual prior to the onset of a disorder characterized by or associated with FGF-CX protein, nucleic acid expression or activity.

15 Another aspect of the invention provides methods for determining FGF-CX protein, nucleic acid expression or FGF-CX activity in an individual to thereby select appropriate therapeutic or prophylactic agents for that individual (referred to herein as "pharmacogenomics"). Pharmacogenomics allows for the selection of agents (*e.g.*, drugs) for therapeutic or prophylactic treatment of an individual based on the genotype of the individual
20 (*e.g.*, the genotype of the individual examined to determine the ability of the individual to respond to a particular agent.)

Yet another aspect of the invention pertains to monitoring the influence of agents (*e.g.*, drugs, compounds) on the expression or activity of FGF-CX in clinical trials.

These and other agents are described in further detail in the following sections.

25 Diagnostic Assays

Fibroblast growth factors FGF-1 through FGF-9 generally promote cell proliferation in cells carrying the particular growth factor receptor. Examples of FGF growth promotion include epithelial cells, such as fibroblasts and keratinocytes, in the anterior eye after surgery. Other conditions in which proliferation of cells plays a role include tumors, restenosis, psoriasis,
30 Dupuytren's contracture, diabetic complications, Kaposi's sarcoma and rheumatoid arthritis.

FGF-CX may be used in the method of the invention for detecting its corresponding fibroblast growth factor receptor CX (FGFRCX) in a sample or tissue. The method comprises

WO 02/02625

PCT/US01/21191

contacting the sample or tissue with FGF-CX, allowing formation of receptor-ligand pairs, and detecting any FGFR/CX: FGF-CX pairs. Compositions containing FGF-CX can be used to increase FGFR/CX activity, for example to stimulate cartilage or bone repair. Compositions containing FGF-CX antagonists or FGF-CX binding agents (e.g. anti-FGF-CX antibodies) can be used to treat diseases caused by an excess of FGF-CX or overactivity of FGFR/CX, especially multiple or solitary hereditary exostosis, hallux valgus deformity, achondroplasia, synovial chondromatosis and endochondromas.

Glia activating factor (GAF) and the DNA encoding GAF act to specifically promote growth of glial cells. Some examples of glia-associated disorders in which GAF may be utilized to modulate glial cell activities are cerebral lesions, cerebral edema, senile dementia, Alzheimer's disease, diabetic neuropathies, etc. Similarly, FGF-CX may be used in diagnosis or treating glial cell related disorders. The glial-cell modulating activity of FGF-CX may be as a neuroprotective-like activity, and FGF-CX may be used as a neuroprotective agent. Due to the close homology of FGF-CX to FGF-9, which was identified originally as a glia activating factor, it can be presumed that the FGF-CX sequence is also a glia activating factor. FGF-CX can therefore be used to stimulate the growth of glia cells and can be used to accelerate healing of cerebral lesions or to treat cerebral edema, senile dementia, Alzheimer's disease, or diabetic neuropathy.

FGF-CX can also be used to stimulate fibroblasts (for accelerating healing of burns, wounds, ulcers, etc), megakaryocytes (to increase the number of platelets), hematopoietic cells, immune system cells, and vascular smooth muscle cells. FGF-CX is also expected to have osteogenesis-promoting activity, and can be used for treating bone fractures and osteoporosis. Assay of FGF-CX polypeptide or nucleic acid moieties may be useful in diagnosis of cerebral tumors, and antibodies against could be used to treat such tumors. It can also be used as a reagent for stimulating growth of cultured cells. An anticipated dosage is 1ng-0.1mg/kg/day, though treatment may vary depending on the type or severity of the disorder being treated. FGF-CX polypeptides may be used as platelet increasing agents, osteogenesis promoting agents or for treating cerebral nervous diseases or hepatopathy such as hepatic cirrhosis. They can also be used to treat cancer when used alongside an anticancer agent. Antibodies directed against the FGF-CX polypeptide, or fragments, derivatives, or analogs thereof, can be used for detecting or determining a biological activity of a FGF-CX polypeptide or for purifying a FGF-CX

WO 02/02625

PCT/US01/21191

polypeptide. Those antibodies that also neutralize the cell growth activity of FGF-CX can be used as anticancer agents.

Many, if not all, homologous proteins are known in the art to have closely related or identical functions. See, *e.g.*, Lewin, "Chapter 21: Structural Genes Belong to Families" In: GENES II, 1985, John Wiley and Sons, Inc., New York. The FGF-CX polypeptide closely resembles the *Xenopus* XFGF-CX protein, which was shown previously to be specifically expressed in highly proliferative tissues (see, *e.g.*, Koga *et al.*, above). Therefore, it is presumed that FGF-CX would also modulate cellular activity in highly proliferative tissues. FGF-CX may thus be particularly useful in diagnosing proliferative disorders and in stimulating the growth of cells and tissues in order to overcome pathological states in which such growth has been suppressed or inhibited. Oligonucleotides corresponding to any one portion of the FGF-CX nucleic acids of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26 may be used to detect the expression of a FGF-CX-like gene. The proteins of the invention may be used to stimulate production of antibodies specifically binding the proteins. Such antibodies may be used in immunodiagnostic procedures to detect the occurrence of the protein in a sample. The proteins of the invention may be used to stimulate cell growth and cell proliferation in conditions in which such growth would be favorable. An example would be to counteract toxic side effects of chemotherapeutic agents on, for example, hematopoiesis and platelet formation, linings of the gastrointestinal tract, and hair follicles. They may also be used to stimulate new cell growth in neurological disorders including, for example, Alzheimer's disease. Alternatively, antagonistic treatments may be administered in which an antibody specifically binding the FGF-CX-like proteins of the invention would abrogate the specific growth-inducing effects of the proteins. Such antibodies may be useful, for example, in the treatment of proliferative disorders including various tumors and benign hyperplasias.

An exemplary method for detecting the presence or absence of FGF-CX in a biological sample involves obtaining a biological sample from a test subject and contacting the biological sample with a compound or an agent capable of detecting FGF-CX protein or nucleic acid (*e.g.*, mRNA, genomic DNA) that encodes FGF-CX protein such that the presence of FGF-CX is detected in the biological sample. An agent for detecting FGF-CX mRNA or genomic DNA is a labeled nucleic acid probe capable of hybridizing to FGF-CX mRNA or genomic DNA. The nucleic acid probe can be, for example, a full-length FGF-CX nucleic acid, such as the nucleic acid of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26, or a portion thereof, such as an oligonucleotide of at

WO 02/02625

PCT/US01/21191

least 15, 30, 50, 100, 250 or 500 nucleotides in length and sufficient to specifically hybridize under stringent conditions to FGF-CX mRNA or genomic DNA, as described above. Other suitable probes for use in the diagnostic assays of the invention are described herein.

An agent for detecting FGF-CX protein is an antibody capable of binding to FGF-CX protein, preferably an antibody with a detectable label. Antibodies can be polyclonal, or more preferably, monoclonal. An intact antibody, or a fragment thereof (e.g., Fab or F(ab)₂) can be used. The term "labeled", with regard to the probe or antibody, is intended to encompass direct labeling of the probe or antibody by coupling (i.e., physically linking) a detectable substance to the probe or antibody, as well as indirect labeling of the probe or antibody by reactivity with another reagent that is directly labeled. Examples of indirect labeling include detection of a primary antibody using a fluorescently labeled secondary antibody and end-labeling of a DNA probe with biotin such that it can be detected with fluorescently labeled streptavidin. The term "biological sample" is intended to include tissues, cells and biological fluids isolated from a subject, as well as tissues, cells and fluids present within a subject. That is, the detection method of the invention can be used to detect FGF-CX mRNA, protein, or genomic DNA in a biological sample *in vitro* as well as *in vivo*. For example, *in vitro* techniques for detection of FGF-CX mRNA include Northern hybridizations and *in situ* hybridizations. *In vitro* techniques for detection of FGF-CX protein include enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs), Western blots, immunoprecipitations and immunofluorescence. *In vitro* techniques for detection of FGF-CX genomic DNA include Southern hybridizations. Furthermore, *in vivo* techniques for detection of FGF-CX protein include introducing into a subject a labeled anti-FGF-CX antibody. For example, the antibody can be labeled with a radioactive marker whose presence and location in a subject can be detected by standard imaging techniques.

In one embodiment, the biological sample contains protein molecules from the test subject. Alternatively, the biological sample can contain mRNA molecules from the test subject or genomic DNA molecules from the test subject. A preferred biological sample is a peripheral blood leukocyte sample isolated by conventional means from a subject.

In another embodiment, the methods further involve obtaining a control biological sample from a control subject, contacting the control sample with a compound or agent capable of detecting FGF-CX protein, mRNA, or genomic DNA, such that the presence of FGF-CX protein, mRNA or genomic DNA is detected in the biological sample, and comparing the presence of FGF-CX protein, mRNA or genomic DNA in the control sample with the presence of FGF-CX protein, mRNA or genomic DNA in the test sample.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

The invention also encompasses kits for detecting the presence of FGF-CX in a biological sample. For example, the kit can comprise: a labeled compound or agent capable of detecting FGF-CX protein or mRNA in a biological sample; means for determining the amount of FGF-CX in the sample; and means for comparing the amount of FGF-CX in the sample with a standard. The compound or agent can be packaged in a suitable container. The kit can further comprise instructions for using the kit to detect FGF-CX protein or nucleic acid.

Prognostic Assays

The diagnostic methods described herein can furthermore be utilized to identify subjects having or at risk of developing a disease or disorder associated with aberrant FGF-CX expression or activity. For example, the assays described herein, such as the preceding diagnostic assays or the following assays, can be utilized to identify a subject having or at risk of developing a disorder associated with FGF-CX protein, nucleic acid expression or activity in, *e.g.*, proliferative or differentiative disorders such as hyperplasias, tumors, restenosis, psoriasis, Dupuytren's contracture, diabetic complications, or rheumatoid arthritis, etc.; and glia-associated disorders such as cerebral lesions, diabetic neuropathies, cerebral edema, senile dementia, Alzheimer's disease, etc. Alternatively, the prognostic assays can be utilized to identify a subject having or at risk for developing a disease or disorder. Thus, the present invention provides a method for identifying a disease or disorder associated with aberrant FGF-CX expression or activity in which a test sample is obtained from a subject and FGF-CX protein or nucleic acid (*e.g.*, mRNA, genomic DNA) is detected, wherein the presence of FGF-CX protein or nucleic acid is diagnostic for a subject having or at risk of developing a disease or disorder associated with aberrant FGF-CX expression or activity. As used herein, a "test sample" refers to a biological sample obtained from a subject of interest. For example, a test sample can be a biological fluid (*e.g.*, serum), cell sample, or tissue.

Furthermore, the prognostic assays described herein can be used to determine whether a subject can be administered an agent (*e.g.*, an agonist, antagonist, peptidomimetic, protein, peptide, nucleic acid, small molecule, or other drug candidate) to treat a disease or disorder associated with aberrant FGF-CX expression or activity. For example, such methods can be used to determine whether a subject can be effectively treated with an agent for a disorder, such as a proliferative disorder, differentiative disorder, glia-associated disorders, etc. Thus, the present invention provides methods for determining whether a subject can be effectively treated with an agent for a disorder associated with aberrant FGF-CX expression or activity in which a test sample is obtained and FGF-CX protein or nucleic acid is detected (*e.g.*, wherein the

WO 02/02625

PCT/US01/21191

presence of FGF-CX protein or nucleic acid is diagnostic for a subject that can be administered the agent to treat a disorder associated with aberrant FGF-CX expression or activity.)

The methods of the invention can also be used to detect genetic lesions in a FGF-CX gene, thereby determining if a subject with the lesioned gene is at risk for, or suffers from, a proliferative disorder, differentiative disorder, glia-associated disorder, etc. In various embodiments, the methods include detecting, in a sample of cells from the subject, the presence or absence of a genetic lesion characterized by at least one of an alteration affecting the integrity of a gene encoding a FGF-CX-protein, or the mis-expression of the FGF-CX gene. For example, such genetic lesions can be detected by ascertaining the existence of at least one of (1) a deletion of one or more nucleotides from a FGF-CX gene; (2) an addition of one or more nucleotides to a FGF-CX gene; (3) a substitution of one or more nucleotides of a FGF-CX gene, (4) a chromosomal rearrangement of a FGF-CX gene; (5) an alteration in the level of a messenger RNA transcript of a FGF-CX gene, (6) aberrant modification of a FGF-CX gene, such as of the methylation pattern of the genomic DNA, (7) the presence of a non-wild type splicing pattern of a messenger RNA transcript of a FGF-CX gene, (8) a non-wild type level of a FGF-CX-protein, (9) allelic loss of a FGF-CX gene, and (10) inappropriate post-translational modification of a FGF-CX-protein. As described herein, there are a large number of assay techniques known in the art which can be used for detecting lesions in a FGF-CX gene. A preferred biological sample is a peripheral blood leukocyte sample isolated by conventional means from a subject. However, any biological sample containing nucleated cells may be used, including, for example, buccal mucosal cells.

In certain embodiments, detection of the lesion involves the use of a probe/primer in a polymerase chain reaction (PCR) (see, e.g., U.S. Pat. Nos. 4,683,195 and 4,683,202), such as anchor PCR or RACE PCR, or, alternatively, in a ligation chain reaction (LCR) (see, e.g., Landegran *et al.* (1988) *Science* 241:1077-1080; and Nakazawa *et al.* (1994) *PNAS* 91:360-364), the latter of which can be particularly useful for detecting point mutations in the FGF-CX-gene (see Abnavaya *et al.* (1995) *Nucl Acids Res* 23:675-682). This method can include the steps of collecting a sample of cells from a patient, isolating nucleic acid (e.g., genomic, mRNA or both) from the cells of the sample, contacting the nucleic acid sample with one or more primers that specifically hybridize to a FGF-CX gene under conditions such that hybridization and amplification of the FGF-CX gene (if present) occurs, and detecting the presence or absence of an amplification product, or detecting the size of the amplification product and comparing the length to a control sample. It is anticipated that PCR and/or LCR may be desirable to use as a

WO 02/02625

PCT/US01/21191

preliminary amplification step in conjunction with any of the techniques used for detecting mutations described herein.

Alternative amplification methods include: self sustained sequence replication (Guatelli *et al.*, 1990, *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1874-1878), transcriptional amplification system (Kwoh, *et al.*, 1989, *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi *et al.*, 1988, *BioTechnology* 6:1197), or any other nucleic acid amplification method, followed by the detection of the amplified molecules using techniques well known to those of skill in the art. These detection schemes are especially useful for the detection of nucleic acid molecules if such molecules are present in very low numbers.

10 In an alternative embodiment, mutations in a FGF-CX gene from a sample cell can be identified by alterations in restriction enzyme cleavage patterns. For example, sample and control DNA is isolated, amplified (optionally), digested with one or more restriction endonucleases, and fragment length sizes are determined by gel electrophoresis and compared. Differences in fragment length sizes between sample and control DNA indicates mutations in the sample DNA. Moreover, the use of sequence specific ribozymes (see, for example, U.S. Pat. No. 5,493,531) can be used to score for the presence of specific mutations by development or loss of a ribozyme cleavage site.

20 In other embodiments, genetic mutations in FGF-CX can be identified by hybridizing a sample and control nucleic acids, e.g., DNA or RNA, to high density arrays containing hundreds or thousands of oligonucleotide probes (Cronin *et al.* (1996) *Human Mutation* 7: 244-255; Kozal *et al.* (1996) *Nature Medicine* 2: 753-759). For example, genetic mutations in FGF-CX can be identified in two dimensional arrays containing light-generated DNA probes as described in Cronin *et al.* above. Briefly, a first hybridization array of probes can be used to scan through long stretches of DNA in a sample and control to identify base changes between the sequences by making linear arrays of sequential overlapping probes. This step allows the identification of point mutations. This step is followed by a second hybridization array that allows the characterization of specific mutations by using smaller, specialized probe arrays complementary to all variants or mutations detected. Each mutation array is composed of parallel probe sets, one complementary to the wild-type gene and the other complementary to the mutant gene.

30 In yet another embodiment, any of a variety of sequencing reactions known in the art can be used to directly sequence the FGF-CX gene and detect mutations by comparing the sequence of the sample FGF-CX with the corresponding wild-type (control) sequence. Examples of sequencing reactions include those based on techniques developed by Maxim and Gilbert (1977)

WO 02/02625

PCT/US01/21191

PNAS 74:560 or Sanger (1977) PNAS 74:5463. It is also contemplated that any of a variety of automated sequencing procedures can be utilized when performing the diagnostic assays (Naeve *et al.*, (1995) *Biotechniques* 19:448), including sequencing by mass spectrometry (see, *e.g.*, PCT International Publ. No. WO 94/16101; Cohen *et al.* (1996) *Adv Chromatogr* 36:127-162; and
5 Griffin *et al.* (1993) *Appl Biochem Biotechnol* 38:147-159).

Other methods for detecting mutations in the FGF-CX gene include methods in which protection from cleavage agents is used to detect mismatched bases in RNA/RNA or RNA/DNA heteroduplexes (Myers *et al.* (1985) *Science* 230:1242). In general, the art technique of "mismatch cleavage" starts by providing heteroduplexes of formed by hybridizing (labeled)
10 RNA or DNA containing the wild-type FGF-CX sequence with potentially mutant RNA or DNA obtained from a tissue sample. The double-stranded duplexes are treated with an agent that cleaves single-stranded regions of the duplex such as which will exist due to basepair mismatches between the control and sample strands. For instance, RNA/DNA duplexes can be treated with RNase and DNA/DNA hybrids treated with S1 nuclease to enzymatically digesting
15 the mismatched regions. In other embodiments, either DNA/DNA or RNA/DNA duplexes can be treated with hydroxylamine or osmium tetroxide and with piperidine in order to digest mismatched regions. After digestion of the mismatched regions, the resulting material is then separated by size on denaturing polyacrylamide gels to determine the site of mutation. See, for example, Cotton *et al.* (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4397; Saleeba *et al.* (1992) *Methods Enzymol* 217:286-295. In an embodiment, the control DNA or RNA can be labeled for
20 detection.

In still another embodiment, the mismatch cleavage reaction employs one or more proteins that recognize mismatched base pairs in double-stranded DNA (so called "DNA mismatch repair" enzymes) in defined systems for detecting and mapping point mutations in
25 FGF-CX cDNAs obtained from samples of cells. For example, the mutY enzyme of *E. coli* cleaves A at G/A mismatches and the thymidine DNA glycosylase from HeLa cells cleaves T at GT mismatches (Hsu *et al.* (1994) *Carcinogenesis* 15:1657-1662). According to an exemplary embodiment, a probe based on a FGF-CX sequence, *e.g.*, a wild-type FGF-CX sequence, is hybridized to a cDNA or other DNA product from a test cell(s). The duplex is treated with a
30 DNA mismatch repair enzyme, and the cleavage products, if any, can be detected from electrophoresis protocols or the like. See, for example, U.S. Pat. No. 5,459,039.

In other embodiments, alterations in electrophoretic mobility will be used to identify mutations in FGF-CX genes. For example, single strand conformation polymorphism (SSCP)

WO 02/02625

PCT/US01/21191

may be used to detect differences in electrophoretic mobility between mutant and wild type nucleic acids (Orita *et al.* (1989) *Proc Natl Acad Sci USA*: 86:2766, see also Cotton (1993) *Mutat Res* 285:125-144; Hayashi (1992) *Genet Anal Tech Appl* 9:73-79). Single-stranded DNA fragments of sample and control FGF-CX nucleic acids will be denatured and allowed to

5 reanneal. The secondary structure of single-stranded nucleic acids varies according to sequence, the resulting alteration in electrophoretic mobility enables the detection of even a single base change. The DNA fragments may be labeled or detected with labeled probes. The sensitivity of the assay may be enhanced by using RNA, rather than DNA, in which the secondary structure is more sensitive to a change in sequence. In one embodiment, the subject method utilizes
10 heteroduplex analysis to separate double stranded heteroduplex molecules on the basis of changes in electrophoretic mobility. See, e.g., Kean *et al.* (1991) *Trends Genet* 7:5.

In yet another embodiment the movement of mutant or wild-type fragments in polyacrylamide gels containing a gradient of denaturant is assayed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). See, e.g., Myers *et al.* (1985) *Nature* 313:495. When DGGE is used as
15 the method of analysis, DNA will be modified to insure that it does not completely denature, for example by adding a GC clamp of approximately 40 bp of high-melting GC-rich DNA by PCR. In a further embodiment, a temperature gradient is used in place of a denaturing gradient to identify differences in the mobility of control and sample DNA. See, e.g., Roscnbaum and Roissner (1987) *Biophys Chem* 265:12753.

20 Examples of other techniques for detecting point mutations include, but are not limited to, selective oligonucleotide hybridization, selective amplification, or selective primer extension. For example, oligonucleotide primers may be prepared in which the known mutation is placed centrally and then hybridized to target DNA under conditions that permit hybridization only if a perfect match is found. See, e.g., Saiki *et al.* (1986) *Nature* 324:163; Saiki *et al.* (1989) *Proc*
25 *Natl Acad. Sci USA* 86:6230. Such allele specific oligonucleotides are hybridized to PCR amplified target DNA or a number of different mutations when the oligonucleotides are attached to the hybridizing membrane and hybridized with labeled target DNA.

Alternatively, allele specific amplification technology that depends on selective PCR amplification may be used in conjunction with the instant invention. Oligonucleotides used as
30 primers for specific amplification may carry the mutation of interest in the center of the molecule (so that amplification depends on differential hybridization) (Gibbs *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res* 17:2437-2448) or at the extreme 3' end of one primer where, under appropriate conditions, mismatch can prevent, or reduce polymerase extension (Prossner (1993)

WO 02/02625

PCT/US01/21191

Tibtech 11:238). In addition it may be desirable to introduce a novel restriction site in the region of the mutation to create cleavage-based detection. See, e.g., Gasparini et al (1992) *Mol Cell Probes* 6:1. It is anticipated that in certain embodiments amplification may also be performed using Taq ligase for amplification. See, e.g., Barany (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:189. In such cases, ligation will occur only if there is a perfect match at the 3' end of the 5' sequence, making it possible to detect the presence of a known mutation at a specific site by looking for the presence or absence of amplification.

The methods described herein may be performed, for example, by utilizing pre-packaged diagnostic kits comprising at least one probe nucleic acid or antibody reagent described herein, which may be conveniently used, e.g., in clinical settings to diagnose patients exhibiting symptoms or family history of a disease or illness involving a FGF-CX gene.

Furthermore, any cell type or tissue, preferably peripheral blood leukocytes, in which FGF-CX is expressed may be utilized in the prognostic assays described herein. However, any biological sample containing nucleated cells may be used, including, for example, buccal mucosal cells.

Pharmacogenomics

Agents, or modulators that have a stimulatory or inhibitory effect on FGF-CX activity (e.g., FGF-CX gene expression), as identified by a screening assay described herein can be administered to individuals to treat (prophylactically or therapeutically) disorders (e.g., neurological, cancer-related or gestational disorders) associated with aberrant FGF-CX activity. In conjunction with such treatment, the pharmacogenomics (i.e., the study of the relationship between an individual's genotype and that individual's response to a foreign compound or drug) of the individual may be considered. Differences in metabolism of therapeutics can lead to severe toxicity or therapeutic failure by altering the relation between dose and blood concentration of the pharmacologically active drug. Thus, the pharmacogenomics of the individual permits the selection of effective agents (e.g., drugs) for prophylactic or therapeutic treatments based on a consideration of the individual's genotype. Such pharmacogenomics can further be used to determine appropriate dosages and therapeutic regimens. Accordingly, the activity of FGF-CX protein, expression of FGF-CX nucleic acid, or mutation content of FGF-CX genes in an individual can be determined to thereby select appropriate agent(s) for therapeutic or prophylactic treatment of the individual.

Pharmacogenomics deals with clinically significant hereditary variations in the response to drugs due to altered drug disposition and abnormal action in affected persons. See e.g.,

WO 02/02625

PCT/US01/21191

Eichelbaum, 1996, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 23:983-985 and Linder, 1997, *Clin Chem*, 43:254-266. In general, two types of pharmacogenetic conditions can be differentiated. Genetic conditions transmitted as a single factor altering the way drugs act on the body (altered drug action) or genetic conditions transmitted as single factors altering the way the body acts on drugs (altered drug metabolism). These pharmacogenetic conditions can occur either as rare defects or as polymorphisms. For example, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency is a common inherited enzymopathy in which the main clinical complication is haemolysis after ingestion of oxidant drugs (anti-malarials, sulfonamides, analgesics, nitrofurans) and consumption of fava beans.

10 As an illustrative embodiment, the activity of drug metabolizing enzymes is a major determinant of both the intensity and duration of drug action. The discovery of genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes (e.g., N-acetyltransferase 2 (NAT 2) and cytochrome P450 enzymes CYP2D6 and CYP2C19) has provided an explanation as to why some patients do not obtain the expected drug effects or show exaggerated drug response and serious toxicity after taking the standard and safe dose of a drug. These polymorphisms are expressed in two phenotypes in the population, the extensive metabolizer (EM) and poor metabolizer (PM). The prevalence of PM is different among different populations. For example, the gene coding for CYP2D6 is highly polymorphic and several mutations have been identified in PM, which all lead to the absence of functional CYP2D6. Poor metabolizers of CYP2D6 and CYP2C19 quite frequently experience exaggerated drug response and side effects when they receive standard doses. If a metabolite is the active therapeutic moiety, PM show no therapeutic response, as demonstrated for the analgesic effect of codeine mediated by its CYP2D6-formed metabolite morphine. The other extreme are the so called ultra-rapid metabolizers who do not respond to standard doses. Recently, the molecular basis of ultra-rapid metabolism has been identified to be due to CYP2D6 gene amplification.

25 Thus, the activity of FGF-CX protein, expression of FGF-CX nucleic acid, or mutation content of FGF-CX genes in an individual can be determined to thereby select appropriate agent(s) for therapeutic or prophylactic treatment of the individual. In addition, pharmacogenetic studies can be used to apply genotyping of polymorphic alleles encoding drug-metabolizing enzymes to the identification of an individual's drug responsiveness phenotype. This knowledge, when applied to dosing or drug selection, can avoid adverse reactions or therapeutic failure and thus enhance therapeutic or prophylactic efficiency when

WO 02/02625

PCT/US01/21191

treating a subject with a FGF-CX modulator, such as a modulator identified by one of the exemplary screening assays described herein.

Monitoring Clinical Efficacy

Monitoring the influence of agents (*e.g.*, drugs, compounds) on the expression or activity of FGF-CX (*e.g.*, the ability to modulate aberrant cell proliferation and/or differentiation) can be applied in basic drug screening and in clinical trials. For example, the effectiveness of an agent determined by a screening assay as described herein to increase FGF-CX gene expression, protein levels, or upregulate FGF-CX activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting decreased FGF-CX gene expression, protein levels, or downregulated FGF-CX activity. Alternatively, the effectiveness of an agent determined by a screening assay to decrease FGF-CX gene expression, protein levels, or downregulate FGF-CX activity, can be monitored in clinical trials of subjects exhibiting increased FGF-CX gene expression, protein levels, or upregulated FGF-CX activity. In such clinical trials, the expression or activity of FGF-CX and, preferably, other genes that have been implicated in, for example, a proliferative or neurological disorder, can be used as a "read out" or marker of the responsiveness of a particular cell.

For example, genes, including FGF-CX, that are modulated in cells by treatment with an agent (*e.g.*, compound, drug or small molecule) that modulates FGF-CX activity (*e.g.*, identified in a screening assay as described herein) can be identified. Thus, to study the effect of agents on cellular proliferation disorders, for example, in a clinical trial, cells can be isolated and RNA prepared and analyzed for the levels of expression of FGF-CX and other genes implicated in the disorder. The levels of gene expression (*i.e.*, a gene expression pattern) can be quantified by Northern blot analysis or RT-PCR, as described herein, or alternatively by measuring the amount of protein produced, by one of the methods as described herein, or by measuring the levels of activity of FGF-CX or other genes. In this way, the gene expression pattern can serve as a marker, indicative of the physiological response of the cells to the agent. Accordingly, this response state may be determined before, and at various points during, treatment of the individual with the agent.

In one embodiment, the invention provides a method for monitoring the effectiveness of treatment of a subject with an agent (*e.g.*, an agonist, antagonist, protein, peptide, nucleic acid, peptidomimetic, small molecule, or other drug candidate identified by the screening assays described herein) comprising the steps of (i) obtaining a pre-administration sample from a subject prior to administration of the agent; (ii) detecting the level of expression of a FGF-CX protein, mRNA, or genomic DNA in the preadministration sample; (iii) obtaining one or more

WO 02/02625

PCT/US01/21191

post-administration samples from the subject; (iv) detecting the level of expression or activity of the FGF-CX protein, mRNA, or genomic DNA in the post-administration samples; (v) comparing the level of expression or activity of the FGF-CX protein, mRNA, or genomic DNA in the pre-administration sample with the FGF-CX protein, mRNA, or genomic DNA in the post administration sample or samples; and (vi) altering the administration of the agent to the subject accordingly. For example, increased administration of the agent may be desirable to increase the expression or activity of FGF-CX to higher levels than detected, *i.e.*, to increase the effectiveness of the agent. Alternatively, decreased administration of the agent may be desirable to decrease expression or activity of FGF-CX to lower levels than detected, *i.e.*, to decrease the effectiveness of the agent.

Methods of Treatment

The present invention provides for both prophylactic and therapeutic methods of treating a subject at risk of (or susceptible to) a disorder or having a disorder associated with aberrant FGF-CX expression or activity.

Diseases and disorders that are characterized by increased (relative to a subject not suffering from the disease or disorder) levels or biological activity may be treated with Therapeutics that antagonize (*i.e.*, reduce or inhibit) activity. Therapeutics that antagonize activity may be administered in a therapeutic or prophylactic manner. Therapeutics that may be utilized include, but are not limited to, (i) a FGF-CX polypeptide, or analogs, derivatives, fragments or homologs thereof; (ii) antibodies to a FGF-CX peptide; (iii) nucleic acids encoding a FGF-CX peptide; (iv) administration of antisense nucleic acid and nucleic acids that are "dysfunctional" (*i.e.*, due to a heterologous insertion within the coding sequences of coding sequences to a FGF-CX peptide) that are utilized to "knockout" endogenous function of a FGF-CX peptide by homologous recombination (see, *e.g.*, Capecchi, 1989, *Science* 244: 1288-1292); or (v) modulators (*i.e.*, inhibitors, agonists and antagonists, including additional peptide mimetic of the invention or antibodies specific to a peptide of the invention) that alter the interaction between a FGF-CX peptide and its binding partner.

Diseases and disorders that are characterized by decreased (relative to a subject not suffering from the disease or disorder) levels or biological activity may be treated with Therapeutics that increase (*i.e.*, are agonists to) activity. Therapeutics that upregulate activity may be administered in a therapeutic or prophylactic manner. Therapeutics that may be utilized include, but are not limited to, a FGF-CX peptide, or analogs, derivatives, fragments or homologs thereof; or an agonist that increases bioavailability.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

Increased or decreased levels can be readily detected by quantifying peptide and/or RNA, by obtaining a patient tissue sample (e.g., from biopsy tissue) and assaying it *in vitro* for RNA or peptide levels, structure and/or activity of the expressed peptides (or mRNAs of a FGF-CX peptide). Methods that are well-known within the art include, but are not limited to, 5 immunoassays (e.g., by Western blot analysis, immunoprecipitation followed by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis, immunocytochemistry, etc.) and/or hybridization assays to detect expression of mRNAs (e.g., Northern assays, dot blots, *in situ* hybridization, etc.).

In one aspect, the invention provides a method for preventing, in a subject, a disease or 10 condition associated with an aberrant FGF-CX expression or activity, by administering to the subject an agent that modulates FGF-CX expression or at least one FGF-CX activity. Subjects at risk for a disease that is caused or contributed to by aberrant FGF-CX expression or activity can be identified by, for example, any or a combination of diagnostic or prognostic assays as described herein. Administration of a prophylactic agent can occur prior to the manifestation of 15 symptoms characteristic of the FGF-CX aberrancy, such that a disease or disorder is prevented or, alternatively, delayed in its progression. Depending on the type of FGF-CX aberrancy, for example, a FGF-CX agonist or FGF-CX antagonist agent can be used for treating the subject. The appropriate agent can be determined based on screening assays described herein.

Another aspect of the invention pertains to methods of modulating FGF-CX expression 20 or activity for therapeutic purposes. The modulatory method of the invention involves contacting a cell with an agent that modulates one or more of the activities of FGF-CX protein activity associated with the cell. An agent that modulates FGF-CX protein activity can be an agent as described herein, such as a nucleic acid or a protein, a naturally-occurring cognate ligand of a FGF-CX protein, a peptide, a FGF-CX peptidomimetic, or other small molecule. In 25 one embodiment, the agent stimulates one or more FGF-CX protein activity. Examples of such stimulatory agents include active FGF-CX protein and a nucleic acid molecule encoding FGF-CX that has been introduced into the cell. In another embodiment, the agent inhibits one or more FGF-CX protein activity. Examples of such inhibitory agents include antisense FGF-CX nucleic acid molecules and anti-FGF-CX antibodies. These modulatory methods can be 30 performed *in vitro* (e.g., by culturing the cell with the agent) or, alternatively, *in vivo* (e.g., by administering the agent to a subject). As such, the present invention provides methods of treating an individual afflicted with a disease or disorder characterized by aberrant expression or activity of a FGF-CX protein or nucleic acid molecule. In one embodiment, the method involves

WO 02/02625

PCT/US01/21191

administering an agent (e.g., an agent identified by a screening assay described herein), or combination of agents that modulates (e.g., upregulates or downregulates) FGF-CX expression or activity. In another embodiment, the method involves administering a FGF-CX protein or nucleic acid molecule as therapy to compensate for reduced or aberrant FGF-CX expression or activity.

The invention will be further illustrated in the following non-limiting examples.

EXAMPLES

10 Example 1. Identification of the FGF-CX gene.

The FGF-CX gene was identified following a TBLASTN (Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990) *J. Mol. Biol.* 215, 403-410) search of Genbank human genomic DNA sequences with Xenopus FGF-CX (Koga, C., Adati, N., Nakata, K., Mikoshiba, K., Furuhata, Y., Sata, S., Tei, H., Sakati, Y., Kurokawa, T., Shiokawa, K. & Yokoyama, K. K. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 261, 756-765; Accession No. AB012615) as query. This search identified a locus (Accession No. AB020858) of high homology on chromosome 8. Intron/exon boundaries were deduced using standard consensus splicing parameters (Mount, S. M. (1996) *Science* 271, 1690-1692), together with homologies derived from known FGFs. The FGF-CX initiation codon localizes to bp 16214 of the sequence of AB020858, and the remaining 3' portion of this exon continues to bp 15930. The 5' UTR of FGF-CX was extended upstream of the initiation codon by an additional 606 bp using public ESTs (Accession Nos. AA232729, AA236522, A1272876 and A1272878). The remaining structure of the FGF-CX gene as it relates to locus AB020858 is as follows: intron 1 (bp 15929-9942); exon 2 (bp 9941-9838); intron 2 (bp 9837-7500); exon 3 (begins at bp 7499 and continues as shown in Fig. 13; the structure of the 3' untranslated region has not yet been determined).

The gene discovered by the procedure in the preceding paragraph includes 3 exons and 2 introns (Fig. 13). The DNA sequence predicts an ORF of 211 amino acid residues, with an in-frame stop codon 117 bp upstream of the initiator methionine. The DNA segment from which the gene was mined maps to chromosome 8p21.3-p22, a location that was confirmed by radiation hybrid analysis (see Example 2).

WO 02/02625

PCT/US01/21191

An FGF signature motif, G-X-[LI]-X-[STAGP]-X(6,7)-[DE]-C-X-[FLM]-X-E-X(6)-Y, identified by a PROSITE search (Bucher, P. & Bairoch, A. (1994) *Ismb.* 2, 53-61) located between amino acid residues 125-148 is double-underlined, and intron/exon boundaries are depicted with arrows. Introns 1 and 2 are 5988 bp and 2338 bp long, respectively. The 5' UTR sequence was derived from public ESTs, and is not shown in its entirety.

Example 2. Radiation Hybrid Mapping of FGF-CX.

Radiation hybrid mapping using human chromosome markers was carried out for FGF-CX. The procedure used is analogous to that described in Steen, RG et al. (A High-Density Integrated Genetic Linkage and Radiation Hybrid Map of the Laboratory Rat, *Genome Research* 1999 (Published Online on May 21, 1999) Vol. 9, AP1-AP8, 1999). A panel of 93 cell clones containing the randomized radiation-induced human chromosomal fragments was screened in 96 well plates using PCR primers designed to identify the sought clones in a unique fashion. The DNA segment from which the nucleotide sequence encoding FGF-CX was identified was annotated as mapping to chromosome 8p21.3-p22. This result was refined by the present analysis by finding that FGF-CX maps to chromosome 8 at a locus which overlaps marker AFM177XB10, and which is 1.6 cR from marker WI-5104 and 3.2 cR from marker WI-9262.

Example 3. Molecular Cloning of the Sequence Encoding a FGF-CX Protein.

Oligonucleotide primers were designed for the amplification by PCR of a DNA segment, representing an open reading frame, coding for the full length FGF-CX. The forward primer includes a BglII restriction site (AGATCT) and a consensus Kozak sequence (CCACC). The reverse primer contains an in-frame XhoI restriction site for further subcloning purposes. Both the forward and the reverse primers contain a 5' clamp sequence (CTCGTC). The sequences of the primers are the following:

FGF-CX-Forward: 5' - CTCGTC AGATCT CCACC ATG GCT CCC TTA GCC GAA GTC - 3' (SEQ ID NO:3)

FGF-CX-Reverse: 5' - CTCGTC CTCGAG AGT GTA CAT CAG TAG GTC CTT G - 3' (SEQ ID NO:4)

PCR reactions were performed using a total of 5ng human prostate cDNA template, 1 μ M of each of the FGF-CX-Forward and FGF-CX-Reverse primers, 5 micromoles dNTP (Clontech Laboratories, Palo Alto CA) and 1 microliter of 50xAdvantage-HF 2 polymerase

WO 02/02625

PCT/US01/21191

(Clontech Laboratories) in 50 microliter volume. The following PCR reaction conditions were used:

- 5 a) 96°C 3 minutes
 b) 96°C 30 seconds denaturation
 c) 70°C 30 seconds, primer annealing. This temperature was gradually decreased by 1°C/cycle.
 d) 72°C 1 minute extension.
 Repeat steps (b)-(d) ten times
 10 e) 96°C 30 seconds denaturation
 f) 60°C 30 seconds annealing
 g) 72°C 1 minute extension
 Repeat steps (e)-(g) 25 times
 h) 72°C 5 minutes final extension

- 15 A single PCR product, with the expected size of approximately 640 bp, was isolated after electrophoresis on agarose gel and ligated into a pCR2.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). The cloned insert was sequenced using vector specific M13 Forward(-40) and M13 Reverse primers, which verified that the nucleotide sequence was 100% identical to the sequence in FIG. 1 (SEQ ID NO:1) inserted directly between the upstream BglII cloning site and the downstream XhoI cloning site. The cloned sequence constitutes an open reading frame coding for the predicted
 20 FGF-CX full length protein. The clone is called TA-AB02085-S274-F19.

Example 4. Preparation of Mammalian Expression Vector pCEP4/Sec.

- The oligonucleotide primers pSec-V5-His Forward (CTCGT CCTCG AGGGT AAGCC
 25 TATCC CTAAC (SEQ ID NO:14)) and pSec-V5-His Reverse (CTCGT CGGGC CCTCG
 ATCAG CGGGT TTAAA C (SEQ ID NO:15)), were designed to amplify a fragment from the pcDNA3.1-V5His (Invitrogen, Carlsbad, CA) expression vector that includes V5 and His6. The PCR product was digested with XhoI and ApaI and ligated into the XhoI/ApaI digested
 pSecTag2 B vector harboring an Ig kappa leader sequence (Invitrogen, Carlsbad CA). The
 30 correct structure of the resulting vector, pSecV5His, including an in-frame Ig-kappa leader and V5-His6 was verified by DNA sequence analysis. The vector pSecV5His was digested with PmeI and NheI to provide a fragment retaining the above elements in the correct frame. The PmeI-NheI fragment was ligated into the BamHI/Klenow and NheI treated vector pCEP4

WO 02/02625

PCT/US01/21191

(Invitrogen, Carlsbad, CA). The resulting vector was named pCEP4/Sec and includes an in-frame Ig kappa leader, a site for insertion of a clone of interest, and the V5 epitope and 6xHis under control of the PCMV and/or the PT7 promoter. pCEP4/Sec is an expression vector that allows heterologous protein expression and secretion by fusing any protein into a multiple cloning site following the Ig kappa chain signal peptide. Detection and purification of the expressed protein are aided by the presence of the V5 epitope tag and 6xHis tag at the C-terminus (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Example 5. Expression of FGF-CX in human embryonic kidney (HEK) 293 cells.

The BglII-XhoI fragment containing the FGF-CX sequence was isolated from TA-AB02085-S274-F19 (Example 3) and subcloned into the BamHI-XhoI digested pCEP4/Sec to generate the expression vector pCEP4/Sec-FGF-CX. The pCEP4/Sec-FGF-CX vector was transfected into 293 cells using the LipofectaminePlus reagent following the manufacturer's instructions (Gibco/BRL/Life Technologies, Rockville, MD). The cell pellet and supernatant were harvested 72 hours after transfection and examined for FGF-CX expression by Western blotting (reducing conditions) with an anti-V5 antibody. Fig. 12 shows that FGF-CX is expressed as a polypeptide having an apparent molecular weight (Mr) of approximately 34 kDa proteins secreted by 293 cells. In addition a minor band is observed at about 31 kDa.

Example 6. Expression of FGF-CX in *E. coli*.

The vector pRSETA (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA) was digested with XhoI and NcoI restriction enzymes. Oligonucleotide linkers of the sequence 5' CATGGTCAGCCTAC 3' (SEQ ID NO:16) and 5' TCGAGTAGGCTGAC 3' (SEQ ID NO:17) were annealed at 37 degree Celsius and ligated into the XhoI-NcoI treated pRSETA. The resulting vector was confirmed by restriction analysis and sequencing and was named pETMY. The BglII-XhoI fragment of the sequence encoding FGF-CX (see Example 3) was ligated into vector pETMY that was digested with BamHI and XhoI restriction enzymes. The expression vector is named pETMY-FGF-CX. In this vector, hFGF-CX was fused to the 6xHis tag and T7 epitope at its N-terminus. The plasmid pETMY-FGF-CX was then transfected into the *E. coli* expression host BL21(DE3, pLys) (Novagen, Madison, WI) and expression of protein FGF-CX was induced according to the manufacturer's instructions. After induction, total cells were harvested, and proteins were

WO 02/02625

PCT/US01/21191

analyzed by Western blotting using anti-HisGly antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA). Fig. 14 shows that FGF-CX was expressed as a protein of Mr approximately 32 kDa.

5 Example 7. Comparison of Expression of Recombinant FGF-CX Protein With and Without a Cloned Signal Peptide.

a) Expression Without a Signal Peptide

As noted in the Detailed Description of the Invention, FGF-CX apparently lacks a classical amino-terminal signal sequence. To determine whether FGF-CX is secreted from mammalian cells, cDNA obtained as the *BglII-XhoI* fragment, encoding the full length FGF-CX protein, was subcloned from TA-AB02085-S274-F19 (Example 3) into *BamHI/XhoI*-digested pcDNA3.1 (Invitrogen). This provided a mammalian expression vector designated pFGF-CX. This construct incorporates the V5 epitope tag and a polyhistidine tag into the carboxy-terminus of the protein to aid in its identification and purification, respectively, and should generate a polypeptide of about 27 kDa. Following transient transfection into 293 human embryonic kidney cells, conditioned media was harvested 48 hr post transfection.

In addition to secretion of FGF-CX into conditioned media, it also found to be associated with the cell pellet/ECM (data not shown). Since FGFs are known to bind to heparin sulfate proteoglycan (HSPG) present on the surface of cells and in the extracellular matrix (ECM), the inventors investigated the possibility that FGF-CX was sequestered in this manner. To this end, FGF-CX-transfected cells were extracted by treatment with 0.5 ml DMEM containing 100 μ M suramin, a compound known to disrupt low affinity interactions between growth factors and HSPGs (La Rocca, R.V., Stein, C.A. & Myers, C.E. (1999) *Cancer Cells* 2, 106-115), for 30 min at 4°C. The suramin-extracted conditioned media was then harvested and clarified by centrifugation (5 min; 2000 X g).

The conditioned media and the suramin extract were then mixed with equal volumes of 2X gel-loading buffer. Samples were boiled for 10 min, resolved by SDS-PAGE on 4-20% gradient polyacrylamide gels (Novex, Dan Diego, CA) under reducing conditions, and transferred to nitrocellulose filters (Novex). Western analysis was performed according to standard procedures using HRP-conjugated anti-V5 antibody (Invitrogen) and the ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

One band having the expected Mr was identified in conditioned media from 293 cells transfected with pFGF-CX (Fig. 11A, lane 1). Conditioned media from cells transfected with control vector did not react with the antibody (Fig. 11A, lane 5). After suramin treatment, it

WO 02/02625

PCT/US01/21191

was found that a significant quantity of FGF-CX could in fact be released from the cell surface/ECM, indicating that HSPGs are likely to play a role in sequestering this protein (Fig. 11A, lane 2). These results indicate that FGF-CX can be secreted without a classical signal peptide.

5 Recombinant FGF-CX protein stimulates DNA synthesis and cell proliferation, effects that are likely to be mediated via high affinity binding of FGF-CX to a cell surface receptor, and modulated via low affinity interactions with HSPGs. The suramin extraction data suggests that FGF-CX binds to HSPGs present on the cell surface and/or the ECM.

b) Expression With a Signal Peptide

10 With the goal of enhancing protein secretion, a construct (pCEP4/Sec-FGF-CX) was generated in which the FGF-CX cDNA was fused in frame with a cleavable amino-terminal secretory signal sequence derived from the Ig κ gene. The resulting protein also contained carboxy-terminal V5 and polyhistidine tags as described above for pFGF-CX. Following transfection into 293 cells, a protein product having the expected Mr of about 31 kDa was

15 obtained, and suramin was again found to release a significant quantity of sequestered FGF-CX protein (Fig. 11A; lanes 3 and 4). As expected, pCEP4/Sec-FGF-CX generated more soluble FGF-CX protein than did pFGF-CX.

Results similar to those described above for 293 cells were also obtained with NIH 3T3 cells (Fig. 11B).

20

Example 8. Real Time Quantitative Expression Analysis Of FGF-CX Nucleic Acids By PCR.

The quantitative expression of various clones was assessed in 41 normal and 55 tumor samples (in most cases, the samples presented in Fig. 15, Panels A and B are those identified in Table 3) by real time quantitative PCR (TAQMAN[®] analysis) performed on a Perkin-Elmer

25 Biosystems ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detection System. In Table 3, the following abbreviations are used:

ca. = carcinoma,

* = established from metastasis,

met = metastasis,

30 s cell var = small cell variant,

non-s = non-sm = non-small,

squam = squamous,

pl. eff = pl effusio = pleural effusion,

WO 02/02625

PCT/US01/21191

glio = glioma,
astro = astrocytoma, and
neuro = neuroblastoma.

5 First, 96 RNA samples were normalized to β -actin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). RNA (~50 ng total or ~1 ng polyA+) was converted to cDNA using the TAQMAN[®] Reverse Transcription Reagents Kit (PE Biosystems, Foster City, CA; cat # N808-0234) and random hexamers according to the manufacturer's protocol. Reactions were performed in 20 μ l and incubated for 30 min. at 48[°]C. cDNA (5 μ l) was then transferred to a
10 separate plate for the TAQMAN[®] reaction using β -actin and GAPDH TAQMAN[®] Assay Reagents (PE Biosystems; cat. no.'s 4310881E and 4310884E, respectively) and TAQMAN[®] universal PCR Master Mix (PE Biosystems; cat # 4304447) according to the manufacturer's protocol. Reactions were performed in 25 μ l using the following parameters: 2 min. at 50[°]C; 10 min. at 95[°]C; 15 sec. at 95[°]C/1 min. at 60[°]C (40 cycles). Results were recorded as CT values
15 (cycle at which a given sample crosses a threshold level of fluorescence) using a log scale, with the difference in RNA concentration between a given sample and the sample with the lowest CT value being represented as 2 to the power of delta CT. The percent relative expression is then obtained by taking the reciprocal of this RNA difference and multiplying by 100. The average CT values obtained for β -actin and GAPDH were used to normalize RNA samples. The RNA
20 sample generating the highest CT value required no further diluting, while all other samples were diluted relative to this sample according to their β -actin /GAPDH average CT values.

Normalized RNA (5 μ l) was converted to cDNA and analyzed via TAQMAN[®] using One Step RT-PCR Master Mix Reagents (PE Biosystems; cat. # 4309169) and gene-specific primers according to the manufacturer's instructions. Probes and primers were designed for each
25 assay according to Perkin Elmer Biosystem's *Primer Express* Software package (version 1 for Apple Computer's Macintosh Power PC) using the sequence of clone 10326230.0.38 as input. Default settings were used for reaction conditions and the following parameters were set before selecting primers: primer concentration = 250 nM, primer melting temperature (T_m) range = 58[°]-60[°] C, primer optimal T_m = 59[°] C, maximum primer difference = 2[°] C, probe does not have 5'
30 G, probe T_m must be 10[°] C greater than primer T_m , amplicon size 75 bp to 100 bp. The probes and primers selected (see below) were synthesized by Synthegen (Houston, TX, USA). Probes were double purified by HPLC to remove uncoupled dye and evaluated by mass spectroscopy to

WO 02/02625

PCT/US01/21191

verify coupling of reporter and quencher dyes to the 5' and 3' ends of the probe, respectively. Their final concentrations were: forward and reverse primers, 900 nM each, and probe, 200nM.

For PCR, normalized RNA from each tissue and each cell line was spotted in each well of a 96 well PCR plate (Perkin Elmer Biosystems). PCR cocktails including two probes (one specific for FGF-CX and a second gene-specific probe to serve as an internal standard) were set up using 1X TaqMan™ PCR Master Mix for the PE Biosystems 7700, with 5 mM MgCl₂, dNTPs (dA, G, C, U at 1:1:1:2 ratios), 0.25 U/ml AmpliTaq Gold™ (PE Biosystems), and 0.4 U/μl RNase inhibitor, and 0.25 U/μl reverse transcriptase. Reverse transcription was performed at 48° C for 30 minutes followed by amplification/PCR cycles as follows: 95° C 10 min, then 40 cycles of 95° C for 15 seconds, 60° C for 1 minute.

Table 3. Tissue Samples used in TaqMan Expression Analysis.

No.	Tissue Sample	No.	Tissue Sample
1	Endothelial cells	49	Renal ca. 786-0
2	Endothelial cells (treated)	50	Renal ca. A498
3	Pancreas	51	Renal ca. RXF 393
4	Pancreatic ca. CAPAN 2	52	Renal ca. ACHN
5	Adipose	53	Renal ca. UO-31
6	Adrenal gland	54	Renal ca. TK-10
7	Thyroid	55	Liver
8	Salivary gland	56	Liver (fetal)
9	Pituitary gland	57	Liver ca. (hepatoblast) HepG2
10	Brain (fetal)	58	Lung
11	Brain (whole)	59	Lung (fetal)
12	Brain (amygdala)	60	Lung ca. (small cell) LX-1
13	Brain (cerebellum)	61	Lung ca. (small cell) NCI-H69
14	Brain (hippocampus)	62	Lung ca. (s.cell var.) SHP-77
15	Brain (hypothalamus)	63	Lung ca. (large cell) NCI-H460
16	Brain (substantia nigra)	64	Lung ca. (non-sm. cell) A549
17	Brain (thalamus)	65	Lung ca. (non-s.cell) NCI-H23
18	Spinal cord	66	Lung ca (non-s.cell) HOP-82
19	CNS ca. (glio/astro) U87-MG	67	Lung ca. (non-s.c) NCI-H522
	CNS ca. (glio/astro) U-118-		
20	MG	68	Lung ca. (squam.) SW 900
21	CNS ca. (astro) SW1783	69	Lung ca. (squam.) NCI-H596
	CNS ca.* (neuro; met) SK-N-		
22	AS	70	Mammary gland
23	CNS ca. (astro) SF-539	71	Breast ca.* (pl. effusion) MCF-7
24	CNS ca. (astro) SNB-75	72	Breast ca.* (pl. ef) MDA-MB-231
25	CNS ca. (glio) SNB-19	73	Breast ca.* (pl. effusion) T47D
26	CNS ca. (glio) U251	74	Breast ca. BT-549
27	CNS ca. (glio) SF-295	75	Breast ca. MDA-N
28	Heart	76	Ovary
29	Skeletal muscle	77	Ovarian ca. OVCAR-3

WO 02/02625

PCT/US01/21191

30	Bone marrow	78 Ovarian ca. OVCAR-4
31	Thymus	79 Ovarian ca. OVCAR-5
32	Spleen	80 Ovarian ca. OVCAR-8
33	Lymph node	81 Ovarian ca. IGROV-1
34	Colon (ascending)	82 Ovarian ca.* (ascites) SK-OV-3
35	Stomach	83 Myometrium
36	Small intestine	84 Uterus
37	Colon ca. SW480	85 Placenta
	Colon ca.* (SW480	
38	met)SW620	86 Prostate
39	Colon ca. HT29	87 Prostate ca.* (bone met)PC-3
40	Colon ca. HCT-116	88 Testis
41	Colon ca. CaCo-2	89 Melanoma Hs688(A).T
42	Colon ca. HCT-15	90 Melanoma* (met) Hs688(B).T
43	Colon ca. HCC-2998	91 Melanoma UACC-62
	Gastric ca.* (liver met) NCI-	
44	N87	92 Melanoma M14
45	Bladder	93 Melanoma LOX IMVI
46	Trachea	94 Melanoma* (met) SK-MEL-5
47	Kidney	95 Melanoma SK-MEL-28
48	Kidney (fetal)	96 Melanoma UACC-257

The following primers and probe were designed. Each possesses a minimum of three mismatches for corresponding regions of the highly homologous human FGF-9 and FGF-16 genes so as to be specific for FGF-CX. Set Ag81b covers the region from base 270 to base 343 of Fig. 1 (SEQ ID NO:1). It should not detect other known FGF family members. The primers and probe utilized were:

Ag81b (F): 5'-GGACCACAGCCTCTTCGGTA-3' (SEQ ID NO:18);
 Ag81b (R): 5'-TGTCCACACCTCTAATACTGACCAG-3' (SEQ ID NO:19);
 and
 Ag81b (P): 5'-FAM-CCCCTGCCACACTGATGAATTCCAA-TAMRA-3' (SEQ ID NO:20).

The results from a representative experiment are shown in Fig. 15, Panels A and B. Expression is plotted as a percentage of the sample exhibiting the highest level of expression. Four replicate runs were made, presented in variously shaded bars. In 39 normal human tissues examined, FGF-CX was found to be most highly expressed in the brain, particularly the cerebellum (Fig. 15, Panels A and B). Other tissues of the central nervous system expressed much lower levels of FGF-CX. Of the 54 human tumor cell lines examined, FGF-CX was found to be most highly expressed in a lung carcinoma cell line (LX-1), a colon carcinoma cell line

WO 02/02625

PCT/US01/21191

(SW-480) a colon cancer cell line and metastasis (SW480) and a gastric carcinoma cell line (NCI-N87; see Fig. 15, Panels A and B).

Additional real time expression analysis was done on an extensive panel of tumor tissues obtained during surgery. These tissues include portions obtained from the actual tumors

- 5 themselves, as well as the portions termed "normal adjacent tissue (NAT)", which typically are already inflamed and show histological evidence of dysplasia. A primer-probe set (Ag81) selected to be specific for FGF-CX was employed in a TaqMan experiment with such surgical tissue samples, in which two replicate runs were performed:

- Ag81 (F): 5'-AGGCAGAAGCGGGAGATAGAT-3' (SEQ ID NO:21);
 10 Ag81 (R): 5'-AGCAGCTTTACCTCATTCACAAATG-3' (SEQ ID NO:22); and
 Ag81 (P): TET-5'-CCATCTACATCCACCACCAGTTGCAGAA-3'-TAMRA (SEQ ID NO:23).

- Set Ag81 covers the region from base 477 to base 554 of Fig. 1 (SEQ ID NO:1). The replicates are shown as bars of grey and black shading in Fig. 15, Panels C and D. The results show
 15 dramatically that for many matched pairs of tumors and their dysplastic NAT samples, FGF-CX is highly expressed in the NAT but not in the tumor itself; more specifically, in the parenchymal cells adjacent to the tumor. Examples in which this matched pattern arises include ovarian cancer, bladder cancer, uterine cancer, lung cancer, prostate cancer and liver cancer.

- Without being limited by theory, it is believed from the results in Fig. 15, Panels C and D
 20 that FGF-CX may contribute to tumor progression by paracrine stimulation of the tumor epithelium and/or other components in the host tissue (endothelial cells, stromal fibroblasts, infiltrating lymphocytes, and similar cell types). Likewise, FGF-CX may function to stimulate the components in the host tissue that synthesize or secrete FGF-CX in an autocrine manner. These host component cells may subsequently act on the tumor compartment.

- 25 The elevated expression profile of FGF-CX relative to unmatched normal tissue suggests that it plays a prospective or promoting role in tumor progression. Therefore, therapeutic targeting of FGF-CX using any of a number of targeting approaches (including, by way of nonlimiting example, monoclonal antibodies, ribozymes, antisense oligonucleotides, peptides that neutralize the interaction of FGF-CX with cognate receptor(s), and small drugs that
 30 modulate the unidentified receptor for FGF-CX) is anticipated to have a positive therapeutic impact on disease progression. Likewise, the use of such agents to modulate the bioactivity of FGF-CX in tumor progression is anticipated to synergize or enhance conventional chemotherapy and radiotherapy. Specific disease indications where therapeutic targeting of FGF-CX might be

WO 02/02625

PCT/US01/21191

applied include adenocarcinomas of the colon, prostate, lung, kidney, uterus, breast, bladder, ovary.

Example 9. Stimulation of Bromodeoxyuridine Incorporation by Recombinant FGF-CX.

5 293-FBNA cells (Invitrogen) were transfected using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's protocol (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Cells were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Life Technologies) 5 hr post-transfection. To generate protein for BrdU and growth assays (Example 10), cells were washed and fed with Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Life Technologies) 18 hr post-transfection. After 48 hr, the
10 media was discarded and the cell monolayer was incubated with 100 μ M suramin (Sigma, St. Louis, MO) in 0.5 ml DMEM for 30 min at 4^oC. The suramin-extracted conditioned media was then removed, clarified by centrifugation (5 min; 2000 X g), and subjected to TALON metal affinity chromatography according to the manufacturer's instructions (Clontech, Palo Alto, CA) taking advantage of the carboxy-terminal polyhistidine tag. Retained fusion protein was
15 released by washing the column with imidazole.

FGF-CX protein concentrations were estimated by Western analysis using a standard curve generated with a V5-tagged protein of known concentration. For Western analysis, conditioned media was harvested 48 hr post transfection, and the cell monolayer was then incubated with 0.5 ml DMEM containing 100 μ M suramin for 30 min at 4^oC. The suramin-
20 containing conditioned media was then harvested.

To generate control protein, 293-FBNA cells were transfected with pCEP4 plasmid (Invitrogen) and subjected to the purification procedure outlined above.

Recombinant FGF-CX was tested for its ability to induce DNA synthesis in a bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay. NIH 3T3 cells (ATCC number CRL-1658,
25 American Type Culture Collection, Manassas, VA), CCD-1070Sk cells (ATCC Number CRL-2091) or MG-63 cells (ATCC Number CRL-1427) were cultured in 96-well plates to ~100% confluence, washed with DMEM, and serum-starved in DMEM for 24 hr (NIH 3T3) or 48 hr (CCD-1070Sk and MG-63). Recombinant FGF-CX or control protein was then added to the cells for 18 hr. The BrdU assay was performed according to the manufacturer's specifications
30 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) using a 5 hr BrdU incorporation time.

It was found that FGF-CX induced DNA synthesis in NIH 3T3 mouse fibroblasts at a half maximal concentration of ~5 ng/ml (Fig. 16 Panel A). In contrast, protein purified from cells transfected with control vector did not induce DNA synthesis. It was also found that FGF-

WO 02/02625

PCT/US01/21191

CX induces DNA synthesis, as determined by BrdU incorporation, at comparable dosing levels in a variety of human cell lines including CCD-1070Sk normal human skin fibroblasts (Fig. 16, Panel B), CCD-1106 keratinocytes (Fig. 16, Panel C), MG-63 osteosarcoma cells (data not shown), and breast epithelial cells.

5

Example 10. Induction of Cell Proliferation by Recombinant FGF-CX.

To determine if recombinant FGF-CX induces cell proliferation, NIH 3T3 cells were cultured in 6-well plates to ~50% confluence, washed with DMEM, and fed with DMEM containing recombinant FGF-CX or control protein for 48 hr, and then counted. Cell numbers were determined by trypsinizing the cells and counting them with a Beckman Coulter Z1 series counter (Beckman Coulter, Fullerton, CA). It was found that FGF-CX induces about a 3-fold increase in cell number relative to control protein in this assay (Fig. 17).

To document morphological changes incident upon proliferation, NIH 3T3 cells were treated for 48 hr with recombinant FGF-CX or control protein in DMEM/2% calf serum and photographed with a Zeiss Axiovert 100 microscope (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY).

In addition to reaching a higher cell density (Fig. 17), NIH 3T3 cells cultured in the presence of FGF-CX prepared as described in Example 9 exhibited a disorganized pattern of growth, indicating a loss of contact inhibition (Fig. 18). Furthermore, individual cells were found to be spindly and refractile. These results show that FGF-CX acts as a growth factor and suggest that recombinant FGF-CX mediates the morphological transformation of NIH 3T3 cells.

20

Example 11. Tumor Formation by Ectopic FGF-CX-Transfected NIH 3T3 Cells in Nude Mice.

NIH 3T3 cells were transfected with pCEP4/Sec-FGF-CX or control vector using Lipofectamine Plus according to the manufacturer's protocol (Life Technologies). Cells were supplemented with 10% calf serum (CS; Life Technologies) 5 hr post-transfection. It was found that pCEP4/Sec-FGF-CX-transfected cells were morphologically transformed by 48 hr after transfection, and remained so after 2 weeks of selection in hygromycin-containing growth media. In contrast, cells transfected with control vector retained their normal morphology (data not shown). Thus the transfected cells behave as expected based, for example, on the experiments reported in Example 10.

30

In order to study the induction of ectopic tumors, NIH 3T3 cells were transfected with various experimental and control vectors. Two days after transfection, cells were placed into either DMEM/5% CS (for pFGF-CX-transfected cells) or DMEM/10% CS supplemented with

WO 02/02625

PCT/US01/21191

500 µg/ml hygromycin B (for pCEP4/Sec-FGF-CX-transfected cells). After 2 weeks of culture, subconfluent cells were trypsinized, neutralized with DMEM/10% CS, washed with PBS and counted. One million cells in PBS were injected into the lateral subcutis of female athymic nude mice (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME).

5 NIH 3T3 cells were transfected with FGF-CX expression plasmids (pFGF-CX and pIgc-FGF-CX) or their appropriate control vectors. We found that cells transfected with either of the FGF-CX expression vectors were morphologically transformed by 48 hr after transfection (data not shown), and possessed a phenotype similar to that generated following exposure of NIH 3T3 cells to recombinant FGF-CX (Fig. 17). In contrast, cells transfected with control vector
10 retained their normal morphology (data not shown).

To determine if ectopic expression of FGF-CX *in vivo* induces the tumorigenicity of NIH 3T3 cells, stable transfectants were generated and injected subcutaneously into nude mice. By 11 days, all of the animals injected with either pFGF-CX or pIgc-FGF-CX-transfected cells possessed rapidly growing tumors increasing in size by 14 days, whereas none of the animals
15 injected with control cells developed tumors by 2 weeks (Fig. 19). These results show that cells transformed by transfection with vectors harboring the FGF-CX gene promote the development and growth of tumors *in vivo*.

Example 12. Method of Identifying the Nucleic Acid Encoding the Fibroblast Growth Factor-20-Like Protein.

20 An additional fibroblast growth factor-20-like protein sequence of the invention (FGF20X), also referred to herein as clone CG53135-02, was derived by laboratory cloning of cDNA fragments, by *in silico* prediction of the sequence. cDNA fragments covering either the full length of the DNA sequence, or part of the sequence, or both, were cloned. *In silico* prediction was based on sequences available in CuraGen's proprietary sequence databases or in
25 the public human sequence databases, and provided either the full length DNA sequence, or some portion thereof.

The laboratory cloning was performed using one or more of the methods summarized below:

30 SeqCalling™ Technology: cDNA was derived from various human samples representing multiple tissue types, normal and diseased states, physiological status, and developmental states from different donors. Samples were obtained as whole tissue, primary cells or tissue cultured primary cells or cell lines. Cells and cell lines may have been treated with biological or chemical agents that regulate gene expression, for example, growth factors, chemokines or steroids. The

WO 02/02625

PCT/US01/21191

cDNA thus derived was then sequenced using CuraGen's proprietary SeqCalling technology. Sequence traces were evaluated manually and edited for corrections if appropriate. cDNA sequences from all samples were assembled together, sometimes including public human sequences, using bioinformatics programs to produce a consensus sequence for each assembly.

5 Each assembly is included in CuraGen Corporation's database. Sequences were included as components for assembly when the extent of identity with another component was at least 95% over 50 bp. Each assembly represents a gene or portion thereof and includes information on variants, such as splice forms single nucleotide polymorphisms (SNPs), insertions, deletions and other sequence variations.

10 Exon Linking: The cDNA coding for the CG53135-02 sequence was cloned by the polymerase chain reaction (PCR) using the primers: 5'-AGGTCACCATGGCTGTATTGGC-3' (SEQ ID NO:24) and 5'-CTGTCTGTCCFCAGAAGAAGTTCTTGATC-3' (SEQ ID NO:25). Primers were designed based on *in silico* predictions of the full length or some portion (one or more exons) of the cDNA/protein sequence of the invention. These primers were used to
15 amplify a cDNA from a pool containing expressed human sequences derived from the following tissues: adrenal gland, bone marrow, brain - amygdala, brain - cerebellum, brain - hippocampus, brain - substantia nigra, brain - thalamus, brain - whole, fetal brain, fetal kidney, fetal liver, fetal lung, heart, kidney, lymphoma - Raji, mammary gland, pancreas, pituitary gland, placenta, prostate, salivary gland, skeletal muscle, small intestine, spinal cord, spleen, stomach, testis,
20 thyroid, trachea and uterus.

Multiple clones were sequenced and these fragments were assembled together, sometimes including public human sequences, using bioinformatics programs to produce a consensus sequence for each assembly. Each assembly is included in CuraGen Corporation's database. Sequences were included as components for assembly when the extent of identity with
25 another component was at least 95% over 50 bp. Each assembly represents a gene or portion thereof and includes information on variants, such as splice forms single nucleotide polymorphisms (SNPs), insertions, deletions and other sequence variations.

Physical clone: The PCR product derived by exon linking, covering the entire open reading frame, was cloned into the pCR2.1 vector from Invitrogen to provide clone
30 137627::160083874.1043010.A9.

Variant sequences are also included in this application. A variant sequence can include a single nucleotide polymorphism (SNP). A SNP can, in some instances, be referred to as a "cSNP" to denote that the nucleotide sequence containing the SNP originates as a cDNA. A SNP

WO 02/02625

PCT/US01/21191

can arise in several ways. For example, a SNP may be due to a substitution of one nucleotide for another at the polymorphic site. Such a substitution can be either a transition or a transversion. A SNP can also arise from a deletion of a nucleotide or an insertion of a nucleotide, relative to a reference allele. In this case, the polymorphic site is a site at which one allele bears a gap with respect to a particular nucleotide in another allele. SNPs occurring within genes may result in an alteration of the amino acid encoded by the gene at the position of the SNP. Intragenic SNPs may also be silent, when a codon including a SNP encodes the same amino acid as a result of the redundancy of the genetic code. SNPs occurring outside the region of a gene, or in an intron within a gene, do not result in changes in any amino acid sequence of a protein but may result in altered regulation of the expression pattern. Examples include alteration in temporal expression, physiological response regulation, cell type expression regulation, intensity of expression, and stability of transcribed message.

The DNA sequence and protein sequence for a novel Fibroblast Growth Factor-20-like gene were obtained by exon linking and are reported here as clone CG53135-02, and presented in Tables 4 and 5, below.

Table 4. Nucleotide sequence encoding the Fibroblast Growth Factor-20-like protein of the invention (SEQ ID NO:26).

```

>CG53135-02
ATGCGTGGCTTAGCCGAACTCGGGGCTTTCTGGGCGGCGCTGGAGGGCTTGGCCAGCCG 60
GGCGGAGCCGACCTGGCCGACCTGGACGGATCTTGGCGCGCGGCGGCGGCTCTATTGGCGGC 120
ACCGCTTCCACCTGCAGATCTGCGCCGACGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 180
AGCGCTTCCGCTATCTGGCAATTCAGCGATGTGGCAGCTGGGACTGGTCAATATTAGAGCT
GFGGACAGTGGTCTATCTTGGGATGAAATGACAAAGCGAAGCTCTATGGATCAGAGAAA 240
CTFACTCCGAATGCACTTTAGGCACTGTTGACAGAACTGGTATACACCTATTCA 300
TCTAACMTATCAACATGGAGACACTGGCGAGGTATTTTGGGCACTTACGAAAGAC 360
GGAACTCCAGAGATGGCGCGAGTCCGAGGCGATCGAATTTACGATTTCTTAACT 420
AGCCAGTGGATCCGAAAGAGCTCCGCAATTGTACAGSRRCTACTGATGACACTTAA 540

```

Table 5. Protein sequence (SEQ ID NO:27) encoded by SEQ ID NO:26.

```

>CG53135-02
MAPLAEVGGFLGGLGGLGQPGAAQLAHLHGILRRRPLVCRTEGFLQILEPDGSAQGTFRQDH 60
SLEGLLEFLSVAVGLVSTRGVDSGLYLGMIDKGLYSEKLTSECTFRQGFRENWYNTYS 120
SNTYKHGDTGRRYPVALMKDGTFRDGAARKRHKFTHFLEPRFVDPREVPELYKDLLMYT 179

```

The novel nucleic acid of 540 nucleotides (clone CG53135-02) encoding a novel Fibroblast Growth Factor-20-like protein is shown in Table 4. An open reading frame was identified beginning at nucleotides 1-3 and ending at nucleotides 538-540. This polypeptide represents a novel functional Fibroblast Growth Factor-20-like protein. The start and stop codons of the open reading frame are highlighted in bold type. Putative untranslated regions

WO 02/02625

PCT/US01/21191

(underlined), if any, are found upstream from the initiation codon and downstream from the termination codon. The encoded protein having 179 amino acid residues is presented using the one-letter code in Table 5.

Similarities

- 5 In a search of sequence databases, it was found, for example, that the nucleic acid sequence of this invention has 495 of 506 bases (97%) identical to a gb:GENBANK-ID:AB044277[acc:AB044277.1 mRNA from Homo sapiens (Homo sapiens mRNA for FGF-20, complete cds). The full amino acid sequence of the protein of the invention was found to have 160 of 162 amino acid residues (98%) identical to, and 160 of 162 amino acid residues (98%) similar to, the 211 amino acid residue ptnr:SWISSNEW-ACC:Q9NP95 protein from Homo sapiens (Human) (FIBROBLAST GROWTH FACTOR-20 (FGF-20)). Further homologies are provided in Table 6, below

Gene Index/ Identifier	Protein/ Organism	Length (nt/ aa)	Identity (%)	Positives (%)	Expect
gb:GENBANK-ID:AB044277[acc:AB044277.1	Homo sapiens mRNA for FGF-20, complete (residues 262-767)	1016 nt	495/506 (97%)	495/506 (97%)	1.6e-103
ptnr:SWISSNEW-ACC:Q9NP95	FIBROBLAST GROWTH FACTOR-20 (FGF-20) - Homo sapiens (residues 50-211)	211 aa	160/162 (98%)	160/162 (98%)	1.6e-93

- A multiple sequence alignment is given in Table 7, with the protein of the invention being shown on the first line in a ClustalW analysis comparing the protein of the invention with related protein sequences. Please note this sequence represents a splice form of Fibroblast Growth Factor-20 as indicated in positions 20-51. In the alignment shown above, black outlined amino acid residues indicate residues identically conserved between sequences (i.e., residues that may be required to preserve structural or functional properties), amino acid residues with a gray background are similar to one another between sequences, possessing comparable physical and/or chemical properties without altering protein structure or function (e.g. the group L, V, I, and M may be considered similar); and amino acid residues with a white background are neither conserved nor similar between sequences.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

Table 7. ClustalW alignment of CG53135-02 protein with related proteins.

1	CG53135-02	novel Fibroblast Growth Factor-20-like protein	175
2	CG53135-01	FGF-20X	211
3	Q9NPS5	FGFK_HUMAN, FIBROBLAST GROWTH FACTOR-20 (FGF-20)	211

```

CG53135-02  WAPLAEVGGFLGGLGGGCG.....GSAADLAEH
CG53135-01  WAPLAEVGGFLGGLGGLGGVSSHPFLIPAGGRPFLINFRSSAAERSARGGPGAAQLAHL
FGFK_HUMAN  WAPLAEVGGFLGGLGGLGGVQSSHPFLIPAGGRPFLIGFRSSAAERSARGGPGAAQLAHL

CG53135-02  RGLLARRQLYKRTDFHLQILPDSVAQSTRQDSDFGILEFISVAVGLVSIKGVDSGLVYLC
CG53135-01  RGLLARRQLYKRTDFHLQILPDSVAQSTRQDSDFGILEFISVAVGLVSIKGVDSGLVYLC
FGFK_HUMAN  RGLLARRQLYKRTDFHLQILPDSVAQSTRQDSDFGILEFISVAVGLVSIKGVDSGLVYLC

CG53135-02  VNDKQELFQSERKLTSEIIFRQPFSEMYNYNITYSNIFKNGLQRRYFVALNKDQTPRDGAS
CG53135-01  VNDKQELFQSERKLTSEIIFRQPFSEMYNYNITYSNIFKNGLQRRYFVALNKDQTPRDGAS
FGFK_HUMAN  VNDKQELFQSERKLTSEIIFRQPFSEMYNYNITYSNIFKNGLQRRYFVALNKDQTPRDGAS

CG53135-02  SRERQKFTHFLRRPVDFERVPELVKELLMYT
CG53135-01  SRERQKFTHFLRRPVDFERVPELVKELLMYT
FGFK_HUMAN  SRERQKFTHFLRRPVDFERVPELVKELLMYT

```

5 The presence of identifiable domains in the protein disclosed herein was determined by searches versus domain databases such as Pfam, PROSITE, ProDom, Blocks or Prints and then identified by the Interpro domain accession number. Significant domains are summarized in Table 8.

Model	Domain	seq-f	seq-t	hmm-f	hmm-t	score	E-value
10	PGF	1/1	31	162..	1	146.1)	280.8 2e-81

IPR002209: (HBGF_PGF)

15 Heparin-binding growth factors I and II (HBGF) [1, 2] (also known as acidic and basic fibroblast growth factors (FGF) are structurally related mitogens which stimulate growth or differentiation of a wide variety of cells of mesodermal or neuroectodermal origin. These two proteins belong to a family of growth factors and oncogenes which is a member of a superfamily that also contains the interleukin-1 proteins, Kunitz-type soybean trypsin inhibitors (STI) (see) and histactophilin. All have very similar structures, but although the HBGF and interleukin-1

20 families share some sequence similarity (about 25% [1]), they show none at all to the STIs. HBGFs are involved in many different processes related to cell differentiation and growth control [1]. HBGF1 and HBGF2 have similar effects: they induce mesoderm formation in embryogenesis, and mediate wound repair, angiogenesis and neural outgrowth; they also induce proliferation and migration of fibroblasts, endothelial cells and astroglial cells. HBGF3 (int-2) and HBGF4 (hst/ks) are known oncogenes, from stomach tumors and Kaposi sarcoma

WO 02/02625

PCT/US01/21191

respectively. HBGF5 and HBGF6 are also oncogene products. HBGF7, keratinocyte growth factor, is possibly the major paracrine effector of normal epithelial cell proliferation.

These growth factors cause dimerization of their tyrosine kinase receptors leading to intracellular signaling. There are currently four known tyrosine kinase receptors for fibroblast growth factors. These receptors can each bind several different members of this family [3].

The crystal structures of HBGF1 and HBGF2 [4] have been solved, showing them to have the same 12-stranded beta-sheet structure as both interleukin-1 and the Kunitz-type soybean trypsin inhibitors [5]; HBGF1 and interleukin-1 had been found to be similar, and they were predicted to have similar structures [6]. The beta-sheets are arranged in 3 similar lobes around a central axis, 6 strands forming an anti-parallel beta-barrel. Several regions of HBGF1 have been implicated in receptor binding, notably beta-strands 1-3, and the loop between strands 8 and 9. The loop between strands 10 and 11 is thought to be involved in binding heparin.

Table 9: PSORT, SignalP and hydropathy results for CuraGen Acc. No. CG53135-02.

```

15  endoplasmic reticulum (membrane) --- Certainty=0.8500 (Affirmative) < succ>
    plasma membrane --- Certainty=0.7900 (Affirmative) < succ>
    microbody (peroxisome) --- Certainty=0.7478 (Affirmative) < succ>
    mitochondrial inner membrane --- Certainty=0.1000 (Affirmative) < succ>
20  INTEGRAL Likelihood = -6.42 Transmembrane 62 - 78 ( 60 - 81)
    Seems to be a Type II (Mcyt Cexol) membrane protein
    Is the sequence a signal peptide?
    # Measure Position Value Cutoff Conclusion
25  max. C 54 0.441 0.37 YES
    max. Y 54 0.137 0.34 NO
    max. S 1 0.622 0.88 NO
    mean S 1-53 0.170 0.48 NO

```

The novel FGF20X nucleic acid encoding the FGF20X protein of the invention, or fragments thereof, may further be useful in diagnostic applications, wherein the presence or amount of the nucleic acid or the protein are to be assessed. These materials are further useful in the generation of antibodies that bind immunospecifically to the novel substances of the invention for use in therapeutic or diagnostic methods. These antibodies may be generated according to methods known in the art, using prediction from hydrophobicity charts, as described in the "Anti- FGF20X Antibodies" section below. The disclosed FGF20X protein has multiple hydrophilic regions, each of which can be used as an immunogen. In one embodiment, a contemplated FGF20X epitope is from about amino acids 20 to 65. In another specific embodiment, FGF20X epitopes are from about amino acids 80 to 175.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

This indicates that the FGF20X sequence of the invention has properties similar to those of other proteins known to contain this/these domain(s) and similar to the properties of these domains.

Chromosomal information:

- 5 The FGF20X gene disclosed in this invention maps to chromosomal 8p21.3-p22. This assignment was made using mapping information associated with genomic clones, public genes and ESTs sharing sequence identity with the disclosed sequence and CuraGen Corporation's Electronic Northern bioinformatics tool.

Tissue expression

- 10 The Fibroblast Growth Factor-20-like gene disclosed in this invention is expressed in at least the following tissues: Mammalian Tissue, Colon, Lung, Brain, Liver, Kidney, and Stomach. Expression information was derived from the tissue sources of the sequences that were included in the derivation of the sequence of clone CG53135-02.

REFERENCES

- 15 1. Burgess, W.H., Maciag, T., The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58: 575-606 [MEDLINE:89372809] [PUB00000068]
2. Thomas, K.A., Transforming potential of fibroblast growth factor genes. (1988) *Trends Biochem. Sci.* 13: 327-328 [MEDLINE:89223029] [PUB00005334]
3. Heath, J.K., Jones, B.Y., Wilkie, A.O.M., Morris-Kay, G.M., Functions of fibroblast growth
20 factors and their receptors. (1995) *Curr. Biol.* 5: 500-507 [MEDLINE:96059371] [PUB00001036]
4. Matthews, B.W., Weaver, L.H., Eriksson, A.E., Cousens, L.S., Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 3441-3445 [MEDLINE:91195367] [PUB00004736]
- 25 5. Murzin, A.G., Chothia, C., Lesk, A.M., Patterns of structure and sequence in the Kunitz inhibitors, interleukins-1 beta and 1 alpha and fibroblast growth factors. (1992) *J. Mol. Biol.* 223: 531-543 [MEDLINE:92148835] [PUB00003281]
6. Gimenez-Gallego, G., Rodkey, J., Bennett, C., Rios-Candelore, M., Disalvo, J., Thomas, K., Brain-derived acidic fibroblast growth factor: complete amino acid sequence and homologies.
30 (1985) *Science* 230: 1385-1388 [MEDLINE:86070224] [PUB00005097]
7. Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Macke, J.P., Nathans, J., Smallwood, P.M., Munoz-Saujuan, I., Tong, P., Hendry, S.H., Fibroblast growth factor (FGF) homologous factors: new

WO 02/02625

PCT/US01/21191

members of the FGF family implicated in nervous system development. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 9850-9857 [MEDLINE:96382556] [PUB0004904]
S.Ayres,M.D., Howard,S.C., Kuzio,J., Lopez-Ferber,M., Possee,R.D., The complete DNA
sequence of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. (1994) Virology 202: 586-605
5 [MEDLINE:94303173] [PUB00005600]

EQUIVALENTS

From the foregoing detailed description of the specific embodiments of the invention, it should be apparent that particular novel compositions and methods involving nucleic acids, polypeptides, antibodies, detection and treatment have been described. Although these particular
10 embodiments have been disclosed herein in detail, this has been done by way of example for purposes of illustration only, and is not intended to be limiting with respect to the scope of the appended claims that follow. In particular, it is contemplated by the inventors that various substitutions, alterations, and modifications may be made as a matter of routine for a person of ordinary skill in the art to the invention without departing from the spirit and scope of the
15 invention as defined by the claims. Indeed, various modifications of the invention in addition to those described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and accompanying figures. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

What is claimed is:

1. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the
5 group consisting of:
- a) an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27;
 - b) a variant of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27, in
10 which any amino acid specified in the chosen sequence is changed to a different amino acid,
provided that no more than 15% of the amino acid residues in the sequence are so changed;
 - c) a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27;
and
15
 - d) a variant of a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2 or SEQ
ID NO:27, wherein any amino acid in the mature form of the chosen sequence is changed to a
different amino acid, provided that no more than 15% of the amino acid residues in the sequence
of the mature form are so changed; and
20
 - e) a fragment of an amino acid sequence described in paragraphs a) to d).
2. A fragment of a polypeptide described in claim 1.
3. The polypeptide of claim 1, wherein said polypeptide is a naturally occurring
25 allelic variant of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27;
4. The polypeptide of claim 3, wherein the variant is the translation of a single
nucleotide polymorphism.
30
5. The polypeptide of claim 1, wherein said polypeptide is a variant polypeptide,
and wherein one or more of any amino acid specified in SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27 is
changed to provide a conservative substitution.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

6. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

5 a) a polypeptide comprising SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27;

b) a variant of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27, in which any amino acid specified in the chosen sequence is changed to a different amino acid, provided that no more than 15% of the amino acid residues in the sequence are so changed;

10

c) a mature form of the amino acid sequence given by SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27; and

15 d) a variant of a mature form of the amino acid sequence given by SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27, wherein any amino acid in the mature form of the chosen sequence is changed to a different amino acid, provided that no more than 15% of the amino acid residues in the sequence of the mature form are so changed;

20 e) a fragment of an amino acid sequence described in a) to d); and

f) the complement of any of the nucleic acid molecules described in paragraphs a) to e).

7. The nucleic acid molecule of claim 6, wherein the nucleic acid molecule comprises the nucleotide sequence of a naturally occurring allelic nucleic acid variant.

25

8. The nucleic acid molecule of claim 6, wherein said nucleic acid molecule encodes a variant polypeptide that has the polypeptide sequence of a naturally occurring polypeptide variant.

30 9. The nucleic acid molecule of claim 6, wherein the nucleic acid molecule comprises a single nucleotide polymorphism encoding said variant polypeptide.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

10. The nucleic acid molecule of claim 6, wherein said nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of

- 5
- a) a nucleotide sequence given by SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:26;
 - b) a nucleotide sequence wherein one or more nucleotides in a nucleotide sequence given by SEQ ID NO:1 is changed from that given by the chosen sequence to a different nucleotide provided that no more than 20% of the nucleotides are so changed;
 - 10 c) a nucleic acid fragment of the sequence described in a);
 - d) a nucleic acid fragment of the sequence described in b); and
 - e) the complement of any of said nucleic acid molecules.
- 15

11. The nucleic acid molecule of claim 6, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence in which any nucleotide specified in the coding sequence of the chosen nucleotide sequence is changed from that given by the chosen sequence to a different nucleotide provided that no more than 20% of the nucleotides in the chosen coding sequence are so changed.

20

12. An isolated nucleic acid molecule encoding a fragment of an FGF-CX polypeptide.

25 13. The nucleic acid molecule of claim 12, wherein said FGF-CX polypeptide is a variant of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27.

14. The nucleic acid molecule of claim 12, wherein said FGF-CX polypeptide is a mature FGF-CX polypeptide.

30

15. The nucleic acid molecule of claim 12, wherein said FGF-CX polypeptide is a variant of a mature form of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

16. A vector comprising the nucleic acid molecule of claim 6.
17. A cell comprising the vector of claim 16.
- 5 18. An antibody that binds immunospecifically to the polypeptide of claim 1.
19. The antibody of claim 18, wherein said antibody is a monoclonal antibody.
20. The antibody of claim 18, wherein the antibody is a humanized antibody or a
10 human antibody.
21. A method for determining the presence or amount of a polypeptide of claim 1 in a sample, the method comprising:
- 15 (a) providing the sample;
- (b) contacting the sample with an antibody that binds immunospecifically to the polypeptide; and
- (c) determining the presence or amount of antibody bound to said polypeptide, thereby determining the presence or amount of polypeptide in said sample.
- 20 22. A method for determining the presence or amount of a nucleic acid molecule of claim 6 in a sample, the method comprising:
- (a) providing the sample;
- (b) contacting the sample with a probe that binds to said nucleic acid molecule; and
- 25 (c) determining the presence or amount of the probe bound to said nucleic acid molecule,
- thereby determining the presence or amount of the nucleic acid molecule in said sample.
23. A method for identifying an agent that binds to a polypeptide of claim 1, the method comprising:
- 30 (a) contacting said polypeptide with a candidate substance; and
- (b) determining whether said candidate substance binds to said polypeptide; wherein a candidate substance that binds is the agent.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

24. The method of claim 23 wherein the candidate substance has a molecular weight not more than about 1500 Da.

25. A method for modulating an activity of the polypeptide of claim 1, the method comprising contacting the polypeptide with a compound that binds to the polypeptide in an amount sufficient to modulate the activity of the polypeptide.

26. A method for identifying a potential therapeutic agent for use in treatment of a pathology, wherein the pathology is related to aberrant expression, aberrant processing, or aberrant physiological interactions of a polypeptide of claim 1, the method comprising:

- (a) providing a cell expressing the polypeptide and having a property or function ascribable to the polypeptide;
- (b) contacting the cell provided in step (a) with a test agent; and
- (c) determining whether the test agent alters the property or function ascribable to the polypeptide;

whereby an alteration of the property or function of the polypeptide observed in the presence of the test agent indicates the test agent is a potential therapeutic agent.

27. The method of claim 26, further comprising subjecting the potential therapeutic agent to additional tests to identify the therapeutic agent.

28. The method of claim 26, wherein the candidate substance is an antibody or has a molecular weight not more than about 1500 Da.

29. The method of claim 26, wherein the property or function comprises cell growth or cell proliferation.

30. The method of claim 29, wherein the test agent binds to the polypeptide.

31. A therapeutic agent identified according to the method of claim 26.

32. A therapeutic agent identified using the method of claim 27.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

33. The therapeutic agent of claim 31, wherein the agent is an antibody or has a molecular weight not more than about 1500 Da.

5 34. A method of treating or preventing a disorder associated with a polypeptide described in claim 1, wherein the disorder is characterized by insufficient or ineffective growth of a cell or a tissue, said method comprising administering to a subject a polypeptide of claim 1 in an amount and for a duration sufficient to treat or prevent said polypeptide-associated disorder in said subject, wherein the subject is thought to be prone to or to be suffering from the disorder.

10 35. The method of claim 34, wherein said subject is a human.

36. A method of treating or preventing a disorder associated with aberrant expression, aberrant processing, or aberrant physiological interactions of a protein described in claim 1, wherein the disorder is characterized by insufficient or ineffective growth of a cell or a tissue, 15 said method comprising administering to a subject a nucleic acid described in claim 6 in an amount and for a duration sufficient to treat or prevent said disorder in said subject, wherein the subject is thought to be prone to or to be suffering from the disorder.

20 37. The method of claim 36, wherein said subject is a human.

38. A method of treating or preventing a disorder associated with aberrant expression, aberrant processing, or aberrant physiological interactions of a polypeptide described in claim 1, wherein the disorder is characterized by hyperplasia or neoplasia of a cell or a tissue, said method comprising administering to a subject a Therapeutic in an amount sufficient to treat or 25 prevent said disorder in said subject, wherein the subject is thought to be prone to or to be suffering from the disorder.

39. The method described in claim 38 wherein the Therapeutic is the antibody described in claim 18.

30 40. The method of claim 38, wherein the subject is a human.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

41. A pharmaceutical composition comprising the polypeptide of claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.
42. A pharmaceutical composition comprising the nucleic acid molecule of claim 6
5 and a pharmaceutically acceptable carrier.
43. A pharmaceutical composition comprising the antibody of claim 18 and a pharmaceutically acceptable carrier.
- 10 44. A pharmaceutical composition comprising the therapeutic agent of claim 31 and a pharmaceutically acceptable carrier.
45. The pharmaceutical composition of claim 44, wherein the therapeutic agent has a molecular weight not more than about 1500 Da.
- 15 46. A kit comprising in one or more containers a pharmaceutical composition of claim 41.
47. A kit comprising in one or more containers a pharmaceutical composition of
20 claim 42.
48. A kit comprising in one or more containers a pharmaceutical composition of claim 43.
- 25 49. A method for screening for a modulator of latency or predisposition to a disorder associated with aberrant expression, aberrant processing, or aberrant physiological interactions of a polypeptide described in claim 1, said method comprising:
- 30 a) providing a test animal at increased risk for the disorder and wherein said test animal recombinantly expresses the polypeptide of claim 1;
- b) administering a test compound to the test animal;
- c) measuring an activity of said polypeptide in said test animal after administering the compound of step (a); and

WO 02/02625

PCT/US01/21191

d) comparing the activity of said protein in said test animal with the activity of said polypeptide in a control animal not administered said compound;

wherein a change in the activity of said polypeptide in said test animal relative to said control animal indicates the test compound is a modulator of latency of or predisposition to the disorder.

50. The method of claim 49, wherein said test animal is a recombinant test animal that expresses a test protein transgene or expresses said transgene under the control of a promoter at an increased level relative to a wild-type test animal, and wherein said promoter is not the native gene promoter of said transgene.

51. A method for determining the presence of or predisposition to a disease associated with altered levels of a polypeptide described in claim 1 in a first mammalian subject, the method comprising:

a) measuring the level of expression of the polypeptide in a sample from the first mammalian subject; and
b) comparing the amount of said polypeptide in the sample of step (a) to the amount of the polypeptide present in a control sample from a second mammalian subject known not to have, or not to be predisposed to, said disease,

wherein an alteration in the expression level of the polypeptide in the first subject as compared to the control sample indicates the presence of or predisposition to said disease.

52. A method for determining the presence of or predisposition to a disease associated with altered levels of a nucleic acid molecule described in claim 6 in a first mammalian subject, the method comprising:

a) measuring the amount of the nucleic acid in a sample from the first mammalian subject; and
b) comparing the amount of said nucleic acid in the sample of step (a) to the amount of the nucleic acid present in a control sample from a second mammalian subject known not to have or not be predisposed to, the disease;

wherein an alteration in the level of the nucleic acid in the first subject as compared to the control sample indicates the presence of or predisposition to the disease.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

53. A method of treating a pathological state in a mammal, wherein the pathology is related to aberrant expression, aberrant processing, or aberrant physiological interactions of a polypeptide described in claim 1, the method comprising administering to the mammal a polypeptide in an amount that is sufficient to alleviate the pathological state, wherein the polypeptide is a polypeptide having an amino acid sequence at least 95% identical to a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:27, or a biologically active fragment thereof.

54. A method of treating a pathological state in a mammal, wherein the pathology is related to aberrant expression, aberrant processing, or aberrant physiological interactions of an FGF-CX polypeptide, the method comprising administering to the mammal an antibody described in claim 18 in an amount and for a duration sufficient to alleviate the pathological state.

55. A method of promoting growth of cells in a subject comprising administering to a subject in need thereof a polypeptide described in claim 1 in an amount and for a duration that are effective to promote cell growth.

56. The method of claim 55, wherein the subject is a human.

57. The method described in claim 55 wherein the cells whose growth is to be promoted are chosen from the group consisting of cells in the vicinity of a wound, cells in the vascular system, cells involved in hematopoiesis, cells involved in erythropoiesis, cells in the lining of the gastrointestinal tract, and cells in hair follicles.

58. A method of inhibiting growth of cells in a subject, wherein the growth is related to expression of a polypeptide described in claim 1, comprising administering to the subject a composition in an amount sufficient to inhibit growth of cells in said subject.

59. The method of claim 58, wherein the composition inhibits the cleavage of an FGF-CX polypeptide.

WO 02/02625

PCT/US01/21191

60. The method of claim 58, wherein the composition comprises an anti FGF-CX antibody or a FGF-CX therapeutic agent.

61. The method of claim 58, wherein the subject is a human.

5

62. The method of claim 58, wherein the cells whose growth is to be inhibited are chosen from the group consisting of transformed cells, hyperplastic cells, tumor cells, and neoplastic cells.

WO 02/02625

1/22

PCT/US01/21191

FIGURE 1

1 ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGCTTCTGGCCGCTGGG
 MetLeuProLeuAlaGluValGlyGlyPheLeuGlyGlyLeuGlu
 46 GGCTTGGCCAGCAGGTGGGTCCGATTTCCTTTGCCCTCCGCC
 GlyLeuGlyGlnGlnValGlySerHisPheLeuLeuProProAla
 91 GGGGAGCGCCGCGCGCTGCTGGGGAGCGCGAGCGCGCGCGAG
 GlyGluArgProProLeuLeuGlyGluArgArgSerAlaAlaGlu
 136 CCGAGCGCCGCGCGCGCGCGCGCTGCGCAGCTGGCGCACCTG
 ArgSerAlaArgGlyGlyProGlyAlaAlaGlnLeuAlaHisLeu
 181 CACGGATCCCTGGCGCGCGCGCGCTTATTGCCACCCGCTTC
 HisGlyIleLeuArgArgArgGlnLeuTyrCysArgTyrGlyPhe
 226 CACCTCGCGCTCCCTCCCGACCGCGCGCTGCGCGCACCCCGCG
 HisLeuGlnIleLeuProAspGlySerValGlnGlyThrArgGln
 271 GACCACAGCTCTTCGGTATCTTGGAAATCATCGTGGCGAGTG
 AspHisSerLeuPheGlyIleLeuGluPheIleSerValAlaVal
 316 GCACTGGTCAGTATTAGAGGTGTGACAGTGGTCTCTATCTTGA
 GlyLeuValSerIleArgGlyValAspSerGlyLeuTyrLeuGly
 361 ATGAATGACAAAGGAGAACTCTATGGATCAGAGAACTTACTTC
 MetAsnAspLysGlyGluLeuTyrSlySerGluLysLeuThrSer
 406 GAATGCCATCTTAGCGAGCGTGTGAGAGAACTGGTATAACACC
 GluCysIlePheArgGluGlnPheGluGluAsnTrpTyrAsnThr
 451 TATTCATCTAACATATATAAACATGGAGACACTGGCCGCGAGTAT
 TyrSerSerAsnIleTyrLysHisGlyAspThrGlyArgArgTyr
 496 TTGTGGCACTTAACAAGACCGAACTCCAGAGATGGCGCCAGG
 PheValAlaLeuAsnLysAspGlyThrProArgLysGlyAlaArg
 541 TCCAGAGCCATCAGAAATTACACAACTTACCCAGACCACTG
 SerLysArgHisGlnLysPheThrHisPheLeuProArgProVal
 586 GATCCAGTAGAGTTCAGAAATTGACAGGACCTACCGAATGTC
 AspProGluArgValProGluLeuTyrLysAspLeuLeuMetTyr
 631 ACT
 Thr

WO 02/02625
FIGURE 2

2/22

PC/T/US01/21191

```

Query: 170 TGGCGCACCTGCACCGCATCCTGCGCCGCGCGCAGCTCTAATGCGCGCACCGCTTCGACC 229
      ||| || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || |
Sbjct: 2 TGGATCAATTAAGGGGATTCGAGGGGGGGGAGCTATACGCGCAGGACTGGGATTCGACT 61

Query: 230 TGCAGATCCCTGCCCAGCCAGCCAGCCTGCAGGGCACCCGGCAGGACCCACACCCCTCTTCGGTA 289
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 62 TAGAAATCTTCCCGATGGTACTATCCAGGGAAACCAGGAAGACCCACCCGCAATTCGCA 121

Query: 290 TCTTGGAAATTCATCTCTGCTGTCAGTGGACTGGTCAGTATTCAGAGCTCTGAGCAGTGGTC 349
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 122 TTCTGSAATTTATCACTATAGCAGTGGCCCTGGTCAGCATTGGAGCGTGGRCAGTGGAC 181

Query: 350 TCTATCTTGGAAAGAAATGACAAGGAGAACTCTATGGATCGAGAGAACTTACTTTCGGRAT 409
      ||| || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || |
Sbjct: 182 TCTACCTCGGATGCAATGGAAGGGGGAGCTGTATGGATCGAAGAAACTAACCCAGAGCT 241

Query: 410 GCATULITAGGGAGCAGTTTGAAGGGHACTGGTATAACALUATTCATCTAACAUATAJA 469
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 242 GGTATTCAGAGAACAGTTGAGAGAAACTGGTATANTACGTACTCGTCAAGCCTAATA 301

Query: 470 AACATGGAGACCTGGCCGCGAGTATTTGTGGCACTTAAACAAAGACGGAAUCCAAAG 539
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 302 RGCACGTGGACACTGGAGGGGCGTATATGTTGCHTAAATTAAGRTGGGACCCCGAG 561

Query: 530 ATGGCCCCAGGTCAGAGAGCATTCAGAAATTCACAGATTCCTTACTAGACUATTTGGATC 589
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct: 362 AAGGGACTAGGACTAAGCGGCACAGAAATTCACACATTTTITACC TAGACCAAGTGGACC 421

Query: 590 CAGA 593
      |||
Sbjct: 422 CCGA 425

```

WO 02/02625
FIGURE 3

3/22

PCT/US01/21191

>gb:GenBank accession number -ID:AB020858|acc:AB020858 Homo sapiens genomic DNA of p21.3-p22 anti-oncogene of hepatocellular colorectal and non-small cell lung cancer , segment 1/11 - Homo sapiens, 100000 bp.

Minus Strand HSPs:

A.

Score = 1430 (214.6 bits), Expect = 1.6e-126, Sum P(3) = 1.6e-126
Identities = 288/289 (99%), Positives = 288/289 (99%),
Strand = Minus / Plus

Query: 289 TACCGAAGAGGCGCTGAGGTCCTGCTGGGCGCCCTGGCACTGCTGCTTAAAGAGAAATCGCA 230
|||||
Sbjct: 15927 TACCGAAGAGGCGCTGAGGTCCTGCTGGGCGCCCTGGCACTGCTGCTTAAAGAGAAATCGCA 18986

Query: 229 GGTGGAAAGCGGCTGGCGCAATAGAGCCCGCGCGCGCGGATGCGGTGCAAGGTGCGCCA 170
|||||
Sbjct: 15987 GGTGGAAAGCGGCTGGCGCAATAGAGCCCGCGCGCGGATGCGGTGCAAGGTGCGCCA 16045

Query: 169 GCTGGCGAGCGCCCGCGCCCGCGCGCGCGCTCCGCTCCGCGCGCGCGCTGCGGTGCGCCA 110
|||||
Sbjct: 16046 GCTGGCGAGCGCCCGCGCCCGCGCGCGCGCTCCGCTCCGCGCGCGCGCTGCGGTGCGCCA 16105

Query: 109 GCTAGCGCGCGCGCGCTGCG 50
|||||
Sbjct: 16106 GCTAGCGCGCGCGCGCTGCG 16165

Query: 49 ACCCTTCAGCG 1
|||||
Sbjct: 16166 ACCCTTCAGCG 16214

B.

Score = 1224 (183.6 bits), Expect = 1.6e-126, Sum P(3) = 1.6e-126
Identities = 250/255 (98%), Positives = 250/255 (98%),
Strand = Minus / Plus

Query: 633 AGTGTACATCAGTAGGTCCTGTACAAATCTGGAACCTCTTCTGGATCCACTGGCTTAGG 574
|||||
Sbjct: 7287 AGTGTACATCAGTAGGTCCTGTACAAATCTGGAACCTCTTCTGGATCCACTGGCTTAGG 7316

Query: 573 TAGAGAAATGCTTAAATTTCTGATGCTCTTGGACCTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 514
|||||
Sbjct: 7317 TAGAGAAATGCTTAAATTTCTGATGCTCTTGGACCTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 7376

Query: 513 TTGTGTAAGTCCACGAAAGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 454
|||||
Sbjct: 7377 TTGTGTAAGTCCACGAAAGACCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 7436

Query: 453 ATAGGTGTTTACACAGTTCTCTTCAAACTGCTCCCTTAAGATGCAATCGGAAGTAACTT 394
|||||
Sbjct: 7437 ATAGGTGTTTACACAGTTCTCTTCAAACTGCTCCCTTAAGATGCAATCGGAAGTAACTT 7496

FIGURE 3 (cont.)

FIGURE 4

Sequences analyzed:

1. HUMAN RFP-9 (P31371_HUMAN RFP-9) (SEQ ID NO:8)
2. MOUSE RFP-9 (P54130_MOUSE RFP-9) (SEQ ID NO:16)
3. RAT RFP-9 (P16364_RAT RFP-9) (SEQ ID NO:11)
4. XENOPUS XFP-CX (Xenopus laevis) (Xenopus laevis XFP-CX) (SEQ ID NO:12)
5. RFP-CX (GenBank accession) (SEQ ID NO:2)

Multiple Alignment:

```

HUMAN RFP-9      MAPLGGVGGYRGGVQDAPP - EKVVPLP - VDSVALL DPLSSRAGGLRGGVAVDLE
RAT RFP-9        MAPLGGVGGYRGGVQDAPP - EKVVPLP - VDSVALL DPLGGSEKGLRGGVAVDLE
MOUSE RFP-9      MAPLGGVGGYRGGVQDAPP - EKVVPLP - VDSVALL DPLGGSEKGLRGGVAVDLE
XENOPUS XFP-CX  MAPLGGVGGYRGGVQDAPP - EKVVPLP - VDSVALL DPLGGSEKGLRGGVAVDLE
RFP-CX          MAPLGGVGGYRGGVQDAPP - EKVVPLP - VDSVALL DPLGGSEKGLRGGVAVDLE

HUMAN RFP-9      LKGIIRRLQYCRIGTILRFPRT - GTRKMRPGLRFP - IAVSLVSLRGGVLSGTVI
RAT RFP-9        LKGIIRRLQYCRIGTILRFPRT - GTRKMRPGLRFP - IAVSLVSLRGGVLSGTVI
MOUSE RFP-9      LKGIIRRLQYCRIGTILRFPRT - GTRKMRPGLRFP - IAVSLVSLRGGVLSGTVI
XENOPUS XFP-CX  LKGIIRRLQYCRIGTILRFPRT - GTRKMRPGLRFP - IAVSLVSLRGGVLSGTVI
RFP-CX          LKGIIRRLQYCRIGTILRFPRT - GTRKMRPGLRFP - IAVSLVSLRGGVLSGTVI

HUMAN RFP-9      SMNERKAYGRRKKTQEVREKQFETV - MYSPNLSKRVVDCGRFYVALRFDGRRRGG
RAT RFP-9        SMNERKAYGRRKKTQEVREKQFETV - MYSPNLSKRVVDCGRFYVALRFDGRRRGG
MOUSE RFP-9      SMNERKAYGRRKKTQEVREKQFETV - MYSPNLSKRVVDCGRFYVALRFDGRRRGG
XENOPUS XFP-CX  SMNERKAYGRRKKTQEVREKQFETV - MYSPNLSKRVVDCGRFYVALRFDGRRRGG
RFP-CX          SMNERKAYGRRKKTQEVREKQFETV - MYSPNLSKRVVDCGRFYVALRFDGRRRGG

HUMAN RFP-9      ETKRCKKPTFLRFRVDFRVPKMR - LSGS
RAT RFP-9        ETKRCKKPTFLRFRVDFRVPKMR - LSGS
MOUSE RFP-9      ETKRCKKPTFLRFRVDFRVPKMR - LSGS
XENOPUS XFP-CX  ETKRCKKPTFLRFRVDFRVPKMR - LSGS
RFP-CX          ETKRCKKPTFLRFRVDFRVPKMR - LSGS

```

FIGURE 5

MAPLAEVGGGLAGLEGLGQVTSHELLPPACENFLEERRSAERAR EGPAAQMLH 59
 MAPLAEVGGGLAGLEGLGQVTSHELLPPACENFLEERRSAERAR EGPAAQMLH 66
 MAPLAEVGGGLAGLEGLGQVTSHELLPPACENFLEERRSAERAR EGPAAQMLH 56
 ---MAPLAEVGGGLAGLEGLGQVTSHELLPPACENFLEERRSAERAR EGPAAQMLH 55

PFILRRQLYCRIGFHLI LDEKNGGTRQDES LGLELTSVAGLTSIRGVDAQLYL 119
 LQFILRRQLYCRIGFHLI LDEKNGGTRQDES LGLELTSVAGLTSIRGVDAQLYL 118
 LQFILRRQLYCRIGFHLI LDEKNGGTRQDES LGLELTSVAGLTSIRGVDAQLYL 116
 LKGIILRRQLYCRIGFHLI LDEKNGGTRQDES LGLELTSVAGLTSIRGVDAQLYL 115

GAN DKGELVGSRELTS LCI FRRQREAWYVYSNFKHGDVREK FALHNDVPERKA 176
 GAN DKGELVGSRELTS LCI FRRQREAWYVYSNFKHGDVREK FALHNDVPERKA 178
 GAN DKGELVGSRELTS LCI FRRQREAWYVYSNFKHGDVREK FALHNDVPERKA 175
 SANE RAEELTGSRELTS LCI FRRQREAWYVYSNFKHGDVREK FALHNDVPERKA 175

RKRRRQKTHLPRE VDFEAEPELKKDILML 211
 RKRRRQKTHLPRE VDFEAEPELKKDILML 208
 RKRRRQKTHLPRE VDFEAEPELKKDILML 206
 RKRRRQKTHLPRE VDFEAEPELKKDILML 207

WO 02/02625

7/22

PC1/US01/21191

FIGURE 6

pnr:SWISSPROT-ACC:E31371 GLIA-ACTIVATING FACTOR PRECURSOR (GAF) (FIBROBLAST GROWTH FACTOR-9)
 :TOP-9) (HGFR-9) - HOMO SAPIENS (HUMAN), 208 aa. Identities = 147/208 (70%), Positives = 170/208
 :314)

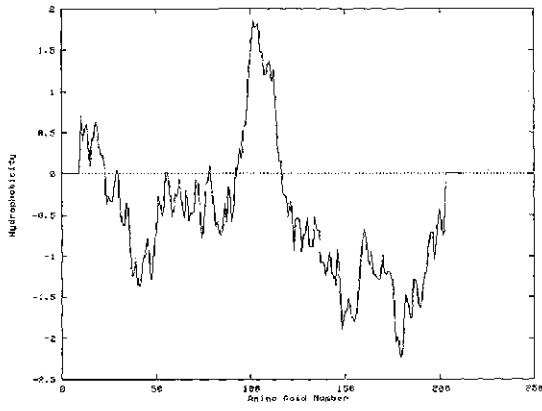
Query: 1 MDELARYGGFLGGLGELCQQCSHFLLPACERFLLCERRHARARAC - CKSQAQLAA 59
 ||| ||| + | + + + || + || + || + | || + | ||
 Subject: 2 MDELAEVGNVGVQDAV--PZGNVFLPV--DSFVLLSDHLAGSAGLGRGSAVTDLDA 56
 ||| ||| + | + + + || + || + || + | || + | ||
 Query: 60 LAGL--AREKQLYCFKGFHLQL--PQSSVGTQCPDRLZGTLGRTISVAVGLVIRGVDRITVL 119
 ||| ||| + | + + + || + || + || + | || + | ||
 Subject: 57 LAGL--AREKQLYCFKGFHLQL--PQSSVGTQCPDRLZGTLGRTISVAVGLVIRGVDRITVL 116
 ||| ||| + | + + + || + || + || + | || + | ||
 Query: 120 QRMVGGELVGGSEFSECTPRECEENWNTYNSNIFKGGCTGRCDFIFLHNCSTPQCA 179
 ||| ||| + | + + + || + || + || + | || + | ||
 Subject: 117 QRMVGGELVGGSEFSECTPRECEENWNTYNSNIFKGGCTGRCDFIFLHNCSTPQCA 176
 ||| ||| + | + + + || + || + || + | || + | ||
 Query: 160 RSEKPKRFTALPRFVDPVREYKDLA 208
 ||| ||| + | + + + || + || + || + | || + | ||
 Subject: 177 RTRVHQSFTLPRFVDPVREYKDLA 205
 ||| ||| + | + + + || + || + || + | || + | ||

WO 02/02625

11/22

PCT/US01/21191

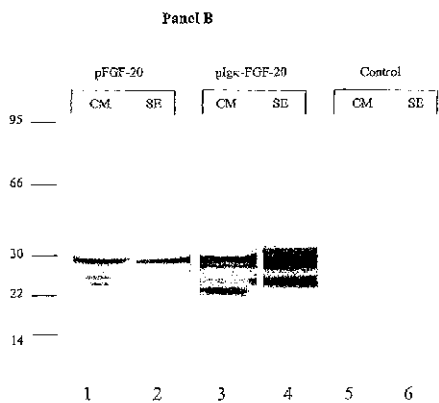
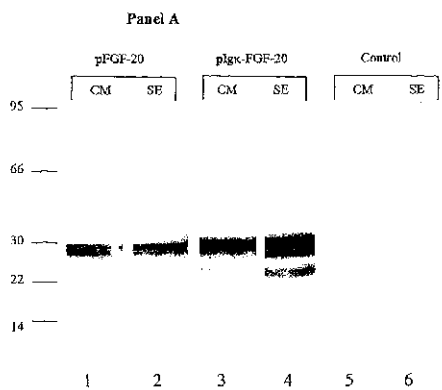
FIGURE 10



WO 02/02625
FIGURE 11

12/22

PCT/US01/21191

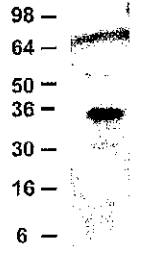


WO 02/02625

13/22

PCT/US01/21191

FIGURE 12.



WO 02/02625
Figure 14.

15/22

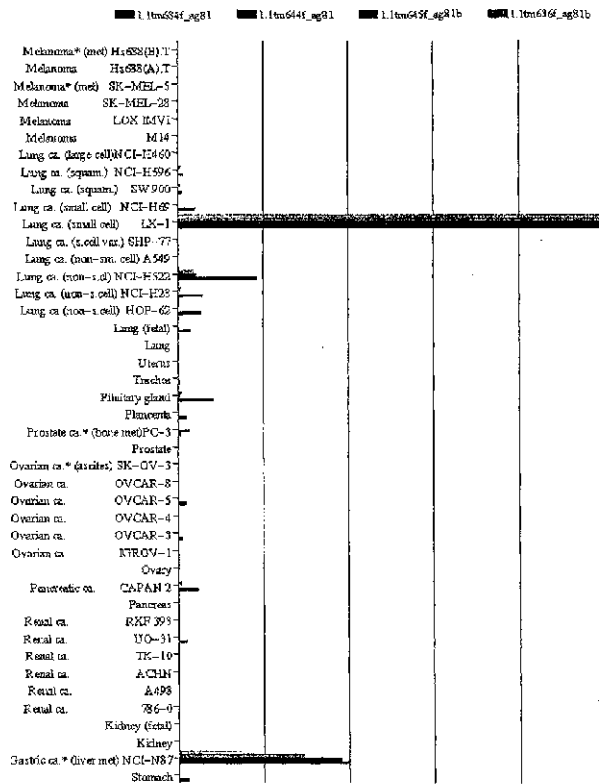
PCT/US01/21191

98—
64—
50—
36—
30—
16—
6 —

WO 02/02625
Figure 15, Panel A.

16/22

ECT/US01/21191

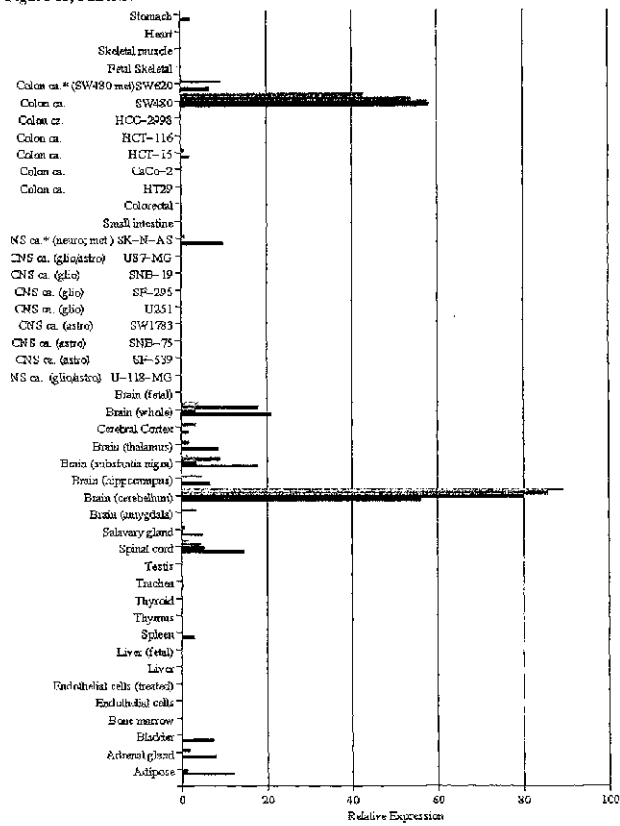


WO 02/02625

17/22

PCT/US01/21191

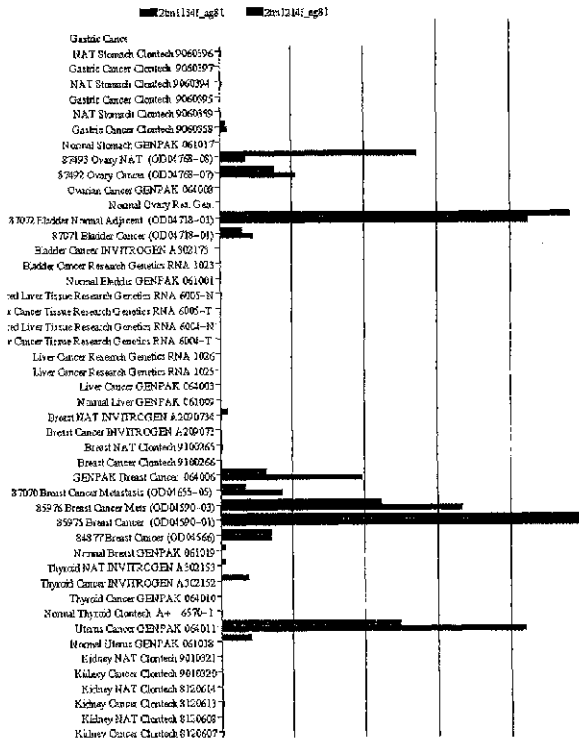
Figure 15, Panel B.



WO 02/02625
Figure 15, Panel C.

18/22

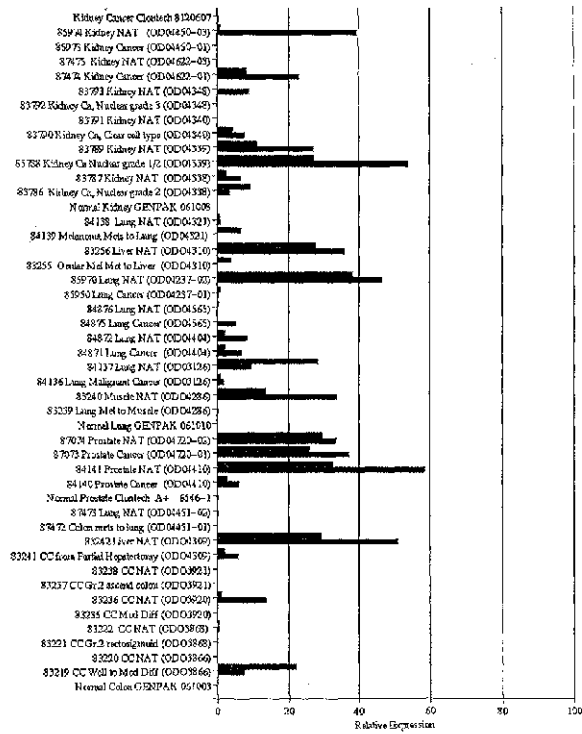
PC/T/US01/21191



WO 02/02625
Figure 15, Panel D.

19/22

ECT/US01/21191



WO 02/02625

20/22

PCT/US01/21191

FIGURE 16.

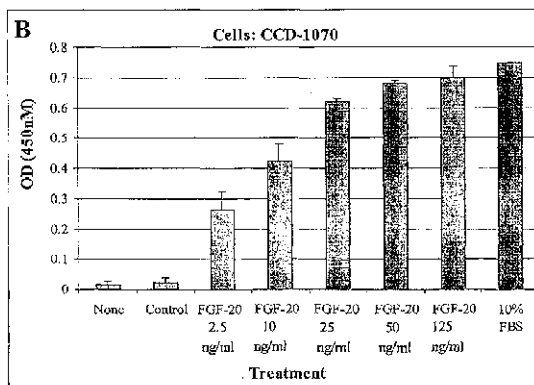
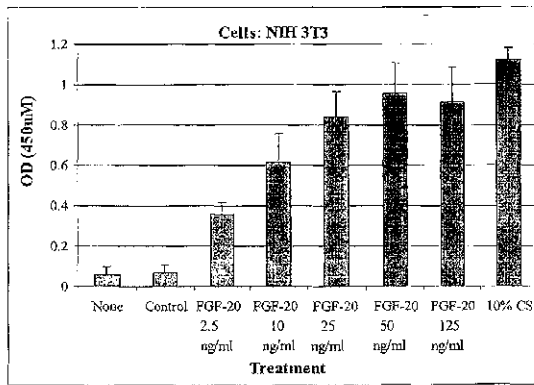


FIGURE 16 (continued)

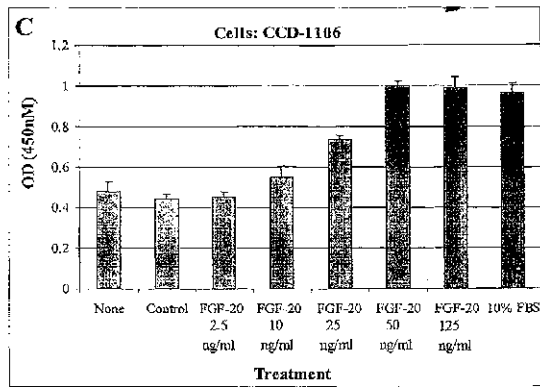


FIGURE 17.

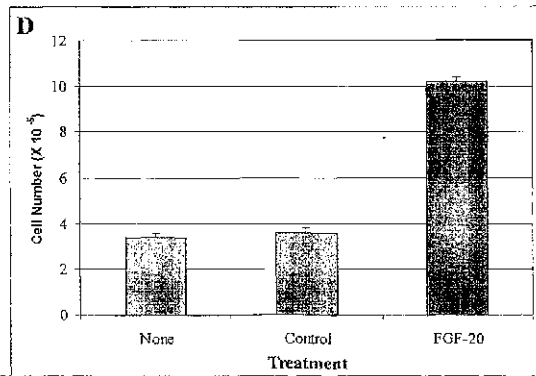


FIGURE 18.

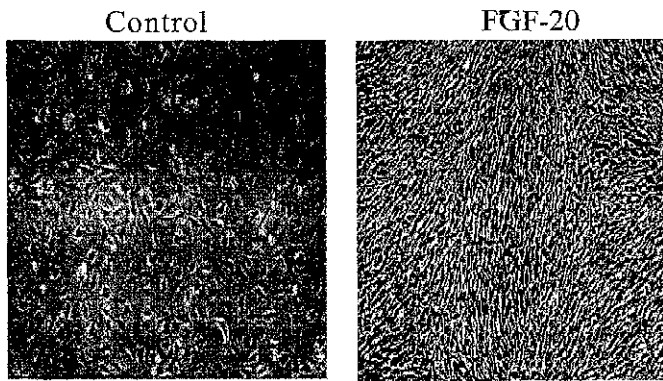
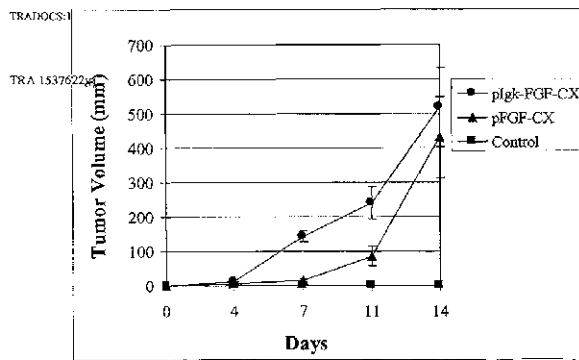


FIGURE 19.



【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/002625 A3

(51) International Patent Classification: C07K 14/50
(21) International Application Number: PCT/US01/21191
(22) International Filing Date: 3 July 2001 (03.07.2001)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data: 09/609,543 3 July 2000 (03.07.2000) US
(63) Related to continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: 09/609,543 (CIP) US Filed on: 3 July 2000 (03.07.2000)
(71) Applicant for all designated States except USA: CLERA-GEN CORPORATION [US/US], 555 Long Walk Drive, 11th floor, New Haven, CT 06511 (US)

(72) Inventor: and
(75) Inventor/Applicant for US only: JEFFERS, Michael [US/US]; 14 Elm Hill Hollow, Branford, CT 06405 (US); SHIMKETS, Richard, A. [US/US]; 191 Lacle Street, West Haven, CT 06516 (US); PRAYAGA, Sudhiradas, K. [IN/US]; 140 Mill Street, Apartment 18-136, East Haven, CT 06512 (US); BOLDOG, Ferenc, L. [HU/US]; 1687 Hartford Turnpike, North Haven, CT 06473 (US); YANG, Meijia [CN/US]; 6 Calvert Lane, East Lyme, CT 06533 (US); BURGESS, Catherine [US/US]; 90 Carriage Hill Drive, Weathersfield, CT 06409 (US); FERNANDES, Elma [US/US]; 77 Florence Road #2R, Branford, CT 06405 (US); HERRMANN, John, L. [TU/US]; 78 Barnsard Lane, Guilford, CT 06437 (US); LAROCHELLE, William, J. [US/US]; 15 Desmond Lane, Madison, CT 06457 (US); LICHTENSTEIN, Henri [US/US]; 88 Greenbrier Drive, Guilford, CT 06437 (US).

[Continued on next page]

(54) Title: NOVEL FIBROBLAST GROWTH FACTORS AND NUCLEIC ACIDS ENCODING SAME



WO 02/002625 A3

1
ATGCTCCCTTTCGCGAGGCTGGGCGCTTCTGGGCGGCTTGGGA
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

(57) Abstract: The present invention provides several isolated polypeptides, polynucleotides encoding them, antibodies that nonspecifically bind to them, or any derivative, variant, mutant, or fragment of the polypeptide, polynucleotide or antibody. The invention additionally provides methods in which the polypeptide, polynucleotide and antibody are used in detection and treatment of a broad range of pathological states, as well as other uses.

WO 02/002625 A3



(74) Agent: **ELRIFI, Ivor, R.**, Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky and Popeo, P.C., One Financial Center, Boston, MA 02111 (US)

IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR, OAPI patent (BE, BR, CH, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, SE, SN, TD, TG)

(81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GL, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PE, PI, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Published:

with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:
1 August 2002

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU,

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.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/21191
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/50		
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 C07K		
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 pertinent, search terms used) EMBL, SEQUENCE SEARCH, EPO-internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	KIRIKOSHI ET AL.: "Molecular Cloning and Characterisation of Human FGF-20 on Chromosome 8p21.3-p22" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 274, August 2000 (2000-08), pages 337-343, XP002197932 figure 1	1-24, 26-30, 34-43, 46-62
A	DATABASE EMBL 'Online! 1 May 2000 (2000-05-01) KOGA ET AL.: "XFGF-20" Database accession no. Q9PVY1 XP002197933 abstract	1-24, 26-30, 34-43, 46-62
-/-		
<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:		
1 later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to illustrate the principle or theory underlying the invention		
2 document of particular relevance; the claimed invention could be considered "obvious" or "derived" to involve a "trivial" step if the document is taken alone		
3 document of particular relevance; the claimed invention could be considered to involve an "inventive step" when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.		
4 document a member of the same patent family		
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 doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (see speciality)		
C 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		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
2 May 2002	18/06/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5816 Palatinen 2 NL - 2500 HW The Hague Tel: (+31-70) 900-9040, Tx: 31 157 epo nl Fax: (+31-70) 340-3010	Author(s) of the Sprinks, M	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/US 01/21191

O ₂ (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE EMBL 'Online! ID: MMFGF9, 8 December 1995 (1995-12-08) SEQ: "Mouse embryonal carcinoma cell mRNA for fibroblast growth factor 9 (FGF 9), complete cds" Database accession no. D38258 XP002156973 abstract	1-24, 26-30, 34-43, 46-62
A	DATABASE EMBL 'Online! ID: FGF9_MOUSE, 1 October 1996 (1996-10-01) SANTOS-OCAMPO ET AL.: "Glia-activating factor precursor (GAF) (fibroblast growth factor 9) (FGF-9) (HBGF-9)" Database accession no. P54130 XP002156974 abstract	1-24, 26-30, 34-43, 46-62
A	DATABASE EMBL 'Online! ID: FGF9_HUMAN, 1 July 1993 (1993-07-01) MIYAMOTO ET AL.: "Glia-activating factor precursor (GAF) (fibroblast growth factor 9) (FGF-9) (HBGF-9)" Database accession no. P31371 XP002156975 abstract	1-24, 26-30, 34-43, 46-62

International Application No. PCT/US 01 21191

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 25,31-33,44,45

It is not possible to carry out a meaningful search into the state of the art on the basis of claims 25, 31-33, 44 and 45 because they refer either directly or indirectly to subject-matter (compounds resulting from screening processes and "therapeutic agents") that is structurally undefined and could not in any event have been functionally tested in the prior art.

In view of the fact that sequence information corresponding to SEQ ID NO:1 and 26 mentioned in the claims is not present anywhere in the application as originally filed, nor in the sequence listings filed at a later date, the search has by necessity been confined to those sequences mentioned in the claims for which the relevant information has been provided, namely SEQ ID NO:2 and 27.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

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 9/10	A 6 1 P 9/10	4 C 0 8 4
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/06	4 C 0 8 5
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	4 H 0 4 5
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 K 14/50	C 0 7 K 14/50	
C 0 7 K 16/22	C 0 7 K 16/22	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
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 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, 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, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ブラヤガ, サンドヒルダス ケイ.

アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 5 1 2, イースト ハイブン, ミル ストリート 1 4 0, アパートメント 1 8 - 1 3 6

(72) 発明者 ボルドッグ, フェレンク エル.

アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 4 7 3, ノース ハイブン, ハートフォード ターンパイク 1 6 8 7

(72) 発明者 ヤン, メイシャ

アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 5 3 3, イースト ライム, キャットバード レーン 6

(72) 発明者 バーゲス, キャサリン

アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 1 0 9, ウェザースフィールド, キャリッジ ヒル ドライブ 9 0

(72) 発明者 フェルナンデス, エルマ

アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 4 0 5, ブランフォード, フローレンス ロード 7 7 ナンバー 2 ビー

(72) 発明者 ハーマン, ジョン エル.

アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 4 3 7, ギルフォード, パーンシェド レーン 7 8

(72) 発明者 ラロシェル, ウィリアム ジェイ.

アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 4 4 3 , マディソン , デボンシャー レーン 1 5
 (72)発明者 リチェンステイン , ヘンリ
 アメリカ合衆国 コネチカット 0 6 4 3 7 , ギルフォード , グリーンブリアー ドライブ
 8 8

F ターム(参考) 2G045 AA29 AA34 AA35 CB01
 4B024 AA01 AA11 BA21 BA56 CA04 CA07 CA09 CA12 CA20 DA03
 DA06 EA04 GA13 GA25 HA11 HA13 HA14
 4B063 QA01 QA05 QA19 QQ02 QQ08 QQ21 QQ41 QQ53 QQ61 QQ79
 QQ89 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42 QR56 QR62 QR72 QR77
 QR80 QS16 QS25 QS34 QS36 QX01 QX02
 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC01 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA26X AA58X AA72X AA91X AA93X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA05
 BA30 CA24 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA17 BA44 CA53 DC50 NA14 ZA402 ZA892 ZA962 ZB152
 ZB212 ZB262 ZC352
 4C085 AA13 AA14 BB11 CC02 CC05 DD22 DD33
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA01 DA75 DA76
 EA20 EA22 EA50 FA71 FA72 FA74

专利名称(译)	新型成纤维细胞生长因子和编码它们的核酸		
公开(公告)号	JP2004502418A	公开(公告)日	2004-01-29
申请号	JP2002507876	申请日	2001-07-03
[标]申请(专利权)人(译)	CURAGEN CORP		
申请(专利权)人(译)	Kyurajen公司		
[标]发明人	ジェファーズマイケル シムケッツリチャードエイ プラヤガサンドヒルダスケイ ボルドッグフェレンクエル ヤンメイシャ バーゲスキャサリン フェルナンデスエルマ ハーマンジョンエル ラロシエルウィリアムジェイ リチェンステインヘンリ		
发明人	ジェファーズ, マイケル シムケッツ, リチャード エイ. プラヤガ, サンドヒルダ スケイ. ボルドッグ, フェレンク エル. ヤン, メイシャ バーゲス, キャサリン フェルナンデス, エルマ ハーマン, ジョン エル. ラロシエル, ウィリアム ジェイ. リチェンステイン, ヘンリ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/10 A61P9/10 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/50 C07K16/22 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61K48/00 A61K2039/505 A61P3/10 A61P9/10 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/50		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61P3/10 A61P9/10 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P35/00 A61P43/00.105 C07K14/50 C07K16/22 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/CB01 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/BA56 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA13 4B024/GA25 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ53 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA05 4B065/BA30 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA402 4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C084/ZB152 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZC352 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC05 4C085		

/DD22 4C085/DD33 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41
4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045
/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74

优先权 09/609543 2000-07-03 US

外部链接 [Espacenet](#)

摘要(译)

本发明提供了新颖的分离的多肽，编码它们的多核苷酸，免疫特异性结合它们的抗体，或该多肽，多核苷酸或抗体的任何衍生物，变体，突变体或片段。本发明还提供了其中多肽，多核苷酸和抗体用于检测和治疗广泛范围的病理状态以及其他用途的方法。