

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離されたポリペプチドであって、以下：

a) 配列番号2によって提供されるアミノ酸配列；

b) 配列番号2によって提供されるアミノ酸配列の改変体であって、ここで、該選択された配列中の特定された任意のアミノ酸が異なるアミノ酸に変更され、ただし、該配列中の15%以下のアミノ酸残基が、そのように変更されている、改変体；

c) 配列番号2によって提供されるアミノ酸配列の成熟形態；

d) 配列番号2によって提供されるアミノ酸配列の成熟形態の改変体であって、ここで、該選択された配列の成熟形態中の任意のアミノ酸が異なるアミノ酸に変更され、ただし、該配列の成熟形態中の15%以下のアミノ酸残基が、そのように変更されている、改変体；および

e) 項(a)～(d)に記載されるアミノ酸配列のフラグメントからなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【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】 前記ポリペプチドが、配列番号2の天然に存在する対立遺伝子改変体である、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項4】 前記改変体が、単一ヌクレオチド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】 請求項1に記載のポリペプチドであって、ここで、該ポリペプチドは改変体ポリペプチドであり、そしてここで、配列番号2に特定される1つ以上の任意のアミノ酸は、保存的置換を提供するように変更される、ポリペプチド。

【請求項6】 単離された核酸分子であって、以下：

a) 配列番号2を含むポリペプチド；

b) 配列番号2の改変体であって、ここで、該選択された配列中の特定された任意のアミノ酸が異なるアミノ酸に変更され、ただし、該配列中の15%以下のアミノ酸残基が、そのように変更されている、改変体；

c) 配列番号2によって提供されるアミノ酸配列の成熟形態；

d) 配列番号2によって提供されるアミノ酸配列の成熟形態の改変体であって、ここで、該選択された配列の成熟形態中の任意のアミノ酸が異なるアミノ酸に変更され、ただし、該配列の成熟形態中の15%以下のアミノ酸残基が、そのように変更されている、改変体；

e) (a) ~ (d) に記載されるアミノ酸配列のフラグメント；および

f) 項(a) ~ (e) に記載される核酸分子のいずれか1つの相補鎖からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む、
単離された核酸分子。

【請求項7】 請求項6に記載の核酸分子であって、ここで、該核酸分子は、天然に存在する対立遺伝子核酸改変体のヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項8】 請求項6に記載の核酸分子であって、ここで、該核酸分子は、天然に存在するポリペプチド改変体のポリペプチド配列を有する改変体ポリペプチドをコードする、核酸分子。

【請求項9】 請求項6に記載の核酸分子であって、ここで、該核酸分子は、前記改変体ポリペプチドをコードする単一ヌクレオチド多型を含む、核酸分子。

【請求項10】 請求項6に記載の核酸分子であって、ここで、該核酸分子は、以下：

a) 配列番号1によって提供されるヌクレオチド配列；

b) ヌクレオチド配列であって、配列番号1によって提供されるヌクレオチド配列中の1つ以上のヌクレオチドが、該選択された配列によって提供されるヌクレオチドから異なるヌクレオチドに変更され、ただし20%以下の該ヌクレオチドが、そのように変更されている、ヌクレオチド配列；

c) (a) に記載される配列の核酸フラグメント；

d) (b) に記載される配列の核酸フラグメント；および

e) 該核酸分子のいずれか1つの相補鎖からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、

核酸分子。

【請求項11】 請求項6に記載の核酸分子であって、ここで、該核酸分子は、前記選択されたヌクレオチド配列のコード配列中に特定される任意のヌクレオチドが、該選択された配列によって提供されるヌクレオチドから異なるヌクレオチドに変更され、ただし、該選択されたコード配列中の20%以下のヌクレオチドが、そのように変更されるヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項12】 FGF-CXポリペプチドのフラグメントをコードする、単離された核酸分子。

【請求項13】 前記FGF-CXポリペプチドが、配列番号2の改変体である、請求項12に記載の核酸分子。

【請求項14】 前記FGF-CXポリペプチドが、成熟FGF-CXポリペプチドである、請求項12に記載の核酸分子。

【請求項15】 前記FGF-CXポリペプチドが、配列番号2の成熟形態の改変体である、請求項12に記載の核酸分子。

【請求項16】 請求項6に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項17】 請求項16に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項18】 請求項1に記載のポリペプチドに免疫特異的に結合する、抗体。

【請求項19】 前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項18に記載の抗体。

【請求項20】 前記抗体が、ヒト化抗体またはヒト抗体である、請求項18に記載の抗体。

【請求項21】 サンプル中の請求項1に記載のポリペプチドの存在または量を決定するための方法であって、該方法は、以下：

(a) 該サンプルを提供する工程；

(b) 該サンプルを、該ポリペプチドに免疫特異的に結合する抗体と接触させる工程；および

(c) 該ポリペプチドに結合した抗体の存在または量を決定し、それによって、該サンプル中の該ポリペプチドの存在または量を決定する工程、

を包含する、
方法。

【請求項22】 サンプル中の請求項6に記載の核酸分子の存在または量を決定するための方法であって、該方法は、以下：

- (a) 該サンプルを提供する工程；
- (b) 該サンプルを、該核酸分子に結合するプローブと接触させる工程；および
- (c) 該核酸分子に結合するプローブの存在または量を決定し、それによって、該サンプル中の該核酸分子の存在または量を決定する工程、を包含する、
方法。

【請求項23】 請求項1に記載のポリペプチドに結合する因子を同定するための方法であって、該方法は、以下：

- (a) 該ポリペプチドを候補物質と接触させる工程；および
 - (b) 該候補物質が該ポリペプチドに結合するか否かを決定する工程；
- を包含し、
ここで、結合する候補物質が該因子である、
方法。

【請求項24】 前記候補物質が、約1500Da以下の分子量を有する、請求項23に記載の方法。

【請求項25】 請求項1に記載のポリペプチドの活性を調節するための方法であって、該方法は、該ポリペプチドを、該ポリペプチドの活性を調節するのに十分な量で該ポリペプチドに結合する化合物と接触させる工程を包含する、方法。

【請求項26】 病態の処置に使用するための有効な治療剤を同定するための方法であって、ここで、該病態は、請求項1に記載のポリペプチドの異常な発現、異常なプロセッシングまたは異常な生理学的相互作用と関連し、該方法は、以下：

- (a) 該ポリペプチドを発現し、かつ該ポリペプチドに起因する特性または機

能を有する細胞を提供する工程；

(b) 工程(a)で提供された該細胞を、試験薬剤と接触させる工程；および

(c) 該試験薬剤が、該ポリペプチドに起因する特性または機能を変更するか否かを決定する工程；

を包含し、

これによって、該試験薬剤の存在下で観察される該ポリペプチドの特性または機能の変更が、該試験薬剤は有効な治療剤であることを示す、

方法。

【請求項27】 請求項26に記載の方法であって、前記有効な治療剤をさらなる試験に供し、該治療剤を同定する工程をさらに包含する、方法。

【請求項28】 請求項26に記載の方法であって、前記候補物質が、抗体であるか、または約1500Da以下の分子量を有する、方法。

【請求項29】 前記特性または機能が、細胞成長または細胞増殖を含む、請求項26に記載の方法。

【請求項30】 前記試験薬剤が、前記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に記載の方法に従って同定された、治療剤。

【請求項32】 請求項27に記載の方法を用いて同定された、治療剤。

【請求項33】 前記薬剤が、抗体であるか、または約1500Da以下の分子量を有する、請求項31に記載の治療剤。

【請求項34】 請求項1に記載のポリペプチドと関連する障害の処置または予防の方法であって、ここで、該障害が、細胞または組織の不十分な増殖または無効な増殖によって特徴付けられ、該方法は、被験体に、該被験体における該ポリペプチド関連障害を処置または予防するのに十分な量および期間で請求項1に記載のポリペプチドを投与する工程を包含し、ここで、該被験体は、該障害の傾向があるかまたは該障害を患っていると考えられている、処置または予防の方法。

【請求項35】 前記被験体がヒトである、請求項34に記載の方法。

【請求項36】 請求項1に記載のタンパク質の異常な発現、異常なプロセ

シング、または異常な生理学的相互作用と関連する障害の処置または予防の方法であって、ここで、該障害が、細胞または組織の不十分な増殖または無効な増殖によって特徴付けられ、該方法は、被験体に、該被験体における該障害を処置または予防するのに十分な量および期間で請求項6に記載の核酸を投与する工程を包含し、ここで、該被験体は、該障害の傾向があるかまたは該障害を患っていると考えられている、処置または予防の方法。

【請求項37】 前記被験体がヒトである、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な発現、異常なプロセシング、または異常な生理学的相互作用と関連する障害の処置または予防の方法であって、ここで、該障害が、細胞または組織の過形成または新形成によって特徴付けられ、該方法は、被験体に、該被験体における該障害を処置または予防するのに十分な量でTherapeuticを投与する工程を包含し、ここで、該被験体は、該障害の傾向があるかまたは該障害を患っていると考えられている、処置または予防の方法。

【請求項39】 前記Therapeuticが請求項18に記載の抗体である、請求項38に記載の方法。

【請求項40】 前記被験体がヒトである、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薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項42】 請求項6に記載の核酸分子および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項43】 請求項18に記載の抗体および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項44】 請求項31に記載の治療剤および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項45】 前記治療剤が、約1500Da以下の分子量を有する、請求項44に記載の薬学的組成物。

【請求項46】 1つ以上の容器中に請求項41に記載の薬学的組成物を含む、キット。

【請求項47】 1つ以上の容器中に請求項42に記載の薬学的組成物を含む、キット。

【請求項48】 1つ以上の容器中に請求項43に記載の薬学的組成物を含む、キット。

【請求項49】 請求項1に記載のポリペプチドの異常な発現、異常なプロセシング、または異常な生理学的相互作用と関連する障害に対する潜伏期または素因のモジュレーターについてのスクリーニング方法であって、該方法は、以下：

a) 該障害に対して高い危険性を有する試験動物を提供する工程であって、ここで、該試験動物は、請求項1に記載のポリペプチドを組換え発現する、工程；

b) 試験化合物を該試験動物に投与する工程；

c) 工程(a)の該化合物の投与後に該試験動物における該ポリペプチドの活性を測定する工程；および

d) 該試験動物における該タンパク質の活性を、該化合物が投与されていないコントロール動物における該ポリペプチドの活性と比較する工程；

を包含し、

ここで、該コントロール動物と比較した該試験動物における該ポリペプチドの活性の変化が、該試験化合物は該障害の潜伏期または素因のモジュレーターであることを示す、

方法。

【請求項50】 請求項49に記載の方法であって、ここで、前記試験動物は、試験タンパク質導入遺伝子を発現するか、または野生型の試験動物と比較して増加したレベルでプロモーターの制御下において該導入遺伝子を発現する組換え試験動物であり、そしてここで、該プロモーターは、該導入遺伝子のネイティブな遺伝子プロモーターではない、方法。

【請求項51】 第1の哺乳動物被験体において変更されたレベルの請求項1に記載のポリペプチドと関連する疾患の存在または素因を決定するための方法であって、該方法は、以下：

a) 該第1の哺乳動物被験体由来のサンプル中の該ポリペプチドの発現レベル

を測定する工程；および

b) 工程 (a) のサンプル中の該ポリペプチドの量を、該疾患を有していないかまたは該疾患を受けにくいことが既知の第 2 の哺乳動物被験体由来のコントロールサンプルに存在する該ポリペプチドの量と比較する工程、
を包含し、
ここで、該コントロールサンプルと比較した場合の該第 1 の被験体中の該ポリペプチドの発現レベルの変化が、該疾患の存在または素因を示す、
方法。

【請求項 5 2】 第 1 の哺乳動物被験体において変更されたレベルの請求項 6 に記載の核酸分子と関連する疾患の存在または素因を決定するための方法であって、該方法は、以下：

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

b) 工程 (a) のサンプル中の該核酸の量を、該疾患を有していないかまたは該疾患を受けにくいことが既知の第 2 の哺乳動物被験体由来のコントロールサンプルに存在する該核酸の量と比較する工程；
を包含し、
ここで、該コントロールサンプルと比較した場合の該第 1 の被験体中の該核酸のレベルの変化が、該疾患の存在または素因を示す、
方法。

【請求項 5 3】 哺乳動物における病態の処置方法であって、ここで、該病態は、請求項 1 に記載のポリペプチドの異常な発現、異常なプロセッシング、または異常な生理学的相互作用と関連し、該方法は、該哺乳動物に、該病態を緩和するのに十分な量でポリペプチドを投与する工程を包含し、ここで、該ポリペプチドは、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 % 同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドであるか、またはその生物学的に活性なフラグメントである、方法。

【請求項 5 4】 哺乳動物における病態の処置方法であって、ここで、該病態は、FGF - CXポリペプチドの異常な発現、異常なプロセッシング、または異

常な生理学的相互作用に関連し、該方法は、該哺乳動物に、該病態を緩和するのに十分な量および期間で請求項18に記載の抗体を投与する工程を包含する、方法。

【請求項55】 被験体において細胞増殖を促進する方法であって、該方法は、細胞増殖の促進の必要がある被験体に、細胞増殖を促進するに有効な量および期間で請求項1に記載のポリペプチドを投与する工程を包含する、方法。

【請求項56】 前記被験体がヒトである、請求項55に記載の方法。

【請求項57】 請求項55に記載の方法であって、増殖が促進される前記細胞が、創傷の近傍の細胞、脈管系の細胞、造血に関与する細胞、赤血球生成に関与する細胞、胃腸管の管壁細胞、および毛包の細胞からなる群より選択される、方法。

【請求項58】 被験体において細胞増殖を阻害する方法であって、ここで、該増殖は請求項1に記載のポリペプチドの発現に関連し、該方法は、該被験体に、該被験体における細胞増殖を阻害するのに十分な量で組成物を投与する工程を包含する、方法。

【請求項59】 前記組成物が、FGF-CXポリペプチドの切断を阻害する、請求項58に記載の方法。

【請求項60】 前記組成物が、抗FGF-CX抗体またはFGF-CX治療剤を含む、請求項58に記載の方法。

【請求項61】 前記被験体がヒトである、請求項58に記載の方法。

【請求項62】 請求項58に記載の方法であって、ここで、増殖が阻害される前記細胞が、トランスフォーメーション細胞、過形成細胞、腫瘍細胞および新形成細胞からなる群より選択される、方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

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

【0002】**(発明の背景)**

サイトカインの線維芽細胞増殖因子(FGF)のグループは、種々の細胞機能(例えば、増殖、生存、アポトーシス、運動性および分化)を調整する少なくとも21のメンバーを含む。これらの分子は、細胞表面チロシンキナーゼFGFレセプター(FGFR)との高親和性相互作用を介してシグナルを変換する。これらのFGFレセプターは、組織培養において大部分の型の細胞上に発現される。リガンド結合の際のFGFレセプターモノマーの二量体化は、レセプターのリン酸基転移反応をもたらす、キナーゼドメインの活性化の要件であると報告されている。FGFレセプター1(FGFR-1)(4つのFGFレセプターの最も広い発現パターンを示す)は、少なくとも7つのチロシンリン酸化部位を含む。多くのシグナル変換分子は、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影響される。

【0003】

通常の増殖および発生に関与するのに加えて、FGFはまた、病理学的状態(癌を含む)の発生に関与してきたことが公知である。FGFは、腫瘍細胞の増殖を直接的に増強することにより、悪性度に寄与し得る。例えば、同じ細胞におけるFGFおよびFGFRの同時発現によるオートクライン増殖刺激は、細胞トランスフォーメーションをもたらすと報告されている。

【0004】**(発明の要旨)**

本発明は、線維芽細胞増殖因子(FGF)ファミリーのタンパク質のメンバーとの相同性を有する新規なポリペプチドをコードする核酸の発見の一部に基づく

。線維芽細胞増殖因子 - C X (F G F - C X) と称されるポリヌクレオチド配列が本発明に含まれ、そしてこれらの核酸配列にコードされる F G F - C X ポリペプチド、ならびにそのフラグメント、ホモログ、アナログ、および誘導体が本発明の特許請求の範囲に含まれる。F G F - C X 核酸の例は、配列番号 1 であり、そして F G F - C X ポリペプチドの例は、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。このアミノ酸配列は、配列番号 1 の核酸配列にコードされる。

【0005】

1つの局面において、本発明は、単離された F G F - C X ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、単離されたポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸配列を含む。他の実施形態において、本発明は、配列番号 2 の改変体を含み、この改変体において、配列番号 2 のアミノ酸配列のいくつかのアミノ酸残基（例えば、1%、2%、3%、5%、10%または15%以下）が変化している。いくつかの実施形態において、単離された F G F - C X ポリペプチドは、配列番号 2 によって与えられるアミノ酸配列の成熟形態、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形態の改変体のアミノ酸配列を含む。好ましくは、配列番号 2 のアミノ酸配列の 1%、2%、3%、5%、10%または15%以下が、アミノ酸配列の成熟形態の改変体において変化する。

【0006】

F G F - C X ポリペプチドのフラグメントもまた本発明に含まれ、これらとしては、改変体 F G F - C X ポリペプチド、成熟 F G F - C X ポリペプチドおよび成熟 F G F - C X ポリペプチドの改変体、ならびに F G F - C X 核酸の対立遺伝子改変体および一塩基多型によりコードされる F G F - C X ポリペプチドが挙げられる。

【0007】

別の局面において、本発明は、単離された F G F - C X 核酸分子を含む。F G F - C X 核酸分子は、上記で議論される F G F - C X のポリペプチド、改変体もしくはフラグメントのいずれかをコードする配列、またはこのような核酸配列に対する相補体を含み得る。1つの実施形態において、これらの配列は、配列番号 1 に開示される配列を含む。他の実施形態において、F G F - C X 核酸は、配列

番号1で与えられるヌクレオチドと異なるヌクレオチドが組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%以下がこのように変化する。他の実施形態において、本発明は、これらの核酸配列のフラグメントまたは相補体を含む。FGF-CX核酸を組込むベクターおよび細胞もまた本発明に含まれる。

【0008】

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

【0009】

本発明はさらに、本発明のFGF-CXポリペプチド、FGF-CX核酸またはFGF-CX抗体を含む薬学的組成物を提供する。例えば、FGF-CXポリペプチド、FGF-CX核酸またはFGF-CX抗体を含むキットもまた本発明に含まれる。

【0010】

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

【0011】

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

【0012】

F G F - C X ポリペプチドに結合する因子を同定するための方法もまた、本発明により提供される。この方法は、候補物質が F G F - C X ポリペプチドに結合するか否かを決定する工程を包含する。候補化合物の結合は、この因子が F G F - C X ポリペプチド結合因子であることを示す。

【0013】

本発明はまた、病態の処置における使用のための有効な治療剤を同定するための方法を含む。この病態は、例えば、本発明の F G F - C X ポリペプチドの異常な発現、異常なプロセッシング、または異常な生理学的相互作用に関連する。この方法は、F G F - C X ポリペプチドを発現し、かつこのポリペプチドに起因する特性または機能を有する細胞を提供する工程；この提供された細胞を、候補物質を含む組成物と接触させる工程；およびこの物質がコントロール細胞と比較してこのポリペプチドに起因する特性または機能を変更するか否かを、決定する工程、を包含する。任意のこのような物質は、有効な治療剤として同定される。さらに、治療剤は、この様式で同定された任意の有効な治療剤を、病態の処置における使用のための治療剤を同定するためにさらなる試験に供することにより、同定され得る。

【0014】

いくつかの実施形態において、特性または機能は、細胞成長または細胞増殖に関連し、そして物質は、ポリペプチドに結合し、それによりポリペプチドの活性を調節する。いくつかの実施形態において、候補物質は、約 1500 Da 以下の分子量を有する。いくつかの実施形態において、候補物質は、抗体である。本発明はさらに、例えば本明細書中上記の方法を使用して同定される任意の治療剤を提供する。

【0015】

本発明のさらなる重要な局面は、F G F - C X ポリペプチドに関連する障害を処置または予防する方法に関する。障害は、細胞もしくは組織の不十分または非効果的な増殖、または細胞もしくは組織の過形成もしくは新形成により、特徴付けられ得る。この方法は、被験体に、本発明の F G F - C X ポリペプチド、もしくは本発明の F G F - C X 核酸、または本発明の他の任意の治療剤 (T h e r a

peutic)を、前述の被検体における障害を処置または予防するのに十分な量および期間で投与する工程を包含する。重要な実施形態において、この被験体は、ヒトである。

【0016】

本発明はまた、FGF-CXポリペプチドの異常な発現、異常なプロセッシング、または異常な生理学的相互作用に関連する障害への潜伏または素因の調節因子についてスクリーニングするための方法を含む。この方法は、本発明のFGF-CXポリペプチドを組換え的に発現し、かつ障害に対する高い危険性を有する試験動物を提供する工程；試験化合物をこの試験動物に投与する工程；この化合物の投与後に、この試験動物におけるこのポリペプチドの活性を測定する工程；およびこの試験動物におけるFGF-CXポリペプチドの活性を、この化合物を投与されていないコントロール動物におけるFGF-CXポリペプチドの活性と比較する工程を包含する。コントロール動物に比べて試験動物においてポリペプチドの活性の変化が存在する場合、この試験化合物は、障害への潜伏または素因の調節因子である。

【0017】

本発明はまた、第1の哺乳動物被験体における、本発明のFGF-CXポリペプチドまたはFGF-CX核酸の変更したレベルに関連する疾患の存在または素因を決定するための方法を提供する。この方法は、第1の哺乳動物被験体由来のサンプル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工程；およびそのサンプル中の量を、疾患を有していないことまたは素因がないことが既知である第2の哺乳動物被験体由来のコントロールサンプル中に存在する量と比較する工程を包含する。コントロールサンプルと比較した場合の第1の被験体におけるポリペプチドの発現レベルまたは核酸の量における変化は、疾患の存在または素因を示す。

【0018】

哺乳動物における病理学的状態を処置する方法もまた本発明によって提供され、この方法において、この病態は、本発明のFGF-CXポリペプチドの異常な発現、異常なプロセッシング、または異常な生理学的相互作用に関連する。この方

法は、哺乳動物に、本発明のポリペプチドを、病理学的状態を軽減するのに十分な量で投与する工程を包含し、ここでFGF-CX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85%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくはさらに99%も同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチド、またはその生物学的に活性なフラグメントである。別の関連方法において、本発明の抗体は、哺乳動物に投与される。

【0019】

本発明の別の局面において、本発明は、被験体における細胞増殖を促進する方法を含む。この方法は、被験体に、本発明のFGF-CXポリペプチドを、細胞増殖を促進するのに有効な量および期間で投与する工程を包含する。いくつかの実施形態において、被験体はヒトであり、そして増殖が促進される細胞は、創傷の近傍の細胞、脈管系の細胞、造血に關与する細胞、赤血球形成に關与する細胞、胃腸管の管壁細胞、および毛包細胞の中から選択され得る。

【0020】

さらなる局面において、本発明は、被験体において細胞増殖を阻害する方法を提供し、ここでこの増殖は、本発明のFGF-CXポリペプチドの発現に關連する。この方法は、被験体に、細胞増殖を阻害する組成物を投与する工程を包含する。非常に重要な実施形態において、この組成物は、本発明の抗体または別の治療剤を含む。重要なことに、被験体はヒトであり、そして増殖が阻害される細胞は、トランスフォーメーションされた細胞、過形成の細胞、腫瘍細胞、および新形成細胞の中から選択される。

【0021】

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

【0022】

FGF-CX核酸分子、ポリペプチドまたは抗体を使用して、診断、処置、予

防または遅延される組織増殖関連障害は、上皮細胞（例えば、手術後の前眼における線維芽細胞およびケラチノサイト）を含み得る。他の組織増殖関連障害としては、例えば、腫瘍、再狭窄、乾癬、デュプイットラン拘縮、糖尿病合併症、カポジ肉種、および慢性関節リウマチが挙げられる。

【0023】

他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書中に記載される方法および材料と同様または等価な方法および材料が、本発明の実施または試験において使用され得るが、適切な方法および材料は、以下に記載される。本明細書中で言及される全ての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、その全体が参考として援用される。矛盾する場合には、定義を含む本明細書が支配する。さらに、材料、方法、および実施例は、例示のみであり、限定を意図しない。

【0024】

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

【0025】

（発明の詳細な説明）

本発明は、線維芽細胞増殖因子（FGF）ファミリーのメンバーであるポリペプチドをコードする、新規なFGF-CX核酸配列の発見の一部は基く。本明細書において使用する場合、表示「FGF-CX」とは、核酸、ポリヌクレオチド、タンパク質、ポリペプチド、ならびにそれらのいずれかの改変体、誘導体およびフラグメント、ならびにこれらのクラスの化合物のいずれかに免疫特異的に結合する抗体に関する。

【0026】

FGFファミリーの以前に記載されたメンバーは、多様な細胞機能（例えば、増殖、生存、アポトーシス、運動性および分化）を調節する。例えば、Szabenyi & Fallon 1999 Int. Rev. Cytol. 185: 45 ~ 106を参照のこと。これらの分子は、細胞表面チロシンキナーゼFGFレ

セプター (FGFR) (その4つが今日までに同定されている) との高親和性相互作用を介してシグナルを細胞内に伝達する。例えば、Xuら、1999 *Cell Tissue Res.* 296, 33~43; Klint & Claesson-Welsh 1999 *Front. Biosci.* 4:165~177を参照のこと。これらのFGFレセプターは、組織培養中のほとんどの型の細胞で発現される。リガンド結合の際のFGFレセプターモノマーの二量体化は、レセプタートランスリン酸化を導く、キナーゼドメインの活性化のための要件であることが報告されている。FGFレセプター-1 (FGFR-1) (4つのFGFレセプターの最も広範な発現パターンを示す) は、少なくとも7つのチロシンリン酸化部位を含む。多数のシグナル伝達分子は、これらのリン酸化部位への異なる親和性での結合により影響される。

【0027】

FGFはまた、ほとんどの細胞表面および細胞外マトリクス (ECM) に存在する硫酸ヘパリンプロテオグリカン (HSPG) に、低い親和性にもかかわらず、結合する。FGFとHSPGとの間の相互作用は、FGF/FGFR相互作用を安定化させ、FGFを隔離し、そしてFGFを分解から保護するように働く。例えば、Szabenyiら、1999 (上記) を参照のこと。FGFの増殖促進能に起因して、FGFファミリーの1つのメンバーである、FGF-7は、現在、化学療法誘導性粘膜炎の処置の臨床試験中である。例えば、Danilenko 1999 *Toxicol. Pathol.* 27:64~71を参照のこと。

【0028】

正常な増殖および発生への関与に加えて、公知のFGFはまた、癌を含む病理学的状態の生成に関与していた。例えば、BasilicoおよびMoscatelli 1992 *Adv. Cancer Res.* 59:115~165を参照のこと。FGFは、腫瘍細胞の増殖を直接増強することにより悪性腫瘍に寄与し得る。例えば、同じ細胞におけるFGFおよびFGFRの同時発現を通じた自己分泌増殖刺激は、細胞のトランスホメーションを導く。例えば、Matsumoto-Yoshitomiら、1997 *Int. J. Cancer* 7

1 : 4 4 2 ~ 4 5 0 を参照のこと。同様に、変異または再整列を介した F G F R の構成的な活性化は、制御されていない増殖をもたらす。例えば、L o r e n z i ら、1 9 9 6 P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A . 9 3 : 8 9 5 6 ~ 8 9 6 1 ; L i ら、1 9 9 7 O n c o g e n e 1 4 : 1 3 9 7 ~ 1 4 0 6 を参照のこと。さらに、いくつかの F G F は、脈管形成性である。例えば、G e r w i n s ら、2 0 0 0 C r i t . R e v . O n c o l . H e m a t o l . 3 4 : 1 8 5 ~ 1 9 4 を参照のこと。このような F G F は、腫瘍増殖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、腫瘍形成プロセスに寄与し得る。驚くことではないが、少なくとも1つの F G F が、現在、癌治療のための可能性のある標的として検討中である。例えば、G a s p a r i n i 1 9 9 9 D r u g s 5 8 : 1 7 ~ 3 8 を参照のこと。

【0029】

周産期および成体マウスの脳における F G F およびこれらのレセプターの発現を試験した。F G F - 4 以外の全ての F G F 遺伝子のメッセンジャーRNAをこれらの組織において検出する。F G F - 3、F G F - 6、F G F - 7 および F G F - 8 の遺伝子は、出生後段階よりも後期胚性段階で、より高い発現を示し、このことは、これらのメンバーが、脳発生の後期段階に関与することを示唆する。対照的に、F G F - 1 および F G F - 5 の発現は、出生後増大した。詳細には、周産期マウスにおける F G F - 6 発現は、中枢神経系および骨格筋に制限されていることが報告されている。この制限は、胚の発生中の大脳において、ただし5日齢の新生児では小脳において強度のシグナルを有した。F G F - レセプター (F G F R) - 4 (F G F - 6 の同系レセプター) は、類似の空間時間的発現を示し、このことは、F G F - 6 および F G F R - 4 が、リガンド - レセプター系として、神経系の成熟に重要な役割を果たすことを示唆する。O z a w a らによれば、これらの結果は、種々の F G F およびそのレセプターが、脳の種々の発生過程 (例えば、神経前駆細胞の増殖および移動、神経およびグリアの分化、神経突起伸長およびシナプス形成) の調節に関与することを強く示唆する

グリア活性化因子 (G A F) (別の F G F ファミリーメンバー) は、ヒト神経膠腫細胞株の培養上清から精製したヘパリン結合増殖因子である。M i y a m o

toら、1993, Mol. Cell Biol 13(7):4251~4259を参照のこと。GAFは、他の公知の増殖因子の活性スペクトルとはわずかに異なる活性スペクトルを示し、そしてFGF-9と命名されている。ヒトFGF-9 cDNAは、208アミノ酸のポリペプチドをコードする。FGFファミリーの他のメンバーに対する配列類似性は、約30%と見積もられた。他のファミリーメンバーで見出された2つのシステイン残基および他のコンセンサス配列はまた、FGF-9配列で十分保存されている。FGF-9は、酸性FGFおよび塩基性FGFにおける配列と同様、そのN末端に代表的なシグナル配列を有さないことが見出された。

【0030】

酸性FGFおよび塩基性FGFは、従来の様式で細胞から分泌されないことが公知である。しかし、FGF-9は、代表的なシグナル配列を欠失しているにもかかわらず、cDNAでトランスフェクトされたCOS細胞から効率的に分泌されることが見出された。FGF-9は、細胞の培養培地において排他的に検出され得る。この分泌タンパク質は、開始メチオニン以外は、cDNA配列により推定されるタンパク質のN末端でアミノ酸残基を欠失しなかった。ラットFGF-9 cDNAをまたクローニングし、そしてこの構造分析により、FGF-9遺伝子が高度に保存されていることを示した。

【0031】

本発明は、新規なヒトFGFおよびその対応するcDNAを提供する。この遺伝子のタンパク質産物は、増殖刺激特性および腫瘍形成特性を示すことが示されている。さらに、そのFGF mRNAの過剰発現は、ある特定の癌細胞株において注目された。これらの観察は、新規なFGFが、ヒト悪性腫瘍の処置における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唆する。

【0032】

本発明はまた、成熟FGF-CXポリペプチド、成熟FGF-CXポリペプチドの改変体、成熟FGF-CXポリペプチドのフラグメントおよび成熟改変FGF-CXポリペプチドのフラグメント、ならびにこれらのポリペプチドおよびフラグメントをコードする核酸を包含する。本明細書において用いる場合、本発明

に開示される F G F - C X ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態は、天然に存在するポリペプチドまたは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、前駆体またはタンパク質としては、非限定的な例として、対応する遺伝子によりコードされる全長遺伝子産物が挙げられる。いくつかの実施形態において、成熟型は、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される、F G F - C X ポリペプチド、前駆体、またはプロタンパク質を含む。「成熟」型産物は、例えば、1つ以上の天然に存在するプロセシング工程の結果として生じ得る。なぜなら、その産物は、遺伝子産物が生じる、細胞、すなわち宿主細胞内で生じ得るからである。

【0033】

ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態を導くこのようなプロセシングの例としては、オープンリーディングフレームの開始コドンによりコードされる N 末端メチオニン残基の切断、またはシグナルペプチドもしくはリーダー配列のタンパク質分解性切断が挙げられる。従って、F G F - C X 前駆体ポリペプチドまたはタンパク質（1 ~ N の残基を有し、ここで残基 1 は、N 末端メチオニンである）から生じる成熟形態は、N 末端メチオニンの除去後に残る、残基 2 ~ N を有する。あるいは、残基 1 ~ N 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形態（ここで、残基 1 ~ 残基 M の N 末端シグナル配列は切断されている）は、残りの残基 M + 1 ~ 残基 N の残基を有する。さらに、「成熟」タンパク質またはフラグメントは、開始メチオニンの除去またはシグナルペプチドの除去以外の切断事象から生じ得る。さらに、本明細書において用いる場合、F G F - C X ポリペプチドまたはタンパク質の「成熟」形態は、タンパク質分解性切断事象以外の翻訳後修飾の工程から生じ得る。このようなさらなるプロセシングとしては、非限定的な例として、グリコシル化、ミリストイル化、またはリン酸化が挙げられる。該して、成熟ポリペプチドまたはタンパク質は、これらのプロセシングの1つのみ、またはこれらの処理のいずれかの組合せの操作から生じ得る。

【0034】

本明細書において用いる場合、「同一の」残基は、2つの配列の間の比較にお

いて、2つの配列の整列における等価なヌクレオチド塩基またはアミノ酸残基が、同じ残基である、残基に対応する。あるいは、整列中の2つの配列の間の比較により、比較中の等しい位置の残基が、同じアミノ酸または以下に規定する保存アミノ酸のいずれかであることが示される場合、残基は、「類似」または「ポジティブ」であると記載される。

【0035】

F G F - C X 核酸、F G F - C X ポリペプチドまたはその一部をコードする単離された核酸、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、および薬学的組成物が、本発明内に含まれる。また、F G F - C X ポリペプチドを作製する方法、ならびにこれらの化合物を用いて状態をスクリーニング、診断、処置する方法、そして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1は、本発明を通じて用いられる配列記述子を記載する。

【0036】

【表1】

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正方向プライマー
4	FGF-CX逆方向プライマー
5	グリア活性化因子 (GAF)
6	ヒトゲノムフラグメント (15927~16214 bp)
7	ヒトゲノムフラグメント (7257~7511 bp)
8	ヒトゲノムフラグメント (9837~9942 bp)
9	ヒトFGF-9
10	マウスFGF-9
11	ラットFGF-9
12	Xenopus FGF-CX
13	ヒトFGF-CX疎水性ドメイン (アミノ酸90~115)
14	PSec-V5-His正方向
15	PSec-V5-His逆方向
16	PSETAリンカー
17	PSETAリンカー
18	TaqMan発現分析正方向プライマー
19	TaqMan発現分析逆方向プライマー
20	TaqMan発現分析プローブ

本明細書中にて議論されるFGF-CX核酸およびFGF-CXポリペプチド、ならびにFGF-CX抗体、治療薬剤および薬学的組成物は、とりわけ、組織増殖関連障害を処置する際に有用である。これらの組織増殖関連障害としては、手術後に眼前部 (anterior eye) において上皮細胞 (例えば、線維芽細胞およびケラチノサイト) を冒す障害が挙げられ得る。他の組織増殖関連障

害としては、例えば、腫瘍、再狭窄、乾癬、デュプイットラン拘縮、糖尿病合併症、カポジ肉腫、および慢性関節リウマチが挙げられる。

【0037】

本発明に含まれるのは、新規な線維芽細胞増殖因子（線維芽細胞増殖因子20X（FGF-CX）と称する）をコードするヌクレオチド配列（配列番号1）である（図1；配列番号1を参照のこと）。このコード配列は、ヒトゲノムDNA配列にて同定された。開示されたDNA配列は、211アミノ酸残基（配列番号2）を有すると推測されるポリペプチドをコードする633塩基を有する。FGF-CXの推定分子量は、図1および配列番号2に示される配列に基づくと、23498.4Daである。

【0038】

FGF-CX核酸配列が、関連する核酸配列を同定するためのBLASTN検索における照会ヌクレオチド配列として使用された。このFGF-CXヌクレオチド配列は、マウス線維芽細胞増殖因子9（FGF9）と高い類似性（543塩基中392塩基が同一（すなわち、72%）；GenBank登録番号S82023）を有し、そしてグリア細胞活性化因子（GAP）をコードするヒトDNAと高い類似性（554塩基中385塩基同一（すなわち、69%）；GenBank登録番号E05822；FGF-9とも称する）を有する。さらに、FGF-CXは、Naruoらによって日本国特許JP 1993301893に開示されるGAF配列（配列番号5）に対してかなりの程度の同一性（424塩基中311塩基が同一（すなわち、73%））を有することが見出された。

【0039】

FGF-CXの相補鎖もまた、染色体のセグメント8p21.3-8p22に位置する100キロ塩基対（kbp）のクローン化ゲノムDNAフラグメント（GenBank登録番号AB020858）に対して類似性の領域を有する。図3Aに示されるように、配列番号1のリバーシ鎖の塩基1~289は、このGenBankゲノムフラグメントの塩基15927~16214（配列番号6）と同一およびポジティブの両方である288bpを289bp中に有する（99%）。図3Bに示されるように、配列番号1のリバーシ鎖の塩基380~633は

、このGenBankゲノムフラグメントの塩基7257~7511(配列番号7)と同一およびポジティブの両方である250bpを255bp中に有する(98%)。図3Cに示されるように、配列番号1のリバース鎖の塩基286~291は、このGenBankゲノムフラグメントの塩基9837~9942(配列番号8)と同一およびポジティブの両方である106bpを106bp中に有する(100%)。BLASTNスコアは、図3A、図3Bおよび図3Cについて、それぞれ、1430(214.6ビット)、1224(183.6ビット)および530(79.5ビット)であった。3つすべてのBLASTN比較についての期待値および合計P(3)値は、 $1.6e^{-126}$ であった。

【0040】

ゲノム探査(genomic mining)により同定されたオープンリーディングフレーム(ORF)を確認するために、PCR増幅を使用して、推定ゲノムクローンに対応するcDNAを得た。得られた生成物のヌクレオチド配列は、推定遺伝子のヌクレオチド配列と正確に一致する(実施例1を参照のこと)。

【0041】

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

【0042】

ヒトFGF-9(配列番号9)との、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アラインメントが、図6に示される。FGF-9は、グリア細胞活性化因子前駆体(GAF)(線維芽細胞増殖因子9)についてSWISSPROT登録番号P31371として開示されている。例えば、Miyamotoら、1993、Mol.Cell.Biol.13:4251~4259;Naruoら、1993、J.Biol.Chem.2

68 : 2857 ~ 2864を参照のこと。マウスFGF - 9配列(配列番号10)およびラットFGF - 9配列(配列番号11)との、推定FGF - CXポリペプチド(配列番号2(配列番号1の翻訳形態))の最初の208アミノ酸のBLASTXアラインメントが、それぞれ、図7および図8に示される。グリア細胞活性化因子前駆体(GAF)(線維芽細胞増殖因子9)についてSWISSPROT登録番号P54130、およびマウスFGF - 9についてSantos - Ocampoら、1996、J. Biol. Chem. 271 : 1726 ~ 1731を参照のこと ; そしてグリア細胞活性化因子前駆体(GAF)(線維芽細胞増殖因子9)(FGF - 9)についてSWISSPROT登録番号P36364、およびラットFGF - 9についてMiyamoto、1993、Mol. Cell. Biol. 13 : 4251 ~ 4259を参照のこと。図5 ~ 7においてバー(「|」)により示されるように、3つすべての種のFGF - 9配列は、FGF - CX(配列番号2)と同一な147残基を208残基中に有し、全体配列同一性70%である。さらに、208残基中170残基が、FGF - CXの配列(配列番号2)に対してポジティブであり、ポジティブな残基の全体パーセンテージは81%である。ポジティブな残基とは、整列した場合に、比較される配列の同じ相対位置において、同一である(「|」)かまたは保守的アミノ酸置換(「+」)を有するかのいずれかである残基である。以下を参照のこと。

【0043】

全長FGF - CXポリペプチド(配列番号2)はまた、Xenopus FGF - CX(配列番号12)とBLASTXにより整列された。図9に示されるように、FGF - CXは、Xenopus XFGF - CXと比較して、211残基中に、同一な170残基(80%)およびポジティブな189残基(89%)を有する。Xenopus XFGF - CXは、哺乳動物FGF - 9に基づくプライマーを用いて実施した縮重PCRの生成物をプローブとして使用して、尾芽期でのcDNAライブラリーから最近得られた。Kogaら、1999、Biochem Biophys Res Commun 261 : 756 ~ 765を参照のこと。XFGF - CXオープンリーディングフレームの推定208アミノ酸配列は、FGFファミリーの特徴であるモチーフと含む。XFGF - CXは、

XFGF-9に対して73.1%の全体類似性を有するが、そのアミノ末端領域にてXFGF-9と異なる(33.3%類似性)。このことは、本発明で開示される配列番号2について、種々の哺乳動物FGF-9配列およびFGF-16配列(ヒトを含む(上記を参照のこと))に対して観察される類似性と似ている。図4、5および7~9を参照のこと。

【0044】

図1中のポリペプチド配列(配列番号2)は、小胞体の膜およびミクロボディー(ペルオキシソーム)の膜を通るソーティングについて高い可能性を有すると、PSORTプログラムにより推定される。さらに、このポリペプチド配列は、そのN末端に切断可能な推定シグナル配列を有さないが、図10におけるハイドロパシープロットは、FGF-CXが、アミノ酸位置およそ90~およそ115に、顕著な疎水性セグメント(配列番号13)を有することを示す。この単一の疎水性領域は、このFGFファミリーの他のメンバー中のソーティングシグナルであることが知られている。従って、配列番号13のアミノ酸を含むポリペプチドは、ソーティングシグナルとして有用であり、種々の細胞膜(例えば、小胞体、ゴルジ膜または原形質膜)を通る分泌を可能にする。

【0045】

FGF-CXは、PSORTコンピューターアルゴリズム(Nakaiら、1992、Genomics 14、897~911)およびSIGNALPコンピューターアルゴリズム(Nielsenら、1997、Protein Eng. 10:1~6)により推定された場合、その最も近いヒトファミリーメンバーのうちのいくつか(例えば、FGF-9およびFGF-16)についてちょうど見出されたように、古典的アミノ末端シグナル配列を欠く。それにも関わらず、FGF-9およびFGF-16の両方は、分泌される。例えば、Matsumoto-Yoshitomiら、1997、Int. J. Cancer 71:442~450; Miyakeら、1998、Biochem. Biophys. Res. Comm. 243:148~152; Miyakawaraら、1999、J. Biol. Chem. 274:29352~29357; Revestら、2000、J. Biol. Chem. 275、8083~8090を参照の

こと。FGF-CXもまた分泌されるか否かを決定するために、全長FGF-CXタンパク質をコードするcDNAが、哺乳動物発現ベクター中にサブクローニングされ、このベクターはpFGF-CXと名付けられた。ヒト胚性腎臓293細胞がこのベクターでトランスフェクトされた場合に発現されるタンパク質が、馴化培地にて見出され、そしてC末端V5エピトープに対する抗体により検出されるバンドを示し、ウェスタンブロットにおけるみかけの分子量は約27kDaである(図11、実施例7)。発現されるタンパク質のさらなる部分が、ヘパリン硫酸プロテオグリカン(HSPG)との相互作用を阻害する物質を用いた処理により、293細胞上での隔離(sequestration)から放出される。この様式で放出されるタンパク質もまた、類似のウェスタンブロットパターンを示す(図11)。同様に、そのタンパク質が、Igシグナル配列を組み込んだ組換えプラスミドからHEK293細胞において発現された場合、ウェスタンブロットによって、みかけの分子量約34kDaのバンドが検出される(図12、実施例5)。

【0046】

本発明のFGF-CXを含む、いくつかの脊椎動物FGF様タンパク質についてのClustalW多重タンパク質アラインメント(Thompsonら、1994、Nucl. Acids Res. 22:4673~4680)が、図4および図5に示される。その3つの哺乳動物タンパク質(配列番号9~11)は、互いに非常に密接に類似するが、本発明のFGF-CXタンパク質(配列番号2)とはかなり異なる。また、Xenopus XFGF-CX(配列番号12)と配列番号2の配列とは、FGF-9の配列よりも近く、互いに類似する。FGF-9分泌に關与する内部疎水性ドメインが、FGF-9配列の残基95~120に広がる。例えば、Miyakawaら、1999、J. Biol. Chem. 274:29352~29357を参照のこと。図10は、FGF-CXのハイドロパシープロットを示す。

【0047】

XFGF-20の発現とXenopus FGF-9の発現は、互いに異なる。XFGF-20 mRNAは、二倍体細胞において、尾芽期およびその後の胚

において、そして特に、成体の胃および精巣において、発現されるが；XFGF-9 mRNAは、卵および多くの成体組織において、母性的に発現される。例えば、Kogaら（上記）を参照のこと。原腸形成の間のXFGF-20の正確な発現は、*Xenopus laevis*における正常な頭構造の形成に必要なものである。XFGF-20 mRNAが早期胚において過剰発現された場合、原腸形成が異常であり、そして前部構造の発生が抑制された。Kogaら（上記）を参照のこと。このような胚において、試験した転写物の中でも、Xbra転写物の発現が、原腸形成の間抑制され、このことは、Xbra遺伝子の発現がXFGF-CX効果を媒介することを示した。例えば、Kogaら（上記）を参照のこと。

【0048】

増殖中の組織（例えば、卵、精巣、および雌性カエルにおける複数の組織を含む）における関連するXFGF-9ポリペプチドの発現パターンは、機能する器官において正常に再生する組織の維持における、XFGF-20についての役割を示唆する。

【0049】

実施例8において、FGF-CX mRNAが、正常な小脳、ならびにいくつかのヒト腫瘍細胞株（肺、胃および結腸の癌を含む）において発現されるが、対応する正常組織では発現されないことが、示される。正常な肺、胃および結腸におけるFGF-CX発現の欠如、ならびにこれらの組織由来の腫瘍株におけるFGF-CX発現の存在は、これらの癌細胞株が、不適切な様式でFGF-CXを明らかに過剰発現することを示す。FGF-CXが位置する染色体領域は、結腸直腸癌、肺癌、および胃癌において共通して変化している。例えば、Emiら、1992、*Cancer Res.* 52:5368~5372；Baffaら、2000、*Clin. Cancer Res.* 6:1372~1377を参照のこと。これらの細胞におけるFGF-CX駆動性オートクライン増殖ループの確立が、それら細胞の最初の腫瘍形成性転換および/またはそれらの細胞のその後の増殖に寄与することが、可能である。このシナリオは、NIH 3T3細胞におけるFGF-CX駆動性オートクラインループの生成が、その細胞の腫瘍形成

能を活性化するという知見により支持される（実施例11を参照のこと）。腫瘍細胞によるFGF-CX分泌が、間質細胞に対するパラクリン効果を介してその細胞のインビボ増殖を刺激することもまた、可能である。

【0050】

NIH 3T3細胞における異種FGF-CXの発現は、その細胞のトランスフォーメーションおよび腫瘍形成性を誘導することが見出されている（実施例11を参照のこと）。これらの効果は、ネイティブのFGF-CX（構築物pFGF-CX）およびアミノ末端の異種Igシグナル配列とともに発現されるFGF-CX（構築物pIg-FGF-CX）の両方によって媒介される。しかし、pIg-FGF-CXは、pFGF-CXよりも（大きなインビトロトランスフォーメーション能力（データは示さず）およびインビボ腫瘍形成性（図19）により示されるように）腫瘍形成的に活性であることが、注意されるべきである。pFGF-CXに対して勝っているpIg-FGF-CXの腫瘍形成性は、pIg-FGF-CXが、NIH 3T3細胞においてpFGF-CXよりも有意に多く分泌FGF-CXタンパク質を生成するという事実（図11B）に、おそらく起因する。

【0051】

FGF-CXと同様に、他のFGFは、異所性発現の後に細胞をトランスフォーメーションすることが示されており、そしていくつかの場合において、FGFシグナル伝達の阻止が、細胞トランスフォーメーションを抑制することが示されている。例えば、Matsumoto-Yoshitomiら、1997、Int. J. Cancer 71:442~450; Liら、1994、Mol. Cell. Biol. 14:7660~7669を参照のこと。

【0052】

本明細書中に記載されるFGF-CXの特性、ならびに関連するFGFタンパク質について見出される効果に基づいて、FGF-CXはヒト悪性疾患において重要な役割を果たすことが、考えられる。これらの理由により、本明細書中に開示されるFGF-CXポリペプチド、FGF-CX核酸およびFGF-CX抗体は、これらの組成物の存在または量を診断する方法において、FGF-CXに関

連する病因に関連する治療薬剤についてスクリーニングおよび同定する際に、そして種々の悪性疾患の処置方法において、有用である。

【0053】

(FGF - CX核酸)

本発明の核酸は、FGF - CXタンパク質またはFGF - CX様タンパク質をコードする核酸を含む。これらの核酸には、配列が図1および配列番号1に提供される核酸、またはそのフラグメントがある。この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し得る。さらに、本発明は、配列番号1の変異体核酸もしくは改変体核酸、またはそのフラグメントを含み、それら核酸の塩基のいずれもが、そのFGF - CX様活性および生理学的機能を維持するタンパク質を依然としてコードしつつ、図1に示される対応する塩基から変化され得る。本発明はさらに、配列番号1の核酸配列の相補体（そのフラグメント、誘導体、アナログおよびホモログを含む）を含む。FGF - CXの一部の相補鎖の例が、図3A、図3B、および図3Cに示される。本発明はさらに、構造が化学的改変を含む、核酸もしくは核酸フラグメント、またはそれらの相補体を含む。

【0054】

本発明の1つの局面は、FGF - CXタンパク質もしくはその生物学的に活性な部分をコードする、単離された核酸分子に関する。また、FGF - CXをコードする核酸（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の使用に十分な核酸フラグメント、ならびにFGF - CX核酸分子の増幅もしくは変異のためのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）プライマーとしての使用のためのフラグメントが、含まれる。本明細書中で使用される場合、用語「核酸分子」とは、DNA分子（例えば、cDNAもしくはゲノムDNA）、RNA分子（例えば、mRNA）、ヌクレオチドアナログを使用して生成されるそのDNAもしくはDNAのアナログ、ならびにそれらの誘導体、フラグメント、およびホモログを含むことが意図される。その核酸分子は、一本鎖であってもよいし、または二本鎖であってもよいが、好ましくは二本鎖DNAである。

【0055】

「プローブ」とは、可変長、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、約6,000nt程度の多さの(用途に依存する)、核酸配列をいう。プローブは、同一の核酸配列、類似の核酸配列もしくは相補的核酸の検出において使用される。長さが比較的長いプローブは、通常は天然供給源もしくは組換え供給源から得られ、オリゴマーよりも高い特異性でありかつゆっくりハイブリダイズする。プローブは、一本鎖であってももしくは二本鎖であってもよく、そしてPCR、メンブレンベースのハイブリダイゼーション技術、またはELISA様技術において特異性を有するように設計され得る。

「単離された」核酸分子は、その核酸の天然の供給源中に存在する他の核酸分子から分離している、核酸分子である。単離された核酸分子の例としては、ベクター中に含まれた組換えDNA分子、異種宿主細胞中に維持された組換えDNA分子、部分精製された核酸分子もしくは実質的に精製された核酸分子、ならびに合成DNA分子もしくは合成RNA分子が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、「単離された」核酸は、その核酸が由来する生物のゲノムDNA中でその核酸に天然で隣接する配列(すなわち、その核酸の5'末端に位置する配列および3'末端に位置する配列)を含まない。例えば、種々の実施形態において、その単離されたFGF-CX核酸分子は、その核酸が由来する細胞のゲノムDNA中でその核酸分子に天然で隣接するヌクレオチド配列のうちの約50kb未満、約25kb未満、約5kb未満、約4kb未満、約3kb未満、約2kb未満、約1kb未満、約0.5kb未満または約0.1kb未満を含み得る。さらに、「単離された」核酸分子(例えば、cDNA分子)は、組換え技術により産生された場合に実質的には他の細胞物質もしくは培養培地なしであり得、あるいは、化学合成された場合には実質的には化学物質前駆体もしくは他の化学物質なしであり得る。

【0056】

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鎖)は、標準的な分子生物学技術および本明細書中に提供される配列情報を使用して単離され得る。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使用して、FGF-CX核酸配列は、標準的なハイブリダイゼーション技術およびクローニング技術(例えば、Sambrookら、編、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor, NY、1989; およびAusubelら、編、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、New York、NY、1993に記載されるような技術)を使用して単離され得る。

【0057】

本発明の核酸は、cDNA、mRNA、あるいはゲノムDNAを、標準的なPCR増幅技術に従うテンプレートおよび適切なオリゴヌクレオチドプライマーとして使用して、増幅され得る。このように増幅された核酸は、適切なベクター中にクローニングされ得、そしてDNA配列分析によって特徴付けられ得る。さらに、FGF-CXヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは、標準的な合成技術によって(例えば、自動化DNA合成機を使用して)調製され得る。

【0058】

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

【0059】

別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列の相補鎖である核酸分子を含む。別の実施形態では、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列またはこのヌクレオチド配列の一部分の相補鎖である核酸分子を含む。配列番号1に示されるヌクレオチド配列に相補的である核酸分子は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列に十分相補的である核酸分子であり、配列番号1に示される核酸配列に対しミスマッチがほとんどまたは全くなく水素結合し得、それによって安定な二本鎖を形成する。

【0060】

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

【0061】

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使用され得るフラグメント、あるいはFGF-CXの生物学的に活性な部分をコードするフラグメント）を含み得る。本明細書中に提供されるフラグメントは、少なくとも6個の（連続する）核酸配列または少なくとも4個の（連続する）アミノ酸配列（それぞれ、核酸の場合には、特異的なハイブリダイゼーションを可能にし、またはアミノ酸の場合には、エピトープの特異的な認識を可能にするに十分な長さ）として規定され、そして全長配列未満のせいぜいいくらかの部分である。フラグメントは、選択された核酸配列またはアミノ酸配列の任意の連続する部分に由来し得る。誘導体は、直接的にかまた

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

【0062】

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

【0063】

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

【0064】

ヒトFGF-CX遺伝子のクローニングから決定されたヌクレオチド配列は、他の細胞型（例えば、他の組織由来）におけるFGF-CXホモログ、ならびに他の哺乳動物由来のFGF-CXホモログを同定および/またはクローニングする際の使用のために設計されるプローブおよびプライマーの作製を可能にする。このプローブ/プライマーは、代表的には、実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。このオリゴヌクレオチドは、代表的には、配列番号1の少なくとも約12個、約25個、約50個、約100個、約150個、約200個、約250個、約300個、約350個または約400個以上の連続するセンス鎖ヌクレオチド配列；または配列番号1のアンチセンス鎖ヌクレオチド配列；あるいは配列番号1の天然に存在する変異体の少なくとも約12個、約25個、約50個、

約100個、約150個、約200個、約250個、約300個、約350個または約400個以上の連続するセンス鎖ヌクレオチド配列に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。

【0065】

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

【0066】

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

【0067】

(F G F - C X の改変体)

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

【 0 0 6 8 】

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

【 0 0 6 9 】

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

ば、可溶性ヒトFGF-CX cDNAは、ヒトの膜結合FGF-CXに対するその相同性に基づいて単離され得る。同様に、膜結合ヒトFGF-CX cDNAは、可溶性ヒトFGF-CXに対するその相同性に基づいて単離され得る。

【0070】

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

【0071】

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

【0072】

本明細書で用いられる場合、語句「ストリンジентハイブリダイゼーション条件」は、その条件下で、プローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチドが、その標的配列にハイブリダイズするが、その他の配列にはハイブリダイズしない条件をいう。ストリンジентな条件は配列依存性であり、そして異なる状況で異なる。より長い配列は、より短い配列より高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジентな条件は、規定されたイオン強度およびpHで、特定の配列の熱融解点（ T_m ）より約5%低いように選択される。この T_m は、標的配列に相補的なプローブの50%が、平衡状態で標的配列にハイブリダイ

ズする（規定されたイオン強度、pHおよび核酸濃度下）温度である。標的配列は一般に過剰で存在するので、 T_m では、50%のプローブが平衡状態で占有されている。代表的には、ストリンジェントな条件は、pH7.0~8.3で、塩濃度が約1.0Mナトリウムイオンより少なく、代表的には約0.01~1.0Mナトリウムイオン（またはその他の塩）、そして温度が短いプローブ、プライマーまたはオリゴヌクレオチド（例えば、10nt~50nt）について少なくとも約30、そしてより長いプローブ、プライマーおよびオリゴヌクレオチドについて少なくとも約60 であるような条件である。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドのような、脱安定化剤の添加で達成され得る。

【0073】

上記のようなストリンジェント条件は、当業者に公知であり、そしてCURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に見出され得る。好ましくは、この条件は、互いに少なくとも約65%、約70%、約75%、約85%、約90%、約95%、約98%または約99% 相同な配列が、代表的には互いにハイブリダイズしたままであるような条件である。ストリンジェントハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、 $6 \times SSC$ 、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を含む高塩緩衝液中での65 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に、 $0.2 \times SSC$ 、0.01% BSA中での50 での1回以上の洗浄が続く。ストリンジェント条件下で配列番号1の配列にハイブリダイズする、本発明の単離された核酸分子は、天然に存在する核酸分子に対応する。本明細書中で使用される場合、「天然に存在する」核酸分子とは、天然に存在する（例えば、天然のタンパク質をコードする）ヌクレオチド配列を有する、RNA分子またはDNA分子をいう。

【0074】

ホモログ（すなわち、ヒト以外の種由来のFGF-CXタンパク質をコードする核酸）または他の関連配列（例えば、パラログ（paralog））は、特定

のヒト配列の全てまたは一部をプローブとし、核酸ハイブリダイゼーションおよびクローニングに関して当該分野で周知の方法を使用して、低い、中程度の、または高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションによって入手され得る。

【0075】

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

【0076】

第3の実施形態では、配列番号1、またはそのフラグメント、アナログもしくは誘導体のヌクレオチド配列を含む核酸分子に、低ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得る核酸が提供される。低ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、35%ホルムアミド、5×SSC、50 mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.2% BSA、100mg/mlの変性サケ精子DNA、10% (重量/容量) デキストラン硫酸中での40 でのハイブリダイゼーション、続いて2×SSC、25mM Tris-HCl (pH7.4)、5mM EDTAおよび0.1% SDS中での50 での1回以上の洗浄である。用いられ得る低ストリンジェンシーの他の条件は、当該分野で周知である(例えば、種交差ハイブリダイゼーションについて用いられるように)。例え

ば、Ausubelら(編), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NYならびにKriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY; ShiloおよびWeinberg, 1981, Proc Natl Acad Sci USA 78:6789-6792を参照のこと。

【0077】

(保存的変異)

集団中に存在し得る、FGF-CX配列の天然に存在する対立遺伝子改変体に加えて、当業者は、配列番号1のヌクレオチド配列への変異によって変化が導入され得、それによって、FGF-CXタンパク質の機能的能力を変更することなく、コードされるFGF-CXタンパク質のアミノ酸配列における変化がもたらされることをさらに理解する。例えば、「非必須」アミノ酸残基にてアミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換は、配列番号1の配列において行われ得る。「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を有意に変更することなく、FGF-CXの野生型配列から、変更され得る残基であり、一方、「必須」アミノ酸残基は、生物学的活性に必要とされる。例えば、本発明のFGF-CXタンパク質の間で保存されているアミノ酸残基は、特に変更を受け入れられないと予測される。

【0078】

さらに、図4に示されるような整列によって示されるような、FGFファミリーのメンバーの間で保存されるアミノ酸残基は、変更をあまり受け入れないと予測される。例えば、本発明のFGF-CXタンパク質は、FGFファミリーのメンバー(すなわち、FGF-9およびXFGF-CXタンパク質)およびFGF-CXホモログにおいて代表的に保存される領域である少なくとも1つのドメインを含み得る。このように、これらの保存されたドメインは、変異を受け入れないようである。しかし、他のアミノ酸残基(例えば、FGFタンパク質のメンバーの間で保存されていないかまたは半ばしか保存されていないアミノ酸残基)は、活性に必須でないかもしれず、従って、変更を受け入れる可能性がより高い。

【0079】

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

【0080】

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

【0081】

変異は、標準技術（例えば、部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発）によって配列番号1のヌクレオチド配列に導入され得る。好ましくは、保存的アミノ酸置換が、1以上の推定非必須アミノ酸残基にて作製される。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換される、アミノ酸置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で定義されている。特定のアミノ酸は、1より多くの分類可能な特徴を有する側鎖を有する。これらのファミリーとしては、以下が挙げられる：塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アルパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、トリプトファン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、チロシン、トリプトファン）、分枝側鎖を有するアミノ酸

(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン) および芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)。従って、増殖因子中の推定された非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖のファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換される。あるいは、別の実施形態では、変異は、増殖因子コード配列の全てまたは一部に沿って(例えば、飽和変異誘発(saturation mutagenesis)によって)ランダムに導入され得、そして得られる変異体は、増殖因子の生物学的活性についてスクリーニングされて、活性を維持する変異体を同定し得る。配列番号1および3の変異誘発に続いて、コードされるタンパク質は、当該分野で公知の任意の組換え技術によって発現され得、そしてこのタンパク質の活性が決定され得る。

【0082】

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

【0083】

(アンチセンス)

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

誘導体およびアナログをコードする核酸分子、または配列番号1のFGF-CXの核酸配列に相補的なアンチセンス核酸がさらに提供される。

【0084】

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

【0085】

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

換ヌクレオチドが用いられ得る)。

【0086】

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

【0087】

本発明のアンチセンス核酸分子は、代表的には被験体に投与されるか、またはインサイチュで生成され、その結果、それらは、FGF - CXタンパク質をコードする細胞性mRNAおよび/またはゲノムDNAとハイブリダイズするか、またはそれに結合し、それによってこのタンパク質の発現を、例えば転写および/または翻訳を阻害することによって阻害する。ハイブリダイゼーションは、安定

な二重鎖を形成する従来のヌクレオチド相補性によってか、または例えばDNA二重鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合には、二重らせんの主溝における特異的相互作用を介してであり得る。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例としては、組織部位での直接的注射が挙げられる。あるいは、アンチセンス核酸分子は、選択された細胞を標的化するように改変され得、次いで全身に投与され得る。例えば、全身投与のために、アンチセンス分子は、それらが選択された細胞表面上に発現されたレセプターまたは抗原に特異的に結合するように改変され得る。これは、例えば、そのアンチセンス核酸分子を細胞表面レセプターまたは抗原に結合するペプチドまたは抗体に連結することによる。このアンチセンス核酸分子はまた、本明細書中に記載されるベクターを用いて細胞に送達され得る。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するために、アンチセンス核酸分子が強力なpol IIプロモーターまたはpol IIIプロモーターの制御下に置かれているベクター構築物が、好ましい。

【0088】

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

【0089】

(リボザイムおよびPNA部分)

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

使用され得る。

【0090】

なお別の実施形態において、本発明のアンチセンス核酸はリボザイムである。リボザイムは、相補領域を有する一本鎖核酸（例えば、mRNA）を切断し得る、リボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNA分子である。従って、リボザイム（例えば、ハンマーヘッド型リボザイム（HaselhoffおよびGerlach（1988）Nature 334：585～591に記載される））を使用して、FGF-CX mRNA転写物を触媒的に切断し、それによってFGF-CX mRNAの翻訳を阻害し得る。FGF-CXをコードする核酸に特異性を有するリボザイムは、本明細書中に開示されるFGF-CX DNAのヌクレオチド配列（すなわち、配列番号1）に基づいて設計され得る。例えば、活性部位のヌクレオチド配列が、FGF-CXをコードするmRNA内で切断されるヌクレオチド配列に相補的である、テトラヒメナL-19 IVS RNAの誘導体が構築され得る。例えば、Cechら、米国特許第4,987,071号；およびCechら、米国特許第5,116,742号を参照のこと。あるいは、FGF-CX mRNAを使用して、RNA分子のプールから、特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒性RNAを選択し得る。例えば、Bartelら（1993）Science 261：1411～1418を参照のこと。

【0091】

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

【0092】

種々の実施形態において、FGF-CXの核酸は、塩基部分、糖部分またはリ

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

【0093】

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

【0094】

別の実施形態において、FGF-CXのPNAは、例えば、それらの安定性または細胞性取り込みを増強するために、PNAに脂溶性基または他のヘルパー基を結合することによって、PNA-DNAキメラの形成によって、またはリポソームもしくは当該分野において公知の薬物送達の他の技術の使用によって改変され得る。例えば、PNAおよびDNAの有利な特性を組合せ得る、FGF-CX

のPNA-DNAキメラが生成され得る。PNA部分が高い結合親和性および特異性を提供する一方で、そのようなキメラは、DNA認識酵素（例えば、RNase HおよびDNAポリメラーゼ）がDNA部分と相互作用するのを可能にする。PNA-DNAキメラは、塩基のスタッキング、核塩基間の結合数および方向を考慮して選択される適切な長さのリンカーを使用して連結され得る（Hyrup（1996）上記）。PNA-DNAキメラの合成は、Hyrup（1996）上記およびFinnら（1996）Nucl Acids Res 24:3357~63において記載されるように行われ得る。例えば、DNA鎖は、標準的なホスホラミダイトカップリング化学を用いて固体支持体上で合成され得、そして改変されたヌクレオシドアナログ（例えば、5'-(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシ-チミジンホスホラミダイト）が、PNAとDNAの5'末端との間に使用され得る（Magら（1989）Nucl Acid Res 17:5973~88）。次いで、PNAモノマーが段階様式でカップリングされ、5' PNAセグメントおよび3' DNAセグメントを有するキメラ分子を生成する（Finnら（1996）上記）。あるいは、5' DNAセグメントおよび3' PNAセグメントを有するキメラ分子が合成され得る。Petersenら（1975）Bioorg Med Chem Lett 5:1119~11124を参照のこと。

【0095】

他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、以下のような他の付属の基を含み得る：ペプチド（例えば、インビボで宿主細胞レセプターを標的化するため）、または細胞膜を横切る輸送を容易にする因子（例えば、Letsingerら、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553~6556；Lemaitreら、1987、Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648~652；PCT公開番号WO88/09810を参照のこと）、または血液脳関門（例えば、PCT公開番号WO89/10134を参照のこと）。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション誘発切断剤（例えば、Krolら、1988、BioTechniques 6:958~976を参照のこと）、またはインターカレーター剤（例えば、Zon

, 1988、Pharm. Res. 5: 539~549を参照のこと)で改変され得る。この端に、オリゴヌクレオチドは、別の分子(例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーション誘発切断剤など)に結合され得る。

【0096】

(FGF-CXポリペプチド)

本発明の新しいタンパク質として、配列が図1(配列番号2)に提供されるFGF-CX様タンパク質が挙げられる。本発明はまた、その任意の残基が、図1で示される対応する残基から変化され得る、変異体タンパク質または改変体タンパク質を含むが、そのタンパク質は、そのFGF-CX様活性および生理的機能、またはその機能的フラグメントを保持するタンパク質を依然としてコードする。変異体タンパク質または改変体タンパク質において、20%以上の残基がこのように変化され得る。

【0097】

通常、FGF-CX-様機能を維持するFGF-CX様変異株は、その残基が配列の特定位置で他のアミノ酸で置換された任意の改変体を含み、さらに、親タンパク質の2つの残基間にさらなる残基(単数または複数)を挿入する可能性、ならびに親配列から1以上の残基を欠失させる可能性を含む。任意のアミノ酸置換、挿入、または欠失は本発明によって包含される。有利な環境において、置換は、上記に決められるように、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しに、表2の以下の位置(配列番号2に提供される番号付けを使用する)は、示されるように置換され得、従って、変異体タンパク質または改変体タンパク質が1以上の示された置換の1つを含み得る。その提案された置換によって、所定の位置でなされ得る可能な置換の範囲は制限されない。

【0098】

【表2】

表 2.

	タンパク質	可能な置換
6:	Glu	Asp
9:	Gly	Ser, Thr, Asn
10:	Phe	Tyr
11:	Leu	Phe, Ile
15:	Glu	Asp
16:	Gly	Ala
17:	Leu	Ile, Val
19:	Gln	Asn, Ser
21:	Val	Phe, Ile
31:	Gly	Lys, Arg, Ser, Ala
33:	Arg	Lys, Ser
35:	Pro	Leu, Val
38:	Gly	Asn, Ser
39:	Glu	Asp
40:	Arg	Lys, His, Pro
42:	Ser	Thr, Ala, Gly
43:	Ala	Gln, Asn, Ser
48:	Ala	Ser, Gly
51:	Gly	Ala
53:	Gly	Ala, Asn
54:	Ala	Gly, Val, Ser
55:	Ala	Ser, Thr
56:	Gln	Asp, Glu, Asn
58:	Ala	Ser, Thr, Asn, Gln, Asp, Glu
61:	His	Gln, Asn, Lys, Arg
78:	Gln	Asn, Glu, Asp
80:	Leu	Phe, Ile
82:	Asp	Glu, Asn, Gln
84:	Ser	Asn, Thr, Gln
85:	Val	Ile
90:	Gln	Asn, Lys
103:	Val	Ile
115:	Ser	Thr
123:	Asp	Glu
128:	Tyr	Phe
135:	Ser	Thr, Gln, Asn
138:	Ile	Val, Leu
155:	Ile	Leu
159:	Gly	Val, Ala
161:	Thr	Ser
166:	Phe	Tyr
177:	Asp	Glu
181:	Ser	Ala, Thr
198:	Glu	Asp
199:	Arg	Lys
207:	Leu	Ile, Val
209:	Met	残基
211:	Thr	Ser

本発明の1つの局面は、単離されたFGF-CXタンパク質、およびその生物学的に活性な部分、またはそれらの誘導体、フラグメント、アナログもしくはホモログに関する。抗FGF-CX抗体を惹起するための免疫原としての使用のために適切なポリペプチドフラグメントもまた提供される。1つの実施形態において、ネイティブなFGF-CXタンパク質は、標準的なタンパク質精製技術を用

いる適切な精製スキームによって、細胞または組織供給源から単離され得る。別の実施形態において、FGF-CXタンパク質は、組換えDNA技術によって産生される。組換え発現に代わるものとして、FGF-CXタンパク質またはポリペプチドは、標準的なペプチド合成技術を用いて化学合成され得る。

【0099】

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

【0100】

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

調製物を含む。

【0101】

F G F - C Xタンパク質の生物学的に活性な部分は、全長F G F - C Xタンパク質より少ないアミノ酸を含み、そしてF G F - C Xタンパク質の少なくとも1つの活性を示す、F G F - C Xタンパク質のアミノ酸配列（例えば、配列番号2、4、6、8、もしくは10に示されるアミノ酸配列）に十分に相同なアミノ酸配列、または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を含むペプチドを含む。代表的には、生物学的に活性な部分は、F G F - C Xタンパク質の少なくとも1つの活性を有するドメインまたはモチーフを含む。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、長さが10、25、50、100またはそれより多いアミノ酸であるポリペプチドであり得る。

【0102】

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、少なくとも1つの、ファミリーF G Fタンパク質の間で実質的に保存された、上記の同定されたドメインを含み得る。さらに、別の生物学的に活性な部分（ここではタンパク質の他の部分が欠失している）は、組換え技術によって調整され得、そして、1つ以上の、ネイティブなF G F - C Xタンパク質の機能的な活性について調べられ得る。

【0103】

1つの実施形態において、F G F - C Xタンパク質は配列番号2で示されるアミノ酸配列を有する。別の実施形態において、F G F - C Xタンパク質は、配列番号2と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を保持するが、以下に詳細に記載されるように、天然の対立遺伝子改変体または変異誘発のためにアミノ酸配列が異なる。従って、別の実施形態において、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約45%相同なアミノ酸配列を含むタンパク質であり、配列番号2のF G F - C Xタンパク質の機能的活性を維持する。別の実施形態において、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、そしてより好ましくは約55、65、70、75、80、85、90、95、98、または99%さえも相同な、アミノ酸配列を含

むタンパク質であり、配列番号2の配列を有する対応するポリペプチドのFGF-CXタンパク質の機能的活性を維持する。

【0104】

(2つ以上の配列間の相同性の決定)

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

【0105】

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

【0106】

用語「配列同一性」は、2つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列が、特定の比較領域にわたって、残基毎を基準として同一である程度をいう。用語「配列同一性のパーセンテージ」は、以下により算出される：比較領域にわたって最適に整列された2つの配列を比較する工程、一致した位置の数を得るため

に、両方の配列において同一の核酸塩基（例えば、核酸の場合にはA、T、C、G、U、またはI）が存在する位置の数を決定する工程、一致した位置の数を、比較領域の内の位置の総数（すなわち、ウィンドウサイズ）で除算する工程、および結果を100で乗算して、配列同一性のパーセンテージを得る工程。用語「実質的な同一性」は、本明細書中で使用される場合、ポリヌクレオチド配列の特徴を示し、ここでこのポリヌクレオチドは、比較領域にわたり参照配列と比較して、少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも85%の配列同一性、そして頻繁には90～95%の配列同一性、より通常には少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含む。用語「ポジティブな残基のパーセンテージ」は、以下により算出される：比較領域にわたって最適に整列された2つの配列を比較する工程、上記で決定されたように、一致した位置の数を得るために、両方の配列において、同一かつ保存的アミノ酸置換の存在する位置の数を決定する工程、一致した位置の数を、比較領域の内の位置の総数（すなわち、ウィンドウサイズ）で除算する工程、および結果を100で乗算して、ポジティブな残基のパーセンテージを得る工程。

【0107】

（キメラタンパク質および融合タンパク質）

本発明はまた、FGF-CXキメラタンパク質または融合タンパク質を提供する。本明細書中で使用される場合、FGF-CX「キメラタンパク質」またはFGF-CX「融合タンパク質」は、非FGF-CXポリペプチドに作動可能に連結された、FGF-CXポリペプチドを含む。「FGF-CXポリペプチド」は、FGF-CXに対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいい、一方、「非FGF-CXポリペプチド」は、FGF-CXタンパク質に対して実質的に相同ではないタンパク質（例えば、FGF-CXタンパク質とは異なり、かつ同一または異なる生物体に由来するタンパク質）に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドをいう。FGF-CX融合タンパク質において、このFGF-CXポリペプチドは、FGF-CXタンパク質のすべてまたは一部分に対応し得る。1つの実施形態では、FGF-CX融合タンパク質は、FGF-CXタンパク質の少なくとも1つの生物学的に活性な部分を含む。別の実施形態では、FGF-C

X融合タンパク質は、FGF-CXタンパク質の少なくとも2つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質において、用語「作動可能に連結された」は、FGF-CXポリペプチドおよび非FGF-CXポリペプチドが、インフレームで互いに融合されていることを示すことが意図される。非FGF-CXポリペプチドは、FGF-CXポリペプチドのN末端またはC末端に融合され得る。

【0108】

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

【0109】

さらに別の実施形態では、融合タンパク質は、GST-FGF-CX融合タンパク質であり、ここではFGF-CX配列は、GST（すなわち、グルタチオンS-トランスフェラーゼ）配列のC末端に融合されている。このような融合タンパク質は組換えFGF-CXの精製を容易にし得る。

【0110】

別の実施形態では、融合タンパク質は、そのN末端に異種シグナル配列を含むFGF-CXタンパク質である。例えば、ネガティブなFGF-CXのシングル配列（すなわち、配列番号2の1～20のアミノ酸）は除去され得、別のタンパク質由来のシングル配列で置換され得る。特定の宿主細胞（例えば、哺乳動物宿主細胞）では、FGF-CXの発現および/または分泌を、異種シグナル配列の使用を通して増加させ得る。

【0111】

別の実施形態では、この融合タンパク質は、FGF-CX-免疫グロブリン融合タンパク質であり、ここでは1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に由来する配列に融合される。本発明のこのFGF-CX-免疫グロブリン融合タンパク質は、薬学的組成物中に取り込まれ、そして被験体に投与されて、細胞の表面上でFGF-CXリガント

とFGF-CXタンパク質との間の相互作用を阻害し、それによってインビボのFGF-CX媒介シグナル伝達を抑制し得る。1つの比限定的な例において、本発明の意図されたFCF-CXリガンドは、FGF-CXレセプターである。このFGF-CX-免疫グロブリン融合タンパク質を用い、FGF-CX同族リガンドの生体利用性に影響を与え得る。FGF-CXリガンド/FGF-CX相互作用の阻害は、増殖障害および分化障害の両方の処置、および細胞生存を調節（例えば、促進または阻害）することに、治療的に有用であり得る。さらに、本発明のこのFGF-CX-免疫グロブリン融合タンパク質は、被験体中で抗FGF-CX抗体を産生するための免疫原として用い得、FGF-CXリガンドを精製し、そしてFGF-CXリガンドとのFGF-CXの相互作用を阻害する分子を同定するスクリーニングアッセイで用いられ得る。

【0112】

本発明のFGF-CXキメラまたは融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技法により産生され得る。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNAフラグメントを、従来の技法に従って、例えば、連結のための平滑末端または粘着(stagger)末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、必要に応じて粘着(cohesive)末端のフィルイン、所望しない連結を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的連結を採用することにより、インフレイムで一緒に連結する。別の実施形態では、融合遺伝子を、自動化DNA合成機を含む従来技法により合成し得る。あるいは、遺伝子フラグメントのPCR増幅を、キメラ遺伝子配列を生成するために次いでアニールおよび再増幅され得る、2つの連続遺伝子フラグメント間の相補的オーバハングを生じるアンカープライマーを用いて実施し得る（例えば、Ausbelら（編）CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley & Sons、1992を参照のこと）。さらに、融合部分（例えば、GSTポリペプチド）をすでにコードした多くの発現ベクターが市販されている。FGF-CXをコードする核酸は、この融合成分がFGF-CXタンパク質にインフレイム連結されるように、このような発現ベクター中にクローン化され得る。

【0113】

(FGF-CXアゴニストおよびアンタゴニスト)

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

【0114】

FGF-CXアゴニスト(模倣物)として、またはFGF-CXアンタゴニストのいずれかとして機能するFGF-CXタンパク質の改変体は、FGF-CXタンパク質アゴニストまたはアンタゴニスト活性のためのFGF-CXタンパク質の変異体、例えば短縮型変異体のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより同定され得る。1つの実施形態では、FGF-CX改変体の多彩なライブラリーは、核酸レベルのコンビナトリアル変異誘発により生成され、そして多彩な遺伝子ライブラリーによりコードされる。FGF-CX改変体の多彩なライブラリーは、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を、潜在的なFGF-CX配列の縮重セットが、個々のポリペプチドとして、あるいは、その中にFGF-CX配列のセットを含む(例えば、ファージディスプレイのための)より大きな融合タンパク質のセットとして発現可能であるように、遺伝子配列中に酵素的に連結することにより産生され得る。縮重オリゴヌクレオチド配列が

ら潜在的なFGF-CX改変体のライブラリーを産生するために用いられ得る種々の方法がある。縮重遺伝子配列の化学的合成は、自動化DNA合成機中で実施され得、次いでこの合成遺伝子は、適切な発現ベクター中に連結される。遺伝子の縮重セットの使用は、1つの混合物において、潜在的なFGF-CX配列の所望のセットをコードする配列のすべての供給を可能にする。縮重オリゴヌクレオチドを合成する方法は当該分野で公知である(例えば、Narang(1983)=Tetrahedron 39:3; Itakuraら(1984)Ann Rev Biochem 53:323; Itakuraら(1984)Science 198:1056; Ikeら(1983)Nucl Acid Res 11:477を参照のこと)。

【0115】

(ポリペプチドライブラリー)

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

【0116】

点変異または短縮により作製されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングするため、選択された性質を有する遺伝子産物のcDNAライブラリーをスクリーニングするためのいくつかの技法が当該分野で公知である。このような技法は、FGF-CXタンパク質のコンビナトリアル変異誘発によ

り生成された遺伝子ライブラリーの迅速スクリーニングに適用可能である。大きな遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための、高スループット分析に適した最も広く用いられる技法は、代表的には、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクター中にクローニングすること、得られるベクターのライブラリーで適切な細胞を形質転換すること、および所望の活性の検出が、その産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下で、このコンビナトリアル遺伝子を発現することを含む。ライブラリー中の機能的変異体の頻度を増大する新規技法であるリクルーシブアンサンブル変異誘発 (REM) を、スクリーニングアッセイと組み合わせて用い、FGF-CX 改変体を同定し得る (Arkinn および Yourvan (1992) PNAS 89:7811-7815; Delgrave ら (1993) Protein Engineering 6:327-331)。

【0117】

(抗 FGF - CX 抗体)

用語「抗体」は、本明細書中で使用される場合、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン (Ig) 分子 (すなわち、抗原と特異的に結合する (免疫反応する) 抗原結合部分を含む分子) の免疫学的に活性な部分をいう。このような抗体としては、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、単鎖、Fab、Fab'、および F(ab')₂ フラグメント、ならびに Fab 発現ライブラリーが挙げられるが、これらに限定されない。一般的に、ヒト由来の抗体分子は、分子内に存在する重鎖の性質が互いに異なる任意のクラス IgG、IgM、IgA、IgE および IgD に関する。特定のクラスは、IgG1、IgG2 などのようにサブクラスを同様に有する。さらにヒトにおいて、軽鎖は、鎖または鎖であり得る。抗体についての本明細書の参考文献は、ヒト抗体種のすべてのこのようなクラス、サブクラスおよびタイプの参考文献を含む。

【0118】

抗原として機能すると意図される本発明の単離されたタンパク質、またはその部分もしくはフラグメントは、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体調製のための標準的な技法を用いて、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。全長のタンパク質が用いられ得るか、あるいは、本発明は、免疫原としての使用のための抗原の抗原性ペプチドフラグメントを提供する。抗原性ペプチドフラグメントは、配列番号2に示されるアミノ酸配列のような全長タンパク質アミノ酸配列の少なくとも6アミノ酸残基を含み、そしてこのペプチドに対して惹起された抗体が全長タンパク質または、そのエピトープを含む任意のフラグメントと特異的な免疫複合体を形成するように、そのエピトープを含む。好ましくは、この抗原性ペプチドは、少なくとも10、15、20、または30のアミノ酸残基を含む。抗原性ペプチドに含まれる好ましいエピトープは、その表面上に位置するタンパク質の領域であり；共通して、これらは親水性領域に存在する。

【0119】

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

【0120】

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

【0121】

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

【0122】

（1. ポリクロナール抗体）

ポリクロナール抗体の産生のために、種々の適切な宿主動物（例えば、ウサギ、ヤギ、マウスまたは他の動物）は、FGF-CXのネイティブなタンパク質、その合成改変体、または前記の誘導体を用いる1以上の注射によって免疫され得る。適切な免疫原性調製物は、例えば、天然に存在する免疫原性タンパク質、免疫原性タンパク質を提示する化学的に合成されたポリペプチド、または組換え的に発現される免疫原性タンパク質を含み得る。さらに、このFGF-CXタンパク質は、免疫されている哺乳動物において免疫原性であることが知られている第2のタンパク質に結合体化され得る。このような免疫原性タンパク質の例としては、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、および大豆トリプシンインヒビターが挙げられるが、これらに限定されない。この調製物はさらに、アジュバントを含み得る。種々のアジュバントが免疫学的応答を増加させるために使用され、このようなアジュバントとしては、Freund's（完全および不完全）、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、界面活性物質（例えば、リゾレシチン、プルロニック（pluronic）ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、ジニトロフェノールなど）、ヒトにおいて使用可能なアジュバント（例えば、Bacille Calmette-GuérinおよびCorynebacterium parvum）または類似の免疫刺激剤が挙げられるが、これらに限定されない。使用され得るア

ジュバントのさらなる例としては、MPL-TDMアジュバント（モノホスホリルリピドA、合成トレハロースジコリノミコレート）が挙げられる。

【0123】

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

【0124】

(2. モノクローナル抗体)

本明細書で用いられる用語「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、独特の軽鎖遺伝子産物および独特の重鎖遺伝子産物からなる抗体分子の唯一の分子種を含む抗体分子の集団をいう。特に、モノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR)は、すべての集団の分子に同一である。従って、MAbは、抗原への独特の結合親和性によって特徴付けられる抗原の特定のエピトープと免疫反応可能な抗原結合部位を含む。

【0125】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ方法（例えば、KohlerおよびMilstein, 1975, Nature, 256:495に記載されるような方法）を使用して調製され得る。ハイブリドーマ方法において、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主細胞は、免疫因子で代表的に免疫され、免疫因子に特異的に結合する抗体を産生するか、または産生し得るリンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫され得る。

【0126】

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

【0127】

好ましい不死化細胞株は、効率的に融合する細胞株であり、それらは選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支持し、そしてHAT培地のような培地に敏感である。より好ましい不死化細胞株はマウス骨髓腫細胞株であり、それらを、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center , San Diego , California およびAmerican Type Culture Collection , Manassas , Virginiaから得ることが可能である。ヒト骨髓腫およびマウス - ヒトヘテロ骨髓腫細胞株はまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載される (Kozbor , 1984 , J . Immunol . , 133 : 3001 ; Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Application ,

Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, 第51 - 63頁)。

【0128】

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

【0129】

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

【0130】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、従来の免疫グロブリン精製手順(例えば、タンパク質Aセファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィー)によって、培養培地または腹水から、単離または精製され得る。

【0131】

モノクローナル抗体はまた、組換えDNA方法(例えば、米国特許第4,816,567号に記載される方法)によって作製され得る。本発明のモノクローナ

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

【0132】

（3．ヒト化抗体）

本発明のFGF-CXタンパク質抗原に対する抗体は、さらにヒト化抗体またはヒト抗体を含み得る。これらの抗体は、投与された免疫グロブリンに対するヒトの免疫応答を引き起こさないヒトへの投与に適する。抗体のヒト化形態は、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそれらのフラグメント（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂または他の抗体の抗原結合配列）であり、それらは主にヒト免疫グロブリンの配列から構成され、そして非ヒト免疫グロブリンに由来する最小の配列を含む。ヒト化は、ヒト抗体の対応する配列についてのげっ歯類CDRまたはCDR配列の置換によって、Winterおよび共同研究者の方法（Jonesら、1986 Nature, 31:522-525；Riechmannら、1988 Nature, 332:323-327；Verhoeyenら、1988 Science, 239:1534-15

36)の後に達成され得る。(米国特許第5,225,539号もまた参照のこと。)いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのFv骨格(framework)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、患者の抗体においても、移入されたCDRまたは骨格配列においても見出されない残基を含み得る。一般に、ヒト化抗体は、すべての少なくとも1つ、および代表的には2つの可変領域を実質的に含む。これらの領域内で、すべてのまたは実質的にすべてのCDR領域は非ヒト免疫グロブリンの領域に対応し、そしてすべてまたは実質的にすべての骨格領域はヒト免疫グロブリンコンセンサス配列の領域に対応する。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)、代表的には、ヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を必要に応じて含む(Jonesら、1986; Riechmannら、1988; およびPresta、1992 Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596)。

【0133】

(4. ヒト抗体)

CDRを含む軽鎖および重鎖の両方の全体配列がヒト遺伝子から生じる抗体分子に、十分なヒト抗体は本質的に関連する。このような抗体を、「ヒト抗体」、または「十分なヒト抗体」と本明細書中で呼ぶ。ヒトモノクローナル抗体は、ヒトモノクローナル抗体を産生するための、トリオーマ(trioma)技術; ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら、1983 Immunol Today 4:72を参照のこと)およびEBVハイブリドーマ技術によって調製され得るFGF-CXタンパク質に関する(Coleら、1985: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 第77-96頁)。ヒトモノクローナル抗体は、本発明の実行において使用され得、そしてヒトハイブリドーマの使用によってか(Coteら、1983. Proc Natl Acad Sci USA 80:2026-2030を参照のこと)、またはインビトロでのEpstein Barr Virusを用いたヒトB細胞によるトランスフォーメーションによって(Coleら、1985: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss,

Inc. , 第77 - 96頁を参照のこと) 産生され得る。

【0134】

さらに、ヒト抗体はまた、さらなる技術(ファージディスプレイライブラリー(HoogenboomおよびWinter, 1991 J. Mol. Biol. , 227:381; Marksら、1991 J. Mol. Biol. , 222:581)を含む)を使用して産生され得る。同様に、ヒト免疫グロブリン位置をトランスジェニック動物(例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が、部分的または完全に不活化されているマウス)に導入することによって、ヒト抗体は作製され得る。チャレンジの際にヒト抗体産生が観察され、このことはすべての点(遺伝子再配列、アセンブリー、および抗体レパートリーを含む)でヒトにおいて観察されたものに密接に類似する。このアプローチは、例えば、以下に記載される: 米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; 同第5,611,016号、およびMarksら(1992 Bio/Technology 10、779-783); Lonbergら(1994 Nature 368 856-859); Morrison(1994 Nature 368、812-13); Fishwildら(1996 Nature Biotechnology 14、845-51); Neuberger(1996 Nature Biotechnology 14、826); ならびにLonbergおよびHuszar(1995 Intern. Rev. Immunol. 13 65-93)。

【0135】

FGF-CXタンパク質と特異的に結合するヒト抗体は、抗原によるチャレンジに応答して動物の内因性抗体よりも十分なヒト抗体を産生するように改変されたトランスジェニック非ヒト動物を使用して、さらに産生され得る。(刊行物WO94/02602を参照のこと。)非ヒト宿主における重免疫グロブリン鎖および軽免疫グロブリン鎖をコードする内因性遺伝子は、耐えられなくなっており、そしてヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードする活性な位置は、宿主のゲノムに挿入される。例えば、要求性ヒトDNAセグメントを含む酵母人工染色

体を使用して、ヒト遺伝子は組み込まれる。次いで、すべての所望の改変を提供する動物を、完全な改変の相補体よりもより少ない改変の相補体を含む中間トランスジェニック動物を雑種することによって子孫として得る。このような非ヒト動物の好ましい実施形態は、マウスであり、PCT刊行物WO96/33735およびWO96/34096に開示されるようにXenomous™と呼ばれる。この動物は、十分なヒト免疫グロブリンを分泌するB細胞を産生する。目的のFGF-CX免疫原を有する免疫後の動物から（例えば、ポリクローナル抗体の調製）、あるいは動物由来の不死化されたB細胞（例えば、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ）から、抗体を直接得ることが可能である。さらに、ヒト可変領域を有する免疫グロブリンをコードする遺伝子は、抗体を直接得るために回復され、そして発現され得るか、または抗体のアナログ（例えば、1本鎖Fv分子）を得るために、さらに改変され得る。

【0136】

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

【0137】

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

【0138】

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

【0139】

(5. F_{ab} フラグメントおよび1本鎖抗体)

本発明に従って、技術は、本発明の抗原性FGF-CXタンパク質に特異的な1本鎖抗体の産生に適用され得る(例えば、米国特許第4,946,778号を参照のこと)。さらに、方法は、 F_{ab} 発現ライブラリーの構築に適用され得(例えば、Huseら、1989 Science 246:1275-1281を参照のこと)、タンパク質またはその誘導体、フラグメント、アナログまたはホモログについての所望の特異性を有するモノクローナル F_{ab} フラグメントの迅速かつ効果的な同定を可能にする。タンパク質抗原に対するイディオタイプを含む抗体フラグメント((i)抗体分子のペプシン消化によって産生される $F_{(ab')_2}$ フラグメント;(ii) $F_{(ab')_2}$ フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって産生された F_{ab} フラグメント(iii)ペプシンおよび還元剤を用いた抗体分子の処理によって産生された F_{ab} フラグメント、および(iv) F_v フラグメントを含むが、これらに限定ない)は、当該分野で公知の技術によって産生され得る。

【0140】

(6. 二重特異的抗体)

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

【0141】

二重特異的抗体を作製する方法は、当該分野で公知である。伝統的に、二重特

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

【0142】

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

【0143】

WO96/27011に記載される別のアプローチに従って、抗体分子の対の間の界面は、組換え細胞培養物から回収されるヘテロダイマーのパーセンテージを最大化するために操作され得る。好ましい界面は、抗体定常ドメインのCH₃領域の少なくとも一部を含む。この方法において、第1の抗体分子の界面からの1つ以上の小さなアミノ酸側鎖は、より大きな側鎖(例えば、チロシンまたはトリプトファン)で置換される。大きな側鎖と同一または同様のサイズの代償性「空洞」は、大きなアミノ酸側鎖を小さなアミノ酸側鎖(例えば、アラニンまたは

スレオニン)で置換することによって、第2の抗体分子の界面上に生成される。このことは、ホモダイマーのような他の不必要な最終生成物よりも、ヘテロダイマーの収量を増加するための機構を提供する。

【0144】

二重特異的抗体は、全長抗体または抗体フラグメント(例えば、 $F(ab')$ ₂二重特異的抗体)として調製され得る。抗体フラグメントから二重特異的抗体を産生するための技術は、文献において記載される。例えば、二重特異的抗体は、化学結合を使用して調製され得る。Brennanら、1985 Science 229:81は、インタクトな抗体がタンパク分解的に切断されて $F(ab')$ ₂フラグメントを産生する手順を記載する。これらのフラグメントは、ピシナルジチオールを安定化し、そして分子間ジスルフィド形成を阻止するために、ジチオール錯化剤亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元される。次いで、この産生された $F(ab')$ フラグメントは、チオニトロベンゾエート(TBN)誘導体に変換される。次いで、 $F(ab')-TBN$ 誘導体の1つは、メルカプトエチルアミンでの還元によって $F(ab')-チオール$ に再変換され、そしてこれは等モル量の他の $F(ab')-TBN$ 誘導体と混合されて二重特異的抗体を形成する。生成された二重特異的抗体は、酵素の選択的固定化のための薬剤として使用され得る。

【0145】

さらに、 $F(ab')$ フラグメントは、E. coliから直接回収され得、そして化学的にカップリングされて二重特異的抗体を形成する。Shalabyら、1992 J. Exp. Med. 175:217-225は、完全にヒト化された二重特異的抗体 $F(ab')$ ₂分子の産生を記載する。各 $F(ab')$ フラグメントは、E. coliから別々に分泌され、そしてインビトロの関連する化学的カップリングに供され、二重特異的抗体を形成する。従って、形成されたこの二重特異的抗体は、Erbb2レセプターを過剰発現する細胞および正常なヒトT細胞に結合し得、そしてヒト胸部腫瘍標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解性活性を誘因し得る。

【0146】

組換え細胞培養物から直接二重特異的抗体フラグメントを作製し、そして単離

するための種々の技術が記載されてきた。例えば、二重特異的抗体は、ロイシンジッパーを使用して産生される。Kostelnyら、1992 J. Immunol. 148(5):1547-1553。FosおよびJunタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドは、遺伝子融合によって2つの異なる抗体のFab'部分に結合される。この抗体ホモダイマーは、ヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、次いで再酸化されて抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた、抗体ホモダイマーの産生のために使用され得る。Hollingerら、1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448に記載されるこの「ディアボディー(diabody)」技術は、二重特異的抗体フラグメントを作製するための代替的な機構を提供した。このフラグメントは、短すぎて同じ鎖上の2つのドメインの間で対にできないリンカーによって軽鎖可変領域(V_L)に接続された重鎖可変領域(V_H)を含む。従って、1つのフラグメントのV_H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およびV_Hドメインと対になるように強制され、これによって2つの抗原結合部位が形成される。単鎖Fv(sFv)ダイマーの使用によって二重特異的抗体フラグメントを作製するための別のストラテジーもまた、報告されてきた。Gruberら、1994 J. Immunol. 152:5368を参照のこと。

【0147】

2つ以上の結合価を有する抗体が意図される。例えば、三重特異的抗体が調製され得る。Tuttら、1991 J. Immunol. 147:60。

【0148】

例示的な二重特異的抗体は、2つの異なるエピトープに結合し得、このうち少なくとも1つは、本発明のタンパク質抗原に起源を有する。あるいは、免疫グロブリン分子の抗抗原性アームは、T細胞レセプター分子のような白血球(例えば、CD2、CD3、CD28、またはB7)、あるいはIgGに対するFcレセプター(FcR)(例えば、FcRI(CD64)、FcRII(CD32)およびFcRIII(CD16))上の標的化分子と結合するアームに、特定の抗原を発現する細胞に対する細胞の防御機構に焦点を合わせるように結合され得る。二重特異的抗体はまた、特定の抗原を発現する細胞に対する細胞傷害

性因子に指向するために使用され得る。これらの抗体は抗原結合アーム、および細胞傷害性因子または放射性核種キレーター（例えば、EOTUBE、DPTA、DOTA、またはTETA）に結合するアームを保有する。目的の別の二重特異的抗体は、本明細書中に記載のタンパク質抗原に結合し、そしてさらに組織因子（TF）に結合する。

【0149】

（7．ヘテロ接合体抗体）

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

【0150】

（8．エフェクター機能操作）

本発明のFGF-CX抗体を、エフェクター機能について、例えば癌の処置における抗体の効力を増大するように改変することが望ましい。例えば、システイン残基は、Fc領域に導入され得、これによってこの領域における鎖間ジスルフィド結合の形成を可能にする。従って、作製されるこのホモダイマー抗体は、改良されたインターナリゼーションの可能性および/または増加した補体媒介細胞死滅、ならびに抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を有し得る。Caronら、1192、J. Exp. Med.、176：1191-1195；Shopes、1992、J. Immunol. 148：2918-2922を参照のこと。増大した抗腫瘍活性を有するホモダイマー抗体はまた、Wolffら、1993、Cancer Research、53：2560-2656に記載されるへ

テロ二官能性架橋剤を使用して調製され得る。あるいは、抗体は操作され得、これは二重のFc領域を有し、そしてこれによって増大した補体溶解およびADCCの可能性を有し得る。Stevensonら、1989、*Anti-Cancer Drug Design*, 3:219-230を参照のこと。

【0151】

(9. 免疫接合体)

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

【0152】

このような免疫接合体の作製において有用な化学療法剤は、上記に記載される。使用され得る酵素学的に活性な毒素およびそれらのフラグメントとしては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素A鎖（*Pseudomonas aeruginosa*由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシン（*modeccin*）A鎖、 α -サルシン、*Aleurites fordii*タンパク質、ジアンチン（*dianthin*）タンパク質、*Phytolacca americana*タンパク質（PAPI、PAPII、およびPASP）、モモルディカチャラチア（*momordica charantia*）インヒビター、クルシン（*curcin*）、クロチン（*crotin*）、セパオナリアオフィシナリス（*sepaonaria officinalis*）インヒビター、ゲロニン（*gelonin*）、ミトゲリン（*mitogellin*）、レストリクトシン（*restrictocin*）、フェノマイシン（*phenomycin*）、エノマイシン（*enomycin*）、およびトリコテセン（*tricothecene*）が挙げられる。種々の放射性核種は、放射性結合した抗体の作製のために利用可能である。その例としては、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y、および¹⁸⁶Reが挙げられる。

【0153】

抗体および細胞傷害性因子の接合体は、種々の二官能性タンパク質結合因子（

例えば、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオール) プロピオネート (SPDP)、イミノチオラン (iminothiolane) (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体 (例えば、ジメチルアジピミデート HCL)、活性エステル (例えば、ジスクシンイミジルスベレート)、アルデヒド (例えば、グルタルアルデヒド (glutarelddehyde))、ビスアジド化合物 (例えば、ビス (p - アジドベンゾイル) ヘキサンジアミン)、ビス - ジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミン)、ジイソシアネート (例えば、トリエン 2 , 6 - ジイソシアネート)、およびビス - 活性フッ素化合物 (例えば、1 , 5 - ジフルオロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼン)) を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta ら、Science , 238 : 1098 (1987) に記載されるように調製され得る。炭素 - 14 - 標識 1 - イソチオシアナトベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミン五酢酸 (MX - DTPA) は、放射性ヌクレオチドの抗体への結合のための例示的なキレート剤である。WO94 / 11026 を参照のこと。

【0154】

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

【0155】

(10 . 免疫リポソーム)

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

【0156】

特に、有用であるリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含有する脂質組成物との逆層蒸発法によって生成され得る。リポソームは、規定された孔径のフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームを生じる。本発明の抗体のFab'フラグメントは、Martinら、1982、J. Biol. Chem., 257:286-288に記載のようにジスルフィド交換反応を介してリポソームに結合体化され得る。化学治療剤(例えば、ドキソルビシン)は、必要に応じてリポソーム内に含まれ得る。Gabizonら、1989、J. National Cancer Inst., 81(19):1484を参照のこと。

【0157】

(11.FGF-CXに対して指向された抗体の診断的適用)

本発明のFGF-CXタンパク質に対して指向される抗体は、タンパク質の局在および/または定量化に関連する、当該分野で公知の方法において使用され得る(例えば、適切な生理学的サンプル内のタンパク質のレベルの測定における使用のため、診断方法における使用のため、タンパク質の画像化における使用のためなど)。所定の実施形態では、タンパク質に対する抗体または抗原結合ドメインを含むその誘導体、フラグメント、アナログまたはホモログは、薬理的に活性な化合物として使用される(以下を参照のこと)。

【0158】

本発明のFGF-CXタンパク質に特異的な抗体は、標準技術(例えば、免疫親和性クロマトグラフィまたは免疫沈降)によって、タンパク質を単離するために用いられ得る。このような抗体は、細胞からの天然のタンパク質抗原の精製および宿主細胞において発現される組換え的に産生された抗原の精製を容易にし得る。さらに、抗原タンパク質の発現の量およびパターンを評価するために、このような抗体を用いて(例えば、細胞の溶解液または細胞上清における)抗原タンパク質を検出し得る。FGF-CXタンパク質に対して指向される抗体は、例えば、所定の処置レジメンの有効性を決定するために、臨床試験の手順の一部とし

て組織におけるタンパク質レベルを診断的にモニターするために用いられ得る。検出は、抗体を検出可能物質にカップリングする（すなわち、物理的に連結することにより容易にされ得る。検出可能な物質の例としては、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、生物発光物質および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；適切な補欠分子団複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン(dichlorotriazinylamine)フルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ、そして、適切な放射性物質の例としては ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H が挙げられる。

【0159】

(12. 抗体療法)

本発明のFGF-CX抗体（ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、および完全なヒト抗体を含む）は、治療剤として使用され得る。このような薬剤は、一般的に、被験体における疾患および病理を処置または予防するために使用される。抗体調製物（好ましくは、その標的抗原について高い特異性および高い親和性を有するもの）は、被験体に対して投与され、そして一般的に、その標的との結合に起因して効果を有する。このような効果は、所定の抗体分子と問題の標的抗原との間の相互作用の特異的性質に依存して、2つの種類のうちの1つであり得る。第1の例では、抗体の投与は、標的が天然に結合する内因性リガンドとその標的との結合を抑止または阻害し得る。この場合、抗体は、標的に結合し、そして天然に存在するリガンドの結合部位をマスクし、ここでそのリガンドは、エフェクター分子として働く。従って、レセプターは、シグナル伝達経路を媒介し、リガンドが、シグナル伝達に関係する。

【0160】

あるいは、その効果は、標的分子上のエフェクター結合部位への結合によって、抗体が生理学的結果を誘発するものであり得る。この場合、標的（存在し得ないかまたは疾患もしくは病理を欠損し得る内因性リガンドを有するレセプター）が、代理のエフェクターリガンドとして抗体を結合して、レセプターによって、レセプターに基づくシグナル伝達事象を開始する。

【0161】

治療的に有効な量の本発明の抗体は、治療目的を達成するために必要とされる量を一般的にいう。上記のように、これは、ある場合において標的の機能を妨害し、そして他の場合において生理学的応答を促進する、抗体とその標的抗原との間の結合相互作用であり得る。投与されるために必要とされる量は、その特異的抗原についての抗体の結合親和性にさらに依存し、そしてまた、その量は、投与される抗体が、その抗体が投与される自由な体積の他の被験体から枯渇される速度に依存する。本発明の抗体または抗体フラグメントの治療的有効用量の一般的な範囲は、非限定的な量として、約0.1mg/kg体重～約50mg/kg体重である。一般的な投薬の頻度は、例えば、毎日2回～1週間に1回の範囲であり得る。

【0162】

(13. 抗体の薬学的組成物)

本発明のFGF-CXタンパク質に特異的に結合する抗体、ならびに本明細書中で開示されるスクリーニングアッセイによって同定される他の分子は、薬学的組成物の形態で種々の障害の処置のために投与され得る。このような組成物を調製する際に関する原理および考慮、ならびに成分の選択の際の手引きは、例えば、RemingtonのThe Science And Practice Of Pharmacy 第19編(Alfonso R. Gennaroら、編) 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 D

elivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4)、1991、M. Dekker, New York. に提供される。

【0163】

抗原性タンパク質が、細胞内にあり、そして完全な抗体が、インヒビターとして使用される場合、抗体を内在化することが、好ましい。しかし、リポソームはまた、抗体または抗体フラグメントを細胞に送達するために使用され得る。抗体フラグメントが、使用される場合、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抑制フラグメントが、好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を維持するペプチド分子が、設計され得る。このようなペプチドは、化学的に合成され得、そして/または組み換えDNA技術によって産生され得る。例えば、Marascoら、1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7889-7893を参照のこと。本明細書中の処方物はまた、処置される特定の指標について必要な1より多くの活性化化合物を含み得、好ましくは、互いに悪影響を与えない相補的活性を有する化合物を含み得る。あるいは、またはさらに、この組成物は、その機能を増強する薬剤（例えば、細胞毒性剤、サイトカイン、化学療法剤または増殖抑制剤のような）を含み得る。このような分子は、意図される目的のために有効である量で組み合わせて適切に存在する。

【0164】

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化によって調製されたマイクロカプセル（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン - マイクロカプセルおよびポリ - (メタクリル酸メチル) マイクロカプセル) で、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミン微粒子、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）またはマクロエマルジョンにおいてトラップされ得る。

【0165】

インビボ投与のために使用される処方物は、滅菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。

【0166】

(FGF-CX組換え発現ベクターおよび宿主細胞)

本発明の別の局面は、FGF-CXタンパク質、またはそれらの誘導体、フラグメント、アナログ、もしくはホモログをコードする核酸を含むベクター、好ましくは発現ベクターに関する。本明細書中で使用される場合、用語「ベクター」は、核酸分子が結合された別の核酸を輸送し得るその核酸分子をいう。ベクターの1つの型は「プラスミド」であり、これはさらなるDNAセグメントが連結し得る環状の二本鎖DNAループをいう。ベクターの別の型はウイルス性ベクターであり、ここでさらなるDNAセグメントはこのウイルス性ゲノムに連結され得る。特定のベクターは宿主細胞中で自発的に複製し得、この中に導入される(例えば、細菌の複製起源を有する細菌ベクターおよびエピソームの哺乳類ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳類ベクター)は、宿主細胞に導入される際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、そしてこれによって宿主のゲノムと同調して複製される。さらに、特定のベクターは、これが作動可能に連結される遺伝子の発現を指向し得る。このようなベクターは、本明細書中で「発現ベクター」といわれる。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしばプラスミドの形態である。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、このプラスミドがベクターの最も一般的に使用される形態であるため、交換可能に使用され得る。しかし、本発明は、ウイルス性ベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)のような発現ベクターのこのような他の形態を含むことを意図し、これは等価な機能を果たす。

【0167】

本発明の組換え発現ベクターは、本発明の核酸を、宿主細胞における核酸の発現に適切な形態で含み、これはこの組換え発現ベクターが、発現のために使用される宿主細胞に基いて選択される1つ以上の調節配列を含むこと意味し、これは発現される核酸配列に作動可能に連結される。組換え発現ベクターにおいて、「作動可能に連結」は、目的のヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現を可能にするような様式(例えば、このベクターが宿主細胞に導入される場合、イン

ピトロ転写 / 翻訳系または宿主細胞において)で調節配列に連結されることを意味することを意図する。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメント(例えば、ポリアデニル化シグナル)を含むことを意図する。このような調節配列は、例えば、Goeddel、1990、GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185、Academic Press、San Diego、Calif.に記載されている。調節配列は、多くの型の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指向する配列、および特定の宿主細胞のみにおいてヌクレオチド配列の発現を指向する配列(例えば、組織特異的調節配列)を含む。発現ベクターの設計が形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどのような因子に依存し得ることは当業者に理解される。本発明の発現ベクターは、宿主細胞に導入され、それにより、本明細書に記載されるような核酸によりコードされるタンパク質またはペプチド(融合タンパク質または融合ペプチドを含む)(例えば、FGF-CXタンパク質、FGF-CXの変異形態、融合タンパク質など)を生成し得る。

【0168】

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

【0169】

原核生物におけるタンパク質の発現は、最も頻繁には、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を指向する構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを含むベクターを有するE. coliにおいて実行される。融合ペ

クターは、そこにコードされるタンパク質に、通常、組換えタンパク質のアミノ末端に、多数のアミノ酸を付加する。このような融合ベクターは、代表的には、以下の3つの目的のために役立つ：(i)組換えタンパク質の発現を増加させること；(ii)組換えタンパク質の溶解度を増加させること；および(iii)親和性精製においてリガンドとして作用することによって組換えタンパク質の精製の際に補助すること。しばしば、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解の切断部位が、融合部分の結合部に導入され、そして融合タンパク質の精製の後に、組換えタンパク質が組換えタンパク質の融合部分から分離されることを可能にする。このような酵素、およびその同族の認識配列は、第Xa因子、トロンピン、およびエンテロキナーゼを含む。代表的な融合発現ベクターとしては、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、またはプロテインAを、それぞれ、標的の組換えタンパク質に融合するpGEX(Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson(1988)Gene 67:31-40)、pMAL(New England Biolabs, Beverly, Mass.)およびpRIT5(Pharmacia, Piscataway, N.J.)が挙げられる。

【0170】

適切な誘導性非融合E.coli発現ベクターの例としては、pTrc(Amarranら(1988)Gene 69:301-315)およびpET11d(Studierら、GENE EXPRESSION TECHNOLOGY:METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif.(1990)60-89)が挙げられる。

【0171】

E.coliにおける組換えタンパク質発現を最大化するための1つのストラテジーは、組換えタンパク質をタンパク質分解的に切断する能力が損なわれた宿主細菌中でタンパク質を発現させることである。例えば、Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY:METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San

Diego, Calif. (1990) 119-128を参照のこと。別のストラテジーは、各アミノ酸についての個々のコドンが、E. coliにおいて優先的に利用されるように、発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を変更することである(例えば、Wadaら(1992) Nucl. Acids Res. 20: 2111-2118を参照のこと)。本発明の核酸配列のこのような変更は、標準的なDNA合成技術によって実行され得る。

【0172】

別の実施形態において、FGF-CX発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母*S. cerevisiae*における発現のためのベクターの例には、pYepSec1(Baldarira、(1987)EMBO J 6:229-234)、pMFA(KurjanおよびHerskowitz、(1982)Cell 30:933-943)、pJRY88(Schultzら、(1987)Gene 54:113-123)、pYES2(Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.)、およびpicZ(Invitrogen Corp., San Diego, Calif.)が挙げられる。

【0173】

あるいは、FGF-CXは、バキュロウイルス発現ベクターを使用して、昆虫細胞中で発現され得る。培養された昆虫細胞(例えば、SF9細胞)中でタンパク質の発現のために利用可能なバキュロウイルスベクターには、pAcシリーズ(Smithら(1983)Mol Cell Biol 3:2156-2165)およびpVLシリーズ(LucklowおよびSummers(1989)Virology 170:31-39)が挙げられる。

【0174】

なお別の実施形態において、本発明の核酸は、哺乳動物発現ベクターを使用して、哺乳動物細胞中で発現される。哺乳動物発現ベクターの例には、pCDM8(Seed(1987)Nature 329:840)およびpMT2PC(Kaufmanら(1987)EMBO J 6:187-195)が挙げられる。哺乳動物細胞中で使用される場合、発現ベクターの制御機能は、しばしば、

ウイルスの調節エレメントによって提供される。例えば、一般に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40に由来する。原核生物細胞および真核生物細胞の両方のための他の適切な発現系については、例えば、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989の第16章および第17章を参照のこと。

【0175】

別の実施形態において、組換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型（例えば、組織特異的調節エレメントを使用して核酸を発現する）中で優先的に核酸の発現を指向し得る。組織特異的調節エレメントは、当該分野で公知である。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、アルブミンプロモーター（肝臓特異的；Pinkertら（1987）Genes Dev 1:268-277）、リンパ特異的プロモーター（CalameおよびEaton（1988）Adv Immunol 43:235-275）、特に、T細胞レセプタープロモーター（WinotoおよびBaltimore（1989）EMBO J 8:729-733）および免疫グロブリン（Banerjiら（1983）Cell 33:729-740；QueenおよびBaltimore（1983）Cell 33:741-748）のプロモーター、ニューロン特異的プロモーター（例えば、ニューロフィラメントプロモーター；ByrneおよびRuddle（1989）P.N.A.S. 86:5473-5477）、膵臓特異的プロモーター（Edlundら（1985）Science 230:912-916）、および乳腺特異的プロモーター（例えば、ミルク乳清プロモーター；米国特許第4,873,316号および欧州出願公開第264,166号）が挙げられる。発生的に調節されるプロモーターもまた含まれる（例えば、マウスホックス（murine hox）プロモーター（KesselおよびGruss（1990）Science 249:374-379）および -フ

エトプロテインプロモーター (Campe s および Tilghman (1989) Genes Dev 3:537-546)。

【0176】

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

【0177】

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

【0178】

宿主細胞は、任意の原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。例えば、F

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

【0179】

ベクターDNAは、従来的な形質転換またはトランスフェクション技術を介して原核生物細胞または真核生物細胞に導入され得る。本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」とは、外来性の核酸（例えば、DNA）を宿主細胞中に導入するための当該分野で認識される種々の技術をいうことを意図し、これらには、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、DEAEデキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションが含まれる。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするための適切な方法は、Sambrookら（MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989）および他の実験室マニュアルに見出され得る。

【0180】

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

る（例えば、選択マーカー遺伝子を取り込んだ細胞は生存するが、他の細胞は死滅する）。

【0181】

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

【0182】

（トランスジェニック動物）

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

。本明細書中で使用される場合、「相同組換え動物」とは、非ヒト動物であり、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスであり、ここで、内因性FGF-CX遺伝子は、この内因性の遺伝子と、動物の発生の前に動物の細胞（例えば、動物の胚細胞）に導入された外因性DNA分子との間の相同組換えによって、変更されている。

【0183】

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

るさらなる動物を繁殖させるために使用され得る。さらに、FGF-CXをコードする導入遺伝子を有するトランスジェニック動物は、さらに、他の導入遺伝子を有する他のトランスジェニック動物へと繁殖させ得る。

【0184】

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

【0185】

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

が、内因性FGF-CX遺伝子と相同組換えされた細胞が、選択される(例えば、Liら(1992)Cell 69:915を参照のこと)。

【0186】

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

【0187】

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

をコードした導入遺伝子を含む)を交配することによる、「二重の」トランスジェニック動物の構築によって提供され得る。

【0188】

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

(薬学的組成物)

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

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

【0189】

本発明の薬学的組成物は、その意図される投与の経路と適合するように処方される。投与の経路の例には、非経口（例えば、静脈内、皮内、皮下）投与、経口（例えば、吸入）投与、経皮（局所的）投与、経粘膜（transmucosal）投与、および直腸投与が挙げられる。非経口、皮内または皮下適用のために使用される溶液または懸濁液は、以下の成分を含み得る：注射用水、生理食塩水溶液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒のような滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩などの緩衝液；および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの張度の調節のための薬剤。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調整され得る。非経口調製物は、アンプル、使い捨てシリンジあるいはガラスまたはプラスチックから作製される多用量のバイアル中に入れられ得る。

【0190】

注入使用に適した薬学的組成物は、滅菌の水溶液（ここで、水溶性）または水性分散液、滅菌の注入可能な溶液または分散液の即座調製のための滅菌粉末を含む。静脈内投与について、適切なキャリアには、生理食塩水、静菌性水、Cremophor EL™（BASF、 Parsippany、 N. J.）またはリン酸塩緩衝化生理食塩水（PBS）が挙げられる。全ての場合において、組成物は、滅菌性であるべきであり、そして容易な注入性（syringability）が存在する程度に流動的であるべきである。これは、製造および保存の条件下で安定でなければならず、そして、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保存されるべきである。このキャリアは、例えば、以下を含む溶媒または分散媒であり得る：水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）ならびにそれらの

適切な混合物。適切な流動性が、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合、要求される粒子サイズを維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持され得る。微生物の作用の防止は、種々の抗菌および抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなど）によって達成され得る。多くの場合、組成物中に等張剤（例えば、糖、マンニトール（m a n i t o l）、ソルビトールなどのポリアルコール、塩化ナトリウム）を含むことが好ましい。注入可能組成物の長期の吸収は、吸収を遅らせる薬剤（例えば、アルミニウムモノステアレートおよびゼラチン）を組成物に含ませることによってもたらされ得る。

【0191】

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

【0192】

経口組成物は、一般的に、不活性希釈剤または食用キャリアを含む。これらは、ゼラチンカプセルに封入され得るか、または錠剤へ圧縮され得る。経口治療投与の目的のために、この活性化化合物は、賦形剤とともに組み込まれ得、そして錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤の形態で使用され得る。経口組成物はまた、マウスウォッシュ（m o u t h w a s h）としての使用のために流体キャリアを使用して調製され得、ここで、この流体キャリア中のこの化合物は、経口的に適用され、そして素早く動かされ（スイッシュ）（s w i s h）、そして吐き出されるか、または飲み込まれる。薬学的に適合性の結合剤、および/またはアジュバント材料が、この組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル剤、

トローチ剤などが、任意の以下の成分または同様の性質を有する化合物を含み得る：結合剤（例えば、微結晶セルロース、ガムトラガントまたはゼラチン）；賦形剤（例えば、デンプンまたはラクトース）、崩壊剤（例えば、アルギン酸）、Primogel、またはコーンスターチ；滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはSterotes）；グライダント（glidant）（例えば、コロイド状二酸化ケイ素）；甘味剤（例えば、スクロースまたはサッカリン）；あるいは香味剤（例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバー）。

【0193】

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

【0194】

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

【0195】

これらの化合物はまた、直腸送達のための坐剤（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ベースと共に）または保持浣腸の形態で調製され得る。

【0196】

1つの実施形態において、この活性化合物は、身体からの迅速な排出に対してこの化合物を保護するキャリアを用いて調製され（例えば、制御放出処方物）、これには、移植片およびマイクロカプセル化された送達系が挙げられる。エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルト

エステル、およびポリ乳酸のような、生分解性、生体適合性ポリマーが使用され得る。このような処方物の調製のための方法は、当該業者には明らかである。これらの材料はまた、Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. から商業的に入手可能である。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体で感染させた細胞へ標的化されるリポソームを含む）がまた、薬学的に受容可能なキャリアとして使用され得る。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されるような、当業者に公知の方法に従って調製され得る。

【0197】

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

【0198】

本発明の核酸分子は、ベクターに挿入され得、そして遺伝子治療ベクターとして使用され得る。遺伝子治療ベクターは、被験体へ、例えば、米国特許大5,703,055号に記載されるように、多くの経路のいずれかによって、送達され得る。従って、送達としては、静脈内注射、局所適用（米国特許第5,328,470号を参照のこと）、または定位注射（例えば、Chenら（1994）PNAS 91:3054-3057を参照のこと）が挙げられ得る。遺伝子治療ベクターの薬学的調製物は、受容可能な希釈剤中の遺伝子治療ベクターを含み得るか、または遺伝子送達ビヒクルが組み込まれる徐放性マトリックスが挙げられ得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターが、組換え細胞からインタクトで産生され得る（例えば、レトロウイルスベクター）場合、この薬学的調製物は、遺伝子送達系を産生する1以上の細胞を含み得る。

【0199】

薬学的組成物は、投与のための使用説明書を伴って、容器、包装、またはディスプレイに含まれ得る。

【0200】

(本発明の用途および方法)

本明細書中に記載される、核酸分子、タンパク質、タンパク質ホモログ、および抗体は、以下の方法の1つ以上において使用してされ得る：(a)スクリーニングアッセイ；(b)検出アッセイ(例えば、染色体マッピング、組織タイピング、法生物学)、(c)予測医学(例えば、診断アッセイ、予後アッセイ、臨床試験をモニターすること、およびファーマノゲノミクス(pharmacogenomics))；(d)処置方法(例えば、治療および予防)。本明細書に記載される場合、1つの実施形態において、本発明のFGF-CXタンパク質は、ATPを結合する能力を有する。別の実施形態において、FGF-CXタンパク質は、FGFRを結合する能力を有する。

【0201】

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

【0202】

本発明は、さらに、上述のスクリーニングアッセイによって同定される新規の

薬剤、および本明細書中で記載されるような処置のためのそれらの使用に関する。

【0203】

(スクリーニングアッセイ)

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

【0204】

1つの実施形態において、本発明は、FGF-CXのタンパク質またはポリペプチド、あるいはその生物学的に活性な部分に結合するか、またはそれらの活性を調節する、候補化合物もしくは試験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。本発明の試験化合物は、当該分野において公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数のアプローチのいずれかを使用して得られ得、これらのライブラリーには、以下が挙げられる：生物学的ライブラリー；空間的にアドレス可能な平行固相もしくは溶液相ライブラリー；逆重畳を要する合成ライブラリー法；「1ビーズ1化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法。生物学的ライブラリーアプローチはペプチドライブラリーに限定されるが、他の4つのアプローチが、ペプチド、非ペプチドオリゴマーもしくは化合物の低分子ライブラリーに適用可能である(Lam(1997)Anticancer Drug Des 12:145)。

【0205】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当該分野において、例えば以下に見出され得る：DeWittら(1993)Proc Natl Acad Sci U.S.A. 90:6909；Erbら(1994)Proc Natl Acad Sci U.S.A. 91:11422；Zuckermann

ら(1994) J Med Chem 37:2678; Choら(1993) Science 261:1303; Carrellら(1994) Angew Chem Int Ed Engl 33:2059; Carellら(1994) Angew Chem Int Ed Engl 33:2061; および Gallopら(1994) J Med Chem 37:1233。

【0206】

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

【0207】

1つの実施形態において、アッセイは細胞ベースのアッセイであり、ここで、膜結合形態のFGF-CXタンパク質、またはその生物学的に活性な部分を細胞表面上に発現する細胞が、試験化合物と接触され、そしてこの試験化合物が、FGF-CXタンパク質に結合する能力が、決定される。例えば、細胞は、哺乳動物起源または酵母細胞であり得る。この試験化合物がFGF-CXタンパク質に結合する能力の決定は、例えば、その試験化合物を放射性同位体標識または酵素標識とカップリングさせて、その結果、この試験化合物のFGF-CXタンパク質またはその生物学的に活性な部分に対する結合が、複合体におけるその標識化合物を検出することによって決定され得ることによって達成され得る。例えば、試験化合物は、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^3H で直接的または間接的のいずれか

で標識され得、そしてその放射性同位体が、放射線放射の直接の計数により、またはシンチレーション計数により、検出され得る。あるいは、試験化合物は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識され得、そしてこの酵素的標識が、適切な基質の生成物への転換を決定することにより、検出され得る。1つの実施形態において、このアッセイは、膜結合形態のFGF-CXタンパク質、またはその生物学的に活性な部分をその細胞表面上に発現する細胞を、FGF-CXと結合する公知の化合物と接触させて、アッセイ混合物を形成する工程、このアッセイ混合物に試験化合物を接触させる工程、ならびにこの試験化合物がFGF-CXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程を包含し、ここで、この試験化合物がFGF-CXタンパク質と相互作用する能力を決定する工程が、この試験化合物が、公知の化合物と比較して、FGF-CXまたはその生物学的に活性な部分と優先的に結合する能力を決定する工程を包含する。

【0208】

別の実施形態において、アッセイは、細胞ベースのアッセイであり、これは、膜結合形態のFGF-CXタンパク質またはその生物学的に活性な部分を細胞表面上で発現する細胞を、試験化合物と接触させる工程、ならびにこの試験化合物が、FGF-CXタンパク質またはその生物学的に活性な部分の活性を調節（例えば、刺激または阻害）する能力を決定する工程を包含する。この試験化合物が、FGF-CXまたはその生物学的に活性な部分の活性を調節する能力の決定は、例えば、FGF-CXタンパク質が、FGF-CX標的分子に結合またはこれら標的分子と相互作用する能力を決定することによって、達成され得る。本明細書中において使用する場合には、「標的分子」とは、FGF-CXタンパク質が自然に結合または相互作用する分子であり、例えば、FGF-CX相互作用タンパク質を発現する細胞表面上の分子、第二の細胞表面上の分子、細胞外環境中の分子、細胞膜の内部表面と会合する分子、または細胞質分子である。FGF-CX標的分子は、非FGF-CX分子あるいは本発明のFGF-CXタンパク質またはポリペプチドである。1つの実施形態において、FGF-CX標的分子は、シグナル伝達経路の構成要素であり、これは、細胞膜を通過して細胞内への細胞外

シグナル（例えば、化合物が膜結合 FGF - CX 分子に結合することにより発生するシグナル）の伝達を促進する。その標的は、例えば、触媒活性を有する第二の細胞間タンパク質、または下流シグナル分子の FGF - CX との会合を容易にするタンパク質であり得る。

【0209】

FGF - CX タンパク質が FGF - CX 標的分子に結合するかまたはその標的分子と相互作用する能力の決定は、直接的結合を決定するための上記方法の1つにより、達成され得る。1つの実施形態において、FGF - CX タンパク質が FGF - CX 標的分子に結合するかまたはその標的分子と相互作用する能力の決定は、その標的分子の活性を決定することにより、達成され得る。例えば、この標的分子の活性は、その標的の細胞セカンドメッセンジャー（すなわち、細胞内 Ca^{2+} 、ジアシルグリセロール、 IP_3 など）の誘導を検出すること、適切な基質への標的の触媒活性 / 酵素活性を検出すること、レポーター遺伝子（検出可能なマーカー（例えば、ルシフェラーゼ）をコードする核酸に作動的に連結された FGF - CX 応答性調節エレメントを含む）の誘導を検出すること、または細胞応答（例えば、細胞生存度、細胞分化、または細胞増殖）を検出することにより、決定され得る。

【0210】

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

知の化合物と比較して、FGF-CX、またはその生物学的に活性な部分と優先的に相互作用する能力を決定することを含む。

【0211】

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

【0212】

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

【0213】

本発明の無細胞アッセイは、FGF-CXタンパク質の、可溶性の形態または膜結合形態の両方の使用に受け入れられる。膜結合形態のFGF-CXタンパク質を含む無細胞アッセイの場合には、FGF-CXタンパク質の膜結合形態が溶液中に維持されるように、可溶化剤を利用することが望ましくあり得る。このような可溶化剤の例には、非イオン性界面活性剤が挙げられ、例えば、n-オクチ

ルグルコシド、n - ドデシルグルコシド、n - ドデシルマルトシド、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)、イソトリデシルポリ(エチレングリコールエーテル)_n (Isotridecylpoly(ethylene glycol ether)_n、N - ドデシル - N,N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホネート、3 - (3 - コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ - 1 - プロパンスルホネート(3 - (3 - cholamidopropyl)dimethylamminiol - 1 - propane sulfonate) (CHAPS)、または3 - (3 - コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ - 2 - ヒドロキシ - 1 - プロパンスルホネート(3 - (3 - cholamidopropyl)dimethylamminiol - 2 - hydroxy - 1 - propane sulfonate) (CHAPSO)である。

【0214】

本発明の上記アッセイ方法の1つより多い実施形態において、FGF - CXまたはその標的分子のいずれかを固定して、そのタンパク質の一方または両方の非複合形態からの複合形態の分離を促進し、そしてそのアッセイの自動化に適用させることが、望ましくあり得る。試験化合物の、FGF - CXタンパク質への結合、または候補化合物の存在下および非存在下での、FGF - CXタンパク質の標的分子との相互作用は、これらの反応物を収容するために適切な任意の容器内で、達成され得る。このような容器の例には、マイクロタイタープレート、試験管、および微小遠心管が挙げられる。1実施形態において、そのタンパク質の一方または両方がマトリックスに結合することを可能にするドメインを付加する融合タンパク質が、提供され得る。例えば、GST - FGF - CX融合タンパク質またはGST標的融合タンパク質は、グルタチオンセファロースビーズ(Sigma Chemical, St. Louis, MO)またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着され得、次いでこれらは、試験化合物と合わせられるか、あるいは試験化合物、および吸着されない標的タンパク質またはFGF - CXタンパク質のいずれかと合わせられ、そしてこの混合物が、複合体

形成に貢献する条件下（例えば、塩およびpHに関して生理学的条件）でインキュベートされる。インキュベーションに続いて、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄して、結合していないあらゆる成分を除去し、ビーズの場合にはマトリックスを固定し、例えば上記のように、複合体を直接的または間接的のいずれかで決定する。あるいは、複合体がマトリックスから解離され得、そしてFGF-CXの結合レベルまたは活性レベルを、標準的な技術を使用して決定し得る。

【0215】

タンパク質をマトリックスに固定するための他の技術がまた、本発明のスクリーニングアッセイにおいて使用され得る。例えば、FGF-CX、またはその標的分子のいずれかが、ビオチンとストレプトアビジンとの結合を利用して、固定され得る。ビオチニル化FGF-CX、または標的分子は、当該分野において周知の技術（例えば、ビオチニル化キット、Pierce Chemicals、Rockford, Ill.）を使用して、ビオチン-NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）から調製され得、そしてストレプトアビジンで被覆した96ウェルのプレート（Pierce Chemical）のウェルに固定され得る。あるいは、FGF-CX、または標的分子と反応性であるがFGF-CXタンパク質のその標的分子への結合を妨害しない抗体が、そのプレートのウェルに誘導体化され得、そして結合していない標的またはFGF-CXが、抗体の結合によってウェル内にトラップされ得る。このような複合体を検出するための方法には、GST固定複合体に関しての上記のものに加えて、FGF-CXまたは標的分子と反応性の抗体を使用する、複合体の免疫検出、ならびにFGF-CXまたは標的分子に関する酵素活性の検出に依存する酵素結合アッセイが挙げられる。

【0216】

別の実施形態において、FGF-CX発現のモジュレーターは、細胞を候補化合物と接触させ、そして細胞中のFGF-CX mRNAまたはタンパク質の発現を決定する方法において同定される。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は、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される。次いで、候補化合

物は、この比較に基づいて、FGF-CX mRNAまたはタンパク質発現のモジュレーターとして同定され得る。例えば、FGF-CX mRNAまたはタンパク質の発現が候補化合物の非存在下より、その存在下における方が大きい(すなわち、統計的に有意に大きい)場合、この候補化合物は、FGF-CX mRNAまたはタンパク質の発現の刺激物質として同定される。あるいは、FGF-CX mRNAまたはタンパク質の発現が候補化合物の非存在下よりその存在下の方が少ない(統計的に有意に少ない)場合、この候補化合物は、FGF-CX mRNAまたはタンパク質の発現のインヒビターとして同定される。細胞中のFGF-CX mRNAまたはタンパク質の発現レベルは、FGF-CX mRNAまたはタンパク質を検出するために本明細書中に記載の方法によって決定され得る。

【0217】

本発明のなお別の局面において、FGF-CXタンパク質は、ツーハイブリッドアッセイまたはスリーハイブリッドアッセイにおいて「ベイトタンパク質」として使用されて(例えば、米国特許第5,283,317号;Zervosら(1993)Cell 72:223-232;Maduraら、1993 J. Biol. Chem. 268:12046-12054;Bartelら、1993 Biotechniques 14:920-924;Iwabuchiら、1993 Oncogene 8:1693-1696;およびBrent WO94/10300を参照のこと)、FGF-CX(「FGF-CX結合タンパク質」または「FGF-CX-bp」)に結合するか、またはこれと相互作用し、そしてFGF-CX活性を調節する他のタンパク質を同定し得る。このようなFGF-CX結合タンパク質はまた、例えば、FGF-CX経路の上流または下流エレメントとしてFGF-CXタンパク質によるシグナル伝達に関与するようである。

【0218】

ツーハイブリッドシステムは、分離可能なDNA結合ドメインおよび活性化ドメインからなる、大部分の転写因子のモジュラー的性質に基づく。簡潔には、このアッセイは、2つの異なるDNA構築物を利用する。一方の構築物においては

、FGF-CXをコードする遺伝子が公知の転写因子（例えば、GAL-4）のDNA結合ドメインをコードする遺伝子に融合される。他方の構築物においては、DNA配列のライブラリー由来の、未同定タンパク質（「プレイ」または「サンプル」）をコードするDNA配列が、公知の転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子に融合される。「ベイト」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し得る場合、この転写因子のDNA結合ドメインおよび活性化ドメインは、非常に近くにある。近位にあることにより、転写因子に応答性の転写調節部位に作動可能に連結され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が検出され得、そして機能的転写因子を含む細胞コロニーは、単離され得、そしてFGF-CXと相互作用するタンパク質をコードするクローニングされた遺伝子を得るために使用され得る。

【0219】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイにより同定される新規な薬剤および本明細書中に記載されるような処置のためのこの薬剤の使用に関する。

【0220】

（検出アッセイ）

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

【0221】

本発明のFGF-CX配列はまた、わずかな生物学的サンプルから個体を識別するために使用され得る。この技術において、個体のゲノムDNAは、1つ以上の制限酵素で消化され、そして同定のために独特のバンドを生成するためにサザンプロット上でプローブされる。本発明の配列は、RFLP（米国特許第5,272,057号に記載の「制限フラグメント長多型」）のためのさらなるDNA

マーカーとして有用である。

【0222】

さらに、本発明の配列を用いて、個体のゲノムの選択された部分について実際の塩基ごとにDNA配列を決定する代替的技術を提供し得る。従って、本明細書中に記載のFGF-CX配列を用いて、配列の5'末端および3'末端から2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使用して、個体のDNAを増幅し得、引き続いて、配列決定し得る。

【0223】

このように調製された個体由来の対応するDNA配列のパネルは、各個体が、対立遺伝子差異に起因するこのようなDNA配列の独特のセットを有するので、唯一の個体識別を提供し得る。本発明の配列は、個体由来および組織由来の配列のこのような識別を得るために使用され得る。本発明のFGF-CX配列は、ヒトゲノムの部分を独特に表す。対立遺伝子変異は、これらの配列のコード領域においてある程度生じ、そして非コード領域においてより大きな程度に生じる。個々のヒト間での対立遺伝子変異は、各500塩基につき約1回の頻度で生じると見積もられる。対立遺伝子変異の多さは、制限フラグメント長多型(RFLP)を含む単一ヌクレオチド多型(SNP)に起因する。

【0224】

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

【0225】

(予測医療)

本発明はまた、診断アッセイ、予後アッセイ、薬物ゲノム(pharmacogenomics)

genomics) およびモニタリング臨床試験が、予後(予測)の目的に使用され、これによって個体を予防的に処置する、予測医療の分野に関する。従って、本発明の1つの局面は、FGF-CXタンパク質および/または核酸の発現、ならびにFGF-CXの活性を、生物学的サンプル(例えば、血液、血清、細胞、組織)の状況で決定し、これによって、異常なFGF-CXの発現または活性に関連して、個体が疾患または障害に罹患するかどうか、あるいは障害を発症するリスクがあるかどうかを決定するための診断アッセイに関する。本発明はまた、個体がFGF-CXタンパク質、核酸発現または活性と関連する障害を発症する危険性があるか否かを決定するための予後(または、予測)アッセイを提供する。例えば、FGF-CX遺伝子における変異は、生物学的サンプル中でアッセイされ得る。このようなアッセイは、予後または予測目的のために使用され得、このようなアッセイにより、FGF-CXタンパク質、核酸発現または活性により特徴付けられるかこれらと関連する障害の発症前に個体が予防的に処置される。

【0226】

本発明の別の局面は、個体において、FGF-CXタンパク質、核酸発現またはFGF-CX活性を決定するための方法を提供し、これによりその個体のための適切な治療薬または予防剤(本明細書中で「薬物ゲノム」という)を選択する。薬理ゲノムは、個体の遺伝子型(例えば、特定の薬剤に対して応答する個体の能力を決定するために試験される個体の遺伝子型)に基づく、個体の治療処置または予防処置のための薬剤(例えば、薬物)の選択を可能にする。

【0227】

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

【0228】

これらの薬剤および他の薬剤は、以下の章にさらに詳細に記載される。

【0229】

(診断アッセイ)

線維芽細胞増殖因子FGF-1~FGF-9は、一般的に特定の増殖因子レセ

プターを保有する細胞における細胞増殖を促進する。FGF増殖促進の例としては、手術後の眼前部における、上皮細胞（例えば、線維芽細胞およびケラチノサイト）が挙げられる。細胞の増殖が役割を果たす他の状態としては、腫瘍、再狭窄、乾癬、デュブイトラン拘縮、糖尿病合併症、カポジ肉腫および慢性関節リウマチが挙げられる。

【0230】

FGF-CXは、サンプルまたは組織において、その対応する線維芽細胞増殖因子レセプターCX（FGFRCX）を検出するための本発明の方法において使用され得る。この方法は、FGF-CXとサンプルまたは組織とを接触させる工程、レセプター-リガンド対を形成させる工程、および任意のFGFRCX:FGF-CX対を検出する工程を包含する。FGF-CXを含む組成物を使用して、FGFRCX活性を増加（例えば、軟骨または骨の修復を刺激）させ得る。FGF-CXアンタゴニストまたはFGF-CX結合剤（例えば、抗FGF-CX抗体）を含む組成物を使用して、過剰のFGF-CXまたはFGFRCXの過剰活性により引き起こされる疾患（特に、多発性または孤立性の遺伝性外骨腫症、外反母趾奇形、軟骨無形成症、滑液膜軟骨腫症および軟骨内腫（*endochondroma*））を処置し得る。

【0231】

グリア活性化因子（GAF）およびGAFをコードするDNAは、グリア細胞の増殖を特異的に促進するように作用する。グリア細胞活性を調節するためにGAFが使用され得るグリア関連障害のいくつかの例は、大脳損傷、大脳浮腫、老年痴呆、アルツハイマー病、糖尿病性ニューロパシーなどである。同様に、FGF-CXを、グリア細胞関連障害の診断または処置において使用し得る。FGF-CXのグリア細胞調節活性は、神経保護様活性であるようであり得、そしてFGF-CXは、神経保護剤として使用され得る。グリア活性化因子として本来同定されているFGF-9に対するFGF-CXの近い相同性に起因して、FGF-CX配列がまた、グリア活性化因子であることが推定され得る。従って、FGF-CXを使用して、グリア細胞の増殖を刺激し得、そしてFGF-CXを使用して、大脳損傷の治癒を促進し得るか、または大脳浮腫、老年痴呆、アルツハイ

マー病、もしくは糖尿病ニューロパシーを処置し得る。

【0232】

FGF-CXはまた、線維芽細胞（熱傷、創傷、潰瘍などの治癒を促進するため）、巨核球（血小板の数を増加させるため）、造血細胞、免疫系細胞、および脈管平滑筋細胞を刺激するために使用され得る。FGF-CXはまた、骨形成促進活性を有することが期待されており、そして骨折および骨粗鬆症を処置するために使用され得る。FGF-CXポリペプチドまたは核酸部分のアッセイは、脳腫瘍の診断に有用であり得、そしてFGF-CXポリペプチドまたは核酸部分に対する抗体は、このような腫瘍を処置するために使用され得る。これはまた、培養細胞の増殖を刺激するための薬剤として使用され得る。予想される用量は、1 ng ~ 0.1 mg / kg / 日であるが、処置は、処置される障害の型または重篤度に依存して変化し得る。FGF-CXポリペプチドは、血小板増加剤、骨形成促進剤として、または脳神経疾患または肝硬変のような肝障害を処置するために使用され得る。これらはまた、平行して抗癌剤を使用した場合に、癌を処置するために使用され得る。FGF-CXポリペプチド、またはそのフラグメント、誘導体、もしくはアナログに対して指向された抗体は、FGF-CXポリペプチドの生物学的活性を検出するためもしくは決定するため、またはFGF-CXポリペプチドを精製するために使用され得る。FGF-CXの細胞増殖活性をまた中和するこれらの抗体は、抗癌剤として使用され得る。

【0233】

全てではないが、多くの相同タンパク質は、密接に関連する機能または同一の機能を有することが当該分野で公知である。例えば、Lewin、「21章：Structural Genes Belong to Families」In: GENES II, 1985, John Wiley and Sons, Inc., New Yorkを参照のこと。FGF-CXポリペプチドは、Xenopus XFGF-CXタンパク質と密接に類似しており、このタンパク質は、高度に増殖性の組織において特異的に発現されることが以前に示された（例えば、Kogara、上記を参照のこと）。従って、FGF-CXはまた、高度に増殖性の組織において、細胞の活性を調節すると推定される。従って、FGF-

CXは、このような増殖が抑制または阻害される病的状態を克服するために、増殖性障害を診断する際ならびに細胞および組織の増殖を刺激する際に特に有用であり得る。配列番号1のFGF-CX核酸の任意の一部に対応するオリゴヌクレオチドは、FGF-CX様遺伝子の発現を検出するために使用され得る。本発明のタンパク質は、このタンパク質と特異的に結合する抗体の産生を刺激するために使用され得る。このような抗体は、サンプル中でのタンパク質の発生を検出するための免疫診断手順において使用され得る。本発明のタンパク質は、このような増殖が好都合である条件下で細胞の成長および細胞の増殖を刺激するために使用され得る。例は、例えば、造血および血小板の形成、胃腸管の管壁、ならびに毛包における化学療法剤の毒性副作用を打ち消すことである。これによりまた、神経学的障害において新しい細胞の増殖を刺激するために使用され得、これらの障害としては、例えば、アルツハイマー病が挙げられる。あるいは、本発明のFGF-CX様タンパク質と特異的に結合する抗体により、このタンパク質の特異的増殖誘導効果を排除する、拮抗的処置が実施される。このような抗体を、例えば、種々の腫瘍および良性の過形成を含む増殖性障害の処置において有用であり得る。

【0234】

生物学的サンプルにおけるFGF-CXの存在または非存在を検出するための例示的な方法は、試験被験体から生物学的サンプルを得る工程、およびその生物学的サンプルと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）を検出し得る化合物もしくは薬剤とを接触させ、その結果、FGF-CXの存在が、その生物学的サンプルにおいて検出される、工程を包含する。FGF-CXのmRNAもしくはゲノムDNAを検出するための薬剤は、FGF-CXのmRNAもしくはゲノムDNAにハイブリダイズし得る、標識された核酸プローブである。この核酸プローブは、例えば、全長のFGF-CX核酸（例えば、SEQ ID NO: 1もしくはその部分の核酸（例えば、少なくとも、15、30、50、100、250もしくは500ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであり、ストリンジェントな条件下で上記のようなFGF-CXのmRNAまたはゲノムDNAと特異的にハイブリダ

イズするに十分である核酸)) であり得る。本発明の診断アッセイにおける使用のための他の適切なプローブは本明細書において記載されている。

【0235】

F G F - C X タンパク質を検出するための薬剤は、F G F - C X タンパク質に結合し得る抗体であり、好ましくは、検出可能な標識を有する抗体である。抗体は、ポリクローナルであり得るか、またはより好ましくはモノクローナル抗体であり得る。インタクトな抗体またはそのフラグメント（例えば、F a b または F (a b ')₂）が使用され得る。用語「標識（された）」とは、プローブまたは抗体に関して、検出可能な物質をそのプローブもしくは抗体にカップリングさせる（すなわち、物理的に連結する）ことによって、そのプローブまたは抗体を直接標識すること、ならびに、直接的に標識される別の薬剤との反応性によって、そのプローブもしくは抗体を間接的に標識することを包含することが意図される。間接的な標識の例としては、蛍光標識された二次抗体を用いた一次抗体の検出、および蛍光標識されたストレプトアビジンを用いて検出され得るようにDNAプローブのビオチンを用いた末端標識が挙げられる。用語「生物学的サンプル」とは、被験体から単離された、組織、細胞および生物学的流体ならびに被験体に存在する組織、細胞および流体を含むことが意図される。すなわち、本発明の検出方法を用いて、F G F - C X の mRNA、タンパク質またはゲノムDNAを、生物学的サンプル中で、インビトロおよびインビボで検出し得る。例えば、F G F - C X mRNA の検出のためのインビトロ技術としては、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。F G F - C X タンパク質の検出のためのインビトロ技術としては、酵素連結免疫吸着アッセイ（E L I S A）、ウェスタンブロット、免疫沈降および免疫蛍光が挙げられる。F G F - C X ゲノムDNAを検出するためのインビトロ技術としては、サザンハイブリダイゼーションが挙げられる。さらに、F G F - C X タンパク質の検出のためのインビボ技術としては、標識された抗F G F - C X 抗体を被験体に導入することが挙げられる。例えば、その抗体は、放射性マーカを用いて標識され得る。この被験体における放射性マーカの存在および位置は、標準的な画像化技術によって検出され得る。

【0236】

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

【0237】

別の実施形態において、本発明の方法はさらに、コントロール被験体からコントロール生物学的サンプルを得る工程、そのコントロールサンプルを、FGF-CXのタンパク質、mRNAもしくはゲノムを検出し得る化合物もしくは薬剤と接触させ、その結果、FGF-CXのタンパク質、mRNAもしくはゲノムDNAの存在がその生物学的サンプルにおいて検出される、工程、およびそのコントロールサンプルにおけるFGF-CXのタンパク質、mRNAもしくはゲノムDNAの存在と、その試験サンプルにおけるFGF-CXのタンパク質、mRNAもしくはゲノムDNAの存在とを比較する工程を包含する。

【0238】

本発明はまた、生物学的サンプルにおけるFGF-CXの存在を検出するためのキットを包含する。例えば、このキットは、以下を備え得る：生物学的サンプルにおいてFGF-CXのタンパク質またはmRNAを検出し得る、標識された化合物もしくは薬剤；そのサンプルにおいてFGF-CXの量を決定するための手段；およびそのサンプルにおいて、FGF-CXの量を標準と比較するための手段。この化合物または薬剤は、適切な容器内に包装され得る。このキットは、さらに、FGF-CXのタンパク質または核酸を検出するためにキットを用いるための説明書を備え得る。

【0239】

(予後アッセイ)

本明細書において記載された診断方法をさらに利用して、FGF-CXの異常発現または異常活性に関連した疾患もしくは障害を有するか、またはその発症の危険にある被験体を同定し得る。例えば、本明細書に記載されるアッセイ(例え

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

【0240】

さらに、本明細書に記載される予後アッセイを使用して、被験体に薬剤(例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣物、タンパク質、ペプチド、核酸、低分子、または他の薬物候補)を投与してFGF-CXの異常発現または異常活性に関連する疾患または障害を処置され得るか否かを、決定し得る。例えば、このような方法を利用して、被験体に障害(例えば、増殖性障害、分化性障害、グリア関連障害など)のための薬剤を用いて、有効に処置され得るか否かを、決定し得る。例えば、従って、本発明は、FGF-CXの異常発現または異常活性に関連する障害についての薬剤を用いて、被験体が有効に処置され得るか否かを決定するための方法を提供する。ここで、試験サンプルが得られ、そしてFGF-CXのタンパク質または核酸が検出される(例えば、ここで、FGF-CXのタンパク質または核酸の存在は、この薬剤を投与してFGF-CXの異常発現

または異常活性に関連する障害が処置され得る被験体についての、診断指標である)。

【0241】

本発明の方法はまた、FGF-CX遺伝子における遺伝的損傷を検出するために使用され、それによって、その損傷遺伝子を有する被験体が増殖性障害、分化性障害、グリア関連障害などについての危険に有るかまたはそれを被っているか否かを決定し得る。種々の実施形態において、この方法は、その被験体からの細胞のサンプルにおいて、FGF-CXタンパク質をコードする遺伝子の統合性に影響を与える変更の少なくとも1つによって特徴付けられる遺伝的損傷の存在または非存在、あるいはFGF-CX遺伝子の誤発現を検出する工程を包含する。例えば、そのような遺伝的損傷は、以下の少なくとも1つの存在を確認することによって検出され得る：(1) FGF-CX遺伝子からの1つ以上のヌクレオチドの欠失；(2) FGF-CX遺伝子への1つ以上のヌクレオチドの付加；(3) FGF-CX遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換、(4) FGF-CX遺伝子の染色体再配置；(5) FGF-CX遺伝子のメッセンジャーRNA転写物のレベルにおける変更、(6) FGF-CX遺伝子の異常改変(例えば、ゲノムDNAのメチル化パターンの異常改変)、(7) FGF-CX遺伝子のメッセンジャーRNA転写物の非野生型スプライシングパターンの存在、(8) FGF-CXタンパク質の非野生型レベル、(9) FGF-CX遺伝子の対立遺伝子の欠失、ならびに(10) FGF-CXタンパク質の不適切な翻訳後改変。本明細書において記載されるように、当該分野において、FGF-CX遺伝子における損傷を検出するために使用され得る、多数の公知のアッセイ技術が存在する。好ましい生物学的サンプルは、従来手段によって被験体から単離された末梢血白血球サンプルである。しかし、有核細胞を含む任意の生物学的サンプルが使用され得、これには、例えば、頬粘膜細胞が挙げられる。

【0242】

特定の実施形態において、損傷の検出は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(例えば、米国特許第4,683,195号および同4,683,202号を参照のこと)(例えば、アンカーPCRまたはRACE PCR)、あるいは、連結

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

【0243】

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

【0244】

代替の実施形態において、サンプル細胞からの FGF-CX 遺伝子における変異は、制限酵素切断パターンにおける変更によって同定され得る。例えば、サンプルおよびコントロールの DNA が単離され、増幅され (必要に応じて)、1つ以上の制限エンドヌクレアーゼを用いて消化され、そしてフラグメント長の大き

さがゲル電気泳動によって決定され、そして比較される。サンプルDNAとコントロールDNAとの間のフラグメント長の大きさにおける差異は、そのサンプルDNAにおける変異を示す。さらに、配列特異的なリボザイムの使用（例えば、米国特許第5,493,531号を参照のこと）を使用して、リボザイム切断部位の発生または欠失によって特異的な変異の存在についてスコア付けし得る。

【0245】

他の実施形態において、FGF-CXにおける遺伝子変異は、サンプル核酸およびコントロール核酸（例えば、DNAまたはRNA）を、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含む高密度アレイに対してハイブリダイズさせることによって同定され得る（Croninら（1996）*Human Mutation* 7:244-255；Kozalら（1996）*Nature Medicine* 2:753-759）。例えば、FGF-CXにおける遺伝子変異は、Croninら、上記、のように光生成DNAプローブを含む二次元アレイにおいて同定され得る。手短には、プローブの第一ハイブリダイゼーションアレイを用いて、サンプルおよびコントロールにおける長いストレッチのDNAにわたって走査し、連続的に重複するプローブの線形アレイを作成することによって、その配列間の塩基変化を同定し得る。この工程は、点変異の同定を可能にする。この工程に続いて、第二のハイブリダイゼーションアレイを用い、これは、検出される全ての改変体または変異体に相補的な、より小さな特化されたプローブアレイを用いて、特定の変異の特徴付けを可能にする。各変異アレイは、一方が野生型遺伝子に対して相補的であり、そして他方が変異遺伝子に対して相補である並行プローブセットから構成される。

【0246】

なお別の実施形態において、当該分野で公知の種々の配列決定反応のいずれかを使用して、FGF-CX遺伝子を直接配列決定し得、そしてサンプルのFGF-CX配列と対応する野生型（コントロール）配列とを比較することによって、変異を検出し得る。配列決定反応の例としては、MaxamおよびGilbert（1977）*PNAS* 74:560またはSanger（1977）*PNAS* 74:5463によって開発された技術に基づくものが挙げられる。診断ア

ッセイを実施する場合、種々の自動化配列決定手順のいずれかを利用し得ることもまた意図される(Naeveら、(1995) *Biotechniques* 19:448)。これらには、質量分析法による配列決定法(例えば、PCT国際公開番号WO 94/16101; Cohenら(1996) *Adv Chromatogr* 36:127-162; およびGriffinら(1993) *Appl Biochem Biotechnol* 38:147-159を参照のこと)が含まれる。

【0247】

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

【0248】

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

【0249】

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

【0250】

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

【0251】

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

【0252】

あるいは、選択的PCR増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術は、本発明と合わせて使用され得る。特異的増幅のためのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中心において(その結果、増幅は、差次的ハイブリダイゼーションに依存する)(Gibbsら(1989) *Nucleic Acids Res* 17:2437~2448)か、もしくは適切な条件下でミスマ

ッチが妨げられ得るかまたはポリメラーゼ伸長を減少し得る、1つのプライマーの3'の最末端で、目的の変異を保有する(Prossner(1993) *Tibtech* 11:238)。さらに、変異の領域において新規な制限部位を導入することは、切断に基づく検出を行うために望ましくあり得る(例えば、Gaspariniら(1992) *Mol Cell Probes* 6:1を参照のこと)。特定の実施形態において、増幅はまた、増幅用Taqリガーゼを使用して実施され得ることが予測される(例えば、Barany(1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:189を参照のこと)。このような場合において、連結は、5'配列の3'末端に完全なマッチが存在する場合にのみ生じ、増幅の存在または非存在を探索することによって、特定の部位で既知の変異の存在を検出することを可能にする。

【0253】

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

【0254】

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

【0255】

(薬理ゲノム学(Pharmacogenomics))

FGF-CX活性(例えば、FGF-CX遺伝子発現)に対する刺激性または阻害性の効果を有する因子、すなわちモジュレーターは、本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定されるように、異常なFGF-CX活性に関連する障害(例えば、神経学的障害、癌関連障害または妊娠性障害)を処置(予防的または治療的に)するために個体に投与され得る。このような処置と合

わせて、個体の薬理ゲノム学（すなわち、個体の遺伝子型と外来化合物または薬物に対するその個体の応答との間の関係についての研究）が、考慮され得る。治療剤の代謝における差異は、薬理的に活性な薬物の用量と血中濃度との間の関係を変更することによって、重篤な毒性または治療の失敗を導き得る。従って、個体の薬理ゲノム学は、個体の遺伝子型の考慮に基づく予防的または治療的処置のために有効な薬剤（例えば、薬物）の選択を許容する。このような薬理ゲノム学は、さらに、適切な投薬量および治療剤レジメンを決定するために使用され得る。従って、FGF-CXタンパク質の活性、FGF-CX核酸の発現、あるいは個体におけるFGF-CX遺伝子の変異含量が決定されて、それによって個体の治療的または予防的処置のために適切な薬剤を選択し得る。

【0256】

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

【0257】

例示的な実施形態として、薬物代謝酵素の活性は、薬物作用の強度および期間の両方の主要な決定因子である。薬物代謝酵素（例えば、N-アセチルトランスフェラーゼ2（NAT2）およびシトクロムP450酵素CYP2D6およびCYP2C19）の遺伝的多型の発見は、幾人かの患者が予期される薬物効果を得

ないか、または薬物の標準的かつ安全な用量を摂取した後に過大な薬物応答および深刻な毒性を示すことに関しての説明を提供した。これらの多型は、集団において2つの表現型（高い代謝能を持つ人（*extensive metabolizer*）（EM）および低い代謝能を持つ人（*poor metabolizer*）（PM））で発現される。PMの罹患率は、異なる集団の間で異なる。例えば、CYP2D6をコードする遺伝子は高度に多型であり、そしていくらかの変異がPMにおいて同定されており、この全ては機能的CYP2D6の非存在に至る。CYP2D6およびCYP2C19の低い代謝能を持つ人は、彼らが標準的な用量を受けるときに、かなり頻繁に過大な薬物応答および副作用を経験する。代謝産物が活性な治療的部分である場合、そのCYP2D6形成代謝産物であるモルヒネによって媒介されるコデインの鎮痛効果について実証されるように、PMは治療的応答を示さない。他の極端なものは、標準的な用量に反応しない、いわゆる超迅速な代謝能を持つ人である。最近、超迅速な代謝の基準となる分子は、CYP2D6遺伝子増幅に起因していることが同定されている。

【0258】

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

【0259】

（臨床的な効力のモニタリング）

FGF-CXの発現または活性（例えば、異常な細胞増殖および/または分化を調節する能力）に対する薬剤（例えば、薬物、化合物）の影響をモニタリングすることは、基本的な薬物スクリーニングにおいて、および臨床試験において適

用され得る。例えば、本明細書中に記載されるようなスクリーニングアッセイによって決定される薬剤が、FGF-CXの遺伝子発現、タンパク質レベルを増加、またはFGF-CX活性をアップレギュレートする効力が、減少したFGF-CXの遺伝子発現、タンパク質レベル、またはダウンレギュレートしたFGF-CXの活性を示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。あるいは、スクリーニングアッセイによって決定される薬剤が、FGF-CXの遺伝子発現、タンパク質レベルを減少、またはFGF-CXの活性をダウンレギュレートする効力が、増加したFGF-CXの遺伝子発現、タンパク質レベル、またはアップレギュレートしたFGF-CXの活性を示す被験体の臨床試験においてモニターされ得る。このような臨床試験において、FGF-CXの発現または活性、および好ましくは、例えば、増殖性障害または神経学的障害に關与している他の遺伝子が、「リードアウト(読み出し)(read out)」、すなわち、特定の細胞の免疫応答のマーカーとして使用され得る。

【0260】

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

【0261】

1つの実施形態において、本発明は、薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、タンパク質、ペプチド、核酸、ペプチド模倣物、低分子、または本明細書中に記載されるスクリーニングアッセイによって同定される他の薬物候補物）を用いて、被験体の処置の効力をモニタリングするための方法を提供し、これは、以下の工程を包含する：（i）薬剤の投与の前に、被験体から投与前サンプルを得る工程；（ii）この投与前サンプルにおいて、FGF-CXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現のレベルを検出する工程；（iii）この被験体から1つ以上の投与後サンプルを得る工程；（iv）この投与後サンプルにおいて、FGF-CXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現もしくは活性のレベルを検出する工程；（v）この投与前サンプルにおけるFGF-CXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現もしくは活性のレベルを、この投与後サンプルにおけるFGF-CXのタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの発現もしくは活性のレベルと比較する工程；ならびに（vi）結果的に、この被験体に対する薬剤の投与を変更する工程。例えば、この薬剤の増加した投与は、検出されるよりも高いレベルにFGF-CXの発現または活性を増加するために（すなわち、この薬剤の効力を増加するために）望ましくあり得る。あるいは、この薬剤の減少した投与は、検出されるよりも低いレベルにFGF-CXの発現または活性を減少するために（すなわち、この薬剤の効力を減少するために）望ましくあり得る。

【0262】

（処置の方法）

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

【0263】

（その疾患または障害に罹患していない被験体と比較して）増加したレベルまたは生物学的活性によって特徴付けられる疾患または障害は、活性を拮抗する（すなわち、低減または阻害する）治療剤（Therapeutic）を用いて処置され得る。活性を拮抗する治療剤は、治療的または予防的な様式で、投与され

得る。利用され得る治療剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：(i) FGF - CXポリペプチド、またはそのアナログ、誘導体、フラグメントもしくはホモログ；(ii) FGF - CXペプチドに対する抗体；(iii) FGF - CXペプチドをコードする核酸；(iv) 相同組換えによってFGF - CXポリペプチドの内因性機能を「ロックアウトする」ために利用される、アンチセンス核酸および「機能不全性」である（すなわち、FGF - CXペプチドに対するコード配列のコード配列内の異種挿入に起因する）核酸の投与（例えば、Capecchi、1989、Science 244：1288～1292を参照のこと）；または(v) FGF - CXペプチドとその結合パートナーとの間の相互作用を変化させる、調節因子（すなわち、インヒビター、アゴニストおよびアンタゴニスト（本発明のさらなるペプチド模倣物または本発明のペプチドに対して特異的な抗体を含む））。

【0264】

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

【0265】

増加したレベルまたは減少したレベルは、ペプチドおよび/またはRNAを定量することによって、容易に検出され得る。この定量は、患者の組織サンプルを（例えば、生検組織から）入手し、そしてそのサンプルを、その発現したペプチド（またはFGF - CXペプチドのmRNA）のRNAレベルまたはペプチドレベル、構造および/または活性をインビトロでアッセイすることによる。当該分野において周知の方法としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：イムノアッセイ（例えば、ウェスタンブロット分析、免疫沈降後の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、免疫細胞化学などによ

る)および/またはmRNAの発現を検出するためのハイブリダイゼーションアッセイ(例えば、ノーザンアッセイ、ドットプロット、インサイチュハイブリダイゼーションなど)。

【0266】

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

【0267】

本発明の別の局面は、治療目的のために、FGF-CXの発現または活性を調節する方法に関する。本発明の調節方法は、細胞を、その細胞に関するFGF-CXタンパク質活性の1つ以上の活性を調節する薬剤と接触させる工程を包含する。FGF-CXタンパク質活性を調節する薬剤は、核酸またはタンパク質、FGF-CXタンパク質の天然に存在する同族リガンド、ペプチド、FGF-CXペプチド模倣物、または他の低分子のような、本明細書中に記載の薬剤であり得る。1つの実施形態において、この薬剤は、1つ以上のFGF-CXタンパク質活性を刺激する。このような刺激薬剤の例としては、活性なFGF-CXタンパク質、およびその細胞に導入されたFGF-CXをコードする核酸分子が挙げられる。別の実施形態において、この薬剤は、1つ以上のFGF-CXタンパク質活性を阻害する。このような阻害薬剤の例としては、アンチセンスFGF-CX核酸分子、および抗FGF-CX抗体が挙げられる。これらの調節方法は、イン

ビトロで（例えば、その薬剤とともにその細胞を培養することによって）、あるいはインビボで（例えば、被験体にその薬剤を投与することによって）実施され得る。このように、本発明は、FGF-CXのタンパク質または核酸分子の、異常な発現または異常な活性によって特徴付けられる、疾患または障害に罹患した個体を処置する方法を提供する。1つの実施形態において、この方法は、FGF-CXの発現または活性を調節する（例えば、アップレギュレートまたはダウンレギュレートする）薬剤（例えば、本明細書中に記載のスクリーニングアッセイによって同定される薬剤）あるいはそのような薬剤の組み合わせを投与する工程を包含する。別の実施形態において、この方法は、FGF-CXのタンパク質または核酸分子を、低減したかまたは異常な、FGF-CXの発現または活性を補償するための治療として、投与する工程を包含する。

【0268】

本発明はさらに、以下の非限定的な例において例示される。

【0269】

（実施例）

（実施例1．FGF-CX遺伝子の同定）

FGF-CX遺伝子を、問い合わせ（query）としてXenopus FGF-CX（Kogaら、1999 Biochem. Biophys. Res. Comm. 261, 756-765；登録番号AB012615）を用いる、GenBankヒトゲノムDNA配列のTBLASTN（Alschulら、1990 J. Mol. Biol. 215, 403-410）検索後に同定した。この検索は、第8染色体上に高い相同性の遺伝子座（登録番号AB020858）を同定した。イントロン/エキソン境界を、既知のFGFに由来する相同性と共に、標準的なコンセンサスプライシングパラメータ（Mount 1996 Science 271, 1690-1692）を使用して推定した。FGF-CX開始コドンは、AB020858の配列のbp16214に局在し、そしてこのエキソンの残りの3'部分は、bp15930まで続く。FGF-CXの5'UTRは、公開EST（登録番号AA232729、AA236522、AI272876およびAI272878）を使用して、さらなる606bpによ

って開始コドンの上流に伸長された。遺伝子座A B 0 2 0 8 5 8に関連する、F G F - C X 遺伝子の残りの構造は以下の通りである：イントロン1 (b p 1 5 9 2 9 - 9 9 4 2) ; エキソン2 (b p 9 9 4 1 - 9 8 3 8) ; イントロン2 (b p 9 8 3 7 - 7 5 0 0) ; エキソン3 (b p 7 4 9 9 にて始まり、そして図13に示されるように続く ; 3 ' U T R の構造は、まだ決定されていない)。

【0270】

前節の手順により発見された遺伝子は、3つのエキソンおよび2つのイントロンを含む(図13)。DNA配列は、211アミノ酸残基のORFを推定し、イニシエータメチオニンの117bp上流にインフレームの終止コドンを含む。遺伝子が調べられたDNAセグメントは、染色体8p21.3-p22にマッピングされ、その位置を放射ハイブリッド分析(radiation hybrid analysis)により確認した(実施例2を参照のこと)。

【0271】

PROSITE検索(Bucher & Bairoch 1994 Ismb. 2:53-61)によって同定されたFGFシグネチャーモチーフ(G-X-[LI]-X-[STAGP]-X(6,7)-[DE]-C-X-[FLM]-X-E-X(6)-Y)は、アミノ酸残基125~148の間に位置し、2重下線が引かれおり、そしてイントロン/エキソン境界は、矢印で示される。イントロン1および2は、それぞれ、5988bp長および2338bp長である。5'UTR配列は、公開ESTに由来し、そしてその全体は示されていない。

【0272】

(実施例2.FGF-CXの放射ハイブリッドマッピング)

ヒト染色体マーカーを使用する放射ハイブリッドマッピングをFGF-CXについて実施した。使用される手順は、Steenらにおいて記載される手順と類似している。(A High-Density Integrated Genetic Linkage and Radiation Hybrid Map of the Laboratory Rat, Genome Research 1999(1999年5月21日にオンラインで公開された)第9巻、AP1-AP8, 1999)。無作為化放射線誘導ヒト染色体フラグメントを含

む93細胞クローンのパネルを、独特の様式で、得ようとするクローンを同定するために設計されたPCRプライマーを使用して、96ウェルプレートにおいてスクリーニングした。FGF-CXをコードするヌクレオチド配列が同定されたDNAセグメントに、染色体8p21.3-p22にマッピングされるとして注釈をつけた。この結果を、FGF-CXがマーカーAFM177XB10と重複し、そしてマーカーWI-5104から1.6cRおよびマーカーWI-9262から3.2cRにある遺伝子座にて第8染色体にマッピングされることを見出すことによって本発明の分析により精緻にした。

【0273】

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

FGF-CX順方向: 5' - CTCGTCAGATCTCCACCATGGCTCCCTTAGCCGAAGTC - 3' (配列番号3)

FGF-CX逆方向: 5' - CTCGTCCTCGAGAGTGTACATCAGTAGGTCCTTG - 3' (配列番号4)。

【0274】

PCR反応を、50マイクロリットル容量において、合計5ngのヒト前立腺cDNAテンプレート、それぞれ1μMのFGF-CX順方向プライマーおよびFGF-CX逆方向プライマー、5マイクロモルdNTP(Clontech Laboratories, Palo Alto CA)および1マイクロリットルの50x Advantage-HF2ポリメラーゼ(Clontech Laboratories)を使用して実施した。以下のPCR反応条件を使用した:

a) 96 3分

b) 96 30秒変性

c) 70 30秒、プライマーアニーリング。この温度は、1 / サイクルで徐々に下げられた。

【0275】

d) 72 1分伸長

工程 (b) ~ (d) を 10 回繰り返す

e) 96 30秒変性

f) 60 30秒アニーリング

g) 72 1分伸長

工程 (e) ~ (g) を 25 回繰り返す

h) 72 5分の最終伸長。

【0276】

単一PCR産物 (約 640 bp の推定されたサイズを有する) を、アガロースゲルで電気泳動後に単離し、pCR2.1ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA) に連結した。クローン化したインサートを、ベクター特異的M13順方向 (- 40) プライマーおよびM13逆方向プライマーを使用して配列決定し、そのヌクレオチド配列が、図1 (配列番号1) の配列と100%同一であり、上流Bg1IIクローニング部位と下流XhoIクローニング部位との間に直接挿入されていることを確認した。クローン化された配列は、推定FGF-CX全長タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを構成する。このクローンは、TA-AB02085-S274-F19と呼ばれる。

【0277】

(実施例 4 . 哺乳動物発現ベクター pCEP4 / Sec の調製)

オリゴヌクレオチドプライマー pSec-V5-His 順方向 (CTCGTCCTCGAGGGTAAGCCTATCCCTAAC (配列番号 14)) および pSec-V5-His 逆方向 (CTCGTCGGGCCCTGATCAGCGGGTTTAAAC (配列番号 15)) を設計し、V5 および His6 を含む pcDNA3.1-V5His (Invitrogen, Carlsbad, CA

) 発現ベクターからフラグメントを増幅した。PCR産物を、XhoIおよびApaIで消化し、そしてIg リーダー配列 (Invitrogen, Carlsbad CA) を含む、XhoI/ApaI消化したpSecTag2Bベクターに連結した。得られたベクターの正確な構造 (インフレームでIg - リーダーおよびV5 - His6を含むpSecV5His) を、DNA配列分析により確認した。ベクターpSecV5HisをPmeIおよびNheIで消化して、上記エレメントを保持するフラグメントを正確なフレームで提供した。このPmeI - NheIフラグメントを、BamHI/KlenowおよびNheI処理されたベクターpCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) に連結した。得られたベクターはpCEP4/Secと命名され、そしてPCMVおよび/またはPT7プロモーターの制御下に、インフレームIg リーダー、目的のクローンの挿入部位、ならびにV5エピトープおよび6xHisを含む。pCEP4/Secは、任意のタンパク質をIg 鎖シグナルペプチド後のマルチクローニング部位の中に融合することによって異種タンパク質発現および分泌を可能に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 - 末端におけるV5エピトープタグおよび6xHisタグの存在により補助される (Invitrogen, Carlsbad, CA)。

【0278】

(実施例5 . ヒト胚性腎臓 (HEK) 293細胞におけるFGF - CXの発現)

FGF - CX配列含有BglII - XhoIフラグメントを、TA - AB02085 - S274 - F19から単離し (実施例3)、そしてBamHI - XhoIで消化したpCEP4/Secにサブクローン化し、発現ベクターpCEP4/Sec - FGF - CXを作製した。このpCEP4/Sec - FGF - CXベクターを、LipofectaminePlus試薬を製造業者の指示 (Gibco/BRL/Life Technologies, Rockville, MD) を使用して、293細胞にトランスフェクトした。細胞ペレットおよび上清を、トランスフェクション後72時間で収集し、抗V5抗体を用いてウェスタンブロッティング法 (還元条件) によってFGF - CX発現について試験した。図

12は、FGF-CXが、293細胞により分泌されるおよそ34kDaのタンパク質の見掛けの分子量(Mr)を有するポリペプチドとして発現されることを示す。さらに、小さなバンドが、約31kDaにおいて観察される。

【0279】

(実施例6.E.coliにおけるFGF-CXの発現)

ベクターpRSETA(Invitrogen Inc., Carlsbad, CA)をXhoIおよびNcoI制限酵素で消化した。オリゴヌクレオチドリンカーの配列5'CATGGTCAGCCTAC3'(配列番号16)および5'TCGAGTAGGCTGAC3'(配列番号17)を、摂氏37度にてアニールし、XhoI-NcoI処理したpRSETAに連結した。得られたベクターを、制限分析および配列決定によって確認し、そしてpETMYと命名した。FGF-CXをコードする配列のBglII-XhoIフラグメント(実施例3を参照のこと)を、BamHIおよびXhoI制限酵素で消化したベクターpETMYに連結した。発現ベクターは、pETMY-FGF-CXと命名される。このベクターにおいて、hFGF-CXを、そのN末端において6xHisタグおよびT7エピトープに融合した。次いで、プラスミドpETMY-FGF-CXを、E.coli発現宿主BL21(DE3,pLys)(Novagen, Madison, WI)にトランスフェクトし、そしてタンパク質FGF-CXの発現を、製造業者の指示に従って誘導した。誘導後、全細胞を収集し、そしてタンパク質を、抗-HisGly抗体(Invitrogen, Carlsbad, CA)を使用して、ウェスタンブロッティング法により分析した。図14は、FGF-CXが、分子量約32kDaのタンパク質として発現されたということを示す。

【0280】

(実施例7.クローン化されたシグナルペプチドを伴う組換えFGF-CXタンパク質、および、伴わない組換えFGF-CX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に記述されるように、FGF-CXは、古典的アミノ末端シグナル配列を明らかに欠失している。FGF-CXが哺乳動物細胞から分泌さ

れるか否かを決定するために、BglII-XhoIフラグメントとして得られたcDNA（これは、全長FGF-CXタンパク質をコードしている）を、TAB02085-S274-F19（実施例3）からBamHI/XhoI消化したpcDNA3.1（Invitrogen）にサブクローン化した。これは、pFGF-CXと命名される哺乳動物発現ベクターを提供した。この構築物は、それぞれ、その同定および精製の際に補助するように、タンパク質のカルボキシ末端にV5エピトープタグおよびポリヒスチジンタグを組み入れており、そして約27kDaのポリペプチドを産生する。293ヒト胚性腎臓細胞への一過性トランスフェクション後、馴化培地を、トランスフェクション後48時間で収集した。

【0281】

馴化培地へのFGF-CXの分泌に加えて、細胞ペレット/細胞外マトリックス（ECM）画分と関連するということがまた見出された（データは示さず）。FGFは、細胞表面およびECMに存在する硫酸ヘパリンプロテオグリカン（HSPG）と結合することが知られているので、本発明者らは、FGF-CXがこの様式で隔離されているか否かを研究した。FGF-CXトランスフェクト細胞を、100μMスラミン（増殖因子とHSPGとの間の低親和性相互作用を崩壊することが公知である化合物）を含有する0.5ml DMEMを用いて、30分間、4℃で処理することによって抽出し（La Roccaら、1990、Cancer Cells 2、106-115）。次いで、スラミン抽出された馴化培地を収集し、そして遠心分離（5分間；2000×g）によって清澄化した。

【0282】

次いで、馴化培地およびスラミン抽出物を等容量の2×ゲルローディング緩衝液と混合した。サンプルを10分間煮沸し、還元条件下において4～20%勾配ポリアクリルアミドゲル（Novex, Dan Diego, CA）でSDS-PAGEによって分離させ、そしてニトロセルロースフィルター（Novex）へ移した。ウェスタン分析を、HRP結合体化抗V5抗体（Invitrogen）およびECL検出システム（Amersham Pharmacia Bi

otech, Piscataway, NJ) を使用する標準的な手順に従って実施した。

【0283】

推定される分子量を有する1つのバンドを、pFGF-CXでトランスフェクトした293細胞に由来する馴化培地において同定した(図11A、レーン1)。コントロールベクターでトランスフェクトした細胞に由来する馴化培地は、抗体と反応しなかった(図11A、レーン5)。スラミン処理後、有意量のFGF-CXが、細胞表面/ECMから実際に放出され得ることが見出され、このことは、おそらく、HSPGがこのタンパク質を隔離する際に役割を果たすということを示唆している(図11A、レーン2)。これらの結果は、FGF-CXが、古典的なシグナルペプチドを伴わずに分泌され得ることを示唆する。

【0284】

組換えFGF-CXタンパク質は、DNA合成および細胞増殖(これらは、おそらく、FGF-CXの細胞表面レセプターへの高親和性結合によって媒介されて、そしてHSPGとの低親和性相互作用によって調節される効果である)を刺激する。スラミン抽出データは、FGF-CXが細胞表面および/またはECM上に存在するHSPGと結合するということを示唆する。

【0285】

(b) シグナルペプチドを伴なう発現)

タンパク質分泌を増強させる目的で、構築物(pCEP4/Sec-FGF-CX)を作製し、ここでそのFGF-CX cDNAを、Ig 遺伝子由来の切断可能アミノ末端分泌シグナル配列とインフレームで融合させた。得られたタンパク質はまた、pFGF-CXについて上述されるようなカルボキシ末端V5およびポリヒスチジンタグを含んだ。293細胞へのトランスフェクション後、約31kDaという推定分子量を有するタンパク質産物を入手し、そしてスラミンが有意量の隔離FGF-CXタンパク質を放出することを再び見出した(図11A;レーン3および4)。予想どおり、pCEP4/Sec-FGF-CXは、pFGF-CXが産生するよりも多くの可溶性FGF-CXタンパク質を産生した。

【0286】

293細胞について上述される結果と類似する結果が、NIH 3T3細胞についてもまた得られた(図11B)。

【0287】

(実施例8 . PCRによるFGF - CX核酸の実時間の定量的発現分析)

種々のクローンの定量的発現を、Perkin - Elmer Biosystems ABI PRISM (登録商標) 7700配列検出システムで実施される実時間定量的PCR (TAQMAN (登録商標) 分析) によって、41個の正常サンプルおよび55個の腫瘍サンプル(ほとんどの場合、図15Aおよび図15Bに示されるサンプルは、表3において同定されたサンプルである) において評価した。

【0288】

初めに、96個のRNAサンプルを、 β -アクチンおよびグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GAPDH) に対して正規化した。RNA(合計約50ngまたは約1ngポリA+)を、製造業者のプロトコルに従って、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) およびランダムヘキサマーを使用してcDNAに転換した。反応を20 μ lにおいて実施し、そして30分間、48 $^{\circ}$ Cにおいてインキュベートした。次いで、cDNA(5 μ l)を、製造業者のプロトコルに従って、 β -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) ならびにTAQMAN (登録商標) ユニバーサルPCR Master Mix (PE Biosystems; カタログ番号4304447) を使用するTAQMAN (登録商標) 反応のために別個のプレートに移した。反応を、以下のパラメータを使用して25 μ lにおいて実施した: 50 $^{\circ}$ Cにて2分; 95 $^{\circ}$ Cにて10分; 95 $^{\circ}$ Cにて15秒/60 $^{\circ}$ Cにて1分(40サイクル)。結果は、対数スケールを使用してCT値(所定のサンプルが蛍光の閾値レベルを越えるサイクル)として記録され、所定のサンプルと最も小さなCT値を有するサンプルとの間のRNA濃度におけ

る差異が CT の二乗として表された。次いで、このRNA差の逆数を取り、そして100を掛けることにより相対発現パーセントを得る。アクチンおよびGAPDHについて得られる平均CT値を使用して、RNAサンプルを正規化した。最高のCT値を生成するRNAサンプルは、さらなる希釈を必要としないが、全ての他のサンプルをそれらの - アクチン / GAPDH平均CT値に従って、このサンプルに対して希釈した。

【0289】

正規化されたRNA (5 μ l) をcDNAに転換し、そして製造業者の指示に従って、One Step RT-PCR Master Mix Reagents (PE Biosystems ; カタログ番号4309169) および遺伝子特異的プライマーを使用するTAQMAN (登録商標) によって分析した。プローブおよびプライマーを、入力としてクローン10326230.0.38の配列を使用するPerkin Elmer Biosystem's Primer Express Softwareパッケージ (Apple ComputerのMacintosh Power PC用バージョンI) に従って、各アッセイのために設計した。デフォルト設定を反応条件に使用し、そして以下のパラメータをプライマーを選択する前に設定した：プライマー濃度 = 250 nM、プライマー融解温度 (T_m) 範囲 = 58 ~ 60、プライマー最適 T_m = 59、最大プライマー差 = 2、プローブは、5' Gを有さず、プローブ T_m は、プライマー T_m よりも10 高くなければならない、アンプリコンサイズは、75 bp ~ 100 bpである。選択されたプローブおよびプライマー (下記を参照のこと) を、Synthegen (Houston, TX, USA) によって合成した。プローブを、HPLCにより二重精製して、結合していない色素を取り除き、そして質量分析法により評価して、それぞれ、プローブの5' 末端および3' 末端へのレポーター色素および消光色素の結合を確認した。これらの最終濃度は、以下の通りであった：順方向プライマーおよび逆方向プライマーは、各々900 nM、ならびにプローブは、200 nM。

【0290】

PCRのために、各組織および各細胞株由来の正規化RNAを、96ウェルP

CRプレート(Perkin Elmer Biosystems)の各ウェルにスポットした。2つのプローブ(FGF-CXに対して特異的な1つ、および、内部標準として供される第2の遺伝子特異的プローブ)を、PE Biosystems 7700用1 x TaqMan™ PCR Master Mixを使用して、5mM MgCl₂, dNTPs(dA, G, C, U(1:1:1:2比率))、0.25 U/ml AmpliTaq Gold™(PE Biosystems)および0.4 U/μl RNaseインヒビター、ならびに0.25 U/μl 逆転写酵素と共にセットした。逆転写を、48 °Cで30分間実施し、次いで、以下のような増幅/PCRサイクルを実施した: 95 °Cで10分間、次いで、以下の40サイクル: 95 °Cで15秒間、60 °Cで1分間。

【0291】

【表3】

表3. TaqMan発現分析において使用された組織サンプル

番号	組織サンプル	番号	組織サンプル
1	内皮細胞	49	腎癌腫 786-0
2	内皮細胞(処理)	50	腎癌腫 A498
3	膵臓	51	腎癌腫 RXF 393
4	膵臓癌腫 CAPAN2	52	腎癌腫 ACHN
5	脂肪	53	腎癌腫 UO-31
6	副腎	54	腎癌腫 TK-10
7	甲状腺	55	肝臓
8	唾液腺	56	肝臓(胎児)
9	下垂体	57	肝臓癌腫(胚芽腫)HepG2
10	脳(胎児)	58	肺
11	脳(全体)	59	肺(胎児)
12	脳(扁桃)	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(小細胞改変体)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	脊髓	66	肺癌腫(非小細胞)HOP-62
19	CNS癌腫(神経膠腫/星状細胞腫)U87-MG	67	肺癌腫(非小細胞)NCI-H522
20	CNS癌腫(神経膠腫/星状細胞腫)U-118-MG	68	肺癌腫(鱗状)SW 900
21	CNS癌腫(星状細胞腫)SW1783	69	肺癌腫(鱗状)NCI-H596
22	CNS癌腫*(神経芽腫;転移)SK-N-AS	70	乳腺
23	CNS癌腫(星状細胞腫)SF-539	71	乳癌腫*(胸水)MCF-7
24	CNS癌腫(星状細胞腫)SNB-75	72	乳癌腫*(胸水)MDA-MB-231
25	CNS癌腫(神経膠腫)SNB-19	73	乳癌腫*(胸水)T47D
26	CNS癌腫(神経膠腫)U251	74	乳癌腫BT-549
27	CNS癌腫(神経膠腫)SF-295	75	乳癌腫MDA-N

(表3の続き)

28	心臓	76	卵巢
29	骨格筋	77	卵巢癌腫OVCAR-3
30	骨髓	78	卵巢癌腫OVCAR-4
31	胸腺	79	卵巢癌腫OVCAR-5
32	脾臓	80	卵巢癌腫OVCAR-8
33	リンパ節	81	卵巢癌腫IGROV-1
34	結腸(上行)	82	卵巢癌腫*(腹水)SK-OV-3
35	胃	83	子宮筋層
36	小腸	84	子宮
37	結腸癌腫SW480	85	胎盤
38	結腸癌腫*(SW480転移)SW620	86	前立腺
39	結腸癌腫HT29	87	前立腺癌腫*(骨転移)PC-3
40	結腸癌腫HCT-116	88	精巣
41	結腸癌腫CaCo-2	89	黒色腫Hs688(A).T
42	結腸癌腫HCT-15	90	黒色腫*(転移)Hs688(B).T
43	結腸癌腫HCC-2998	91	黒色腫UACC-62
44	胃癌腫*(肝臓転移)NCI-N87	92	黒色腫M14
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

表3に対する略語:ca.=癌腫;*=転移から確立された;met=転移;s cell var=小細胞改変体;non-s=non-sm=非小細胞;squam=鱗状;pl. eff=pl effusion=胸水;glio=神経膠腫;astro=星状細胞腫;および,neuro=神経芽腫

以下のプライマーおよびプローブを設計した。各々は、図1(配列番号1)の塩基270~塩基343の領域に及びFGF-CX.Set Ag81bに特異的であるように、高度に相同なヒトFGF-9遺伝子およびFGF-16遺伝子の対応領域に対して最小3つのミスマッチを保有する。これは、他の公知のFGFファミリーメンバーを検出するべきではない。プライマーおよびプローブは、以下を利用した:

【0292】

【化1】

Ag81b (F): 5'-GGACCACAGCCTCTTCGGTA-3' (SEQ ID NO:18);
 Ag81b (R): 5'-TGTCCACACCTCTAATACTGACCAG-3' (SEQ ID NO:19); および
 Ag81b (P): 5'-FAM-CCCCTGCCCACACTGATGAATTCCAA-TAMRA-3' (SEQ ID NO:20)

代表的な実験からの結果を、図15Aおよび図15Bに示す。発現を、最高レベルの発現を示すサンプルのパーセンテージとしてプロットする。四連の泳動をなし、これを、種々に陰影を付けたバーで表した。試験された39個の正常ヒト組織において、FGF-CXは、脳、特に小脳において最も高度に発現されることが見出された(図15Aおよび図15B)。中枢神経系の他の組織は、はるかにより弱いレベルのFGF-CXを発現した。試験された54個のヒト腫瘍細胞株のうち、FGF-CXは、肺癌腫細胞株(LX-1)、結腸癌腫細胞株(SW-480)、結腸癌細胞株および転移(SW480)、ならびに胃癌腫細胞株(NCI-N87; 図15Aおよび図15Bを参照のこと)において、最も高度に発現されることが見出された。

【0293】

さらなる実時間の発現分析を、外科手術の間に得られた腫瘍組織の広範なパネルにおいて実施した。これらの組織は、それ自体実際の腫瘍由来の部分、ならびに代表的に既に炎症しており、そして形成異常の組織学的証拠を示す、「正常隣接組織(NAT)」と称される部分を含む。FGF-CXに特異的であるように選択されたプライマー-プローブセット(Ag81)を、このような外科組織サンプルと共にTaqMan実験において使用した。ここでは、二連の泳動を実施した:

【0294】

【化2】

Ag81 (F): 5'-AGGCAGAAGCGGGAGATAGAT-3' (SEQ ID NO:21);
 Ag81 (R): 5'-AGCAGCTTTACCTCATTTCACAATG-3' (SEQ ID NO:22);
 Ag81 (P): TET-5'-CCATCTACATCCACCACCAGTTGCAGAA-3'-TAMRA
 (SEQ ID NO:23).

。Set Ag81は、図1(配列番号1)の塩基477~塩基554の領域に及ぶ。この複写物は、図15Cおよび図15Dにおいて、灰色および黒の陰影をつけたバーとして示される。この結果は、腫瘍およびその形成異常性NATサンプルの多くの一致した対について、FGF-CXが、腫瘍自体ではなくNATにおいて;より詳細には、腫瘍に隣接した実質細胞において、高度に発現されることを劇的に示す。この一致したパターンを生じる例としては、卵巣癌、膀胱癌、子宮癌、肺癌、前立腺癌、および肝臓癌が挙げられる。

【0295】

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

【0296】

一致しない正常組織と比較した、FGF-CXの発現プロフィールの上昇は、FGF-CXが、腫瘍進行における予定的(prospective)または促進的な役割を果たすことを示唆する。従って、多くの標的化アプローチ(制限することのない例として、モノクローナル抗体、リボザイム、アンチセンスオリゴヌクレオチド、FGF-CXと同族(cognate)レセプターとの相互作用を中和するペプチド、およびFGF-CXについての未同定レセプターを調節する小分子の薬物を含む)のいずれかを使用するFGF-CXの治療的標的化は、疾患進行に対してポジティブな治療的影響を有すると予期される。同様に、腫瘍進行におけるFGF-CXの生物活性を調節するためのこのような薬剤の使用は

、従来の化学療法および放射線療法に相乗作用を与えるか、またはそれらを増強すると予期される。FGF-CXの治療的標的化が適用され得る特定の疾患適用としては、結腸、前立腺、肺、腎臓、子宮、乳房、膀胱、卵巣の腺癌が挙げられる。

【0297】

(実施例9．組換えFGF-CXによって取りこまれるプロモデオキシウリジンの刺激)

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

【0298】

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

【0299】

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

【0300】

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

【0301】

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

【0302】

(実施例10. 組換えFGF-CXによる細胞増殖の誘導)

組換えFGF-CXが細胞増殖を誘導するか否かを決定するために、NIH 3

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

【0303】

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

【0304】

より高い細胞密度を達成することに加えて(図17)、実施例9に記載のように調製されたFGF-CXの存在下で培養されたNIH 3T3細胞は、無秩序な増殖パターンを示した。これは、接触阻害の欠損を示す(図18)。さらに、個々の細胞は、細長くかつ屈曲性であることが見出された。これらの結果は、FGF-CXが、増殖因子として作用することを示し、そして組換えFGF-CXが、NIH 3T3細胞の形態学的トランスフォーメーションを媒介することを示唆する。

【0305】

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

NIH 3T3細胞を、製造業者(Life Technologies)のプロトコールに従ってLipofectamine Plusを用いることにより、pCEP4/Sec-FGF-CXまたはコントロールベクターでトランスフェクトした。細胞に、トランスフェクションの5時間後、10%仔ウシ血清(CS; Life Technologies)を補充した。pCEP4/Sec

- FGF - CXトランスフェクト細胞は、トランスフェクションの48時間後までに形態学的にトランスフォーメーションされ、そしてその形態学的トランスフォーメーションを、ハイグロマイシン含有増殖培地中での2週間の選択後に維持した。対照的に、コントロールベクターでトランスフェクトされた細胞は、その正常な形態を維持した(データは示さず)。従って、トランスフェクトされた細胞は、例えば、実施例10に報告された実験に基づいて予期されたように挙動する。

【0306】

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

【0307】

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

【0308】

インビボでのFGF - CXの異所性発現がNIH 3T3細胞の腫瘍形成性を

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

【0309】

(等価物)

前述した本発明の特定の実施形態の詳細な説明から、特定の新規な組成物および方法(核酸、ポリペプチド、抗体、検出および処置を含む)が記載されたことが明白であるはずである。これらの特定の実施形態は、本明細書中に詳細に開示されているが、これは、例示目的のためのみに例としてなされ、そして先に添付した特許請求の範囲に関して制限することを意図しない。特に、種々の置換物、変更および改変が、特許請求の範囲によって規定される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、当業者には慣用的事項として本発明に対してなされ得るということが本発明によって意図される。実際、本明細書の記載事項に加えて本発明の種々の改変が、前述の説明および添付の図面から当業者には明らかとなる。このような改変は、添付の特許請求の範囲内にあることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明の新規なFGF-CX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)および翻訳されたアミノ酸配列(配列番号2)を示す。

【図2】

図2は、配列番号1の核酸配列と、FGF-9様グリア活性化因子(GAF)配列(配列番号5)とのBLASTN整列である。

【図3】

図3A、図3Bおよび図3Cは、配列番号1の相補(マイナス)鎖と、ヒト第8染色体の肝細胞結腸直腸および非小細胞肺癌セグメント1/11のp21.3-p22癌抑制遺伝子(GenBank登録番号AB020858)の伸長されたゲノムDNAフラグメントの3つの連続しないセグメント(それぞれ、図3A、図3Bおよび図3Cに示す配列番号6~8)とのBLASTN整列である。

【図4】

図4は、4つの脊椎動物FGF様タンパク質(配列番号9~12)と、本発明のFGF-CXタンパク質(配列番号2)とのClustalW整列である。黒、灰色、および白色は、それぞれ整列中の同一の残基、保存された残基、および保存されてない残基を示す。

【図5】

図5は、FGF-CXと3つの他のFGFファミリーメンバーとのClustalW整列である。FGF-CXを、ヒトFGF-9、ヒトFGF-16およびXenopusのFGF-CX(それぞれ、登録番号D14838、AB009391およびAB012615)と整列させた。

【図6】

図6は、FGF-CXポリペプチド配列(配列番号2)のプラス鎖とヒトFGF-9(線維芽増殖因子-9(FGF-9))(HBGF-9);グリア活性化因子前駆体(GAF)(配列番号9)とのBLASTP整列であり、208塩基のうち147塩基(70%)が同一(「|」)であり、208塩基のうち170塩基(81%)がポジティブ(陽性)(「+」)残基であることを示す。

【図7】

図7は、FGF-CXポリペプチド配列(配列番号2)のプラス鎖とマウスFGF-9(配列番号10)とのBLASTX整列であり、これは、208塩基のうち147塩基(70%)が同一(「|」)であり、そして208塩基のうち170塩基(81%)がポジティブ(陽性)(「+」)残基であることを示す。(スコア=775(272.8ビット)、期待値=3.4e-76, P=3.4e-76)。

【図8】

図8は、FGF-CXポリペプチド配列(配列番号2)のプラス鎖とラットFGF-9(配列番号11)とのBLASTX整列であり、これは、208塩基のうち147塩基(70%)が同一(「|」)であり、そして208塩基のうち170がポジティブ(陽性)(「+」)残基であることを示す。(スコア=775(272.8ビット)、期待値=3.4e-76, P=3.4e-76)。

【図9】

図9は、FGF-CXポリペプチド配列(配列番号2)のプラス鎖とXenopus XFGF-CX(配列番号12)とのBLASTX整列であり、これは、211塩基のうち170(80%)が同一(「|」)であり、そして211塩基のうち189(89%)が陽性(「+」)残基であることを示す。(スコア=906(318.9ビット)、期待値=4.4e-90, P=4.4e-90)。

【図10】

図10は、19残基ウィンドウで作成された配列番号2のFGF-CXポリペプチドの疎水性親水性プロットを示す。

【図11】

図11は、FGF-CXのウエスタン分析を示す。示した構築物で一過性にトランスフェクトした293細胞(図11A)またはNIH 3T3細胞(図11B)由来のサンプルを、抗V5抗体を用いるウエスタン分析により試験した。CM=馴化培地、SE=スラミン抽出馴化培地。分子量マーカーを左側に示す。

【図12】

図12は、293細胞により分泌されるFGF-CXタンパク質のウエスタン分析を示す。

【図13】

図13は、FGF-CXのヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を含む、FGF-CX遺伝子の分析を示す。開始コドンおよび終止コドンは太字であり、そして5'UTRに位置するインフレーム終止コドンに下線を付す。

【図14】

図14は、E.coli細胞において発現されたFGF-CXタンパク質のウ

エステン分析を示す。

【図15】

図15A、図15B、図15Cおよび図15Dは、FGF-CX特異的TaqMan試薬を用いてリアルタイム定量的PCRにより得たFGF-CXの発現の分析を示す。正常なヒト組織サンプル由来の正規化RNAについての結果を図15Aに、そして腫瘍細胞株由来の結果を図15Bに示す。手術中に直接得られた腫瘍組織を用いて得られた結果を図15Cおよび図15Dに示す。

【図16】

図16A、図16Bおよび図16Cは、組換えFGF-CXの生物学的活性を示す。この活性は、DNA合成に対する組換えFGF-CXの効果により示される。細胞を血清枯渇させ、18時間、示した因子とともにインキュベートし、そしてBrdU取り込みアッセイで分析した。サンプルを三連で実施した。図16Aは、NIH 3T3マウス線維芽細胞である。図16Bは、CCD-1070ヒト線維芽細胞である。図16Cは、CCD-1106ヒトケラチノサイトである。

【図17】

図17は、組換えFGF-CXの生物学的活性を示す。この活性は、細胞増殖に対する組換えFGF-CXの効果により示される。NIH 3T3細胞を、示した因子を補充した無血清培地とともにインキュベートし、48時間後に計数した。サンプルを二連で実施した。

【図18】

図18は、組換えFGF-CXの生物学的活性を示す。この活性は、細胞形態に対する組換えFGF-CXの効果により示される。NIH 3T3細胞を、FGF-CXまたはコントロールタンパク質とともに48時間インキュベートし、そして倍率25×で写真に撮った。

【図19】

図19は、FGF-CXの腫瘍形成活性を示すグラフである。示した構築物で安定にトランスフェクトしたNIH 3T3細胞を無胸腺ヌードマウスの皮下組織に注射し、そして2週間以上にわたって腫瘍形成について試験した。各データ

ポイントについて、最小で4匹の動物を用いた。

【図1】

```

1 ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGGCTTCTGGGCGGCCTGGAG
  MetAlaProLeuAlaGluValGlyGlyPheLeuGlyGlyLeuGlu
46 GGCTTGGGCCAGCAGGTGGGTTGCAATTCCTGTTGCCTCCTGCC
  GlyLeuGlyGlnGlnValGlySerHisPheLeuLeuProProAla
91 GGGAGCGGCCCGCCGCTGCTGGGCGAGCGCAGGAGCGCGGCGGAG
  GlyGluArgProProLeuLeuGlyGluArgArgSerAlaAlaGlu
136 CGGAGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCTGCGCAGCTGGCGCACCTG
  ArgSerAlaArgGlyGlyProGlyAlaAlaGlnLeuAlaHisLeu
181 CACGGCATCCTGCGCCCGGCAGCTCTATTGCCGCACCGGCTTC
  HisGlyIleLeuArgArgArgGlnLeuTyrCysArgThrGlyPhe
226 CACCTGCAGATCCTGCCCCGCGCAGCGTGCAGGGCACCCGGCAG
  HisLeuGlnIleLeuProAspGlySerValGlnGlyThrArgGln
271 GACCACAGCCTCTTCGGTATCTTGAATTCATCAGTGTGGCAGTG
  AspHisSerLeuPheGlyIleLeuGluPheIleSerValAlaVal
316 GGACTGGTCAGTATTAGAGGTGTGGACAGTGGTCTCTATCTTGG
  GlyLeuValSerIleArgGlyValAspSerGlyLeuTyrLeuGly
361 ATGAATGACAAAGGAGAACTCTATGGATCAGAGAACTTACTTCC
  MetAsnAspLysGlyGluLeuTyrGlySerGluLysLeuThrSer
406 GAATGCATCTTTAGGGAGCAGTTTGAAGAGAACTGGTATAACACC
  GluCysIlePheArgGluGlnPheGluGluAsnTrpTyrAsnThr
451 TATTCATCTAACATATATAAACATGGAGACACTGGCCGCGAGGTAT
  TyrSerSerAsnIleTyrLysHisGlyAspThrGlyArgArgTyr
496 TTTGTGGCACTTAACAAAGACGGAACCTCCAAGAGATGGCGCCAGG
  PheValAlaLeuAsnLysAspGlyThrProArgAspGlyAlaArg
541 TCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCTAGACCAGTG
  SerLysArgHisGlnLysPheThrHisPheLeuProArgProVal
586 GATCCAGAAAGAGTTCAGAAATTGTACAAGGACCTACTGATGTAC
  AspProGluArgValProGluLeuTyrLysAspLeuLeuMetTyr
631 ACT
     Thr

```

Fig. 1

【図3A・B】

問い合わせ配列: 289 TACCGAAGAGGCTGTGGTCCCTGCCGGTGCCTGCACGCTGCCGTCCGGCAGGATCTGCA 230
 |||
 参照配列: 15927 TACCGAAGAGGCTGTGGTCCCTGCCGGTGCCTGCACGCTGCCGTCCGGCAGGATCTGCA 15986
 問い合わせ配列: 229 GGTGGAAGCCGGTGCGBCAATAGAGCTGCCGGCGGCAGGATGCCGTGCAGGTGCGCCA 170
 |||
 参照配列: 15987 GGTGGAAGCCGGTGCGBCAATAGAGCTGCCGGCG- CGCAGGATGCCGTGCAGGTGCGCCA 16045
 問い合わせ配列: 169 GCTGCGCAGCCCCGGCCCCGGCGCGCTCCGCTCCGCGCGCTCCTGCGCTCGGCCA 110
 |||
 参照配列: 16046 GCTGCGCAGCCCCGGCCCCGGCGCGCTCCGCTCCGCGCGCTCCTGCGCTCGGCCA 16105
 問い合わせ配列: 109 GCAGCGCGCGCGCTCCCCGGCAGGAGCAACAGGAAATGCCAACCCACCTGCTGGCCCA 50
 |||
 参照配列: 16106 GCAGCGCGCGCGCTCCCCGGCAGGAGCAACAGGAAATGCCAACCCACCTGCTGGCCCA 16165
 問い合わせ配列: 49 AGCCCTCCAGGCCGCCCAGAAAGCCCCGACTTCGGCTAAGGGAGCCAT 1
 |||
 参照配列: 16166 AGCCCTCCAGGCCGCCCAGAAAGCCCCGACTTCGGCTAAGGGAGCCAT 16214

Fig. 3A

問い合わせ配列: 633 AGTGATACATCAGTAGGTCCTTGTACAATTCGGAACCTTTCTGGATCCACTGGTCTAGG 574
 |||
 参照配列: 7257 AGTGATACATCAGTAGGTCCTTGTACAATTCGGAACCTTTCTGGATCCACTGGTCTAGG 7316
 問い合わせ配列: 573 TAAGAAATGTGTAATTTCTGATGCCTCTTGGACCTGGCGCCATCTCTTGGAGTCCGTC 514
 |||
 参照配列: 7317 TAAGAAATGTGTAATTTCTGATGCCTCTTGGACCTGGCGCCATCTCTTGGAGTCCGTC 7376
 問い合わせ配列: 513 TTTGTTAAGTGCCACAAATACCTGCGGCCAGTGTCTCCATGTTTATATATGTTAGATGA 454
 |||
 参照配列: 7377 TTTGTTAAGTGCCACAAATACCTGCGGCCAGTGTCTCCATGTTTATATATGTTAGATGA 7436
 問い合わせ配列: 453 ATAGGTGTTATACAGTCTCTTCAAACCTGCTCCCTAAAGATGCATTCCGGAAGTAAGTTT 394
 |||
 参照配列: 7437 ATAGGTGTTATACAGTCTCTTCAAACCTGCTCCCTAAAGATGCATTCCGGAAGTAAGTTT 7496
 問い合わせ配列: 393 CTC-TGATCCATAGA 380
 |||
 参照配列: 7497 CTCCTCAAAGAGAGA 7511

Fig. 3B

【図3C】

[図3]の続き

問い合わせ配列: 391 CTGATCCATAGAGTCTCCTTTGTCAATTCATCCAAGATAGAGACCACTGTCCACACCTC 332
 |||
 参照配列: 9837 CTGATCCATAGAGTCTCCTTTGTCAATTCATCCAAGATAGAGACCACTGTCCACACCTC 9896
 問い合わせ配列: 331 TAATACTGACCAGTCCCCTGCCCACACTGATGAATCCAAGATACC 286
 |||
 参照配列: 9897 TAATACTGACCAGTCCCCTGCCCACACTGATGAATCCAAGATACC 9942

Fig. 3C

【図4】

分析(左前記):

- 1. HUMAN FGF-9 (P31371_HUMAN FGF-9) [SEQ ID NO:9]
- 2. MOUSE FGF-9 (P54130_MOUSE FGF-9) [SEQ ID NO:10]
- 3. RAT FGF-9 (P36364_FGF9_RAT FGF-9) [SEQ ID NO:11]
- 4. XENOPUS XFGF-CX (BA083474xen; Xenopus laevis xfgf-cx) [SEQ ID NO:12]
- 5. FGF-CX (cgRB020858) [SEQ ID NO:2]

複数の整列(214731-X7):

HUMAN FGF-9	MAPLCEVGN	YFGVQDAVP	--	FGNVPLVP	--	VDSPVLLS	DHLGQSE	AGGLPRGPA	VTDLDH
RAT FGF-9	MAPLCEVCG	YFCVQDAVP	--	FGNVPLVP	--	VDSPVLLS	DHLGQSE	AGGLPRGPA	VTDLDH
MOUSE FGF-9	MAPLCEVCG	YFCVQDAVP	--	FGNVPLVP	--	VDSPVLLS	DHLGQSE	AGGLPRGPA	VTDLDH
XENOPUS XFGF-CX	MAPLCEVCG	YFCVQDAVP	--	FGNVPLVP	--	VDSPVLLS	DHLGQSE	AGGLPRGPA	VTDLDH
FGF-CX	MAPLCEVCG	YFCVQDAVP	--	FGNVPLVP	--	VDSPVLLS	DHLGQSE	AGGLPRGPA	VTDLDH
HUMAN FGF-9	LKGI	LRERQLYC	RTGFHLEI	FPNGTI	CG	TRK	DHSRFG	ILEFI	SI
RAT FGF-9	LKGI	LRERQLYC	RTGFHLEI	FPNGTI	CG	TRK	DHSRFG	ILEFI	SI
MOUSE FGF-9	LKGI	LRERQLYC	RTGFHLEI	FPNGTI	CG	TRK	DHSRFG	ILEFI	SI
XENOPUS XFGF-CX	LKGI	LRERQLYC	RTGFHLEI	FPNGTI	CG	TRK	DHSRFG	ILEFI	SI
FGF-CX	LKGI	LRERQLYC	RTGFHLEI	FPNGTI	CG	TRK	DHSRFG	ILEFI	SI
HUMAN FGF-9	GMN	KGEL	YGRK	LS	EC	TR	Q	DHSRFG	ILEFI
RAT FGF-9	GMN	KGEL	YGRK	LS	EC	TR	Q	DHSRFG	ILEFI
MOUSE FGF-9	GMN	KGEL	YGRK	LS	EC	TR	Q	DHSRFG	ILEFI
XENOPUS XFGF-CX	GMN	KGEL	YGRK	LS	EC	TR	Q	DHSRFG	ILEFI
FGF-CX	GMN	KGEL	YGRK	LS	EC	TR	Q	DHSRFG	ILEFI
HUMAN FGF-9	RTRK	CKFT	THFL	PRVD	PKV	P	ELY	KD	IL
RAT FGF-9	RTRK	CKFT	THFL	PRVD	PKV	P	ELY	KD	IL
MOUSE FGF-9	RTRK	CKFT	THFL	PRVD	PKV	P	ELY	KD	IL
XENOPUS XFGF-CX	RTRK	CKFT	THFL	PRVD	PKV	P	ELY	KD	IL
FGF-CX	RTRK	CKFT	THFL	PRVD	PKV	P	ELY	KD	IL

Fig. 4

【図5】

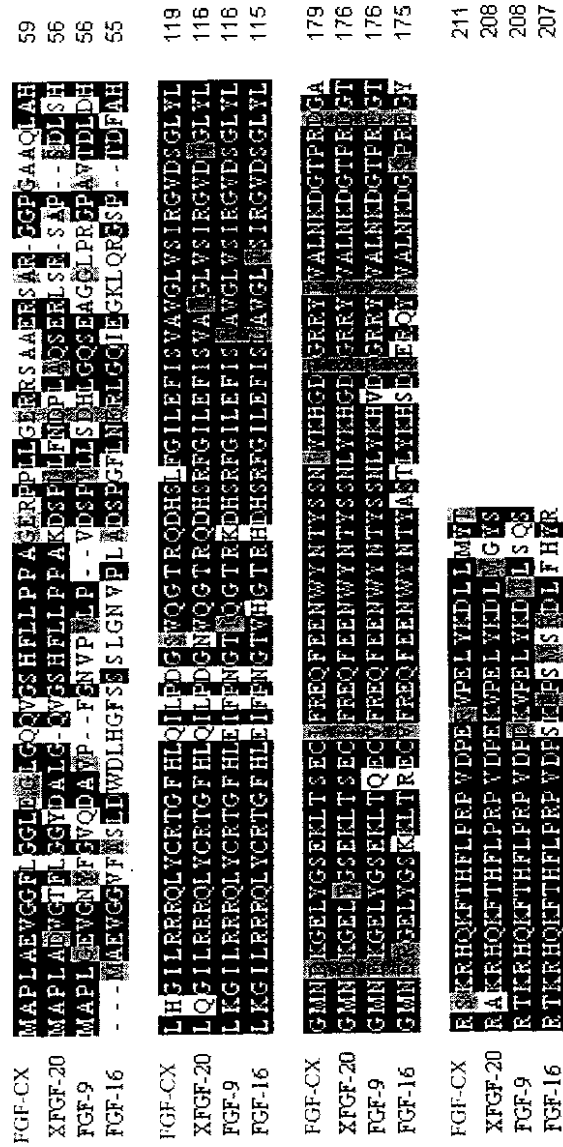


Fig. 5

【図6】

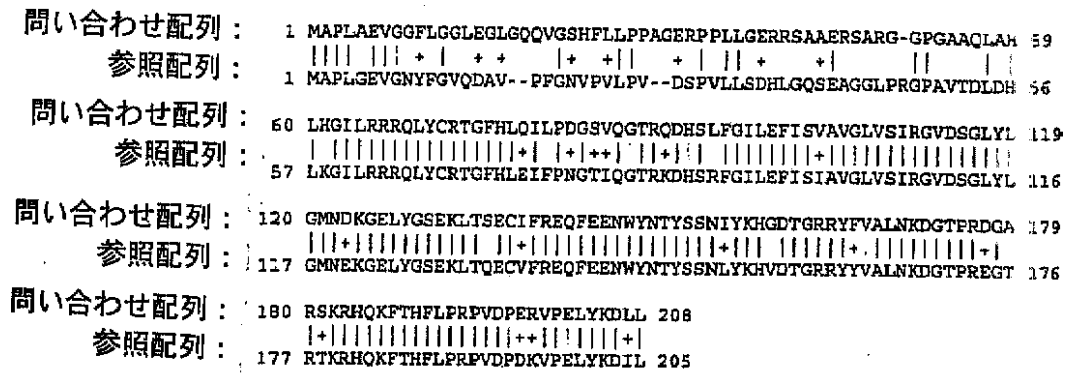


Fig. 6

【図7】

問い合わせ配列 : 1 MAPLAEVGGFLGGLEGLGQQVGSFHLLPPAGERPPLLGERRSAEAERSARG-GPGAAQLAH 59
 参照配列 : 1 MAPLGEVGSYFGVQDAV--PFGNVFVLPV--DSPVLLNDHLGQSEAGGLPRGPAVTDLDH 56

問い合わせ配列 : 60 LHGILRRRQLYCRGTGFHLQILPDGQSVQGTRODHSLEFGILEFISVAVGLVSIKGVDSGLYL 119
 参照配列 : 57 LKGILRRRQLYCRGTGFHLEIFPNGTIQGTRODHSRFGILEFISIAVGLVSIKGVDSGLYL 116

問い合わせ配列 : 120 GMNDKGELYGSEKLTSECFREQFEENWYNTYSSNIYKHGDTGRRYFVALNKDGTPRDGA 179
 参照配列 : 117 GMNEKGELYGSEKLTQECVREQFEENWYNTYSSNLYKHVDTGRRYFVALNKDGTREGT 176

問い合わせ配列 : 180 RSKRHQKFTHFLPRVDPERVPPELYKDIL 208
 参照配列 : 177 RTKRHQKFTHFLPRVDPDKVPELYKDIL 205

Fig. 7

【図8】

問い合わせ配列 : 1 MAPLAEVGGFLGGLEGLGQQVGSFHLLPPAGERPPLLGERRSAEAERSARG-GPGAAQLAH 59
 参照配列 : 1 MAPLGEVGSYFGVQDAV--PFGNVFVLPV--DSPVLLSDHLGQSEAGGLPRGPAVTDLDH 56

問い合わせ配列 : 60 LHGILRRRQLYCRGTGFHLQILPDGQSVQGTRODHSLEFGILEFISVAVGLVSIKGVDSGLYL 119
 参照配列 : 57 LKGILRRRQLYCRGTGFHLEIFPNGTIQGTRODHSRFGILEFISIAVGLVSIKGVDSGLYL 116

問い合わせ配列 : 120 GMNDKGELYGSEKLTSECFREQFEENWYNTYSSNIYKHGDTGRRYFVALNKDGTPRDGA 179
 参照配列 : 117 GMNEKGELYGSEKLTQECVREQFEENWYNTYSSNLYKHVDTGRRYFVALNKDGTREGT 176

問い合わせ配列 : 180 RSKRHQKFTHFLPRVDPERVPPELYKDIL 208
 参照配列 : 177 RTKRHQKFTHFLPRVDPDKVPELYKDIL 205

Fig. 8

【図9】

問い合わせ配列 : 1 MAPLAEVGGFLGGLEGLGQQVGSFHLLPPAGERPPLLGERRSAEAERSARGGPGAAQLAHL 60
 参照配列 : 1 MAPLADVGTFLGGYDALGQ-VGSHFLLPPAKDSPLLFNDPLAQSERLSRSAP--SDLSHL 57

問い合わせ配列 : 61 HGILRRRQLYCRGTGFHLQILPDGQSVQGTRODHSLEFGILEFISVAVGLVSIKGVDSGLYL 120
 参照配列 : 58 QGILRRRQLYCRGTGFHLQILPDGNVQGTRODHSRFGILEFISVAIGLVSIKGVDTGLYL 117

問い合わせ配列 : 121 MNDKGELYGSEKLTSECFREQFEENWYNTYSSNIYKHGDTGRRYFVALNKDGTPRDGA 180
 参照配列 : 118 MNDKGLPGSEKLTSECFREQFEENWYNTYSSNLYKHGDSGRRYFVALNKDGTREGT 177

問い合わせ配列 : 181 SKRHQKFTHFLPRVDPERVPPELYKDLMYT 211
 参照配列 : 178 AKRHQKFTHFLPRVDPKVPPELYKDLGYS 208

Fig. 9

【図10】

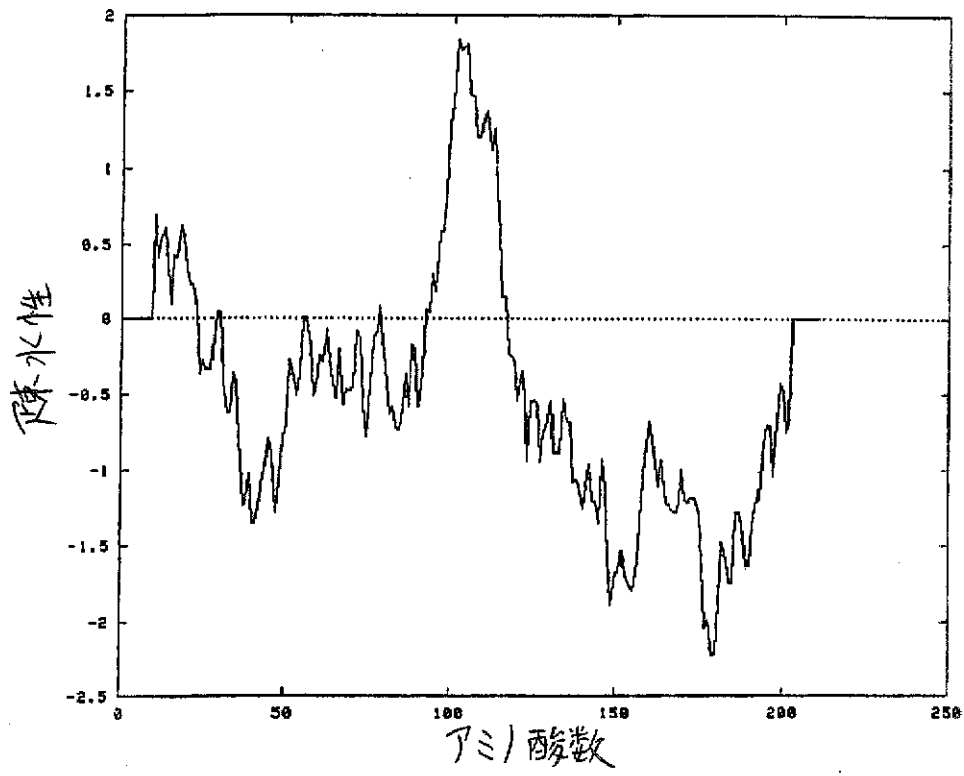


Fig. 10

【図11】

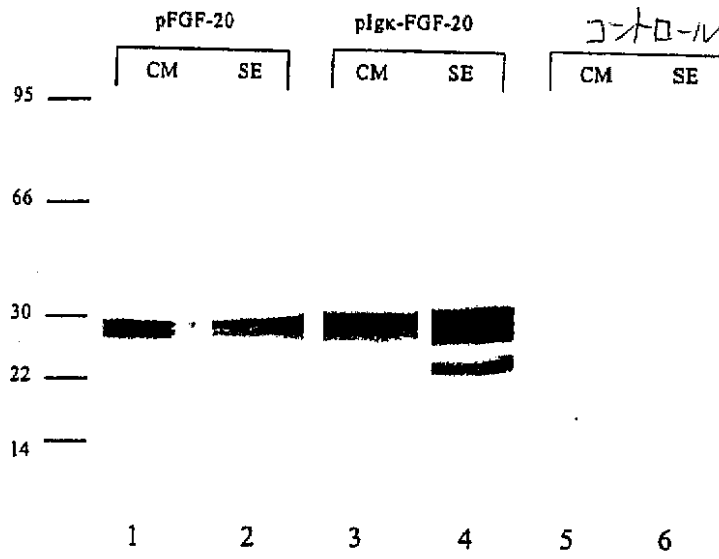


Fig. 11A

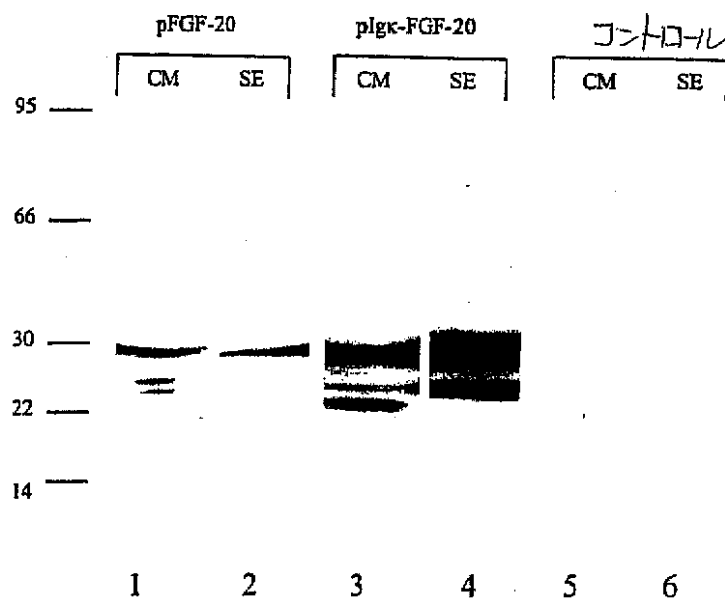


Fig. 11B

【図12】

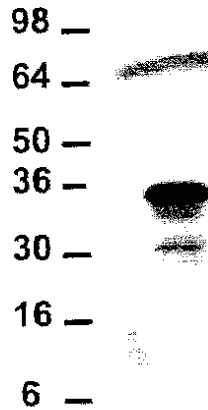


Fig. 12

【図13】

イキソ¹
 ...AGACAGTGAAGAGCTTCCCTGCCATTTTCAGTGCAGAGTCCCTCCGGAGCGACCTCAGAGGAGTAACCGGGCCCTTA
 TTTTGGCCTCGTFTTGCTATAAATTTTCTCTATCCACCTCCATCCACCCCCACAACACTCTTTACTGGGGGGTCTTTT
 1 GTGTTCCGGATCTCCCCCTCCATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCCGGGGCTTCTGGGCGGCCTGGAGGGCTTGGCCAGCA
 M A P L A E V G G F L G G L E G L G Q Q
 21 GGTGGGTTTCGCAATTCCTGTTCCTGCTCCGCGGGAGCGCCCGCCGCTGCTGGGCGAGCGCAGGAGCGCGCGGAGCGGA
 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
 48 GCGCGCGGGCGGGCCGGGGCTGCCAGCTGGCGCACCTGCACGGCATCCTGCGCCGCCGCGCAGCTCTATTGCCCGACC
 A R G G P G A A Q L A H L H G I L R R R O L Y C R T
 74 GGCTTCCACCTGCAGATCCTGCCCGACGGCAGCGTGCAGGGCACCCGGCAGGACCACAGCCTCTTCGGTATCTTGGAAAT
 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
 <-|>イキソ³
 128 TCTATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAATGCATCTTTAGGGAGCAGTTTGAAGAGAACTGGTATAACACCTATTTCATCT
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
 AACATATATAAACATGGAGACACTGGCCCGCAGGTATTTTGTGGCACTTAACAAAGACGGAACTCCAAGAGATGGCGCCAG
 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
 181 GTCCAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTACCTAGACCAGTGGATCCAGAAAGAGTTCCAGAATTTGTACAAGGACC
 S X R H Q K F T H F L P R P V D P E R V P E L Y K D L
 TACTGATGTACACTTGA...
 208 L M Y T

Fig. 13

【図14】

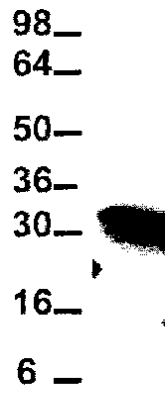
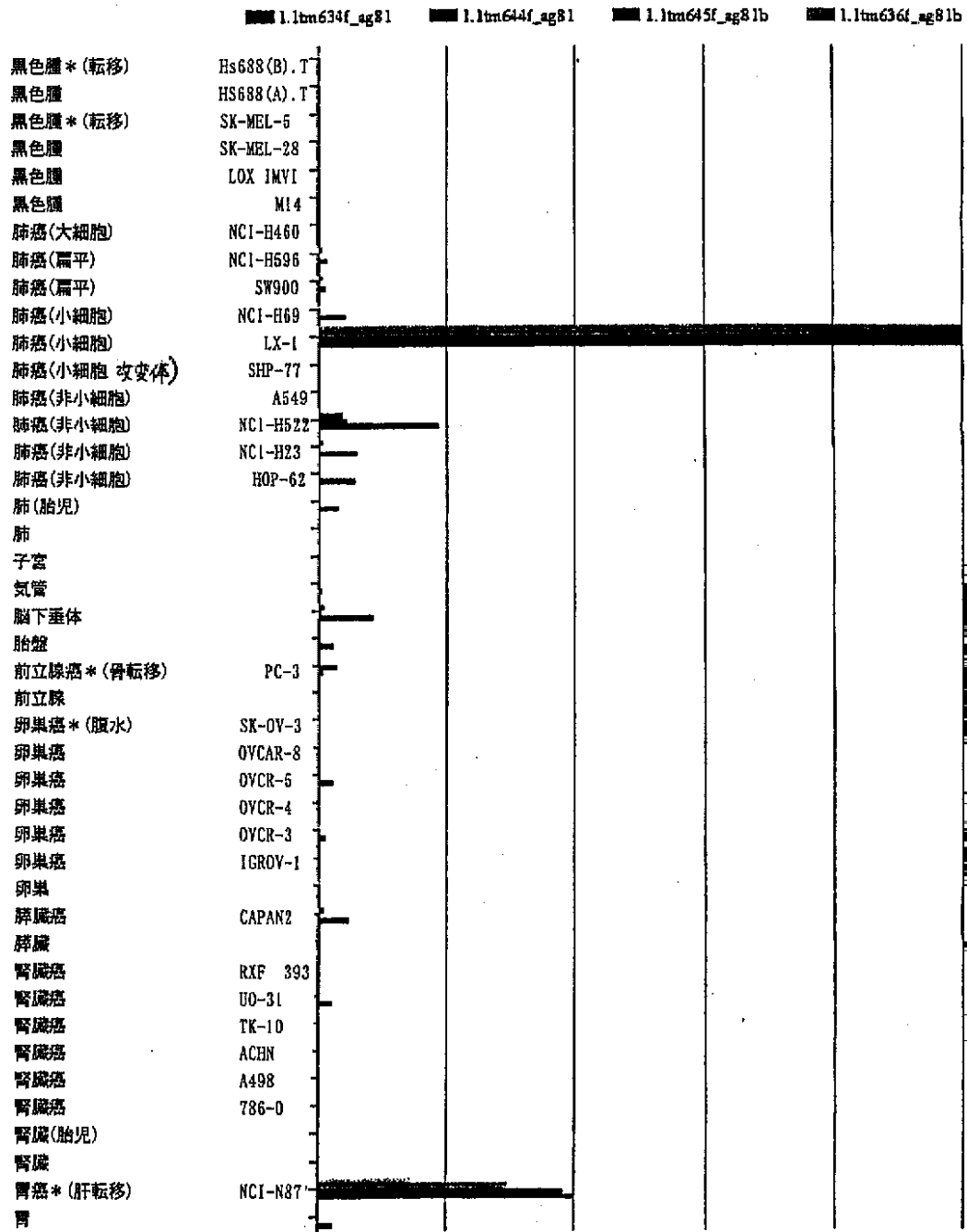


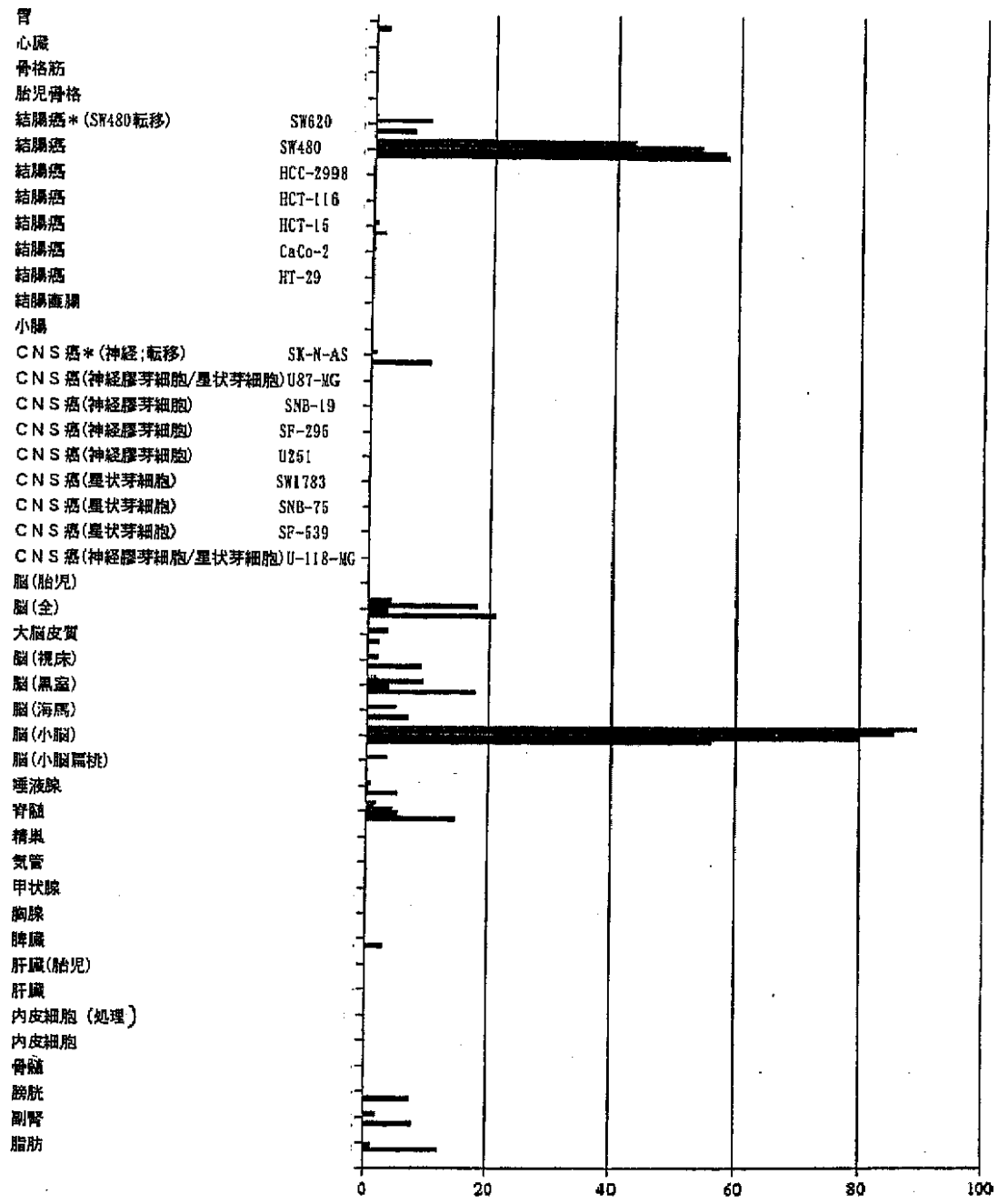
Fig. 14

【図15A】



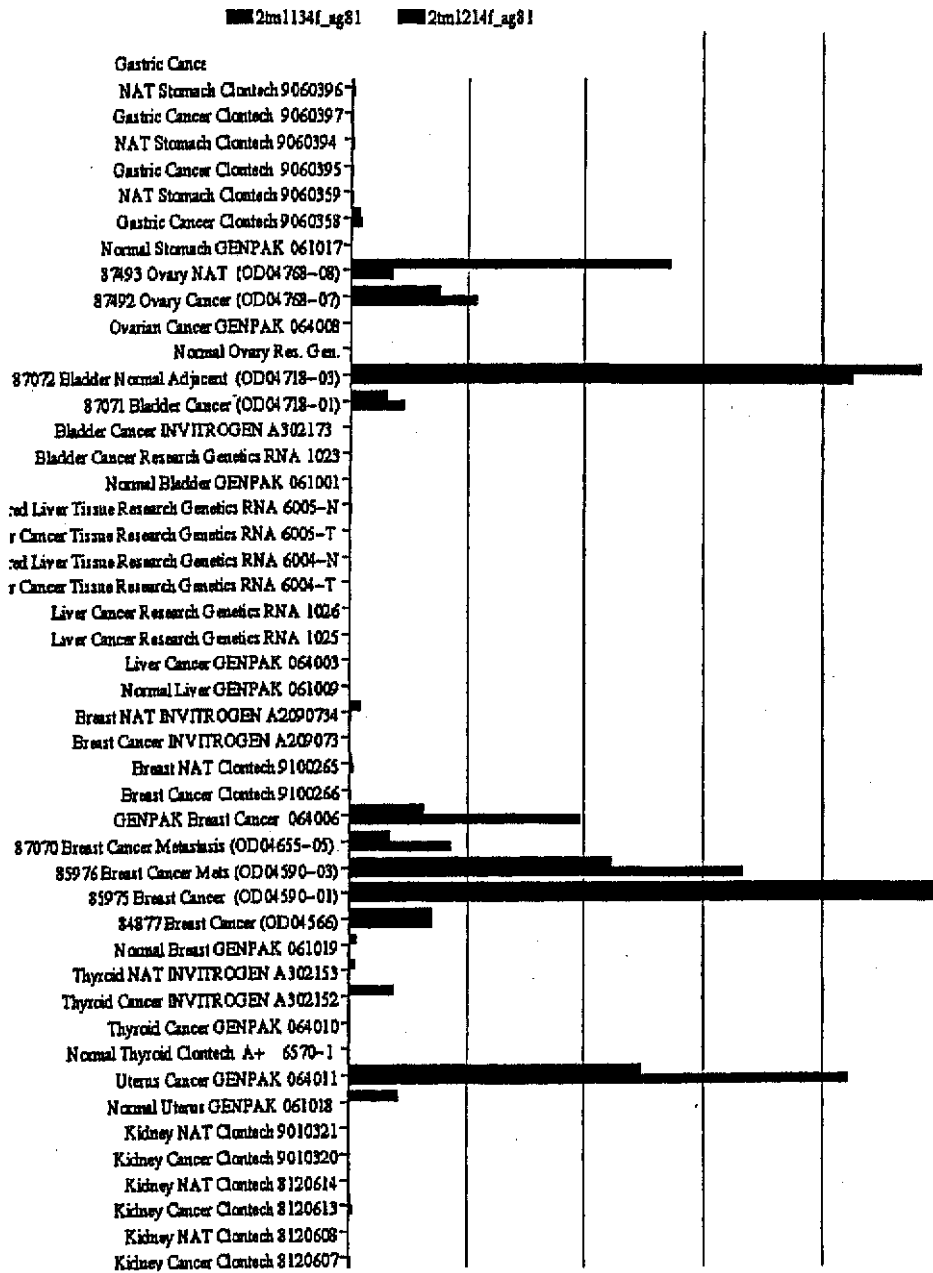
相对発現
Fig. 15A

【圖15B】



相對發現
Fig. 15B

【 15 C 】



相对发现

Fig. 15C

【図15D】

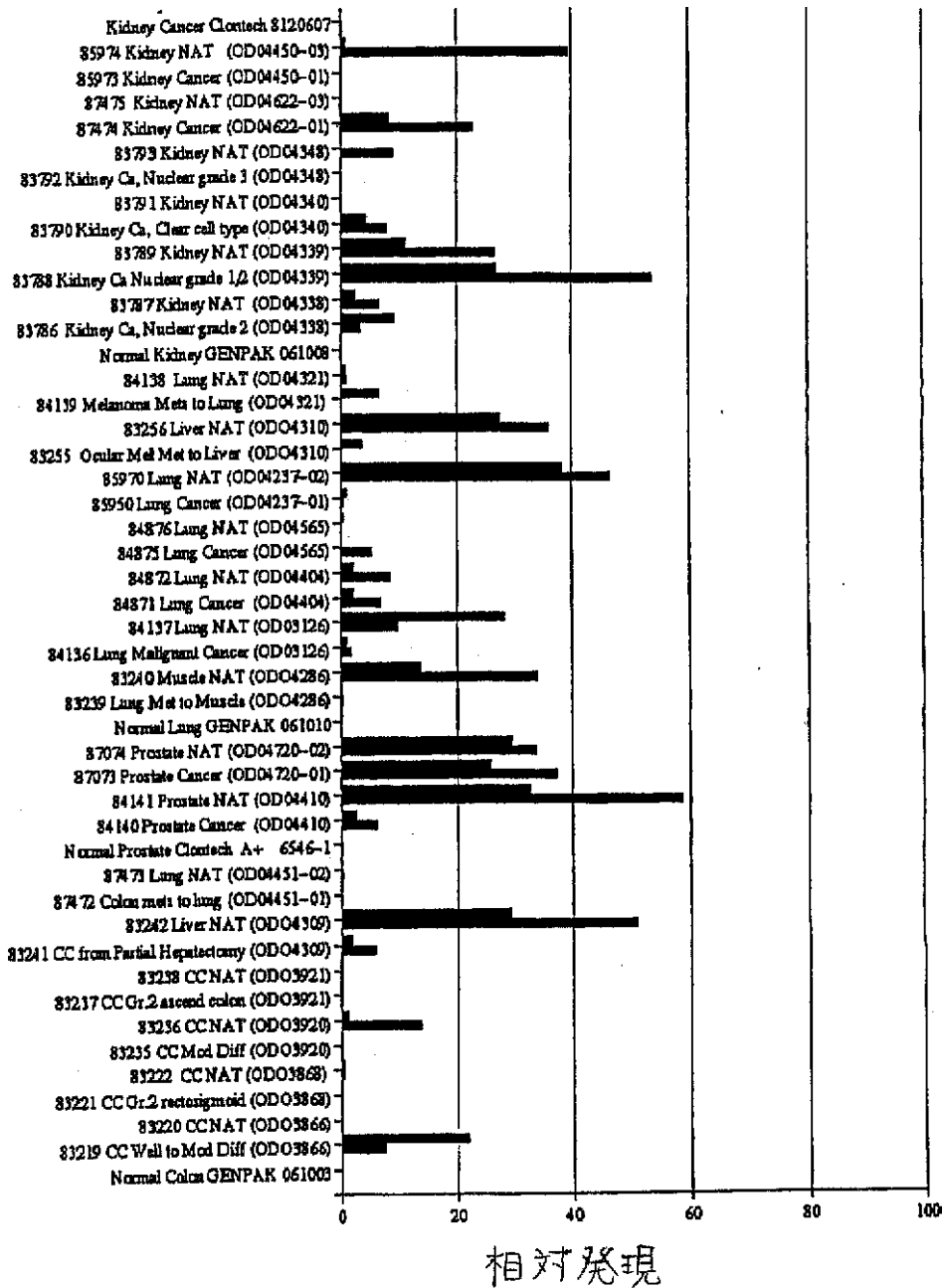


Fig. 15D

【图16A】

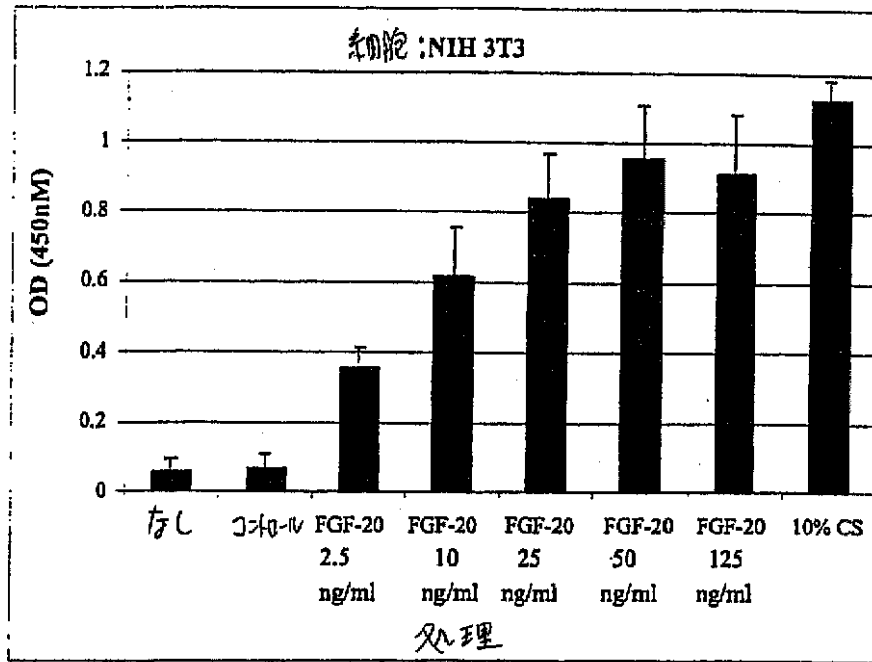


Fig. 16A

【图16B】

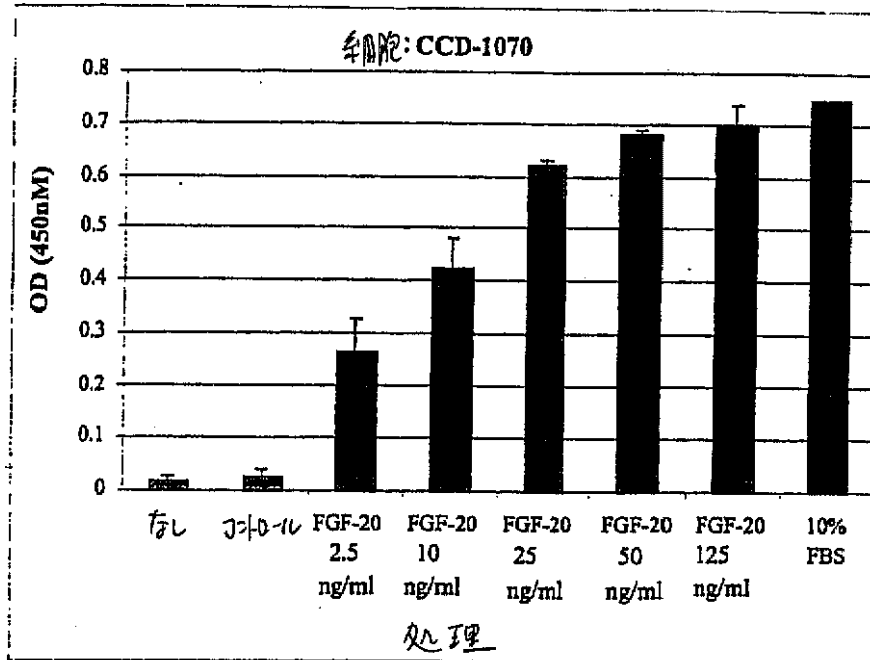


Fig. 16B

【图16C】

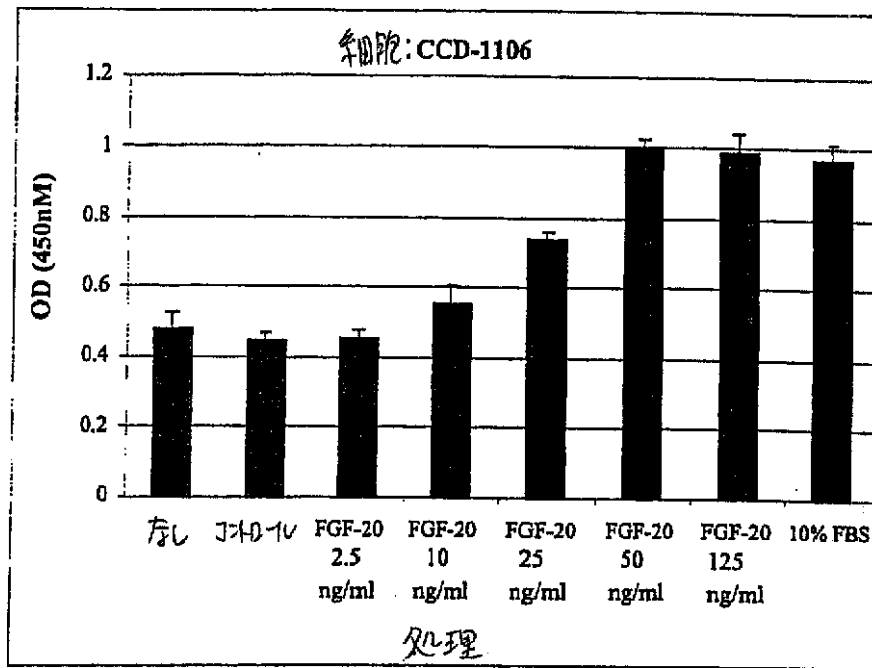


Fig. 16C

【图17】

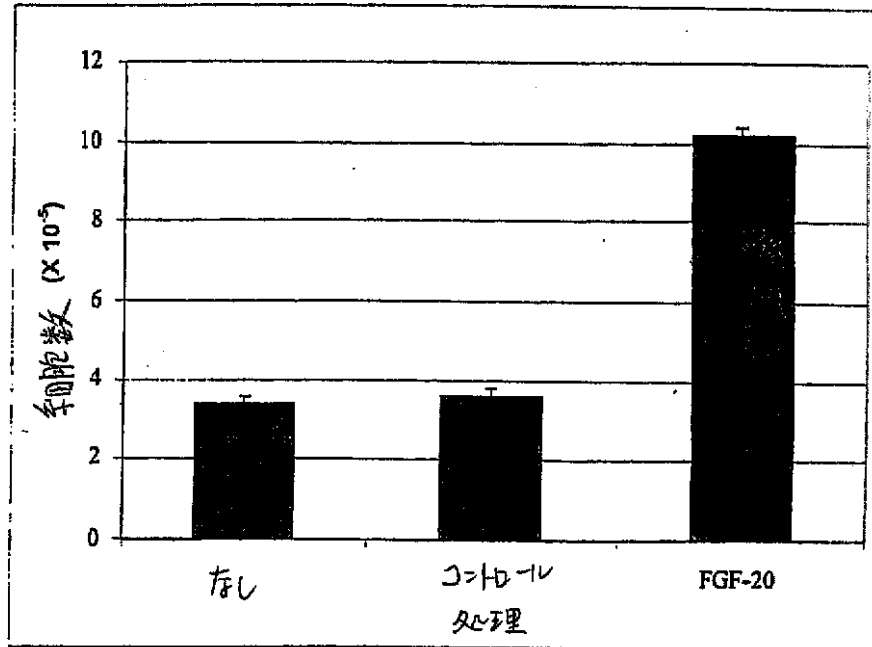


Fig. 17

【図18】

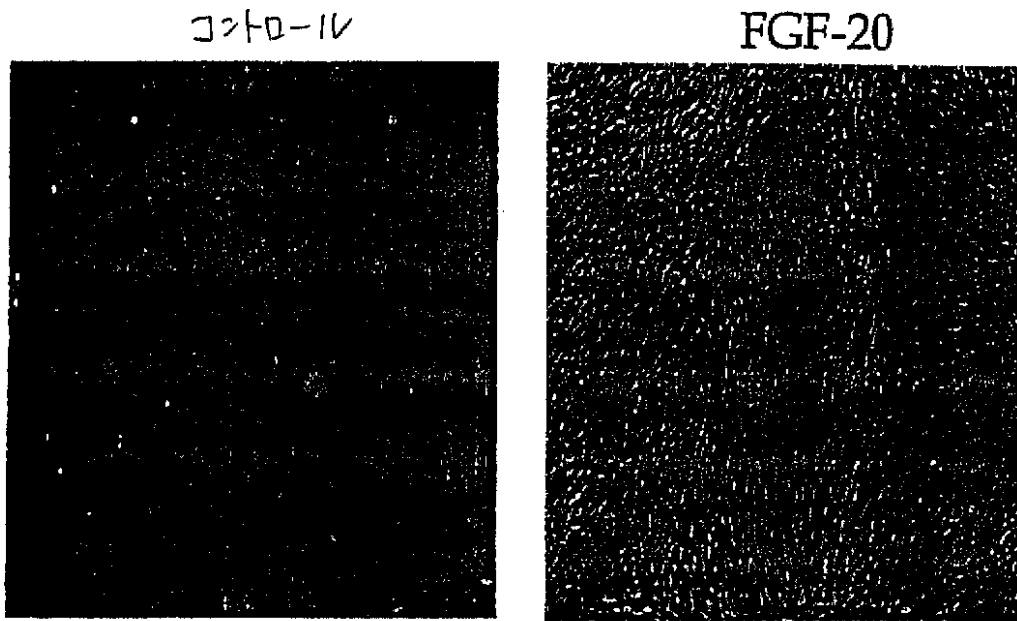


Fig. 18

【図19】

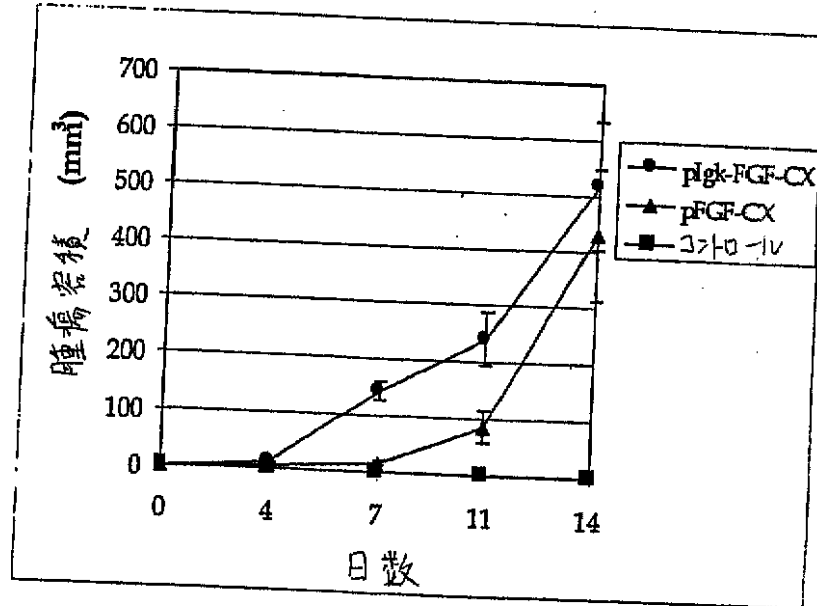


Fig. 19

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/US 00/20405
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) STRAND, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE EMBL 'Online! ID: MMFGF9, 8 December 1995 (1995-12-08) SEQ: "Mouse embryonal carcinoma cell mRNA for fibroblast growth factor 9 (FGF 9), complete cds" XP002156973 abstract	1-62
A	DATABASE EMBL 'Online! ID: FGF9_MOUSE, 1 October 1996 (1996-10-01) SANTOS-OCANPO ET AL.: "Glia-activating factor precursor (GAF) (fibroblast growth factor 9) (FGF-9) (HBGF-9)" XP002156974 abstract	1-62
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*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 *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 *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. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 11 January 2001		Date of mailing of the international search report 08.03.01
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlean 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Sprinks, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 00/20405

C.-(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE EMBL 'Online! ID: FGF9_HUMAN, 1 July 1993 (1993-07-01) MIYAMOTO ET AL.: "Glia-activating factor precursor (GAF) (fibroblast growth factor 9) (FGF-9) (HBGF-9)" XP002156975 abstract	1-62

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 00/20405**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 34-40 and 53-62 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.: 25,31-33,44,45
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims 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:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. 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. 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.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 25,31-33,44,45

It is not possible to carry out a meaningful search into the state of the art on the basis of claims 25,31-33,44 and 45 because they refer either directly or indirectly to subject-matter (compounds resulting from screening processes and "therapeutic agents") that is structurally undefined and could not in any event have been functionally tested in the prior art.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 K 39/395		A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
45/00		A 6 1 P 1/04	4 C 0 8 5
48/00		7/06	4 C 0 8 6
A 6 1 P 1/04		9/00	4 H 0 4 5
7/06		17/02	
9/00		17/14	
17/02		35/00	
17/14		43/00	1 0 5
35/00		C 0 7 K 14/50	
43/00	1 0 5	16/18	
C 0 7 K 14/50		C 1 2 N 1/15	
16/18		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		C 1 2 Q 1/02	
1/21		1/68	A
5/10		G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 Q 1/02		33/50	Z
1/68		33/53	D
G 0 1 N 33/15		33/566	
33/50		C 1 2 P 21/08	
33/53		C 1 2 N 15/00	Z N A A
33/566		5/00	A
// C 1 2 P 21/08		A 6 1 K 37/02	

(31)優先権主張番号 09 / 6 0 9 , 5 4 3

(32)優先日 平成12年7月3日(2000.7.3)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

- (72)発明者 ブラヤガ, サドヒルダス ケイ.
アメリカ合衆国 ミズーリ 63017, チ
ェスタ-フィールド, ウェストミード
ドライブ 1602
- (72)発明者 ボルドッグ, フェレンク エル.
アメリカ合衆国 コネチカット 06473,
ノース ハイブン, ジャンセン レイ
ン 22
- (72)発明者 ヤング, メイジア
アメリカ合衆国 コネチカット 06533,
イースト リム, キャットバード レ
イン 6
- (72)発明者 バーゲス, キャサリン
アメリカ合衆国 コネチカット 06109,
ウェザースフィールド, キャリッジ
ヒル ドライブ 90
- (72)発明者 フェルナンデス, エルマ
アメリカ合衆国 コネチカット 06405,
ブランフォード, フローレンス ロー
ド ナンバー2ピー 77
- (72)発明者 ヘルマン, ジョン エル.
アメリカ合衆国 コネチカット 06437,
ギルフォード, バーンシェド レイン
78
- (72)発明者 ラロケル, ウイリアム ジェイ.
アメリカ合衆国 コネチカット 06443,
マディソン, ディボンシャー レイン
15
- (72)発明者 リチェンスタイン, ヘンリ
アメリカ合衆国 コネチカット 06443,
マディソン, シープ パスチャー ロ
ード 24

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB10 BB41 CB01
DA13 DA36 FB03
4B024 AA01 AA11 BA21 BA41 BA44
CA04 CA09 CA11 DA02 DA03
DA06 DA12 EA04 GA13 HA12
HA15
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08
QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR48
QR55 QS33 QS34 QS38
4B064 AG02 AG27 CA02 CA06 CA10
CA19 DA01 DA13
4B065 AA26X AA72X AA90X AA93X
AA93Y AB01 BA02 CA24
CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA01
BA02 BA23 CA53 CA59 ZA36
ZA55 ZA68 ZA89 ZA92 ZB21
ZB26
4C085 AA13 AA14 BB31 DD62 EE01
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04
NA14 ZA36 ZA55 ZA68 ZA89
ZA92 ZB21 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2003505075A5	公开(公告)日	2008-02-21
申请号	JP2001512864	申请日	2000-07-27
[标]申请(专利权)人(译)	CURAGEN CORP		
申请(专利权)人(译)	Kyurajen公司		
当前申请(专利权)人(译)	Kyurajen公司		
[标]发明人	ジェファーズマイケル シムケッツリチャードエイ プラヤガサドヒルダスケイ ボルドッグフェレンクエル ヤングメイジア バーゲスキャサリン フェルナンデスエルマ ヘルマンジョンエル ラロケルウイリアムジェイ リチェンスタインヘンリ		
发明人	ジェファーズ, マイケル シムケッツ, リチャード エイ. プラヤガ, サドヒルダスケイ. ボルドッグ, フェレンク エル. ヤング, メイジア バーゲス, キャサリン フェルナンデス, エルマ ヘルマン, ジョン エル. ラロケル, ウイリアム ジェイ. リチェンスタイン, ヘンリ		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 A61K31/7088 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P17/02 A61P17/14 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/50 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 C12N5/10 A61K38/00 C12P21/08		
CPC分类号	A61K38/00 A61K2039/505 C07K14/50 A61K48/00 A61P1/04 A61P17/02 A61P17/14		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P17/02 A61P17/14 A61P35/00 A61P43/00.105 C07K14/50 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB10 2G045/BB41 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/BA41 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA13 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS38 4B064/AG02 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/CA59 4C084/ZA36 4C084/ZA55 4C084/ZA68 4C084/ZA89 4C084/ZA92 4C084/ZB21 4C084/ZB26 4C085/AA13 4C085		

/AA14 4C085/BB31 4C085/DD62 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01
4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA36 4C086/ZA55 4C086/ZA68 4C086/ZA89 4C086/ZA92 4C086
/ZB21 4C086/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40

优先权	60/145899 1999-07-27 US 09/494585 2000-01-31 US 09/609543 2000-07-03 US
-----	---

其他公开文献	JP2003505075A
--------	---------------

摘要(译)

本发明提供了新颖的分离的多肽FGF-CX和编码FGF-CX的多核苷酸以及免疫特异性结合FGF-CX的抗体或FGF-CX多肽FGF-C。提供CX多核苷酸或FGF-CX抗体的任何衍生物，变体，突变体或片段。本发明进一步提供了其中FGF-CX多肽，FGF-CX多核苷酸和FGF-CX抗体用于检测和治疗多种病理状况和其他用途的方法。