

(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2005-500035
(P2005-500035A)**

(43) 公表日 **平成17年1月6日(2005.1.6)**

(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 38/27	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 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 274 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-506444 (P2003-506444)	(71) 出願人	301062363 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 06511, ニューヘヴン, ロング ワーフ ドライブ 555, 11 ティーエイチ フロア
(86) (22) 出願日	平成14年6月17日 (2002.6.17)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稜
(85) 翻訳文提出日	平成15年12月15日 (2003.12.15)	(74) 代理人	100067035 弁理士 岩崎 光隆
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/019400	(74) 代理人	100064610 弁理士 中嶋 正二
(87) 国際公開番号	W02002/102990	(74) 代理人	100072730 弁理士 小島 一晃
(87) 国際公開日	平成14年12月27日 (2002.12.27)		
(31) 優先権主張番号	60/298, 441		
(32) 優先日	平成13年6月15日 (2001.6.15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/316, 446		
(32) 優先日	平成13年8月31日 (2001.8.31)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/359, 594		
(32) 優先日	平成14年2月26日 (2002.2.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規線維芽細胞成長因子およびそれをコード化する核酸

(57) 【要約】

本発明は、FGF-CX、新規単離ポリペプチド、ならびにFGF-CXをコード化するポリヌクレオチドおよびFGF-CXに免疫特異的に結合する抗体、または誘導體、変異体、またはFGF-CXポリペプチドのフラグメント、ポリヌクレオチドまたは抗体を提供する。加えて、本発明は、幅広い範囲の病態の検出および処置、ならびにたの使用において用いられるFGF-CXポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび抗体を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) 配列番号：2により与えられるアミノ酸配列；
- b) 選択された配列において特定される任意のアミノ酸が配列中のアミノ酸残基の15%より多くは変更を受けないという条件で異なるアミノ酸に変更されている、配列番号：2により与えられるアミノ酸配列の変異体；
- c) 配列番号：2により与えられるアミノ酸配列の成熟型；および
- d) 選択された配列の成熟型の任意のアミノ酸が成熟型の配列中のアミノ酸残基の15%より多くは変更を受けないという条件で異なるアミノ酸に変更されている、配列番号：2により与えられるアミノ酸の成熟型の変異体；および
- e) a) から d) において記載されたアミノ酸配列のフラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド。

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】

該ポリペプチドが配列番号：2の天然に存在する対立遺伝子変異体である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

変異体が1塩基多型の翻訳物である、請求項 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

該ポリペプチドが変異体ポリペプチドであり、かつ配列番号：2において特定される1またはそれ以上の任意のアミノ酸が変更されて保存的置換を与える、請求項 1 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 6】

a) 配列番号：2を含むポリペプチド；

b) 選択された配列において特定された任意のアミノ酸が配列中のアミノ酸残基の15%より多くは変更を受けないという条件で、異なるアミノ酸に変更されている、配列番号：2の変異体；

c) 配列番号：2により与えられるアミノ酸配列の成熟型；および

d) 選択された配列の成熟型の任意のアミノ酸が成熟型の配列中のアミノ酸残基の15%より多くは変更を受けないという条件で異なるアミノ酸に変更されている、配列番号：2により与えられるアミノ酸配列の成熟型の変異体；

30

e) a) から d) において記載されたアミノ酸配列のフラグメント；および

f) a) から e) において記載された任意の核酸分子の相補的配列 (complement)

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコード化する核酸配列を含む単離核酸分子。

【請求項 7】

核酸分子が天然に存在する対立遺伝子核酸の変異体のヌクレオチド配列を含む、請求項 6 に記載の核酸分子。

【請求項 8】

該核酸分子が天然に存在するポリペプチドの変異体のポリペプチド配列を有する変異体ポリペプチドをコード化する、請求項 6 に記載の核酸分子。

40

【請求項 9】

核酸分子が該変異体ポリペプチドをコード化する1塩基多型を含む、請求項 6 に記載の核酸分子。

【請求項 10】

該核酸分子が、

a) 配列番号：1により与えられるヌクレオチド配列；

b) 配列番号：1により与えられるヌクレオチド配列中の1またはそれ以上のヌクレオチドが、ヌクレオチドの20%より多くは変更を受けないという条件で、選択された配列に

50

より与えられるものから異なるヌクレオチドに変更されている、ヌクレオチド配列；
 c) a)において記載された配列の核酸フラグメント；
 d) b)において記載された配列の核酸フラグメント；および
 e) 任意の該核酸分子の相補的分子 (complement)、
 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 6 に記載の核酸分子。

【請求項 1 1】

核酸分子が、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た任意のヌクレオチドが選択されたコード配列中のヌクレオチドの 20% より多くは変更を受けないという条件で、選択された配列により与えられるものから異なるヌクレオチドに変更されているヌクレオチド配列を含む、請求項 6 に記載の核酸分子。

10

【請求項 1 2】

F G F - C X ポリペプチドのフラグメントをコード化する単離核酸分子。

【請求項 1 3】

該 F G F - C X ポリペプチドが配列番号：2 の変異体である、請求項 1 2 に記載の核酸分子。

【請求項 1 4】

該 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 1 2 に記載の核酸分子。

【請求項 1 5】

該 F G F - C X ポリペプチドが配列番号：2 の成熟型の変異体である、請求項 1 2 に記載の核酸分子。

20

【請求項 1 6】

請求項 6 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 1 8】

(a) 配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列；(b) 選択された配列において特定される任意のアミノ酸が配列中のアミノ酸残基の 15% より多くは変更を受けないという条件で異なるアミノ酸に変更されている、配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の変異体；(c) 配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の成熟型；および(d) 選択された配列の成熟型の任意のアミノ酸が成熟型の配列中のアミノ酸残基の 15% より多くは変更を受けないという条件で異なるアミノ酸に変更されている、配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の成熟型の変異体；および(e) (a) から(d) において記載されたアミノ酸配列のフラグメント、からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体。

30

【請求項 1 9】

該抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 8 に記載の抗体。

【請求項 2 0】

該抗体がヒト化抗体またはヒト抗体である、請求項 1 8 に記載の抗体。

【請求項 2 1】

試料中の(a) 配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列；(b) 選択された配列において特定される任意のアミノ酸が配列中のアミノ酸残基の 15% より多くは変更を受けないという条件で異なるアミノ酸に変更されている、配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の変異体；(c) 配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の成熟型；および(d) 選択された配列の成熟型の任意のアミノ酸が成熟型の配列中のアミノ酸残基の 15% より多くは変更を受けないという条件で異なるアミノ酸に変更されている、配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の成熟型の変異体；および(e) (a) から(d) において記載されたアミノ酸配列のフラグメント、からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドの存在または量を測定する方法であって、方法が：

40

(i) 試料を用意すること；

50

(ii) 試料を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こと；および
 (iii) 該ポリペプチドに結合する抗体の存在または量を測定すること、
 それにより、該試料中のポリペプチドの存在または量を測定すること、を含む方法。

【請求項 2 2】

試料中の請求項 6 に記載の核酸分子の存在または量を測定する方法であって、方法が：

(i) 試料を用意すること；
 (ii) 試料を該核酸分子に結合するプローブと接触させること；および
 (iii) 該核酸分子に結合するプローブの存在または量を測定すること、
 それにより、該試料中の核酸分子の存在または量を測定すること、を含む方法。

【請求項 2 3】

(a) 配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列；(b) 選択された配列において特定される任意のアミノ酸が配列中のアミノ酸残基の 15% より多くは変更を受けないという条件で異なるアミノ酸に変更されている、配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の成熟型の変異体；(c) 配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の成熟型；および (d) 選択された配列の成熟型の任意のアミノ酸が成熟型の配列中のアミノ酸残基の 15% より多くは変更を受けないという条件で異なるアミノ酸に変更されている、配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の成熟型の変異体；および (e) (a) から (d) において記載されたアミノ酸配列のフラグメント、からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドに結合する作用物質を同定する方法であって、方法が：

(i) 該ポリペプチドを候補物質と接触させること；および
 (ii) 該候補物質が該ポリペプチドに結合するか否かを決定すること；
 ここで結合する候補物質が作用物質であること、を含む方法。

【請求項 2 4】

候補物質が約 1500 Da 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】

(a) 配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列；(b) 選択された配列において特定される任意のアミノ酸が配列中のアミノ酸残基の 15% より多くは変更を受けないという条件で異なるアミノ酸に変更されている、配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の変異体；(c) 配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の成熟型；および (d) 選択された配列の成熟型の任意のアミノ酸が成熟型の配列中のアミノ酸残基の 15% より多くは変更を受けないという条件で異なるアミノ酸に変更されている、配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の成熟型の変異体；および (e) (a) から (d) において記載されたアミノ酸配列のフラグメント、からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドの活性を調節する方法であって、ポリペプチドをポリペプチドの活性を調節するのに十分な量でポリペプチドに結合する化合物と接触させることを含む、方法。

【請求項 2 6】

病変の処置において有用な潜在的治療物質を同定する方法であって、当該病変が、(a) 配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列；(b) 選択された配列において特定される任意のアミノ酸が配列中のアミノ酸残基の 15% より多くは変更を受けないという条件で異なるアミノ酸に変更されている、配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の変異体；(c) 配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の成熟型；および (d) 選択された配列の成熟型の任意のアミノ酸が成熟型の配列中のアミノ酸残基の 15% より多くは変更を受けないという条件で異なるアミノ酸に変更されている、配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の成熟型の変異体；および (e) (a) から (d) において記載されたアミノ酸配列のフラグメント、からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドの異常発現、異常プロセッシング、または異常生理的相互作用に関連し、方法が

(i) ポリペプチドを発現しかつポリペプチドに基づく性質または機能を有する細胞を用意すること；
 (ii) (i) において用意された細胞を試験物質と接触させること；および
 (iii) 試験物質がポリペプチドに基づく性質または機能を変えるか否か決定すること；

10

20

30

40

50

それにより、試験物質の存在下で観察されるポリペプチドの性質または機能の変化が、試験物質が潜在的治療物質であることを示すこと、を含む方法。

【請求項 27】

さらに潜在的治療物質を該物質が治療物質であることを同定するための付加試験に付することをさらに含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

候補物質が抗体であるか、または約 1500 Da 以下の分子量を有する、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 29】

性質または機能が細胞成長または細胞増殖を含む、請求項 26 に記載の方法。

10

【請求項 30】

試験物質がポリペプチドに結合する、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

請求項 26 に記載の方法により同定される治療物質。

【請求項 32】

請求項 27 に記載の方法を用いて同定される治療物質。

【請求項 33】

物質が、抗体であるか、または約 1500 Da 以下の分子量を有する、請求項 31 に記載の治療物質。

【請求項 34】

アミノ酸配列を含む単離ポリペプチドと関連する疾患を処置または予防する方法であって

20

；
該アミノ酸配列が、(a) 配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列；(b) 選択された配列において特定される任意のアミノ酸が配列中のアミノ酸残基の 15% より多くは変更を受けないという条件で異なるアミノ酸に変更されている、配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の変異体；(c) 配列番号：2 により与えられるアミノ酸の成熟型；および (d) 選択された配列の成熟型の任意のアミノ酸が成熟型の配列中のアミノ酸残基の 15% より多くは変更を受けないという条件で異なるアミノ酸に変更されている、配列番号：2 により与えられるアミノ酸の成熟型の変異体；および (e) (a) から (d) において記載されたアミノ酸配列のフラグメント；からなる群から選択され、該疾患が、細胞または組織の不十分な成長または役に立たない成長により特徴付けられ、該方法が、該対象中の該ポリペプチド関連疾患を処置または予防するのに十分な量および持続時間で対象に該ポリペプチドを投与することを含み、対象は、疾患の傾向があるか、または疾患を病んでいると思われる、方法。

30

【請求項 35】

該対象がヒトである、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

単離ポリペプチドの異常発現、異常プロセッシング、または異常生理的相互作用と関連する疾患を処置または予防する方法であって、該単離ポリペプチドが、(a) 配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列；(b) 選択された配列において特定される任意のアミノ酸が、配列中のアミノ酸残基の 15% より多くは変更を受けないという条件で異なるアミノ酸に変更されている、配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の変異体；(c) 配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の成熟型；および (d) 選択された配列の成熟型の任意のアミノ酸が成熟型の配列中のアミノ酸残基の 15% より多くは変更を受けないという条件で異なるアミノ酸に変更されている、配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の成熟型の変異体；および (e) a) から d) において記載されたアミノ酸配列のフラグメントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み；

40

疾患は細胞または組織の不十分な成長または役に立たない成長により特徴づけられ、該方法は、(e) 配列番号：2 を含むポリペプチド；(f) 選択された配列中において特定される任意のアミノ酸が、配列中のアミノ酸残基の 15% より多くは変更を受けないという

50

条件で、異なるアミノ酸に変更されている、配列番号：2の変異体；(g)配列番号：2により与えられるアミノ酸配列の成熟型；および(h)選択された配列の成熟型の任意のアミノ酸が、成熟型の配列中のアミノ酸残基の15%より多くは変更を受けないという条件で、異なるアミノ酸に変更されている、配列番号：2により与えられるアミノ酸配列の成熟型の変異体；(i)(e)から(h)において記載されたアミノ酸配のフラグメント；および(j)(e)から(i)において記載された任意の核酸分子の相補的分子(complement)、からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコード化する核酸配列を含む単離核酸分子を、該対象において該疾患を処置または予防するのに十分な量で、または持続時間で対象に投与することを含み、対象は疾患の傾向があるか、または疾患を病んでいると思われる、方法。

10

【請求項37】

該対象がヒトである、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

請求項1に記載のポリペプチドの異常発現、異常プロセッシング、または異常生理的相互作用と関連する疾患を処置または予防する方法であって、疾患が細胞または組織の過形成または異常増殖により特徴付けられ、該方法が該対象における該疾患を処置または予防するのに十分な量で治療薬を対象に投与することを含み、対象が疾患の傾向があるか、または疾患を病んでいると思われる、方法。

【請求項39】

治療薬が請求項18に記載の抗体である、請求項38に記載の方法。

20

【請求項40】

対象がヒトである、請求項38に記載の方法。

【請求項41】

請求項1に記載のポリペプチドおよび医薬的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項42】

請求項6に記載の核酸分子および医薬的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項43】

請求項18に記載の抗体および医薬的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項44】

請求項31に記載の治療物質および医薬的に許容される担体を含む医薬組成物。

30

【請求項45】

治療物質が約1500Da以下の分子量を有する、請求項44に記載の医薬組成物。

【請求項46】

請求項41に記載の医薬組成物を、1またはそれ以上の容器内に含むキット。

【請求項47】

請求項42に記載の医薬組成物を、1またはそれ以上の容器内に含むキット。

【請求項48】

請求項43に記載の医薬組成物を、1またはそれ以上の容器内に含むキット。

【請求項49】

請求項1に記載のポリペプチドの異常発現、異常プロセッシング、または異常生理的相互作用と関連する疾患の潜在活性または素因のモジュレーターをスクリーニングする方法であって、該方法は：

40

a) 疾患のリスクの増大した被検動物を用意すること、該被検動物は、請求項1に記載のポリペプチドを組変え的に発現する；

b) 試験化合物を被検動物に投与すること；

c) 段階(a)の化合物を投与後の該被検動物中の該ポリペプチドの活性を測定すること；および

d) 該被検動物中の該タンパク質の活性を、該化合物を投与されていない対照動物中の該ポリペプチドの活性と比較すること；

該対照動物と比べた該被検動物中の該ポリペプチドの活性の変化は、試験化合物が疾患の

50

潜在活性または素因のモジュレーターであることを示す、ことを含む方法。

【請求項 5 0】

該被検動物が、試験タンパク質導入遺伝子を発現するか、または野生型被検動物と比較して増大したレベルの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被検動物であり、該プロモーターは該導入遺伝子の天然の遺伝子プロモーターでない、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

第 1 の対象中の請求項 1 に記載のポリペプチドの変化レベルと関連する疾病の存在または素因を測定する方法であって、方法は：

a) 第 1 の哺乳動物対象由来の試料中のポリペプチドの発現レベルを測定すること；および 10

b) 段階 (a) の試料中の該ポリペプチドの量を、該疾病を有さない、または素因を有しないと知られている第 2 の哺乳動物対象由来の対照試料に存在するポリペプチドの量と比較すること、

対照試料と比較して第 1 の対象中のポリペプチドの発現レベルの変化は、該疾病の存在または素因を示す、ことを含む方法。

【請求項 5 2】

第 1 の哺乳動物対象中の請求項 6 に記載の核酸分子の変化したレベルと関連する疾病の存在または素因を決定する方法であって、方法は：

a) 第 1 の哺乳動物対象由来の試料中の核酸の量を測定すること；および 20

b) 段階 (a) の試料中の核酸の量を、疾病を有さない、または素因を有さないことが知られている第 2 の哺乳動物対象由来の対照試料において存在する核酸の量と比較すること；

対照試料と比較したときの第 1 の対象中の核酸のレベルの変化は、疾病の存在または素因を示す、ことを含む方法。

【請求項 5 3】

哺乳動物における病態を処置する方法であって、病変が請求項 1 に記載のポリペプチドの異常発現、異常プロセッシング、または異常生理相互作用と関連し、方法が病態を緩和するのに十分な量で哺乳動物にポリペプチドを投与することを含み、ポリペプチドは配列番号： 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに少なくとも 9 5 % 同一なアミノ酸配列、またはそれらの生物学的に活性なフラグメントを有するポリペプチドである、方法。 30

【請求項 5 4】

哺乳動物の病態を処置する方法であって、病変が F G F - C X ポリペプチドの異常発現、異常プロセッシング、または異常生理的相互作用と関連し、病態を緩和するのに十分な量および持続時間で請求項 1 8 に記載の抗体を哺乳動物に投与することを含む、方法。

【請求項 5 5】

対象における細胞の成長を促進する方法であって、細胞成長を促進するのに作用する量および持続時間で請求項 1 に記載のポリペプチドをそれらを必要とする対象に投与することを含む、方法。

【請求項 5 6】

対象がヒトである、請求項 5 5 に記載の方法。 40

【請求項 5 7】

成長が促進されるべき細胞が、傷の近くにある細胞、血管系の細胞、血管新生に關与する細胞、赤血球新生に關与する細胞、消化管の内壁にある細胞、および毛包にある細胞からなる群から選択される、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 8】

対象中の細胞の成長を阻害する方法であって、成長が、請求項 1 に記載のポリペプチドの発現と関連し、該対象中の細胞の成長を阻害するのに十分な量で対象に組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 5 9】

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】

組成物が抗 FGF - CX 抗体または FGF - CX 治療物質を含む、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 61】

対象がヒトである、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 62】

成長が阻害されるべき細胞が、形質転換細胞、過形成細胞、腫瘍細胞、および腫瘍性細胞からなる群から選択される、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 63】

フラグメントが配列番号：2 の残基 55 ~ 211 および配列番号：2 の残基 24 ~ 211 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載のポリペプチドフラグメント。

10

【請求項 64】

核酸分子が、配列番号：2 の残基 55 ~ 211 および配列番号：2 の残基 24 ~ 211 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドフラグメントをコード化する核酸配列を含む、請求項 6 に記載の単離核酸分子。

【請求項 65】

核酸配列が配列番号：1 のヌクレオチド 163 ~ 633 および配列番号：1 のヌクレオチド 70 ~ 633 からなる群から選択される配列を含む、請求項 10 に記載の核酸分子。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の技術分野)

本発明は、一般に核酸およびポリペプチドに関する。本発明は、特に線維芽細胞成長因子ファミリーのメンバーに関するポリペプチドをコード化する核酸に関する。

【0002】

(本発明の背景)

サイトカインである線維芽細胞成長因子 (FGF) グループは、成長、生存、アポトーシス、運動性および分化のような多種多様の細胞機能を調節する少なくとも 21 のメンバーを含む。プロトタイプメンバーが、酸性 FGF (FGF - 1) および塩基性 FGF (FGF - 2) を含むタンパク質である FGF ファミリーは、4 つの関連する受容体チロシンキナーゼに結合する。これらの分子は、細胞表面チロシンキナーゼ FGF 受容体 (FGFR) との高親和性相互作用を経由してシグナルを伝達する。これらの FGF 受容体は、組織培養において大部分の細胞タイプで発現する。リガンド結合上の FGF 受容体モノマーの 2 量体化は、受容体のリン酸化を導くキナーゼドメインの活性化に必要であると報告されてきた。4 つの FGF 受容体の広範な発現パターンを示す FGF 受容体 1 (FGFR - 1) は、少なくとも 7 つのチロシンリン酸化部位を含有する。多くのシグナル伝達分子は、これらのリン酸化部位に対する異なる親和性での結合により作用される。

30

【0003】

正常成長および正常発生での関与に加えて、既知の FGF はまた、癌を含む病態の発生において関係するとみなされてきた。FGF は、腫瘍細胞の成長を直接的に増強することにより腫瘍の原因となり得る。例えば、同一細胞での FGF と FGF R の共発現を介するオートクリン成長刺激は、細胞の形質転換を導くと報告されてきた。

40

【0004】

(発明の概要)

本発明は、タンパク質である線維芽細胞成長因子 (FGF) ファミリーのメンバーに対して相同性を有する新規ポリペプチドをコード化する核酸の発見に部分的に基づく。線維芽細胞成長因子 CX (FGF - CX) と名付けられたポリヌクレオチド配列は本発明に含まれ、これらの核酸配列によりコード化された FGF - CX ポリペプチド、およびスプライスバリエント、SNP、フラグメント、相同体、類似体、およびそれらの誘導体が本発明

50

において請求される。F G F - C X 核酸の実施例は配列番号：1 であり、F G F - C X ポリペプチドの実施例は配列番号：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 の核酸配列によりコード化される。

【0005】

1 つの態様において、本発明は単離 F G F - C X ポリペプチドを含む。いくつかの実施態様においては、単離ポリペプチドは配列番号：2 のアミノ酸配列を含む。他の実施態様において、本発明は配列番号：2 の変異体を含み、変異体のいくつかのアミノ酸残基において、例えば、配列番号：2 のアミノ酸配列の 1 %、2 %、3 %、5 %、10 % または 15 % 未満が変更を受けている。いくつかの実施態様においては、単離 F G F - C X ポリペプチドは、配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の成熟型のアミノ酸配列、または配列番号：2 により与えられるアミノ酸配列の成熟型の変異体を含む。好ましくは、アミノ酸配列の成熟型の変異体において配列番号：2 のアミノ酸配列の 1 %、2 %、3 %、5 % または 15 % 未満が変更を受ける。

10

【0006】

F G F - C X ポリペプチドの変異体、F G F - C X ポリペプチドの成熟型および F G F - C X ポリペプチドの成熟型の変異体のフラグメントを含む F G F - C X ポリペプチドのフラグメント、ならびに F G F - C X 核酸の対立遺伝子変異体および 1 塩基多型によりコード化される F G F - C X ポリペプチドも、本発明において含まれる。F G F - C X ポリペプチドの実施例は、配列番号：2 の残基 54 ~ 211 または配列番号：2 の残基 24 ~ 211 を含むフラグメントである。

20

【0007】

別の態様において、本発明は単離 F G F - C X 核酸分子を含む。F G F - C X 核酸分子は、上で開示された任意の F G F - C X ポリペプチド、変異体、またはフラグメント、またはかかる核酸配列のいずれかに対する相補体をコード化する配列を含み得る。1 つの実施態様において、配列は、配列番号：1 において開示されたものを含む。他の実施態様において、F G F - C X 核酸は、配列番号：1 において与えられるものと異なるヌクレオチドが取り込まれ得る配列を含む。好ましくは、ヌクレオチドの 1 %、2 %、3 %、5 %、10 %、15 %、または 20 % 未満が変更を受ける。

【0008】

1 つの実施態様において、核酸は、配列番号：2 の残基 54 ~ 211 または配列番号：2 の残基 24 ~ 211 を含むポリペプチドフラグメントをコード化する。核酸は、例えば、配列番号：1 のヌクレオチド 163 ~ 633 または配列番号：1 のヌクレオチド 70 ~ 633 を含むことができる。

30

【0009】

他の実施態様において、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 核酸を取り込むベクターおよび細胞はまた、本発明において含まれる。

【0010】

本発明は、本明細書において記載される任意の F G F - C X ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体も含む。様々な実施態様における F G F - C X 抗体は、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/またはヒト抗体を含む。

40

【0011】

本発明は、加えて、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 抗体を含む医薬組成物を提供する。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 抗体を含むキットも本発明において含まれる。

【0012】

いくつかの方法が、本発明において含まれる。例えば、試料中の本発明の F G F - C X ポリペプチドの存在または量を測定する方法が開示される。方法は、試料をポリペプチドに免疫特異的に結合する F G F - C X 抗体と接触させること；および該ポリペプチドに結合する抗体の存在または量を測定することを含み、かかる抗体が、試料中のポリペプチドの存在または量を示す。

50

【0013】

同様に、本発明は、試料中のFGF-CX核酸分子の存在または量を測定する方法を開示する。方法は、試料を核酸分子に結合するプローブと接触させること；および核酸分子に結合するプローブの存在または量を測定することを含み、かかるプローブが試料中のFGF-CX核酸分子の存在または量を示す。

【0014】

本発明により、FGF-CXポリペプチドに結合する物質を同定する方法も提供される。方法は、候補物質がFGF-CXポリペプチドに結合する否かの決定を含む。候補物質の結合は、物質がFGF-CXポリペプチド結合物質であることを示す。

【0015】

本発明は、病態の処置において用いる潜在的治療物質を同定する方法も含む。病態は、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、または異常生理的相互作用と関係する。この方法は、FGF-CXポリペプチドを発現し、かつポリペプチドに基づく性質または機能を有する細胞を用意すること；用意した細胞を、候補物質を含む組成物と接触させること；および対照細胞との比較において物質がポリペプチドに基づく性質または機能を変化させるか否かを決定することを含む。かかる物質のいずれかが、潜在的治療物質として同定される。さらに、治療物質は、この方法で同定された任意の潜在的治療物質を、病態の処置において用いる治療物質を同定するための付加試験の対象とすることにより同定され得る。

10

【0016】

いくつかの実施態様において、性質または機能が細胞成長または細胞増殖に関与し、物質がポリペプチドに結合し、それによりポリペプチドの活性化を調節する。いくつかの実施態様においては、候補物質は約1500Da以下の分子量を有する。いくつかの実施態様において、候補物質は抗体である。本発明は、加えて、本明細書において記載されるような方法を用いて同定される任意の治療物質を提供する。

20

【0017】

本発明の別の重要な態様は、FGF-CXポリペプチドと関連する疾患の処置または予防する方法に関与する。疾患は、細胞または組織の不十分な成長または役に立たない成長により、または細胞または組織の過形成または異常増殖により特徴付けられる。方法は、該対象の疾患を処置または予防するのに十分な量および持続時間での本発明のFGF-CXポリペプチド、または本発明のFGF-CX核酸、または本発明の任意の他の治療物質を対象に投与することを含む。有意義な実施態様において、対象はヒトである。

30

【0018】

本発明は、FGF-CXポリペプチドの異常発現、異常プロセッシング、または異常生理的相互作用と関連する疾患の潜在活性または素因のモジュレーターをスクリーニングする方法も含む。方法は、本発明のFGF-CXポリペプチドを組替え発現し、疾患に対して増加したリスクのある被検動物を用意すること；被検動物に試験化合物を投与すること；化合物の投与後の被検動物中のポリペプチドの活性を測定すること；および被検動物中のFGF-CXポリペプチドの活性を、化合物を投与されていない対照動物中のFGF-CXポリペプチドの活性と比較することを含む。対照動物と比較して被検動物中のポリペプチドの活性での変化が存在すると、試験化合物は疾患の潜在活性または素因のモジュレーターである。

40

【0019】

本発明はまた、第1の哺乳動物対象中の本発明のFGF-CXポリペプチドまたはFGF-CX核酸の変化したレベルと関連する疾病の存在または素因を決定する方法を提供する。方法は、第1の哺乳動物対象由来の試料中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こと；試料中のその量を、疾病を有さない、または素因を有しないと知られている第2の哺乳動物対象由来の対照試料中その量と比較することを含む。対照試料と比較して第1の対象中のポリペプチドの発現レベルまたは核酸の量での変化は、疾病の存在または素因を示す。

50

【 0 0 2 0 】

本発明により、哺乳動物において病態を処置する方法も提供される。ここで、病態は、本発明の F G F - C X ポリペプチドの異常発現、異常プロセッシング、または異常生理的相互作用に關与する。方法は、哺乳動物へ病態を緩和するのに十分な量で本発明のポリペプチドを投与することを含む。ここで、F G F - C X ポリペプチドは、配列番号：2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドと少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または実に 9 9 % 同一なアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはそれらの生物学的に活性なフラグメントである。別の關係する方法において、本発明の抗体が、哺乳類に投与される。

【 0 0 2 1 】

別の態様において、本発明は対象における細胞成長を促進する方法を含む。方法は、細胞成長の促進に作用する量および持続時間で本発明の F G F - C X ポリペプチドを対象へ投与することを含む。いくつかの実施態様において、対象はヒトであり、成長が促進されるべき細胞は、傷の近くにある細胞、血管系における細胞、血管新生において含まれる細胞、赤血球新生において含まれる細胞、消化管の内壁にある細胞、および毛包にある細胞から選択され得る。

【 0 0 2 2 】

さらなる態様において、本発明は対象における細胞成長を阻害する方法を提供する。ここで、成長は本発明の F G F - C X ポリペプチドの発現と關係する。この方法は、細胞成長を阻害する組成物を対象へ投与することを含む。非常に重要な実施態様において、組成物は本発明の抗体または別の治療物質を含む。有意義なことに、対象はヒトであり、成長が阻害されるべき細胞は、形質転換細胞、過形成細胞、腫瘍細胞、および異常増殖細胞から選択される。

【 0 0 2 3 】

なお更なる態様において、本発明は、組織増殖と關連する疾患を処置または予防、または進行を妨げる方法を提供する。方法は、かかる処置または予防または進行の妨げが対象中の組織増殖と關連する疾患を処置、予防、または進行を妨げるのに十分な量で F G F - C X 核酸、F G F - C X ポリペプチド、または F G F - C X 核酸抗体を望む対象への投与を含む。

【 0 0 2 4 】

F G F - C X 核酸分子、ポリペプチドまたは抗体を用いて診断、処置、予防または進行を妨げられる組織増殖と關連する疾患は、上皮細胞、例えば、手術後の眼球前部での線維芽細胞およびケラチノサイトを含み得る。他の組織増殖と關連する疾患は、例えば、腫瘍、再狭窄、乾癬、デュピユイトレン拘縮 (Dupuytren's contracture)、糖尿病合併症、カポジ肉腫、および関節リウマチを含む。

【 0 0 2 5 】

別段の定義がなければ、本明細書において用いられる全技術用語および科学用語は、本発明が屬する当分野の通常の知識を有するものにより普通に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書において記載されるものと類似または等しい方法および物質が、本発明の実施または試験において用いることができるが、適当な方法および物質は以下に記載される。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、全体として、参考文献により取り込まれる。矛盾のある場合は、定義を含む本明細書が支配する。加えて、物質、方法、および実施例は、ただ例示的なものであり、制限されることを意図するものでない。

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な記載および請求項から明らかであろう。

【 0 0 2 6 】

(図面の簡単な説明)

図 1 は、F G F - C X のウエスタン分析を示す。2 9 3 細胞由来試料 (パネル A) または望ましい構築物で一過性に形質移入した N I H 3 T 3 細胞由来試料 (パネル B) を、抗 V 5 抗体を用いたウエスタン分析により調べた。C M は条件培地、S E はスラミンで抽出し

10

20

30

40

50

た条件培地である。分子量マーカーは左に示す。

【0027】

図2は、293細胞により分泌されたFGF-CXタンパク質のウエスタン分析を示す。

【0028】

図3は、E.coli細胞において発現させたFGF-CX(配列番号：2)タンパク質のウエスタン分析を示す。

【0029】

図4は、FGF-CX特異的TaqMan試薬を用いたリアルタイム定量的PCRにより得たFGF-CXの発現分析である。正常ヒト組織試料由来の標準化RNAの結果をパネルAに示し、腫瘍細胞株由来の標準化RNAの結果をパネルBに示す。手術で直接的に得た腫瘍組織を用いて得た結果を、パネルCおよびパネルDに示す。

10

【0030】

図5は、DNA合成への作用により表される、組換えFGF-CXの生物学的活性を表示する。細胞を、血清飢餓状態におき、望ましい因子と18時間インキュベートし、BrdU取込みアッセイにより分析した。試料は3度実行された。パネルAはNIH3T3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。

【0031】

図6は、細胞成長への作用により表される組換えFGF-CXの生物学的活性を表示する。NIH3T3細胞を、望ましい因子を補足した無血清培地でインキュベートし、48時間後にカウントした。試料は2度実行された。

20

【0032】

図7は、細胞形態への作用により表される組換えFGF-CXの生物学的活性である。NIH3T3細胞を、FGF-CXまたは対照タンパク質と48時間インキュベートし、25倍の拡大率で写真撮影した。

【0033】

図8は、FGF-CXの腫瘍化活性を表すグラフである。望ましい構築物で安定的に形質移入したNIH3T3細胞を、胸腺欠損ヌードマウスの皮下組織に注入し、2週間の期間にわたり腫瘍形成について調べた。4匹の動物の最小値をそれぞれのデータポイントに用いた。

30

【0034】

図9は、FGF-CX構築物で安定的に形質移入したNIH3T3細胞を皮下組織へ注入された対照胸腺欠損ヌードマウスおよび胸腺欠損ヌードマウスの写真である。

【0035】

図10は、還元条件下および非還元条件下で調整されたFGF-CXの精製試料のクーマシーブルー染色したSDS-PAGEゲルのイメージである。

【0036】

図11は、786-0ヒト腎臓腺癌細胞を用いて実行した投与量タイトレーション実験の結果を提供する。この実験において、種々の量のFGF-CX(図21において20858として表す)により誘導されたプロモデオキシウリジンの取込みを測定した。

40

【0037】

図12は、インビトロでの病巣の形成を示す。望ましい構築物で形質移入したNIH3T3細胞を、DMEM/5%子ウシ血清中で2週間培養し、染色して写真撮影した。pIg-FGF-20構築物によりもたらされる病巣は、多数だが、密集に起因して小さい。

【0038】

図13は、FGF-CXの受容体結合特異性を評価する実験の結果を示す。NIH3T3細胞を血清飢餓状態におき、望ましい成長因子(四角はPDGF-BB;三角はaFGF;丸はFGF-CX)のみ、または望ましい可溶性FGFRと共にのいずれかでインキュベーションし、BrdU取込みアッセイにより分析した。実験を3度実行し、成長因子のみを受け取った細胞と比べるBrdUの取込みでのパーセントBrdU増加として表す。

50

【0039】

図14は、プラスミド pET24a-FGF20X-del1154 コドンを E.coli 菌株 B L 2 1 (D E 3) で発現させた場合に得たアルギニン上清のクーマシーブルー染色 SDS - P A G E ゲルのイメージを示す。

【0040】

図15は、全長 F G F - C X (図中で F G F 2 0 と表す) と比較して、DNA合成への作用により表す組換え F G F - C X の切断型 (図中で (d 1 ~ 2 3) F G F 2 0 により示す) の生物学的活性を示す。N I H 3 T 3 マウス線維芽細胞を血清飢餓状態におき、望ましい因子で18時間インキュベートし、BrdU取込アッセイにより分析した。

【0041】

(発明の詳細な説明)

この発明は、線維芽細胞成長因子 (F G F) ファミリーのメンバーであるポリペプチドをコード化する新規 F G F - C X 核酸配列の発見に部分的に基づく。本明細書において開示される様に、表示「F G F - C X」は、核酸、ポリヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、および変異体、誘導体およびそれらのいずれかのフラグメント、ならびにこれらのクラスの化合物のいずれかに免疫特異的に結合する抗体に関する。

【0042】

上述した様に、F G F ファミリーのメンバーは、成長、生存、アポトーシス、運動性および分化のような多種多様な細胞機能を制御する (Szebenyi & Fallon (1999) *Int. Rev. Cytol.* 185, 45-106)。これらの分子は、細胞表面チロシンキナーゼ F G F 受容体 (F G F R) との高親和性相互作用を經由して細胞内にシグナルを伝達する。4つの F G F 受容体が今までに同定された (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)。これらの F G F 受容体は、組織培養での多くの細胞タイプで発現する。リガンド結合上の F G F 受容体モノマー2量体化は、受容体のリン酸化を導くキナーゼドメインの活性化に必要であると報告されてきた。4つの F G F 受容体の広範な発現パターンを示す F G F 受容体 1 (F G F R - 1) は、少なくとも7つのチロシンリン酸化部位を含有する。多くのシグナル伝達分子は、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り作用する。

【0043】

F G F はまた、低親和性にも関わらず、たいていの細胞表面および細胞外基質 (E C M) に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカン (H S P G) に結合する。F G F と H S P G との相互作用は、F G F / F G F R 相互作用を安定させ、かつ F G F を隔離してそれらを分解から守るために働く (Szebenyi, G. & Fallon, J. F. (1999))。成長促進能力に起因するため、F G F ファミリーの1メンバーである F G F - 7 は現在、化学療法により誘導された粘膜炎 (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)。

【0044】

正常成長および正常発生において関与することに加えて、既知の F G F はまた、癌を含む病態の発生に関係してきた (Basilico, C & Moscatelli, D. (1992) *Adv. Cancer Res.* 59, 115-165)。F G F は、腫瘍細胞の成長を直接的に増強することによる腫瘍の原因であり得る。例えば、同一細胞での F G F と F G F R の共発現を介するオートクリン成長刺激は、細胞の形質転換を導く (Matsumoto-Yoshitomi, et al. (1997) *Int. J. Cancer* 71, 442-450)。同じく、変異または転位を經由する F G F R の常時活性化は、無調節の増殖を導く (Lorenzi, et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 8956-8961; Li, et al. (1997) *Oncogene* 14, 1397-1406)。さらに、いくつかの F G F は血管原性である (Gerwins, et al. (2000) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 34, 185-194)。かかる F G F は、腫瘍成長を維持するために必要とされる血液供給の発達を促進することにより腫瘍形成過程の原因となり得る。驚くことではないが、少なくとも1つの F G F が現在、癌療法の潜在的標的として研究中である (Gasparini (1999) *Drugs* 58, 17-38)。

10

20

30

40

50

【0045】

出生時マウスおよび成長マウスの脳でのFGFおよびそれらの受容体の発現は調べられてきた。FGF-4を除く全ての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遺伝子、FGF-6遺伝子、FGF-7遺伝子およびFGF-8遺伝子は、出生後の期間よりも胚後期においてより高い発現を示す。このことは、これらのメンバーが脳発生の後期において関与することを示す。対照的に、FGF-1およびFGF-5の発現は、出生後増加した。特に、出生時マウスでのFGF-6発現が、胚の脳発生にはあるが、5日目の新生児の小脳にはない強力なシグナルを有する中枢神経系および骨格筋に限られることが報告されてきた。FGF-6の同族受容体であるFGF受容体(FGFR)4は、類似の時空発現を示す。このことは、FGF-6およびFGF-4が神経系の成熟においてリガンド受容体システムとして重要な働きをすることを示す。Ozawa等によると、これらの結果は、様々なFGFおよびそれらの受容体が、神経の前駆細胞の増殖および遊走、神経細胞の分化およびグリア細胞の分化、神経突起伸長、およびシナプス形成のような脳の様々な発生過程の制御において関与することを強く示す。

10

【0046】

FGFポリペプチドファミリーの他のメンバーは、FGF受容体チロシンキナーゼ(FGFR TK)ファミリーおよびFGF受容体ヘパラン硫酸プロテオグリカン(FGFR HS)ファミリーを含む。これらのメンバーは、活性化および特異的FGFRシグナル伝達複合体を制御する。これらの制御活性化は、哺乳動物の幅広いレンジの器官および組織、および正常組織および腫瘍組織の両方において多様化される。制御された選択的メッセンジャーRNA(mRNA)スプライシングおよび変異体サブドメインの組合せは、FGFR TKモノマーの多様性を生じる。2価の陽イオンは、FGFR HSと協力し、キナーゼ活性の抑制を引き起こし、FGFによるFGFR複合体の適当な活性化を促進する、FGFR TKトランスリン酸化を高次構造的に制限する。例えば、FGFR TKにおける異なる点変異が、全FGFR複合体のFGF依存性活性での段階的な増加による頭蓋顔面異常および骨格異常の段階的な重傷を一般に引き起こすことは知られている。FGFファミリーが重大な作用を発揮する他の過程は、肝臓成長および肝臓機能、および前立腺腫瘍の進行である。

20

【0047】

別のFGFファミリーメンバーであるグリア細胞活性化因子(GAF)は、ヒト神経膠腫細胞株の培養上清から精製されたヘパラン結合成長因子である。Miyamoto et al. 1993, Mol Cell Biol 13(7): 4251-4259を参照されたい。GAFは、他の既知の成長因子のものとは若干異なる活性のスペクトルを示し、FGF-9と名付けられる。ヒトFGF-9 cDNAは、208アミノ酸のポリペプチドをコード化する。FGFファミリーの他のメンバーに対する配列類似性は、約30%であると推定された。他のファミリーメンバーにおいて見られる2つのシステイン残基および他の共通配列も、FGF-9配列においてよく保存されていた。FGF-9は、酸性FGFおよび塩基性FGF中のものの様なN末端中の典型的シグナル配列を有しないと分かった。

30

【0048】

酸性FGFおよび塩基性FGFは、通常の方法で細胞から分泌されないことは知られている。しかしながら、FGF-9は、典型的シグナル配列を欠くにもかかわらずcDNAを形質移入されたCOS細胞から効率的に分泌されることが分かった。それは、細胞培地においても検出されることができた。分泌タンパク質は、開始メチオニンを除くcDNA配列により予測されるものに関して、N末端でアミノ酸残基を失っていない。ラットFGF-9 cDNAもクローン化され、構造分析はFGF-9遺伝子が非常に保存されていることを示した。

40

【0049】

データベース検索を用いて、染色体8p22~21.3由来のヒト配列(GenBank AB20858)はアフリカツメガエルFGF20に相同すると同定された。Kirikoshi et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 274: 337-343, 2000, PMID 10913340を参照

50

されたい。ヒト配列に対して設計されたPCRプライマーを用いて、大腸癌細胞株および胃癌細胞株由来の重複FGF20 cDNAを増幅した。FGF20の3つの予測エキソンは、FGFコアドメインを含有する推定211アミノ酸タンパク質をコード化する。予測分子量は、23kDaである。FGF20は、FGFコアドメインにおいて強疎水性領域およびN末端にて弱疎水性領域を含有する。N末端シグナル配列または潜在的Nグリコシル化部位は、同定されていない。FGF20は、FGF9およびFGF16とそれぞれ71.6%および66.2%の全体的アミノ酸配列同一性を共有する。Kirikoshi et al. (2000)は、系統学的解析から、FGF20、FGF9、およびFGF16が哺乳類FGFファミリー間のサブファミリーを形成すると結論付けた。20の成人および胎児組織、および8つの癌細胞株のノーザンブロット分析を用いて、Kirikoshi et al. (2000)は、2.4~kbのFGF20転写物を大腸癌細胞株SW480においてのみ検出した。RT-PCRは、SW480細胞においてFGF20の大量発現を確認し、ヒト胎児脳、胎児肝臓、胎児腎臓、および胃癌細胞株において低レベルの発現を示した。

10

【0050】

Kirikoshi et al. (2000)は、染色体8p22~p21.3領域は、ヒト癌においてヘテロ接合性喪失頻繁部位であることに気付いた。

本発明は、新規ヒトFGFならびにその対応するcDNAを提供する。この遺伝子のタンパク質産物は、成長刺激性および発現性を示す。さらに、FGF mRNAの過剰発現がある特定の癌細胞株において見つかった。これらの知見は、新規FGFがヒトの悪性腫瘍の処置で優れた標的として働くことにより有用であり得ることを示す。

20

【0051】

本発明はまた、FGF-CXポリペプチド成熟型、FGF-CXポリペプチド成熟型の変異体、FGF-CXポリペプチド成熟型のフラグメントおよびFGF-CXポリペプチド変異体の成熟型のフラグメント、およびそれらポリペプチドおよびフラグメントをコード化する核酸を含む。本明細書において使用する様に、本発明において開示されたFGF-CXポリペプチドまたはFGF-CXタンパク質の「成熟」型は、天然に存在するポリペプチド、前駆体型、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は、実施例に限定されないで、対応する遺伝子によりコード化された全長遺伝子産物を含む。いくつかの実施態様において、成熟型は、本明細書において記載されるオープンリーディングフレームによりコード化されるFGF-CXポリペ

30

【0052】

ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」型を導く、かかるプロセッシングステップの実施例は、オープンリーディングフレームの開始コドンによりコード化されたN末端メチオニン残基の切断、またはシグナルペプチドまたはリーダー配列のタンパク質分解性の切断を含む。従って、残基1~Nを有する(ここで、残基1はN末端メチオニンである)FGF-CX前駆体ポリペプチドまたはタンパク質から生じる成熟型は、N末端メチオニンの除去後残存するNを介する残基2を有するN末端メチオニンである。または、残基1~N(ここで、残基1~MのN末端シグナル配列は切断されている。)を有する前駆体ポリペプチドまたはタンパク質から生じる成熟型は、残存する残基Nに対する残基M+1由来の残基を有する。加えて、「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現象から生じ得る。本明細書においてさらに用いられる様に、FGF-CXポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」型は、タンパク質分解性切断現象以外の翻訳後修飾のステップから生じ得る。かかる別の過程は、実施例に限定されないで、グリコシル化、ミリスチル化またはリン酸化を含む。一般に、成熟ポリペプチドまたはタンパク質は、これら過程の1つのみの働き、またはそれらのいずれかの組合せから生じ得る。

40

【0053】

50

本明細書において使用する様に「同一」残基は、2配列アラインメントの等しいヌクレオチド塩基またはアミノ酸残基が同一残基である2つの配列間比較における、それらの残基に対応する。残基は代わりに、アラインメントの2配列間比較が、比較において等しい位置にある残基が以下で定義される同一アミノ酸または保存アミノ酸のいずれかであることを示すと、「類似」または「ポジティブ」として記載される。

【0054】

F G F - C X 核酸、F G F - C X ポリペプチドまたはそれらの一部をコード化する単離核酸、F G F - C X ポリペプチド、これらの核酸を含有するベクター、F G F - C X 核酸で形質転換された宿主細胞、抗F G F - C X 抗体、および医薬組成物が、本発明において含まれる。F G F - C X を生成する方法、ならびにスクリーニング、診断、これらの化合物を用いる状態を処置する方法、およびF G F - C X 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、開示される。以下の表Aは、本発明を通じて用いられる配列記述子を表す。

10

【0055】

表A

【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	グリア細胞活性化因子 (GAF)	
6	ヒトゲノムフラグメント-bp15927~16214	
7	ヒトゲノムフラグメント-bp7257~7511	
8	ヒトゲノムフラグメント-bp9837~9942	
9	ヒトFGF-9	
10	マウスFGF-9	10
11	ラットFGF-9	
12	アフリカツメガエルFGF-9	
13	ヒトFGF-CX疎水性ドメイン (aa90~115)	
14	PSec-V5-His順方向	
15	PSec-V5-His逆方向	
16	PSETAリンカー	
17	PSETAリンカー	
18	TaqMan発現分析 順方向プライマー	
19	TaqMan発現分析 逆方向プライマー	
20	TaqMan発現分析 プローブ	
21	Ag81 (F) TaqManプライマー	20
22	Ag81 (R) TaqManプライマー	
23	Ag81 (P) TaqManプライマー	
24	FGF-16ポリペプチド、GeneBank AB009391	
25	FGF-CXcDNA	
26	CG53135-02 エキソン結合プライマー	
27	CG53135-02 エキソン結合プライマー	
28	CG53135-02 (nt)	
29	CG53135-02 (aa)	
30	CG53135-06 (nt)	
31	CG53135-06 (aa)	
32	Q9NP95 FGF_K_ヒト、線維芽細胞成長因子20	30
33	CG53135-03 (nt)	
34	CG53135-03 (aa)	
35	CG53135-04 (nt)	
36	CG53135-04 (aa)	
37	CG53135-05 (nt)	
38	CG53135-05 (aa)	
39	CG53135-07 (nt)	
40	CG53135-07 (aa)	
41	CG53135-08 (nt)	
42	CG53135-08 (aa)	
43	CG53135-09 (nt)	
44	CG53135-09 (aa)	
45	CG53135-10 (nt)	40
46	CG53135-10 (aa)	
47	CG53135 FGF-20様タンパク質 (nt)	
48	CG53135 FGF-20様タンパク質 (aa)	
49	CG53135 変異体 13375518 (nt)	
50	CG53135 変異体 13375518 (aa)	
51	CG53135 変異体 13365516 (nt)	
52	CG53135 変異体 13365516 (aa)	
53	CG53135 変異体 13365517 (nt)	
54	CG53135 変異体 13365517 (aa)	

本明細書において話題にする 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、治療物質および医薬組成物は、とりわけ組織増殖関連疾患の処置において有用である。これらの組織増殖関連疾患は、上皮細胞、例えば、手術後の眼球前部での線維芽細胞およびケラチノサイトに作用する疾患を含み得る。他の組織増殖関連疾患は、例えば、腫瘍、再狭窄、乾癬、デュピュイトレン拘縮、糖尿病合併症、カポジ肉腫、および関節リウマチを含む。

【 0 0 5 7 】

本発明において、線維芽細胞成長因子 2 0 X (F G F - C X) (表 1 ; 配列番号 : 1 を参照) と名付けられた新規線維芽細胞成長因子をコード化するヌクレオチド配列 (配列番号 : 1) が含まれる。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。開示された D N A 配列は、2 1 1 アミノ酸残基 (配列番号 : 2) を有すると予測されるポリペプチドをコード化する 6 3 3 塩基を有する。表 1 および配列番号 : 2 において示された配列に基づく F G F - C X の予測分子量は、2 3 4 9 8 . 4 D a である。

10

【 0 0 5 8 】

表 1

表 1 は、本発明の新規 F G F - C X ポリヌクレオチドおよびタンパク質のヌクレオチド配列 (配列番号 : 1) および翻訳アミノ酸配列 (配列番号 : 2) の表示である (C G 5 3 1 3 5 - 0 1 または線維芽細胞成長因子 A B 0 2 0 8 5 8 としても言及される) 。

【 表 2 】

1 ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGCTTTCTGGCGGCCTGGAG
MetAlaProLeuAlaGluValGlyGlyPheLeuGlyGlyLeuGlu

46 GGCTTGGGCCAGCAGGTGGGTTCGCATTTCTGTTGCCTCCTGCC
GlyLeuGlyGlnGlnValGlySerHisPheLeuLeuProProAla

91 GGGGAGCGGCCCGCTGCTGGGCGAGCGCAGGAGCGCGCGGAG
GlyGluArgProProLeuLeuGlyGluArgArgSerAlaAlaGlu

136 CGGAGCGCGCGCGGGCCGGGGCTGCGCAGCTGGCGCACCTG
ArgSerAlaArgGlyGlyProGlyAlaAlaGlnLeuAlaHisLeu

181 CACGGCATCTGCGCCCGGCAGCTCTATTGCCGCACCGGCTTC
HisGlyIleLeuArgArgArgGlnLeuTyrCysArgThrGlyPhe

226 CACCTGCAGATCTGCCCGACGGCAGCGTGCAGGGCACCCGGCAG
HisLeuGlnIleLeuProAspGlySerValGlnGlyThrArgGln

271 GACCACAGCCTCTTCGGTATCTTGAATTCATCAGTGTGGCAGTG
AspHisSerLeuPheGlyIleLeuGluPheIleSerValAlaVal

316 GGAATGACAAAGGAGAACTCTATGGATCAGAGAACTTACTTCC
MetAsnAspLysGlyGluLeuTyrGlySerGluLysLeuThrSer

406 GAATGCATCTTTAGGGAGCAGTTTGAAGAGAACTGGTATAACACC
GluCysIlePheArgGluGlnPheGluGluAsnTrpTyrAsnThr

451 TATTCATCTAACATATATAAACATGGAGACTGGCCGCGAGTAT
TyrSerSerAsnIleTyrLysHisGlyAspThrGlyArgArgTyr

496 TTTGTGGCACTTAACAAAGACGGAACTCCAAGAGATGGCGCCAGG
PheValAlaLeuAsnLysAspGlyThrProArgAspGlyAlaArg

541 TCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCTAGACCAGTG
SerLysArgHisGlnLysPheThrHisPheLeuProArgProVal

586 GATCCAGAAAGAGTTCCAGAATTGTACAAGGACCTACTGATGTAC
AspProGluArgValProGluLeuTyrLysAspLeuLeuMetTyr

631 ACT
Thr

20

30

40

50

表 3A

クエリー: 289 TACCGAAGAGGCTGTGGTCCTGCCGGGTGCCCTGCACGCTGCCGTCCGGCAGGATCTGCA 230
 |||
 対象: 15927 TACCGAAGAGGCTGTGGTCCTGCCGGGTGCCCTGCACGCTGCCGTCCGGCAGGATCTGCA 15986

クエリー: 229 GGTGGAAGCCGGTGCGGCAATAGAGCTGCCGGCGGCGCAGGATGCCGTGCAGGTGGCGCA 170
 |||
 対象: 15987 GGTGGAAGCCGGTGCGGCAATAGAGCTGCCGGCG-CGCAGGATGCCGTGCAGGTGGCGCA 16045

クエリー: 169 GCTGCGCAGCCCCCGGCCCGCGCGCGCTCCGCTCCGCGCGCTCCTGCGCTCGCCCA 110
 |||
 対象: 16046 GCTGCGCAGCCCCCGGCCCGCGCGCGCTCCGCTCCGCGCGCTCCTGCGCTCGCCCA 16105

クエリー: 109 GCAGCGCGGGCCGCTCCCCGGCAGGAGGCAACAGGAAATGCGAACCACCTGCTGGCCCA 50
 |||
 対象: 16106 GCAGCGCGGGCCGCTCCCCGGCAGGAGGCAACAGGAAATGCGAACCACCTGCTGGCCCA 16165

クエリー: 49 AGCCCTCCAGGCCGCCAGAAAGCCCCGACTTCGGCTAAGGGAGCCAT 1
 |||
 対象: 16166 AGCCCTCCAGGCCGCCAGAAAGCCCCGACTTCGGCTAAGGGAGCCAT 16214

10

20

30

40

50

【 0 0 6 4 】

表 3 B

【 表 5 】

表 3B

クエリー: 633 AGTGATACATCAGTAGGTCCCTGTACAAATCTGGAACCTCTTTCTGGATCCACTGGTCTAGG 574
 |||
 対象: 7257 AGTGATACATCAGTAGGTCCCTGTACAAATCTGGAACCTCTTTCTGGATCCACTGGTCTAGG 7316

クエリー: 573 TAAGAAATGTGTAAATTTCTGATGCCTCTTGGACCTGGCGCCATCTCTTGGAGTTCCGTC 514
 |||
 対象: 7317 TAAGAAATGTGTAAATTTCTGATGCCTCTTGGACCTGGCGCCATCTCTTGGAGTTCCGTC 7376

クエリー: 513 TTTGTTAAGTGCCACAAAATACCTGCGGCCAGTGTCTCCATGTTTATATATGTTAGATGA 454
 |||
 対象: 7377 TTTGTTAAGTGCCACAAAATACCTGCGGCCAGTGTCTCCATGTTTATATATGTTAGATGA 7436

クエリー: 453 ATAGGTGTTATACCAGTTCTCTTCAAAGTCTCCCTAAAGATGCATTCCGGAAGTAAGTTT 394
 |||
 対象: 7437 ATAGGTGTTATACCAGTTCTCTTCAAAGTCTCCCTAAAGATGCATTCCGGAAGTAAGTTT 7496

クエリー: 393 CTC-TGATCCATAGA 380
 |||
 対象: 7497 CTCCTGAAAGAGAGA 7511

【 0 0 6 5 】

表 3 C

【 表 6 】

表 3C

クエリー: 391 CTGATCCATAGAGTTCTCCTTTGTCATTTCATCCAAGATAGAGACCACTGTCCACACCTC 332
 |||
 対象: 9837 CTGATCCATAGAGTTCTCCTTTGTCATTTCATCCAAGATAGAGACCACTGTCCACACCTC 9896

クエリー: 331 TAATACTGACCAGTCCCCTGCCCACACTGATGAATTCCAAGATACC 286
 |||
 対象: 9897 TAATACTGACCAGTCCCCTGCCCACACTGATGAATTCCAAGATACC 9942

【 0 0 6 6 】

c D N A によりコード化されるタンパク質は、アフリカツメガエルの F G F - 2 0 X (本
 明細書において X F G F - C X または X F G F - 2 0 X と名付ける)、ならびにヒト F G
 F - 9 およびヒト F G F - 1 6 (それぞれ、 8 0 %、 7 0 % および 6 4 % アミノ酸同一性

である；表4および表5を参照)に非常に密接に関係する。XFGF-CXとの高相同性に基き、本発明の開示において同定された遺伝子は、そのヒトのオルソログを表すと分かり、本明細書においてFGF-CXと名付けられる。

【0067】

加えて、FGFファミリーメンバー間で保存されるアミノ酸残基は、表4および表5として表されるアラインメントにより示される様に、変化に対する影響を多少受けると予測される。例えば、本発明のFGF-CXタンパク質は、FGFファミリーメンバー、すなわち、FGF-9およびXFGF-CXタンパク質、およびFGF-CX相同体中に典型的保存領域の少なくとも1つのドメインを含有し得る。従って、これらの保存ドメインは、変異の影響を受けにくいであろう。しかしながら、他のアミノ酸残基(例えば、保存されていないもの、またはFGFタンパク質のメンバーのうち半分のみ保存されたもの)は、活性に対して本質的でないかもしれなく、従って変異の影響をより受けやすいであろう。黒、グレーおよび白は、それぞれアラインメントでの同一残基、保存残基および非保存残基を表す。

【0068】

表4

表4. 本発明のFGF-CXタンパク質(配列番号:2)を有する4つの脊椎動物FGF様タンパク質(配列番号:9~12)のClustalWアラインメント

【表7】

解析した配列:

1. ヒト FGF-9 (P31371_HUMAN FGF-9) [配列番号:9]
2. マウス FGF-9 (P54130_MOUSE FGF-9) [配列番号:10]
3. ラット FGF-9 (P36364_FGF9_RAT FGF-9) [配列番号:11]
4. アフリカツメガエルXFGF-CX (BAA83474Xen; Xenopus laevis XFGF-CX) [配列番号:12]
5. FGF-CX (cgAB020858) [配列番号:2]

多型アラインメント:

ヒト FGF-9	NAPLGEVGNVYFGVQDAVP--FGNVVLP--VDSPVLLSDHLGQSEAGGLPRGPAVTDLDH
ラット FGF-9	NAPLGEVGNVYFGVQDAVP--FGNVVLP--VDSPVLLSDHLGQSEAGGLPRGPAVTDLDH
マウス FGF-9	NAPLGEVGNVYFGVQDAVP--FGNVVLP--VDSPVLLSDHLGQSEAGGLPRGPAVTDLDH
アフリカツメガエルXFGF-CX	NAPLGEVGNVYFGVQDAVP--FGNVVLP--VDSPVLLSDHLGQSEAGGLPRGPAVTDLDH
FGF-CX	NAPLGEVGNVYFGVQDAVP--FGNVVLP--VDSPVLLSDHLGQSEAGGLPRGPAVTDLDH
ヒト FGF-9	LKGI LRRRQLYCRTGFHLEIFPNGTIQGTRADHSRFGILEFISIAVGLVSI RGVDSGLYL
ラット FGF-9	LKGI LRRRQLYCRTGFHLEIFPNGTIQGTRADHSRFGILEFISIAVGLVSI RGVDSGLYL
マウス FGF-9	LKGI LRRRQLYCRTGFHLEIFPNGTIQGTRADHSRFGILEFISIAVGLVSI RGVDSGLYL
アフリカツメガエルXFGF-CX	LKGI LRRRQLYCRTGFHLEIFPNGTIQGTRADHSRFGILEFISIAVGLVSI RGVDSGLYL
FGF-CX	LKGI LRRRQLYCRTGFHLEIFPNGTIQGTRADHSRFGILEFISIAVGLVSI RGVDSGLYL
ヒト FGF-9	GMNEKGEELYGSEKLTQRCVFRQPFENWNTYSSNLYKHVDTGRRYYVALNKDGTFRGT
ラット FGF-9	GMNEKGEELYGSEKLTQRCVFRQPFENWNTYSSNLYKHVDTGRRYYVALNKDGTFRGT
マウス FGF-9	GMNEKGEELYGSEKLTQRCVFRQPFENWNTYSSNLYKHVDTGRRYYVALNKDGTFRGT
アフリカツメガエルXFGF-CX	GMNEKGEELYGSEKLTQRCVFRQPFENWNTYSSNLYKHVDTGRRYYVALNKDGTFRGT
FGF-CX	GMNEKGEELYGSEKLTQRCVFRQPFENWNTYSSNLYKHVDTGRRYYVALNKDGTFRGT
ヒト FGF-9	RTKRHOKFTHFLRPVDPDKVP ELYKDI LSQS
ラット FGF-9	RTKRHOKFTHFLRPVDPDKVP ELYKDI LSQS
マウス FGF-9	RTKRHOKFTHFLRPVDPDKVP ELYKDI LSQS
アフリカツメガエルXFGF-CX	RTKRHOKFTHFLRPVDPDKVP ELYKDI LSQS
FGF-CX	RTKRHOKFTHFLRPVDPDKVP ELYKDI LSQS

【0069】

FGF-CXを、ヒトFGF-9、ヒトFGF-16およびアフリカツメガエルFGF-CX(それぞれ、受託番号D14838、AB009391およびAB012615)でアラインメントした。ClustalWを、表5に示す。

【0070】

表5. 他の3つのFGFファミリーメンバーでのFGF-CXのClustalWアラインメント

【表8】

10

20

30

40

		10	20	30	40	50	
FGF-CX (配列番号:2)		MAPLAEVGGFLGGLEGLGQVGSFHLLPPAGERPPLLGERRSAAERSARG- 49					
XFGF-20 (配列番号:12)		MAPLAEVGTFLLGGYDALG-QVGSFHLLPPAKQSP-LENDPLAQSERLSE- 48					
FGF-9 (配列番号:9)		MAPLGEVGNRFGVQDAVP--FGNVPVLPV--VDSPLLSDHLGQSEAGGLP 46					
FGF-16 (配列番号:24)		---SAEVEGVFAASLDWDLHGHSSSLGNVFLADSGFLNERLGGIAGKLR 47					
		60	70	80	90	100	
FGF-CX (配列番号:2)		GGPGAAQLAHLEGLRRRQLYCRTGFHLLQILPDGTVQSTRQDHSLEFGILE 99					
XFGF-20 (配列番号:12)		SAP--SDLEHLGGLRRRQLYCRTGFHLLQILPDGTVQSTRQDHSRFGILE 96					
FGF-9 (配列番号:9)		RGPAVTDLHLGILRRRQLYCRTGFHLEIFPNGTIQGTRKDHRSRFGILE 96					
FGF-16 (配列番号:24)		GSP--TDFAHLLKGLRRRQLYCRTGFHLEIFPNGTVGSTRQDHSRFGILE 95					
		110	120	130	140	150	
FGF-CX (配列番号:2)		FISVAVGLVLSIRGVDGSLYLGMNDKGELEGSEKLTSECFREQFEENWYN 149					
XFGF-20 (配列番号:12)		FISVAVGLVLSIRGVDGSLYLGMNDKGELEGSEKLTSECFREQFEENWYN 146					
FGF-9 (配列番号:9)		FISVAVGLVLSIRGVDGSLYLGMNDKGELEGSEKLTSECFREQFEENWYN 146					
FGF-16 (配列番号:24)		FISVAVGLVLSIRGVDGSLYLGMNDKGELEGSEKLTSECFREQFEENWYN 145					
		160	170	180	190	200	
FGF-CX (配列番号:2)		TYSSNLYKHGDTGRRYFVALNKDGTTPRDGTRKRRHQKFTHFLPRPVDPER 199					
XFGF-20 (配列番号:12)		TYSSNLYKHGDSGRRYFVALNKDGTTPRDGTRKRRHQKFTHFLPRPVDPER 196					
FGF-9 (配列番号:9)		TYSSNLYKHGDTGRRYFVALNKDGTTPREGTRKRRHQKFTHFLPRPVDPER 196					
FGF-16 (配列番号:24)		TYSSNLYKHGDSGRRYFVALNKDGTTPREGTRKRRHQKFTHFLPRPVDPER 195					
		210					
FGF-CX (配列番号:2)		VPELYKDLLMYS 211					
XFGF-20 (配列番号:12)		VPELYKDLLGYS 208					
FGF-9 (配列番号:9)		VPELYKDLLSOS 208					
FGF-16 (配列番号:24)		VPELYKDLLFHR 207					

10

20

【0071】

ヒトFGF-9 (配列番号:9)を有する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BLASTPアラインメントを、表6に示す。グリア細胞活性化因子前駆体(GAF)(線維芽細胞成長因子9)についてのSWISSPROT受託番号P31371;Miyamoto et al. 1993 Mol. Cell. Biol. 13:4251-4259;およびNaruo et al. 1993 J. Biol. Chem. 268:2857-2864を参照されたい。ポジティブ残基は、整列させたときの比較配列の同一関連部位での同一アミノ酸残基(「|」)または保存アミノ酸残基(「+」)のいずれかである残基を含む。以下を参照されたい。

30

【0072】

表6は、同一残基(「|」)およびポジティブ残基(「+」)を示す、ヒトFGF-9(配列番号:9)でのFGF-CXポリペプチド配列(配列番号:2)のBLASTPアラインメントである。

【表9】

クエリー:	1	MAPLAEVGGFLGGLEGLGQVGSFHLLPPAGERPPLLGERRSAAERSARG-GPGAAQLAH	59
対象:	1	MAPLGEVGNRFGVQDAVP--FGNVPVLPV--VDSPLLSDHLGQSEAGGLRGPVAVTDLHDH	56
クエリー:	60	LHGILRRRQLYCRTGFHLLQILPDGTVQSTRQDHSLEFGILEFISVAVGLVLSIRGVDGSLYL	119
対象:	57	LKGLRRRQLYCRTGFHLEIFPNGTIQGTRKDHRSRFGILEFISVAVGLVLSIRGVDGSLYL	116
クエリー:	120	GMNDKGELEGSEKLTSECFREQFEENWYNTYSSNLYKHGDTGRRYFVALNKDGTTPRDGA	179
対象:	117	GMNEKGELEGSEKLTQECVFRQFEENWYNTYSSNLYKHVDGTRRYVALNKDGTTPREGT	176
クエリー:	180	RSKRHQKFTHFLPRPVDPERVPELYKDLL	208
対象:	177	RTKRHQKFTHFLPRPVDPERVPELYKDLL	205

40

50

全長 F G F - C X ポリペプチド (配列番号 : 2) をまた、アフリカツメガエル X F G F - C X (配列番号 : 1 2) での B L A S T X にり整列させた。表 9 に示す様に、アフリカツメガエル X F G F - C X と比較して、F G F - C X は、2 1 1 のうち 1 7 0 (8 0 %) 同一残基、および 2 1 1 のうち 1 8 9 (8 9 %) ポジティブ残基を有する。アフリカツメガエル X F G F - C X が、プローブとして哺乳動物 F G F - 9 に基づくプライマーで実施した変性 P C R 産物を用いる尾芽ステージで調製された c D N A ライブラリーから最近得られた。Koga et al., 1999 Biochem Biophys Res Commun 261(3):756-765 を参照されたい。X F G F - C X オープンリーディングフレームの推定 2 0 8 アミノ酸配列は、F G F ファミリーのモチーフ特性を含有する。X F G F - C X は、X F G F - 9 に対して 7 1 . 3 % 全体類似性を有するが、そのアミノ末端領域 (3 3 . 3 % 類似) において X F G F - 9 と異なる。このことは、ヒトを含む (上記参照) 様々な哺乳動物 F G F - 9 および F G F - 1 6 配列に関して、本発明において開示される配列番号 : 2 について見られ類似性に似ている。表 4、5 および b 7 ~ 9 を参照。

10

【 0 0 7 8 】

表 9 は、同一残基 (「 | 」) およびポジティブ残基 (「 + 」) を示す、アフリカツメガエル F G F - 9 (配列番号 : 1 2) での F G F - C X ポリペプチド配列 (配列番号 : 2) の B L A S T X アラインメントである。

【 表 1 2 】

```
クエリー: 1 MAPLAEVGGFLGGLEGLGQQVGSFHLLPPAGERPPLLGERSSAAERSARGGGPAAQLAHL 60
          |||||+|| |||| + ||| ||||| ||||| + | | + + +|| +| | + |+||
対象: 1 MAPLADVGTFLGGYDALGQ-VGSFHLLPPAKDSPLLFNDPLAQSERLSRSAP--SDLSHL 57

クエリー: 61 HGILRRRQLYCRTGFHLQILPDGSSVQGTQDHSLEFGILEFISVAVGLVSIKGVDSGLYLK 120
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
対象: 58 QGILRRRQLYCRTGFHLQILPDGNVQGTQDHSRFGILEFISVAIGLVSIKGVDTGLYLK 117

クエリー: 121 MNDKGELYGSEKLTSECFREQFEENWYNTYSSNLYKHGDTGRRYFVALNKDGTPRDGR 180
          |||||+|| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
対象: 118 MNDKGELEFGSEKLTSECFREQFEENWYNTYSSNLYKHGDSGRRYFVALNKDGTPRDGR 177

クエリー: 181 SKRHQKFTHFLPRPVDPERVPELYKDLLMYT 211
          +||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
対象: 178 AKRHQKFTHFLPRPVDPEKVPPELYKDLMGYS 208
```

20

30

【 0 0 7 9 】

別の F G F - 2 0 変異体が実施例において記載の様にクローン化され、同定された。B L A S T N および B L A S T P 解析を、2 つの変異体、特に C G 5 3 1 3 5 - 0 2 および C G 5 3 1 3 5 - 0 6 について実施した。高スコアが、本発明の線維芽細胞成長因子 2 0 様遺伝子の配列を用いる、日付 0 6 / 1 2 / 0 1 の G e n B a n k 合成物 (H T G ではない) の B L A S T N 検索により決定された様に、一致する。高スコアが、本発明の線維芽細胞成長因子 2 0 様タンパク質の配列を用いる B L A S T P 検索 (日付 0 6 / 1 2 / 0 1 の非重複合成物に対する) により決定された様に、一致する。結果を、それぞれ、表 1 0 および 1 1 に示す。

【 0 0 8 0 】

表 1 0 . F G F - 2 0 C G 5 3 1 3 5 - 0 2 変異体の B L A S T N および B L A S T P 結果

40

【 表 1 3 】

データベース 識別子	タンパク質/生物/長さ [特許番号, 出願日]	残基/ 一致する残基	一致領域との 同一性/類似性	期待値
AB044277	GENBANK-ID:AB044277 FGF-20 の mRNA, 完全 cds - Homo sapiens 1016 bp	34..538 262..767	495/506 (97%) 495/506 (97%)	1.6e- 103
Q9NP95	SWISSNEW-ACC:Q9NP95 線維芽細 胞成長因子 20 (FGF-20) - Homo sapiens (ヒト), 211 aa.	18..179 50..211	160/162 (98%) 160/162 (98%)	1.6e- 93

10

【 0 0 8 1 】

表 11. FGF-20 CG53135-06 変異体の BLASTN および BLASTP 結果

【 表 1 4 】

データベース 識別子	一致タンパク質/生物/長さ [特許番号, 出願日]	残基/ 一致する残基	一致領域との 同一性/類似性	期待値
AB044277	GENBANK-ID:AB044277 FGF-20 の mRNA, 完全 cds - Homo sapiens 1016 bp	34..538 262..767	496/506 (98%) 496/506 (97%)	6.9e- 104
Q9NP95	SWISSNEW-ACC:Q9NP95 線維芽細 胞成長因子 20 (FGF-20) - Homo sapiens (ヒト), 211 aa.	18..179 50..211	161/162 (99%) 161/162 (99%)	6.3e- 94

20

【 0 0 8 2 】

表 1 (配列番号: 2) のポリペプチド配列を、小胞体の膜およびミクロボディー (ペルオキシソーム) の膜を介する局在化について高確率を有するようにプログラム PROST により予測する。CG53135-02 および CG53135-06 変異体ポリペプチドを、小胞体 (膜) に存在する確率 0.8500 を有するように、PSORT により予測する。これに代わる実施態様において、CG53135-02 および CG53135-06 変異体ポリペプチドは、確率 0.7900 で細胞膜、確率 0.7478 でミクロボディー (ペルオキシソーム)、または確率 0.100 でミトコンドリアの内膜に位置する。CG53135-02 および CG53135-06 変異体ポリペプチドを、アミノ酸残基 62 ~ 78 (60 ~ 81) の間の膜貫通型ドメインである ~ 6.42 の可能性を有するように、ソフトウェアプログラム INTEGRAL により予測される。FGF-CX ポリペプチドは、タイプ II (Ncty Cexo) 膜タンパク質であると思われる。

30

【 0 0 8 3 】

加えて、それは予測された既知の切断シグナル配列を N 末端で有さないが、タンパク質の疎水性親水性指標プロットは、FGFG-CX が約 90 ~ 約 115 のアミノ酸位置 (配列番号: 13) で卓越した疎水性セグメントを有することを示す。この単一疎水性領域は、FGF ファミリーの他のメンバーにおいて局在化シグナルとして知られている。それゆえに、配列番号: 13 のアミノ酸を含むポリペプチドは、小胞体、ゴルジ膜または細胞膜のような、様々な細胞の膜を介する分泌を可能とする局在化シグナルとして有用である。CG53135-02 および CG53135-06 変異体タンパク質の疎水性親水性指標プロットは、2 つの卓越した疎水性セグメントが約 23 ~ 約 60 のアミノ酸位置および約 82 ~ 末端のアミノ酸位置に属することを示す。様々な実施態様において、疎水性セグメントは、FGF-CX / FGF-20 様タンパク質特異的抗体に対する抗原性および標的

40

50

ある。

【0084】

F G F - C X は、その最も近いヒトファミリーメンバー（例えば、F G F - 9 および F G F - 16）のいくつかについて丁度見られる様に、P S O R T (Nakai, K & Kanehisa, M. (1992) *Genomics* 14, 897-911) および S I G N A L P (Nielsen, et al. (1997) *Protein Eng.* 10, 1-6) コンピューターアルゴリズムにより予測される様に古典的アミノ末端シグナル配列を失っている。にもかかわらず、F G F - 9 および F G F - 16 の両方が、分泌される (Matsumoto-Yoshitomi, et al. (1997) *Int. J. Cancer* 71, 442-450; Miyake, et al. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 243, 148-152; Miyakawa, et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 29352-29357; Revest et al. (2000) *J Biol. Chem.* 275, 8083-8090)。F G F - C X も分泌されるか否かを決定するために、全長 F G F - C X タンパク質をコード化する c D N A を、p F G F - C X と名付けられた哺乳類発現ベクターにサブクローン化した。ヒト胚腎臓 293 細胞がこのベクターで形質移入されると発現されるタンパク質は、培養上清において見付き、~ 27 k D a のウエスタンブロットの見かけ上の分子量で (図 1、実施例 7)、C 末端 V 5 エピトープに対する抗体により検出されるバンドを表す。発現タンパク質の別の部分は、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (H S P G) との相互作用を阻害する物質での処理により 293 細胞の隔離から放出される。この方法により放出されたタンパク質はまた、同様のウエスタンブロットパターンを表す (図 1)。同様に、タンパク質が対応する I g シグナル配列を取り込む組換えプラスミド由来の H E K 2 9 3 細胞において発現すると、バンドは、約 34 k D a の見かけ上の分子量を有するウエスタンブロットにより検出される (図 2、実施例 5)。

【0085】

本発明の F G F - C X を含むいくつかの多種多様な F G F 様タンパク質についての C l u s t a l W 多型タンパク質アラインメント (Thompson, et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680) は、図 4 および図 5 において見られる。3つの哺乳動物のタンパク質 (配列番号: 9 ~ 11) は、それぞれ非常に似ているが、本発明の F G F - C X タンパク質 (配列番号: 2) とかなり異なる。また、アフリカツメガエル X F G F - C X および配列番号: 2 の配列は、F G F - 9 のそれより、それぞれ非常に似ている。F G F - 9 分泌において関係する内部疎水ドメイン (例えば、Miyakawa, et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 29352-29357 を参照) は、F G F - 9 配列の残基 95 ~ 120 を補う。F G F - C X の疎水性親水性指標プロットを測定するソフトウェアは、当分野においてよく知られており、例えば、Kyte Doolittle、および以下にさらに記載するたのアルゴリズムを含む。

【0086】

X F G F - 20 およびアフリカツメガエル F G F - 9 の発現は、それぞれ異なる。X F G F - C X m R N A は、2倍体細胞、胞胚ステージの胚および胞胚ステージ後の胚において、および大人の胃および精巣において特異的に発現する; X F G F - 9 m R N A は、卵および多くの大人組織において母系性に発現する。上述の Koga et al を参照。原腸形成での X F G F - C X の正しい発現は、*Xenopus laevis* の正常頭構造の形成に必要なことは明らかである。X F G F - C X m R N A が初期胚において発現したら、原腸形成が異常であり、前構造の発生が抑制されたものである。上述の Koga et al を参照。かかる胚において、精巣での X b r a 転写発現は、原腸形成において抑制され、このことは X b r a 遺伝子の発現が X F G F - C X エフェクターを調節することを示す。上述の Koga et al., を参照されたい。

【0087】

増殖組織 (例えば、卵、精巣、胃、および母カエルの多型組織を含む) での関連 X F G F - 9 ポリペプチドの発現パターンは、機能器官の生成を正常に行う組織の維持での X F G F - 20 の役割を示す。

【0088】

F G F - C X m R N A は正常小脳、ならびに肺、胃および大腸の腺癌を含むいくつかのヒト腫瘍細胞株において発現するが、対応する正常組織において発現しないことを、実施例

8において示す。正常肺、胃および大腸でのFGF-CX発現を欠くこと、およびこれらの組織由来の腫瘍細胞株でのその存在は、これらの癌細胞株が適当でない種類のFGF-CXを明らかに過剰発現することを示す。FGF-CXが位置する染色体領域は、結腸直腸、肺および胃腺癌において普通に変化する(Emi, et al. (1992) Cancer Res. 52, 5368-5372; Baffa, et al. (2000) Clin. Cancer Res. 6, 1372-1377)。これらの細胞中のFGF-CX促進オートクリン成長ループの構築が、それらの腫瘍化変換の開始および/または引き続く増殖の原因となることは可能である。このシナリオは、NIH3T3細胞でのFGF-CX促進オートクリンループの生成が腫瘍化潜在性を活性化するという発見により支持される(実施例11を参照)。腫瘍細胞によるFGF-CX分泌はストローマ細胞上のパラクリン作用を経由するインビボでの成長を刺激することも可能とする。

10

【0089】

NIH3T3細胞での異種性FGF-CXの発現は、それらの形質転換および腫瘍形成を誘導することが分かる(実施例11参照)。これらの作用は、天然のFGF-CX(構築物pFGF-CX)およびアミノ末端の異種性Igシグナル配列(構築物pIg-FGF-CX)で発現させたFGF-CXの両方により仲介される。しかしながら、より高いインビトロでの形質転換能力(データは示されていない)およびインビボでの腫瘍形成(図8)により証明される様に、pIg-FGF-CXがpFGF-CXより、発癌遺伝子的により高く活性であることは気付かれなければならない。pFGF-CXに比べpIg-FGF-CXの優れた発癌能は、pIg-FGF-CXが、NIH3T3細胞においてpFGF-CXより有意に多い分泌FGF-CXタンパク質を産生する事実に起因するようである(図1B)。

20

【0090】

FGF-CXの様に、他のFGFは、異所性発現に従い、細胞を形質転換することがわかった。かつ、ある場合において、FGF-CXシグナル伝達の遮断が、細胞の形質転換を抑制することがわかった(Matsumoto-Yoshitomi, et al. (1997) Int. J. Cancer 71, 442-450; Li, et al. (1994) Mol. Cell. Biol. 14, 7660-7669を参照)。

【0091】

本明細書において記載するFGF-CXの発現、ならびに関連FGFタンパク質について見られるエフェクターとの類似性に基づき、FGF-CXがヒト悪性腫瘍において重要な働きをすると信じられている。これらの理由のため、本明細書において開示される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関連病態に係る治療物質のスクリーニングおよび同定、および様々な種類の悪性腫瘍の処置方法において有用である。

30

【0092】

FGF-CX核酸

本発明の核酸は、FGF-CXタンパク質またはFGF-CX様タンパク質のコード化物を含む。これらの中で、核酸は、配列が表1および配列番号:1において提供される核酸、またはそれらのフラグメントである。FGF-CX核酸は、ゲノムFGF-CX核酸のヌクレオチド配列、またはcDNAのヌクレオチド配列を有することができる。加えて、本発明は配列番号:1の突然変異体または変異体核酸、またはそれらのフラグメントを含み、任意の塩基が、表1において示される対応する塩基から変更され得る一方で、そのFGF-CX様活性および生理機能を維持するタンパク質を依然としてコード化する。本発明は、フラグメント、誘導體、類似体およびそれらの相同体を含む、配列番号:1の核酸の相補的配列をさらに含む。FGF-CXの部分の相補鎖の実施例を、表3において示す。本発明は、加えて、構造が化学的修飾を含む核酸または核酸フラグメント、またはそれらの相補的配列を含む。

40

【0093】

本発明の1つの態様は、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化する単離核酸分子に関する。FGF-CXコード化核酸(例えば、FGF-CX mRNA)を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとして用いるのに十分な核

50

酸フラグメント、および増幅のためのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）プライマーとして用いられるフラグメントまたはFGF-CX核酸分子の変異体も含まれる。本明細書において用いる用語「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）、ヌクレオチド類似体を用いて生成されたDNAまたはRNAの類似体、および誘導體、フラグメントおよびそれらの相同体を含むことを意図する。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり得るが、好ましくは二本鎖DNAである。

【0094】

「プローブ」は、可変長の核酸配列、好ましくは少なくとも約10ヌクレオチド（nt）、100nt、または例えば、使用に依存する約6,000ntと同数の核酸配列について言及する。プローブは、同一、類似、または相補的核酸配列の検出において使用される。天然供給源または組換え供給源から普通に得られるより長いプローブは、オリゴマーより非常に特異的にハイブリダイズし、ずっとゆっくり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ることができ、PCR、膜ベースのハイブリダイゼーションテクノロジー、またはELISA様テクノロジーにおいて特異性を有するようにデザインされ得る。

【0095】

「単離」核酸分子は、核酸の天然供給源に存在する他の核酸分子から分離されたものである。単離核酸分子の実施例は、制限されることなく、ベクターに含有される組換えDNA分子、異種性宿主細胞中で維持される組換え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RNA分子を含む。好ましくは、「単離」核酸は、核酸がもたらされる生物のゲノムDNA中の天然の隣接核酸（すなわち、核酸の5'末端および3'末端に位置する配列）である遊離配列である。例えば、様々な実施態様において、単離FGF-CX核酸分子は、核酸がもたらされる細胞のゲノムDNA中の天然の隣接核酸分子である約50kb、25kb、5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kbまたは0.1kb未満のヌクレオチド配列を含有できる。さらに、cDNA分子のような「単離」核酸分子は、組換え技術により産生された場合の他の細胞の物質または培養上清、または化学的に合成された場合の化学物質前駆体または他の化学物質の実質的な遊離物であり得る。

【0096】

本発明の核酸分子、例えば、配列番号：1のヌクレオチド配列を有する核酸分子、またはこのヌクレオチド配列のいずれかの相補的配列は、標準分子生物学的技術および本明細書において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の核酸配列の全てまたは一部を用いて、FGF-CX核酸配列は、標準ハイブリダイゼーションおよびクローニング技術を使用して単離され得る（例えば、Sambrook et al., eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989;および Ausubel, et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY, 1993に記載される）。

【0097】

本発明の核酸は、鋳型および適切なオリゴヌクレオチドプライマーとしてcDNA、mRNA、代わりにゲノムDNAを用いて、標準PCR増幅技術により増幅され得る。増幅された核酸は、適切なベクターにクローン化され、DNA配列解析により特徴付けられることができる。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、標準合成技術、例えば、自動DNA合成機により準備されることができる。

【0098】

本明細書において用いる様に、用語「オリゴヌクレオチド」は、オリゴヌクレオチドがPCR反応に用いられるために十分な数のヌクレオチド塩基を有する連鎖ヌクレオチドのシリーズに言及する。短いオリゴヌクレオチド配列は、ゲノム配列またはcDNA配列に基づくか、またはそれからデザインされ、特定の細胞または組織中の同一、類似または相補的DNAまたはRNAの存在を増幅、確認、または明らかにするために用いられる。オリ

ゴヌクレオチドは、長さ約10nt、50nt、または100nt、好ましくは長さ約15ntから30ntを有する核酸配列の一部を含む。1つの実施態様において、長さ100nt未満の核酸分子を含むオリゴヌクレオチドは、配列番号：1の少なくとも6連続ヌクレオチド、またはそれらの相補的配列をさらに含む。

【0099】

別の実施態様において、本発明の単離核酸分子は、配列番号：1において示されるヌクレオチド配列の相補的配列である核酸分子を含む。別の実施態様において、本発明の単離核酸分子は、配列番号：1において示されるヌクレオチド配列の相補的配列である核酸分子、またはこのヌクレオチド配列の一部を含む。配列番号：1において示されるヌクレオチド配列に相補的な核酸分子は、配列番号：1に示されるヌクレオチド配列にほとんどミス
10
マッチなしでまたは全くミスマッチなしで水素結合し、それにより安定二本鎖を形成する配列番号：1において示されるヌクレオチド配列に十分に相補的なものである。

【0100】

本明細書において使用する、用語「相補的」は、核酸分子のヌクレオチド単位間のWatson-Crick型塩基対またはHoogsteen型塩基対に言及し、用語「結合」は、2つのポリペプチドまたは化合物または関連ポリペプチドまたは化合物、またはそれらの組合せの物理的相互作用または化学的相互作用を意味する。結合は、イオン結合、非イオン結合、ファンデルワールス結合、疎水性相互作用等を含む。物理的相互作用は、直接的または非直接的のいずれかであり得る。非直接的相互作用は、別のポリペプチドまたは化合物の作用を介したものであるか、またはそれに起因したものである。直接的結合は、別のポリペプチド
20
または化合物の作用を介しては生じないか、またはそれに起因しない相互作用に言及するが、それよりむしろ他の実質的な化学中間体なしである。

【0101】

さらに、本発明の核酸分子は、配列番号：1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用いられ得るフラグメント、またはFGF-CXの生物学的に活性な部分をコード化するフラグメントを含み得る。本明細書において提供されるフラグメントは、核酸の少なくとも6（隣接）核酸または少なくとも4（隣接）アミノ酸の配列として、それぞれ核酸の場合の特異的ハイブリダイゼーション、またはアミノ酸の場合のエピトープの特異的認識を可能とするのに十分な長さを定義し、多くても全長配列より短い部分である。フラグメントは、核酸またはアミノ酸配列の任意の隣接部分の選択に由来する
30
。誘導体は、直接的、修飾、部分的な置換のいずれかにより天然の化合物から形成された核酸配列またはアミノ酸配列である。類似体は、天然の化合物に類似だが同一でない構造を有するが、ある成分または側鎖に関してそれと異なる核酸配列またはアミノ酸配列である。類似体は、合成であるか、または異なる進化起源由来であり得るし、かつ野生型と比較し類似または逆の代謝活性を有し得る。

【0102】

誘導体および類似体は、誘導体または類似体が以下に記載する様に修飾核酸またはアミノ酸を含有する場合、全長または全長以外であり得る。本発明の核酸またはタンパク質の誘導体または類似体は、限定されることなく、様々な実施態様において、同一サイズの核酸
40
またはアミノ酸の少なくとも約70%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%と同一性（好ましくは80~99%の同一性を有する）により、またはアラインメントが当分野において既知のコンピューター相同プログラムによりなされる整列配列に比較した場合、本発明の核酸またはタンパク質に実質的に相同な領域を含む分子、または厳密、中厳密、または低厳密条件下で上述のタンパク質をコード化する配列の相補的配列にハイブリダイズする能力があるそのコード化核酸を含む。例えば、Ausubel, et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, NY, 1993、および以下を参照されたい。例示的プログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI）は、Smith-Watermanのアルゴリズム（Adv. Appl. Math., 1981, 2: 482-489、ここで全体を参考文献により本明細書に取り込まれる）を使用するデフォルト設定を用いるGa
50

p プログラムである。

【0103】

「相同核酸配列」または「相同アミノ酸配列」、またはそれらの誘導体は、上述した様にヌクレオチドレベルまたはアミノ酸レベルでの相同性により特徴付けられる配列に言及する。相同ヌクレオチド配列は、F G F - C X ポリペプチドのアイソフォームをコードするこれらの配列をコード化する。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生物の異なる組織において発現し得る。または、アイソフォームは、異なる遺伝子によりコード化され得る。本発明において、相同ヌクレオチド配列は、限定されることなく、哺乳動物、従って例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、および他の生物を含む得るヒト以外の種の F G F - C X ポリペプチドをコード化するヌクレオチド配列を含む。相同ヌクレオチド配列はまた、制限されることなく、本明細書において設定されるヌクレオチド配列の天然に存在する対立遺伝子バリエーションおよび変異を含む。しかしながら、相同ヌクレオチド配列は、ヒト F G F - C X タンパク質をコード化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 の保存的アミノ酸置換（以下を参照）、ならびに F G F - C X 活性を有するポリペプチドをコード化するこれらの核酸配列を含む。F G F - C X タンパク質の生物学的活性は、以下に記載される。相同アミノ酸配列は、ヒト F G F - C X ポリペプチドのアミノ酸配列をコード化しない。

10

【0104】

ヒト F G F - C X 遺伝子のクローニングから決定されるヌクレオチド配列は、他の細胞タイプ、例えば、他の組織由来の F G F - C X 相同体、ならびに他の哺乳動物由来の F G F - C X 相同体の同定および/またはクローニングにおいて使用するためにデザインされるプローブおよびプライマーの生成を可能とする。プローブ/プライマーは、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを典型的に含む。オリゴヌクレオチドは、配列番号：1 の少なくとも約 12、25、50、100、150、200、250、300、350 または 400 またはそれ以上の連続センス鎖ヌクレオチド配列；または配列番号：1 のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列；または配列番号：1 の天然に存在する突然変異体に厳密な条件下でハイブリダイズするヌクレオチドの領域を典型的に含む。

20

【0105】

ヒト F G F - C X ヌクレオチド配列に基づくプローブを用いて、転写物、または同一タンパク質または相同タンパク質をコード化するゲノム配列を検出できる。様々な実施態様において、プローブは、それらに結合する標識群、例えば、放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、または酵素補助因子であり得るラベル群をさらに含む。かかるプローブを、対象由来の細胞試料中の F G F - C X コード化核酸のレベルを測定すること、例えば、F G F - C X mRNA レベルを測定すること、またはゲノム F G F - C X 遺伝子を突然変異したか、または欠損するか否かを決定することにより、F G F - C X タンパク質を異所性発現する細胞または組織の同定のための診断試験キットの一部として用いることができる。

30

【0106】

「F G F - C X の生物学的に活性な部分を有するポリペプチド」は、用量依存性であるまたは依存性でない特定の生物学的アッセイにおいて測定される様に、成熟型を含む本発明のポリペプチドの活性に類似だが同一である必要のない活性を表すポリペプチドに言及する。「F G F - C X の生物学的に活性な部分」をコード化する核酸フラグメントを、F G F - C X の生物学的活性（F G F - C X タンパク質の生物学的な活性は、以下に記載する）を有する、F G F - C X タンパク質のコード化部分を発現する（例えば、インビトロでの組換え発現により）、および F G F - C X のコード化部分の活性を評価するポリペプチドをコード化する配列番号：1 の一部を単離することにより調製されることができる。例えば、F G F - C X の生物学的に活性な部分をコード化する核酸フラグメントは、ATP 結合ドメインを任意で含むことができる。別の実施態様において、F G F - C X の生物学的に活性な部分をコード化する核酸フラグメントは、1 またはそれ以上の領域を含む。

40

【0107】

50

F G F - C X 変異体

本発明は、遺伝子コードの縮重に起因する図1において示されるヌクレオチド配列と異なる核酸分子をさらに包含する。従って、これらの核酸は、配列番号：1において示されるヌクレオチド配列によりコード化されるものの様に同一F G F - C Xタンパク質をコード化する。別の実施態様において、本発明の単離核酸分子は、配列番号：2において示されるアミノ酸配列を有するタンパク質をコード化するヌクレオチド配列を有する。

【0108】

配列番号：1において示されるヒトF G F - C Xヌクレオチド配列に加えて、F G F - C Xのアミノ酸配列の変化を導くDNA配列多型は、集団内（例えば、ヒト集団）に存在し得ることは、当業者により認識されるであろう。F G F - C X遺伝子のかかる遺伝子多型は、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で存在し得る。本明細書において使用する、用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」は、F G F - C Xタンパク質、好ましくは哺乳動物F G F - C Xタンパク質をコード化するオープンリーディングフレームを含む核酸分子に言及する。かかる天然の対立遺伝子のバリエーションは、典型的に、F G F - C X遺伝子のヌクレオチド配列の1～5%バリエーションとなり得る。かかるヌクレオチドバリエーションのいずれかおよび全ては、天然の対立遺伝子バリエーションの結果物であり、かつF G F - C Xの機能活性を変化させないF G F - C X中の結果として生じるアミノ酸多型性は、本発明の範囲内にあることを意図される。

10

【0109】

さらに、他の種由来のF G F - C Xたんぱく質をコード化する核酸分子、およびゆえに配列番号：1のヒト配列と異なるヌクレオチド配列を有する核酸は、本発明の範囲内であることを意図される。天然の対立遺伝子変異体に対応する核酸分子および本発明のF G F - C X c DNAの相同体は、本明細書において開示されるヒトF G F - C X核酸に対する相同性に基づき、厳密なハイブリダイゼーション条件下の標準ハイブリダイゼーション技術によるハイブリダイゼーションプローブとして、ヒトc DNA、またはそれらの一部を用いて単離され得る。例えば、可溶性ヒトF G F - C X c DNAは、ヒト膜結合F G F - C Xに対する相同性に基づき単離され得る。同じく、膜結合ヒトF G F - C X c DNAは、可溶性ヒトF G F - C Xに対する相同性に基づき単離され得る。

20

【0110】

または、別の実施態様において、本発明の単離核酸分子は、少なくとも長さ6ヌクレオチドであり、配列番号：1のヌクレオチド配列を含む核酸分子に厳密な条件下でハイブリダイズする。別の実施態様において、核酸は、少なくとも長さ10、25、50、100、250、500または750ヌクレオチドである。別の実施態様において、本発明の単離核酸分子は、コード領域にハイブリダイズする。本明細書において用いられる様に、用語「厳密な条件下でハイブリダイズする」は、互いに少なくとも60%相同なヌクレオチド配列が、典型的に互いにハイブリダイズしたままであるハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を記載することを意図される。

30

【0111】

相同体（すなわち、ヒト以外の種由来のF G F - C Xタンパク質をコード化する核酸）または他の関連配列（例えば、パラログ）は、核酸ハイブリダイゼーションおよびクロニングの当分野においてよく知られた方法を用いるプローブとして、特定のヒト配列の全部または一部との低厳密、中程度厳密、または高厳密なハイブリダイゼーションにより得られることができる。

40

【0112】

本明細書において用いられる様に、語句「厳密なハイブリダイゼーション条件」は、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、他の配列にはハイブリダイズしない条件に言及する。厳密な条件は、配列依存性であり、違った状況で異なるものである。長い配列は、短い配列より高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般的に、厳密な条件は、定義されたイオン強度およびpHで特異的な配列の温熱性融解温度（ T_m ）より約5度低くなるように選択される。 T_m は、標的配列に相補

50

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温度である(定義されたイオン強度、pHおよび核酸濃度の下)。標的配列は、一般に過剰に存在するので、 T_m において、プローブの50%が平衡状態で占められる。典型的に、厳密な条件は、塩濃度が約1.0Mのナトリウムイオン未満であり、典型的にはpH7.0~8.3で約0.01~1.0Mのナトリウムイオン(または他の塩)、および温度は短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド(例えば、10nt~50nt)のために少なくとも約30であり、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のために少なくとも約60である。厳密な条件は、ホルムアミドの様な不安定試薬の添加でも成し遂げられ得る。

【0113】

上述したような厳密な条件は、当業者にとって既知であり、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.16.3.6において見られる。好ましくは、条件は、互いに少なくとも約65%、70%、85%、90%、95%、98%または99%相同である配列が、典型的に互いに結合したままである様な条件である。厳密な条件の非制限の実施例は、65で6xSSC、50mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTA、0.02%PVP、0.02%Ficoll、0.02%BSA、および500mg/ml変性サケ精子DNAを含む高塩バッファー中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は、50で0.2xSSC、0.01%BSA中での1回またはそれ以上の洗浄が続く。配列番号:1の配列に厳密な条件下でハイブリダイズする本発明の単離核酸分子は、天然に存在する核酸分子に対応する。本明細書において用いられる様に、「天然に存在する」核酸分子は、天然において生じるヌクレオチド配列(例えば、天然のタンパク質をコード化する)を有するRNA分子またはDNA分子に言及する。

【0114】

相同体(すなわち、ヒト以外の種由来のFGF-CXタンパク質をコード化する核酸)または他の関連配列(例えば、パラログ)は、核酸ハイブリダイゼーションおよびクロニングの当分野においてよく知られた方法を用いるプローブとして、特定のヒト配列の全部または一部との低厳密、中程度厳密、高厳密なハイブリダイゼーションにより得られる。

【0115】

第2の実施態様において、配列番号:1のヌクレオチド配列を含む核酸分子、またはフラグメント、それらの類似体または誘導体に中程度厳密な条件下でハイブリダイズすることが可能である核酸配列が提供される。中程度厳密なハイブリダイゼーション条件の非制限の実施例は、55で6xSSC、5xデンハート液、0.5%SDSおよび100mg/mlの変性サケ精子DNA中でのハイブリダイゼーションであり、37で1xSSC、0.1%SDS中での1回またはそれ以上の洗浄が続く。用いられ得る中程度厳密な他の条件は、当分野においてよく知られている。例えば、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を参照されたい。

【0116】

第3の実施態様において、配列番号:1のヌクレオチド配列を含む核酸分子、またはフラグメント、それらの類似体または誘導体に低厳密な条件下でハイブリダイゼーションする核酸が提供される。低厳密なハイブリダイゼーション条件の非制限の実施例は、40で35%ホルムアミド、5xSSC、50mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM EDTA、0.02%PVP、0.02%Ficoll、0.2%BSA、100mg/ml変性サケ精子DNA、10%(wt/vol)デキストラン硫酸中でのハイブリダイゼーション、50で2xSSC、25mM Tris-HCl (pH7.4)、5mM EDTA、および0.1%SDS中での1回またはそれ以上の洗浄が続く。用いられ得る低厳密な他の条件は、当分野においてよく知られている(例えば、異種間ハイブリダイゼーションに用いられる様に)。例えば、Ausubel et al. (eds.), 1993, Current Protocols

10

20

30

40

50

in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY、およびKriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; Shilo and Weinberg, 1981, Proc Natl Acad Sci USA 78: 67896792を参照されたい。

【0117】

保存的変異体

集団中に存在し得るFGF-CX配列の天然に生じる対立遺伝子変異体に加えて、当業者は、変更が配列番号：1のヌクレオチド内への変異により誘導され得ること、それによりFGF-CXタンパク質の機能的能力を変えなくコード化FGF-CXタンパク質のアミノ酸配列の変更を導き得ることをさらに理解する。例えば、「非必須」アミノ酸残基でのアミノ酸置換を導くヌクレオチド置換は、配列番号：1の配列において起こり得る。「非必須」アミノ酸残基は、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を必要とするのに、生物学的活性を変えなくFGF-CXの野生型配列から変更され得る残基である。例えば、本発明のFGF-CXタンパク質間で保存されるアミノ酸残基は、変更特に従わないものであると予測される。

10

【0118】

本発明の別の態様は、活性に必須でないアミノ酸残基での変化を含有するFGF-CXタンパク質をコード化する核酸分子に関する。かかるFGF-CXタンパク質は、配列番号：2由来のアミノ酸配列において異なり、生物学的活性は依然保持している。1つの実施態様において、単離核酸分子は、タンパク質をコード化するヌクレオチド配列を含み、該タンパク質は、配列番号：2のアミノ酸配列に対して少なくとも約75%相同であるアミノ酸配列を含む。好ましくは、核酸によりコード化されるタンパク質は、配列番号：2に少なくとも約80%相同であり、さらに好ましくは、配列番号：2に少なくとも約90%、95%、98%、および最も好ましくは少なくとも約99%相同である。

20

【0119】

配列番号：2のタンパク質に対するFGF-CXタンパク質相同体をコード化する単離核酸分子は、1またはそれ以上のアミノ酸置換、付加または欠損がコード化タンパク質に誘導される様な1またはそれ以上のヌクレオチド置換、配列番号：1のヌクレオチド配列への付加または欠損を導入することにより生成され得る。

【0120】

変異は、部位指向変異誘発およびPCR仲介変異誘発のような標準技術により配列番号：1に導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換は、1またはそれ以上の予測非必須アミノ酸残基でもたらされる。「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取って代わられるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当分野において定義されてきた。あるアミノ酸は、1より多い分類特性を伴う側鎖を有する。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷の極性側鎖（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（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（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（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）を有するアミノ酸を含む。従って、成長因子中の予測非必須アミノ酸残基は、同一の側鎖ファミリーから別のアミノ酸残基で取って代わる。または、別の実施態様において、変異は、飽和変異誘発によるような成長因子コード化配列の全部または一部に沿って、ランダムに導入され、結果として生じる変異は、成長因子の生物学的活性をスクリーニングして、活性を保持する変異を同定することができる。配列番号：1および3の変異誘発に続くコード化タンパク質を、当分野において既知の任意の組換え技術により発現させることができ、かつタンパク質の活性は決定され得る。

30

40

【0121】

別の重要な実施態様において、変異FGF-CXタンパク質は、(1)タンパク質を形成

50

する能力：タンパク質が他の F G F - C X タンパク質、他の細胞表面タンパク質、またはそれらの生物学的に活性な部分と相互作用する、(2) 変異 F G F - C X タンパク質と F G F - C X 受容体との複合体形成；(3) 変異 F G F - C X タンパク質が細胞内標的タンパク質またはそれら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)；または(4) 抗 F G F - C X タンパク質抗体に特異的に結合する能力についてアッセイされ得る。

【0122】

アンチセンス

本発明の別の態様は、配列番号：1のヌクレオチドを含む核酸分子、またはフラグメント、それらの類似体または誘導体にハイブリダイズ可能であるか、または相補的配列である単離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化する「センス」核酸に相補的配列、例えば、二本鎖 c D N A のコード鎖に相補的配列、または m R N A に相補的な配列であるヌクレオチド配列を含む。特定の態様において、アンチセンス核酸分子は、少なくとも約 10、25、50、100、250 または 500 ヌクレオチドまたは全 F G F - C X コード鎖、またはそれら部分のみに対する相補的配列を含むものを提供する。配列番号：2の F G F - C X タンパク質のフラグメント、相同体、誘導体および類似体をコード化する核酸分子、または配列番号：1の F G F - C X 核酸配列に相補的なアンチセンス核酸は、さらに提供される。

10

【0123】

1つの実施態様において、アンチセンス核酸分子は、F G F - C X をコード化するヌクレオチド配列のコード鎖の「コード領域」に対するアンチセンスである。用語「コード領域」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(例えば、配列番号：2に対応するヒト F G F - C X のタンパク質コード領域)に言及する。別の実施態様において、アンチセンス核酸分子は、F G F - C X をコード化するヌクレオチド配列のコード鎖の「非コード領域」に対するアンチセンスである。用語「非コード領域」は、アミノ酸に翻訳されないコード領域に隣接する 5' および 3' 配列(すなわち、5' および 3' 非翻訳領域にも言及する)に言及する。

20

【0124】

本明細書において開示される F G F - C X (例えば、配列番号：1)をコード化するコード鎖配列を与えられ、本発明のアンチセンス核酸は、Watson and Crick型塩基対または Hoogsteen型塩基対のルールによりデザインされ得る。アンチセンス核酸分子は、F G F - C X m R N A の全コード領域に相補的であり得るが、さらに好ましくは、F G F - C X m R N A のコード領域または非コード領域の一部のみに対する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、F G F - C X m R N A の翻訳開始部位を囲む領域に対して相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、長さ約 5、10、15、20、25、30、35、40、45 または 50 ヌクレオチドであり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当分野において既知の方法を用いる化学合成または酵素ライゲーションを使用して構築され得る。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、天然に生じるオリゴヌクレオチドまたは分子の生物学的安定性を増大するためにデザインされたまたはアンチセンスとセンス核酸間で形成される二本鎖の物理的安定性を増大するために様々に修飾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、ホスホロチオネート誘導体およびヌクレオチドを置換されたアクリジンが用いられ得る。

30

40

【0125】

アンチセンス核酸を生成するために用いられ得る修飾ヌクレオチドの実施例は以下を含む：5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、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-(カルボキシ水酸化メチル)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、-D-ガラクトシルエクノシン、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

50

、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 - マンノシルエクオシン、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 (ν)、ワイプトキヨシン、プソイドウラシル、クエオシン、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 (ν)、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。または、アンチセンス核酸は、核酸がアンチセンスの向きでサブクローン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、挿入核酸から転写されたRNAは、該標的核酸に対するアンチセンス向きのものであり、以下の節においてさらに記載される)。

10

【0126】

本発明のアンチセンス核酸は、細胞のmRNAおよび/またはFGF - CXをコード化するゲノムDNAとハイブリダイズするか、または結合し、それによりタンパク質の発現を阻害、例えば転写および/または翻訳を阻害することにより対象に典型的に投与されるか、または組織内で生成される。ハイブリダイゼーションは、安定二本鎖を形成するための通常のヌクレオチド相補的配列によるものであり、または、例えば、DNA二本鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合において、二本鎖ヘリックスの大溝での特異的相互作用を介するものであり得る。本発明のアンチセンス核酸の投与経路の実施例は、組織部位での直接注入を含む。または、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的とするために修飾され、次に全身性に投与され得る。例えば、全身性投与のため、アンチセンス分子は、選択された細胞表面上で発現する受容体または抗原に特異的に結合するように、例えば、細胞表面の受容体または抗原に結合するペプチドまたは抗体に対するアンチセンス核酸分子に結合することにより修飾され得る。アンチセンス核酸分子はまた、本明細書に記載するベクターを用いる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pol IIまたはpol IIIプロモーターの制御下に置かれるベクター構築物が好ましい。

20

【0127】

さらに別の実施態様において、本発明のアンチセンス核酸は、 β - アノマー核酸分子である。 β - アノマー核酸分子は、普通の α - ユニットと反対で、鎖が互いに平行に走る相補的RNAとハイブリダイズする特異的な二本鎖を形成する(Gaultier et al. (1987) Nucleic Acids Res 15: 66256641)。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 et al. (1987) Nucleic Acids Res 15: 61316148)またはキメラRNA - DNA類似体(Inoue et al. (1987) FEBS Lett 215: 327330)を含み得る。

30

【0128】

リボザイムおよびPNA部分

かかる修飾は、実施例に限定されることなく、修飾塩基、および糖リン酸主鎖が修飾されるかまたは誘導される核酸を含む。これらの修飾は、例えば、対象での治療応用において核酸に結合するアンチセンスとして用いられ得るように、修飾された核酸の化学的安定性を増大するために少なくとも一部実行される。

40

【0129】

さらに別の実施態様において、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、相補的領域を有するmRNAの様な一本鎖核酸を切断する能力のあるリボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNA分子である。従って、リボザイムは(例えば、ハンマーヘッドリボザイム(Haselhoff and Gerlach (1988) Nature 334:585591において記載される)を用いて、FGF - CX mRNA転写物を触媒的に切断し、それによりFGF - CX mRNAの翻訳を阻害することができる。FGF - CXコード化核酸に対する特異性を有するリボザイムは、本明細書において開示されるFGF - CX DNA(すなわち、配列番

50

号：1)のヌクレオチド配列に基づいてデザインされ得る。例えば、テトラヒメナL-19IVS RNAの誘導体は、活性化部位のヌクレオチド配列が、FGF-CXコード化mRNAにおいて切断されるべきヌクレオチド配列に相補的配列であるものに構築され得る。例えば、Cech等の米国特許番号4,987,071;およびCech等の米国特許番号5,116,742を参照されたい。または、FGF-CX mRNAを用いて、RNA分子のプールから特異的なリボヌクレアーゼを有する触媒性RNAを選択することができる。Bartel et al., (1993) Science 261:14111418を参照されたい。

【0130】

代わりに、FGF-CX遺伝子発現は、FGF-CXの制御領域(例えば、FGF-CX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とすることにより阻害されて、標的細胞中のFGF-CX遺伝子の転写を妨げる3重ヘリックス構造を形成し得る。Helene. (1991) Anticancer Drug Des. 6: 56984; Helene. et al. (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:2736; およびMaher (1992) Bioassays 14: 80715を一般に参照。

10

【0131】

様々な実施態様において、FGF-CXの核酸は、塩基部分、糖部分またはリン酸主鎖で修飾され、例えば、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され得る。例えば、核酸のデオキシリボースリン酸主鎖は、修飾されて、ペプチド核酸を生成し得る(Hyrup et al. (1996) Bioorg Med Chem 4: 523を参照)。本明細書において用いられる様に、用語「ペプチド核酸」または「PNA」は、デオキシリボースリン酸主鎖が擬ペプチド主鎖により取って代われ、4つの元々の核酸塩基のみ保持する核酸ミメティクス、例えば、DNAミメティクスに言及する。PNAの天然の主鎖は、低イオン強度の条件下でDNAおよびRNAへの特異的なハイブリダイゼーションを可能とすると見られてきた。PNAオリゴマーの合成は、Hyrup et al. (1996) above; Perry0'Keefe et al. (1996) PNAS 93: 14670675に記載される様に、標準固相ペプチド合成プロトコールを用いて実行され得る。

20

【0132】

FGF-CXのPNAは、治療応用および診断応用において用いられ得る。例えば、PNAは、遺伝子発現の配列特異的調節のためアンチセンスまたは抗原物質として、転写または翻訳の抑止を誘導、または複製を阻害することにより、用いられ得る。FGF-CXのPNAは、例えば、遺伝子の単一塩基対変異の解析において、例えば、PNA指向性PCR clamping法より;他の酵素との組合せにおいて用いられる場合の人工制限酵素、例えば、SIヌクレアーゼ(上述のHyrup B. (1996))として;またはDNA配列決定およびハイブリダイゼーションのプロブまたはプライマー(上述のHyrup et al. (1996));上述のPerry-0'Keefe (1996))としても用いられ得る。

30

【0133】

別の実施態様において、FGF-CXのPNAは、親油性またはPNAに対する他のヘルパー群と関連することにより、PNA-DNAキメラの形成により、または当分野において既知の薬輸送のリボソームまたは他の技術の使用により例えば、安定性または細胞の取り込みを増強するために修飾され得る。例えば、FGF-CXのPNA-DNAキメラは、PNAおよびDNAの有利な特性を組合せ得るものを生成され得る。かかるキメラは、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ことを可能とする一方で、PNA部分は高結合親和性および特異性を提供する。PNA-DNAキメラは、塩基スタッキング、核酸塩基間の多くの結合、および向きの点で選択される適当な長さのリンカーを用いて結びつき得る(上述のHyrup (1996))。PNA-DNAキメラの合成は、上述のHyrup (1996)およびFinn et al. (1996) Nucl Acids Res 24: 335763に記載される様に実行されることが出来る。例えば、DNA鎖は、標準ホスホラミダイトカップリング化学反応、およびモディファイされたヌクレオシド類似体、例えば、PNAとDNAの5'末端との間で用いられ得る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を用いて固体支持上で合成され得

40

50

る (Mag et al. (1989) Nucl Acid Res 17: 597388)。PNAモノマーは次に、段階的な方法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産生する (上述のFinn et al. (1996)) または、キメラ分子は、5' DNAセグメントおよび3' PNAセグメントと共に合成され得る。Petersen et al. (1975) Bio org Med Chem Lett 5: 111911124を参照されたい。

【0134】

他の実施態様において、オリゴヌクレオチドは、ペプチドの様な他の添加群 (例えば、インピボにおいて宿主細胞受容体を標的とする)、または細胞膜を介する輸送を促進する物質 (例えば、Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:65536556; Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648652; PCT公開番号W088/09810を参照)、または血管脳関門 (例えば、PCT公開番号W089/10134を参照) を含み得る。加えて、オリゴヌクレオチドは、切断を引き起こすハイブリダイゼーション試薬 (例えば、Krol et al., 1988, BioTechniques 6:958976を参照) または介在試薬 (例えば、Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539549を参照) でモディファイされ得る。最後に、オリゴヌクレオチドは、別の分子、例えば、ペプチド、クロスリンクを引き起こすハイブリダイゼーション試薬、輸送物質、切断を引き起こすハイブリダイゼーション試薬等と共役し得る。

10

【0135】

FGF-CXポリペプチド

本発明の新規タンパク質は、表1 (配列番号: 2) において提供される配列のFGF-CX様タンパク質を含む。本発明はまた、表1において示される対応する残基から任意の残基が変更され得る一方、FGF-CX様活性化および生理学的機能を維持するタンパク質、またはそれらの機能的なフラグメントを依然コード化する突然変異体または変異体タンパク質を含む。突然変異体または変異体タンパク質において、残基の20%以下またはそれより多くが、そのように変更され得る。

20

【0136】

一般に、FGF-CX様機能を維持するFGF-CX様変異体は、配列の特定の位置の残基が、他のアミノ酸により置換された任意の変異体を含み、および別の残基または該タンパク質の2残基間の残基を挿入する可能性、ならびに該配列由来の1またはそれ以上の残基を欠く可能性をさらに含む。任意のアミノ酸置換、挿入、または欠損が本発明により包含される。好ましい場合において、置換は上で定義されたように保存的置換である。さらに、本発明の範囲を制限することなく、表12の以下の位置 (配列番号: 2において提供される番号付けを用いる) が、突然変異体または変異体タンパク質が1またはそれ以上の指示された置換の1つを含み得るように指示された様に置換され得る。示された置換は、与えられた位置でおこり得る可能な置換の範囲を制限しない。

30

【0137】

表12

【表15】

位置	可能な置換	
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	
16:	Gly から Ala	
17:	Leu から Ile または Val	10
19:	Gln を失う	
21:	Val から Phe or 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 失う	
54:	Ala から Gly, Val, または 失う	
55:	Ala から Ser または Thr	
56:	Gln から Asp, Glu, または Asn	30
58:	Ala から Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, または Glu	
61:	His から Gln, Asn, Lys, または Arg	
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	40
103:	Val から Ile	
115:	Ser から Thr	
123:	Asp から Glu	
128:	Tyr から Phe	
135:	SER から THR, GLN, または ASN	
138:	Ile から Val または Leu	
155:	Ile から Leu	

【 0 1 3 8 】

表 1 2 の 続 き

【 表 1 6 】

- 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
 207: Leu から Ile または Val
 209: Met から 任意の残基
 211: Thr から Ser

10

【 0 1 3 9 】

本発明の 1 つの態様は、単離 F G F - C X タンパク質、およびそれらの生物学的に活性な部分、または誘導体、フラグメント、それらの類似体または相同体に関する。抗 F G F - C X 抗体を生じる免疫原としての使用に適したポリペプチドフラグメントもさらに提供される。1 つの実施態様において、天然の F G F - C X タンパク質は、標準タンパク質精製技術を用いる適当な精製スキームにより細胞または組織供給源から単離されることができ

20

【 0 1 4 0 】

「単離」または「精製」タンパク質またはそれらの生物学的に活性な部分は、細胞の物質または F G F - C X タンパク質がもたらされる細胞または組織供給源由来のタンパク質の混入が実質的にない、または化学的前駆体または化学的に合成される場合の他の化学物質が実質的にない。用語「細胞の物質が実質的にない」は、タンパク質は単離または組替的に産生されるもの由来の細胞の細胞成分から分離される F G F - C X タンパク質の標本を含む。1 つの実施態様において、用語「細胞の物質が実質的にない」は、非 F G F - C X タンパク質（「混入するタンパク質」として本明細書においても言及される）の約 3 0 %（乾燥重量による）未満、より好ましくは、非 F G F - C X タンパク質の薬 2 0 % 未満、さらに好ましくは、非 F G F - C X タンパク質の約 1 0 % 未満、そしてさらに好ましくは非 F G F - C X タンパク質の約 5 % 未満を有する F G F - C X タンパク質の標本を含む。F G F - C X タンパク質またはそれらの生物学的に活性な部分が組変え的に産生される場合、好ましくは培養上清が実質的にない、すなわち、培養液が約 2 0 % 未満、さらに好ましくは、約 1 0 % 未満、そして最も好ましくはタンパク質標本の用量の約 5 % 未満を意味する。

30

40

【 0 1 4 1 】

用語「化学的前駆体または他の化学物質が実質的にない」は、タンパク質が化学的前駆体またはタンパク質の合成において関与する他の化学物質から分離される F G F - C X タンパク質の標本を含む。1 つの実施態様において、用語「化学的前駆体または他の化学物質が実質的にない」は、化学的前駆体または非 F G F - C X 化学物質の約 3 0 %（乾燥重量による）未満、さらに好ましくは、化学的前駆体または非 F G F - C X 化学物質の約 2 0 % 未満、なおさらに好ましくは、化学的前駆体または非 F G F - C X 化学物質の約 1 0 % 未満、そして最も好ましくは、化学的前駆体または非 F G F - C X 化学物質の約 5 % 未満を有する F G F - C X タンパク質の標本を含む。

50

【0142】

F G F - C X タンパク質の生物学的に活性な部分は、F G F - C X タンパク質のアミノ酸配列に十分に相同なアミノ酸配列またはF G F - C X タンパク質のアミノ酸配列に由来するアミノ酸配列、例えば、全長F G F - C X タンパク質より少ないアミノ酸を含む配列番号：2において示されるアミノ酸配列を含むペプチドを含み、F G F - C X タンパク質の少なくとも1つの活性を表す。典型的に、生物学的に活性な部分は、少なくとも1つのF G F - C X タンパク質の活性を有するドメインまたはモチーフを含む。F G F - C X タンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、長さ10、25、50、100またはそれ以上のアミノ酸であるポリペプチドであり得る。

【0143】

本発明のF G F - C X タンパク質の生物学的に活性な部分は、F G F ファミリータンパク質間で実質的に保存された上で同定されたドメインの少なくとも1つを含有し得る。さらに、タンパク質の他の領域を欠いている他の生物学的に活性な部分は、組換え技術により調製され、かつ天然のF G F - C X タンパク質の1またはそれ以上の機能的活性化を評価し得る。

【0144】

1つの実施態様において、F G F - C X タンパク質は、配列番号：2においれ示されるアミノ酸配列を有する。他の実施態様において、F G F - C X タンパク質は、配列番号：2に実質的に相同であり、配列番号：2のタンパク質の機能的活性化を保持し、以下に詳細に記載する様に、天然の対立遺伝子バリエーションまたは変異誘発に起因するアミノ酸配列において依然異なる。他の実施態様によると、F G F - C X タンパク質は、配列番号：2のアミノ酸配列に少なくとも45%相同なアミノ酸配列を含み、かつ配列番号：2のF G F - C X タンパク質の機能的活性を保持するタンパク質である。別の実施態様において、F G F - C X は、配列番号：2のアミノ酸配列に少なくとも約45%相同なアミノ酸配列、さらに好ましくは、約55、65、70、75、80、85、90、95、98さらに99%相同なアミノ酸配列を含有し、かつ配列番号：2の配列を有する対応ポリペプチドのF G F - C X タンパク質の機能的活性を保持するタンパク質である。

【0145】

2またはそれ以上の配列間の相同性の測定

2つのアミノ酸または2つの核酸のパーセント相同性を測定するために、配列を最適な比較目的のため整列させる（例えば、ギャップが配列間の最適なアラインメントのため比較された配列のいずれかにおいて導入され得る）。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は、次に比較される。第1の配列の位置が、第2の配列の対応する位置の同一のアミノ酸残基またはヌクレオチドにより占められている場合、分子はその位置で相同である（すなわち、本明細書において用いられる様に、アミノ酸または核酸「相同性」は、アミノ酸または核酸「同一」と等しい。）

【0146】

核酸配列相同性は、2配列間の同一性の程度として測定され得る。相同性は、G C G プログラムパッケージにおいて提供されるG A P ソフトウェアのような、当分野において既知のコンピュータプログラムを用いて測定され得る。Needleman and Wunsch 1970 J Mol Biol 48: 443-453を参照されたい。核酸配列比較の以下の設定：5.0のG A P 生成ペナルティーおよび0.3のG A P 伸長ペナルティーを伴うG C G G A P ソフトウェアを用いて、上で言及された類似核酸配列のコード領域は、配列番号：1において示されるD N A 配列のC D S（コード化）部分と好ましくは少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%の同一性の程度を表す。

【0147】

用語「配列同一性」は、2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列が、比較の特定領域にわたって残基毎に同一である程度に言及する。用語「配列同一性のパーセンテージ」は、比較の領域にわたって、2つの最適整列配列を比較すること、一致位置の数をもたらすために両配列において生じる同一核酸塩基（例えば、核酸の場合、A、T、C、G、

10

20

30

40

50

UまたはI)のある位置の数を測定すること、比較の領域中の位置の合計数(すなわち、ウィンドウサイズ)により一致位置の数を割ること、および配列同一性のパーセンテージをもたらすために、結果を100倍することにより測定される。本明細書において用いられる様に、用語「実質的同一性」は、ポリヌクレオチド配列の特徴を示す。ここで、該ポリヌクレオチドは、比較領域にわたって参考配列と比較して、少なくとも80%配列同一性、好ましくは、少なくとも85%同一性、およびしばしば90~95%配列同一性、さらに一般的には少なくとも99%配列同一性を有する配列を含む。用語「ポジティブ残基のパーセンテージ」は、比較の領域にわたって2つの最適化整列配列を比較すること、上で定義された様に同一および保存アミノ酸置換が、一致位置の数をもたらすために両配列間で生じる位置の数を測定すること、比較の領域の位置の合計数(すなわち、ウィンドウサイズ)により一致位置の数を割ること、およびポジティブ残基のパーセンテージをもたらすために、結果を100倍することにより測定される。

10

【0148】

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。本明細書において用いられる様に、FGF-CX「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非FGF-CXポリペプチドに作用可能に結合した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に言及し、「非FGF-CXポリペプチド」は、FGF-CXタンパク質に実質的に相同でないタンパク質、例えば、FGF-CXタンパク質と異なり、かつ同一生物または異なる生物からもたらされ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に言及する。FGF-CX融合タンパク質内で、FGF-CXポリペプチドは、FGF-CXタンパク質の全部または一部に対応し得る。1つの実施態様において、FGF-CX融合タンパク質は、少なくとも1つのFGF-CXタンパク質の生物学的に活性な部分を含む。別の実施態様において、FGF-CX融合タンパク質は、少なくとも2つのFGF-CXタンパク質の生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質内で、用語「作用可能に結合する」は、FGF-CXポリペプチドおよび非FGF-CXポリペプチドが互いにインフレームで融合されることを示すことを意図する。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末端に融合し得る。

20

【0149】

例えば、1つの実施態様において、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用可能に結合するFGF-CXポリペプチドを含む。かかる融合タンパク質は、FGF-CX活性を調節する化合物のスクリーニングアッセイ(かかるアッセイは、以下で詳細に記載される)においてさらに利用され得る。

30

【0150】

別の実施態様において、融合タンパク質は、FGF-CX配列がGSTのC末端に融合する(すなわち、グルタチオンSトランスフェラーゼ)GST-FGF-CX融合タンパク質である。かかる融合タンパク質は、組換えFGF-CXの精製を促進することができる。

【0151】

さらに別の実施態様において、融合タンパク質は、N末端にある異種性シグナル配列を含むFGF-CXタンパク質である。例えば、天然のFGF-CXシグナル配列(すなわち、配列番号:2のアミノ酸1~20)が、取り除かれ、別のタンパク質由来のシグナル配列で取って代われ得る。ある宿主細胞において(例えば、哺乳動物細胞)、FGF-CXの発現または/および分泌は、異種性シグナル配列の使用を介して増加され得る。

40

【0152】

別の実施態様において、融合タンパク質は、1またはそれ以上のドメインを含む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からもたらされる配列に融合されるFGF-CX免疫グロブリン融合タンパク質である。本発明のFGF-CX免疫グロブリン融合タンパク質は、医薬組成物に取り込まれ、対象に投与され、細胞表面上の

50

F G F - C X リガンドと F G F - C X タンパク質との相互作用を阻害し、それによりインビボでの F G F - C X 仲介シグナル伝達を抑制できる。制限されない実施例において、本発明の考えられる F G F - C X リガンドは、F G F - C X 受容体である。F G F - C X 免疫グロブリン融合タンパク質を用いて、F G F - C X 同族リガンドの生物学的利用能に作用させることができる。F G F - C X リガンド / F G F - C X 相互作用の阻害は、増殖性疾患および分化性疾患の両方の処置、ならびに細胞生存の調節（例えば、促進または阻害）のために治療的に有用であり得る。さらに、本発明の F G F - C X 免疫グロブリン融合タンパク質を免疫原として用いて、対象において抗 F G F - C X 抗体を産生し、F G F - C X リガンドを精製し、F G F - C X リガンドとの F G F - C X の相互作用を阻害する分子を同定するためのスクリーニングにおいて用いられ得る。

10

【0153】

本発明の F G F - C X キメラタンパク質または融合タンパク質は、標準組換え DNA 技術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 フラグメントは、例えば、ライゲーションのための平滑末端またはねじれ (stagger) 末端、適当な末端を提供するための制限酵素切断、適当な粘着末端の充填、望まない結合を避けるためのアルカリフォスファターゼ処理、および酵素ライゲーションを用いることにより、従来技術に従いインフレームで互いに結合する。別の実施態様において、融合遺伝子は、自動 DNA 合成機を含む従来技術により合成され得る。または、遺伝子フラグメントの PCR 増幅は、引き続いてアニーリングし、再増幅され、キメラ遺伝子配列を精製し得る 2 つの連続遺伝子フラグメント間の相補的なオーバーハングを生じるアンカープライマーを用いて

20

【0154】

F G F - C X 作用物質および拮抗物質

本発明はまた、F G F - C X 作用物質 (ミメティクス) または F G F - C X 拮抗物質のいずれかとして機能する F G F - C X タンパク質の変異体に関する。F G F - C X タンパク質の変異体は、変異誘発、例えば、F G F - C X タンパク質の別々の点変異または切断により生成され得る。F G F - C X の作用物質は、F G F - C X タンパク質の天然に存在する型の生物学的に活性な同一物またはサブセットを実質的に保持し得る。F G F - C X タンパク質の拮抗物質は、例えば、F G F - C X タンパク質を含む細胞のシグナルカスケードの下流または上流のメンバーに競合的に結合することにより、1 またはそれ以上の F G F - C X タンパク質の天然に生じる形の活性化を阻害し得る。従って、特異的な生物学的作用は、機能を制限された変異体との処理により誘発され得る。1 つの実施態様において、タンパク質の天然に生じる形の生物学的に活性なサブセットを有する変異体との対象の処理は、F G F - C X タンパク質の天然に生じる形との処置と関係する対象においてより少ない副作用を有する。

30

【0155】

F G F - C X 作用物質 (ミメティクス) としてまたは F G F - C X 拮抗物質のいずれかとして作用する F G F - C X タンパク質の変異体は、例えば、F G F - C X タンパク質の作用物質または拮抗物質の活性について F G F - C X タンパク質の切断突然変異体の組合せ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 つの実施態様において、F G F - C X 変異体の多彩なライブラリーは、核酸レベルの組合せ変異誘発により生成され、多彩な遺伝子ライブラリーによりコード化される。F G F - C X 変異体の多彩なライブラリーは、例えば、潜在的な F G F - C X 配列の変性セットが、個々のポリペプチドとして、または代わりに F G F - C X 配列のセットを含有するより大きな融合タンパク質のセット (例えば、ファージディスプレイ) として発現可能である様な遺伝子配列に合成オリゴヌクレオチドの混合物を酵素的にライゲーションすることにより産生され得る。変

40

50

性オリゴヌクレオチド配列由来の潜在的 F G F - C X 変異体のライブラリーを産生するために用いられ得る様々な方法がある。変性遺伝子配列の化学的合成を、自動 D N A 合成機において実行することができ、合成遺伝子は次に、適当な発現ベクターに結合させられる。遺伝子の変性セットの使用は、潜在的 F G F - C X 配列の望まれるセットをコード化する配列の全部である混合物の 1 つにおいて供給を可能とする。変性オリゴヌクレオチドを合成する方法は、当分野において既知である（例えば、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を参照）。

【 0 1 5 6 】

ポリペプチドライブラリー

10

加えて、F G F - C X コード配列のフラグメントのライブラリーを用いて、F G F - C X タンパク質の変異体のスクリーニングおよび続く選択のための F G F - C X の多彩な群を産生し得る。1 つの実施態様において、コード配列フラグメントのライブラリーは、ニッキングが 1 分子あたり約 1 回のみ生じる条件下でヌクレアーゼを有する F G F - C X コード配列の二本鎖 P C R フラグメントの処理、二本鎖 D N A の変性、異なるニック産物由来のセンス/アンチセンスプライマーを含み得る二本鎖 D N A を形成するための D N A の再生、S 1 ヌクレアーゼとの処理により二本鎖の再形成から一本鎖部分を取り除くこと、および結果として生じるフラグメントライブラリーの発現ベクターへのライゲーションにより生成されうる。この方法により、発現ライブラリーは、N 末端および F G F - C X タンパク質の様々なサイズの内部フラグメントをコード化するものがもたらされ得る。

20

【 0 1 5 7 】

点変異または切断により作られた組合せライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングすること、および選択された性質を有する遺伝子産物の c D N A ライブラリーをスクリーニングするいくつかの技術は、当分野において既知である。かかる技術は、F G F - C X タンパク質の組合せ変異誘発により生成される遺伝子ライブラリーの迅速なスクリーニングに適している。複製可能な発現ベクターへの遺伝子ライブラリーのクローン化、結果として生じるベクターライブラリーとの適当な細胞の形質移入、および望まれる活性の検出が産物が検出される遺伝子をコード化するベクターの単離を促進する条件下での組合せ遺伝子の発現を典型的に含む大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングする高処理量分析に従った技術が、最も広く用いられる。ライブラリーの機能的変異の頻度を増大する新たな技術である再帰全変異誘発 (R E M) が、F G F - C X 変異体を同定するためのスクリーニングアッセイとの組合せにおいて用いられ得る (Arkin and Yourvan (1992) PNAS 89:7811 7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6:327331)。

30

【 0 1 5 8 】

抗 F G F - C X 抗体

本明細書において用いられる用語「抗体」は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン (I g) 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) 抗原結合部位を含有する分子に言及する。かかる抗体は、限定されることなく、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、一本鎖、F a b、F a b ' および F (a b ') 2 フラグメント、および F a b 発現ライブラリーを含む。一般に、ヒトから得られる抗体分子は、分子に存在する天然の重鎖により別のものと異なる任意のクラスの I g G、I g M、I g A、I g E および I g D に関する。あるクラスは、同様に、I g G 1、I g G 等のサブクラスを有する。さらに、ヒトにおいて、軽鎖は、鎖または鎖であり得る。抗体に対する本明細書における参考文献は、ヒト抗体種のかかるクラス、サブクラスおよびタイプの全てに対する参考文献を含む。

40

【 0 1 5 9 】

抗原、またはそれらの一部またはフラグメントとして機能することを意図される単離タンパク質は、ポリクローナル抗体標本およびモノクローナル抗体標本の標準技術を用いる、抗原に免疫特異的に結合する抗体を生成するための免疫原として用いられ得る。全長タンパク質を用いることができるか、または、本発明は免疫原としての使用のため抗原性ペプ

50

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、配列番号：2において示されるアミノ酸配列のような全長タンパク質のアミノ酸配列の少なくとも6アミノ酸残を含み、全長タンパク質またはエピトープを含有する任意のフラグメントとの特異的免疫複合体を形成するペプチドに対して生じる抗体のエピトープを包含する。好ましくは、抗原性ペプチドは、少なくとも10アミノ酸残基、または少なくとも15アミノ酸残基、または少なくとも20アミノ酸残基、または少なくとも30アミノ酸残基を含む。抗原性ペプチドにより包含される好ましいエピトープは、その表面に位置するタンパク質の領域；普通は、親水性領域である。

【0160】

本発明のある実施態様において、抗原性ペプチドにより包含される少なくとも1つのエピトープが、タンパク質の表面に位置する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ポリペプチドの領域が特定の親水性領域であり、それゆえ、抗体産物の標的化に有用である表面残基をコード化することを示す。抗体産物の標的化を意味する様に、親水性領域および親水性を示す疎水性親水性指標プロットは、例えば、フリーエ形質転換ありまたはなしのいずれかでのKyte Doolittle法またはHopp Woods法を含む、当分野においてよく知られた任意の方法により生成され得る。例えば、Hopp and Woods, 1981, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: 3824-3828; Kyte and Doolittle 1982, J. Mol. Biol. 157: 105-142を参照されたい。それぞれ、全体として参考文献により本明細書において取り込まれる。抗原性タンパク質、または誘導体、フラグメント、それらの類似体または相同体内の1またはそれ以上のドメインに特異的な抗体も、本明細書において提供される。

【0161】

本発明のタンパク質、または誘導体、フラグメント、類似体、それらの相同体またはオルソログは、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生成での、免疫原として利用され得る。

【0162】

当分野内において既知の様々な方法は、本発明のタンパク質、またはそれらの誘導体、フラグメント、類似体、またはそれらの相同体またはオルソログに対して指示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に用いられ得る（例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYを参照。参考文献により本明細書に組み込まれる）。これらの抗体のいくつかを、以下に論じる。

【0163】

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、様々な適当な宿主動物（例えば、ウサギ、ヤギ、マウスまたは他の哺乳動物）が、FGF-CX天然タンパク質、それらの合成変異体、または上述の誘導体を伴う1回またはそれ以上の注入により免疫され得る。適当な免疫原性標本は、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表す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せた免疫原性タンパク質を含有することができる。さらに、FGF-CXタンパク質は、免疫された哺乳動物での免疫原であると知られた第2のタンパク質に複合され得る。かかる免疫原性タンパク質の実施例は、制限されることなく、キーホールカサガイヘモシアニン、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を含む。標本は、アジュバントをさらに含むことができる。免疫学的反応を増大させるために用いられる様々なアジュバントは、制限されることなく、フロイント（完全および不完全）、ミネラルジェル（例えば、水酸化アルミニウム）、表面活性物質（例えば、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、ジニトロフェノール等）、Bacille Calmette-GuerinおよびCorynebacterium parvumのようなヒトに使用可能なアジュバント、または類似の免疫促進剤が挙げられる。使用し得るアジュバントのさらに別な例としては、MPL-TDMアジュバント（モノホスホリルリピドA、合成ジコリノミコール酸トレハロース

)を挙げ得る。

【0164】

免疫原性 FGF - CX タンパク質に対して指示されるポリクローナル抗体分子は、哺乳動物（例えば、血液から）単離され、免疫血清の IgG 分画を第 1 に提供するタンパク質 A またはタンパク質 G を用いるアフィニティークロマトグラフィーのようなよく知られた技術によりさらに精製され得る。引き続いて、または代わりに、探された免疫グロブリンの標的である特異的抗原、またはそれらのエピトープは、免疫親和性クロマトグラフィーにより免疫特異的抗体を精製するためのカラム上に固定され得る。免疫グロブリンの精製は、例えば、D. Wilkinson (The Scientist, published by The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28)により考察される。

10

【0165】

2. モノクローナル抗体

本明細書において用いる用語「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、特徴のある軽鎖遺伝子産物および特徴のある重鎖遺伝子産物からなる抗体分子の 1 分子種のみを含有する抗体分子群に言及する。特に、モノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR)は、全ての分子群において同一である。従って、MAb は、それらに特徴のある結合親和性により特徴付けられる抗原の特定のエピトープと免疫反応が可能な抗原結合部位を含有する。

【0166】

モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975)により記載される様に、ハイブリドーマ法を用いて調製され得る。ハイブリドーマ法において、マウス、ハムスター、または他の適当な宿主動物は、免疫試薬で典型的に免疫され、免疫試薬に特異的に結合する抗体を産生するか、または産生可能であるリンパ球を促進する。または、リンパ球は、インビトロで免疫され得る。

20

【0167】

免疫試薬は、FGF - CX タンパク質抗原、それらのフラグメントまたはそれらの融合タンパク質を典型的に含む。ヒト起源の細胞が望まれるなら用いられ一般に、末梢血液リンパ球が用いられ、非ヒト哺乳動物起源が望まれるなら、脾細胞またはリンパ節が用いられる。リンパ球は、そこでポリエチレングリコールのような適当な融合試薬を用いた不死化細胞株と融合され、ハイブリドーマ細胞を形成する。例えば、Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103を参照されたい。不死化細胞株は、普通は、哺乳類細胞特定の場合げっ歯類、ウシおよびヒト機嫌の骨髄腫に形質移入される。普通は、ラットまたはマウス骨髄腫細胞株が用いられる。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、非融合細胞不死化細胞の成長または生存を阻害する 1 またはそれ以上の物質を含有する適当な培養液において培養され得る。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、ハイブリドーマの培養液は、物質が HGPRT 欠乏細胞の成長を妨げるヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン(「HAT 培地」)を典型的に含む。

30

【0168】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定した高発現レベルをサポートするものであり、HAT 培地のような培地に感受性がある。さらに好ましくない不死化細胞株は、例えば、the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California and the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia から得られる、マウス骨髄腫細胞株である。ヒト骨髄腫細胞株およびマウス - ヒトヘテロ骨髄腫細胞株は、ヒトモノクローナル抗体の産物についても記載される。例えば、Kozbor: J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al.: Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63 を参照されたい。

40

【0169】

ハイブリドーマ細胞が培養される培養液は、そのとき抗原に対して指示するモノクローナ

50

ル抗体の存在をアッセイされ得る。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降またはラジオイムノアッセイ (R I A) または酵素結合免疫測定法 (E L I S A) のようなインビトロ結合アッセイにより測定される。かかる技術およびアッセイは、当分野において既知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980) の Scatchard analysis により測定され得る。それは、高い程度の特異性および標的抗原の高結合親和性を有する抗体を同定するためのモノクローナル抗体の治療的増幅において特に重要な目的であり。

【 0 1 7 0 】

望ましいハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンは、限界希釈法によりサブクローン化され、標準方法 (Goding, 1986) により成長する。この目的に適当な培地は、例えば、ダルベッコ変法イーグル培地および R P M I 培地を含む。または、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物の腹水の様にインビボにおいて成長し得る。

【 0 1 7 1 】

サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、単離されるか、または例えば、タンパク質 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、ゲル電気泳道、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーのような通常の免疫グロブリン精製により、培地または腹水液から精製される。

【 0 1 7 2 】

モノクローナル抗体はまた、米国特許番号 4 , 8 1 6 , 5 6 7 において記載される様な組換え D N A 方法により作られることができる。本発明のモノクローナル抗体をコード化する D N A は、迅速に単離され、通常の方法 (例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコード化する遺伝子に免疫特異的に結合することが可能なオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより) を用いて配列決定され得る。本発明のハイブリドーマ細胞は、かかる D N A の好ましい供給源として働く。一旦単離されると、D N A は、サル C O S 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞、または免疫グロブリンタンパク質を別に産生しない骨髓腫細胞のような宿主細胞に形質移入される発現ベクター内に位置し、組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成を得られる。D N A は、例えば、相同マウス配列の場所にあるヒト重鎖および軽鎖定常ドメインの配列をコードする置換 (米国特許番号 4 , 8 1 6 , 5 6 7 ; Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994)) により、または非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部または一部の免疫グロブリンコード配列に共有結合性結合することによりモディファイされ得る。かかる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のために置換され得るし、またはキメラ二価抗体を生成するための本発明の抗体の抗原結合部位の可変ドメインのために置換され得る。

【 0 1 7 3 】

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示する抗体は、ヒト化抗体またはヒト抗体を含む。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による免疫応答を生じさせることなくヒトへの投与に適している。抗体のヒト化型は、ヒト免疫グロブリンの配列を主に含み、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含有する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 (F v 、 F a b 、 F a b ' 、 F (a b ') 2 、 または他の抗体の抗原結合配列) である。ヒト化は、Winter and co-workers (J ones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)) の方法に従い、ヒト交代の対応する配列のげっ歯類 C D R または C D R 配列を置換することにより実行され得る (米国特許番号 5 , 2 2 5 , 5 3 9 も参照) 。時には、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り置きかえられる。ヒト化抗体は、レシピエント抗体において、または移動された C D R またはフレームワーク配列のどちらにおいても見られない残基も含む。一般に、ヒト化抗体は、可変ドメインの少なくとも 1 つの全体、および典型的な 2 つの可変ドメインを実質的に含む。ここで、非ヒト免疫グロブリンの対応す

10

20

30

40

50

るCDR領域の全て、または実質的に全て、およびフレームワーク領域の全て、または実質的に全ては、ヒト免疫グロブリン共通配列の領域である。ヒト化抗体は、好ましくは、少なくとも免疫グロブリン定常領域(Fc)の一部、ヒト免疫グロブリンの一部を典型的に含む(Jones et al., 1986; Riechmann et al., 1988; and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992))。

【0174】

4. ヒト抗体

完全にヒト抗体は、ヒト遺伝子から生じるCDRを含む軽鎖および重鎖の両方の全配列の抗体分子に基本的に関与する。かかる抗体は、本明細書において「ヒト抗体」または「完全にヒト抗体」と名付けられる。FGF-CXタンパク質に対して指示するヒトモノクローナル抗体は、trioma技術；ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor, et al., 1983 *Immunol Today* 4: 72を参照)およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ技術(Cole, et al., 1985 In: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 7796を参照)により調製され得る。ヒトモノクローナル抗体は、本発明の実施において利用され得るし、ヒトハイブリドーマを用いることにより、またはインビトロでのEBウイルスとのヒトB細胞の形質移入により産生され得る(Cole, et al., 1985 In: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 7796を参照)。

【0175】

加えて、ヒト交代はまた、ファージディスプレイライブラリーを含む別の技術を用いて産生され得る(Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991))。同様に、ヒト抗体は、トランスジェニック動物、例えば部分的に不活性化されたまたは完全に不活性化された内在性免疫グロブリン遺伝子であるマウスにヒト免疫グロブリン遺伝子座を導入することにより作られることができる。挑戦により、ヒト抗体産物は、遺伝子再配列、構築、抗体レパートリーを含む全観点においてヒトにおいて見られるものはよく似ていることを観察される。このアプローチは、例えば、米国特許番号5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016、および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)); およびLonberg and Huszar (*Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995))において記載される。

【0176】

FGF-CXタンパク質に特別に結合するヒト抗体は、抗原により、挑戦に対する応答での動物の内在性抗体よりむしろ完全にヒト抗体を産生するためにモディファイされるトランスジェニック非ヒト動物を用いて別に産生され得る(公開番号WO94/02602参照)。非ヒト宿主での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化する内在性遺伝子は、能力を奪われ、宿主のゲノムに挿入されるヒト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化する遺伝子座を活性化する。ヒト遺伝子は、例えば、要求されるヒトDNAセグメントを含有する酵母人工染色体を用いて組み込まれる。全ての望まれる修飾を提供する動物は、修飾の全相補的配列より少ない相補的配列を含有するトランスジェニック動物が仲介する交配により子孫として得られる。かかる非ヒト動物の好ましい実施態様は、マウスおよびPCT公開番号WO96/33735およびWO96/34096において開示される様にXenomouse™と名付けられる。この動物は、完全にヒト免疫グロブリンを分泌するB細胞を産生する。抗体は、例えば、ポリクローナル抗体の標本、またはモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのような動物由来の不死化B細胞由来の標本として該FGF-CX免疫グロブリンでの免疫の後の動物から直接的に得られることができる。加えて、ヒト可変領域を有する免疫グロブリンをコード化する遺伝子は、回復させ、直接的に抗体を得るために発現させるか、または例えば、一本鎖Fv分子のような抗体の類似体を得るためにさらにモディファイされ得る。

10

20

30

40

50

【0177】

マウスとして例示され、内在性免疫グロブリン重鎖の発現を欠く非ヒト宿主を産生する方法の実施例は、米国特許番号5,939,598において開示される。それは、遺伝子座の転座および転座免疫グロブリン重鎖遺伝子座の転写物の形成を防ぐために胚性幹細胞での少なくとも1つの内在性重鎖遺伝子座由来のJセグメントを欠くことを含む方法により得られることができ、欠損は、選択可能なマーカーをコード化する遺伝子を含むベクターを標的とすること；および体細胞および生殖細胞が胚性幹細胞から選択可能なマーカーをコード化する遺伝子を含むトランスジェニックマウスを賛成することにより作用される。

【0178】

ヒト抗体のような、該抗体を産生する方法は、米国特許番号5,916,771において開示される。それは、重鎖をコード化するヌクレオチド配列を含む発現ベクターを培養での1つの哺乳動物宿主細胞内へ導入すること、軽鎖をコード化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へ導入すること、およびハイブリドーマ細胞を形成するために2つの細胞を融合させることを含む。ハイブリドーマ細胞は、重鎖および軽鎖を含む交代を発現する。

10

【0179】

この産物のさらなる改良において、免疫原の臨床的に関連するエピトープを同定する方法、および高親和性で関連するエピトープに免疫特異的に結合する抗体を選択する関連する方法は、PCT公開番号WO99/53049において開示される。

20

【0180】

5. Fabフラグメントおよび一本鎖抗体

本発明によると、技術は、本発明の抗原性FGF-CXタンパク質に対して特異的な一本鎖抗体の産物に適應させ得る（例えば、米国特許番号4,946,778を参照）。加えて、方法は、タンパク質または誘導體、フラグメント、類似体またはそれらの相同体にたいする望まれる特別性を有するモノクローナルFabフラグメントの迅速で効果的な同定を可能とするFab発現ライブラリー（例えば、Huse, et al., 1989 Science 246: 1275-1281を参照）の構造に適應され得る。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、制限されることなく、(i) 抗体分子のペプシン切断により産生される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ブリッジを還元することにより生成されるFabフラグメント；(iii) パパインでの抗体分子の処理により生成されるFabフラグメントおよび還元剤および(iv) Fvフラグメントを含む当分野において既知の技術により産生され得る。

30

【0181】

6. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、モノクローナルであり、好ましくは少なくとも2つの異なる抗原への結合特異性を有するヒトまたはヒト化抗体である。当該場合において、結合特異性の1つは、本発明の抗原性タンパク質によるものである。第2の結合標的は、別の抗原であり、有利には細胞表面タンパク質または受容体または受容体サブユニットである。

【0182】

二重特異性抗体を作る方法は、当分野において既知である。伝統的に、二重特異性抗体の組換え産物は、2つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖ペアの共発現に基づき、2つの重鎖は、異なる特異性を有する(Milstein and Cuello, Nature, 305:537-539 (1983))。

40

免疫グロブリン重鎖および軽鎖のランダムな分類のため、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、1つのみが正しい二重特異性構造の10の異なる抗体分子の潜在的な混合物を産生する。正しい分子の精製は普通、アフィニティークロマトグラフィーステップにより成し遂げられる。類似の方法が、1993年5月13日に公開されたWO93/08829、およびTraunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)において開示される。

【0183】

50

望まれる結合特異性を有する抗体可変ドメイン（抗体抗原結合部位）は、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合され得る。好ましくは、融合は、少なくともヒンジ領域、C H 2 領域、およびC H 3 領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインと共にある。好ましくは、少なくとも融合の1つにおいて存在する軽鎖結合を必要とする部位を含有する第1の重鎖定常領域（C H 1）を有する。免疫グロブリン重鎖融合をコード化するDNAは、望まれるなら、免疫グロブリン軽鎖は、別の発現ベクターに挿入され、適当な宿主生物に同時形質移入される。二重特異性抗体の生成のさらなる詳細のため、例えば、Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)を参照されたい。

【0184】

WO 96 / 27011において記載される別のアプローチによると、抗体分子ペア間の干渉は、組換え細胞培養から回復させるヘテロダイマーの最大パーセンテージに設計され得る。好ましい干渉は、抗体定常ドメインのC H 3 領域の少なくとも一部を含む。最後に、第1の抗体分子の干渉由来の1またはそれ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）でとって代わられる。大きな側鎖と同一または類似の側鎖の代償性「穴」は、より小さなものの大きなアミノ酸側鎖を取って代わることにより第2の抗体分子の干渉で生成される。このことは、ホモダイマーのような他の望まれていない末端産物のヘテロダイマー分野を増大するメカニズムを提供する。

【0185】

二重特異性抗体は、全長抗体または抗体フラグメント（例えば、F (a b ') 2 二重特異性抗体）として調製され得る。抗体フラグメントから二重特異性抗体を生成する技術は、文献において記載されている。例えば、二重特異性抗体は、化学的な連鎖を用いて調製され得る。Brennan et al., *Science* 229:81 (1985)は、無処理抗体が、F (a b ') 2 フラグメントを生成するためにタンパク質分解性に切断され得る方法を記載する。これらのフラグメントは、ジチオール複合体試薬ナトリウム亜ヒ酸塩存在下において近接ジチオールを安定化、分子間ジスルフィド形成を防ぐために置換される。生成されたF a b ' フラグメントは、チオニトロベンゾエイト（thionitrobenzoate）（T N B）誘導体にそのとき変換される。F a b ' - T N B 誘導体の1つは、そのときF a b ' - チオールにメルカプトエチルアミンとの置換により再変換され、二重特異性抗体を形成するために他のF a b ' - T N B 誘導体の等モル量と混合される。産生された二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化のための試薬として用いられ得る。

【0186】

加えて、F a b ' フラグメントは、E. coli から直接的に回復され、二重特異性抗体を形成するために化学的にカップリングされ得る。Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175:217225 (1992)は、完全にヒト化二重特異性抗体F (a b ') 2 分子産物を記載する。それぞれのF a b ' フラグメントは、E. coli から別々に分泌され、二重特異性抗体を形成するためにインビトロでの直接化学カップリングの対象とされた。従って、形成された二重特異性抗体は、E r b B 2 受容体を過剰発現する細胞、および正常ヒトT細胞、ならびにヒト乳癌標的に対するヒト細胞障害性リンパ球の細胞溶解性活性のトリガーに結合可能であった。

【0187】

組換え細胞培養に直接由来する二重特異性抗体フラグメントを作り、単離するための様々な技術は、また記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを用いて産生され得る。Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5):15471553 (1992)を参照。F o s タンパク質およびJ u n タンパク質由来のロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合により2つの異なる抗体のF a b ' 部分に結合させた。抗体ホモダイマーを、モノマーを形成するためにヒンジ領域で還元し、抗体ヘテロダイマーを形成するために再び酸化した。Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:64446448 (1993)により記載される「ダイアボーイ」技術は、二重特異性抗体フラグメントを作る選択的メカニズムを提供した。フラグメントは、同一鎖の2つのドメイン間の対形成を可能とするには短いリンカーにより軽鎖可変領域（V L）に結合する重鎖可変ドメイン（V H）を含む。代わりに、1つのフラグメントのV HドメインおよびV Lドメインは、別のフラグメントの相補的なV L

ドメインおよびVHドメインを有する対に強制され、それにより、2つの後援結合部位を形成する。一本鎖Fv(sFv)ダイマーの使用による二重特異性抗体フラグメントを作る別のストラテジーも、報告されている。Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994)を参照されたい。

【0188】

2より多い結合価を有する抗体が熟慮される。例えば、三重特異性抗体が、調製され得る。Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)を参照。

【0189】

例示的に二重特異性抗体は、少なくとも1つが本発明のタンパク質抗原に起源を有する、2つの異なるエピトープに結合することができる。また、免疫グロブリン分子の抗-抗原性アームは、T細胞受容体分子(例えば、CD2、CD3、CD28、またはB7)、FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)およびFcγRIII(CD16)のような特定の抗原を発現する細胞にたいする細胞の防御メカニズムに力をおくために白血球上の引き金を引く分子に結合するアームと結合されることができ、二重特異性抗体を用いて、細胞障害性試薬を特定の抗原を発現する細胞に直接作用させることができる。これらの抗体は、抗原結合アームおよび細胞障害性試薬またはEOTUBE、DPTA、DOTAまたはTETAのような放射性核種キレート剤を結合するアームを有する。当該別の二重特異性抗体は、本明細所において記載されるタンパク質抗原に結合し、組織因子(TF)にさらに結合する。

10

【0190】

ヘテロ結合抗体

ヘテロ結合抗体もまた、本発明の範囲内である。ヘテロ結合抗体は、2つの共有結合性に結合した抗体から構成される。かかる抗体は、例えば、望まれる細胞に対して免疫系細胞を標的するため(米国特許番号4,676,980)、およびHIV感染の処置のために(WO91/00360;WO92/200373;EP03089)提案される。抗体が、クロスリンクする試薬を含むそれらを含む、合成タンパク質化学反応において既知の方法を用いて調製され得る。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を用いて、チオエーテル結合の形成により構築され得る。この目的のための適切な試薬の実施例は、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチリミデートおよび例えば、米国特許番号4,676,980に開示されるものを含む。

20

30

【0191】

エフェクター機能操作

例えば、癌処置における抗体の有効性を増強するために、エフェクター機能に関する本発明のFGF-CX抗体をモディファイことは望ましい。例えば、システイン残基(s)は、Fc領域に挿入され、それにより、この領域での内部鎖のジスルフィド結合形成を可能とする。従って、生成されたホモダイマー抗体は、改善したインターナリゼーション能力および/または増大した相補的配列仲介の細胞死滅および抗体依存の細胞傷害(ADCC)を有することができる。Caron et al., J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992)およびShopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)を参照されたい。増強抗腫瘍活性を有するホモダイマー抗体はまた、Wolff et al. Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993)において記載される様にヘテロ二重特異性クロスリンカーを用いて調製され得る。または、抗体は、二重Fc領域を有するものを操作され、それにより、増強した相補的な分解およびADCC能力を有することができる。Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)を参照されたい。

40

【0192】

9. 免疫複合体

本発明は、化学療法物質、毒(例えば、細菌、真菌、植物、または動物起源の酵素的に活性な毒、またはそれらのフラグメント)、または放射性同位元素(すなわち、放射性複合体)の様な細胞傷害性物質に結合したFGF-CX抗体を含む免疫複合体に関する。

【0193】

50

そのような免疫複合体の生成に有用な化学療法物質を上述した。使用できる酵素的に活性化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性活性フラグメント、内毒素 A 鎖 (Pseudomonas aeruginosa由来)、リシン A 鎖、アピリン A 鎖、モデシン A 鎖、アルファサルシン、Aleurites fordiiタンパク質、ディアンティンタンパク質、Phytolaca americanaタンパク質 (P A P I、P A P I IおよびP A P - S)、momoridica charantia阻害剤、クルシン、クロチン、sapaonaria officinalisc阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、リストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシンおよびトリコテセンが挙げられる。種々の放射性核種を放射性複合抗体の生産に利用できる。例として、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Yおよび¹⁸⁶Reを挙げ得る。

【0194】

抗体と細胞障害性薬剤との複合体を、N-サクシンイミジル-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 (IT)、イミドエステルの2機能性誘導体 (ジメチルアジピミデートHCLのような)、活性エステル (ジサクシンイミジルスベレートのような)、アルデヒド (グルタルアルデヒドのような)、ビスアジド誘導体 (ビス-(p-アジドベンゾイル)-ヘキサンジアミンのような)、ビスジアゾニウム誘導体 (ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンのような)、ジイソシアネート (トリエン2,6-ジイソシアネートのような)、およびビス活性フッ素化合物 (1,5-ジフルオロ2,4-ジニトロベンゼンのような)のような種々の2機能性タンパク質カップリング剤を用いて作る。例えば、リシン免疫毒素を、Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987)に記載のように調製することができる。炭素14で標識した1-イソチオシアナートベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸 (MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドを抗体に結合するための典型的なキレート剤である。WO 94/11026を参照されたい。

【0195】

もう一つの実施態様では、抗体を、腫瘍をプレターゲットイングのための「受容体」(ストレプトアビジンのような)に結合することができて、そこでは抗体-受容体複合体を患者に投与し、引き続いて未結合の複合体を除去剤を用いて血液循環から除去し、次いで今度は細胞障害性薬剤に複合した「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

【0196】

10. 免疫リポソーム
本明細書において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。抗体を含有するリポソームは、Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); および米国特許番号4,485,045および4,544,545に記載されるような、当分野において既知の方法により調製される。増大した循環時間を有するリポソームは、米国特許番号5,013,556において開示される。

【0197】

特に有用なリポソームリポソームを、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て逆相蒸発法により生成し得る。リポソームリポソームを定められた孔径のフィルターを通して押し出して、所望の直径のリポソームリポソームを得る。本発明の抗体のFab'フラグメントを、Martin et al., 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リポソームに結合し得る。化学療法剤 (ドキシソルピシンのような)を任意にリポソーム内に含有する。Gabizon et al., J. National Cancer Inst., 81(19): 1484 (1989)を参照されたい。

【0198】

11. 本発明のタンパク質に対して指向した抗体の診断応用
本発明のFGF-CXタンパク質に対して指向した抗体を、タンパク質の局在および/または定量 (例えば、適切な生理的試料中のタンパク質レベルの測定における使用、診断法における使用、タンパク質のイメージングにおける使用等)に関する当分野内において公

10

20

30

40

50

知の方法で使用し得る。ある一定の実施態様では、タンパク質またはその誘導体、フラグメント、類似体、または相同体に対する抗原結合ドメインを含有する抗体を、薬理的に活性な化合物として利用する（下記を参照）。

【0199】

本発明のFGF-CXタンパク質に対して特異的な抗体を、イムノアフィニティークロマトグラフィーまたは免疫沈降のような標準的な技術により、タンパク質を単離するために使用し得る。そのような抗体を、細胞由来の天然タンパク質および宿主細胞で発現する組換え的に生産した抗原の精製を容易にし得る。さらに、そのような抗体を使用して、抗原タンパク質の存在量またはパターンを評価するために抗原タンパク質（例えば、細胞溶解物または細胞上清中の）を検出することができる。FGF-CXタンパク質に対して指向した抗体を診断的に使用して、例えば、与えられた処置法の有効性を測定するために臨床検査の手順の一環として組織中のタンパク質レベルをモニターすることができる。抗体を検出可能な物質にカップリング（即ち物理的に連結）することにより、検出を促進し得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、配合群、蛍光物質、発光物質、生物発光物質および放射性物質を挙げる。適当な酵素の例としては、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼおよびアセチルコリンエステラーゼを挙げ得る；適当な配合群の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンを挙げ得る；適当な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレッセイン、フルオレッセインイソチオシアナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレッセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリスリンを挙げ得る；発光物質の例としては、ルミノールを挙げ得る；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を挙げるし、適当な放射性物質の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H を挙げ得る。

10

20

【0200】

12. 抗体療法

ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化および完全なヒト化抗体を含む本発明のFGF-CX抗体は、治療物質として用いられ得る。かかる物質は、一般に、対象の疾病または病態を処置または予防するために使用される。抗体調合物、好ましくは標的抗原に対する高特異性および高親和性を有する抗体調合物は、対象に投与され、標的との結合に起因する作用を一般に有する。かかる作用は、2種のうちの1つであり、与えられる抗体分子と当該標的抗原との相互作用の特異的性質に依存する。第1の場合、抗体の投与は、標的が本来結合する内在性リガンドとの標的の結合を抑制または阻害し得る。この場合、抗体は標的に結合し、リガンドがエフェクター分子として働く、天然に存在するリガンドの結合部位を覆う。従って、受容体は、リガンドが責任を負うシグナル伝達経路を仲介する。

30

【0201】

または、作用は、抗体が標的分子上のエフェクター結合部位への結合である長所による生理的結果を誘発するものであり得る。この場合の標的において、疾病または病態において存在しないか、または不完全であり得る内在性リガンドを有する受容体は、代替のエフェクターリガンドとして抗体を結合し、受容体に基づくシグナル伝達事象を開始する。

【0202】

本発明の抗体の治療的に有効な量は、一般に治療目的を達成するのに必要とされる量に關与する。上述のように、このことは抗体とその標的抗原との結合相互作用であり得、ある場合においては標的の機能との干渉、そして他の場合においては生理的応答を促進し得る。投与に必要な量は、その特異的抗原に対する抗体の結合親和性にさらに依存し、投与される抗体が投与される他の対象において遊離の量から使い果た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的に有効な投与量の通常範囲は、限定されない例として、体重あたり約0.1mg/kg～約50mg/kgであり得る。通常範囲の投与回数は、例えば、1日2回から1週間に1回の範囲である。

40

【0203】

13. 抗体の医薬組成物

50

本発明の F G F - C X タンパク質を免疫特異的に結合する抗体、ならびに本明細書において開示されるスクリーニングアッセイにより同定される他の分子は、医薬組成物の形で様々な疾患を処置するために投与され得る。かかる組成物の調製に關与する原理および考慮事項、ならびに成分の選択の指針は、例えば、Remington : The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa. : 1995; Drug Absorption Enhancement : Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; および Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New Yorkにおいて提供される。

【 0 2 0 4 】

抗原性タンパク質が細胞内にあり、かつ全抗体が阻害剤として用いられると、内部移行抗体が好ましい。しかしながら、リポソームを用いて、抗体、または抗体フラグメントを細胞内に輸送することができる。抗体フラグメントが用いられる場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小の阻害剤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、ペプチド分子が標的タンパク質配列を結合する能力を保持するようにデザインされ得る。かかるペプチドは、化学的に合成されるか、および/または、組換え D N A 技術により産生されることができる。例えば、Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)を参照されたい。本明細書における製剤は、処置される特定の徴候に必要である 1 より多い活性化化合物、好ましくは、互いに逆に作用しない相補的活性を有するものを含有できる。代わりに、または加えて、組成物は、例えば細胞障害性物質、サイトカイン、化学療法剤、または成長阻害物質のような機能を増強する物質を含むことができる。かかる分子は、意図される目的のために作用する量の組合せにおいて適切に存在する。

【 0 2 0 5 】

活性成分はまた、例えば、コアセルベーション技術または界面重合により調製されるマイクロカプセル、例えば、ハイ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 - (メチルメタクリル酸塩) マイクロカプセルにより、それぞれ、コロイド薬輸送システム (例えば、リポソーム、アルブミン微粒子、ミクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル)、またはマクロエマルジョン中に封入され得る。

【 0 2 0 6 】

インピボ投与に用いられるべき製剤は無菌でなければならない。このことは、無菌ろ過膜を介するろ過により容易に成し遂げられる。

【 0 2 0 7 】

F G F - C X 組換え発現ベクターおよび宿主細胞

本発明に別の態様は、ベクター、好ましくは、F G F - C X タンパク質、誘導體、フラグメント、類似体、またはそれらの相同体をコード化する核酸を含有する発現ベクターに関する。本明細書において使用する、用語「ベクター」は、それが結合した別の核酸を輸送する能力のある核酸分子に言及する。ベクターの 1 つのタイプは、別の D N A セグメントが結合され得る環状二本鎖 D N A ループに言及する「プラスミド」である。ベクターの別のタイプは、ウイルスベクターであり、別の D N A セグメントは、ウイルスゲノムに結合され得る。あるベクター (例えば、細菌の複製開始点を有する細菌ベクターおよびエピゾームの哺乳類ベクター) は、そらが導入される宿主細胞において自立増殖できる。他のベクター (例えば、非エピゾーム哺乳類ベクター) は、宿主細胞への導入において宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより、宿主ゲノムと共に複製される。さらに、あるベクターは、作用可能に結合するゲノムの発現に指示することができる。かかるベクターは、本明細書において「発現ベクター」として言及される。一般に、組換え D N A 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である。本発明の明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドはベクターの最も普通に用いられる形であるので、交互に用いられることができる。しかしながら、本発明は、等しい機能を有するウイルスベクター (例えば、複製能を欠いたレトロウイルス、アデノウイルスおよびア

10

20

30

40

50

デノ随伴ウイルス)のような、発現ベクターの他の形を含むことを意図する。

【0208】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸発現に適当な形で本発明の核酸を含み、このことは、組換え発現ベクターが、発現のために用いられる宿主細胞に基づき選択される1またはそれ以上の制御配列、発現されるべき核酸配列に作用可能に結合することを意味する。組換え発現ベクター内で、「作用可能に結合する」は、該ヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を可能とする哺乳動物において(例えば、インビトロの転写システム/翻訳システムにおいて、またはベクターが宿主細胞に導入される宿主細胞において)制御配列に結合することを意味することを意図する。用語「制御配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現調節エレメント(例えば、ポリアデニル化シグナル)を含むことを意図する。かかる制御配列は、例えば、Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)において記載される。制御配列は、宿主細胞の多くのタイプでのヌクレオチド配列の構成的発現に指示するもの、およびある宿主細胞でのヌクレオチドの発現に指示するもの(例えば、組織特異的制御配列)を含む。発現ベクターのデザインが形質転換されるべき宿主細胞の選択、望まれるタンパク質の発現のレベル等のような因子に依存し得ることは、当業者により理解される。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、本明細書において記載される核酸によりコード化される融合タンパク質または融合ペプチドを含む、タンパク質またはペプチド(例えば、FGF-CXタンパク質、FGF-CXの成熟型、融合タンパク質等)を産生することができる。

10

20

【0209】

本発明の組換え発現ベクターは、原核細胞または真核細胞におけるFGF-CXの発現のためにデザインされる得る。例えば、FGF-CXは、E.coliのような細菌細胞、昆虫細胞(バキュロウイルス発現ベクターを使用する)、酵母細胞、または哺乳類細胞において発現され得る。適当な宿主細胞は、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)においてさらに記載される。または、組換え発現ベクターは、インビトロにおいて、例えば、T7プロモーター制御配列およびT7ポリメラーゼを用いて、転写および翻訳され得る。

【0210】

真核細胞でのタンパク質の発現は、融合または非融合タンパク質のいずれかの発現に指示する構成的または誘導性プロモーターを含有するベクターを有するE.coliにおいて、しばしば実行される。融合ベクターは、多くのアミノ酸を、それらにコード化されるタンパク質、普通は組換えタンパク質のアミノ末端に加える。かかる融合ベクターは、3つの目的:(1)組換えタンパク質の発現を増加するため;(2)組換えタンパク質の溶解性を増加するため;および(3)アフィニティー精製でのリガンドとして作用することにより組換えタンパク質の溶解性を増加するために、典型的に役立つ。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解性の切断部位が、融合部分と組換えタンパク質との結合で導入され、融合部分からの組換えタンパク質の分離、引き続いて、融合タンパク質の精製を可能とする。かかる酵素、およびそれらの同族認識配列は、Xa因子、トロンピンおよびエンテロキナーゼを含む。典型的な融合発現ベクターは、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、またはタンパク質Aをそれぞれ標的組換えタンパク質に融合するpGEC(Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson (1988) Gene 67:3140)、pMAL(New England Biolabs, Beverly, Mass.)およびpRIT5(Pharmacia, Piscataway, N.J.)を含む。

30

40

【0211】

適当な誘導性非融合E.coli発現ベクターの実施例は、pTrc(Amrann et al., (1988) Gene 69:301315)およびpET11d(Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 6089)を含む。

【0212】

50

E.coliでの組換えタンパク質発現を最大にする1つの戦略は、組換えタンパク質をタンパク質分解性に切断する障害能力を有する宿主細菌でのタンパク質を発現することである。Gottesman, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119128を参照されたい。別の戦略は、それぞれのアミノ酸の個々のコドンがE.coliで優先的に利用されるものであるように、発現ベクターに挿入されるべき核酸の核酸配列を変えることである(Wada et al., (1992) Nucleic Acids Res. 20:21112118)。本発明の核酸配列のかかる変化は、標準DNA合成技術により実行されることができる。

【0213】

別の実施態様において、FGF-CX発現ベクターは酵母発現ベクターである。酵母*S. cerevisiae*での発現のためのベクターの実施例は、pYepSec1 (Baldari, et al., (1987) EMBO J 6:229234)、pMFA (Kurjan and Herskowitz, (1982) Cell 30:933943)、pJRY88 (Schultz et al., (1987) Gene 54:113123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.)、およびpicZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.)を含む。

【0214】

代わりに、FGF-CXは、バキュロウイルス発現ベクターを用いる昆虫細胞において発現され得る。培養昆虫細胞(例えば、SF9細胞)でのタンパク質発現に利用可能なバキュロウイルスベクターは、pAcシリーズ (Smith et al. (1983) Mol Cell Biol 3:21562165) およびpVLシリーズ (Lucklow and Summers (1989) Virology 170:3139)を含む。

【0215】

なお別の実施態様において、本発明の核酸は、哺乳類発現ベクターを用いる哺乳類細胞において発現する。哺乳類発現ベクターの実施例は、pCDM8 ((1987) Nature 329:840を参照) およびpMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J 6:187195)を含む。哺乳類細胞において用いられると、発現ベクターの調節機能は、ウイルス制御エレメントによりしばしば提供される。例えば、普通に用いら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由来である。原核細胞および真核細胞の両方に適当な他の発現システムについては、例えば、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を参照されたい。

【0216】

別の実施態様において、組換え哺乳類発現ベクターは、特定の細胞タイプにおいて核酸の発現を優先的に指示する能力がある(例えば、組織特異的制御エレメントを用いて、核酸を発現する)。組織特異的制御エレメントは、当分野において既知である。適当な組織特異的プロモーターの制限されない実施例は、アルブミンプロモーター(肝臓特異的; Pinkert et al. (1987) Genes Dev 1:268277)、リンパ系特異的プロモーター (Calame and Eaton (1988) Adv Immunol 43:235275)、特にT細胞受容体のプロモーター (Winoto and Baltimore (1989) EMBO J 8:729733) および免疫グロブリンのプロモーター (Banerji et al. (1983) Cell 33:729740; Queen and Baltimore (1983) Cell 33:741748)、神経細胞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 and Ruddle (1989) PNAS 86:54735477)、膵臓特異的プロモーター (Edlund et al. (1985) Science 230:912916)、および乳腺特異的プロモーター(例えば、乳清プロモーター; 米国特許番号4,873,316およびヨーロッパ出願公開番号264,166)を含む。発生的に制御されるプロモーターは、例えば、マウス*hox*プロモーター (Kessel and Gruss (1990) Science 249:374379) および -フェトタンパク質プロモーター (Campes and Tilghman (1989) Genes Dev 3:537546) を包含する。

【0217】

本発明はさらに、発現ベクターの中にアンチセンスの配向でクローン化した本発明のDNA

A分子を含む組換え発現ベクターを提供する。即ち、DNA分子は、脳RNAに対してアンチセンスであるRNA分子の発現(DNA分子の転写による)を可能にするような様式で、調節配列に機能し得るように結合する。種々の細胞タイプ中のアンチセンスRNA分子の連続的発現を指示するアンチセンスの配向にクローン化した核酸に機能し得るように結合した調節配列、例えば、ウイルスのプロモーターおよび/またはエンハンサーを選択することができるか、またはアンチセンスRNAの組織特異的または細胞タイプ特異的な構成的発現を指示する調節配列を選択することができる。アンチセンス発現ベクターは、ベクターを導入した細胞タイプにより活性を決定する高効率調節領域の制御下で、アンチセンス核酸を生産する組換えプラスミド、ファージミドまたは弱毒化ウイルスの形であり得る。アンチセンス遺伝子を用いた遺伝子発現の調節の考察については、Weintraub, et al., 「Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis」 Reviews-Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986を参照されたい。 10

【0218】

本発明のもう一つの態様は、本発明の組換え発現ベクターを導入する宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」を、本明細書においては互換的に使用する。そのような用語は、特定の対象の細胞のみならずそのような細胞の子孫または潜在的子孫をまた指すことを理解する。突然変異または環境の影響により後の世代に特定の修飾が生じるかもしれないため、そのような子孫は、実際には親細胞と同一ではないかもしれないが、本明細書において使用する用語の範囲内になお含まれる。

【0219】

宿主細胞は任意の原核細胞または真核細胞であり得る。例えば、FGF-CXタンパク質を、E. coliのような細菌細胞、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)またはCOS細胞)のような細菌の細胞中で発現することができる。他の適当な宿主細胞は当業者に周知である。 20

【0220】

ベクターDNAを、従来の形質転換または形質移入技術により原核細胞または真核の細胞の中に導入することができる。本明細書において使用する用語「形質転換」および「形質移入」とは、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈、DEAE-デキストラン仲介性形質移入、リポフェクション、またはエレクトロポレーションを含む外来の核酸(例えばDNA)を宿主細胞に導入するために当分野で認める種々の技術を指すものとする。宿主細胞を形質転換または形質移入するための適当な方法は、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., 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すことができる。 30

【0221】

哺乳動物細胞の安定的な形質移入については、使用される発現ベクターおよび形質移入の技法に依存して、細胞のごく少数のフラクションが外来性DNAをそのゲノムの中に組み込み得る。これらの組み込み体を同定し選択するために、選択可能なマーカー(例えば、抗生物質に対する抵抗性)が一般的に、興味のある遺伝子と一緒に宿主細胞に導入される。種々の選択可能なマーカーとしては、G418, ハイグロマイシンおよびメトトレキサートのような薬剤に抵抗性を与えるものが挙げられる。選択可能なマーカーをコードする核酸を、FGF-CXをコードするものと同じのベクター上で宿主細胞に導入することができるか、または別のベクター上で導入することもできる。導入された核酸で安定に形質移入された細胞は、薬剤選択により同定されることができる(例えば、選択可能なマーカーを組み込んでいる細胞は生き残る一方で、他の細胞は死ぬ)。 40

【0222】

培地中の原核細胞または真核細胞のような本発明の宿主細胞を用いて、FGF-CXタンパク質を生産する(即ち、発現する)ことができる。したがって、本発明は、本発明の宿主細胞を用いるFGF-CXタンパク質の生産方法をさらに提供する。一つの実施態様では、その方法は、本発明の宿主細胞(その中にFGF-CXタンパク質をコードする組換 50

え発現ベクターを導入する)を、F G F - C Xタンパク質を生産するような適当な培地中で培養することを含む。もう一つの実施態様では、その方法は、培地または宿主細胞からF G F - C Xタンパク質を単離することをさらに含む。

【0223】

トランスジェニック動物

本発明の宿主細胞をまた使用して、非ヒトトランスジェニック動物を生産し得る。例えば、一つの実施態様では、本発明の宿主細胞は、その中にF G F - C Xタンパク質コード化配列を導入する受精卵母細胞または胚性幹細胞である。次いで、そのような宿主細胞を使用して、その中で外来性のF G F - C X配列をゲノムの中に導入する非ヒトトランスジェニック動物、またはその中で内在性のF G F - C X配列を変更する相同な組換え動物を創成することができる。そのような動物は、F G F - C Xの機能および/または活性の研究にならびにF G F - C Xタンパク質活性のモジュレーターの同定および/または評価に有用である。本明細書において使用する「トランスジェニック動物」とは、その中で動物の一つまたはそれ以上の細胞が導入遺伝子を含む非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはラットまたはマウスのようなげっ歯類である。トランスジェニック動物の他の例としては、ヒト以外の霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両棲類等を挙げ得る。導入遺伝子は、それからトランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムの中に取り込まれ、そして成熟動物のゲノム内に残存して、それによりトランスジェニック動物の一つまたはそれ以上の細胞タイプまたは組織中におけるコード化遺伝子産物の発現を指令する外来性DNAである。本明細書において使用する「相同の組換え動物」とは、その中で内在性F G F - C X遺伝子が内在性遺伝子および、動物の細胞、例えば、動物の胚細胞の中に動物の発生前に導入された外来性DNA分子との間で相同組換えにより変更した非ヒト動物、好ましくは哺乳類、さらに好ましくはマウスである。

【0224】

本発明のトランスジェニック動物は、F G F - C Xをコードする核酸を受精卵母細胞の雄性前核の中に、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り導入して、卵母細胞を偽妊娠雌性仮親動物の体内で発生することを可能にすることにより、創成することができる。配列番号：1のF G F - C X DNA配列を、非ヒト動物のゲノム内に導入遺伝子として導入することができる。これに代えて、マウスF G F - C X遺伝子のようなヒトF G F - C X遺伝子の非ヒト相同体を、ヒトF G F - C XのcDNAとのハイブリダイゼーション(上にさらに詳述)に基づいて単離して、導入遺伝子として使用し得る。イントロン配列およびポリアデニル化シグナルもまた、導入遺伝子の発現効率を増加するために導入遺伝子中に含み得る。組織特異的調節配列をF G F - C X導入遺伝子に機能し得るように結合して、特定の細胞にF G F - C Xタンパク質の発現を指示し得る。胚の操作およびマイクロインジェクションによる、トランスジェニック動物、特にマウスのような動物の作成方法は当分野において従来的となっており、例えば、米国特許番号4,736,866; 4,870,009; および4,873,191;ならびにHogan, 1986. In: MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.に記載されている。類似の方法を他のトランスジェニック動物の生産に用い得る。初代トランスジェニック動物を、ゲノム内のF G F - C X導入遺伝子の存在および/または動物の組織または細胞中におけるF G F - C X mRNAの発現に基づいて、同定し得る。次いで、初代トランスジェニック動物を、導入遺伝子を保持する追加的動物の繁殖に使用し得る。さらに、F G F - C Xをコードする導入遺伝子を保持するトランスジェニック動物を使用して、他の導入遺伝子を保持するさらに別なトランスジェニック動物を繁殖し得る。

【0225】

相同の組換え動物を創成するために、その中に欠失、付加または置換を導入して、それによりF G F - C X遺伝子を変化させる例えば機能的に破壊するあるF G F - C X遺伝子の少なくとも一部を含有するベクターを調製する。F G F - C X遺伝子は、ヒト遺伝子(例えば配列番号：1)であり得るが、さらに好ましくはヒトF G F - C X遺伝子の非ヒ

10

20

30

40

50

ト相同体である。例えば、配列番号：1のヒトFGF-CX遺伝子のマウス相同体を使用して、マウスゲノム中の内在性FGF-CX遺伝子を変更するのに適する相同組換えベクターを構築することができる。一つの実施態様では、ベクターを、相同組換えにより、内在性遺伝子を機能的に破壊する（即ち、もはや機能的なタンパク質をコードしない；「ノックアウト」ベクターとも呼称する）ようにデザインする。

【0226】

これに代えて、ベクターは、相同組換えにより内在性FGF-CX遺伝子を変異するかまたは他のように変更するが、依然機能性タンパク質をコードする（例えば、上流の調節領域を変更してそれにより内在性FGF-CXタンパク質の発現を変更する）ようにデザインし得る。相同組換えベクターでは、FGF-CX遺伝子の変更したタンパク質は、FGF-CX遺伝子のさらに別な核酸により5'末端または3'末端に隣接して、ベクターにより保持する外来性FGF-CX遺伝子および胚性幹細胞中の内在性FGF-CX遺伝子の間で相同組換えが起こることを可能にする。さらに別な隣接FGF-CX核酸は、内在性遺伝子と成功裏に相同組換えが起きるように十分な長さを持つ。典型的には、数千塩基の隣接DNA（5'末端および3'末端の両方とも）をベクターに含み得る。相同組換えベクターの記載については、例えば、Thomas, et al., (1987). Cell 51: 503を参照されたい。次いで、ベクターを胚性幹細胞株に（例えば、エレクトロポレーションにより）導入し、そしてその中で導入したFGF-CX遺伝子を内在性FGF-CX遺伝子と相同的に組み換えた細胞を選択する（例えば、Li, et al., (1992). Cell 69: 915を参照）。

【0227】

次いで、選択した細胞を動物（例えば、マウス）の胚盤胞の中に注入して、凝集キメラを形成する。例えば、Bradley, 1987. In: TERATOCARCINOMAS AND EMBRYONIC STEM CELLS: A PRACTICAL APPROACH, Robertson, ed. IRL, Oxford, pp. 113-152を参照されたい。次いで、キメラ胚を適当な偽妊娠雌性仮親動物に植え込んで、胚を満期出産する。生殖細胞内に相同組換えしたDNAを保持している子孫を用いて、その中で動物の全ての細胞が、導入遺伝子の生殖系列を介した伝達により相同組換えDNAを含有する動物を繁殖させることができる。相同組換えベクターおよび相同組換え動物を構築する方法は、Bradley, (1991). Curr. Opin. Biotechnol. 2: 823-829; PCT国際公開第：WO90/11354号；WO91/01140号；WO92/0968号；およびWO93/04169号にさらに記載される。

【0228】

もう一つの実施態様では、導入遺伝子の調節発現を可能にする選択したシステムを含有する非ヒトトランスジェニック動物を生産し得る。そのようなシステムの一つの例は、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼシステムである。cre/loxPリコンビナーゼシステムの記載については、例えば、Lakso, et al., (1992). PNAS 89: 6232-6236を参照されたい。リコンビナーゼシステムのもう一つの例は、Saccharomyces cerevisiaeのFLPリコンビナーゼシステムである。O'Gorman, et al., (1991). Science 251:1351-1355を参照されたい。もしcre/loxPリコンビナーゼシステムを用いて導入遺伝子の発現を調節するならば、Creリコンビナーゼおよび選択したタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含有する動物が必要となる。そのような動物は、例えば、一つは選択したタンパク質をコードする導入遺伝子を含有し、他はリコンビナーゼをコードする導入遺伝子を含有する二つのトランスジェニック動物を交配させることによる「ダブル」トランスジェニック動物の構築により提供し得る。

【0229】

本明細書に説明した非ヒトトランスジェニック動物のクローンはまた、Wilmut, et al., (1997). Nature 385: 810-813. In brief, a cell, e.g., a somatic cellに記載された方法にしたがって生産することができる。略述すれば、トランスジェニック動物から細胞（例えば体細胞）を単離し、誘導して、増殖サイクルから抜け出てG₀期に入ることができる。次いで、静止細胞を、例えば、電気パルスの使用により静止細胞を単離したのと同じ種類の動物由来の脱核した卵母細胞と融合することができる。次いで、再構成した卵母

10

20

30

40

50

細胞を、それを桑実胚または胚盤胞にまで発生させて、次いで擬妊娠雌性仮親動物に導入するように培養する。この雌性仮親動物から生まれた子孫は、細胞、例えば、体細胞を単離する動物のクローンである。

【0230】

医薬組成物

本発明のFGF-CX核酸分子、FGF-CXタンパク質、抗-FGF-CX抗体（本明細書では「活性化化合物」ともいう）、ならびにそれらの誘導体、フラグメント、類似体および相同体を投与に適する医薬組成物の中に組み込み得る。典型的に、そのような組成物は核酸分子、タンパク質または抗体およびおよび医薬的に許容され得る担体を含む。本明細書において使用する「医薬的に許容され得る担体」とは、医薬品投与に適合する任意のおよび全ての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌および抗かび剤、等張および吸収遅延剤等を含むことを意図する。適当な担体は、この分野で標準的な参照テキストであるRemingtonの薬剤学の最新版（出典明示により本明細書の一部とする）に記載されている。そのような担体または賦形剤の好ましい例としては、水、食塩水、ビンガー溶液、ブドウ糖溶液および5%ヒト血清アルブミンを挙げるが、それらに限定しない。リポソームおよび脂肪油のような非水溶性ビークルもまた使用する。薬学的に活性化物質のためのそのような媒体および薬剤は当分野において周知である。任意の従来媒体または薬剤が活性化化合物に適合しない限りでなければ、組成物内のそれらの使用を意図する。補助的な活性化化合物をまた、組成物の中に組み込み得る。

10

【0231】

本発明の医薬組成物を、その意図する投与経路に適合するように処方する。投与経路の例としては、非経口の、例えば、静脈の、皮内の、皮下の、経口の（吸入）、経皮の（局所）、経粘膜のおよび直腸の投与を挙げ得る。非経口の、皮内のまたは皮下の応用に使用する溶液または懸濁液としては、以下の成分を挙げることができる：注射用水のような無菌賦形剤、食塩水溶液、脂肪油、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；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンのような抗菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムのような抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸のようなキレート化剤；酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩のような緩衝剤、ならびに塩化ナトリウムまたはブドウ糖のような等張性を調整する薬剤。塩酸または水酸化ナトリウムのような酸または塩基を用いてpHを調整することができる。非経口性製剤を、ガラスまたはプラスチックで作るアンプル、使い捨て注射器、または多回使用バイアルの中に封入し得る。

20

30

【0232】

注射用に適する医薬組成物としては、無菌水溶液（水溶性である場合）または分散液および無菌注射用の溶液または分散液の必要に応じて調合する製剤用の無菌粉末を挙げ得る。静脈投与のためには、適当な担体としては、生理食塩水、静菌性水、Cremophor EL[登録商標]（BASF, Parsippany, N.J.）またはリン酸緩衝食塩水（PBS）を挙げ得る。全ての場合において、組成物は無菌でなければならず、容易に注射できる程度に流動性であるべきである。それは製造および保管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のような微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセリン、プロピレングリコールおよび液性ポリエチレングリコール等）ならびにそれらの適当な混合液を含有する溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性を、例えば、レシチンのようなコーティングの使用により、分散液の場合には必要な粒子径の維持により、および界面活性剤の使用により、保持し得る。微生物作用の保護は、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、チメロサル等、により達成される。多くの場合に、組成物中に、等張性薬剤、例えば、砂糖、マニトールのようなポリアルコール、ソルビトール、塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射用組成剤の吸収の延長は、組成物中に吸収を遅延する薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含むことによりもたらせ得る。

40

50

【0233】

無菌注射用溶液を、適切な溶媒の中に一つまたは上で列挙した成分の組合せと共に必要な量で活性化化合物（例えば、あるFGF-CXタンパク質または抗FGF-CX抗体）を組み込み、ついでる過滅菌を行なうことにより調製することができる。一般的に、分散液は、基本的な分散媒体および上で列挙したのものから必要な他の成分を含有する無菌ビークルの中に活性化化合物を組み込むことにより調製することができる。無菌注射用溶液の調製のための無菌粉末の場合には、調製方法は、活性成分の粉末プラス前もって無菌ろ過されたその溶液からの任意のさらに別の望ましい成分の粉末を生成する真空乾燥および凍結乾燥である。

【0234】

一般的に、経口の組成物は、不活性賦形剤または食用の担体を含む。それらをゼラチンカプセル中に封入するかまたは錠剤に打錠することができる。経口治療投与の目的には、活性化化合物を添加物と共に組込んで錠剤、トローチまたはカプセルの形状で使用することができる。経口の組成物をまた、うがい薬としての使用のために液体担体を用いて調製し得るが、ここでは液体担体中の化合物を経口的に塗布し、さっと取り除いて、吐き出すか飲み込む。薬学的に適合する結合剤、おおびノまたはアジュバント材料を組成物の一部として含み得る。錠剤、丸剤、カプセル、トローチ等は任意の以下の成分または同様な性質を持つ化合物を含有し得る：微結晶セルロース、トラガカントゴムまたはゼラチンのような結合剤；デンプンまたは乳糖のような添加剤、アルギン酸、プリモゲルまたはコーンスターチのような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムまたはステロートのような滑沢剤；コロイド状二酸化ケイ素のような滑り剤；ショ糖またはサッカリンのような甘味剤；またはハッカ、サルチル酸メチル、オレンジ香料のような着香剤。

【0235】

吸入による投与のためには、化合物を、適当な噴射剤、例えば二酸化炭素のようなガスを含有する加圧容器またはディスペンザー、またはネブライザーからエアゾールスプレイの形式で送達し得る。

【0236】

全身的投与はまた、経粘液または経皮手段により得る。経粘液または経皮投与のためには、透過すべきバリアーに適切な浸透剤を処方に使用する。そのような浸透剤は当分野において一般的に公知であり、そして、例えば、経粘液投与のためには、洗剤、胆汁酸塩、フシジン酸誘導体を挙げ得る。経粘液投与は鼻腔スプレーまたは坐剤の使用により達成され得る。経皮投与のためには、活性化化合物は、当分野において一般的に公知であるように、軟膏、軟膏剤、ゲルまたはクリームの中に処方される。

【0237】

化合物をまた、直腸送達のために坐薬（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の坐剤用基材と共に）または保持浣腸剤の形式で調製し得る。

【0238】

一つの実施態様において、活性化化合物を、インプラントおよびマイクロカプセル化送達システムを含む制御放出製剤のように、化合物を身体からの迅速な排泄から防止する担体と共に調製する。酢酸エチレンビニル、ポリ酸無水物、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酢酸のような、生物分解性で生体適合性のポリマーを使用し得る。そのような製剤を調製する方法は当業者に明らかである。材料はまた、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc.から市販で入手可能である。リボソームの懸濁液（モノクローナル抗体を持つ感染した細胞からウイルス抗体に至って標的化したりボソームを含む）をまた、医薬的に許容され得る担体として使用することができる。これらを、例えば米国特許番号4,522,811に記載のように、当業者に公知の方法に従い調製し得る。

【0239】

投与の容易さおよび投与量の均一性のために、経口性または非経口性の組成物を単位投与剤型で処方することが特に有益である。本明細書で使用する単位投与剤型とは、処置する

10

20

30

40

50

対象に対して単一の投与量として適する物理学的に分離した単位を指し；それぞれの単位は、必要な薬学的な担体と一緒に望ましい治療効果を生じるように計算した予め決められた量の活性化化合物を含有する。本発明の単位投与剤型の規格は、活性化化合物の特異な特色および達成すべき特別な治療効果により指示されかつ直接に依存する。

【0240】

本発明の核酸分子をベクターの中に挿入して遺伝子治療ベクターとして使用することができる。遺伝子治療ベクターを輸送して、例えば米国特許番号5,703,055に記載されるように多くの経路のいずれかによる対象とされ得る。従って、輸送はまた、例えば、静脈注射、局所投与により（米国特許番号5,328,470を参照）または走触性注射（例えば、Chen, et al., (1994). PNAS USA 91: 3054-3057を参照）を含む。遺伝子治療ベクターの医薬製剤は、許容される賦形剤の中に遺伝子治療ベクターを含むか、またはその中に遺伝子治療ベクターを埋め込んだ持続性マトリックスを含み得る。これに代えて、完全な遺伝子治療ベクターを組換え細胞、例えばレテロウイルスベクターから無傷で生産し得る場合には、医薬製剤は遺伝子送達システムを生産する一つまたはそれ以上の細胞を含み得る。

10

医薬製剤を、投与指示書と共に、容器、パックまたはディスペンサーの中に含み得る。

【0241】

本発明の使用および方法

本明細書において記載される核酸分子、タンパク質、タンパク質相同体、および抗体は、以下の方法の1つまたはそれ以上において用いられ得る：(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、法医学的生物学）；(c)予測医療（例えば、診断アッセイ、予測アッセイ、臨床試験のモニタリング、および薬理ゲノミクス）；および(d)処置方法（例えば、治療的および予防的）。本明細書において記載されるように、ある実施態様において、本発明のFGF-CXタンパク質はATPに結合する能力を有する。

20

【0242】

以下に詳述するように、本発明の単離核酸分子を使用して、FGF-CXタンパク質を発現し（例えば、遺伝子治療応用において宿主細胞中で組換え発現ベクターを介して）、FGF-CX mRNA（例えば、生物学的試料中の）またはFGF-CX遺伝子中の遺伝的欠損を検出し、そしてFGF-CX活性を調整することができる。加えて、FGF-CXタンパク質を用いて、FGF-CXの活性または発現を調整する薬または化合物をスクリーニングし、ならびに、例えば、増殖性疾患または分化性疾患のようなFGF-CXタンパク質の不十分なまたは過剰な生産、またはFGF-CXの野生型タンパク質と比較して低下または異常な活性を有するFGF-CXタンパク質型の生産を特徴とする疾患を処置し得る。加えて、本発明の抗FGF-CX抗体を使用して、FGF-CXタンパク質を検出しかつ単離し、そしてFGF-CX活性を調整し得る。

30

本発明はさらに、本明細書に説明するスクリーニングアッセイで同定する新規な薬剤および上述の処置のためのそれらの使用に関する。

【0243】

スクリーニングアッセイ

本発明は、モジュレーター、即ち、FGF-CXタンパク質に結合するか、または、例えばFGF-CXの発現またはFGF-CXの活性に促進的または阻害的作用を有する候補または試験化合物または薬剤（例えば、ペプチド、ペプチドミメティクス、低分子または他の薬）を同定する方法（本明細書では「スクリーニングアッセイ」とも呼称する）を提供する。

40

【0244】

一つの実施態様では、本発明は、膜結合型のあるFGF-CXタンパク質またはポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分の活性を調整する候補また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を、生物学的ライブラリー；空間的にアドレス参照可能な並列の固相または液相ライブラリー；デコンボリューション

50

を必要とする合成的ライブラリー方法；「1 ビーズ 1 化合物」ライブラリー方法；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方法：を含む、当分野において周知のコンビナトリアルライブラリーにおける数多くのアプローチのいずれを用いても得られる。生物学的ライブラリーのアプローチはペプチドライブラリーに限定される一方で、他の 4 種のアプローチはペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは化合物の低分子ライブラリーに適用可能である。例えば、Lam, 1997. *Anticancer Drug Design* 12: 145を参照されたい。

【0245】

分子ライブラリー合成方法の例を、例えば、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: 1 10
1422、Zuckermann, et al., (1994). *J. Med. Chem.* 37: 2678、Cho, et al., (1993). *Science* 261: 1303; Carrell, et al., (1994). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059、Carell, et al., (1994). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061、およびGallop, et al., (1994). *J. Med. Chem.* 37: 1233における当分野に見出し得る。

【0246】

化合物のライブラリーを、溶液中で(例えば、Houghten, (1992). *Biotechniques* 13: 412-421)、またはビーズ上で(Lam, (1991). *Nature* 354: 82-84)、チップ上で(Fodor, (1993) 20
)。 *Nature* 364: 555-556)、バクテリア(Ladner, 米国特許番号 5, 2 2 3, 4 0 9)、胞子(Ladner, 米国特許番号 5, 2 3 3, 4 0 9)、プラスミド(Cull, et al., (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-1869)上でまたはファージ上で(Scott and Smith, (1990) 20
)。 *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)で提供し得る。

【0247】

ある実施態様では、アッセイは細胞に基づくアッセイであり、そこでは膜結合型の F G F - C X 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に発現する細胞を試験化合物と接触させ、そして試験化合物がある F G F - C X タンパク質に結合する能力を測定する。細胞は、例えば、哺乳動物由来または酵母細胞であり得る。試験化合物が F G F - C X タンパク質に結合する能力を測定することは、例えば、試験化合物を放射性同位元素または酵素標識とカップリングして、F G F - C X タンパク質またはその生物学的に活性な 30
部分への試験化合物の結合を、複合物中の標識化合物を検出することにより測定できるようにする。例えば、試験化合物を、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴Cまたは³Hで直接的にまたは間接的に標識し、そして放射性同位元素を放射線放射の直接計数またはシンチレーション計数により検出する。これに代えて、試験化合物を、例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼにより酵素的に標識し、そして適切な基質の生産物への変換の測定により酵素標識を検出する。ある実施態様では、アッセイは、膜結合型の F G F - C X 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に発現する細胞を、F G F - C X に結合する既知の化合物と接触して、アッセイ混合物を形成して、アッセイ混合物を試験化合物と接触し、そして試験化合物がある F G F - C X タン 40
パク質と相互作用する能力を測定することを含むが、そこでは試験化合物がある F G F - C X タンパク質と相互作用する能力を測定することは、試験化合物が F G F - C X タンパク質またはその生物学的に活性な部分に、既知化合物と比較して優先的に結合する能力を測定することを含む。

【0248】

もう一つの実施態様では、アッセイは細胞に基づくアッセイであり、膜結合型の F G F - C X 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に発現する細胞を試験化合物と接触し、そして試験化合物が F G F - C X 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整する(例えば促進または阻害する)能力を測定することを含む。試験化合物が F G F - C X またはその生物学的に活性な部分の活性を調整する活性を測定することは、例えば、F G F - C X タンパク質がある F G F - C X の標的分子と結合するかまたは相 50

相互作用をする能力を測定することにより達成し得る。本明細書において使用する「標的分子」とは、自然界にある FGF - CX タンパク質が結合または相互作用する分子、例えば、ある FGF - CX と相互作用するタンパク質を発現する細胞表面の分子、2番目の細胞表面の分子、細胞外の環境中の分子、細胞膜の内側表面と会合している分子または細胞質の分子である。FGF - CX の標的分子は、非 FGF - CX 分子または本発明のある FGF - CX タンパク質またはポリペプチドであり得る。一つの実施態様では、ある FGF - CX の標的分子は、細胞外のシグナル（例えば、膜結合 FGF - CX 分子への化合物の結合により発生するシグナル）を細胞膜を通してかつ細胞内への伝達を促進する情報伝達経路の成分である。標的は、例えば、触媒活性を有する2番目の細胞内タンパク質または下流のシグナル分子と FGF - CX との会合を促進するタンパク質であり得る。

10

【0249】

FGF - CX タンパク質を、ある FGF - CX の標的分子と結合するかまたは相互作用をする能力を測定することは、直接的な結合を測定する上述の方法の一つにより達成し得る。一つの実施態様では、FGF - CX タンパク質がある FGF - CX の標的分子と結合または相互作用する能力を測定することは、標的分子の活性を測定することにより達成することができる。例えば、標的分子の活性を、標的の細胞性第二のメッセンジャー（即ち、細胞内 Ca^{2+} 、ジアシルグリセロール、 IP_3 等）の誘導を検出すること、適切な基質に対する標的の触媒/酵素活性を検出すること、受容体遺伝子（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機能し得るように結合した FGF - CX 応答性調節要素を含む）の誘導を検出すること、または細胞応答、例えば、細胞の生存、細胞

20

【0250】

なおもう一つの実施態様では、本発明のアッセイは無細胞アッセイであって、ある 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し、そして試験化合物が 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測定することを含む。FGF - CX タンパク質への試験化合物の結合を、上述のように、直接的または間接的のどちらかで測定することができる。一つのそのような実施態様では、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を FGF - CX と結合する既知の化合物と接触して、アッセイ混合物を形成すること、アッセイ混合物を試験化合物と接触すること、および試験化合物がある FGF - CX タンパク質と相互作用する能力を測定することを含むが、そこでは試験化合物がある FGF - CX タンパク質と相互作用する能力を測定することは、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に既知化合物と比較して優先的に結合する能力を測定することを含む。

30

【0251】

なおもう一つの実施態様では、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タンパク質を試験化合物と接触し、そして試験化合物が FGF - CX タンパク質またはその生物学的に活性なタンパク質の活性を調整する（例えば促進または阻害する）能力を測定することを含む無細胞アッセイである。FGF - CX の活性を調整する試験化合物の能力を測定することは、例えば、FGF - CX タンパク質がある FGF - CX の標的分子に結合する活性を直接な結合を測定するために上述した方法の一つにより達成することができる。さらに別の実施態様では、試験化合物が FGF - CX タンパク質の活性を調節する能力を測定することは、FGF - CX タンパク質がさらにある FGF - CX の標的分子を調整する能力を測定することにより達成することができる。例えば、適切な基質に対する標的分子の触媒/酵素活性を上述のように測定することができる。

40

【0252】

なおもう一つの実施態様では、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を FGF - CX タンパク質と結合する既知の化合物と接触して、アッセイ混合物を形成すること、アッセイ混合物を試験化合物と接触すること、そして試験化合物が FGF - CX タンパク質と相互作用する能力を測定することを含むが、そこでは試験化合物がある FGF - CX タンパク質と相互作用する能力を測定することは、FGF -

50

C Xタンパク質があるFGF - C Xの標的分子に優先的に結合するかまたはその活性を調整する能力を測定することを含む。

【0253】

本発明の無細胞アッセイは、可溶性型または膜結合型のFGF - C Xタンパク質の両方に使用することができる。膜結合型のFGF - C Xタンパク質を含む無細胞アッセイの場合には、膜結合型のFGF - C Xタンパク質を溶液中に維持するように、可溶化剤を利用するのが望ましい。そのような可溶化剤の例としては、n - オクチルグルコシド、n - ドデシルグルコシド、n - ドデシルマルトシド、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]、イソトリデシポリ(エチレングリコールエーテル)_nのような非イオン性界面活性剤、N - ドデシル - N,N - ジメチル - アンモニオ - 1 - プロパンスルホネート、3 - (3 - クロルアミドプロピル)ジメチルアミノール - 1 - プロパンスルホネート(CHAPS)、または3 - (3 - クロルアミドプロピル)ジメチルアミノール - 2ヒドロキシ - 1 - プロパンスルホネート(CHAPSO)を挙げ得る。

10

【0254】

本発明の上記のアッセイ法の二つ以上の実施態様において、FGF - C Xタンパク質またはその標的分子を固相化して、一つまたは両方のタンパク質の非複合型から複合型の分離を容易にし、ならびにアッセイの自動化に適合することができる。試験化合物のFGF - C Xタンパク質への結合、または候補化合物存在下および非存在下でのFGF - C Xタンパク質と標的分子との相互作用は、反応物質を含有するのに適する任意の容器において達成することができる。そのような容器の例としては、マイクロタイタープレート、試験管、およびマイクロ遠心チューブを挙げ得る。一つの実施態様では、一つまたは両方のタンパク質を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を提供し得る。例えば、GST - FGF - C X融合タンパク質またはGST - 標的融合タンパク質をグルタチオンセファローズビーズ(Sigma Chemical, St. Louis, MO)またはグルタチオンで誘導体化したマイクロタイタープレート上に吸着し、これを次いで試験化合物、または試験化合物および非吸着標的タンパク質またはFGF - C Xタンパク質のどちらかと結合し、そして混合物を複合体形成を促進する条件下で(例えば、塩およびpHに関して生理的な条件で)インキュベートする。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレート穴を洗滌して、非結合成分を全て除去し、ビーズの場合にはマトリックスを固定化し、複合体を例えば上述のように、直接的にまたは間接的に測定する。これに代えて、複合体をマトリックスから解離し、そしてFGF - C Xタンパク質の結合または活性レベルを標準的技術を用いて測定することもできる。

20

30

【0255】

マトリックス上にタンパク質を固定化する他の技術をまた、本発明のスクリーニングアッセイに使用し得る。例えば、FGF - C Xタンパク質またはその標的分子のいずれかをピオチンおよびストレプトアビジンの結合を利用して固定化することができる。ピオチニル化FGF - C Xタンパク質または標的分子をピオチン - NHS(N - ヒドロキシ - サクシニミド)から当分野内で周知の技術(例えば、ピオチニル化キット、Pierce Chemicals, Rockford, Ill.)を用いて調製して、ストレプトアビジンをコーティングした96穴プレート(Pierce Chemical)の穴に固定化することができる。これに代えて、FGF - C Xタンパク質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タンパク質への結合を妨害しない抗体をプレートの穴に誘導体化して、非結合標的またはFGF - C Xタンパク質を抗体との結合により穴に捕捉することができる。そのような複合体を検出する方法としては、GST - 固定化複合体について上述したものに加えて、FGF - C Xタンパク質または標的分子と反応する抗体を用いる複合体の免疫検出、ならびにFGF - C Xタンパク質または標的分子に関連した酵素活性を検出することに依存する酵素結合アッセイを挙げ得る。

40

【0256】

50

もう一つの実施態様では、FGF-CXタンパク質発現のモジュレータを、細胞を候補化合物と接触し、細胞中のFGF-CX mRNAまたはタンパク質の発現を測定する方法で同定する。候補化合物の存在下でのFGF-CX mRNAまたはタンパク質の発現レベルを、候補化合物の非存在下でのFGF-CX mRNAまたはタンパク質の発現レベルと比較する。次いで、候補化合物を、この比較に基づいてFGF-CX mRNAまたはタンパク質のモジュレータとして同定し得る。例えば、FGF-CX mRNAまたはタンパク質の発現を候補化合物の存在下の方がその非存在下でよりも多い（即ち統計的に有意に多い）ときには、候補化合物を、FGF-CX mRNAまたはタンパク質発現の促進剤として同定する。これに代えて、FGF-CX mRNAまたはタンパク質の発現が候補化合物の存在下の方がその非存在下でよりも少ない（即ち統計的に有意に少ない）ときには、候補化合物を、FGF-CX mRNAまたはタンパク質発現の阻害剤として同定する。細胞中のFGF-CX mRNAまたはタンパク質の発現のレベルを、FGF-CX mRNAまたはタンパク質を検出するために本明細書で説明する方法により測定することができる。

10

【0257】

本発明のなもう一つの態様では、FGF-CXタンパク質は2ハイブリッドアッセイまたは3ハイブリッドアッセイ（例えば米国特許番号5,283,317、Zervos, 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、および Brent 第WO94/10300号を参照）における「ベイトタンパク質」として使用して、FGF-CXと結合または相互作用をしてFGF-CX活性を調整する他のタンパク質（「FGF-CX結合タンパク質」または「FGF-CX-bp」）を同定し得る。そのような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要素としてFGF-CXタンパク質によるシグナルの増幅に参与する。

20

【0258】

2ハイブリッドシステムは、分離可能なDNA結合および活性化ドメインより成る殆どの転写因子のモジュール構成的性質に基づく。略述すれば、アッセイには2つの異なるDNA構築物を利用する。1つの構築物においては、FGF-CXをコードする遺伝子を既知の転写因子（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する。他の構築物においては、未同定のタンパク質（「プレイ」または「試料」）をコードするDNA配列ライブラリー由来のDNAを、既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する。もし「ベイト」および「プレイ」タンパク質がインビボで相互作用してFGF-CX依存性複合体を形成することができれば、転写因子のDNA結合および活性化ドメインを近くに引き寄せ得る。この近接は、転写因子に応答性の転写調節部位に機能し得るように結合したレポーター遺伝子（例えば、LacZ）の転写を可能にする。レポーター遺伝子の発現を検出し、機能的転写因子を含有する細胞コロニーを単離し、そしてこれを用いてFGF-CX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得ることができる。

30

本発明はさらに前述のスクリーニングアッセイにより同定する新規薬剤および本明細書に説明する処置へのその使用に関する。

40

【0259】

検出アッセイ

本明細書で同定するcDNAの一部またはフラグメント（および対応する完全な遺伝子配列）をポリヌクレオチド試薬として種々の方式で使用することができる。例として、限定は無しに、これらの配列を：(i) 染色体上にそれぞれの遺伝子をマップし；かくして遺伝的疾患に関連した遺伝子領域を位置決定する；(ii) 微量の生物学的試料から個体を同定する（組織タイピング）；および(iii) 生物学的試料の法医学的同定を助けるために用い得る。

【0260】

本発明のFGF-CX配列をまた使用して、微量な生物学的試料から個体を同定し得る。

50

この技術では、個体のゲノムDNAを一つまたはそれ以上の制限酵素で消化して、サザンプロット上でプローブ結合し、同定用のユニークなバンドを生成する。本発明の配列は、RFLP(制限断片長多型、米国特許番号5,272,057に記載)のさらに別なDNAマーカーとして有用である。

【0261】

さらに、本発明の配列を使用して、個体のゲノムの選択した部分の実際の塩基ごとのDNA配列を測定するさらに別な技術を提供し得る。かくして、本明細書に説明したFGF-CX配列を用いて、配列の5'末端および3'末端から二つのPCRプライマーを調製し得る。次いで、これらのプライマーを用いて、個体のDNAを増幅し、引き続いてこれをシーケンシングし得る。

10

【0262】

それぞれの個体は、対立遺伝子の違いによるそのようなDNAの特徴的セットを有するため、この様式で調製した個体由来の対応するDNA配列のパネルは、特徴的個体の同定を提供し得る。本発明の配列を使用して、個体および組織由来のそのような同定配列を得ることができる。本発明のFGF-CX配列は、ヒトゲノムの部分を特徴的に表現する。対立遺伝子の変異は、これらの配列のコード化領域中にある程度起こり、そして非コード化領域中にはより大きな程度で起こる。個別のヒト間の対立遺伝子の変異は、500塩基に約1個の頻度で起こるとみつもられる。対立遺伝子変異の多くは、制限断片長多型(RFLP)を含む単一ヌクレオチド多型(SNP)に因る。

20

【0263】

本明細書に説明する配列のそれぞれを、個体由来のDNAを同定の目的で比較し得る標準として、ある程度、使用し得る。上述した様に配列番号：1の非コード化領域にはより多くの遺伝子多型が起こるため、個体を識別するにはより少ない配列が必要である。非コード化配列は、それぞれが100塩基の非コード化増幅配列を生じる多分10~1,000個のプライマーのパネルにより個体の明白な同定を無理なく提供し得る。もし予想するコード化配列を使用すれば、明白な個体の同定のためのさらに適切なプライマーの数は500~2,000である。

【0264】

予測医学

本発明はまた、診断アッセイ、予後アッセイ、薬理ゲノミクス、および臨床試験のモニタリングを予後的(予測的)目的で使用し、それにより個体を予防的に処置する、予測医学の分野に関する。したがって、本発明の1つの態様は、FGF-CXタンパク質および/または核酸の発現ならびにFGF-CX活性を生物学的試料(例えば、血液、血清、細胞、組織)との関連で測定して、それにより個体が異常なFGF-CXの発現または活性に関連した疾患または障害に罹患しているか、または障害を発症するリスクを有しているか否かを測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タンパク質、核酸の発現または活性に関連した障害を発症するリスクを有しているか否かを測定するための予後的(予測的)アッセイを提供する。例えば、あるFGF-CX遺伝子の突然変異を生物学的試料中でアッセイし得る。そのようなアッセイを、予後的または予測的に使用し、それによりFGF-CXタンパク質、核酸の発現または活性を特徴とするかまたはこれと関連する障害の発生に先立って個体を予防的に処置し得る。

30

40

【0265】

本発明のもう一つの態様は、個体におけるFGF-CXタンパク質、核酸発現または活性を測定し、それによりその個体にとって適切な治療的または予防的な薬剤を選択する方法(本明細書では「薬理ゲノミクス」と呼称する)を提供する。薬理ゲノミクスは、個体の遺伝子型に基づいた個体の治療的または予防的処置のための薬剤(例えば薬)の選択を可能にする(例えば、個体の遺伝子型を検査して、個体が特定の薬剤に応答する能力を測定する)。

【0266】

本発明のなおもう一つの態様は、薬剤(例えば、薬、化合物)が臨床試験においてFGF

50

- C X の発現または活性に与える影響をモニタリングすることに関する。
これらおよび他の薬剤については以下のセクションで詳細に説明する。

【0267】

診断アッセイ

線維芽細胞成長因子 FGF - 1 ないし FGF - 9 は、特定の成長因子受容体を輸送する細胞において細胞増殖を一般に促進する。FGF 成長促進の実施例は、手術後の眼球前部での線維芽細胞およびケラチノサイトのような上皮細胞を含む。細胞の増殖が機能する他の条件は、腫瘍、再狭窄、乾癬、デュピュイトレン拘縮、糖尿病合併症、カポジ肉腫および関節リウマチを含む。

【0268】

FGF - C X は、試料または組織中の対応する線維芽細胞成長因子受容体 C X (FGFRCX) を検出する本発明の方法において用いられる。方法は、細胞または組織を FGF - C X と接触させること、受容体 - リガンド対の形成を可能とし、任意の FGFRCX : FGF - C X 対を検出することを含む。FGF - C X を含有する組成物を用いて、例えば、軟骨または骨修復を刺激するために、FGFRCX 活性を増大させることができる。FGF - C X 拮抗物質または FGF - C X 結合試薬 (例えば、抗 FGF - C X 抗体) を含有する組成物は、FGF - C X の過剰または FGFRCX の過剰活性、特に多数または唯一の遺伝性外骨腫症、外反母趾変形、軟骨形成不全、滑膜骨軟骨腫症および endochondromas により引き起こされる疾病を処置するために用いられ得る。

【0269】

グリア細胞活性化因子 (GAF) および GAF をコード化する DNA は、グリア細胞の成長を特異的に促進するために働く。GAF がグリア細胞の活性化を調節するために利用され得るグリア関連疾患のいくつかの実施例は、大脳傷害、大脳浮腫、老年痴呆、アルツハイマー病、糖尿病性神経障害等である。同様に、FGF - C X は、グリア細胞関連疾患の診断または処置において用いられ得る。FGF - C X のグリア細胞調節活性は、神経保護様活性としてであり、FGF - C X は、神経保護試薬として用いられ得る。グリア活性化因子として元々同定された FGF - C X の FGF - 9 に対する近接する相同性に起因し、FGF - C X 配列がグリア活性化因子であることを推定できる。FGF - C X は、それゆえ、グリア細胞の成長を刺激するために用いられ、大脳傷害の治癒を促進するか、または大脳浮腫、老年痴呆、アルツハイマー病、または糖尿病性神経障害を処置するために用いられ得る。

【0270】

FGF - C X はまた、用いて、線維芽細胞 (火傷、傷、潰瘍の治癒を加速するために)、巨核球 (血小板の数を増加するための)、造血細胞、免疫システム細胞、および血管の平滑筋細胞を刺激し得る。FGF - C X はまた、骨形成促進活性を有すると予測され、かつ骨折および骨粗鬆症の両方の処置に用いられ得る。FGF - C X ポリペプチドまたは核酸部分のアッセイは、大脳腫瘍の診断で用いられ得るし、抗体もかかる腫瘍の処置のために用いられ得る。それはまた、培養細胞の成長を促進する物質として用いられ得る。処置される疾患のタイプまたは重症度に非常に依存するが、予測投与量は、1日当たり、1ng ~ 0.1mg / 体重である。FGF - C X ポリペプチドは、血小板増加物質、骨形成促進物質として、または大脳疾病または肝硬変のような肝障害のために用いられ得る。それらはまた、抗癌剤と一緒に用いられると癌を処置し得る。FGF - C X ポリペプチド、またはフラグメント、誘導体、またはそれらの類似体に対して指示する抗体を、FGF - 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、または FGF - C X ポリペプチドを精製するために用いられ得る。FGF - C X の細胞成長活性を中和もするこれらの抗体は、抗癌剤として用いられ得る。

【0271】

全部ではないが、当分野において既知の相同タンパク質は、密接に関係し、または同一の機能を有する。例えば、Lewin, "Chapter 21: Structural Genes Belong to Families" In: Genes II, 1985, John Wiley and Sons, Inc., New York を参照されたい。FGF - C

10

20

30

40

50

Xポリペプチドは、高増殖性組織（例えば、上述のKoga et al.,を参照）で特異的に発現するべきと明らかに見られるアフリカツメガエルXFGF-CXタンパク質に非常に似ている。それゆえ、FGF-CXはまた高増殖性組織での細胞活性を調節することは推定される。従って、FGF-CXは、かかる成長が抑制または阻害された病態に打ち勝つために増殖性疾患の診断、および細胞および組織の成長の刺激において特に有用であり得る。配列番号：1のFGF-CX核酸の任意の位置に対応するオリゴヌクレオチドは、用いられて、FGF-CX様遺伝子の発現を検出し得る。本発明のタンパク質は、タンパク質に免疫特異的に結合する抗体の産生を刺激するために用いられ得る。かかる抗体は、試料中のタンパク質の発現を検出するための免疫診断的方法で用いられ得る。本発明のタンパク質は、かかる成長が好ましいものである条件下で、細胞成長および細胞増殖を刺激するために用いられ得る。実施例は、例えば、血管新生および血小板形成、消化管の内壁、および毛包への化学療法剤の反対の毒性副作用である。それらはまた、例えば、アルツハイマー病を含む神経性疾患での新たな細胞成長を刺激するために用いられ得る。または、拮抗作用的な処置は、本発明のFGF-CX様タンパク質に免疫特異的に結合する抗体がタンパク質の特異的な成長誘導作用を抑制するので投与され得る。かかる抗体は、例えば、様々な腫瘍および良性過形成を含む増殖性疾患の処置において有用であり得る

10

【0272】

生物学的試料中におけるFGF-CXの存在または非存在を検出する例示的な方法は、被験対象から生物学的試料を得ること、および生物学的試料をFGF-CXタンパク質またはFGF-CXタンパク質をコードする核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA）を検出する能力のある化合物または薬剤と接触し、FGF-CXの存在が生物学的試料中で検出できるようにすることを伴う。FGF-CX mRNAまたはゲノムDNAの検出用の薬剤は、FGF-CX mRNAまたはゲノムDNAとハイブリダイズする能力のある標識核酸プローブである。核酸プローブは、上述のように、例えば、配列番号：1の核酸のような全長FGF-CX核酸、または少なくとも15、30、50、100、250または500ヌクレオチド長でそして厳密な条件下でFGF-CX mRNAまたはゲノムDNAに特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチドの一部である。本発明の診断的アッセイにおいて使用するための他の適当なプローブを本明細書で説明する。

20

【0273】

FGF-CXタンパク質検出用の薬剤は、FGF-CXタンパク質に結合する能力のある抗体、好ましくは検出可能な標識を持つ抗体である。抗体は、ポリクローナル、またはさらに好ましくはモノクローナルであり得る。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）を使用し得る。プローブまたは抗体に関する用語「標識」とは、検出可能な物質をプローブまたは抗体にカップリングする（即ち物理的に連結することによりプローブまたは抗体を直接的に標識すること、ならびに直接標識したもう一つの試薬との反応性によりプローブまたは抗体を間接的に標識することを包含する。間接的な標識の例としては、蛍光標識した第2抗体を用いた第1抗体の検出、および蛍光標識したストレプトアビジンで検出し得るように、ビオチンでDNAプローブを末端標識することを挙げ得る。用語「生物学的試料」とは、対象から単離した組織、細胞および生物学的流体、ならびに対象内に存在する組織、細胞および流体を含む。即ち、本発明の検出法を使用して、インビトロおよびインビボで生物学的試料中のFGF-CX 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シツハイブリダイゼーションを挙げ得る。FGF-CXタンパク質を検出するためのインビトロ技術としては、酵素結合免疫測定法(ELISA)、ウエスタンブロット、免疫沈降、および免疫蛍光を挙げ得る。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を挙げ得る。さらに、FGF-CXタンパク質を検出するためのインビボ技術は、対象中へ標識抗FGF-CX抗体を導入することを含む。例えば、抗体を、対象中のその存在および位置を標準造影技術で検出し得る放射活性マーカーで標識することができる。

30

40

50

【0274】

一つの実施態様では、生物学的試料は被験対象由来のタンパク質分子を含有する。これ代えて、生物学的試料は、被験対象由来のmRNA分子または被験対象由来のゲノムDNA分子を含有し得る。好ましい生物学的試料は、対象より従来の手段で単離した末梢血白血球試料である。

【0275】

もう一つの実施態様では、方法は、対照対象から対照の生物学的試料を得ること、対照試料をFGF-CXタンパク質、mRNAまたはゲノムDNAを検出する能力のある化合物または薬剤と、FGF-CXタンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在を生物学的試料中で検出するように接触すること、および対照試料中のFGF-CXタンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在を試験試料中のFGF-CXタンパク質、mRNAまたはゲノムDNAと比較することをさらに伴う。

10

【0276】

本発明はまた、生物学的試料中のFGF-CXの存在を検出するキットを包含する。例えば、キットは：生物学的試料中のFGF-CXタンパク質またはmRNAを検出する能力のある標識化合物または薬剤；試料中のFGF-CXの量を測定する手段；および試料中のFGF-CXの量を標準と比較する手段を含み得る。化合物および薬剤を適当な容器中に包装し得る。キットは、FGF-CXタンパク質または核酸を検出するキットの使用のための使用説明書をさらに含み得る。

【0277】

予後アッセイ

さらに、本明細書に説明する診断方法を利用して、異常FGF-CXの発現または活性に関連した疾患または障害を有するかまたは発症するリスクにある対象を同定し得る。例えば、先行の診断アッセイおよび以下のアッセイのような、本明細書で説明するアッセイを利用して、例えば、過形成、腫瘍、再狭窄、乾癬、デピュイトレン拘縮、糖尿病性合併症、または関節リウマチ等のような増殖性疾患または分化性疾患；および大脳障害、糖尿病性神経障害、大脳浮腫、老年痴呆、アルツハイマー病等のようなグリア細胞関連疾患でのFGF-CXタンパク質、核酸の発現または活性に関連した障害を有するかまたは発症するリスクにある対象を同定し得る。これに代えて、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発症するリスクにある対象を同定し得る。かくして、本発明は、試験試料を対象から得て、そして異常なFGF-CXタンパク質または核酸(例えば、mRNA、ゲノムDNA)を検出する異常なFGF-CXの発現または活性に関連した疾患または障害を同定する方法を提供し、ここではFGF-CXタンパク質または核酸の存在は、異常なFGF-CXの発現または活性に関連した疾患または障害を有するかまたは発症するリスクにある対象に対する診断になる。本明細書において使用する「試験試料」とは、興味のある対象から得られる生物学的試料を指す。例えば、試験試料は生物学的流体(例えば血清)、細胞試料、または組織であり得る。

20

30

【0278】

さらに、本明細書に説明する予後アッセイを使用して、異常なFGF-CXの発現または活性に関連した疾患または障害を処置するために、対象に薬剤(例えばアゴニスト、アンタゴニスト、ペプチドミメティック、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子、または他の医薬候補物)を投与することができるか否かを決定し得る。例えば、そのような方法を使用して、対象の増殖性疾患、分化性疾患、グリア細胞関連疾患などのような疾患を薬剤により有効に処置するか否かを決定し得る。かくして、本発明は、試験試料を得て、FGF-CXタンパク質または核酸を検出する異常なFGF-CXの発現または活性に関連した障害を薬剤により対象を有効に処置し得るか否かを決定する方法を提供する(例えば、ここではFGF-CXタンパク質または核酸の存在は、異常なFGF-CXの発現または活性に関連した障害を処置するために薬剤を投与され得る対象に対する診断になる)。

40

【0279】

本発明の方法をまた使用してあるFGF-CX遺伝子中の遺伝的損傷を検出し、それによ

50

り損傷のある遺伝子を有する対象が増殖性疾患、分化性疾患、グリア細胞関連疾患などのリスク、または病むリスクにあるか否かを決定し得る。種々の実施態様において、これらの方法は、対象由来の細胞試料中において、ある F G F - C X タンパク質をコードする遺伝子の完全性に影響を及ぼす少なくとも一つの変更、または F G F - C X 遺伝子の誤発現を特徴とする遺伝的損傷の存在または不在の検出を含む。例えば、そのような遺伝的損傷を、(1)ある F G F - C X 遺伝子からの一つまたはそれ以上のヌクレオチドの欠失；(2)ある F G F - C X 遺伝子への一つまたはそれ以上のヌクレオチドの付加；(3)ある F G F - C X 遺伝子の一つまたはそれ以上のヌクレオチドの置換、(4)ある F G F - C X 遺伝子の染色体再編成、(5)ある F G F - C X 遺伝子の m R N A 転写物レベルの変化、(6)ゲノム D N A のメチル化パターンのようなある F G F - C X 遺伝子の異常修飾、(7)ある F G F - C X 遺伝子の m R N A 転写物の非野生型スプライシングパターンの存在、(8)ある F G F - C X タンパク質の非野生型レベル、(9)ある F G F - C X 遺伝子の対立遺伝子欠失、および(10)ある F G F - C X タンパク質の不適切な翻訳後修飾の少なくとも一つの存在の確認により検出し得る。本明細書に説明するある F G F - C X 遺伝子の損傷を検出するために使用し得る当分野において公知の多数のアッセイ技術が存在する。好ましい生物学的試料は、対象から従来で単離した末梢血白血球試料である。しかしながら、例えば、頬粘膜細胞を含む有核細胞を含有する任意の生物学的試料を使用し得る。

10

【0280】

特定の実施態様では、損傷の検出は、アンカー P C R または R A C E P C R のようなポリメラーゼ連鎖反応(P C R)(例えば米国特許番号 4,683,195 および 4,683,202 を参照)におけるかまたはこれに代えて、連結連鎖反応(L C R)(例えば、Landegr an, et al., (1988). Science 241: 1077-1080、および Nakazawa, et al., (1994). PNAS . USA 91: 360-364 を参照)におけるプローブ/プライマーの使用を伴うが、後者は F G F - C X 遺伝子中の点突然変異検出に特に有用であり得る(Abravaya, et al., (1995). Nucl. Acids Res. 23: 675-682 を参照)。この方法は、患者から細胞試料を集め、試料の細胞から核酸(例えば、ゲノム、m R N A または両方)を単離し、F G F - C X 遺伝子(もし存在するならば)のハイブリダイゼーションおよび増幅が起きるような条件下で、ある F G F - C X 遺伝子と特異的にハイブリダイズする一つまたはそれ以上のプライマーと核酸試料を接触し、そして増幅産物の存在または不在を検出し、または増幅産物のサイズを検出し、そして対照試料と長さを比較するステップを含み得る。P C R および/または L C R は、本明細書に説明する変異の検出に使用する任意の技術と一緒に予備的増幅ステップとして使用するのが望ましい。

20

30

【0281】

さらに別な増幅法としては：自己保持配列複製(Guatelli, et al., (1990). Proc. Natl . Acad. Sci. USA 87: 1874-1878 を参照)、転写増幅システム(Kwoh, et al., (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177 を参照)；Q レプリカーゼ(Lizardi, et al, (1988). BioTechnology 6: 1197 を参照)、または任意の他の核酸増幅法に引き続いて当業者に周知の技術を用いる増幅分子の検出を挙げ得る。これらの検出スキームは、核酸分子がごく少数で存在するならば、そのような分子の検出に特に有用である。

40

【0282】

さらに別の実施態様では、試料細胞由来のある F G F - C X 遺伝子中の変異を、制限酵素切断パターンの変化により同定し得る。例えば、試料および対照の D N A を単離し、増幅し(任意に)、一つまたはそれ以上の制限エンドヌクレアーゼで処理し、そしてフラグメントのサイズをゲル電気泳動で測定して比較する。試料と対照の D N A 間のフラグメントサイズの差は試料 D N A 中の変異を示す。さらに、配列特異的リボザイム(例えば、米国特許番号 5,493,531 を参照)を使用して、リボザイム切断部位の発生または消失により特異的な変異の存在を評価し得る。

【0283】

他の実施態様では、F G F - C X 中の遺伝的突然変異は、試料および対照の核酸、例えば

50

、DNAまたはRNAを数百または数千個のオリゴヌクレオチドプローブを含有する高密度アレイにハイブリダイズすることにより同定することができる。例えば、Cronin, et al., (1996). Human Mutation 7: 244-255、Kozal, et al., (1996). Nat. Med. 2: 753-759を参照されたい。例えば、FGF - CX中の遺伝的変異を、上述のCronin, et al.に記載するように光を発生するDNAプローブを含有する2次元アレイ中で同定し得る。略述すれば、プローブの1番目のハイブリダイゼーションアレイを用いて、試料と対照中の長い一続きのDNAをスキャンして、一連の重なり合うプローブの線形アレイを作成することにより配列間の塩基変化を同定し得る。このステップは点突然変異の同定を可能にする。これに、検出した全ての変異体または突然変異に相補的なさらに小さな特別のプローブアレイを用いることにより特定の変異の特徴化を可能にする2番目のハイブリダイゼーションを行う。それぞれの変異アレイは、一つは野生型遺伝子に相補的で、他は突然変異遺伝子に相補的な並行なプローブのセットから成る。

10

【0284】

なおもう一つの実施態様において、当分野において公知の種々のシークエンシング反応のいずれかを使用してFGF - CX遺伝子を直接にシークエンシングして、試料のFGF - CXの配列を対応する野生型(対照)配列と比較することにより変異を検出し得る。シークエンシング反応の例としては、Maxim and Gilbert, (1977). PNAS. USA 74: 560またはSanger, (1977). PNAS. USA 74: 5463により開発された技術に基づくものを挙げ得る。質量分析によるシークエンシング(例えば、PCT国際公開第WO94/16101号; Cohen, et al., (1996). Adv. Chromatography 36: 127-162およびGriffin, et al., (1993) 20) Appl. Biochem. Biotechnol. 38: 147-159を参照)を含む種々の自動化シークエンシング方法のいずれも診断アッセイの実施に際して利用され得ることをまた考え得る(例えば、Naeve, et al., (1995). Biotechniques 19: 448を参照)。

20

【0285】

FGF - CX遺伝子中の変異を検出する他の方法としては、切断剤からの保護を用いてRNA/RNAまたはRNA/DNAヘテロ二重鎖中のミスマッチ塩基を検出する方法を挙げ得る。例えば、Myers, et al., (1985). Science 230: 1242を参照されたい。一般に、「ミスマッチ切断」の当分野の技術は、野生型FGF - CX配列を含有する(標識した)RNAまたはDNAを、組織試料より得た潜在的突然変異体のRNAまたはDNAとハイブリダイズすることにより形成したヘテロ二重鎖を提供することから始まる。二重鎖を、対照および試料の鎖の間の塩基のミスマッチのために存在する二重鎖の単鎖領域を切断する薬剤で処理する。例えば、RNA/DNA二重鎖をRNaseで処理し、DNA/DNAハイブリッドはS₁ヌクレアーゼで処置し、ミスマッチ領域を酵素的に処理し得る。他の実施態様では、ミスマッチ領域を消化するために、DNA/DNAまたはRNA/DNAの二重鎖のどちらかを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で処理し得る。ミスマッチ領域の処理の後、得られた材料を次いで変性ポリアクリルアミドゲル上でサイズにより分離して変異の部位を決定する。例えば、Cotton, et al., (1988) 30. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4397、Saleeba, et al., (1992). Methods Enzymol. 217: 286-295を参照されたい。一つの実施態様では、対照のDNAまたはRNAを検出用に標識し得る。

30

40

【0286】

なおもう一つの実施態様では、ミスマッチ切断反応は、細胞の試料より得られたFGF - CX cDNA中で点突然変異を検出しマッピングするために、規定したシステム中で二重鎖DNA中のミスマッチ塩基対を認識する一つまたはそれ以上のタンパク質(いわゆる「DNAミスマッチ修復」酵素)を使用する。例えば、E. coliのmutY酵素はG/AミスマッチのAを切断し、そしてHeLa細胞からのチミジンDNAグリコシダーゼはG/TミスマッチのTを切断する。例えば、Hsu, et al., (1994). Carcinogenesis 15: 1657-1662を参照されたい。例示的な実施態様によれば、あるFGF - CX配列、例えば、野生型FGF - CX配列に基づくプローブを、試験細胞(複数を含む)由来のcDNAまたは他のDNA産物とハイブリダイズする。この二重鎖をDNAミスマッチ修復酵素で処理

50

して、切断生産物をもしあれば電気泳動のプロトコール等から検出し得る。例えば、米国特許番号 5,459,039 を参照されたい。

【0287】

他の実施態様では、電気泳動上の移動度の変化を用いて、FGF-CX 遺伝子の突然変異を同定する。例えば、単鎖コンフォメーション多型 (SSCP) を使用して、突然変異体および野生型核酸の間の電気泳動移動度の差を検出し得る。例えば、Orita, et al., (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 86: 2766、Cotton, (1993). Mutat. Res. 285: 125-144、Hayashi, 1992. Genet. Anal. Tech. Appl. 9: 73-79 を参照されたい。試料および対照の FGF-CX 核酸の単鎖 DNA フラグメントを変性し、復元することを可能にする。単鎖核酸の二次構造は配列により異なり、電気泳動上の移動度のそこで得た変化はたとえ 1 個の塩基変化の検出をも可能にする。DNA フラグメントを標識プローブで標識または検出し得る。アッセイの感度を、2 次構造が配列変化により感受性である RNA (DNA よりもむしろ) を使用することにより増大し得る。一つの実施態様では、主題の方法は、ヘテロ二重らせん分析を利用して、電気泳動の移動度の変化に基づいて二重らせんヘテロ二重鎖分子を分離する。例えば、Keen, et al., (1991). Trends Genet. 7: 5 を参照されたい。

10

【0288】

なおもう一つの実施態様では、ある勾配の変性剤を含有するポリアクリルアミドゲル中での突然変異体または野生型フラグメントの移動を、変性濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) を用いてアッセイする。例えば、Myers, et al., (1985). Nature 313: 495 を参照されたい。DGGE を分析法として使用する際、DNA を修飾し、例えば、凡そ 40 bp の高融点 GC 富化 DNA の GC クランプを PCR で付加することにより、それが完全に変性しないことを保証する。さらなる実施態様では、変性勾配に代えて温度勾配を使用して、対照および試料の DNA の移動度の差を同定する。例えば、Rosenbaum and Reissner, (1987). Biophys. Chem. 265: 12753 を参照されたい。

20

【0289】

点突然変異を検出するための他の技術の例として、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を挙げ得るが、これらに限定しない。例えば、既知の変異を中央に置いたオリゴヌクレオチドプライマーを調製し、次いで完全なマッチが見られる場合にのみハイブリダイゼーションを認める条件下で、標的 DNA とハイブリダイズする。例えば、Saiki, et al., (1986). Nature 324: 163、Saiki, et al., (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6230 を参照されたい。オリゴヌクレオチドをハイブリダイズ用膜に付着して、標識した標的 DNA とハイブリダイズする際、そのような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、PCR 増幅した標的 DNA またはある数の異なる突然変異体とハイブリダイズする。

30

【0290】

これに代えて、選択的 PCR 増幅に基づく対立遺伝子特異的増幅技術を本発明と一緒に使用し得る。特異的増幅のためのプライマーとして使用するオリゴヌクレオチドは、興味のある変異を分子の中央で (増幅がディファレンシャルハイブリダイゼーションに依存するように; 例えば、Gibbs, et al., (1989). Nucl. Acids Res. 17: 2437-2448 を参照) または適切な条件下で、ミスマッチがポリメラーゼ伸長を阻止または低減できる (例えば、Prossner, (1993). Tibtech. 11: 238 を参照) 一つのプライマーの 3' 最末端において保持していてもよい。加えて、切断に基づく検出を創成するために、変異の領域に新規制限部位を導入するのが望ましい。例えば、Gasparini, et al., (1992). Mol. Cell Probes 6: 1 を参照されたい。特定の実施態様では、増幅はまた、増幅のための Taq リガーゼを使用して実施され得ることを予想する。例えば、Barany, (1991). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189 を参照されたい。このような場合には、5' 末端配列の 3' 末端に完全なマッチがある場合にのみ連結が起こり、増幅の存在または不在を調べることにより特定の部位における既知の変異の存在を検出することを可能にする。

40

【0291】

50

本明細書に説明する方法を、例えば、本明細書に説明する少なくとも1つのプローブ核酸または抗体試薬を含むプレパック診断キットを利用することにより実施し得る。これを、例えば、臨床の場においてF G F - C X遺伝子の関与する疾患または疾病の症状を示すかまたは家族歴のある患者を診断するのに簡便に使用し得る。

【0292】

さらに、F G F - C Xを発現する任意の細胞タイプまたは組織、好ましくは末梢血白血球を本明細書に説明した予後アッセイに利用し得る。しかしながら、例えば、類粘膜細胞の有核細胞を含む任意の生物学的試料を使用し得る。

【0293】

薬理ゲノミクス

本明細書に説明したスクリーニングアッセイにより同定するようなF G F - C X活性(例えば、F G F - C X遺伝子発現)に促進的または阻害的効果を有する薬剤またはモジュレータを個体に投与し、異常F G F - C X活性に関連する疾患(例えば、神経性疾患、癌関連疾患、または妊娠性疾患)を(予防的にまたは治療的に)処置することができる。そのような処置と一緒に、個体の薬理ゲノミクス(即ち、個体の遺伝子型および外来性化合物または薬に対するその個体の応答との間の関係の研究)を考慮し得る。治療薬の代謝の差は、薬理的に活性な薬の用量と血中濃度の関係を変えることにより、重症の毒性または治療の失敗をもたらし得る。かくして、個体の薬理ゲノミクスは、個体の遺伝子型の考慮に基く予防的または治療的処置のための有効な薬剤(例えば薬)の選択を許容する。そのような薬理ゲノミクスをさらに用いて、適切な投与量および治療方法を決定し得る。したがって、個体のF G F - C Xタンパク質の活性、F G F - C X核酸の発現、またはF G F - C X遺伝子の変異の含量を測定し、それにより個体の治療的処置または予防的処置に適切な薬剤(複数を含む)を選択し得る。

【0294】

薬理ゲノミクスは、罹患した人における変化した薬剤分布および異常な作用に因る薬への応答における臨床的に有意な遺伝的変異を取り扱う。例えば、Eichelbaum, 1996. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 23: 983-985; Linder, 1997. Clin. Chem., 43: 254-266を参照されたい。一般に、二つのタイプの薬理遺伝学的異常を区別し得る。薬が身体に作用する方式を変える単一の因子として伝達する遺伝的異常(変化した薬剤作用)または身体が薬に作用する方式を変える単一因子として伝達する遺伝的異常(変化した薬物代謝)がある。これらの薬理遺伝学的異常は、稀な欠陥または多型性のどちらかとして生じ得る。例えば、グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PD)欠乏症は、よくみられる遺伝性酵素異常症であり、ここでは主な臨床的合併症は、酸化剤の薬(抗マラリア剤、スルホンアミド剤、鎮痛剤、ニトロフラン類)摂取後またはソラマメ摂食後の溶血である。

【0295】

例示的实施態様として、薬の代謝酵素の活性は、薬の作用の強度および持続の両者の主たる決定因子である。薬の代謝酵素の遺伝的多型性(例えば、N-アセチルトランスフェラーゼ2(NAT2)ならびにチトクロームP450酵素のCYP2D6およびCYP2C19)の発見は、なぜ或る患者は標準かつ安全用量の薬物摂取後に期待した薬の効果を得られないかまたは過大な薬の応答および重篤な毒性を示すのかについての説明を提供する。これらの多型性を、人口集団で高代謝群(EM)および低代謝群(PM)の2つの表現型で表現する。PMの存在比率は異なる集団間で異なる。例えば、CYP2D6をコードする遺伝子は高度に多型性で、そして幾つかの変異が、機能的なCYP2D6の不在をもたらすPMを同定する。CYP2D6およびCYP2C19の低代謝群は、標準的な用量の投与を受けた際、極めて頻繁に過剰な薬の応答および副作用を経験する。代謝物が活性な治療成分であるならば、CYP2D6が生成する代謝物モルヒネにより仲介するコデインの鎮痛作用について実証するように、PMは治療応答を示さない。それと全く正反対なのが、標準の用量に応答しないいわゆる超高速代謝群である。最近、超高速代謝群の分子の根拠をCYP2D6遺伝子増幅に因ると確認した。

【0296】

10

20

30

40

50

従って、個体の FGF - CX タンパク質の活性、FGF - CX 核酸の発現、または FGF - CX 遺伝子の変異含量を測定し、それにより個体の治療的処置または予防的処置のために適切な薬剤（複数を含む）を選択し得る。加えて、薬理遺伝学的研究を用いて、薬の代謝酵素をコードする遺伝子多型の対立遺伝子の遺伝子型決定を、個体の薬の応答性の表現型の同定に応用し得る。この知識を投与量および薬の選択に応用する際、本明細書で説明する例示的スクリーニングアッセイの一つにより同定したモジュレータのような FGF - CX モジュレータで対象を処置する際に、有害作用または治療失敗を避け、かくして治療的または予防的効率を増強し得る。

【0297】

臨床作用のモニタリング

FGF - CX の発現または活性（例えば、異常な細胞増殖および/または分化を調整する活性）に対する薬剤（例えば、薬、化合物）の影響をモニタリングすることは、基礎的な薬のスクリーニングに応用できるだけでなく、また臨床試験にも応用できる。例えば、本明細書に説明したようにスクリーニングアッセイにより、FGF - CX 遺伝子発現、タンパク質レベルを増加し、または FGF - CX 活性を上方調節すると決定した薬剤の有効性を、低下した FGF - CX 遺伝子発現、タンパク質レベル、または下方制御された FGF - CX 活性を示す対象の臨床試験でモニターし得る。これに代えて、FGF - CX 遺伝子発現、タンパク質レベルを減少し、または FGF - CX 活性を下方調節すると決定した薬剤の有効性を、増加した FGF - CX 遺伝子発現、タンパク質レベル、または上方制御した FGF - CX 活性を示す対象の臨床試験でモニターし得る。そのような臨床試験において、FGF - CX、および、好ましくは、例えば、細胞増殖性疾患または神経障害性疾患に関係する他の遺伝子の発現または活性を、特定の細胞の免疫応答性の「読み出し」またはマーカーとして使用し得る。

10

20

【0298】

例えば、FGF - CX 活性（例えば、本明細書で説明するスクリーニングアッセイで同定する）を調整する薬剤（例えば、化合物、薬または低分子）を用いた処置により細胞中で調整する FGF - CX を含む遺伝子を同定し得る。従って、細胞増殖障害に対する薬剤の効果を、例えば、臨床試験において検討するために、細胞を単離して RNA を調製し、そして障害に関連すると思う FGF - CX および他の遺伝子の発現レベルを分析し得る。遺伝子発現レベル（即ち、遺伝子発現パターン）を、本明細書に説明するようにノーザンブロット分析または RT - PCR により、またはこれに代えて本明細書で説明する方法の一つにより生産したタンパク質の量を測定することにより、または FGF - CX または他の遺伝子の活性レベルを測定することにより、定量することができる。この様式においては、遺伝子発現パターンは、薬剤に対する細胞の生理学的応答を示すマーカーとしての役割を果たす。したがって、薬剤による個体の処置の前および処置中の種々の時点で、この応答状態を測定し得る。

30

【0299】

一つの実施態様において、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、ペプチドミメティック、低分子、または本明細書で説明するスクリーニングアッセイで同定した他の薬候補物）で対象を処置することの有効性をモニターする方法を提供し、その方法は、(i) 薬剤投与前に対象から投与前試料を得て、(ii) 投与前試料中の FGF - CX タンパク質、mRNA、またはゲノム DNA の発現レベルを検出し、(iii) 対象から一つまたはそれ以上の投与後の試料を得て、(iv) 投与後の試料中の FGF - CX タンパク質、mRNA、またはゲノム DNA の発現または活性レベルを検出し、(v) 投与前の試料中の FGF - CX タンパク質、mRNA、またはゲノム DNA の発現または活性レベルを投与後のひとつまたは複数の試料中の FGF - CX タンパク質、mRNA、またはゲノム DNA と比較し、そして (vi) それにしたがって対象への薬剤の投与を変更するステップを含む。例えば、FGF - CX の発現または活性を検出したより高レベルに増加するためには、即ち、薬剤の有効性を増加するためには、薬剤の増加した投与が望ましい。これに代えて、FGF - CX の発現または活性を検出したより低レベルに減

40

50

少する、即ち、薬剤の有効性を減少するためには、薬剤の減少した投与が望ましい。

【0300】

処置方法

本発明は、異常なFGF-CXの発現または活性に関連した疾患のリスクにある（感受性）かまたは疾患を有する対象を処置する予防的方法および治療的方法の両方を提供する。

【0301】

増加したレベル（疾患または障害に罹患していない対象と比べて）または生物学的活性を特徴とする疾患および障害を、活性に拮抗する（即ち、低下するかまたは阻害する）治療薬で処置し得る。活性に拮抗する治療薬を、治療の様式または予防の様式で投与し得る。利用し得る治療薬としては、(i) FGF-CXポリペプチド、またはその類似体、誘導體、フラグメントまたは相同体；(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FGF-CXペプチドの内在的機能を相同組換えにより「ロックアウト」するのに使用する「機能障害性」である核酸（即ち、FGF-CXペプチドに対するコード化配列のコード化配列内への異種挿入に因る）の投与（例えば、Capecchi, 1989. Science 244: 1288-1292を参照）；または(v) FGF-CXペプチドおよびその結合相手との相互作用を変化するモジュレータ（即ち、本発明のさらに別なペプチドのミメティックまたは本発明のペプチドに特異的な抗体を含む阻害剤、アゴニスト、アンタゴニスト）を挙げ得るが、これらに限定しない。

10

【0302】

減少したレベル（疾患または障害に罹患していない対象と比べて）または生物学的活性を特徴とする疾患および障害を、活性を増加する（即ち、アゴニストである）治療薬で処置し得る。活性を上方制御する治療薬を、治療の様式または予防の様式で投与し得る。利用し得る治療薬としては、FGF-CXペプチド、またはその類似体、誘導體、フラグメント、または相同体；またはバイオアベイラビリティを増加するアゴニストを挙げ得るが、これらに限定しない。

20

【0303】

増加または減少したレベルを、患者の組織試料（例えば、生検組織から）を得て、インビトロでRNAまたはペプチドのレベル、発現したペプチド（またはFGF-CXペプチドのmRNA）の構造および/または活性をアッセイすることにより、ペプチドおよび/またはRNAを定量することにより容易に検出し得る。当分野内で周知の方法としては、イムノアッセイ（例えば、ウエスタンブロット分析、免疫沈降とそれに引き続く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、免疫細胞化学、等）および/またはmRNA発現を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、ノーザンアッセイ、ドットブロット、インシットハイブリダイゼーション、等）を挙げ得るが、これらに限定しない。

30

【0304】

一つの態様では、異常なFGF-CX発現または少なくともあるFGF-CX活性を調整する薬剤を対象に投与することにより、本発明は、異常なFGF-CXの発現または活性に関連した疾患または異常を、対象において予防する方法を提供する。異常なFGF-CXの発現または活性が原因または一因となって生じる疾患のリスクを有する対象を、例えば、本明細書で説明するように診断的アッセイまたは予後的アッセイのいずれかまたはそれらの組合せによって同定し得る。疾患または障害を予防し、または、これに代えて、その進行を遅らせるようにFGF-CX異常に特徴的な症状の出現に先立って予防的薬剤の投与を行い得る。FGF-CX異常のタイプに依存して、例えば、あるFGF-CXアゴニストまたはFGF-CXアンタゴニストである薬剤を対象の処置に使用し得る。適切な薬剤を、本明細書で説明するスクリーニング法に基づいて決定することができる。本発明の予防的方法をさらに以下のサブセクションで考察する。

40

【0305】

治療的方法

本発明のもう一つの態様は、治療目的のためにFGF-CXの発現または活性を調整する

50

方法に関する。本発明の調整方法は、細胞を細胞に関連する FGF - CX タンパク質活性の一つまたはそれ以上の活性を調整する薬剤と接触することを含む。FGF - CX タンパク質活性を調整する薬剤は、核酸またはタンパク質、ある FGF - CX タンパク質の天然に存在する同属のリガンド、ペプチド、ある FGF - CX ペプチドミメティック、または低分子のような本明細書に説明する薬剤であり得る。一つの実施態様では、薬剤は一つまたはそれ以上の FGF - CX タンパク質活性を促進する。そのような促進的薬剤の例としては、活性な FGF - CX タンパク質および細胞中に導入した FGF - CX をコードする核酸分子を挙げ得る。もう一つの実施態様では、薬剤は一つまたはそれ以上の FGF - CX タンパク質活性を阻害する。そのような阻害的薬剤の例としては、アンチセンス FGF - CX 核酸分子および抗 - FGF - CX 抗体を挙げ得る。これらの調整方法は、インビトロで（例えば、細胞を薬剤と共に培養することにより）または、これに代えて、インビボで（例えば、薬剤を対象に投与することにより）実施し得る。このように、本発明はある FGF - CX タンパク質または核酸分子の異常な発現または活性を特徴とす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。一つの実施態様では、その方法は、薬剤（例えば、本明細書で説明するスクリーニングアッセイで同定した薬剤）または FGF - CX の発現または活性を調整する（例えば、上方制御または下方制御する）薬剤の組合せを投与することを伴う。もう一つの実施態様では、その方法は減少または異常な FGF - CX の発現または活性を補償するための治療としてある FGF - CX タンパク質または核酸分子を投与することを伴う。

10

20

30

40

【0306】

実施例

実施例 1 . FGF - CX 遺伝子の同定

FGF - CX 遺伝子を、クエリーとしてアフリカツメガエル FGF - CX を有する Genbank ヒトゲノム DNA 配列 (Koga, et al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Comm. 261, 756-765; 受託番号 AB012615) の検索である、TBLASTN (Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410) に従い、同定した。この検索により、染色体 8 上の高相同性の遺伝子座 (受託番号 AB020858) を同定した。イントロン / エキソン境界を、既知の FGF 由来の相同体と共に、標準コンセンサスプライスパラメータ (Mount (1996) Science 271, 1690-1692) を用いて推定した。FGF - CX 開始コドンは、AB020858 配列の 16214 bp に位置し、このエキソンの残存 3' 部分は、15930 bp に続く。FGF - CX の 5' UTR は、公開 EST (受託番号 AA232729、AA236522、AI272876 および AI272878) を用いて別の 606 bp により、開始コドンの上流に伸長した。遺伝子座 AB020858 に関する様に FGF - CX 遺伝子の残存構造は、以下にの通りである：イントロン 1 (15929 ~ 9942 bp)；エキソン 2 (9941 ~ 9838 bp)；エキソン 3 (7499 bp で開始し、表 13 において示す様に続く；3' 非翻訳領域の構造がまだ決定されていない)。表 13 は、FGF - CX のヌクレオチド (配列番号：25) 配列および推定アミノ酸 (配列番号：2) 配列を含む FGF - CX 遺伝子の解析である。開始コドンおよび停止コドンは、はっきりしており、5' UTR に備わるインフレームの停止コドンに下線を引いてある。

【0307】

表 13

【表 17】

表 13

エキソン 1
 ...AGACAGTGGAGAGCTTCCCTGCCATTTTCAGTGCAAAGTCCCTCCGGAGCGACCTCAGAGGAGTAACCGGGCCTTAACT
 TTTTGGCGCTCGTTTTGCTATAAATTTTTCTCTATCCACCTCCATCCCACCCACCAACACTCTTTACTGGGGGGTCTTTT
 GTGTTCGGGATCTCCCCCTCCATGGCTCCCTTAGCCGAAAGTCGGGGGCTTTCCTGGGGCGCCTGGAGGGCTTGGGCCAGCA
 1 M A P L A E V G G F L G G L E G L G Q Q
 GGTGGSTTCGCATTTCTCTGTGGCTCCTGCCCCGGGAGCGGGCCCGCTGCTGGGGCGAGCGCAGGAGCGCGGGAGCGGA
 21 V G S H F L L P P A G E R P P L L G E R R S A A E R S
 GCGCGCGGGCGGGCCGGGGCTGCGCAGCTGGCGCACCTGCACGGCATCCTGCGCGCGGGCAGCTCTATTGCCGCACC
 48 A R G G P G A A Q L A H L H G I L R R R Q L Y C R T
 GGCTTCCACCTGCAGATCCTGCCCGACGGCAGCGTGCAGGGCACCCGGCAGGACCACAGCCTCTTCGGTATCTTGAATT
 74 G F H L Q I L P D G S V Q G T R Q D H S L F G I L E F
 CATCAGTGTGGCAGTGGGACTGGTTCAGTATTAGAGGTGTGGACAGTGGTCTCTATCTTGGAAATGAATGACAAAGGAGAAC
 101 I S V A V G L V S I R G V D S G L Y L G M N D K G E L
 <-|-> エキソン 2
 TCTATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAATGCATCTTTAGGGAGCAGTTTGAAGAGAACTGGTATAACACCTATTTCATCT
 128 Y G S E K L T S E C I F R E Q F E E N W Y N T Y S S
 AACATATATAAACATGGAGACACTGGCCGCAGGTATTTGTGGCACCTTAACAAGACGGAACTCCAAGAGATGGCGCCAG
 154 N I Y K H G D T G R R Y F V A L N K D G T P R D G A R
 GTCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCTAGACCAGTGGATCCAGAAAGAGTCCAGAATGTACAGGACC
 181 S K R H Q K F T H P L P R P V D P E R V P E L Y K D L
 TACTGATGTACACTGA...
 208 L M Y T

10

20

【 0 3 0 8 】

上述の段落の方法により発見した遺伝子は、3つのエキソンおよび2つのイントロンを含む(表13)。DNA配列は、開始メチオニンの117bp上流のインフレームの停止コドンを含む211アミノ酸残基のORFを予測する。探し出された遺伝子由来のDNAセグメントは、放射線ハイブリッド解析により確認された位置である染色体8p21.3~p22に位置する(実施例2参照)。

【 0 3 0 9 】

G - X - [L I] - X - [S T A G P] - X (6 , 7) - [D E] - C - X - [F L M]
 - X - E - X (6) - Yである、FGFの特別のモチーフを、PROSITE検索(Bucher & Bairoch (1994) Ismb. 2, 53-61)により同定し、二重下線を引いたアミノ酸残基125~148間に位置し、イントロン/エキソンの境界は、矢印で表す。イントロン1および2は、それぞれ5988bpおよび2338bpの長さである。5'UTR配列は、公開ESTに由来し、全体としては示していない。

30

【 0 3 1 0 】

実施例2.FGF-CXの放射線ハイブリッドマッピング

ヒト染色体マーカーを用いる放射線ハイブリッドマッピングを、FGF-CXについて行った。用いた方法は、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)に記載されるものと類似である。無作為放射線誘導ヒト染色体フラグメントを含有する93細胞クローンのパネルを特徴的な方法で検索したクローンを同定するためにデザインされたPCRプライマーを用いて96ウェルプレート中でスクリーニングした。同定したFGF-CXをコード化するヌクレオチド配列由来のDNAセグメントを、染色体8p21.3~p22へのマッピングとして注釈をつけた。この結果を、マーカーAFM177XB10にオーバーラップし、かつマーカーWI-5104由来の1.6cRおよびマーカーWI-9262由来の3.2cRである遺伝子座にある染色体8に位置するFGF-CXの発見による本解析により、絞り込んだ。

40

【 0 3 1 1 】

50

実施例 3 . F G F - C X タンパク質をコードする配列の分子クローニング

オリゴヌクレオチドプライマーを、オープンリーディングフレームを表し、全長 F G F - C X をコードする、DNA セグメントの PCR により増幅のためにデザインした。順方向プライマーは、B g l I I 制限部位 (A G A T C T) および一致コザック配列 (C C A C C) 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のインフレームの X h o I 制限部位を含有する。順方向および逆方向プライマーの両方は、5 ' クランプ配列 (C T C G T C) を含有する。プライマーの配列は、以下である：

F G F - C X 順方向：5 ' - C T C G T C A G A T C T C C A C C A T G G C T C C C T T A G C C G A A G T C - 3 ' (配列番号：3)

F G F - C X 逆方向：5 ' - C T C G T C C T C G A G A G T G T A C A T C A G T A G G T C C T T G - 3 ' (配列番号：4) 10

【 0 3 1 2 】

PCR 反応を、5 0 μ l の用量中の全部で 5 n g のヒト前立腺 c D N A 鋳型、それぞれ 1 μ M の F G F - C X 順方向および F G F - C X 逆方向プライマー、5 μ m o l の d N T P (Clontech Laboratories, Palo Alto CA) および 1 μ l の 5 0 × Advantage-HF2 ポリメラーゼ (Clontech Laboratories) を用いて実施した。以下の PCR 反応条件を用いた：

a) 9 6 3 分
b) 9 6 3 0 秒 変性
c) 7 0 3 0 秒 プライマーアニーリング この温度を 1 / サイクルにより徐々に下げた。 20

d) 7 2 1 分 伸長
ステップ (b) ~ (d) を 1 0 回繰り返す

e) 9 6 3 0 秒 変性
f) 6 0 3 0 秒 アニーリング
g) 7 2 1 分 伸長

ステップ (e) ~ (g) を 2 5 回繰り返す
h) 7 2 5 分 最終伸長

【 0 3 1 3 】

約 6 4 0 b p の予測した配列を有するシングル PCR 産物を、アガロースゲルの電気泳動後単離し、p C R 2 . 1 ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA) に結合させた。クローン化したインサートを、ベクターに特異的な M 1 3 順方向 (~ 4 0) M 1 3 逆方向プライマーを用いて配列決定し、ヌクレオチド配列が上流 B g l I I クローニング部位と下流 X h o I 部位との間に直接挿入された表 1 の配列 (配列番号：1) に 1 0 0 % 同一であることを確認した。クローン化配列は、予測 F G F - 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。クローンを T A - A B 0 2 0 8 5 - S 2 7 4 - F 1 9 と呼ぶ。 30

【 0 3 1 4 】

実施例 4 . 哺乳類発現ベクター p C E P 4 / S e c の調製

オリゴヌクレオチドプライマー p S e c - V 5 - H i s 順方向 (C T C G T C C T C G A G G G T A A G C C T A T C C C T A A C (配列番号：1 4) および p S e c - V 5 - H i s 逆方向 (C T C G T C G G G G C C C C T G A T C A G C G G G T T T A A A C (配列番号：1 5) を、V 5 および H i s 6 を含む p c D N A 3 . 1 - V 5 H i s (Invitrogen, Carlsbad, CA) 発現ベクター由来のフラグメントを増幅するためにデザインした。PCR 産物を、X h o I および A p a I で切断し、I g リーダー配列にある (Invitrogen, Carlsbad CA) X h o I / A p a I 切断 p S e c T a g 2 B ベクター に結合させた。インフレームの I g リーダーおよび V 5 - H i s 6 を含む結果として得たベクター p S e c V 5 H i s の正しい構造を、DNA 配列分析により確認した。ベクター p S e c V 5 H i s を、正しいフレーム中の上記エレメントを保持するフラグメントを提供するために P m e I および N h e I で切断した。P m e I - N h e I フラグメントを B a m H I / クレノーおよび N h e I 処理ベクター p C E P 4 (Invitrogen 50

、Carlsbad, CA) に結合した。結果として得たベクターを p C E P 4 / S e c と名付け、ベクターは、インフレーションの I g リーダー、該クローンの挿入部位、および P C M V および / または P T 7 プロモーターの制御下の V 5 エピトープ 6 × H i s を含んでいる。p C E P 4 / S e c は、任意のタンパク質を I g 鎖シグナルペプチドに続く多型クローニング部位に融合されることにより異種性タンパク質の発現および分泌を可能とする発現ベクターである。発現タンパク質の検出および精製は、C 末端にある V 5 エピトープ標識 (Invitrogen, Carlsbad, CA) および 6 × H i s 標識の存在により助けられる。

【 0 3 1 5 】

実施例 5 . ヒト胚腎臓 (H E K) 2 9 3 細胞での F G F - C X の発現

F G F - C X 配列を含有する B g l I I - X h o I フラグメントを、 T A - A B 0 2 0 8 5 - S 2 7 4 - F 1 9 (実施例 3) から単離し、発現ベクター p C E P 4 / S e c - F G F - C X を生成するために B a m H I - X h o I 切断 p C E P 4 / S e c にサブクローン化した。p C E P 4 / S e c - F G F - C X ベクターを、製造元 (Gibco/BRL/Life Technologies, Rockville, MD) の指示に従い、LipofectaminePlus 試薬を用いて 2 9 3 細胞に形質移入した。細胞ペレットおよび上清を、形質移入後 7 2 時間で回収し、抗 V 5 抗体でのウェスタンブロット (還元条件) により F G F - C X 発現を調べた。図 2 は、F G F - C X を、2 9 3 細胞により分泌された約 3 4 k D A タンパク質である見かけ上の分子量 (M r) を有するポリペプチドとして発現することを示す。

【 0 3 1 6 】

実施例 6 . E . coli での F G F - C X の発現

ベクター p R S E T A (InVitrogen Inc., Carlsbad, C) を、X h o I および N c o I 制限酵素で切断した。配列 5 ' C A T G G T C A G C C T A C 3 ' (配列番号 : 1 6) および 5 ' T C G A G T A G G C T G A C 3 ' (配列番号 : 1 7) のオリゴヌクレオチドリンカーを、3 7 でアニーリングし、X h o I - N c o I で処理した p R S E T A に結合させた。結果として得たベクターを、制限分析および配列決定により確認し、p E T M Y と名付けた。F G F - C X をコード化する配列の B g l I I - X h o I フラグメント (実施例 3 参照) を、B a m H I および X h o I 制限酵素で切断されたベクター p E T M Y に結合させた。発現ベクターを、p E T M Y - F G F - C X と名付ける。このベクターにおいて、h F G F - C X を、N 末端の 6 × H i s 標識および T 7 エピトープに融合させた。プラスミド p E T M Y - F G F - C X を、そこで E . coli 発現宿主 B L 2 1 (D E 3 , p L Y s) (Novagen, Madison, WI) に形質移入し、タンパク質 F G F - C X の発現を製造元の指示により誘導した。誘導後、全細胞を回収し、タンパク質を抗 H i s G l y 抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いるウェスタンブロットにより分析した。図 3 は、F G F - C X を M r 約 3 2 k D a として発現することを示す。

【 0 3 1 7 】

実施例 7 . クローン化シグナルペプチドを伴なう組換え F G F - C X タンパク質および伴わない組換え F G F - C X タンパク質の発現の比較

a) シグナルペプチドを伴わない発現

本発明の詳細な説明で言及した様に、F G F - C X は、古典的なアミノ末端シグナル配列を明らかに欠いている。F G F - C X が、哺乳類細胞から分泌されるか否かを決定するために、全長 F G F - C X タンパク質をコード化する B g l I I - X h o I フラグメントとして得た c D N A 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 切断 p c D N A 3 . 1 (Invitrogen) にサブクローンした。これは、p F G E - C X と名付けられた哺乳類発現ベクターを提供する。この構造は、同定および精製のそれぞれにおいて確認されるためにタンパク質のカルボキシ末端に V 5 エピトープ標識およびポリヒスチジン標識を取り込み、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 ヒト胚腎臓細胞への一過性の形質移入の後、培養上清を形質移入後 4 8 時間で回収した。

【 0 3 1 8 】

培養上清への F G F - C X の分泌に加えて、細胞ペレット / E C M と関連することも分か

った（データは示していない）。FGFは、細胞表面および細胞外基質（ECM）へヘパリン硫酸プロテオグリカン（HSPG）に結合することが知られているので、本発明者は、FGF-CXをこの方法で解離することが可能かを調べた。最後に、FGF-CXで形質移入した細胞を成長因子とHSPGとの低親和性の相互作用を分断することが知られている化合物である、100Mの スラミンを含有する0.5mlのDMEMでの30分間、4での処理により抽出した(La Rocca, R.V., Stein, C.A. & Myers, C.E. (1990) *Cancer Cells* 2, 106-115)。スラミンで抽出した培養上清を、次に回収し、遠心分離（5分；200xg）により明らかにした。

【0319】

培養上清およびスラミン抽出物を次に、同量の2xゲルローディングバッファーと混合した。試料を、10分間沸騰させ、還元条件下で4~20%の勾グラジエントポリアクリルアミドゲル（Novex, Dan Diego, CA）上でのSDS-PAGEにより分離し、ニトロセルロースフィルター（Novex）にトランスファーした。ウエスタン分析を、HRP結合抗V5抗体（Invitrogen）およびECL検出システム（Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ）を用いる標準方法により実施した。

【0320】

予測Mrを有する1つのバンドを、pFGF-CXで形質移入した293細胞由来の培養上清で同定した（図1A、レーン1）。対照ベクターで形質移入した細胞由来の培養上清は、抗体と反応しなかった（図1A、レーン5）。スラミン処置の後、有意な量のFGF-CXが、細胞表面/ECMから実際に放出されることがわかった。このことは、HSPGがこのタンパク質の隔離において働きそうであることを示す（図1A、レーン2）。これらの結果は、HGF-CXが古典的なシグナルペプチドを伴わず分泌され得ることを示す。

【0321】

組換えFGF-CXタンパク質は、DNA合成、細胞増殖、細胞表面受容体へのFGF-CXの高親和性結合を経由して仲介され、およびHSPGとの低親和性相互作用を経由して調節されるべき作用を刺激する。スラミン抽出物のデータは、FGF-CXが細胞表面および/またはECMに存在するHSPGに結合することを示す。

【0322】

b) シグナルペプチドを伴う発現
タンパク質分泌を増強するゴールで、FGF-CX cDNAをIg 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共にインフレームで融合させた、構造（pCEP4/Sec-FGF-CX）を生成した。結果として得られるタンパク質はまた、pFGF-CXについて上述したようにカルボキシ末端のV5およびポリヒスチジン標識を含有していた。293細胞への形質移入に続き、約31kDaの予測Mrを有するタンパク質産物を得た。スラミンが有意な量の解離FGF-CXタンパク質を放出することが再び分かった（図1A、レーン3および4）。予測した様に、pCEP4/Sec-FGF-CXは、pFGF-CXより可溶性の高いFGF-CXタンパク質を生成した。

293細胞について上述したものと同様の結果を、NIH3T3細胞でも得た（図1B）。

【0323】

実施例8 . PCRによるFGF-CX核酸のリアルタイム定量的発現解析
様々なクローンの定量的発現を、41の正常試料および55の腫瘍試料（多くの場合、図4のパネルAおよびBにおいて表す試料が、表14において同定されたものである。）において、Perkin-Elmer Biosystems ABI PRISM [登録商標] 7700配列検出システムで実施するリアルタイム定量的PCR（TAQMAN [登録商標] 分析）により評価した。表14において、以下の略語を用いた：

ca . = 癌腫

* = 転移から確立された

s cell var = 小細胞変異体

10

20

30

40

50

non-s = non-sm = 非小細胞
 squam = 扁平上皮
 pl. eff = pl effusion = 胸膜浸出液
 glio = 神経膠腫
 astro = 星細胞腫、および
 neuro = 神経芽細胞腫

【0324】

第1に、96 RNA 試料を アクチンおよびグリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素 (GAPDH) に対して標準化した。RNA (~50 ng トータルまたは ~1 ng poly A⁺) を、TAQMAN [登録商標] 逆転写試薬キット (PE Biosystems, Foster City, CA; カタログ番号 N808-0234) および製造元のプロトコールによるランダム6量体化を用いて cDNA に転換した。反応を、20 μl で実行し、30 分間、48 °C でインキュベートした。cDNA (5 μl) を次に、製造元のプロトコールにより、アクチンおよび GAPDH TAQMAN [登録商標] アッセイ試薬 (PE Biosystems; それぞれ、カタログ番号 4310881E および 4310884E) および TAQMAN [登録商標] universal PCR Master Mix (PE Biosystems; カタログ番号 4304447) を用いる TAQMAN [登録商標] 反応のための分離プレートに移した。反応を、以下のパラメーターを用いて 25 μl 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 スケールを用いる CT 値 (与えられた試料が蛍光の閾値を横切るサイクル) として、与えられた試料と CT の値に対して 2 として表される最も低い CT 値を有する試料との RNA 濃度の差で記録した。パーセント比較発現を、次にこの RNA の差の逆数を求め、かつ 100 倍することにより得られた。アクチンおよび GAPDH について得られた平均 CT 値を用いて、RNA 試料を標準化した。最も高い CT 値を生成する RNA 試料は、さらなる希釈を必要としない一方で、他の全部の試料を - アクチン / GAPDH 平均 CT 値によりこの試料と比べて希釈した。

【0325】

標準化 RNA (μl) を cDNA に変換して One Step RT-PCR Master Mix Reagent (PE Biosystems; カタログ番号 4309169) および製造元の指示により遺伝子特異的なプライマーを用いる TAQMAN [登録商標] を経由して分析した。プローブおよびプライマーを、Perkin Elmer Biosystem のプライマー発現ソフトウェアパッケージ (version 1 for Apple Computer's Macintosh Power PC) により、クローン 10326230.0.38 の配列を入力として用いて互いのアッセイのためデザインした。デフォルト設定を反応条件のために用いて、以下のパラメーターをプライマー選択の前に設定した: プライマー条件 = 250 nM、プライマーメルティング温度 (T_m) 範囲 = 58 ~ 60 °C、プライマー最適 T_m = 59 °C、最大プライマー温度差 = 2 °C、プローブが 5' G を有さない、プローブ T_m がプライマーの T_m より 10 °C 高くなければならない、増幅サイズが 75 bp ~ 100 bp である。選択したプローブおよびプライマー (以下を参照) を Synthege n (Houston, TX, USA) により合成した。プローブを HPLC により二重精製して、未結合のダイを取り除き、質量分析法により評価して、プローブの 5' 末端および 3' 末端、それぞれに対する受容体とクエンチャーダイとのカップリングを示した。それらの最終濃度は、順方向プライマーおよび逆方向プライマーがそれぞれ 900 nM、およびプローブが 200 nM であった。

【0326】

PCR のため、それぞれの組織および細胞株由来の標準化 RNA を 96 穴 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 (1つは FGF-CX に特異的であり、2つめは内部標準として機能する遺伝子特異的プローブ) を含む PCR カクテルを PE Biosystems 7700 の 1 x TaqMan [登録商標] PCR Master Mix を用いて、5 mM MgCl₂、dNTPs (1:1:1:2 の割合の dA、G、C、U)、0.25 U/ml AmpliTaq Gold [登録商標] (PE Biosystems)、および 0.4 U/μl RNase インヒビター、および 0.25 U/μl 逆転写酵素

で設定した。逆転写を、48 で30分間のあと、以下のような：95 10分、次に95 15秒、60 1分の40サイクルの増幅 / PCRサイクルにより実施した。

【0327】

表14 . TaqMan 発現解析において用いた組織試料

【表18】

No.	組織試料	No.	組織試料
1	内皮細胞	49	腎臓癌腫 786-0
2	内皮細胞 (処置)	50	腎臓癌腫 A498
3	膵臓	51	腎臓癌腫 RXF 393
4	膵臓癌腫 CAPAN 2	52	腎臓癌腫 ACHN
5	脂肪	53	腎臓癌腫 UO-31
6	副腎	54	腎臓癌腫 TK-10
7	甲状腺	55	肝臓
8	唾液腺	56	肝臓(胎児)
9	脳下垂体	57	肝臓癌腫(肝芽腫)HepG2
10	脳(胎児)	58	肺
11	脳(全体)	59	肺(胎児)
12	脳(扁桃体)	60	肺癌腫(小細胞) LX-1
13	脳(小脳)	61	肺癌腫(小細胞)NCI-H69
14	脳(海馬)	62	肺癌腫(小細胞変異体)SHP-77
15	脳(視床下部)	63	肺癌腫(大細胞)NCI-H460
16	脳(黒質)	64	肺癌腫(非小細胞)A549
17	脳(視床)	65	肺癌腫(非小細胞)NCI-H23
18	脊髄	66	肺癌腫(非小細胞)HOP-62
	CNS 癌腫		
19	(星細胞腫/神経膠腫)U87-MG	67	肺癌腫(非小細胞)NCI-H522
	CNS 癌腫(星細胞腫/神経膠腫)		
20	U-118-MG	68	肺癌腫(扁平上皮細胞)SW900
21	CNS 癌腫(神経膠腫)SW1783	69	肺癌腫(扁平上皮細胞)NCI-H596
22	CNS 癌腫*(神経芽細胞腫;転移)	70	乳腺
23	CNS 癌腫(神経膠腫)SF-539	71	乳癌腫*(胸膜浸出液)MCF-7
			乳癌腫*(胸膜浸出液)
24	CNS 癌腫(神経膠腫)SNB-75	72	MDA-MB-231
25	CNS 癌腫(星細胞腫)SNB-19	73	乳癌腫(胸膜浸出液)T47D
26	CNS 癌腫(星細胞腫)U251	74	乳癌腫 BT-549
27	CNS 癌腫(星細胞腫)SF-295	75	乳癌腫 MDA-N
28	心臓	76	卵巣
29	骨格筋	77	卵巣癌腫 OVCAR-3
30	骨髄	78	卵巣癌腫 OVCAR-4
31	胸腺	79	卵巣癌腫 OVCAR-5
32	脾臓	80	卵巣癌腫 OVCAR-8
33	リンパ節	81	卵巣癌腫 IGROV-1
34	大腸(上行結腸)	82	卵巣癌腫*(腹水)SK-OV-3
35	胃	83	子宮筋
36	小腸	84	子宮
37	大腸癌腫 SW480	85	胎盤
38	大腸癌腫(SW480 転移)SW620	86	前立腺
39	大腸癌腫 HT29	87	前立腺癌腫*(骨転移)PC-3
40	大腸癌腫 HCT-116	88	精巣
41	大腸癌腫 CaCo-2	89	黒色腫 Hs688(A).T
42	大腸癌腫 HCT-15	90	黒色腫(転移)Hs688(B).T
43	大腸癌腫 HCC-2998	91	黒色腫 UACC-62
44	胃癌腫*(肝臓転移)NCI-N87	92	黒色腫 M14

表 1 4 の続き

【表 1 9】

45	膀胱	93	黒色腫 LOX IMVI
46	気管	94	黒色腫*(転移)SK-MEL-5
47	腎臓	95	黒色腫 SK-MEL-28
48	腎臓 (胎児)	96	黒色腫 UACC-257

【0329】

本発明において開示される線維芽細胞成長因子 20 様遺伝子は、少なくとも以下の組織において発現する：哺乳動物組織、大腸、肺、脳、肝臓、腎臓、および胃。発現情報は、CuraGen ACC 番号 CG 5 3 1 3 5 - 0 2 の配列の誘導において含まれる配列の組織供給源由来であった。 10

【0330】

以下のプライマーおよびプローブをデザインした。それぞれ、FGF-CX に特異的であるために、非常に相同であるヒト FGF-9 および FGF-16 遺伝子の対応する領域の 3 つのミスマッチの最小値を有する。セット Ag 8 1 b は、表 1 の塩基 270 ~ 塩基 343 (配列番号：1) 由来の領域を覆う。それは他の既知の FGF ファミリーメンバーを決して検出しない。利用したプライマーおよびプローブは：

Ag 8 1 b (F) : 5' - GGACCACAGCCTCTTCGGTA - 3' (配列番号：18) ; 20

Ag 8 1 b (R) : 5' - TGTCCACACCTCTAATACTGACCAAG - 3' (配列番号：19) ; および

Ag 8 1 b (P) : 5' - FAM - CCCACTGCCACACTGATGAATTCCAAT - 3' (配列番号：20) である。

【0331】

代表的な実験結果を図 4、パネル A および B において示す。発現を、最も高いレベルの発現を示す試料のパーセンテージとしてプロットする。4 回の反復実施を行い、様々な斜線であらわした。調べた 39 のヒト正常組織において、FGF-CX は、脳、特に小脳において最も高発現することが分かった (図 4、パネル A および B)。中枢神経系の他の組織は、ずっと低いレベルの FGF-CX を発現した。調べた 54 のヒト腫瘍細胞のうち、FGF-CX は、肺癌腫細胞株 (LX-1)、大腸癌腫細胞株 (SW-480)、大腸癌細胞株および転移 (SW480) および胃癌腫細胞株 (NCI-N87 ; 図 4、パネル A および B を参照) において、最も高発現することがわかった。 30

【0332】

別のリアルタイム発現分析を、手術において得た腫瘍組織の広範なパネルで行った。これらの組織は、実際の腫瘍本体から得られた部分、らびに「正常隣接組織 (NAT)」と名付けられた部分を含む、典型的に既に炎症しており異形性の組織学的な証拠を示す。FGF-CX に特異的であるように選択されたプライマーとプローブのセット (Ag 8 1) を、かかる外科手術の組織試料での TaqMan 実験において用いた。2 度の反復実施を行った： 40

Ag 8 1 (F) : 5' - AGG C A G A A G C G G G A G A T A G A T - 3' (配列番号：21) ;

Ag 8 1 (R) : 5' - A G C A G C T T T A C C T C A T T C A C A A T G - 3' (配列番号：22) ; および

Ag 8 1 (P) : T E T - 5' - C C A T C T A C A T C C A C C A C C A G T T G C A G A A - 3' - T A M R A (配列番号：23)

【0333】

セット Ag 8 1 は、表 1 の塩基 477 ~ 塩基 554 (配列番号：1) 由来の領域を覆う。複製を。図 4、パネル C および D においてグレーおよび黒の斜線として示す。結果は、腫 50

瘍とそれらの形質異常 N A T 試料の多くの対応ペアについて、F G F - C X は、N A T において高発現するが、腫瘍においては発現しないこと；さらに特異的には、腫瘍に隣接する実質細胞においては発現することを劇的に示す。この対応パターンが生じる実施例は、卵巣癌、子宮癌、肺癌、前立腺癌および肝臓癌を含む。

【0334】

それにより制限されることなく、図4における結果、パネルCおよびパネルDから、F G F - C X が腫瘍上皮および/または宿主組織中の他の成分（内皮細胞、胃線維芽細胞、非浸潤上リンパ球、および類似の細胞タイプ）のパラクリン刺激による腫瘍進行の原因となり得ることがわかる。同じく、F G F - C X は、オートクライン方法でのF G F - C X 合成または分泌する宿主組織中の成分を刺激するために機能しうる。これらの宿主成分細胞は、腫瘍成分で引き続いてふるまう。

10

【0335】

F G F - C X の高発現特徴は、腫瘍進行の予測する働きまたは促進する働きをする非対応正常組織に関係する。それゆえ、多くの標的アプローチ（制限されない例として、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、同族受容体とのF G F - C X の相互作用を中和するペプチド、およびF G F - C X の未同定受容体を調節する小薬を含む。）のいずれかを用いるF G F - C X の治療標的を予測し、標的は疾病の進行へのポジティブな治療の影響を有する。同じく、腫瘍進行でのF G F - C X の生物活性を調節するような物質の使用を予測し、通常の化学療法および放射線療法にシナジーを与えるか、または増強させる。F G F - C X の治療標的が適用される特異的な疾病の同一性は、大腸、前立腺、胚、腎臓、子宮、乳房、膀胱、卵巣の腺癌を含む

20

【0336】

実施例9．組換えF G F - C X によるプロモデオキシウリジン取込刺激

293EBNA細胞（Invitrogen）を、製造元のプロトコール（Life Technologies, Gaithersburg, MD）により、Lipofectamine 2000を用いて形質移入した。細胞を、形質移入後の5時間、10%子ウシ血清（FBS; Life Technologies）で補った。BrdUおよび成長アッセイ（実施例10）のタンパク質を生成するために、細胞を洗浄し、形質移入後18時間、ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM; Life Technologies）を与えた。48時間後、培地を除去し、細胞単層を0.5ml DMEM中100μMスラミン（Sigma, St. Louis, MO）で、30分、4でインキュベートした。スラミン抽出培養上清を、次に取り除き、遠心分離（5分；2000×g）により明らかにして、製造元の指示により、カルボキシ末端ポリヒスチジン標識を利用するTALONメタルアフィニティークロマトグラフィー（Clontech, Palo Alto, CA）の対象とした。保留融合タンパク質を、イミダゾールでのカラム洗浄により放出させた。

30

【0337】

F G F - C X タンパク質濃度を、既知の濃度のV5標識タンパク質で作成された標準曲線を用いるウエスタン分析により推定した。ウエスタン分析のため、培養上清を形質移入後48時間で回収し、細胞単層を、100μMのスラミンを含有する0.5mlのDMEMで、30分間4でインキュベートした。スラミン含有培養上清を次に回収した。

【0338】

対照タンパク質を生成するために、293-EBNA細胞を、pCEP4プラスミド（Invitrogen）で形質移入し、上でアウトラインを記載した精製方法の対象とした。

40

【0339】

組換えF G F - C X を、DNA合成を誘導する能力についてプロモデオキシウリジン（BrdU）取込アッセイにおいて試験した。NIH3T3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ウエルプレートにて100%の密集度まで培養し、DMEMで洗浄し、DMEM中で24時間（NIH3T3）または48時間（CCD-1070skおよびMG-63）血清飢餓状態にした。組換えF G F - C X または対照タンパク質を、次に細胞に1

50

8時間添加した。BrdUアッセイを、製造元 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN) の説明により、5時間BrdU取込時間を用いて実施した。

【0340】

FGF-CXが、NIH3T3マウス線維芽細胞において $\sim 5 \text{ ng/ml}$ の最大半分の濃度で、DNA合成を誘導することが分かった (図5のパネルA)。対照的に、対照ベクターで形質移入した細胞から精製したタンパク質は、DNA合成を誘導しなかった。FGF-CXが、BrdU取込により決定された様に、CCD-1070sk正常ヒト皮膚線維芽細胞 (図5、パネルB)、CCD-1106ケラチノサイト (図5、パネルC)、MG-63骨肉腫細胞 (データは示していない)、および乳房上皮細胞を含む様々なヒト細胞株での比較可能な投与レベルで、DNA合成を誘導することも分かった。

10

【0341】

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を決定するため、NIH3T3細胞を6ウェルプレート中で50%の密集度まで培養し、DMEMで洗浄し、組換えFGF-CXまたは対照タンパク質を含有するDMEMを48時間与え、次にカウントした。細胞数を、細胞をトリプシン処理し、Beckman Coulter Z1シリーズのカウンター (Beckman Coulter, Fullerton, CA) でカウントすることにより決定した。このアッセイにおいてFGF-CXが、対照タンパク質と比べ細胞数で約3倍の増加を誘導することが分かった (図6)。

【0342】

増殖での形態的变化を測定するために、NIH3T3細胞をDMEM/2%子ウシ血清中の組換えFGF-CXまたは対照タンパク質で処理し、Zeiss Axiovert 100顕微鏡 (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY) で写真撮影した。

20

【0343】

より高い細胞密度 (図6) にいたることに加えて、実施例9で記載した様に調製したFGF-CXの存在下で培養したNIH3T3細胞は、接触障害の減少を示す、成長の整理されていないパターンを表した (図7)。さらに、個々の細胞は、細長くかつ屈折していることが分かった。これらの結果は、FGF-CXが成長因子としてふるまうことを示し、組換えFGF-CXがNIH3T3細胞の形態的な形質転換を仲介することを示す。

【0344】

実施例11. ノードマウスでの異所性FGF-CXで形質移入されたNIH3T3細胞による腫瘍形成

30

NIH3T3細胞を、製造元のプロトコール (Life Technologies) により、Lipofectamine Plusを用いて、pCEP4/Sec-FGF-CXまたは対照ベクターで形質移入した。細胞に形質移入後5時間で、10%子ウシ血清 (CS; Life Technologies) を添加した。pCEP4/Sec-FGF-CXで形質移入された細胞は、形質移入後48時間までに形態的に形質転換され、ハイグロマイシン含有成長培地中でのセレクションの2週間後でも残っていることがわかった。対照的に、対照ベクターで形質移入された細胞は、正常な形態を保持していた (データは示していない)。従って、形質移入された細胞は、例えば、実施例10において報告した実験に基づいて予測される様にふるまう。

【0345】

異所性腫瘍の誘導を研究するために、NIH3T3細胞を、様々な実験ベクターおよび対照ベクターで形質移入した。形質移入後2日で、細胞を、DMEM/5%CS (pFGF-CXで形質移入した細胞用) または $500 \mu\text{g/ml}$ のハイグロマイシンBを添加したDMEM/10%CS (pSEP4/Sec-FGF-CXで形質移入した細胞) のいずれかに置いた。培養2週間後、半分密集した細胞をトリプシン処理し、DMEM/10%で中和し、PBSで洗浄してカウントした。PBS中の100万個の細胞を、メス胸腺欠損ノードマウス (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) の側方皮下組織に注入した。

40

【0346】

NIH3T3細胞を、FGF-CX発現プラスミド (pFGF-CXおよびpIg FGF-CX) またはそれらの適当な対照ベクターで形質移入した。FGF-CX発現ベク

50

ターのいずれかで形質移入された細胞を、形質移入後48時間までに形態学的に形質転換し(データは示していない)、組換えFGF-CXにさらされた後に生成されたものと類似のフェノタイプを有することが分かった(図6)。対照的に、対照ベクターで形質移入された細胞は、正常な形態を保持していた(データは示していない)。

【0347】

FGF-CXの異所性発現がインビボにおいてNIH3T3細胞の腫瘍形成を誘導するかを決定するために、安定な形質移入体を生成し、ヌードマウスの皮下に注入した。11日までに、pFGF-CXまたはpig-FGF-CXのいずれかで形質移入した細胞で注入した全ての動物が、14日までに急激な腫瘍サイズの増大を有し、一方で、対照細胞で注入された動物のいずれもが2週間までに腫瘍を発生しなかった(図8)。対照処理を受けたあるマウスおよびFGF-CXベクターで形質移入した細胞を受けた別のマウスの写真を、図9に示す。これらの結果は、FGF-CX遺伝子を有するベクターとの形質移入により形質移入された細胞が、インビボでの腫瘍発生および腫瘍成長を促進することを示す。

10

【0348】

実施例12.FGF-CXの発現

FGF-CXは、実施例6において記載される様に、本来発現する。タンパク質を、Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製し、還元条件と非還元条件下のSDS-PAGEの対象とし、クーマシーブルーを用いて染色した。結果を、図10において示す。それは、両方の条件下で見られ、タンパク質は、約29~30kDaの見かけ上の分子量と共に移動する。

20

【0349】

実施例13.組換えFGF-CXによるプロモでオキシウリジン取込刺激

BrdUの取込についての用量反応実験を、ヒト腎臓癌腫細胞(786-0; American Type Culture Collection, Manassas, VA)を用いて行った。結果を図11において示す。FGF-CXは、「20858」と名付けられる。FGF-CXは、約2.5ng/mlである半分作用する用量で対照よりは4倍より多く、腎臓癌腫細胞の増殖を刺激することが分かる。

【0350】

実施例14.FGF-CXで形質移入された細胞でのインビトロでの病巣形成

培養における異所性FGF-CX発現の細胞成長への作用を評価するために、NIH3T3細胞を、FGF-CX発現プラスミド(図12においてpFGF-20およびpig-FGF-CX-20として同定した。実施例7を参照)または対照ベクターで形質移入した。NIH3T3細胞を、製造元のプロトコール(Life Technologies)により、Lipofectamine-Plusを用いて形質移入した。細胞を、形質転換後5時間で10%子ウシ血清(CS; Life Technologies)で補足した。形質移入後2日で、細胞を、90mmディッシュに移し、子ウシ血清をプラスしたDMEMで2週間培養した。細胞を、次に0.2%クリスタルヴァイオレット/70%エタノール溶液で染色し、写真撮影した。90mmディッシュそれぞれは、1.5μgのプラスミドDNAで形質移入された35mmディッシュ由来の細胞の半分を表す。

30

40

【0351】

2つのFGF-CX発現ベクターいずれかで形質移入された細胞は、形質移入後約2週間で形態的に形質導入された細胞の病巣を生成するが、一方で対照ベクターで形質移入された細胞は正常形態を維持していることがわかった(図12)。pig-FGF-20構造は、密集に起因し、見られるイメージにおいて小さい病巣の形成において、pFGF-20構造より有意により効率的であるように改善した(図12参照)。

【0352】

実施例15.FGF-CXの受容体結合特異性

線維芽細胞成長因子(FGF)は、形態形成、細胞の分化、血管形成、組織リモデリング、炎症、腫瘍形成を含む様々な機能において重要な働きをする。FGFは、普通の3次構

50

造を有する保存120アミノ酸FGFコアドメインを含有する。FGFシグナル伝達を、一般に膜貫通型チロシンキナーゼ受容体の活性化により生じると予測する。FGFR1ないしFGFR4である、4つの受容体を同定し、活性化受容体変異または不活性化受容体変異を、マウスおよびハムスターの両方でこれらの遺伝子のサブセットについて記載した。

【0353】

FGF-CXの受容体結合特異性を測定するために、組換えFGF-CXによりNIH3T3細胞でのDNA合成の誘導への可溶性FGF-CX受容体(FGFR)の作用を調べた。4つの受容体を、今日までに同定した(Klint P and Claesson-Welsh L. *Front. Biosci.*, 4: 165-177, 1999; Xu X, et al. *Cell Tissue Res.*, 296: 33-43, 1999)。FGFR1 (IIIc)、FGFR2 (IIb)、FGFR2 (IIb)、FGFR2 (IIIc)、FGFR3 (IIIc)およびFGFR4の可溶性受容体を利用した。これらFGFRのそれぞれの可溶性型は、FGF-CXの生物学的活性化を特異的に阻害できることが分かった(図13を参照)。完全阻害またはほぼ完全な阻害を、可溶性FGFR2 (IIb)、FGFR2 (IIb)、FGFR2 (IIIc)、およびFGFR3 (IIIc)で得たが、一方で、部分的な阻害を、可溶性FGFR1 (IIIc)およびFGFR4で成し遂げた。可溶性受容体物質のいずれもが、それにより、それらの特異性を示す、PDGF-BBによるDNA合成の誘導での妨害をしなかった。それぞれの可溶性受容体物質の完全性を、分析下ですべてのFGFRと相互作用すると知られている因子であるaFGF(酸性FGF)によるDNA合成の誘導を阻害する能力を示すことにより示した。

10

20

【0354】

実施例16. FGF-CXのN末端欠損型のクローニングおよび発現

プラスミドpET24a-FGF20X-del154コドン(Invitrogen)を、LB培地中で、37°Cで成長させた。このプラスミドは、位置55で宿すFGF-CXのC末端部分をコード化する。細胞の密集度が0.6ODに達したときに、IPTGを最終濃度1mMになるように加えた。誘導培養液を、次に追加の4時間、37°Cでインキュベートした。細胞を、3000×g、15分間、4°Cでの遠心分離により回収し、PBSに懸濁し、次にマイクロ流動化(microfluidizer)を介して2つの層で分離した。可溶性タンパク質および非可溶性タンパク質を分離するために、溶解物を、10,000×g、20分間、4°Cで遠心分離の対象とした。非溶解性分画(ペレット)を、1M Lアルギニン含有するPBSで抽出した。残存非可溶性物質を、次に遠心分離により除去し、アルギニン抽出の可溶性分画を、0.2μg低タンパク質結合膜を介してフィルター処理し、SDS-PAGEにより分析した。結果を、産物が約20kDaの見かけ上の分子量(矢印参照)を有するポリペプチドであることを示す図14に示す。発現ポリペプチドのN末端配列決定は、FGF-CXの残基55~69(表1、配列番号:2)に100%同一である配列AQLAHLHGILRRRQLを提供する。

30

【0355】

実施例17. FGF-CXの切断型に対する応答でのNIH3T3細胞へのプロモデオキシウリジン取込刺激

FGF-CXの残基24~211((d1~23)FGF-CX;表1および配列番号:2)を発現するベクターを調製した。この切断型を取り込むベクターを用いて得た条件培地で処理したNIH3T3細胞によるBrdUの取込を、全長FGF-CXをコード化するベクターを用いて条件培地での処置への応答での取込と比較した。この実験を実施例9において記載した様に行った。

40

【0356】

結果を、図15において示す。(d1~23)FGF-CXは、最も低濃度10ng/mlで試験した場合に高活性を維持する。この濃度で、全長FGF-CXの活性は、非常に低下し、対照のレベルに接近する。(d1~23)FGF-CXは、全長FGF-CXより少なくとも5倍の活性化であり得ることを推定する。

【0357】

50

実施例 18 . F G F - C X 変異体 C G 5 3 1 3 5 - 0 2 のクローニングおよび発現
線維芽細胞成長因子 20 様タンパク質の変異体をコードするヌクレオチド配列は、受託
番号 C G 5 3 1 3 5 - 0 2 と関連し、同定された。受託番号 C G 5 3 1 3 5 - 0 2 の配列
は、配列のコンピューターでの予測による c D N A フラグメントの実験室でのクローニン
グによりもたらされた。D N A 配列の全長または配列の一部のいずれか、または両方を覆
う c D N A フラグメントをクローン化した。コンピューターでの予測は、C u r a G e n 専
売配列データベースまたは公開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、
全長 D N A 配列、またはそれらのいくつかの部分のいずれかを提供した。実験室のクロー
ニングを、以下に要約する 1 またはそれ以上の方法を用いて実行した。

【 0 3 5 8 】

SeqCalling [登録商標] 技術 : c D N A は、多様な組織タイプ、正常および疾病状態、病
態、および異なるドナー由来の発生状態を表す様々なヒト試料からもたらされた。試料を
、全体として、一次細胞または一次細胞または細胞株を培養した組織として得た。細胞お
よび細胞株を、遺伝子発現を制御する生物学的物質または化学的物質、例えば、成長因子
、ケモカイン、またはステロイドで処理した。従って、もたらされた c D N A を C u r a
G e n の専売 SeqCalling 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、適切
な場合、訂正のため編集した。時としてヒト公開配列を含む、全試料由来の c D N A 配列
を、互いのアセンブリーのための共通配列を生むためのバイオインフォマティックプログ
ラムを用いて、一緒に集めた。それぞれのアセンブリーを、C u r a G e n コーポレーシ
ョンのデータベースに含む。配列を、互いの成分との同一性の伸展が少なくとも 5 0 b p
を超える 9 5 % である場合、アセンブリーのための成分として含んだ。それぞれのアセン
ブリーは、遺伝子またはそれらの部分を表し、スプライスフォーム 1 塩基多型 (S N P)
、挿入、欠損および他の配列変異体のような、変異体の情報を含む。

【 0 3 5 9 】

エキソン結合 : C G 5 3 1 3 5 - 0 2 配列をコードする c D N A を、プライマー : 5 ' -
A G G T C A C C A T G G C T G T T A T T G G C - 3 ' (配列番号 : 2 6) および 5 '
- C T G T C T G T C C T C A G A A G A A G T T C T T G A T C - 3 ' (配列番号 : 2
7) を用いるポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によりクローン化した。プライマーを、本
発明の c D N A / タンパク質配列の全長またはある部分 (1 またはそれ以上のエキソン)
のコンピューターでの予測に基づいてデザインした。これらのプライマーを用いて、以下
の組織由来の発現ヒト配列を含有するプールから c D N A 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 - 全体、胎児の脳、胎児の腎臓、
胎児の肝臓、胎児の肺、心臓、腎臓、リンパ腫 - R a j i、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。

【 0 3 6 0 】

多数のクローンを配列決定し、時として公開ヒト配列を含むこれらのフラグメントを、互
いのアセンブリーのため共通配列を生むためのバイオインフォマティックプログラムを用
いて一緒に集めた。それぞれのアセンブリーは、C u r a G e n のデータベースに含まれ
る。配列を、互いの成分との同一性の伸展が、少なくとも 5 0 b p を超える 9 5 % である
場合、アセンブリーのため成分として含まれる。互いのアセンブリーは、それらの遺伝子また
はタンパク質を表し、スプライスフォーム 1 塩基多型 (S N P)、挿入、欠損および他の
配列変異体のような変異体の情報を含む。

【 0 3 6 1 】

物理的クローン : 全オープンリーディングフレームを覆う、エキソン結合によりもたらさ
れた P C R 産物を、クローン 1 3 7 6 2 7 : : 1 6 0 0 8 3 8 7 4 . A 9 を提供するため
に Invitrogen の p C R 2 . 1 ベクターにクローン化した。

【 0 3 6 2 】

新規線維芽細胞成長因子 20 様遺伝子の D N A 配列およびタンパク質配列を、エキソン結
合により得た。C u r a G e n 受託番号 C G 5 3 1 3 5 - 0 2 として本明細書において報
告する。

10

20

30

40

50

【0363】

新規線維芽細胞成長因子20様タンパク質(配列番号:29)をコード化する540ヌクレオチド(CuraGen受託番号CG53135-02と名付けられた)の新規核酸(配列番号:28)を、表15に示す。オープンリーディングフレームを、ヌクレオチド1~3で始まり、ヌクレオチド538~540で終わることを同定した。このポリペプチドは、新規線維芽細胞成長因子20様タンパク質を表す。オープンリーディングフレームの開始コドンおよび停止コドンは、太字で強調する。推定の非翻訳領域(下線)は、もしあれば、開始コドンから上流および終止コドンから下流で見つかる。179アミノ酸残基を有するコード化タンパク質を、表16において1文字コードを用いて表す。

【0364】

表15. 本発明の線維芽細胞成長因子20様タンパク質をコード化するヌクレオチド配列(配列番号:28)

【表20】

```

>CG53135-02
ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGGGCTTTCTGGGGCGGCCTGGAGGGCTTGGGCCAGCCG      60
GGGGCAGCGCAGCTGGCGCACCTGCACGGCATCCTGGCGCCCGGCAGCTCTATTGCCGC      120
ACCGGCTTCCCACTGCAGATCCTGCCCGACGGCAGCGCGCAGGGCACCCGGCAGGACCAC      180
AGCCTCTTCGGTATCTTGGAAATTCATCAGTGTGGCAGTGGGACTGGTCAGTATTAGAGGT      240
GTGGACAGTGGTCTCTATCTTGGAAATGAATGACAAAGGAGAACTCTATGGATCAGAGAAA      300
CTTACTTCCGAATGCATCTTTAGGGAGCAGTTTGAAGAGAACTGTATAACACCTATTCA      360
TCTAACATATATAAACATGGAGACACTGGCCCGCAGGTATTTTGTGGCACTTAACAAAGAC      420
GGAACTCCAAGAGATGGCGCCAGGTCCAAGAGGCATCAGAAATTACACATTCTTACCT      480
AGACCAGTGGATCCAGAAAGAGTTCAGAAATGTACAAGGACCTACTGATGTACACTTAG      540

```

10

20

【0365】

表16. 上記の表15において示されたヌクレオチド配列によりコード化されるタンパク質配列(配列番号:29)

【表21】

```

>CG53135-02
MAPLAEVGGFLGGLLEGLGQPGAAQLAHLHGILRRRQLYCRITGFHLQILPDGSAQGTRQDH
SLFGILEFISVAVGLVSIKRVDSGLYLGMDKGLYSGEKLTSKIFREQFEENWYNTYS
SNLYKHGDTGRRYFVALNKDGTTPRDGARSKRHQKFTFLPRPVDPERVPELYKDLLMYT

```

【0366】

配列データベース検索において、例えば、本発明の核酸配列が、Homo sapiens (FGF-20のHomo sapiens mRNA,完全コード領域)由来のgb:GENBANK ID:AB044277 | acc:AB044277.1 mRNAに同一な506のうち495塩基(97%)を有することがわかった(表10)。本発明のタンパク質の全長アミノ酸配列は、Homo sapiens(ヒト)由来の211アミノ酸残基ptnr:SWISSNEW-ACC:Q9NP95タンパク質(線維芽細胞成長因子20(FGF-20))に同一な162のうち160のアミノ酸残基(98%)を有し、類似の162のうち160のアミノ酸残基(98%)を有することが分かった(表10)。

30

【0367】

多様な配列アラインメントを、本発明のタンパク質を本発明のタンパク質を関連タンパク質配列と比較したClustalW解析において第1の線で示す、表17に示す。この配列が、位置20~51で示された様に線維芽細胞成長因子のスプライスフォームを表すことに注意されたい。

40

【0368】

表17. CG53135-02タンパク質と関連するタンパク質のClustalWアラインメント

【表22】

受託番号	一般名	長さ
CG53135-02	新規線維芽細胞成長因子20様タンパク質 (配列番号: 29)	179
CG53135-01	FGF-20X (配列番号: 2)	211
Q9NP95	FGFK_ヒト、線維芽細胞成長因子20 (配列番号: 32)	211

```

CG53135-02  MAPLAEVGGFLGGLEGLGQ-----FGAAQLAHL
CG53135-01  MAPLAEVGGFLGGLEGLGQGVGSHFLLP PAGERPPLLGERRSAEERSARGGPGAAQLAHL
FGFK_ヒト   MAPLAEVGGFLGGLEGLGQGVGSHFLLP PAGERPPLLGERRSAEERSARGGPGAAQLAHL

CG53135-02  HGILRRRQLYVRTGFHLQ;LPDGSVQGTQDHSLEFGILEFISVAVGLVSIKGVDSGLYLC
CG53135-01  HGILRRRQLYVRTGFHLQ;LPDGSVQGTQDHSLEFGILEFISVAVGLVSIKGVDSGLYLC
FGFK_ヒト   HGILRRRQLYVRTGFHLQ;LPDGSVQGTQDHSLEFGILEFISVAVGLVSIKGVDSGLYLC

CG53135-02  MNDKGEIYQSEKLTSECFREQFEEIWFYNTYSNIIYKHCDTGRRYFVALNKDGTFRDGR
CG53135-01  MNDKGEIYQSEKLTSECFREQFEEIWFYNTYSNIIYKHCDTGRRYFVALNKDGTFRDGR
FGFK_ヒト   MNDKGEIYQSEKLTSECFREQFEEIWFYNTYSNIIYKHCDTGRRYFVALNKDGTFRDGR

CG53135-02  SKRHQKFTHFLPRPVDPERVPELYEDLLMVT
CG53135-01  SKRHQKFTHFLPRPVDPERVPELYEDLLMVT
FGFK_ヒト   SKRHQKFTHFLPRPVDPERVPELYEDLLMVT

```

10

【0369】

表17において示すアラインメントにおいて、黒で輪郭を描かれたアミノ酸残基は、配列 (すなわち、構造的性質または機能的性質を保つことを必要とされ得る残基) 間で完全に保存された残基を示し; グレーの背景を伴うアミノ酸残基は、タンパク質構造または機能が変わらない (例えば、群L、V、IおよびMを類似であるとみなされる) 同程度の物理的性質および/または化学的性質を有する配列間で互いに類似である; および白の背景を伴うアミノ酸残基は、配列間で保存されないか、あるいは類似でない。

20

【0370】

本明細書において開示するタンパク質中の同定可能なドメインの存在を、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り決定し、プロリン間のドメイン受託番号により同定した。有意な一致を、表18において要約する様に、IPR002209; (HBGF_FGF)ドメインに対して見た。

30

【0371】

表18. CG53135-02のドメイン解析

【表23】

モデル	ドメイン	seq-f	seq-t	hmm-f	hmm-t	スコア	期待値
FGF	1/1	31	162 ..	1	1	146 {}	280.8 2e-81

【0372】

IPR002209; (HBGF_FGF)ヘパリン結合成長因子IおよびII (HBGF) (中胚葉起源または神経外胚葉起源の広範なパラエティーに富む細胞の成長または刺激を促進する構造上関連するマイトジェンである酸性および塩基性線維芽細胞成長因子 (FGF) としても知られる。例えば、Burgess & Maciag, 1989参照。) Annu. Rev. Biochem. 58: 575-606; Thomas 1988 Trends Biochem. Sci. 13: 327-328を参照。これらの2つのタンパク質は、成長因子ファミリーに属し、インターロイキン1タンパク質、Kunitzタイプダイズトリプシン阻害剤 (STI) およびヒスタクトフィリン (histactophilin) も含有するスーパーファミリーのメンバーである腫瘍形成に属する。

40

全てが非常に小さな構造を有するが、HBGFおよびインターロイキン1ファミリーは配列類似性 (約25%) を共有するけれど、STIに対して全く示さない。例えば、Burgess & Maciag, 1989) Annu. Rev. Biochem. 58: 575-606; Thomas 1988 Trends Biochem. S

50

ci. 13: 327-328; Heath et al. 1995 Curr. Biol. 5: 500-507; Matthews et al. 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 3441-3445; Murzin 1992 J. Mol. Biol. 223: 531-543; Gimenez-Gallego et al. 1985 Science 230: 1385-1388; Copeland et al. 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 9850-9857; および Ayres et al. 1994 Virology 202: 586-605を参照されたい。

【0373】

H B G F は、細胞の分化および成長調節に関連する多くの分化過程において含まれる。例えば、Burgess & Maciag, 1989) Annu. Rev. Biochem. 58: 575-606を参照されたい。H B G F 1 および H B G F 2 は、類似の作用を有する：それらは、胚形成での中胚葉形成を誘導し、傷修復、血管新生、神経細胞の伸長を仲介する；それらはまた、線維芽細胞、内皮細胞、およびアストログリア細胞の増殖および遊走を誘導する。H B G F 3 (i n t - 2) および H B G F 4 (h s t / k s) は、それぞれ胃癌およびカポジ肉腫由来の既知の癌遺伝子である。H B G F および H B G F 6 はまた、癌遺伝子産物である。ケラチノサイト成長因子である、H B G F 7 は、正常上皮細胞増殖の主要なパラクリンエフェクターである。

10

【0374】

これらの成長因子は、細胞内シグナル伝達を導く、それらのチロシンキナーゼ受容体上の2量体化を引き起こす。線維芽細胞成長因子の4つの既知のチロシンキナーゼ受容体が現在存在する。これらの受容体は、このファミリーのいくつかの異なるメンバーにそれぞれ結合する。例えば、Heath et al. 1995 Curr. Biol. 5: 500-507を参照されたい。

20

【0375】

H B G F 1 および H B G F 2 の結晶構造を溶解した。例えば、Matthews et al. 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88: 3441-3445を参照されたい。H B G F 1 および H B G F 2 は、インターロイキン1およびK u n i t z タイプダイズトリプシン阻害剤両方のような同一の12本鎖シート構造を有する例えば、Murzin 1992 J. Mol. Biol. 223: 531-543を参照されたい。H B G F 1 およびインターロイキン1は、類似であると分かり、類似の構造を有することを予測した。例えば、Gimenez-Gallego et al. 1985 Science 230: 1385-1388を参照されたい。シートを、抗類似パレルを形成する6本鎖である中心軸のまわりの3つの類似葉にアレンジする。H B G F 1 のいくつかの領域は、受容体結合、明白に、構造1ないし3、および鎖8と9との間のループにおいて関係する。鎖10と11との間のループは、ヘパリン結合において関係すると考える。

30

【0376】

このことは、本発明の配列がH B G F 1 様およびH B G F 2 様ドメインを含有すると知られている他のタンパク質の配列と類似する性質、かつこれらのドメインの性質に類似する性質を有することを示す。

【0377】

本発明の核酸およびタンパク質は、様々な疾病および疾患の診断および/または処置での応用を有する。例えば、本発明の組成物は、：ヒルシユスブルング病、クローン病、虫垂炎、炎症性腸疾患、憩室疾患、全身性エリトマトーデス、自己免疫疾患、喘息、肺気腫、強皮症、アレルギー、A R D S、フォンヒッペルリンドウ (Von Hippel-Lindau) (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、先天性心臓欠陥、大動脈弁狭窄、心房中隔欠損症 (A S D)、房室 (A - V) チャンネル欠損症、動脈管開存症、肺動脈弁狭窄、大動脈弁下部狭窄、心室中隔欠損症 (V S D)、弁疾患、結節性硬化症、強皮症、糖尿病、自己免疫疾患、腎動脈狭窄、間質性腎炎、糸球体腎炎、多発性嚢胞腎、全身性エリトマトーデス、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、脳梗塞、結節硬化、高カルシウム血症、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病、脳性麻痺、てんかん、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症、白質萎縮症、行動障害、依存症、不安、痛み、神経変性、ならびに他の疾病、疾患、状態を病む患者の処置に効力を有する。

40

【0378】

50

実施例 19 . F G F - C X 変異体 C G 5 3 1 3 5 - 0 6 のクローニングおよび発現
 受託番号 C G 5 3 1 3 5 - 0 6 に言及した線維芽細胞成長因子 2 0 様タンパク質 (配列番
 号 : 3 1) の変異体をコード化するヌクレオチド配列を、表 1 9 および 2 0 に示す様に同
 定した。SeqCallingアセンブリー配列を、F G F 2 0 の S N P 変異体および / または F G
 F 2 0 ファミリーのメンバーに対して類似性を有するタンパク質に翻訳される D N A 配列に
 ついての C u r a g e n コーポレーションヒトSeqCalling [登録商標] データベースの検
 索によりまず同定した。1 またはそれ以上のSeqCallingアセンブリー 1 7 4 2 0 3 2 9 9
 を、適当な類似性を有するとして同定した。上に示した表 1 1 を参照されたい。選択され
 たアセンブリーを、さらに解析して、新規全長タンパク質ならびに新規スプライスフォ
 ムをコード化する任意のオープンリーディングフレームを同定した。結果として得られた
 D N A 配列および F G F 2 0 様遺伝子の新規 S N P 変異体のタンパク質配列を、C u r a
 G e n 受託番号 C G 5 3 1 3 5 - 0 6 として本明細書において報告する。

【 0 3 7 9 】

表 1 9 . 本発明の F G F 2 0 様タンパク質 (受託番号 C G 5 3 1 3 5 - 0 6) の S N P 変
 異体をコード化するヌクレオチド配列 (配列番号 : 3 0)

【 表 2 4 】

本発明のタンパク質 (受託番号 C G 5 3 1 3 5 - 0 6)

>CG53135-06

ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGGCTTTCTGGGCGGCTGGAGGGCTGGGCCAGCCG	60
GGGGCAGCGCAGCTGGCGCACCTGCACGGCATCCTGCGCCCGGCAGCTCTATTGCCGC	120
ACCGGCTTCCACCTGCAGATCCTGCCCGACGGCAGCGTGCAGGGCACCCGGCAGGACCAC	180
AGCCTCTTCGGTATCTTGGAAATCATCAGTGTGGCAGTGGGACTGGTCAGTATTAGAGGT	240
GTGGACAGTGGTCTCTATCTTGAATGAATGACAAAGGAGAACTCTATGGATCAGAGAAA	300
CTTACTTCCGAATGCATCTTTAGGGAGCAGTTTGAAGAGAACTGGTATAACACCTATTCA	360
TCTAACATATATAAATGAGACACTGGCCGACAGGTATTTGTGGCACTTAACAAAGAC	420
GGAACTCCAAGAGATGGCGCCAGGTCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCT	480
AGACCAGTGGATCCAGAAAGAGTTCCAGAATGTACAAGGACCTACTGATGTACACTTAG	540

【 0 3 8 0 】

表 2 0 . 表 1 9 において示されたヌクレオチド配列によりコード化されるタンパク質配列
 (配列番号 : 3 1)

【 表 2 5 】

>CG53135-06

MAPLAEVGGFLGGLEGLGQPGAAQLAHLHGILRRRQLYCRTGFHLQILPDGVSQGTRODH
 SLFGILEFISVAVGLVSIKRVDSGLYLGMDKGLYKSEKLTSECFREQFEENWYNTYS
 SNIYKHGDTGRRYFVALNKDGTTPRDGARSKRHQKFTHFLPRPVDPERVPELYKDLLMYT

【 0 3 8 1 】

多型配列アラインメントを、関連タンパク質配列を有する本発明のタンパク質と比較する
 ClustalW解析での第 1 のラインに示す本発明のタンパク質を伴う表 2 1 に示す。この配列
 が C G 5 3 1 3 5 - 0 6 の位置 5 3 において示された様に F G F 2 0 の S N P を表すこと
 に注意されたい。別の S N P を、以下の実施例 2 1 において記載する。

【 0 3 8 2 】

表 2 1 . C G 5 3 1 3 5 - 0 6 タンパク質と関連するタンパク質のClustalWアラインメン
 ト

【 表 2 6 】

10

20

30

40

受託番号	一般名	長さ
Q9NP95	FGFK_ヒト、線維芽細胞成長因子20 (配列番号: 32)	211
CG53135-04	FGF-20様タンパク質スプライズバリエント (配列番号: 29)	179
CG53135-06	FGF20様タンパク質の新規 SNP 変異体 (配列番号: 31)	179

FGFK_ヒト	1	MAPLAEVGGFLGGLEGLGQ	QVGSHFLLFP	AGERPPLLGERRS	AAERSARGG	FGAAQLAHL	60
CG53135-04	1	MAPLAEVGGFLGGLEGLGQ	-----	-----	-----	FGAAQLAHL	28
CG53135-06	1	MAPLAEVGGFLGGLEGLGQ	-----	-----	-----	FGAAQLAHL	28
FGFK_ヒト	61	HGILRRRQLYCRTGFHLQI	LPDGSVQGT	RQDHSLFGI	LEFISVAVGLVSI	RCVDSGLVIG	120
CG53135-04	29	HGILRRRQLYCRTGFHLQI	LPDGSVQGT	RQDHSLFGI	LEFISVAVGLVSI	RCVDSGLVIG	88
CG53135-06	29	HGILRRRQLYCRTGFHLQI	LPDGSVQGT	RQDHSLFGI	LEFISVAVGLVSI	RCVDSGLVIG	88
FGFK_ヒト	121	MNDKGEIYGEKLTSECI	FRQFEENWYN	TYSSNI	VKHGDTGRRY	FVALNKDGTFRDGA	180
CG53135-04	89	MNDKGEIYGEKLTSECI	FRQFEENWYN	TYSSNI	VKHGDTGRRY	FVALNKDGTFRDGA	148
CG53135-06	89	MNDKGEIYGEKLTSECI	FRQFEENWYN	TYSSNI	VKHGDTGRRY	FVALNKDGTFRDGA	148
FGFK_ヒト	181	SKRHOKFTHFLRPVDP	ERVP	ELYKDLLMYT			211
CG53135-04	149	SKRHOKFTHFLRPVDP	ERVP	ELYKDLLMYT			179
CG53135-06	149	SKRHOKFTHFLRPVDP	ERVP	ELYKDLLMYT			179

10

20

30

40

40

40

40

40

【0383】

本明細書において開示されるタンパク質の同定可能なドメインの存在を、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り決定し、次にプロリン間のドメイン受託番号により同定した。有意なドメインを表22に要約する。プロリン間IPR002209FGFドメインを上述する。

【0384】

表22. CG53135-06のドメイン解析

【表27】

モデル	記載	スコア	期待値	N
FGF (InterPro)	線維芽細胞成長因子	286.8	3.4e-83	1

ドメイン解析 :							
モデル	ドメイン	seq-f	seq-t	hmm-f	hmm-t	スコア	期待値
FGF	1/1	31	162	1	146	286.8	3.4e-83

【0385】

実施例20. 最適化FGF-CXを含むFGF-CX変異体のクローニングおよび特徴別のFGF-CX変異体を、上述のようにクローン化した。ヌクレオチドおよびポリペプチドを表23~29において示す。コドン最適化FGF-CXを表25に示す。

【0386】

表23. CG53135-03のヌクレオチドおよびポリペプチド配列、コンセンサスDNA配列

【表28】

>CG53135-03 636 nt
 ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGGCTTTCTGGGCGGCCTGGAGGGCTTGGGCCAGCAG
 GTGGGTTTCGCAATTCCTGTTGCCTCCTGCCGGGAGCGGCCCGCTGCTGGGCGAGCGC
 AGGAGCGCGGCGGAGCGGAGCGCGCGCGGGGGCGGGGGTGCAGCTGGCGCACCTG
 CACGGCATCCTGCCCGCCGGCAGCTCTATTGCCGACCGGCTTCCACCTGCAGATCCTG
 CCCGACGGCAGCGTGCAGGGCACCCGGCAGGACCACAGCCTCTTCCGGTATCTTGGAAATC
 ATCAGTGTGGCAGTGGGACTGGTTCAGTATTAGAGGTGTGGACAGTGGTCTCTATCTTGG
 ATGAATGACAAAGGAGAACTCTATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAATGCATCTTAGG
 GAGCAGTTTGAAGAGAACTGGTATAACACCTATTTCATCTAACATATATAAACATGGAGAC
 ACTGGCCGCGAGGTATTTTGTGGCACTTAACAAAGACGGAATCCAAGAGATGGCGCCAGG
 TCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCTAGACCAGTGGATCCAGAAAGAGTT
 CCAGAAATGTACAAGGACCTACTGATGTACACTTGA (配列番号: 33)

タンパク質配列 : ORF 開始 : 1 ORF 停止 : 634フレーム: 1

>CG53135-03-prot 211 aa
 MAPLAEVGGFLGGLGGLGQQVGSHPFLPPAGERPPLLGERRSAAERSARGGPGAAQLAHL
 HGILRRRQLYCRTFHLLQILPDGSSVQGTQRDHSLEFIFISVAVGLVSIIRGVDSGLYL
 MNDKGELYGSEKLTSECIIFREQFEENWYNTYSSNIYKHGDTGRRYFVALNKDGTPRDGAR
 SKRHQKFTHFLPRPVDPERVPELYKDLLMYT (配列番号: 34)

10

【0387】

表24. CG53135-04のヌクレオチドおよびポリペプチド配列: コンセンサスDNA配列:

【表29】

>CG53135-04 540 nt
 ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGGCTTTCTGGGCGGCCTGGAGGGCTTGGGCCAGCCG
 GGGGCGCGCAGCTGGCGCACCTGCACGGCATCCTGCCCGCCGGCAGCTCTATTGCCGC
 ACCGGCTTCCACCTGCAGATCCTGCCCGACGGCAGCGCGAGGGCACCCGGCAGGACCAC
 AGCCTCTTCCGGTATCTTGGAAATTCATCAGTGTGGCAGTGGGACTGGTCAGTATAGAGGT
 GTGGACAGTGGTCTCTATCTTGGAAATGAATGACAAAGGAGAACTCTATGGATCAGAGAA
 CTTACTTCCGAATGCATCTTTAGGGAGCAGTTTGAAGAGAACTGGTATAACACCTATTCA
 TCTAACATATATAAACATGGAGACACTGGCCGCGAGGTATTTTGTGGCACTTAACAAAGAC
 GAACTCCAAGAGATGGCGCCAGGTCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCT
 AGACCAGTGGATCCAGAAAGAGTTCCAGAATTGTACAAGGACCTACTGATGTACACTTAG (配列番号: 35)

20

>CG53135-04-prot 179 aa
 MAPLAEVGGFLGGLGGLGPGAAQLAHLHGILRRRQLYCRTFHLLQILPDGSAQGTQRDHS
 LEFIFISVAVGLVSIIRGVDSGLYLMNDKGELYGSEKLTSECIIFREQFEENWYNTYSS
 NIYKHGDTGRRYFVALNKDGTPRDGARSKRHQKFTHFLPRPVDPERVPELYKDLLMYT (配列番号: 36)

30

【0388】

表25. クローンアセンブリ、FGF-20X、コドン最適化、CG53135-05のヌクレオチドおよびポリペプチド配列

【表30】

>CG53135-05 636 nt
 ATGGCTCCGCTGGCTGAAGTTGGTGGTTTCCTGGGCGGTCTGGAGGGTCTGGGTGAGCAG
 GTTGGTTCTCACTTCCTGCTGCCCGGCTGGTGAACGTCCGCCACTGCTGGGTGAACGT
 CGCTCCGCGAGCTGAACGCTCCGCTCGTGGTGGCCCCGGGTGCTGCTCAGCTGGCTCACCTG
 CATGGTATCCTGCGTCCGCGTCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
 CCGGATGGTCTGTTTCCAGGTTACCCGTCAGGACCACTCTCTGTTCCGGTATCCTGGAATTC
 ATCTCTGTGCTGTTGGTCTGGTTTCTATCCGTTGGTGTGACTCTGGCCGTGACCTGGGT
 ATGAACGACAAAGGCGAACTGTACGGTCTGAAAACTGACCTCTGAATGCATCTTCCGT
 GAACAGTTTGAAGAGAACTGGTACAACACCTACTCTTCCAACATCTACAAACATGGTGGAC
 ACCGGCCGTCGCTACTTCTGCTCTGAACAAAGACGGTACCCCGGTGATGGTGGTCTGCT
 TCTAAACGTCACAGAAATTCACCCACTTCTGCGCGCCAGTTGACCCGGAGCGTGT
 CCAGAAGTGTATAAGACCTGCTGATGTACACCTAA (配列番号: 37)

40

タンパク質配列:

>CG53135-05-prot 211 aa
 MAPLAEVGGFLGGLGGLGQQVGSHPFLPPAGERPPLLGERRSAAERSARGGPGAAQLAHL
 HGILRRRQLYCRTFHLLQILPDGSSVQGTQRDHSLEFIFISVAVGLVSIIRGVDSGLYL
 MNDKGELYGSEKLTSECIIFREQFEENWYNTYSSNIYKHGDTGRRYFVALNKDGTPRDGAR
 SKRHQKFTHFLPRPVDPERVPELYKDLLMYT (配列番号: 38)

【0389】

50

表 26 . CG53135 - 07 のヌクレオチドおよびポリペプチド配列

【表 3 1】

CG53135-07 54 nt
ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGGCTTTCTGGGCGGCCTGGAGGGCTTGGGC (配列番号 : 39)
 CG53135-07 のタンパク質配列 :
CG53135-07-prot 18 aa
MAPLAEVGGFLGGLLEGLG (配列番号 : 40)

【0390】

表 27 . CG53135 pep 2、CG53135 - 08 のヌクレオチドおよびポリペプチド配列

10

【表 3 2】

CG53135-08 63 nt
GAGCGGCCGCGCTGCTGGGCGAGCGCAGGAGCGCGGCGGAGCGCGCGCGGCGGG
CCG (配列番号 : 41)

CG53135-08-prot 21 aa
ERPFLIGERRSAAERSARGGP (配列番号 : 42)

【0391】

表 28 . CG53135 pep、CG53135 - 09 のヌクレオチドおよびポリペプチド配列

20

【表 3 3】

CG53135-09 63 nt
CGCAGGTATTTTGTGGCACTTAACAAAGACGGAACTCCAAGAGATGGCGCCAGGTCCAAG
AGG (配列番号 : 43)

CG53135-09-prot 21 aa
RRYFVALNKDGTTPRDGARSKR (配列番号 : 44)

【0392】

表 29 . FGF - 20、CG53135 pep、CG53135 - 10 のヌクレオチドおよびポリペプチド配列

【表 3 4】

CG53135-10 60 nt
CCTAGACCAGTGGATCCAGAAAGAGTTCAGAAATTGTACAAGGACCTACTGATGTACACT (配列番号 : 45)

CG53135-10-prot 20 aa
PRFVDPERVPELYKDLLMYT (配列番号 : 46)

30

【0393】

FGF - CX 変異体 CG53135 - 01 ないし CG53135 - 08 (それぞれ、v - 01 ないし v - 04 として標識した) の ClustalW アラインメントを表 30 に示す。

【0394】

表 30 . CG53135 - 01 変異体から CG53135 - 08 変異体の ClustalW 多様性アラインメント

40

【表 3 5】

V-04	1-GQ.....	27
V-07	1-	18
V-06	1-Q.....	27
V-02	1-RRRQ.....	15
V-05	1-QQVGSHFLLPPAGERPPLLGERRSAAERSARGG.....	59
V-03	1-QQVGSHFLLPPAGERPPLLGERRSAAERSARGG.....	59
V-01	1-QQVGSHFLLPPAGERPPLLGERRSAAERSARGG.....	59
V-08	1ERP.....	21
V-04	28A.....	87
V-07	18	18
V-06	28	87
V-02	16	66
V-05	60	119
V-03	60	119
V-01	60	119
V-08	21	21
V-04	88	147
V-07	18	18
V-06	88	147
V-02	67	126
V-05	120	179
V-03	120	179
V-01	120	179
V-08	21	21
V-04	148	179
V-07	18	18
V-06	148	179
V-02	127	158
V-05	180	211
V-03	180	211
V-01	180	211
V-08	21	21

10

20

【0395】

コドン最適化 FGF - CX 核酸 (配列番号: 378) およびポリペプチド (配列番号: 38) 配列の BLASTP アライメントおよび BLASTN アライメントを実施した。結果を表 31 に示す。

30

【0396】

表 31 . 配列番号: 37 および 38 の BLAST 解析

【表 36】

示された様に4回のBLAST検索を実施した:

- I. 非重複性 GenBank データベースから最適化した57のCuraBLASTN解析
- II. 非重複性 GenBank データベースから最適化した57のCuraBLASTN解析
- III. GENESEQ PatNデータベースから最適化した57のCuraBLASTN解析
- IV. 非重複性 GenBank データベースから最適化した57のCuraBLASTX解析

結果をそれぞれ要約する:

高スコアセグメント対を産生する配列:

高	Sum
スコア	確率
	P(N)

I.

gb:GENBANK-ID:AX250592	acc:AX250592.1	配列	1 from Pat...	1830	6.7e-77
gb:GENBANK-ID:AX356109	acc:AX356109.1	配列	1 from Pat...	1830	1.3e-76
gb:GENBANK-ID:AX128219	acc:AX128219.1	配列	3 from Pat...	1830	1.4e-76
gb:GENBANK-ID:AX080364	acc:AX080364.1	配列	1 from Pat...	1828	1.7e-76
gb:GENBANK-ID:AX356110	acc:AX356110.1	配列	2 from Pat...	1828	1.7e-76
gb:GENBANK-ID:AX128217	acc:AX128217.1	配列	1 from Pat...	1812	8.9e-76

10

II.

gb:GENBANK-ID:AB044277	acc:AB044277.1	Homo sapiens mRNA f...	1830	8.1e-77
gb:GENBANK-ID:AB030648	acc:AB030648.1	Homo sapiens mRNA f...	1830	1.3e-76
gb:GENBANK-ID:AB020021	acc:AB020021.1	Rattus norvegicus m...	1812	8.4e-76
gb:GENBANK-ID:AB049218	acc:AB049218.1	Mus musculus Fgf20 ...	1794	5.4e-75
gb:GENBANK-ID:AB020858	acc:AB020858.1	Homo sapiens genom...	854	5.0e-67

III.

patn:AAA75630	ヒト線維芽細胞成長因子のヌクレオチド配列	...	1830	1.1e-76
patn:AAS03277	線維芽細胞成長因子をコード化するヒトcDNA	...	1830	1.1e-76
patn:AAF62049	ヒト線維芽細胞成長因子CX	(FGF-CX)	1828	1.4e-76
patn:AAS03276	線維芽細胞成長因子コード化するラットcDNA	...	1812	7.1e-76
patn:AAT58530	... 由来マウス FGF9 のヌクレオチド配列	...	1133	3.2e-45

20

IV.

ptnr:SWISSPROT-ACC:Q9NP95	線維芽細胞成長因子20	...	+1	1118	3.3e-112
ptnr:SPTREMBL-ACC:Q9EST9	FGF-20 - Rattus norvegicus (R...	...	+1	1074	1.5e-107
ptnr:SPTREMBL-ACC:Q9ESL9	線維芽細胞成長因子20	...	+1	1069	5.2e-107
ptnr:SPTREMBL-ACC:Q9PVY1	XFGF-20 - Xenopus laevis (Afr...	...	+1	906	9.7e-90
ptnr:SWISSPROT-ACC:P31371	グリア細胞活性化因子	precu...	+1	775	7.4e-76

【0397】

実施例21. FGF-CX SNP変異体のクローニングおよび発現

30

SeqCalling [登録商標] 技術: cDNAは、多様な組織タイプ、正常および疾病状態、病態、および異なるドナー由来の発生状態を表す様々なヒト試料からもたらされた。試料を、全体組織、細胞株、一次細胞または一次細胞および細胞株を培養した組織として得た。細胞および細胞株を、遺伝子発現を制御する生物学的物質または化学的物質、例えば、成長因子、ケモカイン、ステロイドで処理した。それゆえにもたらされたcDNAを、次に、CuraGen専売のSeqCalling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、適切な場合、訂正のため編集した。全試料由来のcDNA配列を、それ自体、SeqCallingアセンブリーのCuraGenのヒトSeqCallingデータベースを生成するためのバイオインフォマティックプログラムを用いる公開ESTで集めた。それぞれのアセンブリーは、1またはそれ以上のヒト試料からもたらされた1またはそれ以上の重複cDNA配列を含有する。フラグメントおよびESTを、アセンブリーの別の成分との同一性の伸展が、少なくとも50bpを超える95%であると、アセンブリーの成分として含まれる。それぞれのアセンブリーは、スプライスフォームおよび/または1塩基多型(SNP)およびそれらの組合せのような遺伝子および/またはその変異体をあらわすことができる。

40

【0398】

ヒトゲノムDNAにおいて同定された様々な配列は、この発明に含まれる。変異体配列は、1塩基多型(SNP)を含むことができる。SNPは、時には、cDNAとしてSNP起源を含有するヌクレオチド配列意味する「cSNP」として言及することができる。SNPを様々な方法で生じさせることができる。例えば、SNPは、多型部位での別のもの

50

への1ヌクレオチドの置換に起因し得る。かかる置換は、トランジションまたはトランスバージョンのいずれかであり得る。SNPはまた、参考対立遺伝子と関係するヌクレオチドの欠損またはヌクレオチドの挿入から生じ得る。この場合、多型部位は、ある対立遺伝子は、別の対立遺伝子中の特定のヌクレオチドに関して、ギャップを生む部位である。遺伝子内で生じるSNPは、SNPの位置の遺伝子によりコード化されたアミノ酸の変化において結果として起こり得る。しかしながら、SNPはまた、SNPを含むコドンが遺伝子コードの重複性の結果として同一アミノ酸をコード化する場合、サイレントであり得る。遺伝子領域の外側、または遺伝子内のイントロン中で生じるSNPは、タンパク質の任意のアミノ酸配列中で変化を生じないが、発現パターンの変化制御、例えば、時間的な発現での変化、生理的応答制御、細胞タイプ発現制御、発現の強度、転写されたメッセンジャーの安定性において生じる。

【0399】

新規SNP同定方法：SNPは、CuraGen専売特許のSNP ToolアルゴリズムでのDeep SNP Mining (DSM)により同定された。SNP Toolは、以下の基準でのアセンブリーでのバリエーションを同定する：それぞれアセンブリー位置に対して、アラインメントの両末端上の10塩基対内で解析されない；ウインドウサイズ（一見の塩基数）が10である；ウインドウでのミスマッチの許される数は2である；最小のSNP塩基の質（PHREDスコア）は23である；スコアSNPに対する変化の最小数は2である。SNP Toolは、アセンブリーを解析し、アセンブリーでの個々の変異体配列と関連するSNP位置、与えられた位置でのアセンブリーの深さ、推定アセンブリー対立遺伝子頻度、SNP配列変異体、およびゲノムDNAプール供給源を表す。配列トレースを選択し、手動での確認のため図する。内臓のフレーム検索ソフトウェアは、アミノ酸変更SNPの同時同定を可能とする。イントロン/エキソン境界に接するSNPを、SNPコンセンサスをCura Toolに入力することおよび該CGUIDタンパク質配列に対する1×1TB LASTNをを実施することにより二重チェックした。包括的なSNPデータ解析を次にSNPCallingデータベースに出力した。

【0400】

新規SNP確認方法：SNPを、Pyrosequencingとして知られる有効な方法を利用して確認する。Pyrosequencingの詳細なプロトコールは、Alderborn et al., (2000), Genome Research, 10, Issue 8, Augustにおいて見ることができる。SNP結果を、表32に示す。

【0401】

表32. 図1において記載したヌクレオチド配列の変異体

【表37】

変異体	ヌクレオチド			アミノ酸		
	位置	当初	変化後	位置	当初	変化後
13377871	301	A	G	101	Ile	Val
13374151	308	T	G	103	Val	Gly
13375519	361	A	G	121	Met	Val
13375518	517	G	A	173	Gly	Arg
13375516	523	C	G	175	Pro	Ala
13375517	616	G	A	206	Asp	Asn

【0402】

実施例22. FGF-CX変異体CG53135-04の分子クローニング

A. CG53135-04の残基1~179の分子クローニング

残基1~179由来のCG53135-04の全長型をコードするcDNAを、PCRによる「インフレーム」クローニングの標的とした。PCR鑄型は、以前に同定されたプラスミドに基づく。

10

20

30

40

50

【0403】

以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、標的 cDNA 配列をクローン化した：

F1 5' - C A C C A G A T C T A T G G C T C C C T T A G C C G A A G T C G G
G G G C - 3' (配列番号：55)

R1 5' - G C C G T C G A C A G T G T A C A T C A G T A G G T C C T T G T A
C A A T T C - 3' (配列番号：56)

【0404】

下流のクローニング目的のため、順方向プライマーは、インフレームの B g l I I 制限部位を含み、逆方向プライマーは、インフレームの S a l I 制限部位を含有する。

2度のPCR反応を、CG53135-04のインサートを含有するプラスミドの全量 10
~ 5 ngを用いてセットアップした。

【0405】

反応混合液は、50 μl 反应用量中の、2 μl のそれぞれのプライマー（元々の濃度：5
p m o l / μ l ）、1 μl の 10 m M d N T P (Clontech Laboratories, Palo Alto C
A) および 1 μl の 50 × Advantage-HF2 ポリメラーゼ (Clontech Laboratories) を含有
していた。以下の反応条件を用いた：

PCR 条件 1：

- a) 96 3分
- b) 96 30秒 第2の変性
- c) 60 30秒 プライマーアニーリング
- d) 72 6分 伸長

ステップ b ~ d を 15 回繰り返す

- e) 96 15秒 変性
- f) 60 30秒 プライマーアニーリング
- g) 72 6分 伸長

ステップ e ~ g を 29 回繰り返す

- e) 72 10分 最終伸長

PCR 条件 2：

- a) 96 3分
- b) 96 15秒 第2の変性
- c) 76 30秒 サイクル当たり 1 温度を下げる
- d) 72 4分 伸長

ステップ b ~ d を 34 回繰り返す

【0406】

増幅産物を、アガロース電気泳動により検出した。フラグメントをゲル精製し、製造元の
指示に従い、pCR2.1 TOPOベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA) に結合させ
た。PCR 反応当たり 12 クローンをピックアップし、配列決定した。インサートを、ベ
クター特異的 M13 順方向プライマーおよび M13 逆方向プライマーを用いて配列決定し
た。

SF1 : G T A T C T T G G A A T T C A T C A G T G T G G C (配列番号：57)

SF2 : T G G T C T C T A T C T T G G A A T G A A T G A C (配列番号：58)

SR1 : G A A G A G G C T G T G G T C C T G C C (配列番号：59)

SR2 : A C T G T C C A C A C C T C T A A T A C T G A C C (配列番号：60)

【0407】

インサートアセンブリー 250059596 が、CG53135-04 の標的配列の残基
1 と残基 179 の間のオープンリーディングフレームをコード化することが分かった。表
33 ~ 36 を参照されたい。クローンインサートは、元々の配列に対して 100% 同一で
ある。CG53135-04 でのアラインメントを、表 37 の ClustalW に示す。アセンブ
リーの最初の 3 アミノ酸残基および最後の 3 アミノ酸残基は、サブクローニングの目的の
プライマーに加えられた制限酵素部位由来である。白またはグレーの背景を有する異なる

10

20

30

40

50

アミノ酸に注意し、欠損ノ挿入アミノ酸を、その位置でコードしない配列の破線により検出できる。

【 0 4 0 8 】

表 3 3 . クロ ー ン 配 列

【 表 3 8 】

>CG53135-04 (配列番号: 61)

ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGGCTTTCTGGGCGGCCTGGAGGGCTTGGGCCAGCCGGGGCAGCGC
AGCTGGCGCACCTGCACGGCATCCTGCGCCCGGCAGCTCTATTGCCGCACCGGCTTCCACCTGCAGAT
CCTGCCCGACGGCAGCGTGCAGGGCACCCGGCAGGACACAGCCCTTTCGGTATCTTGAATTCATCAGT
GTGGCAGTGGGACTGGTCACTATTAGAGGTGTGGACAGTGGTCTCTATCTTGGAAATGAATGACAAAGGAG
AACTCTATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAATGCATCTTTAGGGAGCAGTTTGAAGAGAACTGGTATAA
CACCTATTCACTAACATATATAAACATGGAGACACTGGCCCGCAGGTATTTTGTGGCACTTAACAAAGAC
GGAATCCAAGAGATGGCGCCAGGTCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCTAGACCAGTGG
ATCCAGAAAGAGTTCCAGAATTGTACAAGGACCTACTGATGTACACTTAG

10

【 0 4 0 9 】

表 3 4 . クロ ー ン 配 列

【 表 3 9 】

>250059596 (配列番号: 62)

CACCAGATCTATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGGCTTTCTGGGCGGCCTGGAGGGCTTGGGCCAGCCG
GGGCAGCGCAGCTGGCGCACCTGCACGGCATCCTGCGCCCGGCAGCTCTATTGCCGCACCGGCTTCC
ACCTGCAGATCCTGCCCGACGGCAGCGTGCAGGGCACCCGGCAGGACACAGCCCTTTCGGTATCTTGA
ATTCATCAGTGTGGCAGTGGGACTGGTCACTATTAGAGGTGTGGACAGTGGTCTCTATCTTGAATGAAT
GACAAAGGAGAACTCTATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAATGCATCTTTAGGGAGCAGTTTGAAGAGA
ACTGGTATAACACCTATTCACTAACATATATAAACATGGAGACACTGGCCCGCAGGTATTTTGTGGCACT
TAACAAAGACGGAATCCAAGAGATGGCGCCAGGTCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCT
AGACCAGTGGATCCAGAAAGAGTTCCAGAATTGTACAAGGACCTACTGATGTACACTGTTCGACGGC

20

【 0 4 1 0 】

表 3 5 . C G 5 3 1 3 5 - 0 4 の ビ ュ ー D N A 配 列 解 析

【 表 4 0 】

翻訳されたタンパク質-フレーム: 1-ヌクレオチド1~537

1 ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGGCTTTCTGGGCGGCCTGGAGGGCTTGGGCCAGCCGGGGCAGCGCAGCTGGCGCA
M A P L A E V G G F L G G L E G L G Q P G A A Q L A H
81 CCTGCACGGCATCCTGCGCCCGGCAGCTCTATTGCCGCACCGGCTTCCACCTGCAGATCCTGCCCGACGGCAGCGTGC
L H G I L R R R Q L Y C R T G F H L Q I L P D G S V Q
161 AGGGCACCCGGCAGGACACAGCCCTTTCGGTATCTTGAATTCATCAGTGTGGCAGTGGGACTGGTCACTATTAGAGGT
G T R Q D H S L F G I L E F I S V A V G L V S I R G
241 GTGGCAGTGGTCTCTATCTTGAATGAATGACAAAGGAGAACTCTATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAATGCATCTT
V D S G L Y L G M N D K G E L Y G S E K L T S E C I F
321 TAGGGAGCAGTTTGAAGAGAACTGGTATAACACCTATTCACTAACATATATAAACATGGAGACACTGGCCCGCAGGTATI
R E Q F E E N W Y N T Y S S N I Y K H G D T G R R Y F
401 TTGTGGCACTTAACAAAGACGGAATCCAAGAGATGGCGCCAGGTCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCT
V A L N K D G T P R D G A R S K R H Q K F T H F L P
481 AGACCAGTGGATCCAGAAAGAGTTCCAGAATTGTACAAGGACCTACTGATGTACACTTAG
R P V D P E R V F E L Y K D L L M Y T

30

40

【 0 4 1 1 】

表 3 6 . 2 5 0 0 5 9 5 9 6 の ビ ュ ー D N A 配 列 解 析

【 表 4 1 】

翻訳されたタンパク質-フレーム：2-ヌクレオチド2~556

```

1  CACCAGATCTATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGGCTTTCTGGGCGGCCTGGAGGGCTGGGCCAGCCGGGGGCAGCGC
   T R S M A P L A E V G G F L G G L E G L G Q P G A A Q
81  AGCTGGCGCACCTGCGCCGCGCGGCGAGCTCTATTGCCGACCGGCTCCACCTGCAGATCCTGCCCGAC
   L A H L H G I L R R R Q L Y C R T G F H L Q I L P D
161  GGCAGCGTGCAGGGCACCCGGCAGGACCACAGCCTCTTCGGTATCTTGGGAATTCATCAGTGTGGCAGTGGGACTGGTCAG
   G S V Q G T R Q D H S L F G I L E F I S V A V G L V S
241  TATTAGAGGTGTGGACAGTGGTCTCTATCTTGAATGAATGACAAAGGAGAATCTATGGATCAGAGAACTTACTTCCG
   I R G V D S G L Y L G M N D K G E L Y G S E K L T S E
321  AATGCATCTTTAGGGAGCAGTTTGAAGAGAATGGTATAACACCTATTTCATCTAACATATATAAACATGGAGACACTGGC
   C I F R E Q F E E N W Y N T Y S S N I Y K H G D T G
401  CGCAGGTATTTTGTGGCACTTAACAAAGACGGAATCCAAGAGATGGCGCCAGGTCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACA
   R R Y F V A L N K D G T P R D G A R S K R H Q K F T H
481  TTTCTTACCTAGACCAGTGGATCCAGAAAGAGTTCAGAATTGTACAAGGACCTACTGATGTACACTGTGCGACGGC
   F L P R P V D P E R V P E L Y K D L L M Y T V D G

```

10

20

40

50

【 0 4 1 2 】

表 3 7 . クローン配列のClustalW

【 表 4 2 】

250059596	1	IRSMAPLA	60
CG53135-04	1	---MAPLA	57
250059596	61	QDHS	120
CG53135-04	58	QDHS	117
250059596	121	FYSS	180
CG53135-04	118	FYSS	177
250059596	181	YTVDG	185
CG53135-04	178	YI---	179

【 0 4 1 3 】

B , CG53135 - 04 の分子クローニング (3 1 ~ 1 6 2 a a)
 残基 3 1 ~ 1 6 2 由来の CG53135 - 04 のドメインをコードする c DNA を、 P C R による「インフレーム」クローニングの標的とした。 P C R 鑄型は、以前に同定されたプラスミドに基づく。

【 0 4 1 4 】

以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、標的 c DNA 配列をクローン化した：
 F 2 5 ' - C A C C A G A T C T A T C C T G C G C C G C C G G C A G C T C T A
 T T G C C - 3 ' (配列番号： 6 3) ；
 F 2 5 ' - C A C C A G A T C T A T C C T G C G C C G C C G G C A G C T C T A
 T T G C C - 3 ' (配列番号： 6 3) ；
 R 2 5 ' - G C C G T C G A C T G G T C T A G G T A A G A A A T G T G T A A A
 T T T C T G A T G C C - 3 ' (配列番号： 6 4)

【 0 4 1 5 】

下流のクローニング目的のため、順方向プライマーは、インフレームの B g 1 I I 制限部位を含み、逆方向プライマーは、インフレームの S a 1 I 制限部位を含有する。 P C R 反応を、 CG53135 - 04 のインサートを含有する全部で 1 ~ 5 n g のプラスミドを用いてセットアップした。

【 0 4 1 6 】

反応混合液は、 5 0 μ l の反応液中に、 2 μ l のそれぞれのプライマー (元々の濃度： 5 p m o l / μ l)、 1 μ l の 1 0 m M d N T P (Clontech Laboratories, Palo Alto C A) および 1 μ l の 5 0 × Advantage-HF2 ポリメラーゼ (Clontech Laboratories) を含有する。用いた反応条件は、実施例 2 2 A において、上で提供される。

【0417】

増幅産物を、アガロース電気泳動により検出した。フラグメントをゲル精製し、製造元の指示に従い、pCR2.1 TOPOベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA) に結合させた。PCR反応当たり12クローンをピックアップし、配列決定した。インサートを、ベクター特異的M13順方向プライマーおよびM13逆方向プライマーを用いて配列決定した。

【0418】

インサートアセンブリ-250059629が、CG53135-04の標的配列の残基31と162との間のオープンリーディングフレームをコード化することが分かった。クローン化インサートは、元々の配列と100%同一である。表38~42を参照されたい。CG53135-04でのアラインメントを、表42のClustalWにおいて示す。アセンブリの最初の3アミノ酸残基および最後の3アミノ酸残基は、サブクローニングの目的のためのプライマーに加えられた制限酵素部位由来である。白またはグレーの背景を有する異なるアミノ酸に注意し、欠損/挿入アミノ酸を、その位置でコードしない配列中の破線により検出できる。

10

【0419】

表38. クローン配列

【表43】

>CG53135-04 (配列番号: 65)
ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGCTTCTGGGCGGCCTGGAGGGCTTGGGCCAGCCGGGGGCGAGCGC
AGCTGGCGCACCTGCACGGCATCCTGCGCCGCGGCGAGCTCTATTGCCGCACCGGCTTCCACCTGCAGAT
CCTGCCCGACGGCAGCGTGCAGGGCACCCGGCAGGACCACAGCCTCTTCGGTATCTTGGAAATTCATCAGT
GTGGCAGTGGGACTGGTCAGTATTAGAGGTGTGGACAGTGGTCTCTATCTTGGAAATGAATGACAAAGGAG
AACTCTATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAATGCATCTTAGGGAGCAGTTTGAAGAGAAGCTGGTATAA
CACCTATTCTAACAATATATAAACAATGGAGACACTGGCCGAGGTATTTTGTGGCACTTAACAAAGAC
GGAATCCAAGAGATGGCGCCAGGTCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCTAGACCAGTGG
ATCCAGAAAGAGTTCAGAAATGTACAAGGACCTACTGATGTACACTTAG

20

【0420】

表39. クローン配列

【表44】

>250059629 (配列番号: 66)
CACCAGATCTATCCTGCGCCGCGGCGAGCTCTATTGCCGCACCGGCTTCCACCTGCAGATCCTGCCCGAC
GGCAGCGTGCAGGGCACCCGGCAGGACCACAGCCTCTTCGGTATCTTGGAAATTCATCAGTGTGGCAGTGG
GACTGGTCAGTATTAGAGGTGTGGACAGTGGTCTCTATCTTGGAAATGAATGACAAAGGAGAAGCTCTATGG
ATCAGAGAAACTTACTTCCGAATGCATCTTTAGGGAGCAGTTTGAAGAGAAGCTGGTATAACACCTATTCA
TCTAACATATATAAACAATGGAGACACTGGCCGAGGTATTTTGTGGCACTTAACAAAGACGGAAGCTCCAA
GAGATGGCGCCAGGTCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCTAGACCAGTCCGACGGC

30

【0421】

表40. CG53135-04のビュー-DNA配列解析

【表45】

翻訳されたタンパク質-フレーム：1-ヌクレオチド1~537

```

1  ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGGCTTCTGGGCGGCTGGAGGGCTGGGCCAGCCGGGGCAGCGCAGCTGGCGCA
M A P L A E V G G F L G G L E G L G Q P G A A Q L A H
81  CCTGCACGGCATCCTGCGCCGCGGCGAGCTCTATTGCCGACCCGGCTTCCACCTGCAGATCCTGCCCGACGGCAGCGTGC
L H G I L R R R Q L Y C R T G F H L Q I L P D G S V Q
161  AGGGCACCCGGCAGGACCACAGCCTCTTCGGTATCTTGAATTCATCAGTGTGGCAGTGGGACTGGTTCAGTATTAGAGGT
G T R Q D H S L F G I L E F I S V A V G L V S I R G
241  GTGGACAGTGGTCTCTATCTTGAATGAATGACAAAGGAGAAGTCTATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAATGCATCTT
V D S G L Y L G M N D K G E L Y G S E K L T S E C I F
321  TAGGGAGCAGTTTGAAGAGAAGTGGTATAACACCTATTTCATCTAACATATAAATGAGACACTGGCCGACAGGTATT
R E Q F E E N W Y N T Y S S N I Y K H G D T G R R Y F
401  TTGTGGCACTTAACAAGACGGAATCCAGAGATGGCGCCAGGTCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCT
V A L N K D G T P R D G A R S K R H Q K F T H F L P
481  AGACCAGTGGATCCAGAAAGAGTCCAGAAATGTACAAGGACCTACTGATGTACACTTAG
R P V D P E R V P E L Y K D L L M Y T

```

10

【0422】

表41. 250059629のビュー-DNA配列解析

【表46】

翻訳されたタンパク質-フレーム：2-ヌクレオチド2~415

```

1  CACCAGATCTATCCTGCGCCGCGGCGAGCTCTATTGCCGACCCGGCTTCCACCTGCAGATCCTGCCCGACGGCAGCGTGC
T R S I L R R R Q L Y C R T G F H L Q I L P D G S V Q
81  AGGGCACCCGGCAGGACCACAGCCTCTTCGGTATCTTGAATTCATCAGTGTGGCAGTGGGACTGGTTCAGTATTAGAGGT
G T R Q D H S L F G I L E F I S V A V G L V S I R G
161  GTGGACAGTGGTCTCTATCTTGAATGAATGACAAAGGAGAAGTCTATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAATGCATCTT
V D S G L Y L G M N D K G E L Y G S E K L T S E C I F
241  TAGGGAGCAGTTTGAAGAGAAGTGGTATAACACCTATTTCATCTAACATATAAATGAGACACTGGCCGACAGGTATT
R E Q F E E N W Y N T Y S S N I Y K H G D T G R R Y F
321  TTGTGGCACTTAACAAGACGGAATCCAGAGATGGCGCCAGGTCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCT
V A L N K D G T P R D G A R S K R H Q K F T H F L P
401  AGACCAGTCCGACGGC
R P V D G

```

20

【0423】

表42. ClustalWアラインメント

【表47】

```

250059629 1 -----T-----SI LRRRQLYCR TGFHLQILPDG SVQGTROD 33
CG53135-04 1 MAPLA EWGGLG LGLG LGGP GAAQLAHL LCGI LRRRQLYCR TGFHLQILPDG SVQGTROD 60

250059629 34 SLFGI LEFISVAVGL VSI RGVDSGLYLGMNDK GELYGSEKLTSECI FREQFEENWYNTYS 93
CG53135-04 61 SLFGI LEFISVAVGL VSI RGVDSGLYLGMNDK GELYGSEKLTSECI FREQFEENWYNTYS 120

250059629 94 SNIYKHGDTGRRIFVALNEDGT PRD GARS KRHOKFT HFLFRPVDG----- 138
CG53135-04 121 SNIYKHGDTGRRIFVALNKDGT PRD GARS KRHOKFT HFLFRPVD P ERVPEL YLD LLMYT 179

```

30

【0424】

C. CG53135-04の分子クローニング(31~179aa)

残基31~179由来のCG53135-04の成熟型をコードするcDNAを、PCRにより「インフレーム」の標的とした。PCR鑄型は、以前に同定されたプラスミドに基づく。

【0425】

以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、標的cDNA配列をクローン化した：

```

F2 5' - CACCAGATCT ATCCTGCGCCGCGCCGGCAGCTCTA
TTGCC - 3' (配列番号：63)
R1 5' - GCCGTCGAC AGTG TACATCAGTAGGTCCTTGTA
CAATTC - 3' (配列番号：56)

```

40

50

【0426】

下流クローニング目的のため、順方向プライマーは、インフレームのB g l I I 制限部位を含み、逆方向プライマーは、インフレームのS a l I 制限部位を含有する。2度のPCR反応を、CG53135-04のインサートを含有するプラスミドの全量1~5ngを用いてセットアップした。

【0427】

反応混合液は、50μl反応量中で、2μlのそれぞれのプライマー（元々の濃度：5pmol/μl）、1μlの10mM dNTP（Clontech Laboratories, Palo Alto CA）および1μlの50x Advantage-HF2ポリメラーゼ（Clontech Laboratories）を含有する。用いた反応条件は、実施例22Aにおいて上で提供された。

10

【0428】

増幅産物を、アガロースゲル電気泳動により検出した。フラグメントを、ゲル精製し、製造元の指示に従い、pCR2.1 TOPOベクター（Invitrogen, Carlsbad, CA）に結合させた。PCR反応当たり12クローンをピックアップし、配列決定した。インサートを、ベクター特異的なM13順方向プライマーおよびM13プライマーを用いて配列決定した。

【0429】

インサートアセンブリ-250059669が、標的配列のCG53135-04の残基31と179間のオープンリーディングフレームをコード化することが分かった。クローンインサートは、元々の配列と100%同一である。表43~46を参照されたい。CG53135-04でのアラインメントを、表47でのClustalWに示す。アセンブリの最初の3アミノ酸残基および最後の3アミノ酸残基は、サブクローニングの目的のためのプライマーに加えられた制限酵素部位由来である。白またはグレーの背景を有する異なるアミノ酸に注意し、欠損/挿入アミノ酸を、その位置でコードしない配列中の破線により検出され得る。

20

【0430】

表43. クローン配列

【表48】

>CG53135-04 (配列番号: 67)

ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGGCTTTCTGGGCGGCCTGGAGGGCTTGGGCCAGCCGGGGGCGAGCGC
AGCTGGCGCACCTGCACGGCATCCTGCGCCGCCGGCAGCTCTATFGCCGCACCGGCTTCCACCTGCAGAT
CCTGCCCGACGGCAGCGTGCAGGGCACCCGGCAGGACCACAGCCTCTTTCGGTATCTTGGAAATTCATCAGT
GTGGCAGTGGGACTGGTCAGTATTAGAGGTGTGGACAGTGGTCTCTATCTTGAATGAATGACAAAGGAG
AACTCTATFGATCAGAGAACTTACTTCCGAATGCATCTTTAGGGAGCAGTTTGAAGAGAAGTGGTATAA
CACCTATTCATCTAACATATATAAACAATGGAGACACTGGCCGCAGGTATTTTGTGGCACTTAACAAAGAC
GGAAGTCCAAGAGATGGCGCCAGGTCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCTAGACCAGTGG
ATCCAGAAAGAGTTCCAGAATTGTACAAGGACCTACTGATGTACACTTAG

30

【0431】

表44. クローン配列

【表49】

>250059669 (配列番号: 68)

CACCAGATCTATCCTGCGCCGCCGGCAGCTCTATTGCCGCACCGGCTTCCACCTGCAGATCCTGCCCGAC
GGCAGCGTGCAGGGCACCCGGCAGGACCACAGCCTCTTCGGTATCTTGGAAATTCATCAGTGTGGCAGTGG
GACTGGTCACTATTAGAGGTGTGGACAGTGGTCTCTATCTTGAATGAATGACAAAGGAGAAGTCTATGG
ATCAGAGAACTTACTTCCGAATGCATCTTTAGGGAGCAGTTTGAAGAGAAGTGGTATAACACCTATTCA
TCTAACATATATAAACAATGGAGACACTGGCCGCAGGTATTTTGTGGCACTTAACAAAGACGGAAGTCCAA
GAGATGGCGCCAGGTCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCTAGACCAGTGGATCCAGAAAG
AGTTCCAGAATTGTACAAGGACCTACTGATGTACACTGTTCGACGGC

40

【0432】

表45. CG53135-04のビューDNA配列解析

【表50】

翻訳されたタンパク質-フレーム：1-ヌクレオチド1~537

```

1  ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGGCTTTCTGGGCGGCTGGAGGGCTTGGGCCAGCCGGGGGCAGCGCAGCTGGCGCA
   M A P L A E V G G F L G G L E G L G Q P G A A Q L A H
81  CCTGCACGGGCATCCTGCGCCGCGGCAGCTCTATTGCGCACCGGGCTTCCACCTGCAGATCCTGCCCGACGGCAGCGTGC
   L H G I L R R R Q L Y C R T G F H L Q I L P D G S V Q
161  AGGGCACCCCGCAGGACCACAGCCTCTTCGGTATCTTGGAAATTCATCAGTGTGGCAGTGGGACTGGTCAGTATTAGAGGT
   G T R Q D H S L F G I L E F I S V A V G L V S I R G
241  GTGGACAGTGTCTCTATCTTGAATGAATGACAAAGGAGAACTCTATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAATGCATCTT
   V D S G L Y L G M N D K G E L Y G S E K L T S E C I F
321  TAGGGAGCAGTTTGAAGAGAACTGGTATAACACCTATTTCATCTAACATATATAAACATGGAGACACTGGCCGCGAGTATT
   R E Q F E E N W Y N T Y S S N I Y K H G D T G R R Y F
401  TTGTGGCACTTAACAAGACCGAACTCCAAGAGATGGCGCCAGGTCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCT
   V A L N K D G T P R D G A R S K R H Q K F T H F L P
481  AGACCAGTGGATCCAGAAAGAGTTCAGAATTGTACAAGGACCTACTGATGTACACTTAG
   R P V D P E R V P E L Y K D L L M Y T

```

10

【0433】

表46. 250059669のビュー-DNA配列解析

【表51】

翻訳されたタンパク質-フレーム：2-ヌクレオチド2~466

```

1  CACCAGATCTATCCTGCGCCGCGGCAGCTCTATTGCGCACCGGGCTTCCACCTGCAGATCCTGCCCGACGGCAGCGTGC
   T R S I L R R R Q L Y C R T G F H L Q I L P D G S V Q
81  AGGGCACCCCGCAGGACCACAGCCTCTTCGGTATCTTGGAAATTCATCAGTGTGGCAGTGGGACTGGTCAGTATTAGAGGT
   G T R Q D H S L F G I L E F I S V A V G L V S I R G
161  GTGGACAGTGTCTCTATCTTGAATGAATGACAAAGGAGAACTCTATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAATGCATCTT
   V D S G L Y L G M N D K G E L Y G S E K L T S E C I F
241  TAGGGAGCAGTTTGAAGAGAACTGGTATAACACCTATTTCATCTAACATATATAAACATGGAGACACTGGCCGCGAGTATT
   R E Q F E E N W Y N T Y S S N I Y K H G D T G R R Y F
321  TTGTGGCACTTAACAAGACCGAACTCCAAGAGATGGCGCCAGGTCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCT
   V A L N K D G T P R D G A R S K R H Q K F T H F L P
401  AGACCAGTGGATCCAGAAAGAGTTCAGAATTGTACAAGGACCTACTGATGTACACTGTGCGACGGC
   R P V D P E R V P E L Y K D L L M Y T V D G

```

20

【0434】

表47. ClustalWアラインメント

【表52】

```

250059669 1 .....TSSILRRRLYCRRTGFHLQILPDGSVQGTRODH 33
CG53135-04 1 MAPLAEWGGFLGLEGGLGQPGAAQLAHLGILRRRLYCRRTGFHLQILPDGSVQGTRODH 60

250059669 34 SLFGILEFISVAVGLVSIIRGVDSGLYLGMNDKGLYGLYSEKLTSECFRQFEENWYNTYS 93
CG53135-04 61 SLFGILEFISVAVGLVSIIRGVDSGLYLGMNDKGLYGLYSEKLTSECFRQFEENWYNTYS 120

250059669 94 SNIVKHGDTGRRYFVALNKDGTFRDGAERSKHKQKFTHFLPRPWFDFERVPELYKDLLMYTV 133
CG53135-04 121 SNIVKHGDTGRRYFVALNKDGTFRDGAERSKHKQKFTHFLPRPWFDFERVPELYKDLLMYTV 179

250059669 154 DG 155
CG53135-04 *** - - ***

```

30

40

【0435】

(相当発明)

本発明の特別な実施例の上述の詳細な記載から、特定の新規組成物および記載した核酸、ポリペプチド、抗体、検出および処置を含む方法が明らかである。これらの特定の実施態様は本明細書において開示されたが、このことは例示のみを目的とする実施例によりなされ、以下の添付請求項の範囲に関して制限することを意図するものではない。特に、様々な置換、変更、および修飾が、請求項により定義されるように本発明の要旨を逸脱しないで当業者にとって日課として行われ得ることは、本発明者により意図される。実際、本明細書において記載したものに加えて、本発明の様々な修飾が、上述の記載および添付の図

50

から当業者にとって明らかである。かかる修飾は、添付請求項の範囲内にあることを意図する。

【図面の簡単な説明】

【0436】

【図1】図1は、FGF-CXのウエスタン分析を示す。

【図2】図2は、293細胞により分泌されたFGF-CXタンパク質のウエスタン分析を示す。

【図3】図3は、E.coli細胞において発現させたFGF-CX(配列番号:2)タンパク質のウエスタン分析を示す。

【図4-A】図4-Aは、FGF-CX特異的TaqMan試薬を用いたリアルタイム定量的PCRにより得たFGF-CXの発現分析である。正常ヒト組織試料由来の標準化RNAの結果をパネルAに示す。 10

【図4-B】図4-Bは、FGF-CX特異的TaqMan試薬を用いたリアルタイム定量的PCRにより得たFGF-CXの発現分析である。腫瘍細胞株由来の標準化RNAの結果をパネルBに示す。

【図4-C】図4-Cは、FGF-CX特異的TaqMan試薬を用いたリアルタイム定量的PCRにより得たFGF-CXの発現分析である。手術で直接的に得た腫瘍組織を用いて得た結果を、パネルCに示す。

【図4-D】図4-Dは、FGF-CX特異的TaqMan試薬を用いたリアルタイム定量的PCRにより得たFGF-CXの発現分析である。手術で直接的に得た腫瘍組織を用いて得た結果を、パネルDに示す。 20

【図5-A】図5-Aは、DNA合成への作用により表される、組換えFGF-CXの生物学的活性を表示する。

【図5-B】図5-Bは、DNA合成への作用により表される、組換えFGF-CXの生物学的活性を表示する。

【図5-C】図5-Cは、DNA合成への作用により表される、組換えFGF-CXの生物学的活性を表示する。

【図6】図6は、細胞成長への作用により表される組換えFGF-CXの生物学的活性を表示する。

【図7】図7は、細胞形態への作用により表される組換えFGF-CXの生物学的活性である。 30

【図8】図8は、FGF-CXの腫瘍化活性を表すグラフである。

【図9】図9は、FGF-CX構築物で安定的に形質移入したNIH3T3細胞を皮下組織へ注入された対照胸腺欠損ヌードマウスおよび胸腺欠損ヌードマウスの写真である。

【図10】図10は、還元条件下および非還元条件下で調整されたFGF-CXの精製試料のクーマシーブルー染色したSDS-PAGEゲルのイメージである。

【図11】図11は、786-0ヒト腎臓腺癌細胞を用いて実行した投与量タイトレーション実験の結果を提供する。

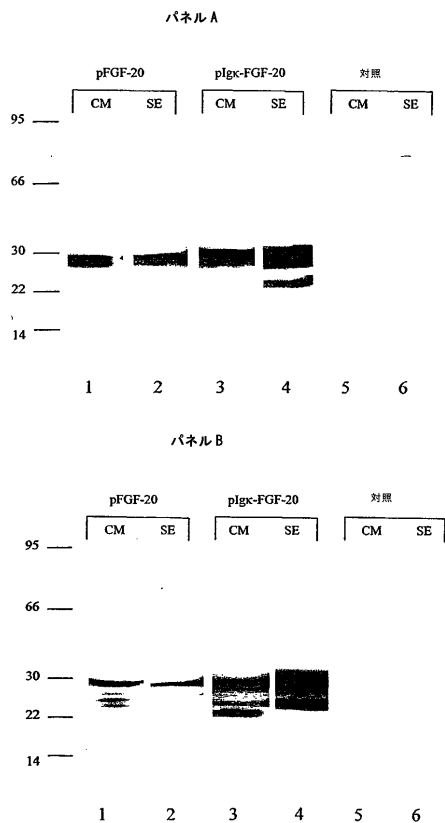
【図12】図12は、インビトロでの病巣の形成を示す。

【図13】図13は、FGF-CXの受容体結合特異性を評価する実験の結果を示す。 40

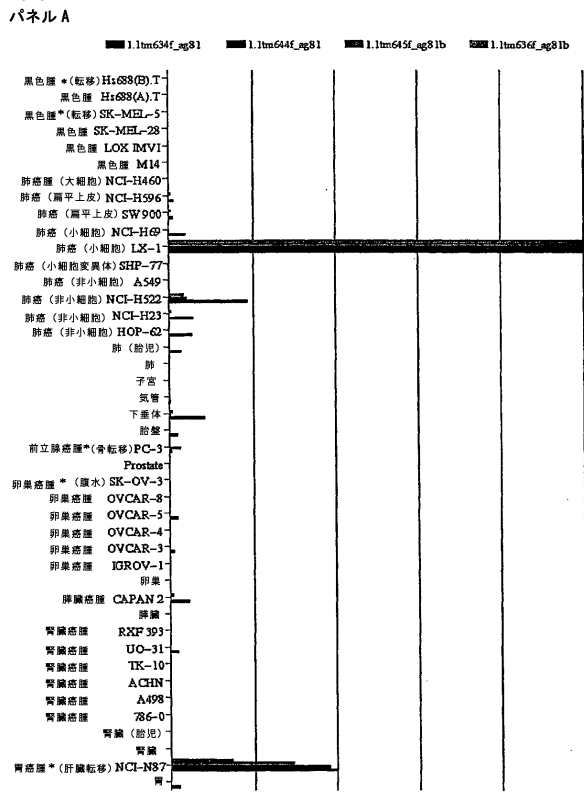
【図14】図14は、プラスミドpET24a-FGF20X-del154コドンを用いたE.coli菌株BL21(DE3)で発現させた場合に得たアルギニン上清のクーマシーブルー染色SDS-PAGEゲルのイメージを示す。

【図15】図15は、全長FGF-CXと比較して、DNA合成への作用により表す組換えFGF-CXの切断型の生物学的活性を示す。

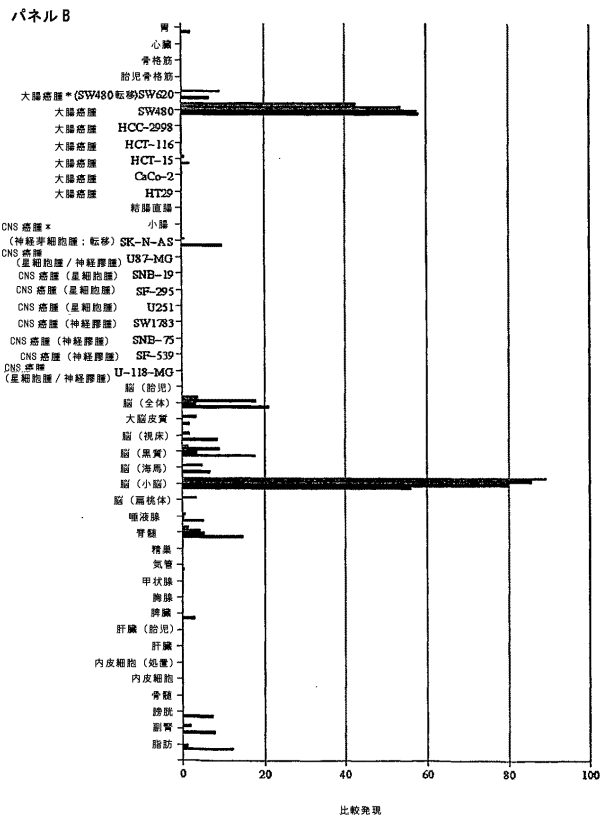
【 図 1 】



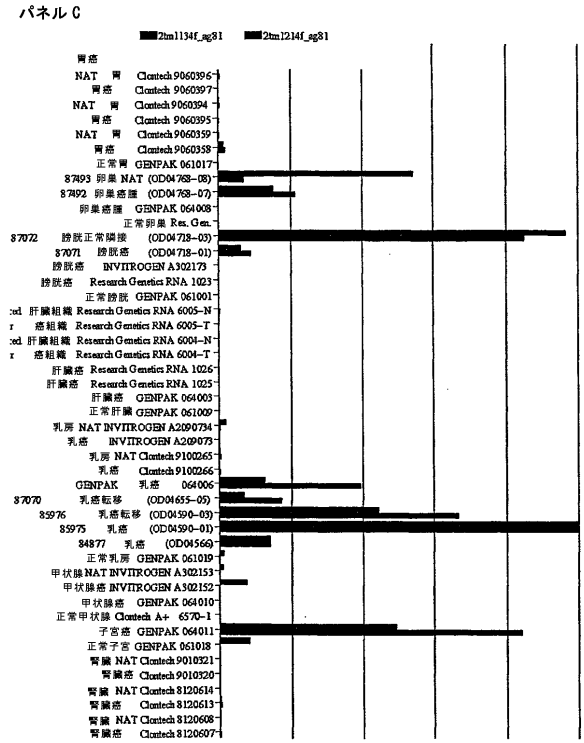
【 図 4 - A 】



【 図 4 - B 】

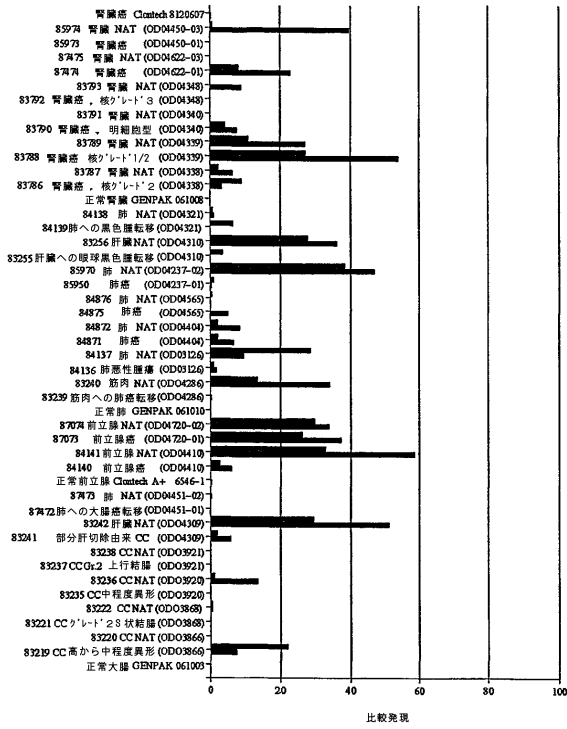


【 図 4 - C 】

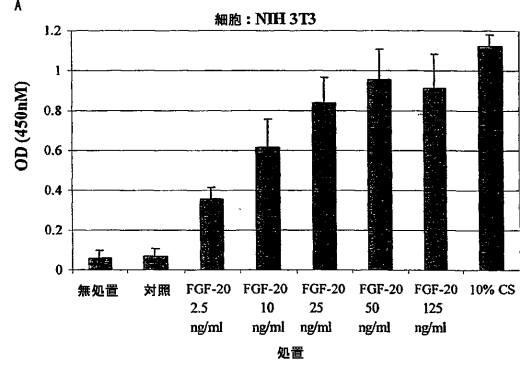


【図 4 - D】

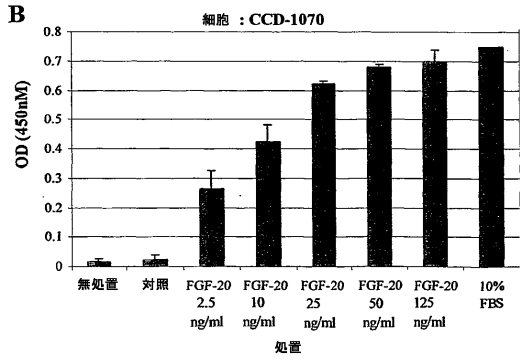
パネル D



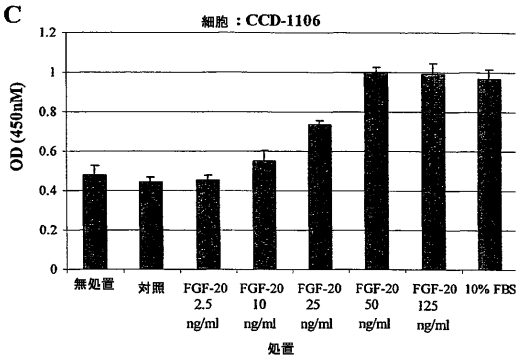
【図 5 - A】



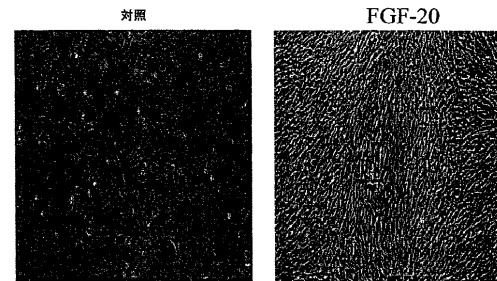
【図 5 - B】



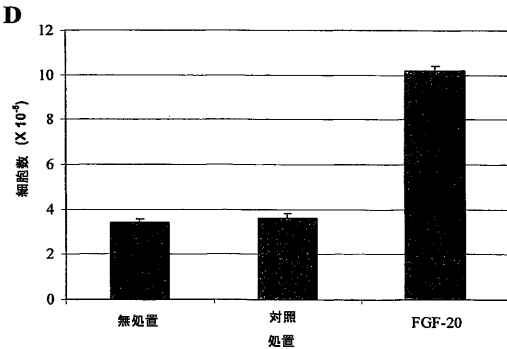
【図 5 - C】



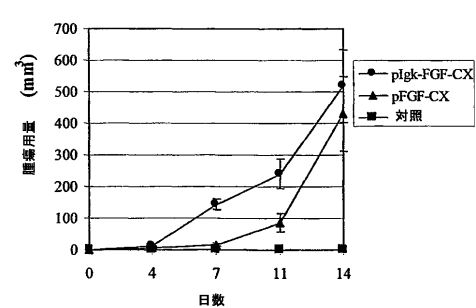
【図 7】



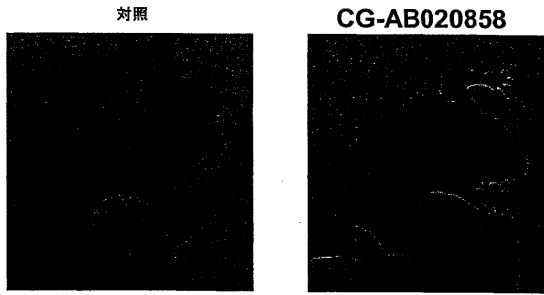
【図 6】



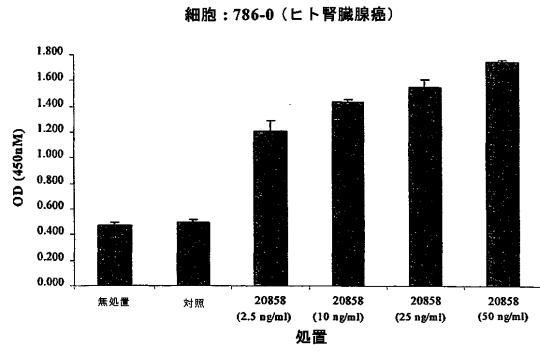
【図 8】



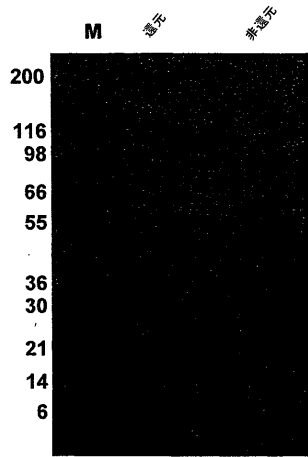
【 図 9 】



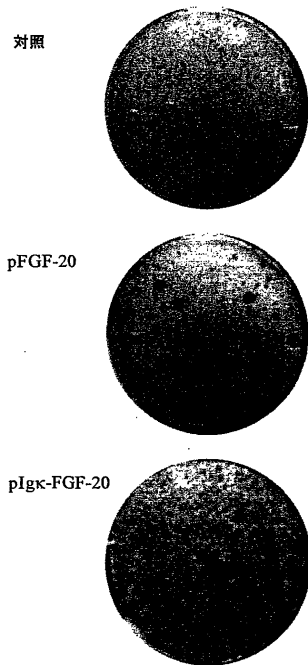
【 図 1 1 】



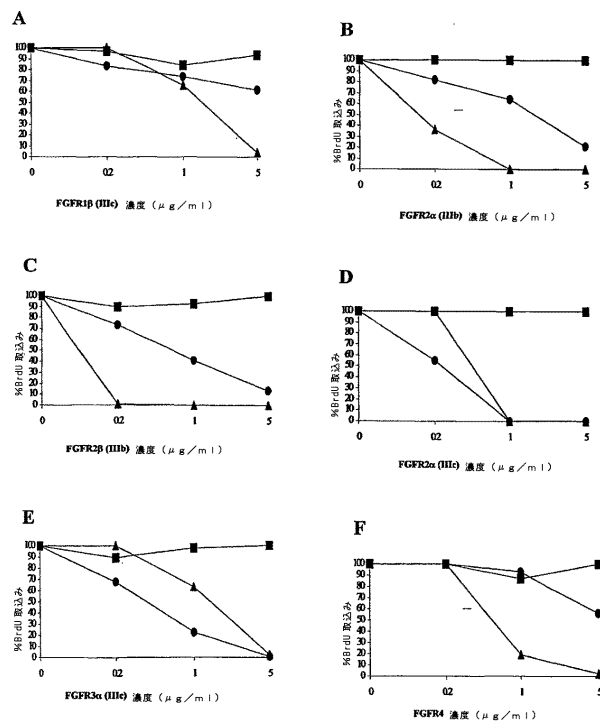
【 図 1 0 】



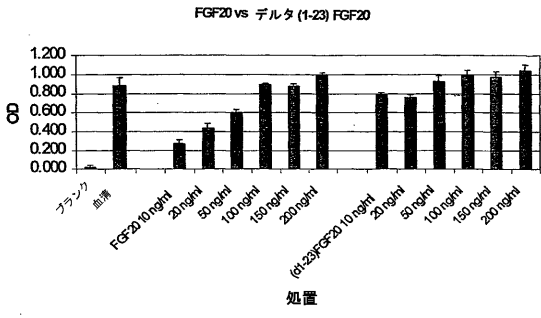
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 5 】



【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
27 December 2002 (27.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/102990 A2

(51) International Patent Classification²: C12N US 60/316,446 (CIP)
Filed on 31 August 2001 (31.08.2001)

(21) International Application Number: PCT/US02/19400 US 60/359,594 (CIP)
Filed on 26 February 2002 (26.02.2002)

(22) International Filing Date: 17 June 2002 (17.06.2002) US Not furnished (CIP)
Filed on 31 May 2002 (31.05.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

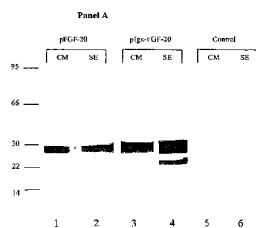
(30) Priority Data:
60/298,441 15 June 2001 (15.06.2001) US
60/316,446 31 August 2001 (31.08.2001) US
60/359,594 26 February 2002 (26.02.2002) US
Not furnished 31 May 2002 (31.05.2002) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:
US 60/298,441 (CIP)
Filed on 15 June 2001 (15.06.2001)

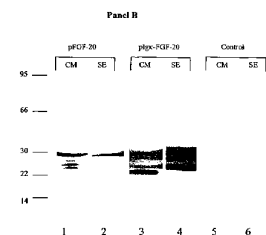
(71) Applicant (for all designated States except US): CURAGEN CORPORATION [US/US]; 555 Long Wharf Drive, 11th Floor, New Haven, CT 06511 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): SHIMKETS, Richard, A. [US/US]; 5 Indian Meadows Drive, Guilford, CT 06437 (US). JEFFERS, Michael, E. [US/US]; 14 Flax Mill Hollow, Branford, CT 06405 (US). PRAYAGA, Sudhirdas, K. [IN/US]; 7365 Macloed Lane, O'Fallon, MI 63366 (US). BOLDOG, Ferenc, L. [HU/US]; 1687 Hartford Turnpike, North Haven, CT 06473 (US). YANG, Meijia [US/US]; 6 Catbird Lane, East Lyme, [Continued on next page]

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



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



WO 02/102990 A2

WO 02/102990 A2 

- CT 06533 (US). **BURGESS, Catherine, E.** [US/US]; 90 Carriage Hill Drive, Wethersfield, CT 06109 (US). **FERNANDES, Elma, R.** [IN/US]; 77 Florence Road, 2B, Branford, CT 06405 (US). **HERRMANN, John, L.** [US/US]; 78 Barnshed Lane, Guilford, CT 06437 (US). **LAROCHELLE, William, J.** [US/US]; 15 Devonshire Lane, Madison, CT 6443 (US). **LICHENSTEIN, Henri, S.** [US/US]; 88 Greenbrier Drive, Guilford, CN 06437 (US). **GORMAN, Linda** [US/US]; 329 Monticello Drive, Branford, CT 06405 (US). **ZHONG, Mei** [CA/US]; 45 Harrison Avenue, Apartment 1B, Branford, CT 06405 (US). **PADIGARU, Muralidhara** [IN/US]; 71 Hampton Park, Branford, CT 06405 (US). **PENA, Carol, E., A.** [US/US]; 604 Orange Street, Number 2, New Haven, CT 06511 (US). **ALSOBROOK, John, P., II** [US/US]; 60 Lake Drive, Madison, CT 06443 (US). **LEPLEY, Denise, M.** [US/US]; 51 Church Street, Branford, CT 06405 (US). **RIEGER, Daniel, K.** [DE/US]; 10A McKinnel Court, Branford, CT 06405 (US). **GROSSE, William, M.** [US/US]; 15 Rice Terrace Road, Apartment C, Branford, CT 06405 (US).
- (74) Agent: ELRIFI, Ivor, R.;** Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky and Popeo, P.C., One Financial Center, Boston, MA 02111 (US).
- (81) Designated States (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HN, 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, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

WO 02/102990

PCT/US02/19400

**NOVEL FIBROBLAST GROWTH FACTOR AND NUCLEIC
ACIDS ENCODING SAME**

5

FIELD OF THE INVENTION

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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 differentiation. The FGF family of proteins, whose prototypic members include acidic FGF (FGF-1) and basic FGF (FGF-2), bind to four related receptor tyrosine kinases. 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 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 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 a nucleic acid encoding a novel polypeptide 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 splice variants, SNPS, fragments, homologs, analogs, and derivatives thereof, are claimed in the invention. An example of an FGF-CX nucleic acid is SEQ ID NO:1, and an example of an FGF-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. 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 are changed. In some embodiments, the isolated FGF-CX polypeptide

WO 02/102990

PCT/US02/19400

includes the amino acid sequence of a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2, or a variant of a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2. Preferably, no more than 1%, 2%, 3%, 5%, 10% or 15% of the amino acid sequences of SEQ ID NO:2 are changed in the variant of the mature form of the amino acid sequence.

5 Also include 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. An example of an FGF-CX polypeptide is a fragment that includes residues 54-211 of SEQ ID NO:2 or residues 24-211 of
10 SEQ ID NO:2.

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
15 other embodiments, the FGF-CX nucleic acids include a sequence wherein nucleotides different from those given in SEQ ID NO:1 may be incorporated. Preferably, no more than 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, or 20% of the nucleotides are so changed.

In one embodiment, the nucleic acid encodes a polypeptide fragment that includes residues 54-211 of SEQ ID NO:2 or residues 24-211 of SEQ ID NO:2. The nucleic acid can
20 include, *e.g.*, nucleotides 163-633 of SEQ ID NO:1 or nucleotides 70-633 of SEQ ID NO:1.

In other embodiments, the invention includes fragments or complements of these nucleic acid sequences. Vectors and cells incorporating FGF-CX nucleic acids are also included in the invention.

The invention also includes antibodies that bind immunospecifically to any of the FGF-
25 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
30 in 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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.

5 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.

10 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.

15 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
20 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.

25 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.

30 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, or a FGF-CX nucleic acid of the invention, or any other

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 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 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 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 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 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 a 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 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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.

5 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 inhibited are chosen from among transformed cells, hyperplastic cells, tumor cells, and neoplastic cells.

10 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-CX polypeptide, or a FGF-CX antibody in an amount sufficient to treat, prevent, or delay a tissue proliferation-associated disorder in the subject.

15 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 proliferation-associated disorder include, *e.g.*, tumors, restenosis, psoriasis, Dupuytren's contracture, diabetic complications, Kaposi sarcoma, and rheumatoid arthritis.

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

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

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

Western analysis using anti-V5 antibody. CM=conditioned media, SE=suramin-extracted conditioned media. Molecular mass markers are indicated on the left.

FIG. 2 shows a Western analysis of FGF-CX protein secreted by 293 cells.

FIG. 3 shows a Western analysis of FGF-CX (SEQ ID NO:2) protein expressed in *E. coli* cells.

FIG. 4 present 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.

FIG. 5 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

FIG. 6 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.

FIG. 7 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.

FIG. 8 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 athymic nude mice and examined for tumor formation over a two week period. A minimum of 4 animals was used for each data point.

FIG. 9 presents photographs of a control athymic nude mouse and an athymic nude mouse injected subcutis with NIH 3T3 cells stably transfected with an FGF-CX construct.

FIG. 10 presents an image of a Coomassie Blue stained SDS-PAGE gel of purified samples of FGF-CX prepared under reducing and nonreducing conditions.

FIG. 11 provides the results of a dose titration experiment carried out using 786-0 human renal carcinoma cells. In this experiment incorporation of bromodeoxyuridine induced by varying amounts of FGF-CX (designated in FIG. 21 as 20858) was determined.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

FIG. 13 shows *in vitro* formation of foci. NIH 3T3 cells transfected with the indicated constructs were cultured for 2 weeks in DMEM/5% calf serum, stained and photographed. The foci generated by the pJgk-FGF-20 construct are numerous but small due to overcrowding.

5 FIG. 13 shows the results of experiments assessing the receptor binding specificity of FGF-CX. NIH 3T3 cells were serum-starved, incubated with the indicated growth factor (square=PDGF-BB; triangle=aFGF; circle=FGF-CX) either alone or together with the indicated soluble FGFR, and analyzed by a BrdU incorporation assay. Experiments were performed in triplicate and are represented as the percent BrdU increase in incorporation of BrdU relative to cells receiving the growth factor alone.

10 FIG. 14 shows an image of a Coomassie Blue stained SDS-PAGE gel of the arginine supernatant obtained when plasmid pET24a-FGF20X-del54-codon was expressed in *E. coli* strain BL21 (DE3).

FIG. 15 displays the biological activity of a truncated form of recombinant FGF-CX (denoted by (d1-23)FGF20 in the Figure) as represented by its effects on DNA synthesis, compared to that of full length FGF-CX (denoted FGF20 in the Figure). NIH 3T3 mouse fibroblasts were serum-starved, incubated with the indicated factor for 18 hr, and analyzed by a BrdU incorporation assay.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

This invention is based in part on the discovery of novel FGF-CX nucleic acid 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 as growth, survival, apoptosis, motility and differentiation (Szebenyi & Fallon (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; Klmt, P. & Claesson-Welsh, L. (1999) *Front. Biosci.* 4, 165-177). 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 four FGF receptors, contains at least seven tyrosine

WO 02/102990

PCT/US02/19400

phosphorylation sites. A number of signal transduction molecules are affected by binding with different affinities 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 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 & Moscatelli, D. (1992) *Adv. Cancer Res.* 59, 115-165). FGFs may contribute 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 leads to cellular transformation (Matsumoto-Yoshitomi, *et al.* (1997) *Int. J. Cancer* 71, 442-450). Likewise, the constitutive activation of FGFR via mutation or rearrangement leads to uncontrolled proliferation (Lorenzi, *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 8956-8961; Li, *et al.* (1997) *Oncogene* 14, 1397-1406). Furthermore, some FGFs are angiogenic (Gerwins, *et al.* (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 (1999) *Drugs* 58, 17-38).

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. 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. 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

of brain, such as proliferation and migration of neuronal progenitor cells, neuronal and glial differentiation, neurite extensions, and synapse formation.

Other members of the FGF polypeptide family include the FGF receptor tyrosine kinase (FGFR TK) family and the FGF receptor heparan sulfate proteoglycan (FGFRHS) family.

5 These members interact to regulate active and specific FGFR signal transduction complexes. These regulatory activities are diversified throughout a broad range of organs and tissues, and in both normal and tumor tissues, in mammals. Regulated alternative messenger RNA (mRNA) splicing and combination of variant subdomains give rise to diversity of FGFR TK monomers. Divalent cations cooperate with the FGFRHS to conformationally restrict FGFR TK
10 trans-phosphorylation, which causes depression of kinase activity and facilitates appropriate activation of the FGFR complex by FGF. For example, it is known that different point mutations in the FGFR TK commonly cause craniofacial and skeletal abnormalities of graded severity by graded increases in FGF-independent activity of total FGFR complexes. Other processes in which FGF family exerts important effects are liver growth and function and
15 prostate tumor progression.

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
20 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 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 respect to those predicted by the cDNA sequence, except the initiation methionine. The rat
30 FGF-9 cDNA was also cloned, and the structural analysis indicated that the FGF-9 gene is highly conserved.

Using a database search, a human sequence (GenBank AB020858) from chromosome 8p22-p21.3 was identified that was homologous to *Xenopus* FGF20. See, Kirikoshi *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274: 337-343, 2000, PMID 10913340. PCR primers

WO 02/102990

PCT/US02/19400

designed to the human sequence were used to amplify overlapping FGF20 cDNAs from colon cancer and gastric cancer cell lines. The 3 predicted exons of FGF20 encode a deduced 211 amino acid protein containing an FGF core domain. The predicted molecular mass is 23 kD. FGF20 contains a strong hydrophobic region in the FGF core domain and a weak hydrophobic region at the N terminus. No N-terminal signal sequence or potential N-glycosylation sites were identified. FGF20 shares 71.6% and 66.2% overall amino acid sequence identity with FGF9 and FGF16, respectively. Kirikoshi *et al.* (2000) concluded from a phylogenetic analysis that FGF20, FGF9, and FGF16 form a subfamily among the mammalian FGF family. Using Northern blot analysis of 20 adult and fetal tissues and 8 cancer cell lines, Kirikoshi *et al.* (2000) detected a 2.4-kb FGF20 transcript only in a colon cancer cell line, SW480. RT-PCR confirmed the abundant expression of FGF20 in SW480 cells and demonstrated low levels of expression in human fetal brain, fetal liver, fetal kidney, and gastric cancer cell lines.

Kirikoshi *et al.* (2000) noted that the chromosome 8p22-p21.3 region is a frequent site of loss of heterozygosity in human cancer.

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 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 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 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 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 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-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.

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 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 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 A below delineates the sequence descriptors that are used throughout the invention.

TABLE A

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	P5Sec-V5-His Forward
15	P5Sec-V5-His Reverse

WO 02/102990

PCT/US02/19400

16	PSETA linker
17	PSETA linker
18	TaqMan expression analysis forward primer
19	TaqMan expression analysis reverse primer
20	TaqMan expression analysis probe
21	Ag81 (F) TaqMan primer
22	Ag81 (R) TaqMan primer
23	Ag81 (P) TaqMan primer
24	FGF-16 polypeptide, GenBank AB009391
25	FGF-CX cDNA
26	CG53135-02 exon linking primer
27	CG53135-02 exon linking primer
28	CG53135-02 (nt)
29	CG53135-02 (aa)
30	CG53135-06 (nt)
31	CG53135-06 (aa)
32	Q9NP95 FGFK_Human, Fibroblast Growth Factor-20
33	CG53135-03 (nt)
34	CG53135-03 (aa)
35	CG53135-04 (nt)
36	CG53135-04 (aa)
37	CG53135-05 (nt)
38	CG53135-05 (aa)
39	CG53135-07 (nt)
40	CG53135-07 (aa)
41	CG53135-08 (nt)
42	CG53135-08 (aa)
43	CG53135-09 (nt)
44	CG53135-09 (aa)
45	CG53135-10 (nt)
46	CG53135-10 (aa)
47	CG53135 FGF-20-like Protein (nt)
48	CG53135 FGF-20-like Protein (aa)
49	CG53135 Variant 13375518 (nt)
50	CG53135 Variant 13375518 (aa)
51	CG53135 Variant 13365516 (nt)
52	CG53135 Variant 13365516 (aa)
53	CG53135 Variant 13365517 (nt)
54	CG53135 Variant 13365517 (aa)

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 disorder include, *e.g.*, tumors, restenosis, psoriasis, Dupuytren's contracture, diabetic complications, Kaposi sarcoma, and rheumatoid arthritis.

Included in the invention is a nucleotide sequence (SEQ ID NO:1) encoding a novel fibroblast growth factor designated fibroblast growth factor-20X (FGF-CX) (see Table 1; SEQ

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 Table 1 and SEQ ID NO:2, is 23498.4 Da.

Table 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 (also referred to as CG53135-01 or Fibroblast Growth Factor AB020858).

```

1  ATGACCCCTTACCCGAAGTCGGGGCTTCTGGGGCGCTGGAG
   MetAlaProLeuAlaGluValGlyGlyPheLeuGlyGlyLeuGlu
46  GGCTTGGCCAGCAGGTGGTTCGCAITTCCTGTTGCCTCCTGCC
   GlyLeuGlyGlnGlnValGlySerHisPheLeuLeuProProAla
91  GGGAGCCGGCCCGCTGCTGGCCGAGCCGAGAGCGGGCCGAG
   GlyGluArgProProLeuLeuGlyGluArgArgSerAlaAlaGlu
136  CGSAGCCGCGCGCGCGCGCGCGCTCCGCTGGCGGACCTG
   ArgSerAlaArgGlyGlyProGlyAlaAlaGlnLeuAlaHisLeu
181  CACCGCATCCTCGCGCCCGCGCGCTTATGCCGACCGGCTTC
   HisGlyIleLeuArgArgGlnLeuTyrCysArgThrGlyPhe
226  CACCTGCAGATCCTGCCGACCGCGCTGCAGGGCACCGGCGAG
   HisLeuGlnIleLeuProAspGlySerValGlnGlyThrArgGln
271  GACCACAGCCCTTCCTGGTATCTTGGAAITTCATCAGTGGCAGTG
   AspHisSerLeuPheGlyIleLeuGluPheIleSerValAlaVal
316  GGACTGGTCAGTATTAGAGTGTGGACAGTGGTCTCTATCTTGA
   GlyLeuValSerIleArgGlyValAspSerGlyLeuTyrLeuGly
361  ATCAATGACAAAGGAACTCTATGATCAGAGAACTTACITCC
   MetAsnAspLysGlyGluLeuTyrGlySerGluLysLeuThrSer
406  GAAATGCATCTTTAGGAGCAGTTTGAAGAGAACTGGTATAACACC
   GluCysIlePheArgGluGlnPheGluGluAsnTrpTyrAsnThr
451  TAITCATCTAACATATATAAATCATGGAGACTGGCCGAGGAT
   TyrSerSerAsnIleTyrLysHisGlyAspThrGlyArgArgTyr
496  TTTGTGGCACTTAACAAGACCGAACTCCACAGAGTGGCCCGG
   PheValAlaLeuAsnLysAspGlyThrProArgAspGlyAlaArg
541  TCCAGAGGCATCAGAAATTCACATTTCTTACCTAGACCAGTG
   SerLysArgHisGlnLysPheThrHisPheLeuProArgProVal
586  GATCCAGAAAGAGTCCAGAAATTCACAGACCTACTGATGTAC
   AspProGluArgValProGluLeuTyrLysAspLeuLeuMetTyr
631  ACT
     Thr

```

5 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

factor (GAP) (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

5 Table 2).

Table 2 is a BLASTN alignment of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1 with a FGF-9-like Glia-Activating factor (GAF) sequence (SEQ ID NO:5).

```

Query: 170 TGGCGCACCTGCACGGCATCCTGCGCGCCGGCAGCTCTAATGCCGCACCGGCTCCACC 229
      |||
Sbjct: 2 TGGATCATTAAAGGGGATTCACAGGGGAGGCGCTATACCTGCAGGACTGGATTCAC 61

Query: 230 TGCAGATCCCTGCCCCGAGCGCAGCGTGCAGGGCACCCGGCAGGACCCACGCTCTTCGGTA 289
      |||
Sbjct: 62 TAGAAATCTTCGCCAATGGTACTATCCAGGAAACAGGAAAGACCCAGCCGATTTGGCA 121

Query: 290 TCTTGGAAATTCATCAGTGTGSCAGTGGGACTGGTCAGTATTAGAGGTGTGGACAGTGGTC 349
      |||
Sbjct: 122 TCTGGAAATTTATCAGTATAGCAGTGGGCTGGTCAGCATTCGAGGCGTGGACAGTGGAC 181

Query: 350 TCTATCTTGGAAATGAAATGACAAAGGAGAACTCTATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAA 409
      |||
Sbjct: 182 TCTACCTCGGGATGAAATGAGAAAGGGGAGCTGTATGGATCAGAAAACTTACCCAGAGCT 241

Query: 410 GCATCTTTAGGAGCAGTTTGAAGAGAACTGGTATAACACCTATTCTATTAACATATATA 469
      |||
Sbjct: 242 GTGTATTGAGAGAACAGTTCGAGAAAACCTGGTATAATACGTACTCGTCAAACTATATA 301

Query: 470 AAGATGGAGACACTGGCCCGCGGTATTTGTGGCACCTAACCAAGACGGAACTCCAGAG 529
      |||
Sbjct: 302 AGCACGTGGACACTGGAAAGCCGATACATATGTTGCAATTAATTAAGATGGACCCCGAGG 361

Query: 530 ATGGCCCGAGTCCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCTAGACAGTGGATC 589
      |||
Sbjct: 362 AAGGGACTAGGACTAAAACGGCACCCAGAAATTCACACATTTTTCCTAGACAGTGGACC 421

Query: 590 CAGA 593
      |||
Sbjct: 422 CCGA 425

```

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

10 Table 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 Tables 3A-3C, respectively) of an extended genomic fragment of human chromosome 8 (GenBank Accession Number AB020858).

Table 3A

```

Query: 289 TACCGAAGAGGCTGTGGTCTCCCGGTGCGCTGCAAGCTGCCCTCCGCGCAGGATCTCCA 230
      |||

```

WO 02/102990

PCT/US02/19400

Sbjct: 15927 TACCGAAGAGGCTGTGGTCTGCGGGGTGCCCTGCAAGCTGCCTGGGCGAGGATCTGCA 15986
 Query: 229 GFTGGAAGCCGGTSCGGCAATAGAGCTGCCCGGCGCGAGATGCCGTGCAGGTGCGCCA 170
 Sbjct: 15987 GGTGGAAGCCGGTSCGGCAATAGAGCTGCGGCG -CGCAGGATGCCGTGCAGGTGCGCCA 16045
 Query: 169 GCTGCGCAGCCCCCGCCCGCGCGCGCTCCGCTCCGCGCGCTCCTGGCTCGCCCA 110
 Sbjct: 16046 GCTGCGCAGCCCCCGCCCGCGCGCGCTCCGCTCCGCGCGCTCCTGGCTCGCCCA 16105
 Query: 109 GCBGCGGCGCGCTCCCGCGAGGCAACAGGAAATGCGAACCCACTGCTGGCCCA 50
 Sbjct: 16106 GCBGCGGCGCGCTCCCGCGAGGCAACAGGAAATGCGAACCCACTGCTGGCCCA 16165
 Query: 49 AGCCCTCCAGGCCGCCCGAAGAGCCCGCACTTCGGCTAAGGGAGCCAT 1
 Sbjct: 16166 AGCCCTCCAGGCCGCCCGAAGAGCCCGCACTTCGGCTAAGGGAGCCAT 16214

Table 3B

Query: 633 AGTGTACTCAGTAGGTCTTGTACAATCTGGAACCTCTTCTGATCCACTGCTTAGG 574
 Sbjct: 7257 AGTGTACTCAGTAGGTCTTGTACAATCTGGAACCTCTTCTGATCCACTGCTTAGG 7316
 Query: 573 TAAGAAATGTGTAAATTTCTGATGCTCTTGGACCTGGCGCCATCTCTGGAGTCCGTC 514
 Sbjct: 7317 TAAGAAATGTGTAAATTTCTGATGCTCTTGGACCTGGCGCCATCTCTGGAGTCCGTC 7376
 Query: 513 TTTGTAAAGTGCACAAATACCTGCGCCAGTGTCTCCATGTTTATATATGTTAGATGA 454
 Sbjct: 7377 TTTGTAAAGTGCACAAATACCTGCGCCAGTGTCTCCATGTTTATATATGTTAGATGA 7436
 Query: 453 ATAGGTGTTATACCAGTCTCTTCAAACCTGCTCCCTAAGAGTGCATTGGGAAGTAGTTT 394
 Sbjct: 7437 ATAGGTGTTATACCAGTCTCTTCAAACCTGCTCCCTAAGAGTGCATTGGGAAGTAGTTT 7496
 Query: 393 CTC-TGATCCATAGA 380
 Sbjct: 7497 CTCCTGAAGAGAGA 7511

Table 3C

Query: 391 CTGATCCATAGAGTCTCCTTGTGCAATCATCCAGATAGAGACCACTGTCCACACCTC 332
 Sbjct: 9837 CTGATCCATAGAGTCTCCTTGTGCAATCATCCAGATAGAGACCACTGTCCACACCTC 9896
 Query: 331 TAATACTGACCAAGTCCCACTGCCACATGATGAATTCCTAGATACC 286
 Sbjct: 9897 TAATACTGACCAAGTCCCACTGCCACATGATGAATTCCTAGATACC 9942

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

In addition, amino acid residues that are conserved among FGF family members, as indicated by the alignments presented as Table 4 and Table 5, are predicted to be less amenable to alteration. 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.*, FGF-9 and XFGF-CX

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 likely to be amenable to alteration. Black, gray and white represent identical, conserved and nonconserved residues in the alignment, respectively.

Table 4. 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.

Sequences analyzed:

1. HUMAN FGF-9 (F31371_HUMAN FGF-9) [SEQ ID NO:9]
2. MOUSE FGF-9 (F54130_MOUSE FGF-9) [SEQ ID NO:10]
3. RAT FGF-9 (F36364_FGF9_RAT FGF-9) [SEQ ID NO:11]
4. XENOPUS XFGF-CX (BAAB3474Xen; Xenopus laevis XFGF-CX) [SEQ ID NO:12]
5. FGF-CX (cgAB020858) [SEQ ID NO:2]

Multiple Alignment:

```

HUMAN FGF-9  MAPLGEVGNVYFGVQDAVF--FGNVEVLP--VDSFVLDLSDHLGQSEAGGLPRGPAVTDLDH
RAT FGF-9    MAPLGRVGVYFGVQDAVF--FGNVEVLP--VDSFVLDLSDHLGQSEAGGLPRGPAVTDLDH
MOUSE FGF-9  MAPLGEVGVYFGVQDAVF--FGNVEVLP--VDSFVLDLSDHLGQSEAGGLPRGPAVTDLDH
XENOPUS XFGF-CX  MAPLGEVGVYFGVQDAVF--FGNVEVLP--VDSFVLDLSDHLGQSEAGGLPRGPAVTDLDH
FGF-CX       MAPLGEVGVYFGVQDAVF--FGNVEVLP--VDSFVLDLSDHLGQSEAGGLPRGPAVTDLDH

HUMAN FGF-9  LKGLRRRRLVCRIGPHLEIFPNQTIQGTAKDHSRFGILEPFSIAVGLVSRGVDSSGLVLI
RAT FGF-9    LKGLRRRRLVCRIGPHLEIFPNQTIQGTAKDHSRFGILEPFSIAVGLVSRGVDSSGLVLI
MOUSE FGF-9  LKGLRRRRLVCRIGPHLEIFPNQTIQGTAKDHSRFGILEPFSIAVGLVSRGVDSSGLVLI
XENOPUS XFGF-CX  LKGLRRRRLVCRIGPHLEIFPNQTIQGTAKDHSRFGILEPFSIAVGLVSRGVDSSGLVLI
FGF-CX       LKGLRRRRLVCRIGPHLEIFPNQTIQGTAKDHSRFGILEPFSIAVGLVSRGVDSSGLVLI

HUMAN FGF-9  GNNRKGRLYGSSEKLTQSCVFRQPRQPRNNYNTYSSNLVYKHVDIGRRYVALNKDGTFRFGT
RAT FGF-9    GNNRKGRLYGSSEKLTQSCVFRQPRQPRNNYNTYSSNLVYKHVDIGRRYVALNKDGTFRFGT
MOUSE FGF-9  GNNRKGRLYGSSEKLTQSCVFRQPRQPRNNYNTYSSNLVYKHVDIGRRYVALNKDGTFRFGT
XENOPUS XFGF-CX  GNNRKGRLYGSSEKLTQSCVFRQPRQPRNNYNTYSSNLVYKHVDIGRRYVALNKDGTFRFGT
FGF-CX       GNNRKGRLYGSSEKLTQSCVFRQPRQPRNNYNTYSSNLVYKHVDIGRRYVALNKDGTFRFGT

HUMAN FGF-9  RTRRHQKFTFLRPRVDPDKVPELYKDLISQS
RAT FGF-9    RTRRHQKFTFLRPRVDPDKVPELYKDLISQS
MOUSE FGF-9  RTRRHQKFTFLRPRVDPDKVPELYKDLISQS
XENOPUS XFGF-CX  RTRRHQKFTFLRPRVDPDKVPELYKDLISQS
FGF-CX       RTRRHQKFTFLRPRVDPDKVPELYKDLISQS

```

FGF-CX was aligned with human FGF-9, human FGF-16 and Xenopus FGF-CX (Accession Numbers D14838, AB009391 and AB012615, respectively). The ClustalW is shown in Table 5.

Table 5. ClustalW alignment of FGF-CX with three other FGF family members.

```

          10      20      30      40      50
FGF-CX (SEQ ID NO:2)  MAPLAEVGGVGGVGGVGVSSHFLDPAASRGLDSESRASLRRSR  49
XFGF-20 (SEQ ID NO:12)  MAPLAEVGGVGGVGGVGVSSHFLDPAASRGLDSESRASLRRSR  48
FGF-9 (SEQ ID NO:9)    MAPLAEVGGVGGVGGVGVSSHFLDPAASRGLDSESRASLRRSR  46
FGF-16 (SEQ ID NO:24)  --MAPVGVVRSALNDLHGSSESLGNVLAASEGFHMERLGGTACKLER  47

          60      70      80      90     100
FGF-CX (SEQ ID NO:2)  GPGGAAFLAHLEGLRRRRLVCRIGPHLQILPDGAVOQTRQDHSRFGILE  99
XFGF-20 (SEQ ID NO:12)  GPGGAAFLAHLEGLRRRRLVCRIGPHLQILPDGAVOQTRQDHSRFGILE  96
FGF-9 (SEQ ID NO:9)   GPGAVTDLGLKGLRRRRLVCRIGPHLEIFPNQTIQGTAKDHSRFGILE  96
FGF-16 (SEQ ID NO:24)  GPG--LFLAHLEGLRRRRLVCRIGPHLEIFPNQTIQGTAKDHSRFGILE  95

```

WO 02/102990

PCT/US02/19400

```

      110      120      130      140      150
FGF-CX (SEQ ID NO:2)  PISVAVGLVSIIRGVDSGLYLGMNDKGRVYGSSEKLTSECFRQEPFENWYN 149
XFGF-20 (SEQ ID NO:12) PISVAVGLVSIIRGVDSGLYLGMNDKGRVYGSSEKLTSECFRQEPFENWYN 146
FGF-9 (SEQ ID NO:9)   PISVAVGLVSIIRGVDSGLYLGMNDKGRVYGSSEKLTSECFRQEPFENWYN 146
FGF-16 (SEQ ID NO:24) PISVAVGLVSIIRGVDSGLYLGMNDKGRVYGSSEKLTSECFRQEPFENWYN 145

      160      170      180      190      200
FGF-CX (SEQ ID NO:2)  TVSSNLTQKHGDSGRRYFVALNKDGTFRDGTGSRKRHKQKFTHLPRPVDPDK 199
XFGF-20 (SEQ ID NO:12) TVSSNLTQKHGDSGRRYFVALNKDGTFRDGTGSRKRHKQKFTHLPRPVDPDK 196
FGF-9 (SEQ ID NO:9)   TVSSNLYKHGVTGRRYFVALNKDGTFRDGTGSRKRHKQKFTHLPRPVDPDK 196
FGF-16 (SEQ ID NO:24) TVSSNLYKHGDSGRRYFVALNKDGTFRDGTGSRKRHKQKFTHLPRPVDPDK 195

      210
FGF-CX (SEQ ID NO:2)  VPFLVKDLDL 211
XFGF-20 (SEQ ID NO:12) VPFLVKDLDL 208
FGF-9 (SEQ ID NO:9)   VPFLVKDLDL 208
FGF-16 (SEQ ID NO:24) VPFLVKDLDL 207

```

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 Table 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. 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.

Table 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 (“|”) and positive (“+”) residues.

```

Query:   1  MAPLAEVGGSTLGGLEGLGQQVGSFLLFPAGERPFLGERRSAAERSARG-GPGAAQLAH 59
      ||| ||| + | + + | + +| + || + +| || |
Sbjct:   1  MAPLGEVGNVFGVQDAV--PPGNVPLFV--DSPVLLSDHLGQSRAGGLRGPVAVTLDLH 56

Query:   60 LHGILRRRQLYCRTPHQLTLPDGSVQGTFRQDHSILPGLLEFISVAVGLVSIIRGVDSGLYL 119
      | ||| ||| ||| ||| ||| +| | +| +| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct:   57 LKGLRRRQLYCRTPHLETFPNGTITQSTRKDSRFGIILEFISTAVGLVSIIRGVDSGLYL 116

Query:   120 GMNDKGEVYGSSEKLTSECFRQEPFENWYNTYSSNLYKHGDTGRRYFVALNKDGTFRDGA 179
      ||| +||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct:   117 GMNKGELVGSSEKLTQECVFRQEPFENWYNTYSSNLYKHVDYGRRYFVALNKDGTFRGT 176

Query:   180 RSKRHQKFTHLPRPVDPERVPFLYKDLL 208
      | + ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct:   177 RTRKHQKFTHLPRPVDPDKVPELYKDLL 205

```

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 Tables 7 and 8, respectively. See, SWISSPROT Accession Number P54130 for Glia-Activating Factor Precursor (GAF) (Fibroblast Growth

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 XFGF-CX open reading frame contains a motif characteristic of the FGF family. XFGF-CX has a 73.1% overall similarity to XFGF-9 but differs from XFGF-9 in its amino-terminal region (33.3% similarity). This resembles the similarity seen for the presently disclosed SEQ ID NO:2 with respect to various mammalian FGF-9 and FGF-16 sequences, including human (see above). See, Tables 4, 5 and 7-9.

Table 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 ("|") and positive ("+") residues.

```

Query:   1  MAPLAEVGGFLGGLGELGQQVGSHPFLFPAGERPPLIGERRSAAERSARGGPGAAQLAHL 60
          |||||*|| |||| + ||| ||||| |||| + | | + + +|| + | + |+||
Sbjct:   1  MAPLADVGTFLGGYDALGQ-VGSHFLFPKADSPLLENDPLAQSERLSRSAP--SLSHL 57

Query:   61  HGIILRRRQLYCRIGFHLQILPDGVSQGTQRQDHSLEFGLLEPTISVAVGLVSIKGVDSGLYLG 120
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct:   58  QGILRRRQLYCRIGFHLQILPDGNVQGTQRQDHSRFPGLSFLSVAIGLVSTRQVDTGLYLG 117

Query:   121  MNDKGLYVSEKLTSECFRQPEENWYNTYSSNLYKHGDTNRRYFVALNKDGTPRDGR 180
          ||||| + ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct:   118  MNDKGLFVSEKLTSECFRQPEENWYNTYSSNLYKHGDSGRRYFVALNKDGTPRDGR 177

Query:   181  SRHQKPTFLFRPVDPERVPPELYKDLIMYT 211
          +||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct:   178  SRHQKPTFLFRPVDPERVPPELYKDLIMYS 208

```

Additional FGF-20 variants were cloned and identified, as described in the examples.

BLASTN and BLASTP analyses were performed for two additional variants, specifically CG53135-02 and CG53135-06. A high-scoring match as determined by a BLASTN search of GenBank Composite (no HTG) dated 06/12/01 using the sequence of the Fibroblast Growth Factor-20-like gene of the invention. A high-scoring match as determined by a BLASTP search (versus Non-Redundant Composite dated 06/12/01) using the sequence of the Fibroblast Growth Factor-20-like protein of the invention. Results are shown in Tables 10 and 11, respectively.

Table 10. BLASTN and BLASTP Results for FGF-20 CG53135-02 variant				
Database Identifier	Protein/Organism/Length [Patent #, Date]	Residues/ Match Residues	Identities/ Similarities for the Matched Region	Expect Value
AB044277	GENBANK- ID:AB044277 mRNA for FGF-20, complete cds - Homo sapiens 1016 bp	34..538 262..767	495/506 (97%) 495/506 (97%)	1.6e-103

WO 02/102900

PCT/US02/19400

Q9NP95	SWISSNEW-ACC:Q9NP95 FIBROBLAST GROWTH FACTOR-20 (FGF-20) - Homo sapiens (Human), 211 aa.	18..179 50..211	160/162 (98%) 160/162 (98%)	1.6e-93
--------	--	--------------------	--------------------------------	---------

Table 11. BLASTN and BLASTP Results for FGF-20 CG53135-06 variant

Database Identifier	Match Protein/Organism/Length [Patent #, Date]	Residues/ Match Residues	Identities/ Similarities for the Matched Region	Expect Value
AB044277	GENBANK-ID:AB044277 mRNA for FGF-20, complete cds - Homo sapiens 1016 bp	34..538 262..767	496/506 (98%) 496/506 (97%)	6.9e-104
Q9NP95	SWISSNEW-ACC:Q9NP95 FIBROBLAST GROWTH FACTOR-20 (FGF-20) - Homo sapiens (Human), 211 aa.	18..179 50..211	161/162 (99%) 161/162 (99%)	6.3e-94

The polypeptide sequence in Table 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). The CG53135-02 and CG53135-06 variant polypeptides are predicted by PSORT to have a probability of 0.8500 to be in the endoplasmic reticulum (membrane). In alternative embodiments, the CG53135-02 and CG53135-06 variant polypeptides are located in the plasma membrane with a probability of 0.7900, a microbody (peroxisome) with a probability of 0.7478 or the mitochondrial inner membrane with a probability of 0.100. The CG53135-02 and CG53135-06 variant polypeptides are predicted by the software program INTEGRAL to have a -6.42 likelihood of being a transmembrane domain between amino acid residues 62-78 (60-81). The FGF-CX polypeptide seems to be a type II (Ncyt Cexo) membrane protein.

In addition, although it does not have a predicted known cleavable signal sequence at its N-terminus, a hydropathy plot of the protein 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. A hydropathy plot of the CG53135-02 and CG53135-06 variant proteins indicates that two prominent hydrophobic segments reside at amino acid positions about 23 to about 60 and from amino acid positions about 82 to the end. In various embodiments, the hydrophobic segments are antigenic and targets for FGF-CX /FGF-20-like protein specific antibodies.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

FGF-CX lacks a classical amino-terminal signal sequence as predicted by PSORT (Nakai, K & Kanehisa, M. (1992) *Genomics* 14, 897-911) and SIGNALP (Nielsen, *et al.* (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

5 (Matsumoto-Yoshitomi, *et al.* (1997) *Int. J. Cancer* 71, 442-450; Miyake, *et al.* (1998) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 243, 148-152; Miyakawa, *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 29352-29357; Revest *et al.* (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

10 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. 1, 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

15 protein released in this way also exhibits a similar Western blot pattern (FIG. 1). 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. 2, Example 5).

ClustalW multiple protein alignments (Thompson, *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 20 4673-4680) for several vertebrate FGF-like proteins, including the FGF-CX of the present invention, 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

25 internal hydrophobic domain involved in FGF-9 secretion (*see, e.g.*, Miyakawa, *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 29352-29357) spans residues 95-120 of the FGF-9 sequence. Software for determining a hydropathy plot of FGF-CX are well known in the art, including, for example, the Kyte Doolittle, and other algorithms further described below.

The expression of XFGF-20 and of *Xenopus* FGF-9 are distinct from each other.

30 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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.

5 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.

10 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
15 gastric carcinomas (Emi, *et al.* (1992) *Cancer Res.* 52, 5368-5372; Baffa, *et al.* (2000) *Clin. Cancer Res.* 6, 1372-1377). It is possible 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
20 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 Igκ signal
25 sequence at its amino-terminus (construct pIgκ-FGF-CX). However, it should be noted that pIgκ-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. 8). The superior oncogenicity of pIgκ-FGF-CX relative to pFGF-CX is likely due to the fact that pIgκ-FGF-CX produces significantly more secreted FGF-CX protein than does pFGF-CX in NIH 3T3 cells
30 (FIG. 1B).

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, *et al.* (1997) *Int. J. Cancer* 71, 442-450; Li, *et al.* (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 7660-7669).

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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.

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 Table 1 and SEQ ID NO:1, 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 invention includes mutant or variant nucleic acids of SEQ ID NO:1, or a fragment thereof, any of whose bases may be changed from the corresponding base shown in Table 1 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, including fragments, derivatives, analogs and homolog thereof. Examples of the complementary strand of portions of FGF-CX are shown in Table 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 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 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 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-

WO 02/102990

PCT/US02/19400

stranded and designed to have specificity in PCR, membrane-based hybridization technologies, or ELISA-like technologies.

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. 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 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.

A nucleic acid molecule of the present invention, *e.g.*, a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, or a complement of any of this 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 as a hybridization probe, FGF-CX nucleic acid sequences can 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, 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 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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

5 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 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.

10 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 a portion of this nucleotide sequence. A nucleic acid molecule that is complementary to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 is one that is sufficiently complementary to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 that it can hydrogen bond with little or no

15 mismatches to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, 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

20 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

25 intermediates.

Moreover, the nucleic acid molecule of the invention can comprise only a portion of the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1, *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 provided herein are defined as sequences of at least 6 (contiguous) nucleic acids or at least 4 (contiguous)

30 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 FGF-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 FGF-CX polypeptide of species other 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, as well as a polypeptide

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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.

5 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,
10 250, 300, 350 or 400 or more consecutive sense strand nucleotide sequence of SEQ ID NO:1; or an anti-sense strand nucleotide sequence of SEQ ID NO:1; or of a naturally occurring mutant of SEQ ID NO:1.

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
15 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
20 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
25 FGF-CX" can be prepared by isolating a portion of SEQ ID NO:1, that encodes a polypeptide having a FGF-CX biological activity (biological activities of the FGF-CX 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
30 optionally include an ATP-binding domain. In another embodiment, a nucleic acid fragment 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 FIG.1 due to degeneracy of the genetic code. These nucleic

WO 02/102990

PCT/US02/19400

acids thus encode the same FGF-CX protein as that encoded by the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1. 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.

5 In addition to the human FGF-CX nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1, it will be appreciated by those skilled in the art that DNA sequence polymorphisms 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
10 "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 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
15 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 thus that have a nucleotide sequence that differs from the human sequence of SEQ ID NO:1, 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
20 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 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
25 human FGF-CX.

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. In another embodiment, the nucleic acid is at least 10, 25, 50, 100, 250, 500 or 750 nucleotides in length. In another
30 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.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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.

5 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
10 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
15 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.

20 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
25 hybridization in a high salt buffer comprising 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% 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
30 molecule. As used herein, a "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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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.

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 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 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 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 denatured salmon sperm DNA, 10% (wt/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 EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY; Shilo and Weinberg, 1981, Proc Natl Acad Sci USA 78: 6789-6792.

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, thereby leading to 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. 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 an "essential" amino acid residue is required for biological activity. For example, amino acid residues that are conserved among

WO 02/102990

PCT/US02/19400

the FGF-CX proteins of the present invention, are predicted to be particularly unamenable 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, yet retain biological activity. In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule comprises a 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. Preferably, the protein encoded by the nucleic acid is at least about 80% homologous to SEQ ID NO:2, more preferably at least about 90%, 95%, 98%, and most preferably at least about 99% homologous to SEQ ID NO:2.

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, such that one or more amino acid substitutions, additions or deletions are introduced into the encoded protein.

Mutations can be introduced into SEQ ID NO:1 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 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, 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 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 and 3 the encoded protein can be expressed by any recombinant technology known in the art and the activity of the protein can be determined.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 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 fragments, analogs or derivatives thereof. An "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, 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 antisense nucleic acids complementary to a FGF-CX nucleic acid sequence of SEQ ID NO:1 are additionally provided.

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). In another embodiment, the antisense nucleic acid molecule is 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), antisense nucleic acids of the invention can be designed according to 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, for example, about 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 or 50 nucleotides in length. An antisense

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 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-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, beta-D-galactosylqueosine, 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, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid (ν), wybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid (ν), 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).

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 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 specifically bind to receptors or antigens expressed on a selected cell surface,

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 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 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).

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.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 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 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).

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 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.* (1996) *Nucl Acids Res* 24: 3357-63. For example, a DNA chain can be synthesized

WO 02/102990

PCT/US02/19400

on a solid support using standard phosphoramidite coupling chemistry, and modified nucleoside analogs, *e.g.*, 5'-(4-methoxytrityl)amino-5'-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 and a 3' DNA segment (Finn *et al.* (1996) above).
5 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: 1119-11124.

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 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 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.*
10
15

FGF-CX polypeptides

The novel protein of the invention includes the FGF-CX-like protein whose sequence is provided in Table 1 (SEQ ID NO:2). The invention also includes a mutant or variant protein any of whose residues may be changed from the corresponding residue shown in Table 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.
20

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 12 (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
25
30

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 12.

	POSITION	POSSIBLE SUBSTITUTION
5	6:	Glu to Asp
	9:	Gly to Ser, Thr, or Asn
	10:	Phe to Tyr
	11:	Leu to Phe or Ile
10	15:	Glu to Asp
	16:	Gly to Ala
	17:	Leu to Ile or Val
	19:	Gln may be deleted
	21:	Val to Phe or Ile
15	31:	Gly to Lys, Arg, Ser, or Ala
	33:	Arg to Lys or Ser
	35:	Pro to Leu or Val
	38:	Gly to Asn or Ser
20	39:	Glu to Asp
	40:	Arg to Lys, His, or Pro
	42:	Ser to Thr, Ala, or Gly
	43:	Ala to Gln, Asn, or Ser
	48:	Ala to Ser or Gly
	51:	Gly to Ala
	53:	Gly to Ala or deleted
25	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
30	61:	His to Gln, Asn, Lys, or Arg
	78:	Gln to Asn, Glu, or Asp
	80:	Leu to Phe or Ile
	82:	Asp to Glu, Asn, or Gln
	84:	Ser to Asn, Thr, or Gln
35	85:	Val to Ile
	90:	Gln to Asn or Lys
	103:	Val to Ile
	115:	Ser to Thr
40	123:	Asp to Glu
	128:	Tyr to Phe
	135:	Ser to Thr, Gln, or Asn
	138:	Ile to Val or Leu
	155:	Ile to Leu
	159:	Gly to Val or Ala
45	161:	Thr to Ser
	166:	Phe to Tyr
	177:	Asp to Glu
	181:	Ser to Ala or Thr
	198:	Glu to Asp
	199:	Arg to Lys

WO 02/102990

PCT/US02/19400

207: Leu to Ile or Val
209: Met to any residue
211: Thr to Ser

5 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
10 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.

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
15 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
20 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
25 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
30 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 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. In other embodiments, the FGF-CX protein is substantially homologous to SEQ ID NO:2 and retains the functional activity of the protein of SEQ ID NO:2, 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 and retains the functional activity of the FGF-CX proteins of SEQ ID NO:2. 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 and retains the functional activity of the FGF-CX proteins of the corresponding polypeptide having the sequence of SEQ ID NO:2.

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 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").

WO 02/102990

PCT/US02/19400

The nucleic acid sequence homology may be determined as the degree of identity 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
5 for nucleic acid sequence comparison: GAP creation penalty of 5.0 and GAP extension penalty 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.

The term "sequence identity" refers to the degree to which two polynucleotide or
10 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 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
15 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 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
20 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 positions at which the identical and conservative amino acid substitutions, as defined above, occur in both sequences to yield the number of matched
25 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
30 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 substantially homologous to the FGF-CX protein, *e.g.*, a protein that is different from the FGF-

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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
5 comprises at least two 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.

For example, in one embodiment a FGF-CX fusion protein comprises a FGF-CX
10 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).

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)
15 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 sequence (*i.e.*, amino acids 1 to 20 of SEQ ID NO:2) can be removed and replaced with a signal sequence from another protein. In certain host cells (*e.g.*, mammalian host cells),
20 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 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
25 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 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
30 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. 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 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 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 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. 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.

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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 Yourvan (1992) PNAS 89:7811-7815; Delgrave *et al.* (1993) Protein Engineering 6:327-331).

5 **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

10 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

15 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, 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 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

25 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 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 these 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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

2. Monoclonal Antibodies

The term "monoclonal antibody" (MAb) or "monoclonal antibody composition", as used herein, refers to a population of antibody molecules that contain only one molecular
10 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 binding site capable of immunoreacting with a particular epitope of the antigen characterized by a unique binding affinity for it.

15 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 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*.

20 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 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. See,
25 *e.g.*, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103. Immortalized cell lines are usually transformed mammalian cells, particularly myeloma cells of rodent, bovine and human origin. Usually, rat or mouse myeloma cell lines are employed. The hybridoma cells can be cultured in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused,
30 immortalized cells. For example, if the parental cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRPT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine ("HAT medium"), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

Preferred immortalized cell lines are those that fuse efficiently, support stable high level expression of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. More preferred immortalized cell lines are murine myeloma lines, which can be obtained, for instance, from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California and the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies. See, *e.g.*, Kozbor: *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*: *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63.

The culture medium in which the hybridoma cells are cultured can then be assayed for the presence of monoclonal antibodies directed against the antigen. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by the hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked 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 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.

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 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 then transfected into host cells such as simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells,

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 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 be substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody of the invention to create a chimeric bivalent antibody.

10 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 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. 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); Verhoeven *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 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 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. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)).

WO 02/102990

PCT/US02/19400

4. Human Antibodies

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.

5 Human monoclonal antibodies directed against a FGF-CX protein can be prepared by the trioma 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 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).

15 In addition, human antibodies can also be produced using additional techniques, including phage display libraries (Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); 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 20 humans in all respects, including gene rearrangement, assembly, and antibody repertoire. This approach is described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, and in 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)).

25 Human antibodies that specifically bind a FGF-CX protein may additionally be produced 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 30 immunoglobulin chains in the nonhuman host have been incapacitated, and active loci encoding 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

than the full complement of the modifications. The preferred embodiment of such a nonhuman animal is a 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 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.

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 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 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 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 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof. Antibody fragments that contain the idiotypes to a protein antigen 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.

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 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 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).

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. 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 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

chains (e.g. tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the large side 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.

5 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 wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate F(ab')₂ fragments. 10 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 15 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) 20 describe the production of a fully humanized bispecific antibody F(ab')₂ molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from *E. coli* and subjected to directed chemical coupling *in vitro* to form the bispecific antibody. The bispecific antibody thus formed was able to 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.

25 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 30 the hinge region 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)

WO 02/102990

PCT/US02/19400

by a linker 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 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).

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 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).

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). 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.

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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

interchain disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody thus generated can have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). See Caron *et al.*, *J. Exp. Med.*, 176: 1191-1195 (1992) and Shopes, *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992). Homodimeric antibodies with enhanced anti-tumor activity can also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as described in Wolff *et al.* *Cancer Research*, 53: 2560-2565 (1993). Alternatively, an antibody can be engineered that has dual Fc regions and can thereby have enhanced complement lysis and ADCC capabilities. See Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design*, 3: 219-230 (1989).

9. Immunoconjugates

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).

Chemotherapeutic agents useful in the generation of such immunoconjugates have been described above. Enzymatically active toxins and fragments thereof that can be used include diphtheria A chain, nonbinding active fragments of diphtheria toxin, exotoxin A chain (from *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A chain, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, Aleurites fordii proteins, dianthin proteins, *Phytolaca americana* proteins (PAPI, PAPII, and PAP-S), momordica charantia inhibitor, curcin, crotin, *sapaonaria officinalis* inhibitor, gelonin, 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), 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) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). For example, a ricin immunotoxin can be prepared as described in Vitetta *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). Carbon-14-labeled 1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylene triaminepentaacetic acid (MX-DTPA) is an exemplary chelating agent for conjugation of radionucleotide to the antibody. See WO94/11026.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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.

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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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.*,
5 physically linking) the antibody to a detectable substance. Examples of detectable substances include 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;
10 examples of suitable 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 .

15 12. Antibody Therapeutics

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
20 the subject and will generally have an effect due to its binding with the target. Such an effect may be one of two 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
25 of the naturally occurring ligand, wherein the ligand serves as an effector molecule. Thus the receptor mediates 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
30 pathology, binds the antibody as a surrogate effector ligand, initiating a receptor-based signal 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

functioning of the target, and in other cases, promotes a physiological response. The amount 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 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

10 Antibodies specifically binding a FGF-CX protein of the invention, as well as other 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 15 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, *et al.*, editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa. : 1995; Drug 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, 20 internalizing antibodies are preferred. However, liposomes can also be used to deliver the antibody, or an antibody fragment, into cells. Where antibody fragments are used, the smallest inhibitory fragment that specifically binds to the binding domain of the target protein is preferred. For example, based upon the variable-region sequences of an antibody, peptide molecules can be designed that retain the ability to bind the target protein sequence. Such 25 peptides can be synthesized chemically and/or produced by recombinant DNA technology. See, *e.g.*, Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993). The formulation herein 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 30 enhances its function, such as, for example, a cytotoxic agent, cytokine, chemotherapeutic agent, or growth-inhibitory agent. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The active ingredients can also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example,

WO 02/102990

PCT/US02/19400

hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles, and nanocapsules) or in macroemulsions.

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

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
10 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
15 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
20 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,
25 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
30 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

expression control elements (e.g., polyadenylation signals). Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel; 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., 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 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 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 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 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; 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89).

5 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 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
10 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 (Kurjan and Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz *et al.*, (1987) *Gene* 54:113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.),
15 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.*, SF9 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).
20

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
25 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.

30 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*

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 (1989) *PNAS* 86:5473-5477), pancreas-specific promoters (Edlund *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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

as Chinese hamster ovary cells (CHO) or COS cells). Other suitable host cells are known to those skilled in the art.

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

10 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).

15 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.

Transgenic animals

20 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 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 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 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 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 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 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.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

To create a homologous recombinant animal, a vector is prepared which contains at least 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-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.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 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 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 Wilmut *et al.* (1997) *Nature* 385:810-813. In brief, a cell, *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 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, 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, 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 used. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is well known

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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.

5 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, intradermal, or subcutaneous application can include the following components: a sterile
10 dihuent 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 acids or bases, such as hydrochloric acid or sodium hydroxide. The parenteral preparation
15 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 sterile injectable solutions or dispersion. For intravenous administration,
20 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 microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion
25 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 action of microorganisms can be achieved by various antibacterial and
30 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 manitol, 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 absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

5 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 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 the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

10 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 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 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.

25 Systemic administration can also be by transmucosal or transdermal means. For transmucosal or transdermal administration, penetrants appropriate to the barrier to be permeated 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.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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.

5 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, 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
10 obtained commercially 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.

15 It is especially advantageous to formulate oral or parenteral compositions in dosage unit 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
20 the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on the unique 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.*,
25 intravenous injection, local administration (see U.S. Pat. No. 5,328,470) or stereotactic injection (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,
30 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 delivery system.

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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

Uses and Methods of the Invention

The nucleic acid molecules, proteins, protein homologues, and antibodies described 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); 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 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 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.

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 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 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

applicable to peptide, non-peptide oligomer or small molecule libraries of compounds (Lam (1997) *Anticancer Drug Des* 12:145).

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) *Science* 261:1303; Carrell *et al.* (1994) *Angew Chem Int Ed Engl* 33:2059; Carell *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.).

- 15 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 of mammalian origin or a yeast cell. Determining the ability of the test compound to bind to the FGF-CX protein can be
- 20 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 , ^{32}S , ^{14}C , or ^3H , either directly or indirectly, and the radioisotope detected by direct counting of radioemission or by scintillation counting.
- 25 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
- 30 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.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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-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 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 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 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 , *etc.*), detecting catalytic/enzymatic activity of the target 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 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 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 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 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 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 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, n-dodecylmaltoside, octanoyl-N-methylglucamide, decanoyl-N-methylglucamide, Triton[®] X-100, Triton[®] X-114, Thesit[®], Isotridecypoly(ethylene glycol ether)_n, N-dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane sulfonate, 3-(3-cholamidopropyl)dimethylamminio-1-propane sulfonate (CHAPS), or 3-(3-cholamidopropyl)dimethylamminio-2-hydroxy-1-propane sulfonate (CHAPSO).

WO 02/102990

PCT/US02/19400

In more than one embodiment of the above assay methods of the present invention, it 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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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,
30 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 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 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 *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, 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 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 (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 screening assays and uses thereof for treatments as described herein.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 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.

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).

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.

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 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 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, 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 bases. If

WO 02/102990

PCT/US02/19400

predicted coding sequences are used, a more appropriate number of primers for positive individual identification would be 500-2,000.

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. 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 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.

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 (*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.

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,

WO 02/102990

PCT/US02/19400

psoriasis, Dupuytren's contracture, diabetic complications, Kaposi's sarcoma and rheumatoid arthritis.

5 FGF-CX may be used in the method of the invention for detecting its corresponding fibroblast growth factor receptor CX (FGFRX) in a sample or tissue. The method comprises contacting the sample or tissue with FGF-CX, allowing formation of receptor-ligand pairs, and detecting any FGFRX: FGF-CX pairs. Compositions containing FGF-CX can be used to increase FGFRX 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 FGFRX, especially multiple or solitary hereditary exostosis, hallux valgus deformity, achondroplasia, 10 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, 15 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 20 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 stimulates fibroblasts (for accelerating healing of burns, wounds, ulcers, etc), megakaryocytes (to increase the number of platelets), hematopoietic cells, 25 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, 30 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

detecting or determining a biological activity of a FGF-CX polypeptide or for purifying a FGF-CX 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 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 a portion thereof, such as an oligonucleotide of at least 15, 30, 50, 100, 250 or 500 nucleotides in length and sufficient to specifically hybridize under

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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.

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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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.

5 **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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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 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.)

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 Abravaya *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 preliminary amplification step in conjunction with any of the techniques used for detecting mutations described herein.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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
5 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.

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
10 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
15 or loss of a ribozyme cleavage site.

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 oligonucleotides probes (Cronin *et al.* (1996) *Human Mutation* 7: 244-255; Kozal *et al.* (1996) *Nature Medicine* 2: 753-759). For example, genetic mutations in
20 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
25 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.

In yet another embodiment, any of a variety of sequencing reactions known in the art
30 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) *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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 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) 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 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 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 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 G/T 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 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) 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

DNA fragments of sample and control FGF-CX nucleic acids will be denatured and allowed to renature. 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 heteroduplex analysis to separate double stranded heteroduplex molecules on the basis of changes in electrophoretic mobility. See, e.g., Keen *et al.* (1991) *Trends Genet* 7:5.

10 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 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., Rosenbaum and Reissner (1987) *Biophys Chem* 265:12753.

15 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 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.

20 Alternatively, allele specific amplification technology that depends on selective PCR amplification may be used in conjunction with the instant invention. Oligonucleotides used as 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) *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)

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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

5 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.

10 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

15 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

20 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

25 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.

30 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., 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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.

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.

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 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*

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 more 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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.

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, immunoassays (*e.g.*, by Western blot analysis, immunoprecipitation followed by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis, immunocytochemistry, *etc.*) and/or

WO 02/102990

PCT/US02/19400

hybridization assays to detect expression of mRNAs (*e.g.*, Northern assays, dot blots, *in situ* hybridization, *etc.*).

5 In one aspect, the invention provides a method for preventing, in a subject, a disease or 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 symptoms characteristic of the FGF-CX aberrancy, such that a disease or disorder is
10 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
15 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
20 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
25 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 administering an agent (*e.g.*, an agent identified by a screening assay described
30 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.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

EXAMPLES

Example 1. Identification of the FGF-CX gene.

The FGF-CX gene was identified following a TBLASTN (Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215, 403-410) search of Genbank human genomic DNA sequences with Xenopus FGF-CX (Koga, *et al.* (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 (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 Table 13; the structure of the 3' untranslated region has not yet been determined). Table 13 presents an analysis of the FGF-CX gene, including the nucleotide (SEQ ID NO:25) and deduced amino acid (SEQ ID NO:2) sequence of FGF-CX. The initiation and stop codons are in bold, and an in frame stop codon residing in the 5' UTR is underlined.

Table 13

```

Exon 1
...AGACAGTGGAGGCTTCCCTGCAATTTTCAGTGCAAAGTCCCTCCGGAGCACTCAGAGGAGTAACCGGGCCCTAACT
TTTTGCGCTGGTTTTGCTATAATTTTTCTCTATCCACCTCCATCCACCCCCACACACTCTTACTGGGGGGTCTTTT
1  GTGTTCCGGATCTCCCCCTCCATGGCTCCCTTAGCCGAGTCCGGGGCTTTCTGGCGGCTGGAGGGCTTGGGCCAGCA
M A P L A E V G G F L G G L E G L G Q Q
1  GGTGGGTTCCGATTTCCCTGCTCTGCGGGGCGGGCGGCTGCTGGCGGAGCCAGAGCGGGCGGAGCCGA
21  V G S E F L L P P A G E R P P L L G E R R S A A E R S
CGCCCGCGCGCGCGCGGGGCTGCGCAGCTGGCGCACCTGCACGGCCTCTGCGCGCCGGCAGCTCTATTGCGCGACC
48  A R G G F G A A Q L A H L H G I L R R R Q L Y C R T
GGCTTCCGACTGCGAGATCCTGCCCGACGGCGCTGCGAGGGCCGCCCGGCGAGCCACAGCCTCTCGGTACTTGGAAAT
74  G F H L Q I L P D G S V Q G T R Q D H S L P G I L E F
CAGTGGTGGCAGTGGGACTGGTCAATATTAGAGGTTGGACAGTGGTCTCTATCTGGAAATGAATGCAAGAGGAGAAC
101  I S V A V S L V S I E R G V D S S L Y L G M N D K G E L
<-|-> Exon 3
128  TCTATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAAATGCATCTTTAGGGAGCAGTTTGAAGAGAACTGCTATAACACCTATTGATCT
Y G S R K L T S E C T F R E D F E N W Y N T Y S S
AAACATATAAACAATGAGACACTGGCCCGAGGTATTTGTGGCACTTAACAAGACCGGACTCCAGAGGATGGCGCCAG
154  N I Y K H G D T G R R Y F V A L N K D G T P R D G A R
GTCCAGAGGCATCGAATTTACACATTTCTTACCTAGACCGATGGATCCAGAAAGAGTTCCGAAATTGTACAGGACC
181  S K R H Q K F T H F L F R P V D P E R V F E L V K D L
TACTGATGACACITGA...
208  L M Y T

```

WO 02/102990

PCT/US02/19400

The gene discovered by the procedure in the preceding paragraph includes 3 exons and 2 introns (Table 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).

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 & Bairoch (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 BglIII 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)

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 (Clontech Laboratories) in 50 microliter volume. The following PCR reaction conditions were used:

- a) 96°C 3 minutes
- b) 96°C 30 seconds denaturation
- 10 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
- e) 96°C 30 seconds denaturation
- 15 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

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 Table 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 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 TATCC CTAAC (SEQ ID NO:14)) and pSec-V5-His Reverse (CTCGT CGGGC CCCTG 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).

35 The correct structure of the resulting vector, pSecV5His, including an in-frame Ig-kappa leader

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 (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. 2 shows that FGF-CX is expressed as a polypeptide having an apparent molecular weight (M_r) 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

proteins were analyzed by Western blotting using anti-HisGly antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA). FIG. 3 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. (1990) *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. 1A, lane 1). Conditioned media from cells transfected with control vector did not react with the antibody (FIG. 1A, lane 5). After suramin treatment, it was found that a significant quantity of FGF-CX could in fact be released from the cell

WO 02/102990

PCT/US02/19400

surface/ECM, indicating that HSPGs are likely to play a role in sequestering this protein (FIG. 1A, 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 obtained, and suramin was again found to release a significant quantity of sequestered FGF-CX protein (FIG. 1A; lanes 3 and 4). As expected, pCEP4/Sec-FGF-CX generated more soluble
15 FGF-CX protein than did pFGF-CX.

Results similar to those described above for 293 cells were also obtained with NIH 3T3 cells (FIG. 1B).

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. 4, Panels A and B are those identified in Table 14) by real time quantitative PCR (TAQMAN[®] analysis) performed on a Perkin-Elmer Biosystems ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detection System. In Table 14, the following
25 abbreviations are used:

ca. = carcinoma,
* = established from metastasis,
met = metastasis,
s cell var = small cell variant,
30 non-s = non-sm = non-small,
squam = squamous,
pl. eff = pl effusion = pleural effusion,
glio = glioma,
astro = astrocytoma, and

WO 02/102990

PCT/US02/19400

neuro = neuroblastoma.

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 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 (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 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 assay according to Perkin Elmer Biosystem's *Primer Express* Software package (version I 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' 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 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.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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, 5 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.

10 **Table 14. 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. RFX 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-62
19	CNS ca. (glio/astro) U87-MG	67	Lung ca. (non-s. cl) NCI-H522
20	CNS ca. (glio/astro) U-118-MG	68	Lung ca. (squam.) SW 900
21	CNS ca. (astro) SW1783	69	Lung ca. (squam.) NCI-H596
22	CNS ca.* (neuro; met) SK-N-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
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
38	Colon ca.* (SW480 met)SW620	86	Prostate

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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
44	Gastric ca.* (liver met)	NCI-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 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 CuraGen Acc. No. CG53135-02.

5 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 Table 1 (SEQ ID NO:1). It should not detect other known FGF family members. The primers and probe utilized were:

10 Ag81b (F): 5'-GGACCACAGCCTCTTCGGTA-3' (SEQ ID NO:18);
 Ag81b (R): 5'-TGTCCACACCTCTAATACTGACCAG-3' (SEQ ID NO:19); and
 Ag81b (P): 5'-FAM-CCCACCTGCCACACTGATGAATTCAR-TAMRA-3' (SEQ ID NO:20).

15 The results from a representative experiment are shown in FIG. 4, 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. 4, Panels A and B). Other tissues of the central nervous system expressed
 20 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 (SW-480) a colon cancer cell line and metastasis (SW480) and a gastric carcinoma cell line (NCI-N87; see FIG. 4, Panels A and B).

25 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 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:

WO 02/102990

PCT/US02/19400

Ag81 (F) : 5' -AGGCAGAAGCGGGAGATAGAT- 3' (SEQ ID NO:21);
 Ag81 (R): 5'-AGCAGC'TTTACCTCATTCAATG-3' (SEQ ID NO:22); and
 Ag81 (P): TET-5'-CCATCTACATCCACCACAGTTGCAGAA-3'-TAMRA (SEQ ID NO:23).

Set Ag81 covers the region from base 477 to base 554 of Table 1 (SEQ ID NO:1). The replicates are shown as bars of grey and black shading in FIG. 4, Panels C and D. The results show 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. 4, Panels C and D 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.

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 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 applied include adenocarcinomas of the colon, prostate, lung, kidney, uterus, breast, bladder, ovary.

Example 9. Stimulation of Bromodeoxyuridine Incorporation by Recombinant FGF-CX.

293-EBNA 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

modified Eagle medium (DMEM; Life Technologies) 18 hr post-transfection. After 48 hr, the 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 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-containing conditioned media was then harvested.

To generate control protein, 293-EBNA 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, 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 (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. 5 Panel A). In contrast, protein purified from cells transfected with control vector did not induce DNA synthesis. It was also found that FGF-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. 5, Panel B), CCD-1106 keratinocytes (FIG. 5, Panel C), MG-63 osteosarcoma cells (data not shown), and breast epithelial cells.

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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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. 6).

5 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. 6), 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. 7). Furthermore, individual cells were
10 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.

Example 11. Tumor Formation by Ectopic FGF-CX-Transfected NIH 3T3 Cells in Nude Mice.

15 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
20 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.

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
25 either DMEM/5% CS (for pFGF-CX-transfected cells) or DMEM/10% CS supplemented with 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).

30 NIH 3T3 cells were transfected with FGF-CX expression plasmids (pFGF-CX and pIlgc-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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

exposure of NIH 3T3 cells to recombinant FGF-CX (FIG. 6). In contrast, cells transfected with control vector 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.
- 5 By 11 days, all of the animals injected with either pFGF-CX or pI κ C-FGF-CX-transfected cells possessed rapidly growing tumors increasing in size by 14 days, whereas none of the animals injected with control cells developed tumors by 2 weeks (FIG. 8). Photographs of one mouse receiving control treatment and another mouse that received cells transfected with an FGF-CX-bearing vector are shown in FIG. 9. These results show that cells transformed by transfection
- 10 with vectors harboring the FGF-CX gene promote the development and growth of tumors *in vivo*.

Example 12. Expression of FGF-CX.

- FGF-CX was expressed essentially as described in Example 6. The protein was
- 15 purified using Ni²⁺-affinity chromatography, subjected to SDS-PAGE under both reducing and nonreducing conditions, and stained using Coomassie Blue. The results are shown in FIG. 10. It is seen that under both sets of conditions, the protein migrates with an apparent molecular weight of approximately 29-30 kDa.

Example 13. Stimulation of Bromodeoxyuridine Incorporation by Recombinant FGF-CX.

- A dose response experiment for incorporation of BrdU was carried out using human renal carcinoma cells (786-0; American Type Culture Collection, Manassas, VA). The results are shown in FIG. 11, in which FGF-CX is designated "20858". It is seen that FGF-CX stimulates proliferation of renal carcinoma cells by more than 4-fold over controls, with a half-effective dose being about 2.5 ng/mL.
- 25

Example 14. Formation of *in vitro* Foci in Cells Transfected with FGF-CX.

- To assess the effect of ectopic FGF-CX expression on cell growth in culture, NIH 3T3 cells were transfected with FGF-CX expression plasmids (identified as pFGF-20 and pI κ C-FGF-20 in FIG. 12, see Example 7) or control vector. NIH 3T3 cells were transfected using
- 30 Lipofectamine-Plus according to the manufacturer's protocol (Life Technologies). Cells were supplemented with 10% calf serum (CS; Life Technologies) 5 h post-transfection. Two days after transfection, cells were transferred to 90-mm dishes and cultured for two weeks in DMEM + 5% calf serum. The cells were then stained with a 0.2% crystal violet/70% ethanol

WO 02/102990

PCT/US02/19400

solution and photographed. Each 90mm dish represents half of the cells from a 35mm dish that had been transfected with 1.5 ug of plasmid DNA.

It was found that cells transfected with either of the two FGF-CX expression vectors generated foci of morphologically transformed cells approximately 2 weeks after transfection, while cells transfected with control vector retained their normal morphology (FIG. 12). The pIgk-FGF-20 construct proved to be significantly more efficient at formation of foci, which are small in the image shown due to overcrowding, than the pFGF-20 construct (see FIG. 12).

Example 15. Receptor binding specificity of FGF-CX.

Fibroblast growth factors (FGFs) play important roles in diverse functions including morphogenesis, cellular differentiation, angiogenesis, tissue remodeling, inflammation, and oncogenesis. FGFs contain a conserved 120-amino acid FGF core domain with a common tertiary structure. FGF signaling is generally assumed to occur by activation of transmembrane tyrosine kinase receptors. Four FGF receptors, FGFR1 through FGFR4, have been identified, and activating or inactivating receptor mutations have been described for a subset of these genes in both mice and humans.

To determine the receptor binding specificity of FGF-CX, we examined the effect of soluble FGF receptors (FGFRs) on the induction of DNA synthesis in NIH 3T3 cells by recombinant FGF-CX. Four receptors have been identified to date (Klint P and Claesson-Welsh L. *Front. Biosci.*, 4: 165-177, 1999; Xu X, *et al.* *Cell Tissue Res.*, 296: 33-43, 1999). Soluble receptors for FGFR1 β (IIIc), FGFR2 α (IIIb), FGFR2 β (IIIb), FGFR2 α (IIIc), FGFR3 α (IIIc) and FGFR4 were utilized. It was found that soluble forms of each of these FGFRs were able to specifically inhibit the biological activity of FGF-CX (see FIG. 13). Complete or nearly complete inhibition was obtained with soluble FGFR2 α (IIIb), FGFR2 β (IIIb), FGFR2 α (IIIc), and FGFR3 α (IIIc), whereas partial inhibition was achieved with soluble FGFR1 β (IIIc) and FGFR4. None of the soluble receptor reagents interfered with the induction of DNA synthesis by PDGF-BB, thereby demonstrating their specificity. The integrity of each soluble receptor reagent was demonstrated by showing its ability to inhibit the induction of DNA synthesis by aFGF (acidic FGF), a factor known to interact with all of the FGFRs under analysis.

Example 16. Cloning and Expression of an N-terminal Deletion Form of FGF-CX.

E. coli strain BL21 (DE3) (Invitrogen) harboring the plasmid pET24a- FGF20X-del54-codon were grown in LB medium at 37°C. This plasmid encodes the C-terminal portion of

WO 02/102990

PCT/US02/19400

FGF-CX beginning at position 55. When cell densities reached an OD of 0.6, IPTG was added to final concentration of 1mM. Induced cultures were then incubated for an additional 4 hours at 37°C. Cells were harvested by centrifugation at 3000Xg for 15 minutes at 4°C, suspended in PBS and then disrupted with two passes through a microfluidizer. To separate soluble and insoluble proteins, the lysate was subjected to centrifugation at 10,000Xg for 20 minutes at 4°C. The insoluble fraction (pellet) was extracted with PBS containing 1M L-arginine. The remaining insoluble material was then removed by centrifugation and the soluble fraction of the arginine extract was filtered through 0.2 micron low-protein binding membrane and analyzed by SDS PAGE. The result is shown in FIG. 14, which indicates that the product is a polypeptide with an apparent molecular weight of approximately 20 kDa (see arrow). N-terminal sequencing of the expressed polypeptide provides the sequence AQLAHLHGILRRRQL which is 100% identical to residues 55-69 of FGF-CX (Table 1, SEQ ID NO:2).

15 Example 17. Stimulation of Bromodeoxyuridine Incorporation into NIH 3T3 Cells in Response to a Truncated Form of FGF-CX.

A vector expressing residues 24-211 of FGF-CX ((d1-23)FGF-CX; See Table 1 and SEQ ID NO:2) was prepared. The incorporation of BrdU by NIH 3T3 cells treated with conditioned medium obtained using the vector incorporating this truncated form was compared to the incorporation in response to treatment with conditioned medium using a vector encoding full length FGF-CX. This experiment was carried out as described in Example 9.

The results are shown in FIG. 15. It is seen that (d1-23)FGF-CX retains high activity at the lowest concentration tested, 10 ng/mL. At this concentration, the activity of full length FGF-CX has fallen considerably, approaching the level of the control. It is estimated that (d1-23)FGF-CX may be at least 5-fold more active than full length FGF-CX.

25 Example 18. Cloning and Expression of FGF-CX Variant CG53135-02.

A nucleotide sequence encoding a variant of Fibroblast Growth Factor-20-like protein, referred to as Acc. No. CG53135-02, was identified. The sequence of Acc. No. 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 the public human sequence databases, and provided either

WO 02/102990

PCT/US02/19400

the full length DNA sequence, or some portion thereof. The laboratory cloning was performed using one or more of the methods summarized below:

SeqCalling™ Technology: cDNA was derived from various human samples representing multiple tissue types, normal and diseased states, physiological states, 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 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 bioinformatic 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 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.

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:26) and 5'-CTGTCTGTCCTCAGAAGAAGTCTTGATC-3' (SEQ ID NO:27). 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 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, thyroid, trachea and uterus.

Multiple clones were sequenced and these fragments were assembled together, sometimes including public human sequences, using bioinformatic 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 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.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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 137627::160083874.1043010.A9.

5 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 CuraGen Acc. No. CG53135-02.

The novel nucleic acid (SEQ ID NO:28) of 540 nucleotides (designated CuraGen Acc. No. CG53135-02) encoding a novel Fibroblast Growth Factor-20-like protein (SEQ ID NO:29) is shown in Table 15. An open reading frame was identified beginning at nucleotides 1-3 and ending at nucleotides 538-540. This polypeptide represents a novel functional Fibroblast
10 Growth Factor-20-like protein. The start and stop codons of the open reading frame are highlighted in bold type. Putative untranslated regions (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 16.

Table 15. Nucleotide sequence (SEQ ID NO:28) encoding the Fibroblast Growth Factor-20-like protein of the invention.

```

>CG53135-02
ATGGCTCCCTTGGCCGAGTGGGGGCTTCTGGGGGCTGGAGGGCTTGGGCGAGCCG 60
GGGGCAGCGGAGCTGGCGCACCCTGCGACGSCATCTGGCCGCGCGGCGCTCTATTTGCCGC 120
ACCGGCTTCGACCTGCAGATCCTGCGCGAGCGGCGAGCCACCGGGCAGGACCCAC 180
AGCCTCTTCGGTATCTTGGAAATCAATCAATGAGTGGCAGTGGGACTGGTCAGTATAGAGGT 240
GTGGACAGTGGTCTCTATCTTGGAAATGAATGACAAAGGAGAACTCTATGGATCAGAGAAA 300
CTTACTCCGAATGCATCTTTAGGAGCAGTTTGAAGAGAACTGGTATAACACCTAATCA 360
TCTAAGCATATAAACAATGGAGACACTGGCCGAGGTAATTTGGGCACTTAAGAAAGAC 420
GGAACTCCAGAGATGGCCCGAGTCCAGAGGCRITGGAAATTTACACATTTCTTACT 480
AGACCAAGTGGATCCGAAAGAGTTCCAGAAATTGTACAGGACCTTCTGATGTACACTTAG 540

```

Table 16. Protein sequence (SEQ ID NO:29) encoded by the nucleotide sequence shown in Table 15 above.

```

>CG53135-02
MAPLAEVGGFLGGLRGLGPGAAQLAHLHGILRRRQLYCRTPHQLIIPDGSAGQTRQDH
SLFGILEFISVAVGLVSIKRVDSGLYLGMDKGLYGSKLTSECFREQFENWYNTYS
SNIYKHGDTGRRYFVALNKDGTFRDGAARKRHKRPTFLPRVDFRVPFLYKDLIMYT

```

15 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) (Table 10). 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
20 residues (98%) similar to, the 211 amino acid residue pmr:SWISSNEW-ACC:Q9NP95 protein from Homo sapiens (Human) (FIBROBLAST GROWTH FACTOR-20 (FGF-20))(Table 10).

WO 02/102990

PCT/US02/19400

A multiple sequence alignment is given in Table 17, 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. Note this sequence represents a splice form of Fibroblast Growth Factor-20 as indicated in positions 20-51.

Table 17. ClustalW alignment of CG53135-02 protein with related proteins.

Accno	Common Name	Length
CG53135-02	novel Fibroblast Growth Factor-20-like protein (SEQ ID NO:29)	179
CG53135-01	FGF-20X (SEQ ID NO:2)	211
Q9NP95	FGFK_Human, Fibroblast Growth Factor-20 (SEQ ID NO:32)	211

CG53135-02	MAPLAEVGGFLGGLGGLGGL-----FGAAQLAHL
CG53135-01	MAPLAEVGGFLGGLGGLGQGVGSHFLLPAGERPPLLGERRSAAERSARGGPGAAQLAHL
FGFK_HUMAN	MAPLAEVGGFLGGLGGLGQGVGSHFLLPAGERPPLLGERRSAAERSARGGPGAAQLAHL
CG53135-02	HGILRRRQLYCRTPHQLIIPDGSVQGTTRQDHSIFGILFEFISVAVGLYSIRCVDSGLYLQ
CG53135-01	HGILRRRQLYCRTPHQLIIPDGSVQGTTRQDHSIFGILFEFISVAVGLYSIRCVDSGLYLQ
FGFK_HUMAN	HGILRRRQLYCRTPHQLIIPDGSVQGTTRQDHSIFGILFEFISVAVGLYSIRCVDSGLYLQ
CG53135-02	MNDKGGELYGSEKLTSECFRQQFEEHWYNTYSNLYKHGDTGRRYFVALNKDGTFRDGAR
CG53135-01	MNDKGGELYGSEKLTSECFRQQFEEHWYNTYSNLYKHGDTGRRYFVALNKDGTFRDGAR
FGFK_HUMAN	MNDKGGELYGSEKLTSECFRQQFEEHWYNTYSNLYKHGDTGRRYFVALNKDGTFRDGAR
CG53135-02	SKRHQKPTHTFLPRPVDPERVPELYKDLLMYT
CG53135-01	SKRHQKPTHTFLPRPVDPERVPELYKDLLMYT
FGFK_HUMAN	SKRHQKPTHTFLPRPVDPERVPELYKDLLMYT

5

In the alignment shown in Table 17, 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.

10

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 match was found to the IPR002209; (HBGF_FGF) domain, as summarized in Table 18.

15

Table 18. Domain analysis for CG53135-02

Model	Domain	seq-f	seq-t	hmm-f	hmm-t	score	E-value
FGF	1/1	31	162	1	146	[]	280.8 2e-81

WO 02/102990

PCT/US02/19400

IPR002209; (HBGF_FGF) Heparin-binding growth factors I and II (HBGF) (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. See, *e.g.*, Burgess & Maciag, 1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58: 575-606; Thomas 1988 *Trends Biochem. Sci.* 13: 327-328. 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) and histactophilin. All have very similar structures, but although the HBGF and interleukin-1 families share some sequence similarity (about 25%), they show none at all to the STIs. See, *e.g.*, Burgess & Maciag, 1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58: 575-606; Thomas 1988 *Trends Biochem. Sci.* 13: 327-328; Heath *et al.* 1995 *Curr. Biol.* 5: 500-507; Matthews *et al.* 1991 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 3441-3445; Murzin 1992 *J. Mol. Biol.* 223: 531-543; Gimenez-Gallego *et al.* 1985 *Science* 230: 1385-1388; Copeland *et al.* 1996 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 9850-9857; and Ayres *et al.* 1994 *Virology* 202: 586-605.

HBGFs are involved in many different processes related to cell differentiation and growth control. See, *e.g.*, Burgess & Maciag, 1989) *Annu. Rev. Biochem.* 58: 575-606. 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 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. See, *e.g.*, Heath *et al.* 1995 *Curr. Biol.* 5: 500-507.

The crystal structures of HBGF1 and HBGF2 have been solved. See, *e.g.*, Matthews *et al.* 1991 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 3441-3445. HBGF1 and HBGF2 have the same twelve-stranded beta-sheet structure as both interleukin-1 and the Kunitz-type soybean trypsin inhibitors. See, *e.g.*, Murzin 1992 *J. Mol. Biol.* 223: 531-543. HBGF1 and interleukin-1 had been found to be similar, and they were predicted to have similar structures. See, *e.g.*, Gimenez-Gallego *et al.* 1985 *Science* 230: 1385-1388. The beta-sheets are arranged in three similar lobes around a central axis, six strands forming an anti-parallel beta-barrel. Several regions of HBGF1 have been implicated in receptor binding, notably beta-strands one through

WO 02/102990

PCT/US02/19400

three, and the loop between strands eight and nine. The loop between strands ten and eleven is thought to be involved in binding heparin.

This indicates that the sequence of the invention has properties similar to those of other proteins known to contain the HBGF1-like and HBGF2-like domain(s) and similar to the properties of these domains.

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

Example 19. Cloning and Expression of FGF-CX Variant CG53135-06.

A nucleotide sequence (SEQ ID NO:30) encoding a variant of Fibroblast Growth Factor-20-like protein (SEQ ID NO:31), referred to as Acc. No. CG53135-06, was identified, as shown in Tables 19 and 20. SeqCalling assembly sequences were initially identified by searching CuraGen Corporation's proprietary Human SeqCalling® database for DNA sequences that translate into proteins with similarity to SNP variant of FGF20 and/or members of the FGF20 family. One or more SeqCalling assemblies 174203299 were identified as having suitable similarity. See Table 11, above. The selected assembly was analyzed further to identify any open reading frames encoding novel full length proteins as well as novel splice forms. The resulting DNA sequence and protein sequence for a novel SNP variant of FGF20-like gene are reported here as CuraGen Acc. No. CG53135-06.

Table 19. Nucleotide sequence (SEQ ID NO:30) encoding the SNP variant of FGF20-like

WO 02/102900

PCT/US02/19400

protein (Acc. No. CG53135-06) of the invention.

>CG53135-06
ATGGCTCCCTTAGCCGAGTCCGGGGCTTTCTGGGGGGCCTGGAGGGCTTGGGCCAGCCG 60
GGGGCAGCGCAGCTGGCGCACTGCAAGGCATCTTGGCCGCCCGGCACTCTATTSCCGC 120
ACCGGCTTCCACCTGCAAGATCCTGCCGACGGCAGCGTGCAGGGCACC09GCAGGACCAC 180
AGCCTCTCGGATCTTGGAAATTCATGATGTGGCAGTGGACTGGTCAATATAGAGGT 240
GTGGACCTGTCCTTCTTATCTTGGATTAATGACBRAGGGACCTTATPGRTCAGGAAA 300
CTTACTCCGATATGCACTCTTAGGGAGCAGTTGAAGAGAACTGTTATACACCTATTCA 360
TCTAACATATAAACAATGGAGACACTGCGCGCGGTATTTTGTGCACTTAAACAAAGAC 420
GGAACATCCAAAGAGATGGCGCAGGTCCAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCT 480
AATCCAGTGGATCCAGAAAGGTTCCAGAAATGTACAGGACCTACTGATGACACTTAG 540

Table 20. Protein sequence (SEQ ID NO:31) encoded by the nucleotide sequence shown in Table 19.

>CG53135-06
MAPLAEVGGFLGGLEGLQPGAAQLAHLHGILRRRLYCRTPHLLQLEFDGVSQGTRODH
SLPGLLEPTISVAVGLYSIRGVDSGLYLGMNDKGLYSEKLTSECFRQFERNWNTYS
SNLYKHGDTGRRYFVALNKDCTPRDGRSKRQRKPTHTFLRPVDPBRVPELYKDLIMYT

A multiple sequence alignment is given in Table 21, 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. Note this sequence represents a SNP of FGF20 as indicated in position 53 of CG53135-06. Additional SNPs are described in Example 21, below.

5

Table 21. ClustalW alignment of CG53135-06 protein with related proteins.

Table with 4 columns: Accno, Common Name, Length, and sequence alignment. Rows include Q9NP95, CG53135-04, CG53135-06, FGFK_HUMAN, and CG53135-04.

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 22. The IntroPro IPR002209 FGF domain is described above.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

Table 22. Domain analysis for CG53135-06

Model	Description	Score	E-value	N
FGF (InterPro)	Fibroblast growth factor	286.8	3.4e-83	1

Parsed for domains:

Model	Domain	seq-f	seq-t	hmm-f	hmm-t	score	E-value
FGF	1/1	31	162	1	146	286.8	3.4e-83

Example 20. Cloning and Characterization of FGF-CX Variants including Optimized FGF-CX.

Additional FGF-CX variants were cloned as described above. Nucleotide and polypeptide are shown in Tables 23-29. Codon optimized FGF-CX is shown in Table 25.

Table 23. Nucleotide and Polypeptide Sequence for CG53135-03, Consensus DNA Sequence:

```
>CG53135-03 636 nt
ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGGCTTTCTGGCCGGCCTGGAGGGCTTGGGCGACG
GTGGTTCCGATTTCCCTGTTCCTCTCTGCGGGGAGCGCCCGCTGCTGGCGAGGCG
AGGAGCGCGCGAGCGGAGCGCGCGGGCGGGCTGGCGAGCTGGCGACCTG
CACGGCATCTGCGCGCGCGGAGCTTATGCGCGACCGGCTTCCACTGCAGATCCTG
CCCGACGGCAGCTGCGAGGGCACCGCGAGGACCAAGCGCTCTCGGTACTTGGAAATC
ATCAGTGGCGAGTGGGACTGGTCAGTATTAGAGGTGGGACAGTGGTCTCTATCTTGA
ATGATGACAAAGGAGAACTCTATGATCAGAGAACTTACTTCCGAATGCATCTTTAGG
GAGCAGTTTAAAGACTGTATAAACACTTCTACTAACTATATAACTTGGAGAC
ACTGGCCGAGGTATTTTGGCACTTAACLAGACGGAACTCCAGGATGGSCCGAG
TCCAGAGGCATCGAAATTTACACATTTCTTACCTAGACCGATGATCCGAAAGAGTT
CCAGAATTGACAGGACCTACTGATGTACACTGA (SEQ ID NO: 33)
```

```
Protein Sequence: ORF Start: 1 ORF Stop: 634 Frame: 1
>CG53135-03-prot 211 aa
MAPLAEVGGFLGELGEGVGSFLLPAGERPELLGERRSAEBSARGGGAQLAHL
HGLLRRLQYCRFGHLQLLPESSVQTRQDHSLEFLSFAVGLVSIKGVDSGLLQ
MNDKGLYSEKLTSECTPRQFENWNTYSNLYKHGDTGRRYFVALNKDGTFRDGAR
SKRHQKPTFLPRFPVDPERVPELYKDLLMYT (SEQ ID NO: 34)
```

5

Table 24. Nucleotide and Polypeptide Sequence for CG53135-04:Consensus DNA Sequence:

```
>CG53135-04 540 nt
ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGGCTTTCTGGCCGGCCTGGAGGGCTTGGGCGACG
GKKGKAGSAGCTGGCGACCTGCGCGGCTCTTGGCGCGGCGACCTCAITGGCCG
ACCGGCTTCCACTCGAGATCCTGCGCGACGCGAGCGCGCGGCGACCGCGAGGACCG
AGCCTCTTCCGATCTTGGAAATTCATCAGTGTGGGAGTGGACTGGTCAATATTAGAGGT
GTGGCAGTGGTCTATCTTGGAAATGAATGACAAAGGAGAACTCTATGATTCAGAGAA
CTTACTTCCGATGCACTTTAGGGAGCAGTTTGAAGAGAACTGGTATAACACTTATCA
CTTAACTATAAATGAGACACAGCGCGAGGATTTTGGGCACTTAACTAAGAC
GGAACTCCAGAGATGGCGCAGGTTCCAGAGGCGATCGAATTTACACATTTCTTACCT
AGACCAGTGGATCCAGAAAGAGTTCCAGAAATGTACAGGACCTACTGATGTACACTTAG (SEQ ID NO: 35)
```

```
>CG53135-04-prot 179 aa
MAPLAEVGGFLGELGEGVGSFLLPAGERPELLGERRSAEBSARGGGAQLAHL
HGLLRRLQYCRFGHLQLLPESSVQTRQDHSLEFLSFAVGLVSIKGVDSGLLQ
MNDKGLYSEKLTSECTPRQFENWNTYSNLYKHGDTGRRYFVALNKDGTFRDGAR
SKRHQKPTFLPRFPVDPERVPELYKDLLMYT (SEQ ID NO: 36)
```

Table 25. Nucleotide and Polypeptide Sequence for Clone Assembly, FGF-20X, Codon

WO 02/102990

PCT/US02/19400

Optimized, CG53135-05

>CG53135-05 636 nt
 ATGGCTCCGCTGAGCTGAAGTTGGTGGTTTCCTGGGCGGCTCGAGGGGCTCGGGTCAACAG
 GTGGGTTCTCACTTCCTGCTGCGCGCGCTGAGTGAAGCTCGCCACTGCTGGGTGAACGT
 CACTTCCGACTTGAACGCTCCGCTGTTGGTGGCCCGGCTGCTGCTCACTGCTCACTG
 CATGGTATCCCTGCTGCGCTGAGCTGTACTGCGGCTCTGGTTCCGCTCGCGAGTCCCTG
 CCGGATGGTTCTGTTCAAGGTACCCGTCAGGACCACTCTCTGTTCCGCTATCCCTGAAATTC
 ATCTCTGTTGCTGTTGGTGGTTCCTATCCGCTGCTGTTGACTCTGGCCGTAACCTGGGT
 ATGAAAGACAAAGGCGAAGTGTACGCTTCTGAAAACTGACTCTGAATGCATCTTCGCT
 GAACAGTTTGAAGAGACTGGTACAAACCTACTCTCCAAACATCTACAAACATGTTGAC
 ACCGGCCCTGCTACTTGGTTGCTCTGAACAAGACGCTACCCCGCTGATGGTGTCTGCT
 TCTAAAACCTCACAGAAATTCACCACTTCTCTCCCGCCCAAGTTGACCCGAGCGCTGTT
 CCGAAGCTGTATAAGACTGCTGATGTACACCTAA (SEQ ID NO: 37)
 Protein Sequence:
 >CG53135-05-prot 211 aa
 MAPLAEVGGFLGGLBGLQQVGSHELLPPAGERPFLGERRSAERSARGGPGAAQLMHL
 HGILRRRLYCRKTFHLQLLPDGSVQTRQDHSFLGILFISVAVLVSIRGVDGSLYLG
 MNDKGLYGSKELTSECTFRQFEENWYNTYSNLYKHGDTGRRYFVALNKDGTFRDGR
 SRRHKFTHELFPRVDFPRVPELYKDLLMYT (SEQ ID NO: 38)

Table 26. Nucleotide and Polypeptide Sequence for CG53135-07:

CG53135-07 54 nt
 ATGGCTCCCTTAGCCGAGTGGGGGCTTCTGGCGGCTCGAGGGCTTGGCC (SEQ ID NO:39)
 Protein Sequence of CG53135-07:
 CG53135-07-prot 18 aa
 MAPLAEVGGFLGGLRGLG (SEQ ID NO: 40)

Table 27. Nucleotide and Polypeptide Sequence for CG53135pep2, CG53135-08:

CG53135-08 63 nt
 GAGCGCGCGCGCTGCTGGGAGCGCAGGAGCGCGCGGAGCGGAGCGCGCGCGCGG
 CCG (SEQ ID NO: 41)
 CG53135-08-prot 21 aa
 ERPFLGERRSAERSARGG (SEQ ID NO: 42)

Table 28. Nucleotide and Polypeptide Sequence for CG53135pep3, CG53135-09:

CG53135-09 63 nt
 CGCAGGTATTGTGGCACTTAACAAGACGGACTCCAAGAGATGGGCCAGGTCCAAG
 AGG (SEQ ID NO: 43)
 CG53135-09-prot 21 aa
 RRYFVALNKDGTFRDGRSKR (SEQ ID NO: 44)

Table 29. Nucleotide and Polypeptide Sequences for FGF-20, CG53135pep4, CG53135-10:

CG53135-10 60 nt
 CCTAGACCGATGGATCCAGAAAGATTCCGAAATTGTACAAGGACCTACTGATGTACT (SEQ ID NO: 45)
 CG53135-10-prot 20 aa
 PRPVDPRVPELYKDLLMYT (SEQ ID NO: 46)

5

A ClustalW alignment of FGF-CX variants CG53135-01 through CG53135-08 (labeled as v-01 through v-04, respectively) is shown in Table 30.

WO 02/102900

PCT/US02/19400

II.

gb:GENBANK-ID:AB044277|acc:AB044277.1 Homo sapiens mRNA f... 1830 8.1e-77
 gb:GENBANK-ID:AB030648|acc:AB030648.1 Homo sapiens mRNA f... 1830 1.3e-76
 gb:GENBANK-ID:AB020021|acc:AB020021.1 Rattus norvegicus m... 1812 8.4e-76
 gb:GENBANK-ID:AB049218|acc:AB049218.1 Mus musculus Fgf20 ... 1794 5.4e-75
 gb:GENBANK-ID:AB020858|acc:AB020858.1 Homo sapiens genomi... 854 5.0e-67

III.

patn:AA75630 Nucleotide sequence of human fibroblast gro... 1830 1.1e-76
 patn:AA90277 Human cDNA encoding fibroblast growth facto... 1830 1.1e-76
 patn:AAF62049 Human fibroblast growth factor-CX (FGF-CX) ... 1828 1.4e-76
 patn:AA503276 Rat cDNA encoding fibroblast growth factor ... 1812 7.1e-76
 patn:AA758530 Nucleotide sequence of mouse FGF9 derived f... 1133 3.2e-45

IV.

ptnr:SWISSPROT-ACC:Q9NP95 Fibroblast growth factor-20 ... +1 1118 3.2e-112
 ptnr:SFTRMBL-ACC:Q9BST9 FGF-20 - Rattus norvegicus (R... +1 1074 1.5e-107
 ptnr:SFTRMBL-ACC:Q9BSL9 FIBROBLAST GROWTH FACTOR 20 ... +1 1069 5.2e-107
 ptnr:SFTRMBL-ACC:Q9PVY1 XFGF-20 - Xenopus laevis (Afr... +1 906 9.7e-90
 ptnr:SWISSPROT-ACC:P31371 Glia-activating factor precu... +1 775 7.4e-76

Example 21. Cloning and Expression of FGF-CX SNP Variants.

- SeqCalling™ Technology: cDNA was derived from various human samples
- 5 representing multiple tissue types, normal and diseased states, physiological states, and developmental states from different donors. Samples were obtained as whole tissue, cell lines, primary cells or tissue cultured primary cells and cell lines. Cells and cell lines may have been treated with biological or chemical agents that regulate gene expression for example, growth factors, chemokines, steroids. The cDNA thus derived was then sequenced using CuraGen's
- 10 proprietary SeqCalling technology. Sequence traces were evaluated manually and edited for corrections if appropriate. cDNA sequences from all samples were assembled with themselves and with public ESTs using bioinformatics programs to generate CuraGen's human SeqCalling database of SeqCalling assemblies. Each assembly contains one or more overlapping cDNA sequences derived from one or more human samples. Fragments and ESTs were included as
- 15 components for an assembly when the extent of identity with another component of the assembly was at least 95% over 50 bp. Each assembly can represent a gene and/or its variants such as splice forms and/or single nucleotide polymorphisms (SNPs) and their combinations.

- Variant sequences identified in human genomic DNA are included in this application. A variant sequence can include a single nucleotide polymorphism (SNP). A SNP can, in some
- 20 instances, be referred to as a "cSNP" to denote that the nucleotide sequence containing the SNP originates as a cDNA. A SNP 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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, however, in the case that 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 for example, alteration in temporal expression, physiological response regulation, cell type expression regulation, intensity of expression, stability of transcribed message.

Method of novel SNP Identification: SNPs were identified by analyzing genomic sequence assemblies generated by a process called Deep SNP Mining (DSM) in CuraGen's proprietary SNPTool algorithm. The SNPTool identifies variation in assemblies with the following criteria: SNPs are not analyzed within 10 base pairs on both ends of an alignment; window size (number of bases in a view) is 10; the allowed number of mismatches in a window is 2; minimum SNP base quality (PHRED score) is 23; minimum number of changes to score an SNP is 2/assembly position. SNPTool analyzes the assembly and displays SNP positions, associated individual variant sequences in the assembly, the depth of the assembly at that given position, the putative assembly allele frequency, SNP sequence variation, and the genomic DNA pool source. Sequence traces are then selected and brought into view for manual validation. Built-in FrameSearch software allows for the concurrent identification of amino acid changing SNPs. SNPs that border the intron/exon boundary were double checked by importing the SNP consensus into CuraTools and performing a 1x1 TBLASTN against the CGUID protein sequence of interest. Comprehensive SNP data analysis is then exported into the SNPCalling database.

Method of novel SNP Confirmation: SNPs are confirmed employing a validated method known as Pyrosequencing. Detailed protocols for Pyrosequencing can be found in: Alderborn et al. (2000). Genome Research. 10, Issue 8, August. 1249-1265. SNP results are shown in Table 32.

Table 32. Variants of nucleotide sequence described in Figure 1.

Variant	Nucleotides			Amino Acids		
	Position	Initial	Modified	Position	Initial	Modified
13377871	301	A	G	101	Ile	Val
13374151	308	T	G	103	Val	Gly

WO 02/102990

PCT/US02/19400

13375519	361	A	G	121	Met	Val
13375518	517	G	A	173	Gly	Arg
13375516	523	C	G	175	Pro	Ala
13375517	616	G	A	206	Asp	Asn

Example 22. Molecular Cloning of FGF-CX Variant CG53135-04.

A. Molecular Cloning of CG53135-04 residue 1 to 179

The cDNA coding for the full-length form of CG53135-04 from residue 1 to 179 was targeted for "in-frame" cloning by PCR. The PCR template is based on the previously identified plasmid.

The following oligonucleotide primers were used to clone the target cDNA sequence:

F1 5' - CACCAGATCT ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGGC-3' (SEQ ID NO:55)
 R1 5' - GCCGTCGAC AGTGATACATCAGTAGGTCTTGTCATATTC-3' (SEQ ID NO:56)

For downstream cloning purposes, the forward primer includes an in-frame *Bgl* II restriction site and the reverse primer contains an in-frame *Sal* I restriction site.

Two PCR reactions were set up using a total of 1-5 ng of the plasmid that contains the insert for CG53135-04.

The reaction mixtures contained 2 microliters of each of the primers (original concentration: 5 pmol/ul), 1 microliter of 10mM dNTP (Clontech Laboratories, Palo Alto CA) and 1 microliter of 50xAdvantage-HF 2 polymerase (Clontech Laboratories) in 50 microliter-reaction volume. The following reaction conditions were used:

PCR condition 1:

- a) 96°C 3 minutes
- b) 96°C 30 seconds denaturation
- c) 60°C 30 seconds, primer annealing
- d) 72°C 6 minutes extension

Repeat steps b-d 15 times

- e) 96°C 15 seconds denaturation
- f) 60°C 30 seconds, primer annealing
- g) 72°C 6 minutes extension

Repeat steps e-g 29 times

- e) 72°C 10 minutes final extension

PCR condition 2:

- a) 96°C 3 minutes
- b) 96°C 15 seconds denaturation

WO 02/102990

PCT/US02/19400

- c) 76°C 30 seconds, reducing the temperature by 1°C per cycle
- d) 72°C 4 minutes extension
- Repeat steps b-d 34 times
- e) 72°C 10 minutes final extension.

5 An amplified product was detected by agarose gel electrophoresis. The fragment was gel-purified and ligated into the pCR2.1 TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's recommendation. Twelve clones per PCR reaction were picked and sequenced. The inserts were sequenced using vector-specific M13 Forward and M13 Reverse primers.

- 10
- SP1: GTATCTTGGAAATTCATCAGTGTGGC (SEQ ID NO: 57)
 - SP2: TGGTCTCTATCTTGGAAATGAATGAC (SEQ ID NO: 58)
 - SR1: GAAAGGGCTGTGGTCTCTGCC (SEQ ID NO: 59)
 - SR2: ACTGTCCACACCTCTAATACTGACC (SEQ ID NO: 60)

15 The insert assembly 250059596 was found to encode an open reading frame between residues 1 and 179 of the target sequence of CG53135-04. See Tables 33-36. The cloned inserts are 100% identical to the original sequence. The alignment with CG53135-04 is displayed in a ClustalW in Table 37. The first 3 and the last 3 amino acid residues of the assemblies are derived from the restriction enzyme sites added in the primers for the purpose of sub-cloning. Note that differing amino acids have a white or grey background, and deleted/inserted amino acids can be detected by a dashed line in the sequence that does not code at that position.

Table 33. Cloned Sequences

```
>CG53135-04 (SEQ ID NO: 61)
ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCCGGGGCTTCTGGGCGGCTGGAGGGCTTGGCCAGCCGGGGGCGAGGGC
AGCTGGGGCACCCTGCAAGGCAATCTGCGCCGCGGGCAGCTCTATTGCCGACCGGCTTCCACCTCAGAT
CCTGCCCGCAGCGGCGTGCAGGGGCAACCGGGCAGGACCAACAGCCTCTTCGGTATCTTGGAAATTCATCAGT
GTGCAATGGGACTGTCATATTAAGAGTGTGACAGTGTCTCTATCTTGGAAATGAATGACAAAGGG
AATCTATGGATCCAGAAACTTACTTCCGATGCACTTTAGGGAGCACTTTAGAGAACTGATPA
CACCTATCTCATCAACATPATAAACAATGGAGCACTGGCCGAGGTATTTGTGGCACTTAACAAGAC
GGACTCCAGAGATGGCCAGTCCAGAGGCATCGAAATTTACACATTTCTTACCTAGACCAGTGG
ATCCGAAAGAGTTCCAGAAATTTGACAGGACCTACTGATGTACACTAG
```

Table 34. Cloned Sequences

```
>250059596 (SEQ ID NO: 62)
CACCGAATCATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCCGGGGCTTCTGGGCGGCTGGAGGGCTTGGCCAGCCG
GGGCGAGCCGCGCTGGCCAGCTGACGGGCACTTCTGCGCCCGGAGCTCTATTGCCGACCGGCTTCCACCTCAGAT
ACCTGCGAATCTTGGCCGAGGCAAGCTGCGGGCAGCCCGGCAAGCAACAGCCTCTTCGGTATCTTGGAAATTCATCAGT
ATTCACTCAGTGTGGCAGTGGGACTGGTCAATTAAGAGTGTGACAGTGGTCTCTATCTTGGAAATGAAT
GACAAAGGAGAACTCTATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAAATGCACTTTAGGGAGCAGTTTGAAGAGA
ACTGGTATAACACCTATTCACTAACAATATAAACAATGGAGCACTGGCCGAGGTATTTGTGGCACT
TAAACAAGACGGAATCCAGAGATGGCCCGGTCGAAAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCT
AGACCAGTGGATCCAGAAAGGTTCCAGAAATTTGACAGGACCTACTGATGTACACTGACAGCC
```

WO 02/102990

PCT/US02/19400

Table 35. View DNA Sequence Analysis of CG53135-04

Translated Protein - Frame: 1 - Nucleotide 1 to 537

1 ATGGCTCCCTAGCCGAGTCGGGGCTTCTGGGCGCTGSGGGCTTGGGCCACCGGGSCAGCCAGCTGGCCCA
M A P L A E V G G F L G S L E G L G Q P G A A Q L A H
81 CCTGGACGGCATCTTGGCGCGCGGCGCTTATTGCGCACCGGCTTCCACCTGCAGATCCTCCCGACGGCAGGCGCC
L H G I L R R R Q L Y C R T G F H L Q I L P D G S V Q
161 AGGGCACCCCGCAGGACCCAGCCCTTTCGGTATCTTGGAAATCATCAGTGTGGCACTGGGACTGGTCAATTAGAGGT
G T R Q D H S L F G I L E F I S V A V G L V S I R G
241 GTGGACATGGTCTCTATCTTGGAAATGATGACAAAGAGAACTCTATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAATGCACTTT
V D S G L Y L G M N D K G S L Y G S E K L T S E C I F
321 TAGGGACGATTTGAGAGAACTGGTATACACCTATTCATCTAACATATATAAACATGGAGACACGCGCAGGATTT
R E Q F E E N W Y N T Y S S N I Y K H G D T G R R Y F
401 TTGGGCACTTAACAAGACGGAACTCCAGAGATGGCGCAGGTCCAGAGGCATCAGAAATTAACATTTCTTACCT
V A L N K D G T P R D G A R S K R H Q K F T H F L P
481 AGACCAATGGATCCAGAAAGATTCCGGAATTTACAGGACCTACTGATGACACTAG
R P V D P E R V P E L Y K D L L M Y T

Table 36. View DNA Sequence Analysis of 250059596

Translated Protein - Frame: 2 - Nucleotide 2 to 556

1 CACCAGATCATGGCTCCCTAGCCGAGTCGGGGCTTCTGGGCGCTGSGGGCTTGGGCCACCGGGSCAGCCAGCTGGCCCA
T R S M A P L A E V G G F L G G L E G L G Q P G A A Q
81 AGCGGACGGCATCTTGGCGCGCGGCGCTTATTGCGCACCGGCTTCCACCTGCAGATCCTCCCGAC
L A H L H G I L R R R Q L Y C R T G F H L Q I L P D
161 GGCGAGTCCAGGACCCCGCAGGACCCAGCCCTTTCGGTATCTTGGAAATCATCAGTGTGGCACTGGGACTGGTCAAG
G S V Q G T R Q D H S L F G I L E F I S V A V G L V S
241 TATGGACATGGTCTCTATCTTGGAAATGATGACAAAGAGAACTCTATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAATGCACTTT
I R G V D S G L Y L G M N D K G S L Y G S E K L T S E
321 AATGATCTTTAGGAGCAGTTTGAAGGAACTGGTATACACCTATTCATCTAACATATATAAACATGGAGACACGCGCAGGATTT
C I F R E Q F E E N W Y N T Y S S N I Y K H G D T G
401 CGGAGTATTTTGGCACITTAACAAGACGGAACTCCAGAGATGGCGCAGGTCCAGAGGCATCAGAAATTAACCA
R R Y P V A L N K D G T P R D G A R S K R H Q K F T H
481 TTTCTTACCTAGACGATGGATCCAGAAAGATTCCGGAATTTACAGGACCTACTGATGACACTAGTCCAGCGC
F L P R P V D P E R V P E L Y K D L L M Y T V D G

5

Table 37. ClustalW of cloned sequences.

250059596 1 TRSMAELAEVGGFLGLEGGQFGAAQLAHLHGI LRRRQLYRTYRHLQILEPDSVQGT R 60
CG53135-04 1 --MAFLAEVGGFLGLEGGQFGAAQLAHLHGI LRRRQLYRTYRHLQILEPDSVQGT R 57
250059596 61 QHS LFGI LEFISVAVGLVSI RQVDSGL YLGMNDKGLVGSERLTS ECI FRQGFENWYN 120
CG53135-04 28 QHS LFGI LEFISVAVGLVSI RQVDSGL YLGMNDKGLVGSERLTS ECI FRQGFENWYN 117
250059596 121 TVSSNIYKHGDTGRRYFVALNKDGTFRDARS KRHOKTTHPLFRPVDPERVPELYKDLIM 130
CG53135-04 118 TVSSNIYKHGDTGRRYFVALNKDGTFRDARS KRHOKTTHPLFRPVDPERVPELYKDLIM 177
250059596 181 TVVDG 185
CG53135-04 178 VT - - 179

B. MOLECULAR CLONING OF CG53135-04 (31-162 AA)

The cDNA coding for the domain of CG53135-04 from residue 31 to 162 was targeted for "in-frame" cloning by PCR. The PCR template is based on the previously identified plasmid.

The following oligonucleotide primers were used to clone the target cDNA sequence: P2 5'-CACCAGATCT ATCCCTGGCGCGCGGCGCTCTATTGCC-3' (SEQ ID NO:63)

WO 02/102990

PCT/US02/19400

R2 5' -GCCGTCGAC TGGTCTAGGTAGAAATGTGTAATTTCTGATGCC-3' (SEQ ID NO:64)

For downstream cloning purposes, the forward primer includes an in-frame *Bgl* II restriction site and the reverse primer contains an in-frame *Sal* I restriction site.

5 Two PCR reactions were set up using a total of 1-5 ng of the plasmid that contains the insert for CG53135-04.

The reaction mixtures contained 2 microliters of each of the primers (original concentration: 5 pmol/ul), 1 microliter of 10mM dNTP (Clontech Laboratories, Palo Alto CA) and 1 microliter of 50xAdvantage-HF 2 polymerase (Clontech Laboratories) in 50 microliter-
10 reaction volume. The reaction conditions used are provided in above in Example 22A.

An amplified product was detected by agarose gel electrophoresis. The fragment was gel-purified and ligated into the pCR2.1 TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's recommendation. Twelve clones per PCR reaction were picked and sequenced. The inserts were sequenced using vector-specific M13 Forward and M13 Reverse
15 primers.

The insert assembly 250059629 was found to encode an open reading frame between residues 31 and 162 of the target sequence of CG53135-04. The cloned inserts are 100% identical to the original sequence. See Tables 38-41. The alignment with CG53135-04 is displayed in a ClustalW in Table 42. The first 3 and the last 3 amino acid residues of the
20 assemblies are derived from the restriction enzyme sites added in the primers for the purpose of sub-cloning. Note that differing amino acids have a white or grey background, and deleted/inserted amino acids can be detected by a dashed line in the sequence that does not code at that position.

Table 38. Cloned Sequences

25 >CG53135-04 (SEQ ID NO:65)
ATGAGCTCCTTAGCGGACTCGGGGCTTTCTGGGCGGCTGGAGGCTTGGGCCAGCCGGGGCAGCGC
AGCTTGGGCACTTGCAGGATCTGCGCCGCCCGGAGCTCTATTGCCGCACTGGCTTCCACTGCGAGT
30 CCTGCCCGAGCGGACAGCTGCGAGGCAACCGGCGAGGACACAGGCTCTTCGGTATCTGGAAATTCATCAGT
GTGGCAGTGGGACTGGTCACTATTAGAGGTGTGGACAGTGGTCTCTATCTGGAAATGAAATGACAAAGGAG
AACTCTATGAGATCAGAGAACTTACTTCCGAAATGCACTTTAGGGAGCAGTTGAAAGAGAACTGGTATAA
CACTTATCATTAACATATATAACAATGGAGCACTGGCCGCGAGTATTTGTGGCACTTACAAAGAC
GGAACTCCAGAGATGGGCCAGGTCAGAGAGGCACTAGAAATTTACACATTTCTTACCTGACCACTGG
ATCCGAAAGAGTTCCAGAAATGACAGGACCTACTGATGTACACTTAG

Table 39. Cloned Sequences

35 >250059629 (SEQ ID NO:66)
CACCGATCTATCTCGGCCCGCGGAGCTCTATTGCCGCAACCGGCTTCCGACTGCGATCTTGGCCGAC
GGCAGCGTGCAGGGGCAACCGGCGAGGACACAGGCTCTTGGGTATCTTGGAAATTCATCAGTGTGGCAGTGG
40 GACTGGTCACTATTAGAGGTGTGGACAGTGGTCTCTATCTTGGAAATGAAATGACAAAGGAGAACTTATGG
ATCAGAGAACTTACTTCCGAAATGCACTTTAGGGAGCAGTTGAAAGAGAACTGGTATAACACTTATTCA
TCTAACAATATAAACAATGGAGACACTGGCCGCGAGTATTTGTGGCACTTACAAAGACGGAACCTCAA
GAGATGGCGCCAGGTCAGAGGCACTAGAAATTTACACATTTCTTACCTGACCACTGACCGC

WO 02/102990

PCT/US02/19400

Table 40. View DNA Sequence Analysis of CG53135-04

Translated Protein - Frame: 1 - Nucleotide 1 to 537

```

1  ATGGCTCCCTTAGCCGAMGTCGGGGSCCTTCTGGGCGGCTTGGAGGGCTTGGCCAGCCGGGGCAGCCAGCTGGCGCA
M A P L A E V G G F L G G L E G L G Q P G A A Q L A H
81  CCTGCAAGGATCCTGGCGCCCGGCGAGCTCTATTGCCGACCGGCTTCACCTCCAGATCCTGCCGACCGCAGGTCG
L H G I L R R R Q L Y C R T G F H L Q I L P D G S V Q
161  AGGGCCCGGACGACCCAGCCCTCTCGGTAICTTGGAAITCATCATGTGGCAGTGGGACTGGTCAATATTAGAGGT
G T R Q D H S L F G I L E F I S V A V G L V S I R G
241  GTGGCAGTGGTCTCTATCTTGGAAATGACAAAGGAGAACTCTATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAATGCATCTT
V D S G L Y L G M N D K G E L Y G S E K L T S E C I F
321  TAGGGACAGTGTGAGAGAACTGGTATAACACCTATTCATTAACATATAAACAATGAGACACTGGCCGAGTATT
R E Q F E E N W Y N T Y S S N I Y K H G D T G R R Y F
401  TTGTGCCTTAACAAGACGAACTCCAGAGATGGCCGAGGTCAGAGGATCAGAAATTCACATTTCTACCT
V A L N K D G T P R D G A R S K R H Q K F T H F L P
481  AGACCAATGGATCCAGAAAGATTCAGAAATGTACAAGSACTACTGATGTACACTTAG
R P V D F E R V P E L Y K D L L M Y T

```

Table 41. View DNA Sequence Analysis of 250059629

5

Translated Protein - Frame: 2 - Nucleotide 2 to 415

```

1  CACCAGATCTATCTGGCGCGCGGAGCTCTATTGCGGACCGGCTTCACCTCCGATCCTGGCAAGCCAGCCGCGC
T R S I L R R R Q L Y C R T G F H L Q I L P D G S V Q
81  AGGGCCCGGACGACCCAGCCCTCTCGGTAICTTGGAAITCATCATGTGGCAGTGGGACTGGTCAATATTAGAGGT
G T R Q D H S L F G I L E F I S V A V G L V S I R G
161  GTGGCAGTGGTCTCTATCTTGGAAATGACAAAGGAGAACTCTATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAATGCATCTT
V D S G L Y L G M N D K G E L Y G S E K L T S E C I F
241  TAGGGACAGTGTGAGAGAACTGGTATAACACCTATTCATTAACATATAAACAATGAGACACTGGCCGAGTATT
R E Q F E E N W Y N T Y S S N I Y K H G D T G R R Y F
321  TTGTGCCTTAACAAGACGAACTCCAGAGATGGCCGAGGTCAGAGGATCAGAAATTCACATTTCTACCT
V A L N K D G T P R D G A R S K R H Q K F T H F L P
401  AGACCAATGGATCCAGAAAGATTCAGAAATGTACAAGSACTACTGATGTACACTTAG
R P V D G

```

Table 42. ClustalW alignment

```

250059629 1  -----TGGSLI LRRPOLYCRTPGHLQILEGDSVQGTREQH 33
CG53135-04 1 MAPLAEVGGLGLLELDQFGAAQLAHLGG I LRRPOLYCRTPGHLQILPDQSVQGTREQH 60
250059629 34 SLFGILEFISVAWGLVSI RGVDSGLYLG MNDKGLY GSEKLTSECFR EOPFEENWYNTYS 93
CG53135-04 61 SLFGILEFISVAWGLVSI RGVDSGLYLG MNDKGLY GSEKLTSECFR EOPFEENWYNTYS 120
250059629 94 SNLYKHGDTGRRYFVALNKDGT PRDGARS KRHQKETHLFRPVDG----- 138
CG53135-04 121 SNLYKHGDTGRRYFVALNKDGT PRDGARS KRHQKETHLFRPVDGERPVELYKOLLMYT 179

```

10 C. Molecular Cloning of CG53135-04 (31-179 aa)

The cDNA coding for the mature form of CG53135-04 from residue 31 to 179 was targeted for "in-frame" cloning by PCR. The PCR template is based on the previously identified plasmid.

The following oligonucleotide primers were used to clone the target cDNA sequence:

15 F2 5'-CACCAGATCT ATCCTGGCGCGCGGAGCTCTATTGCC-3' (SEQ ID NO:63)
R1 5'-GCCCTCGAC AGTGTACATCAGTAGGTCCTGTACAAATTC-3' (SEQ ID NO:56)

WO 02/102990

PCT/US02/19400

For downstream cloning purposes, the forward primer includes an in-frame Bgl II restriction site and the reverse primer contains an in-frame Sal I restriction site.

Two PCR reactions were set up using a total of 1-5 ng of the plasmid that contains the insert for CG53135-04.

5 The reaction mixtures contained 2 microliters of each of the primers (original concentration: 5 pmol/ul), 1 microliter of 10mM dNTP (Clontech Laboratories, Palo Alto CA) and 1 microliter of 50xAdvantage-HF 2 polymerase (Clontech Laboratories) in 50 microliter-reaction volume. The reaction conditions used are provided in above in Example 22A.

10 An amplified product was detected by agarose gel electrophoresis. The fragment was gel-purified and ligated into the pCR2.1 TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's recommendation. Twelve clones per PCR reaction were picked and sequenced. The inserts were sequenced using vector-specific M13 Forward and M13 Reverse primers.

15 The insert assembly 250059669 was found to encode an open reading frame between residues 31 and 179 of the target sequence of CG53135-04. The cloned inserts are 100% identical to the original sequence. See Tables 43-46 The alignment with CG53135-04 is displayed in a ClustalW in Table 47. The first 3 and the last 3 amino acid residues of the assemblies are derived from the restriction enzyme sites added in the primers for the purpose of sub-cloning. Note that differing amino acids have a white or grey background, and 20 deleted/inserted amino acids can be detected by a dashed line in the sequence that does not code at that position.

Table 43. Cloned Sequences

>CG53135-04 (SEQ ID NO: 67)
25 ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGGCTTCTGGGGCCCTGGAGGGCTTGGGCCAGCCGGGGCAGCGC
AGCTGGCCGACCTGCAAGGATCTGGCCGCGCGGCGAGCTCTATTGCGCAOCGCGCTTCCCACTGCAGAT
CCTCCCGACGGCAGCGTGCAGGGCACCCGGCAGGACACAGCCCTTTCGGTATCTTGGAAATTCATCAT
GTGGCAATGGGACTGGTCTGGTATTAGAGGTGTGGCACTGGTCTTCTTCTTGGAAATTCACAGAGGG
30 ATCTCTATGGATCAGGAACTTACTCCGATGCACTTTAGGGAGCACTTGAAGAGAACTGGTATGA
CACCTATTCATCAATATAAACAATGAGACATGGCCGCGAGTATTTTGGCCACTTACAAAGAC
GGAACTCCAGAGATGGCGCAGTCCAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCTAGACCAGTGG
ATCCAGAAAGATTCAGAAATTTACAGGACCTACTGATGTACACTAG

Table 44. Cloned Sequences

>250059669 (SEQ ID NO: 68)
35 GACCGAATCTATCTGGCCGCGAGCTCTATTGCGCACCGGCTTCCACTTCGAGATCTGGCCGAC
CCGAGGTGCGAGGCAACCAGGACCAAGCCCTTGGTATCTTGGAAATTCATCATGTGGCAATGG
GACTGGTCACTTAGAGGTCTGGACAGTGGTCTCTTCTTGGAAATGAAATGACAAAGGAGAACTCTATGG
ATCAGAGAACTTACTCCGAATGCATCTTAGGGAGCAGTTTGAAGAGAACTGGTATTAACACTTATCA
40 TCTAGATAATATAACATGGAGACACTGGCCGCGAGTATTTTGGCCACTTAAAGAGCGGAACTCCAA
GAGATGGCGCCAGTCCAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCTAGACCAGTGGATCCAGAAAG
AGTTCCAGAAATTTGACAGGACCTACTGATGTACACTGTCGACGGC

Table 45. View DNA Sequence Analysis of CG53135-04

WO 02/10290

PCT/US02/19400

Translated Protein - Frame: 1 - Nucleotide 1 to 537

```

1  ATGGCTCCCTTAGCCGAAAGTGGGGGCTTTCTGGGCGCTGGAGGCTTGGCCAGCCGGGGCAGCCAGCTGGCCCA
M A P L A E V G G F L G G L E G L G Q P P G A A Q L A H
81  CCTGCAAGGCATCTGCGCCGCGCGAGCTCTATTGCGCAGCGCTTCCACTGCAGATCCTGCCAGCGGCGGCTGEC
L H S I L R R R Q L Y C R T G F H L Q I L P D G S V Q
161  AGGCGACCCGCGAGGACCCAGCCTCTCGGTATCTGGAAATCAICAGTGTGCGAGTGGGACTGCTCAGTATTAGAGGT
G T R Q D H S L F G I L E F I S V A V G L V S I R G
241  GTGGCACTGGTCTCTATCTTGGATGAATGACAAAGGAGAACTCATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAAATGCATCTT
V D S G L Y L G M N D K G E L Y G S E K L T S E C I F
321  TAGGGAGCGATTTGAGAGAACTGGTATAACCCCTATTCTATCACTATATAACATGGAGACACTGCGCGAGGTATT
R E Q P E E N W Y N T Y S S N I Y K H G D T G R R Y F
401  TTGTGGCACTTACAAAGACGGAATCCAGAGATGGCGCAGGTCCAGAGGACATCAGAAATTTACACATTTCTTACT
V A L N K D G T P R D G A R S K R H Q K F T H P L F
481  AGACCGTGGATCCAGAAAGGATTCAGAAATGTACAAAGACCTACTGATGTACACTTAG
R P V D P E R V P E L Y K D L L M Y T

```

Table 46. View DNA Sequence Analysis of 25005969

Translated Protein - Frame: 2 - Nucleotide 2 to 466

```

1  CACCGACTCTCTCTGCGCCGCGCGAGCTCTATTGCGCAGCGCTTCCACTGCAGATCCTGCCAGCGGCGGCTGEC
T R S I L R R R Q L Y C R T G F H L Q I L P D G S V Q
81  AGGCGACCCGCGAGGACCCAGCCTCTCGGTATCTGGAAATCAICAGTGTGCGAGTGGGACTGCTCAGTATTAGAGGT
G T R Q D H S L F G I L E F I S V A V G L V S I R G
161  GTGGCACTGGTCTCTATCTTGGATGAATGACAAAGGAGAACTCATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAAATGCATCTT
V D S G L Y L G M N D K G E L Y G S E K L T S E C I F
241  TAGGGAGCGATTTGAGAGAACTGGTATAACCCCTATTCTATCACTATATAACATGGAGACACTGCGCGAGGTATT
R E Q P E E N W Y N T Y S S N I Y K H G D T G R R Y F
321  TTGTGGCACTTACAAAGACGGAATCCAGAGATGGCGCAGGTCCAGAGGACATCAGAAATTTACACATTTCTTACT
V A L N K D G T P R D G A R S K R H Q K F T H P L F
401  AGACCGTGGATCCAGAAAGGATTCAGAAATGTACAAAGACCTACTGATGTACACTTTGCAAGCC
R P V D P R R V P E L Y K D L L M Y T V D G

```

5

Table 47. ClustalW alignment

```

250059669 1 .....TSSILRRROLVCRTPHQLIIPDGSVQGTRODH 33
CG53135-04 1 MAFVAFVGGFPGLELQIQPAAQOLAH...ILRRROLVCRTPHQLIIPDGSVQGTRODH 60
250059669 34 SLFGILLEFISVAVOLVSIIRGVD SGLYLGMNDKGELYGSEKLTSECFRPEQFENWNTYVS 93
CG53135-04 61 SLRQILLEFISVAVGLVSIIRGVD SGLYLGMNDKGELYGSEKLTSECFRPEQFENWNTYVS 120
250059669 94 SNLYKHGDIGRRVVALNKDOTPRDGA RSKRHQKFTHEFLPRVDDPERVPELYKDLLMYTV 153
CG53135-04 121 SNLYKHGDIGRRVVALNKDOTPRDGA RSKRHQKFTHEFLPRVDDPERVPELYKDLLMYTV 179
250059669 154 DG 155
CG53135-04 *** -- ***

```

EQUIVALENTS

10 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 embodiments have been disclosed herein in detail, this has been done by way of

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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
5 of the 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 02/102990

PCT/US02/19400

What is claimed is:

1. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
 - a) an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2;
 - b) a variant of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2, 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;
 - c) a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2; and
 - d) a variant of a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2, 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
 - 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 allelic variant of SEQ ID NO:2.
4. The polypeptide of claim 3, wherein the variant is the translation of a single nucleotide polymorphism.
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 is changed to provide a conservative substitution.
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:
 - a) a polypeptide comprising SEQ ID NO:2;
 - b) a variant of SEQ ID NO:2, 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;

WO 02/102990

PCT/US02/19400

- c) a mature form of the amino acid sequence given by SEQ ID NO:2; and
- d) a variant of a mature form of the amino acid sequence given by SEQ ID NO:2, 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;
- 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.

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.

9. The nucleic acid molecule of claim 6, wherein the nucleic acid molecule comprises a single nucleotide polymorphism encoding said variant polypeptide.

10. The nucleic acid molecule of claim 6, wherein said nucleic acid molecule comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of

- a) a nucleotide sequence given by SEQ ID NO:1;
- 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;
- 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.

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.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

12. An isolated nucleic acid molecule encoding a fragment of an FGF-CX polypeptide.
13. The nucleic acid molecule of claim 12, wherein said FGF-CX polypeptide is a variant of SEQ ID NO:2.
14. The nucleic acid molecule of claim 12, wherein said FGF-CX polypeptide is a mature FGF-CX polypeptide.
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.
16. A vector comprising the nucleic acid molecule of claim 6.
17. A cell comprising the vector of claim 16.
18. An antibody that binds immunospecifically to an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: (a) an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2; (b) a variant of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2, 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; (c) a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2; and (d) a variant of a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2, 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 (e) a fragment of an amino acid sequence described in paragraphs (a) to (d).
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 human antibody.
21. A method for determining the presence or amount of an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: (a) an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2; (b) a variant of an amino acid sequence given by SEQ ID

WO 02/102990

PCT/US02/19400

NO:2, 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; (c) a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2; and (d) a variant of a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2, 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 (e) a fragment of an amino acid sequence described in paragraphs (a) to (d); in a sample, the method comprising:

- (i) providing the sample;
- (ii) contacting the sample with an antibody that binds immunospecifically to the polypeptide; and
- (iii) determining the presence or amount of antibody bound to said polypeptide, thereby determining the presence or amount of polypeptide in said sample.

22. A method for determining the presence or amount of a nucleic acid molecule of claim 6 in a sample, the method comprising:

- (i) providing the sample;
 - (ii) contacting the sample with a probe that binds to said nucleic acid molecule; and
 - (iii) 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 an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: (a) an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2; (b) a variant of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2, 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; (c) a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2; and (d) a variant of a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2, 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 (e) a fragment of an amino acid sequence described in paragraphs (a) to (d), the method comprising:

WO 02/102990

PCT/US02/19400

- (i) contacting said polypeptide with a candidate substance; and
 - (i) determining whether said candidate substance binds to said polypeptide;
- wherein a candidate substance that binds is the agent.

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 an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: (a) an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2; (b) a variant of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2, 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; (c) a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2; and (d) a variant of a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2, 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 (e) a fragment of an amino acid sequence described in paragraphs (a) to (d), 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 an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: (a) an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2; (b) a variant of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2, 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; (c) a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2; and (d) a variant of a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2, 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 (e) a fragment of an amino acid sequence described in paragraphs (a) to (d), the method comprising:

- (i) providing a cell expressing the polypeptide and having a property or function ascribable to the polypeptide;

WO 02/102990

PCT/US02/19400

(ii) contacting the cell provided in step (a) with a test agent; and
(iii) 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.

33. The therapeutic agent of claim 31, wherein the agent is an antibody or has a molecular weight not more than about 1500 Da.

34. A method of treating or preventing a disorder associated with an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence;
said amino acid sequence selected from the group consisting of: (a) an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2; (b) a variant of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2, 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; (c) a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2; and (d) a variant of a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2, 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

WO 02/102990

PCT/US02/19400

are so changed; and (e) a fragment of an amino acid sequence described in paragraphs (a) to (d);

wherein the disorder is characterized by insufficient or ineffective growth of a cell or a tissue, said method comprising administering to a subject said polypeptide 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.

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:

an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: (a) an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2; (b) a variant of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2, 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; (c) a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2; and (d) a variant of a mature form of an amino acid sequence given by SEQ ID NO:2, 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 (e) a fragment of an amino acid sequence described in paragraphs a) to d);

wherein the disorder is characterized by insufficient or ineffective growth of a cell or a tissue, said method comprising administering to a subject an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: (e) a polypeptide comprising SEQ ID NO:2; (f) a variant of SEQ ID NO:2, 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; (g) a mature form of the amino acid sequence given by SEQ ID NO:2; and (h) a variant of a mature form of the amino acid sequence given by SEQ ID NO:2, 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; (i) a fragment of an amino acid sequence described in (e) to (h); and (j) the complement of any of the nucleic acid molecules described in paragraphs (e) to (i); in an amount and for a duration sufficient to treat or prevent said

WO 02/102990

PCT/US02/19400

disorder in said subject, wherein the subject is thought to be prone to or to be suffering from the disorder.

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 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.

40. The method of claim 38, wherein the subject is a human.

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 and a pharmaceutically acceptable carrier.

43. A pharmaceutical composition comprising the antibody of claim 18 and a pharmaceutically acceptable carrier.

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.

46. A kit comprising in one or more containers a pharmaceutical composition of claim 41.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

47. A kit comprising in one or more containers a pharmaceutical composition of claim 42.

48. A kit comprising in one or more containers a pharmaceutical composition of claim 43.

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:

- 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
- 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,

WO 02/102990

PCT/US02/19400

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.

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 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.

WO 02/102990

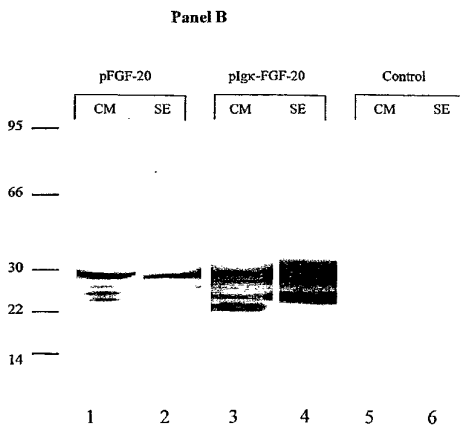
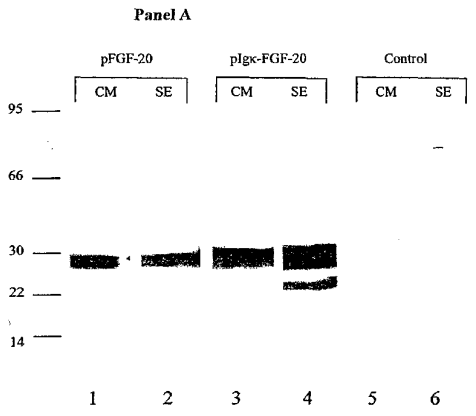
PCT/US02/19400

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.
60. The method of claim 58, wherein the composition comprises an ant FGF-CX antibody or a FGF-CX therapeutic agent.
61. The method of claim 58, wherein the subject is a human.
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.
63. The polypeptide fragment described in claim 2, wherein the fragment comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of residues 55-211 of SEQ ID NO:2 and residues 24-211 of SEQ ID NO:2.
64. The isolated nucleic acid molecule described in claim 6, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleic acid sequence encoding a polypeptide fragment comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of residues 55-211 of SEQ ID NO:2 and residues 24-211 of SEQ ID NO:2.
65. The nucleic acid molecule described in claim 10, wherein the nucleic acid sequence comprises a sequence selected from the group consisting of nucleotides 163-633 of SEQ ID NO:1 and nucleotides 70-633 of SEQ ID NO:1.

WO 02/102990

PCT/US02/19400

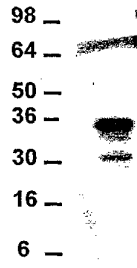
FIGURE 1



WO 02/102990

PCT/US02/19400

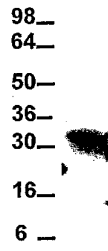
FIGURE 2



WO 02/102990

PCT/US02/19400

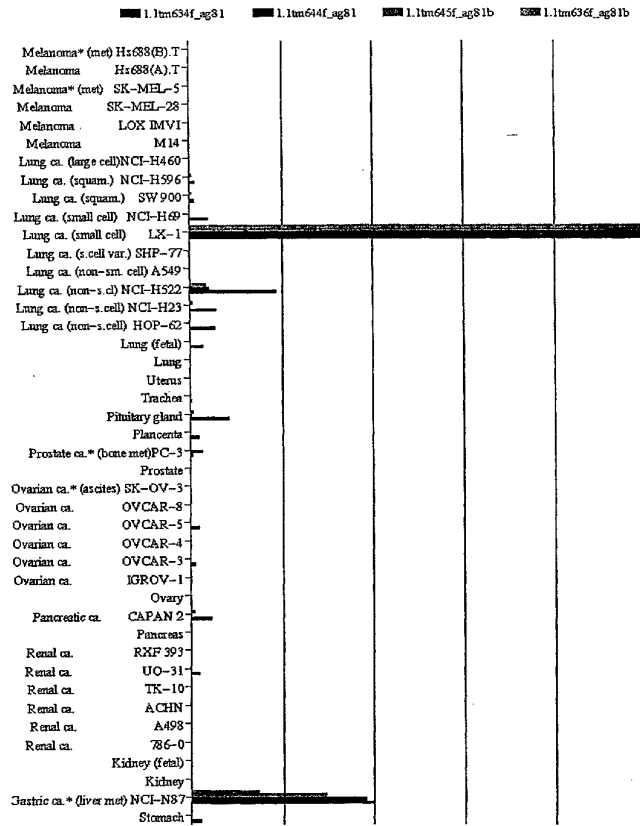
Figure 3



WO 02/102990

PCT/US02/19400

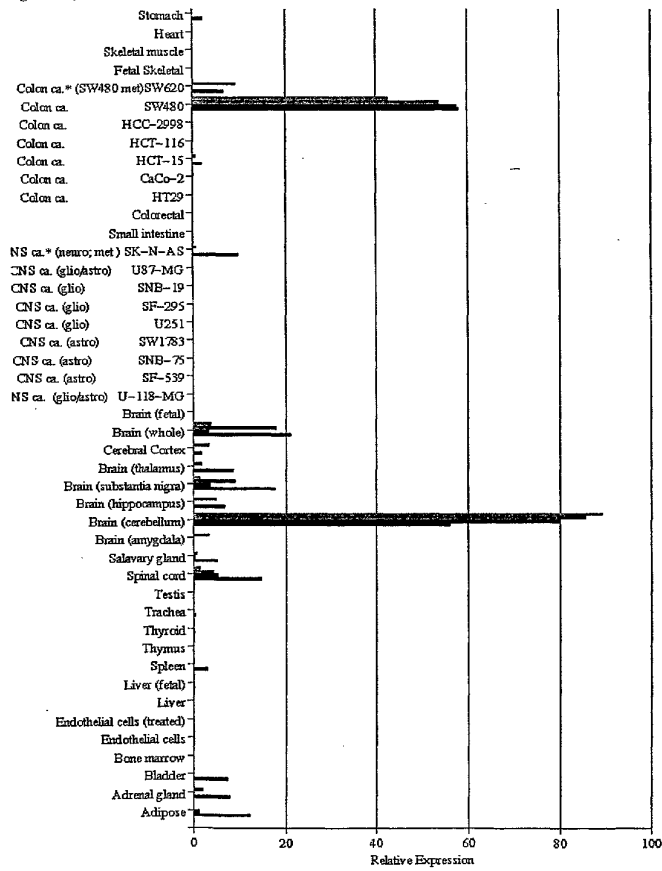
Figure 4, Panel A.



WO 02/102990

PCT/US02/19400

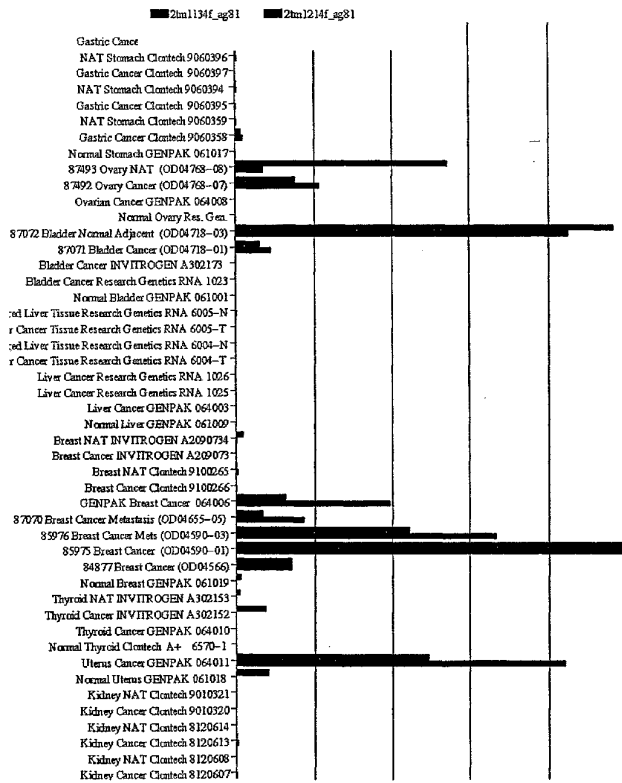
Figure 4, Panel B.



WO 02/102990

PCT/US02/19400

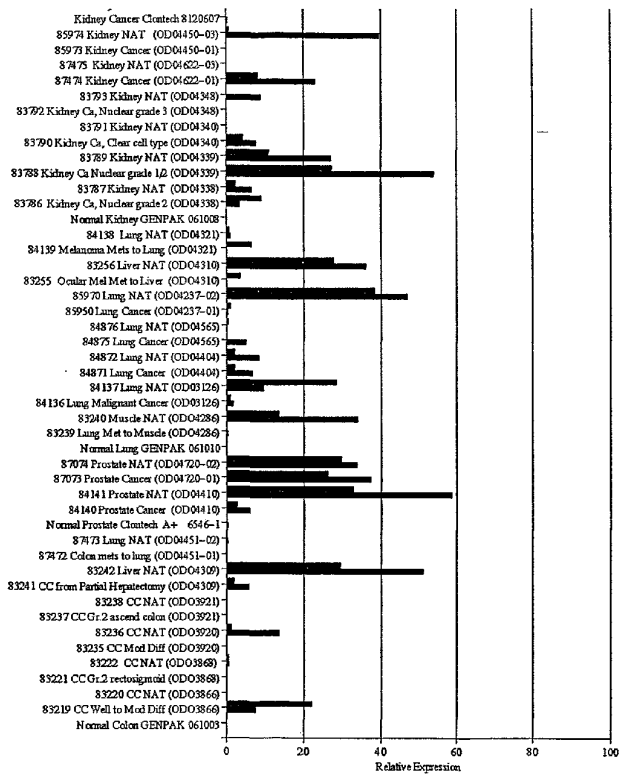
Figure 4, Panel C.



WO 02/102990

PCT/US02/19400

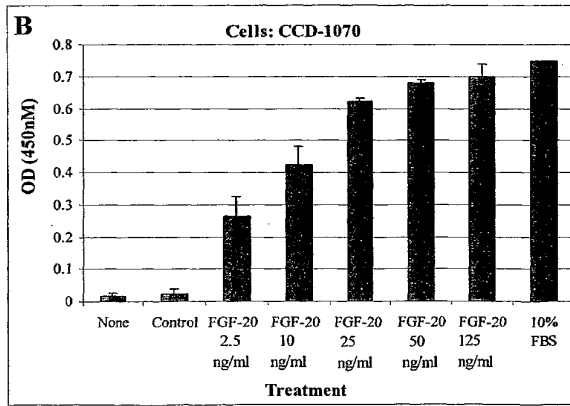
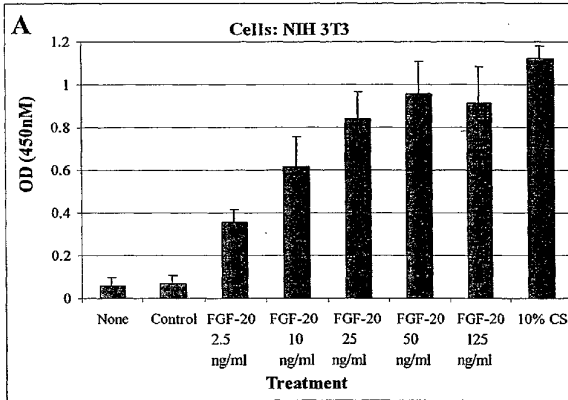
Figure 4, Panel D.



WO 02/102990

PCT/US02/19400

FIGURE 5



WO 02/102990

PCT/US02/19400

FIGURE 5 (continued).

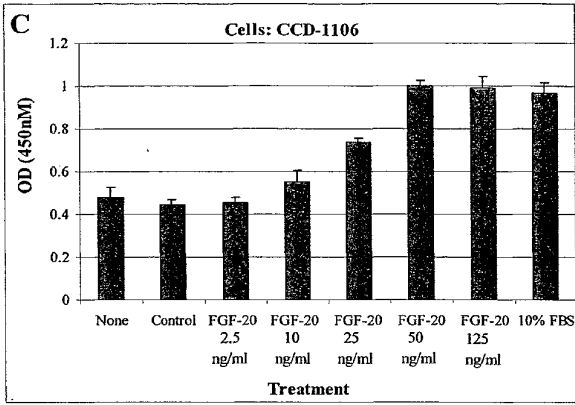
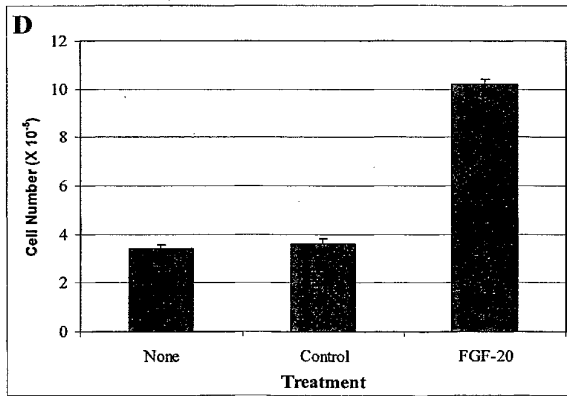


FIGURE 6



WO 02/102990

PCT/US02/19400

FIGURE 7

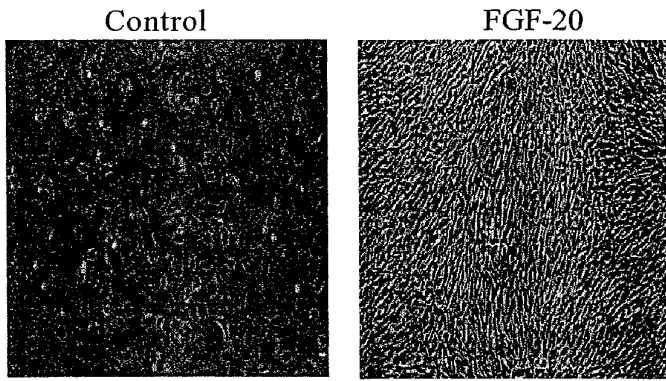
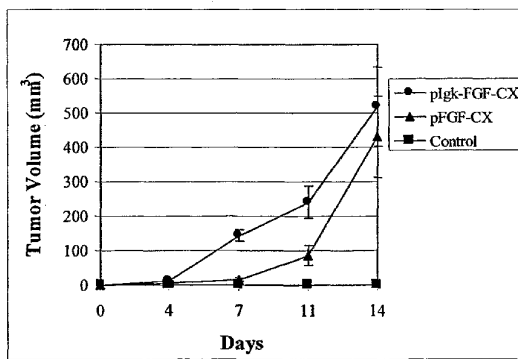


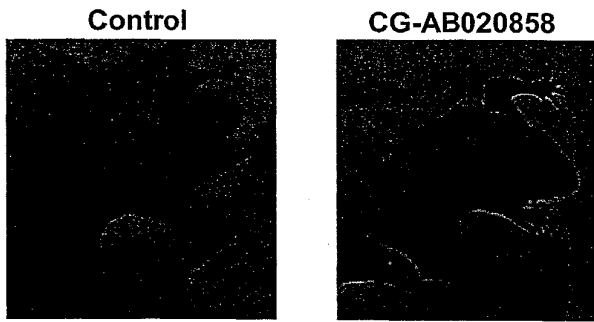
FIGURE 8



WO 02/102990

PCT/US02/19400

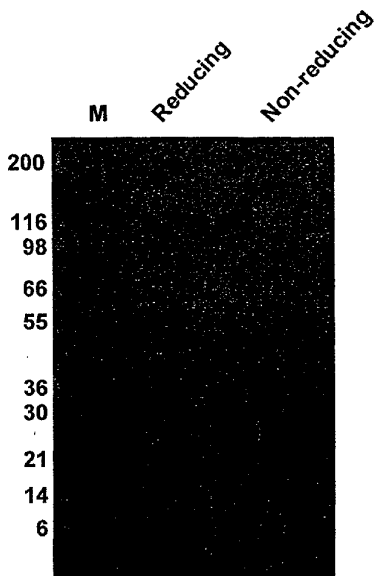
FIGURE 9



WO 02/102990

PCT/US02/19400

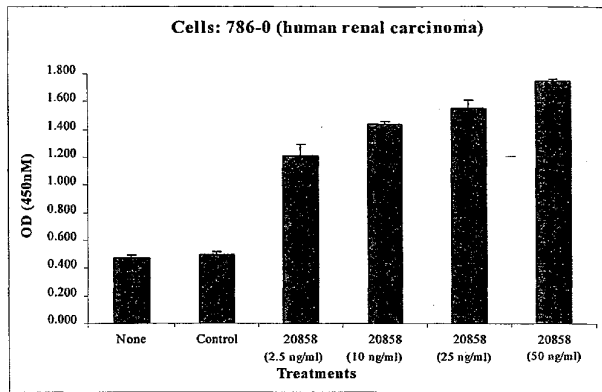
FIGURE 10



WO 02/102990

PCT/US02/19400

FIGURE 11

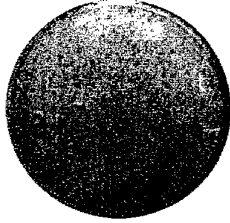


WO 02/102990

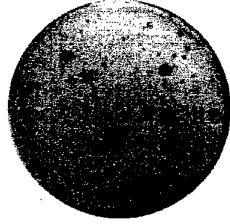
PCT/US02/19400

FIGURE 12

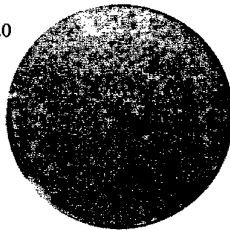
Control



pFGF-20



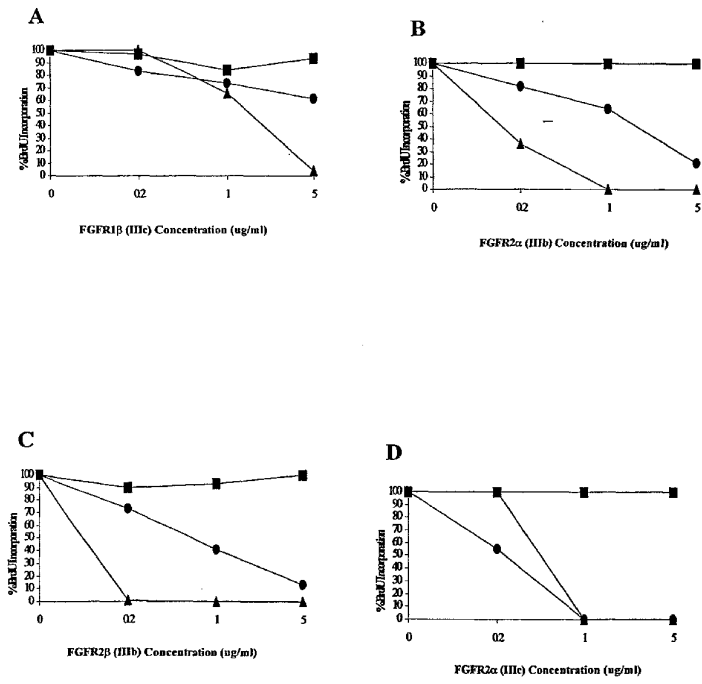
pIgκ-FGF-20



WO 02/102990

PCT/US02/19400

FIGURE 13



WO 02/102990

PCT/US02/19400

FIGURE 13(continued)

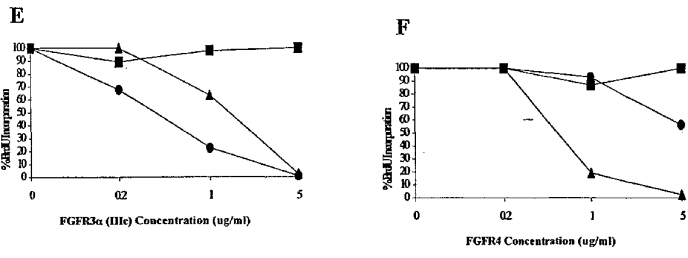
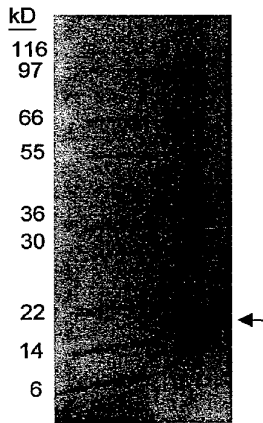


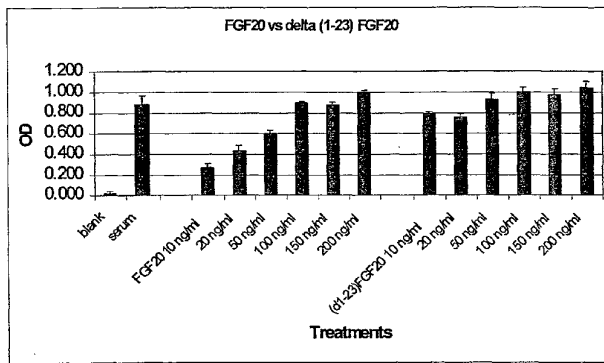
FIGURE 14



WO 02/102990

PCT/US02/19400

FIGURE 15



【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
27 December 2002 (27.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/102990 A3(51) International Patent Classification: C07H 21/04,
C12N 15/11, 15/85, 15/86, C07K 5/00, 17/00, G01N 33/50

(21) International Application Number: PCT/US02/19400

(22) International Filing Date: 17 June 2002 (17.06.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/298,441 15 June 2001 (15.06.2001) US
60/316,446 31 August 2001 (31.08.2001) US
60/359,594 26 February 2002 (26.02.2002) US
Not furnished 31 May 2002 (31.05.2002) US(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part
(CIP) to earlier applications:US 60/298,441 (CIP)
Filed on 15 June 2001 (15.06.2001)
US 60/316,446 (CIP)
Filed on 31 August 2001 (31.08.2001)
US 60/359,594 (CIP)
Filed on 26 February 2002 (26.02.2002)
US Not furnished (CIP)
Filed on 31 May 2002 (31.05.2002)(71) Applicant (for all designated States except US): CURA-
GEN CORPORATION [US/US]; 555 Long Wharf Drive,
11th floor, New Haven, CT 06511 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SHIMKETS,
Richard, A. [US/US]; 5 Indian Meadows Drive, Guilford,
CT 06437 (US). JEFFERS, Michael, E. [US/US]; 14
Flax Mill Hollow, Branford, CT 06405 (US). PRAYAGA,
Sudhirdas, K. [IN/US]; 7365 Macleod Lane, O'Fallon,
MI 48366 (US). BOLDG, Ferenc, L. [HU/US];
1687 Hartford Turnpike, North Haven, CT 06473 (US).
YANG, Meijia [US/US]; 6 Cabbird Lane, East Lyme,
CT 06533 (US). BURGESS, Catherine, E. [US/US];
90 Carriage Hill Drive, Wethersfield, CT 06109 (US).
FERNANDES, Elma, R. [IN/US]; 77 Florence Road,
2B, Branford, CT 06405 (US). HERRMANN, John, L.
[US/US]; 78 Barnshed Lane, Guilford, CT 06437 (US).LAROCHELLE, William, J. [US/US]; 15 Devonshire
Lane, Madison, CT 06443 (US). LICHENSTEIN, Henri,
S. [US/US]; 88 Greenbrier Drive, Guilford, CN 06437
(US). GORMAN, Linda [US/US]; 329 Monticello Drive,
Branford, CT 06405 (US). ZHONG, Mei [CA/US]; 45
Harrison Avenue, Apartment 1B, Branford, CT 06405
(US). PADIGARU, Maralidhara [IN/US]; 71 Hampton
Park, Branford, CT 06405 (US). PENA, Carol, E., A.
[US/US]; 604 Orange Street, Number 2, New Haven, CT
06511 (US). ALSOBROOK, John, P., II [US/US]; 60
Lake Drive, Madison, CT 06443 (US). LEPLEY, Denise,
M. [US/US]; 51 Church Street, Branford, CT 06405
(US). RIEGER, Daniel, K. [DE/US]; 10A McKinnel
Court, Branford, CT 06405 (US). GROSSE, William, M.
[US/US]; 15 Rice Terrace Road, Apartment C, Branford,
CT 06405 (US).(74) Agent: ELRIFI, Ivor, R.; Mintz, Levin, Cohn, Ferris,
Glovksy and Popeo, P.C., One Financial Center, Boston,
MA 02111 (US).(81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GI,
GM, HN, 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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TH, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).Published:
with international search report(88) Date of publication of the international search report:
28 August 2002For 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 02/102990 A3

(54) Title: FIBROBLAST GROWTH FACTOR AND NUCLEIC ACID ENCODING SAME

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

【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)

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
27 December 2002 (27.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/102990 A3(51) International Patent Classification: C07H 21/04,
C12N 15/11, 15/85, 15/86, C07K 5/00, 17/00, G01N 33/50

(21) International Application Number: PCT/US02/19400

(22) International Filing Date: 17 June 2002 (17.06.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/298,441 15 June 2001 (15.06.2001) US
60/316,446 31 August 2001 (31.08.2001) US
60/359,594 26 February 2002 (26.02.2002) US
60/385,173 31 May 2002 (31.05.2002) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part

(CIP) to earlier applications:
US 60/298,441 (CIP)
Filed on 15 June 2001 (15.06.2001)
US 60/316,446 (CIP)
Filed on 31 August 2001 (31.08.2001)
US 60/359,594 (CIP)
Filed on 26 February 2002 (26.02.2002)
US Not furnished (CIP)
Filed on 31 May 2002 (31.05.2002)(71) Applicant (for all designated States except US): CURA-
GEN CORPORATION [US/US]; 555 Long Wharf Drive,
11th floor, New Haven, CT 06511 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SHIMKETS,
Richard, A. [US/US]; 5 Indian Meadows Drive, Guilford,
CT 06437 (US). JEFFERS, Michael, E. [US/US]; 14
Flax Mill Hollow, Branford, CT 06405 (US). PRAYAGA,
Sudhidas, K. [US/US]; 7365 Macleod Lane, O'Fallon,
MI 48356 (US). BOLDOG, Ferenc, L. [HU/US];
1687 Hartford Turnpike, North Haven, CT 06473 (US).
YANG, Meijia [US/US]; 6 Cabrid Lane, East Lyme,
CT 06533 (US). BURGESS, Catherine, E. [US/US];
90 Carriage Hill Drive, Weathersfield, CT 06109 (US).
FERNANDES, Elma, R. [IN/US]; 77 Florence Road,
2B, Branford, CT 06405 (US). HERRMANN, John, L.
[US/US]; 78 Barnshed Lane, Guilford, CT 06437 (US).
LAROCHELLE, William, J. [US/US]; 15 Devonshire
Lane, Madison, CT 6443 (US). LICHENSTEIN, Henri,
S. [US/US]; 88 Greenbrier Drive, Guilford, CN 06437
(US). GORMAN, Linda [US/US]; 329 Monticello Drive,Branford, CT 06405 (US). ZHONG, Mei [CA/US]; 45
Harrison Avenue, Apartment 1B, Branford, CT 06405
(US). PADIGARU, Muralidhara [IN/US]; 71 Hampton
Park, Branford, CT 06405 (US). PENA, Carol, E., A.
[US/US]; 604 Orange Street, Number 2, New Haven, CT
06511 (US). ALSOBROOK, John, P., II [US/US]; 60
Lake Drive, Madison, CT 06443 (US). LEPLEY, Denise,
M. [US/US]; 51 Church Street, Branford, CT 06405
(US). RIEGER, Daniel, K. [DE/US]; 10A McKinnel
Court, Branford, CT 06405 (US). GROSSE, William, M.
[US/US]; 15 Rice Terrace Road, Apartment C, Branford,
CT 06405 (US).(74) Agent: ELRIFI, Ivor, R.; Mintz, Levin, Cohn, Ferris,
Glovsky and Popeo, P.C., One Financial Center, Boston,
MA 02111 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI, GB, GD, GH, GI,
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, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, 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, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).Published:
with international search report(88) Date of publication of the international search report:
28 August 2003(48) Date of publication of this corrected version:
24 December 2003(15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 52/2003 of 24 December 2003, Section II

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.

(54) Title: FIBROBLAST GROWTH FACTOR AND NUCLEIC ACID ENCODING SAME

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



WO 02/102990 A3

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/19400
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C07H 21/04; C12N 15/11, 15/85, 15/86; C07K 5/00, 17/00; G01N 33/50 US CL : 435/325; 436/86; 530/300,350; 536/23.1, 23.5 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classified/on system followed by classification symbols) U.S. : 435/325; 436/86; 530/300,350; 536/23.1, 23.5		
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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIKEFALVI, A. et al. Biological Roles of Fibroblast Growth Factor-2. Endocrine Reviews. February 1997, Vol. 18, No. 1, pages 26-45.	1-17, 21, 41-42, 46-47, and 63-65
A,P	WONG, L.C. et al. Novel SNP at the Common Primer Site of FGF2 Gene Causes Error in Molecular Diagnosis of Craniosynostosis Syndrome. American Journal of Medical Genetics, 15 August 2001, Vol. 102, No. 3, pages 282-285, entire document.	1-17, 21, 41-42, 46-47, and 63-65
A,P	BANGE, J. et al. Cancer Progression and Tumor Cell Motility are Associated with the FGFR4 Arg388 Allele. Cancer Research. 01 February 2002, Vol. 62, pages 840-847, entire document.	1-17, 21, 41-42, 46-47, and 63-65
X	WO 01/07595 A2 (CURAGEN CORPORATION) 01 February 2001 (01.02.2001), claim 10, Figure 1, pp. 128, 100% sequence homology with SEQ ID NO: 1 and Claim 1 Figure 1, 100% sequence homology with SEQ ID NO: 2.	1-17, 21, 41-42, 46-47, and 63-65
X	WO 01/31008 A2 (CHIRON CORPORATION) 03 May 2001 (03.05.2001), Claim 2, Figure 8, 100% sequence homology to SEQ ID NO: 1 and claim 12, Figure 8, 100% sequence homology to SEQ ID NO: 2.	1-17, 21, 41-42, 46-47, and 63-65
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot 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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"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 12 May 2003 (12.05.2003)	Date of mailing of the international search report 04 JUN 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Christopher Nichols, Ph.D. Telephone No. 703-308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/US02/19400
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	OHMACHI, S. et al. FGF-20, A Novel Neurotrophic Factor, Preferentially Expressed in the Substantia Nigra Pars Compacta of Rat Brain. Biochemical and Biophysical Research Communications. 22 October 2000, Vol. 277, No. 2, pages 355-360, especially Figure 1 and 2 (96.1% sequence homology with SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO: 2).	1-17, 21, 41-42, 46-47, and 63-65
X	KIRIKOSHI, H. et al. Molecular Cloning and Characterization of Human FGF-20 on Chromosome 8p21.3-p22. Biochemical and Biophysical Research Communications. 02 August 2000, Vol. 274, No. 2, pages 337-343, especially Figure 1 and 2 (100% sequence homology with SEQ ID NO: 2).	1-17, 21, 41-42, 46-47, and 63-65
X	WO 00/54813 A2 (CHIRON CORPORATION) 21 September 2000 (21.09.2000), Figure 29, 100% sequence homology to SEQ ID NO: 1 and Figure 29, 100% sequence homology to SEQ ID NO: 2.	1-17, 21, 41-42, 46-47, and 63-65
X, P	WO 02/02625 A2 (CURAGEN CORPORATION) 10 January 2002 (10.01.2002), Claim 10, Figure 1, 100% sequence homology to SEQ ID NO: 1 and Claim 1 Figure 1, 100% sequence homology to SEQ ID NO: 2.	1-17, 21, 41-42, 46-47, and 63-65
X, P	US 2002/0001825 A1 (ITOH) 03 January 2002 (03.01.2002), SEQ ID NO: 23 shares 100% sequence homology with SEQ ID NO: 2, pages 49-50.	1-17, 21, 41-42, 46-47, and 63-65
X, P	WO 01/68854 A2 (AMGEN, INC.) 20 September 2001 (20.09.2001), Claim 1, Figure 1, 99.7% sequence homology with SEQ ID NO: 1 and Claim 3, Figure 1, 100% sequence homology to SEQ ID NO: 2.	1-17, 21, 41-42, 46-47, and 63-65
X, P	WO 01/92522 A2 (ELI LILLY AND COMPANY) 06 December 2001 (06.12.2001), claim 1, page 135, 99.7% sequence homology with SEQ ID NO: 1 and claim 10 pages 136-137, 100% sequence homology with SEQ ID NO: 2.	1-17, 21, 41-42, 46-47, and 63-65
X, P	WO 02/24234 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 28 March 2002 (28.03.2002), Figure 29 100% sequence homology with SEQ ID NO: 1 and 100% sequence homology with SEQ ID NO: 2.	1-17, 21, 41-42, 46-47, and 63-65

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/19400
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-17, 21, 41-42, 46-47, and 63-65
Remark on Protest	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/19400

Continuation of Item 4 of the first sheet:

Title is too long, PCT Rule 4.3, suggested new title follows: "FIBROBLAST GROWTH FACTOR AND NUCLEIC ACID ENCODING SAME".

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group 1, claim(s) 1-17, 21, 41-42, 46-47, and 63-65 drawn to an isolated polypeptide comprising SEQ ID NO: 2 which is a fibroblast growth factor, an isolated nucleic acid comprising SEQ ID NO: 1, fragments, host cells, pharmaceutical compositions, comprising same and a method of detecting SEQ ID NO: 2.

Group 2, claim(s) 18-20, 43, 48, drawn to an antibody immunospecific for SEQ ID NO: 2 and pharmaceutical compositions comprising same.

Group 3, claim(s) 22, 44-45, drawn to a method for determining the presence or amount of a nucleic acid molecule.

Group 4, claim(s) 23-24, drawn to a method for identifying an agent that binds to an isolated polypeptide.

Group 5, claim(s) 25, drawn to a method for modulating an activity of an isolated polypeptide.

Group 6, claim(s) 26-33, drawn to a method for identifying a potential therapeutic agent for use in treatment of a pathology.

Group 7, claim(s) 34-35, drawn to a method of treating or preventing a disorder associated with an isolated polypeptide.

Group 8, claim(s) 36-40, drawn to a method of treating or preventing a disorder associated with aberrant expression, aberrant processing, or aberrant physiological interactions of a polypeptide comprising SEQ ID NO: 2.

Group 9, claim(s) 49-50, drawn to 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 comprising SEQ ID NO: 2.

Group 10, claim(s) 51, drawn to a method for determining the presence or predisposition to a disease associated with altered levels of a polypeptide comprising SEQ ID NO: 2.

Group 11, claim(s) 52, drawn to a method for determining the presence or predisposition to a disease associated with altered levels of a nucleic acid molecule comprising SEQ ID NO: 1.

Group 12, claim(s) 53, drawn to a method of treating a pathological state in a mammal comprising administering a polypeptide comprising SEQ ID NO: 2.

Group 13, claim(s) 54, drawn to a method of treating a pathological state in a mammal comprising administering an antibody immunospecific for an isolated polypeptide comprising SEQ ID NO: 2.

Group 14, claim(s) 55-57, drawn to a method of promoting growth in cells comprising administering a polypeptide comprising SEQ ID NO: 2.

Group 15, claim(s) 58-62, drawn to a method of inhibiting growth of cells in a subject comprising administering to the subject a comprising in an amount sufficient to inhibit growth of cells in said subject.

The inventions listed as Groups 1-15 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

According to PCT Rule 13.2, unity of invention exists only when the shared same or corresponding technical feature is a contribution over the prior art. The inventions listed as Groups 1-15 do not relate to a single general inventive concept because they lack the same or corresponding special technical feature. The technical feature of Group 1 is SEQ ID NO: 2, which is disclosed by the instant application as encoding a fibroblast growth factor, which is shown by BIKFALVI et al. (February 1997) "Biological Roles of Fibroblast Growth

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/19400

Factor-2." Endocrine Reviews 18(1): 26-45 to lack novelty or inventive step as BIKFALVI et al. (1997) teaches that fibroblast growth factors are a well-characterized group of molecules and does not make it a contribution over the prior art.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
WIST (USPT, PG Pubs, JPO, EPO, DERWENT); STN (CAPLUS, MEDLINE); NCBI (PubMed)
Fibroblast growth factor, FGF, FGF-CX, single nucleotide polymorphism. SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2

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 1/00	A 6 1 P 1/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 17/02	A 6 1 P 17/02	4 H 0 4 5
A 6 1 P 17/14	A 6 1 P 17/14	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
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 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 P 21/08	
C 1 2 P 21/08	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	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/36	

(31)優先権主張番号 60/385,173

(32)優先日 平成14年5月31日(2002.5.31)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,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,GQ,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,EC,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,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 リチャード・エイ・シムケッツ

アメリカ合衆国06437コネチカット州ギルフォード、インディアン・メドーズ・ドライブ5番

(72)発明者 マイケル・イー・ジェファーズ

アメリカ合衆国06405コネチカット州ブランフォード、フラックス・ミル・ホロー14番

(72)発明者 スティルダス・ケイ・プラヤガ

アメリカ合衆国63366ミズーリ州オフアロン、マクレオド・レイン7365番

(72)発明者 フェレンツ・エル・ポルドグ

アメリカ合衆国06473コネチカット州ノース・ヘイブン、ハートフォード・ターンパイク1687番

(72)発明者 メイジャ・ヤン

アメリカ合衆国06533コネチカット州イースト・ライム、キャットバード・レイン6番

(72)発明者 キャサリン・イー・パージェス

アメリカ合衆国06109コネチカット州ウェザーズフィールド、キャリッジ・ヒル・ドライブ90番

(72)発明者 エルマ・アール・フェルナンデス

アメリカ合衆国06405コネチカット州ブランフォード、フローレンス・ロード77番、2ビー

(72)発明者 ジョン・エル・ハーマン

- アメリカ合衆国06437コネチカット州ギルフォード、バーンシェド・レイン78番
 (72)発明者 ウィリアム・ジェイ・ラロシェル
 アメリカ合衆国06443コネチカット州マディソン、デボンシャー・レイン15番
 (72)発明者 ヘンリー・エス・リヒェンスタイン
 アメリカ合衆国06437コネチカット州ギルフォード、グリーンブライアー・ドライブ88番
 (72)発明者 リンダ・ゴーマン
 アメリカ合衆国06405コネチカット州ブランフォード、モンティセロ・ドライブ329番
 (72)発明者 メイ・ジョン
 アメリカ合衆国06405コネチカット州ブランフォード、アパートメント1ビー、ハリソン・ア
 ベニュー45番
 (72)発明者 ムラリダラ・パディガル
 アメリカ合衆国06405コネチカット州ブランフォード、ハンプトン・パーク71番
 (72)発明者 キャロル・イー・エイ・ピーナ
 アメリカ合衆国06511コネチカット州ニュー・ヘイブン、ナンバー2、オレンジ・ストリート
 604番
 (72)発明者 ジョン・ピー・アルソブルック・ザ・セカンド
 アメリカ合衆国06443コネチカット州マディソン、レイク・ドライブ60番
 (72)発明者 デニース・エム・レブレイ
 アメリカ合衆国06405コネチカット州ブランフォード、チャーチ・ストリート51番
 (72)発明者 ダニエル・カー・リーガー
 アメリカ合衆国06405コネチカット州ブランフォード、マッキネル・コート10エイ番
 (72)発明者 ウィリアム・エム・グロス
 アメリカ合衆国06405コネチカット州ブランフォード、アパートメント・シー、ライス・テラ
 ス・ロード15番

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 CB01 DA13 DA36 FB02 FB03
 4B024 AA01 AA11 BA03 BA41 BA61 CA01 CA04 CA09 DA01 DA02
 DA05 DA06 DA11 EA04 GA01 GA11 HA08 HA12
 4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QQ61 QQ91 QR08 QR32
 QR41 QR42 QR50 QR51 QR55 QR62 QR77 QS03 QS25 QS34
 QS36 QS39 QX01
 4B064 AG26 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
 4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y AB01 AB02 BA02 BA08 CA25 CA44
 4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA02 BA08 BA22 DB54
 4C085 AA13 AA14 BB31 CC21 DD88 EE01
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09 CA40 DA20 DA75 DA76 EA20
 FA74

專利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005500035A5	公开(公告)日	2005-10-06
申请号	JP2003506444	申请日	2002-06-17
[标]申请(专利权)人(译)	CURAGEN CORP		
申请(专利权)人(译)	Kyurajen公司		
[标]发明人	リチャードエイシムケッツ マイケルイージェファーズ スティルダスケイプラヤガ フェレンツエルボルドグ メイジャヤン キャサリンイーバージェス エルマアールフェルナンデス ジョンエルハーマン ウィリアムジェイラロシエル ヘンリーエスリヒェンスタイン リンダゴーマン メイジョン ムラリダラパディガル キャロルイーエイピーナ ジョンピーアルソブルックザセカンド デニースエムレプレイ ダニエルカーリーガー ウィリアムエムグロス		
发明人	リチャード・エイ・シムケッツ マイケル・イー・ジェファーズ スティルダス・ケイ・プラヤガ フェレンツ・エル・ボルドグ メイジャ・ヤン キャサリン・イー・バージェス エルマ・アール・フェルナンデス ジョン・エル・ハーマン ウィリアム・ジェイ・ラロシエル ヘンリー・エス・リヒェンスタイン リンダ・ゴーマン メイ・ジョン ムラリダラ・パディガル キャロル・イー・エイ・ピーナ ジョン・ピー・アルソブルック・ザ・セカンド デニース・エム・レプレイ ダニエル・カー・リーガー ウィリアム・エム・グロス		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/27 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P9/00 A61P17/02 A61P17/14 A61P35/00 C07K14/50 C07K16/22 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	A61P1/00 A61P17/02 A61P17/14 C07K14/50		

FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P1/00 A61P9/00 A61P17/02 A61P17/14 A61P35/00 C07K14/50 C07K16/22 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/36
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA03 4B024/BA41 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ61 4B063/QQ91 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR51 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/DB54 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB31 4C085/CC21 4C085/DD88 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/DA20 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74
代理人(译)	小岛 一晃
优先权	60/298441 2001-06-15 US 60/316446 2001-08-31 US 60/359594 2002-02-26 US 60/385173 2002-05-31 US
其他公开文献	JP2005500035A

摘要(译)

本发明提供了FGF-CX，一种新的分离的多肽，以及编码FGF-CX的多核苷酸和与FGF-CX或FGF-CX多肽，多核苷酸或多肽的任何衍生物，变体，突变体或片段免疫特异性结合的抗体。抗体。本发明另外提供了其中FGF-CX多肽，多核苷酸和抗体用于检测和治疗多种病理状态以及其他用途的方法。