

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3996084号
(P3996084)

(45) 発行日 平成19年10月24日(2007.10.24)

(24) 登録日 平成19年8月10日(2007.8.10)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 14/71 (2006.01)	C O 7 K 14/71
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A
A 6 1 K 38/45 (2006.01)	A 6 1 K 37/52
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00

請求項の数 9 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-111330 (P2003-111330)	(73) 特許権者	501138884
(22) 出願日	平成15年4月16日(2003.4.16)		アヴェンティス ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願平3-513709の分割		アメリカ合衆国 ニュージャージー州 O
原出願日	平成3年7月3日(1991.7.3)		8807 ブリッジウォーター コーポレイト ドライヴ 55
(65) 公開番号	特開2004-41176 (P2004-41176A)	(74) 代理人	100059959
(43) 公開日	平成16年2月12日(2004.2.12)		弁理士 中村 稔
審査請求日	平成15年4月16日(2003.4.16)	(74) 代理人	100067013
(31) 優先権主張番号	549, 587		弁理士 大塚 文昭
(32) 優先日	平成2年7月6日(1990.7.6)	(74) 代理人	100082005
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100065189
			弁理士 穴戸 嘉一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 繊維芽細胞生育因子受容体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

単離された形態であって、プロテインキナーゼ活性を有する細胞質ドメイン、キナーゼ挿入物、膜横断ドメインおよび3つの免疫グロブリン様反復部を有する細胞外ドメインを含む受容体蛋白質であって、以下のアミノ酸配列を有する前記受容体蛋白質。

Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Leu Ala Glu Ala Ile Gly Leu Asp	
465	470
Lys Asp Lys Pro Asn Arg Val Thr Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys	
	485
Ser Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu Ser Asp Leu Ile Ser Glu Met Glu	
	500
Met Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly	10
	515
Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu Tyr Val Ile Val Glu Tyr Ala Ser	
	530
Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu Gln Ala Arg Arg Pro Pro Gly Leu	
545	550
Glu Tyr Cys Tyr Asn Pro Ser His Asn Pro Glu Glu Gln Leu Ser Ser	
	565
Lys Asp Leu Val Ser Cys Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Tyr	20
	580
Leu Ala Ser Lys Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val	
	595
Leu Val Thr Glu Asp Asn Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala	
	610
Arg Asp Ile His His Ile Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg	30
625	630
Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Ile Tyr	
	645
Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile	
	660
Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Val Pro Val Glu Glu Leu	
	675
Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp Lys Pro Ser Asn Cys	40

Leu Pro Glu Asp Pro Arg Trp Glu Leu Pro Arg Asp Arg Leu Val Leu	
465	470 475 480
Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln Val Val Leu Ala Glu	
	485 490 495
Ala Ile Gly Leu Asp Lys Asp Lys Pro Asn Arg Val Thr Lys Val Ala	
	500 505 510
Val Lys Met Leu Lys Ser Asp Ala Thr Glu Lys Asp Leu Ser Asp Leu	10
	515 520 525
Ile Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly Lys His Lys Asn Ile	
	530 535 540
Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Asp Gly Pro Leu Tyr Val Ile	
545	550 555 560
Val Glu Tyr Ala Ser Lys Gly Asn Leu Arg Glu Tyr Leu Gln Ala Arg	
	565 570 575
	20
Arg Pro Pro Gly Leu Glu Tyr Cys Tyr Asn Pro Ser His Asn Pro Glu	
	580 585 590
Glu Gln Leu Ser Ser Lys Asp Leu Val Ser Cys Ala Tyr Gln Val Ala	
	595 600 605
Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Lys Lys Cys Ile His Arg Asp Leu	
	610 615 620
Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asp Asn Val Met Lys Ile Ala	30
625	630 635 640
Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile His His Ile Asp Tyr Tyr Lys Lys	
	645 650 655
Thr Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ala Leu	
	660 665 670
Phe Asp Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val	
	675 680 685
	40
Leu Leu Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Val	

690		695		700	
Pro Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg Met Asp					
705		710		715	720
Lys Pro Ser Asn Cys Thr Asn Glu Leu Tyr Met Met Met Arg Asp Cys					
		725		730	735
Trp His Ala Val Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe Lys Gln Leu Val Glu					
		740		745	750
Asp Leu Asp Arg Ile Val Ala Leu Thr Ser Asn Gln Glu Tyr Leu Asp					10
		755		760	765
Leu Ser Met Pro Leu Asp Gln Tyr Ser Pro Ser Phe Pro Asp Thr Arg					
		770		775	780
Ser Ser Thr Cys Ser Ser Gly Glu Asp Ser Val Phe Ser His Glu Pro					
785		790		795	800
Leu Pro Glu Glu Pro Cys Leu Pro Arg His Pro Ala Gln Leu Ala Asn					20
		805		810	815
Gly Gly Leu Lys Arg Arg					
		820			

【請求項 3】

請求項 1 記載の蛋白質をコードする、単離された DNA。

【請求項 4】

請求項 2 記載の蛋白質をコードする、単離された DNA。

【請求項 5】

以下の DNA 配列を有する、単離された DNA。

30

atgtggagct ggaagtgcc	cctctctcgg gcigtgcigg	tcacagccac acctcgcacc	60	
gctagggcgt ccccgacct	gccigaacaa gcccagccct	ggggagcccc tigtgaagtg	120	
gagtccttcc tggccaccc	cggtagacctg ctgcagcttc	gcigtcggct gcgggacgat	180	
gtgcagagca tcaactggct	gcgggacggg gtgcagctgg	cggaaagcaa ccgcaccgcg	240	
atcacagggg aggaggigga	ggtagcaggac tccgtgcccg	cagactccgg cctctatgct	300	
tgcgtaacca gcagccctc	gggcagtgc accacctact	tctccgtcaa tgtttcagat	360	
gctctccct cctcggagga	tgatgatgat gatgatgact	cctcttcaga ggagaaagaa	420	10
acagataaca ccaaaccaaa	cgtatgccg gtacttccat	attggacatc cccagaaaag	480	
atggaaaaga aatigcatgc	agtgccggct gccaaagacag	tgaagtcaa atgcccttcc	540	
agtgggacct caaacccac	actgcgctgg ttgaaaaatg	gcaaagaatt caaacctgac	600	
cacagaatig gaggctacaa	ggtccgttat gccacctgga	gcatcataat ggactctgtg	660	
gtgccctctg acaagggcaa	ctacacctgc atigtggaga	atgagtacgg cagcatcaac	720	
cacacatacc agctggatgt	cgtggagcgg tccccacc	gccccatcct gcaagcaggg	780	
ttgcccgcca acaaacagt	ggccctgggt agcaacgtgg	agttcatgtg taagggtgac	840	20
agtgacctgc agccgcacat	ccagtggcta aagcacatcg	aggatgaatgg gagcaagatt	900	
ggcccagaca acctgctta	tgtccagatc ttgaagactg	ctggagttaa taccaccgac	960	
aaagagatgg aggtgcttca	cttaagaaat gtctcctttg	aggacgcagg ggagtatacg	1020	
tgcttggcgg gtaactctat	cggactctcc catcactctg	catggttgac cgttctggaa	1080	
gccciggaag agaggccggc	agtatgacc tcgccccgt	acctggagat catcatctat	1140	
tgcacagggg ccttctctat	ctcttgcatt gtggggctcg	tcactgtcta caagatgaag	1200	
agtggtagca agaagagtga	cttccacagc cagatggctg	tgcacaagct ggccaagagc	1260	30
atccctctgc gcagacaggt	aacagtgtct gcigtactca	gtgcatccat gaactctggg	1320	
gttctctcgg ttccggccatc	acggctctcc tccagtggga	ctccatgct agcagggctc	1380	
tctgagtatg agcttccga	agacctctgc tgggagctgc	ctcgggacag actggctta	1440	
ggcaaaccct tgggagaggg	ctgctttggg cagggtggtg	tggcagaggc tatcgggctg	1500	
gacaaggaca aacccaaccg	tgtgaccaa gtggctgtga	agatgtttaa gtcggacgca	1560	
acagagaaag actgtcaga	ctgatctca gaaatggaga	tgatgaagat gatcgggaag	1620	
cataagaata tcatcaacct	gctgggggcc tgcacgcagg	atggctcctt gtatgtcact	1680	40
gtggagtatg cctccaaggg	caacctgcgg gactacctgc	aggccccggg gccccaggg	1740	

ctggaatact gctacaaccc cagccacaac ccagaggagc agctctcctc caaggacctg 1800
gtgtccttgcg cctaccaggi ggccccgagc atggagtatc tggcctccaa gaagtgcata 1860
caccgagacc tggcagccag gaatgtcctg gtgacagagg acaatgigat gaagatagca 1920
gactttggcc tgcacggga cattcaccac atcgactact ataaaaagac aaccaacggc 1980
cgactgccig tgaagtggat ggcacccgag gcattatttg accggatcta caccaccag 2040
agtgaigtgt ggtctttcgg ggtgctcctg tgggagatct tcaactctggg cggctcccca 2100
taccocggig tgcctgtgga ggaactttc aagctgciga aggagggtca ccgcatggac 2160
aagcccagta actgcaccaa cgagctgtac atgatgatgc gggactgctg gcatgcagtg 2220
ccctcacaga gaccacctt caagcagctg gtggaagacc tggaccgcat cgtggccttg 2280
acctccaacc aggagtacct ggacctgtcc atgccccigg accagtactc ccccagcttt 2340
cccgacacc ggagctctac gtgctcctca ggggaggatt cegtcttctc tcatgagccg 2400
ctgccccagg agccctgctt gccccgacac ccagcccagc ttgccaatgg cggactcaaa 2460
cgccgctga 2469

10

【請求項 6】

20

プロモータに機能的に結合された請求項 3 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の単離された DNA を含む、発現ベクタ。

【請求項 7】

請求項 6 記載の発現ベクタにより形質転換された組換え宿主。

【請求項 8】

細胞受容体に対する繊維芽細胞生育因子の結合を阻害する薬物を検索する方法であって、

(a) 繊維芽細胞生育因子の存在下で、繊維芽細胞生育因子受容体を過剰発現し得る宿主細胞と共に薬物をインキュベートする工程、および

(b) 該薬物の、繊維芽細胞生育因子の結合を阻害する能力を測定する工程
を含み、前記受容体が (i) 請求項 1 記載の受容体蛋白質 ; (ii) 請求項 1 記載の受容体蛋白質のアミノ酸残基 1 ~ 3 7 6 に対応する、請求項 1 記載の受容体蛋白質の断片 ; 又は (iii) 請求項 2 記載の蛋白質であることを特徴とする、薬物の検索方法。

30

【請求項 9】

繊維芽細胞生育因子受容体に対する日和見病原体の結合を阻害する薬物を検索する方法であって、

(a) 前記病原体の存在下で、繊維芽細胞生育因子受容体を過剰発現し得る宿主細胞と共に薬物をインキュベートする工程、および

(b) 該薬物の、病原体の結合を阻害する能力を測定する工程
を含み、前記受容体が (i) 請求項 1 記載の受容体蛋白質 ; (ii) 請求項 1 記載の受容体蛋白質のアミノ酸残基 1 ~ 3 7 6 に対応する、請求項 1 記載の受容体蛋白質の断片 ; 又は (iii) 請求項 2 記載の蛋白質であることを特徴とする、薬物の検索方法。

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の分野】

この発明は、独特の種類繊維芽細胞生育因子受容体、これをコードする核酸および組換え系での生育因子受容体の発現に関する。またこの発明は、受容体の拮抗体として作用する候補薬物の検索に発現された受容体またはその断片を使用することに関する。

【0002】

報告された研究開発

50

繊維芽細胞生育因子 (F G F) 系統群は7つの関連するヘパリン結合蛋白質よりなり、これらには酸性 F G F (a F G F)、塩基性 F G F (b F G F)、i n t - 2、h s t / k F G F、F G F - 5、F G F - 6 および K G F が包まれる。F G F 系統群の構成員は約 30 ~ 55 % のアミノ酸配列の同一性、類似する遺伝子構造を共有し、形質移入された細胞中で過剰発現する場合に培養細胞を形質転換することができる。原型的な F G F、a F G F および b F G F は、精製され、配列決定およびクローン化されるべき最初のものであった。これらは、間葉および神経外胚葉起源の多様な細胞に対する試験管内における分裂誘発因子である。生体内では、F G F は発生中のツメガエル胚子の中胚葉の形成を誘導することができ、有効な脈管形成活性を有する (プルゲスとマシアグ、A n n . R e v . B i o c h e m . 5 8 ; 5 7 5 - 6 0 6 (1 9 8 9) による総説)。

10

【 0 0 0 3 】

F G F に対する細胞の応答は、固有のチロシンキナーゼ活性を有する特定の細胞表面受容体の結合および活性化により媒介される。受容体は蛋白質であり、しばしばグリコシル化されており、細胞膜の一体化された構成要素として働く。典型的には、受容体は、リガンドとして知られる物質と特定の相互作用をすることができる細胞表面に局在した細胞外ドメインを有する。繊維芽細胞生育因子はリガンドの例である。細胞外ドメインに対するリガンドの結合の結果、膜の細胞内表面に局在する受容体の第2の領域 (すなわち細胞質ドメイン) が活性化され、他の細胞内分子との反応が可能となる。細胞質ドメインは触媒領域、すなわち酵素活性を有する領域からなる。ここに記載する繊維芽細胞生育因子受容体と特に関連するものとして、触媒ドメインは蛋白質チロシンキナーゼである。このキナーゼの基質には、受容体自体 (すなわち自己リン酸化) またはホスホリパーゼ C - のような他の細胞内蛋白質がなることができる。ある種の受容体のキナーゼドメインは、100 までの殆ど親水性のアミノ酸残基の挿入により妨害され得る。

20

【 0 0 0 4 】

この挿入物は、ある種の細胞基質およびエフェクタ蛋白質との受容体相互作用を変調するよう作用し得る。細胞質ドメインは、C O O H 末端尾部領域にて終止する。この配列は、公知の R T R の中では最も分岐したものである。幾つかの自己リン酸化部位がこの領域にマップされており、この領域はキナーゼシグナル機能に対して負の制御を及ぼすことにより作用し得る。触媒領域は、近位膜ドメインにより膜から適切に離間する。現在までの証拠では、この領域は、異種刺激による受容体機能の変調、受容体変調導入として知られているプロセスに関与するとの考えが支持されている。細胞外および細胞質ドメインの結合は膜中を架橋する領域により、適切には膜横断ドメインとして知られている。リガンドの相互作用は、凝集または他の機構によるような構造変化を誘導することにより細胞質ドメインを活性化すると考えられている。よって、受容体は分子の変換器として作用し、細胞外の事態 (リガンド結合) を細胞内応答 (細胞質酵素活性) に翻訳するものである。

30

【 0 0 0 5 】

前記したように、受容体が結合する物質はリガンド (その対応受容体との関連においてのみ定義的に意味を持つ用語) として知られている。よって、「リガンド」という用語は、リガンドの存在についての情報を細胞内標的分子に受容体が運ぶという様式でその物質が受容体と結合または相互作用することができるという以外には、如何なる特定の分子の大きさ、構造的または組成的特徴をも意味しない。このような機能的な定義により、細胞外ドメインに結合し得るが受容体の活性化に影響を与え得ない物質は必然的に排除される。直接的に言えば、受容体に結合することのできる全ての物質はリガンドではないが、全てのリガンドは受容体に結合することができる。

40

前記したように、受容体は、リガンド相互作用に依存する検定し得る生物学的活性を有するものとして同定された。一般に、この活性は酵素的なものであり、細胞質ドメインに局在している。この発明に関連する1つの群の受容体は、固有の蛋白質チロシンキナーゼ (P T K) 活性を有する。

【 0 0 0 6 】

図1は、P T K 活性を担持する幾つかの公知の生育因子受容体の概略図である。

50

P T K活性を有する生育因子受容体、または受容体チロシンキナーゼ (R T K) は類似する分子トポロジーを有する。全てのものが大きなグリコシル化された細胞外リガンド結合ドメイン、単一の疎水性膜横断領域、および P T K触媒ドメインを含む細胞質ドメインを有している。その構造により、P T Kは膜会合アロステリック酵素であると考えられることができる。水溶性のアロステリック酵素と異なり、R T Kのトポロジーは、リガンド結合ドメインと P T K活性とは細胞膜により分離されていることを示している。したがって、細胞外のリガンド結合による受容体の活性化は、膜のバリアを横切って細胞内ドメイン機能の活性化に翻訳されなければならない。

【 0 0 0 7 】

配列の類似性および独特の構造的特徴に基き、3つの受容体をサブクラスに分類することができる (図 1) 。4つのサブクラスに特徴的な構造的特徴は、単量体サブクラス I 受容体の細胞外ドメインにおける2つのシステインに富む反復配列、サブクラス I I R T K の類似するシステインに富む配列を有するジスルフィド結合ヘテロ四量体 2 2 構造、およびサブクラス I I I および I V T R K の細胞外ドメインにおける5または3の免疫グロブリン様反復部をそれぞれ包含するものである。後者の2つのサブクラスのチロシンキナーゼドメインは、種々の長さの親水性挿入配列により中断される。R T K c D N A クローンが利用可能であることにより、R T K 系統群の構成員の作用機構の詳細な構造 / 機能解析を開始することが可能となった (ウルリッチとシュレシnger、C e l l 6 1 ; 2 0 3 - 2 2 1 (1 9 9 0) による総説) 。

【 0 0 0 8 】

この発明は蛋白質チロシンキナーゼをコードする *f l g* 様遺伝子 (*f l g*) の部分的ヒト c D N A クローンの見つけに基づくものであるが、そのキナーゼドメインは、C S F - 1 および P D G F 受容体チロシンキナーゼのキナーゼ挿入物に類似する位置で中断されていたものである (ルタラ、O n c o g e n e , 3 : 9 - 1 5 (1 9 8 8)) 。その後、*f l g* 特異的オリゴヌクレオチドプローブ (リーら、S c i e n c e , 2 4 5 : 5 7 - 6 0 (1 9 8 9)) を用い、更に抗ホスホチロシン抗体 (パスカールとシンガー、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 8 6 : 5 4 4 9 - 5 4 5 3 (1 9 8 9)) を用いてクローン化することによりチキン *f l g* の全長の c D N A が単離された。*f l g* は次の4つの基準に基く F G F 受容体である：1) 固定化された b F G F 上でのアフィニティクロマトグラフィーによりチキン胚子から精製された受容体はチキン *f l g* 遺伝子産物であり、2) *f l g* 抗ペプチド抗血清は A 2 0 4 横紋筋肉腫細胞における 1 3 0 および 1 5 0 k D a の蛋白質に架橋結合した [¹²⁵I] a F G F を免疫沈降させ、3) *f l g* 抗ペプチド抗血清は a F G F または b F G F を用いる生細胞の処理によりチロシン上で特異的にリン酸化された類似する大きさの蛋白質を免疫沈降させ、4) a F G F 処理細胞溶解物に由来する *f l g* 抗ペプチド抗血清により免疫沈降された 1 3 0 および 1 5 0 k D a の蛋白質は試験管内でチロシンのリン酸化を受ける。

【 0 0 0 9 】

推定される第2の F G F 受容体はマウス細菌性発現キナーゼ (*b e k*) 遺伝子産物であり、そのクローン一部が抗ホスホチロシン抗体を用いてマウス肝臓 c D N A 発現ライブラリーを検索することにより得られている (コンプルスら、M o l . C e l l . B i o l . , 8 : 5 5 4 1 - 5 5 4 4 (1 9 8 8)) 。部分的 *b e k* クロンの演繹されたアミノ酸配列および *f l g* の対応する領域は 8 5 % 同一である。しかしながら、*b e k* がヒト *f l g* 遺伝子のマウスの相同体を表しているのか、それとも他の密接に関連する遺伝子なのかは不明であった。この発明は、ヒト *b e k* および *f l g* の両者の全長の c D N A クローン、その完全な演繹されたアミノ酸配列を提供し、形質移入された細胞において *b e k* および *f l g* の両者が a F G F 、 b F G F および k - F G F と特異的かつ高い親和性で結合することを示すものである。

【 0 0 1 0 】

合理的に薬物を設計するため、受容体機能はますます試みる際の焦点となっている。受容体 - リガンド結合、受容体活性化および / または受容体細胞内標的相互作用に影響を与え

10

20

30

40

50

る分子は全て治療のための潜在的な候補物質である。単離細胞または組織外植片により候補薬物を試験する従来の方法では大規模な検索には限界がある。標的受容体を含む組織サンプルまたは単離細胞は取得するのにコストがかかり、存在量は限られており、機能的に存続した状態で維持するのは困難である。更に、候補薬物を組織サンプルに信頼性よく再現性よく投与するのはしばしば困難である。組織培養した一次外植片を使用する検索検定は、組織サンプルを用いて可能な場合より大規模に行われる。しかしながら、生理的効果を検定するのはより困難であり、また検定は多数の原因、例えば培養媒体または培養条件により妨害を受け易い。最後に、天然の材料から単離された受容体を使用する検定は、受容体が天然性の変動を受け易く、適切な天然の供給元が常に利用可能とは限らないという欠点を有する。ここにおける目的は、大規模な検索の手順を修正できる形態で受容体を提供することである。

10

【 0 0 1 1 】**【 発明の要旨 】**

この発明は、単離された形態であって、プロテインキナーゼ活性を有する細胞質ドメイン、キナーゼ挿入物、膜横断ドメインおよび3つの免疫グロブリン様反復部を有する細胞外ドメインからなる受容体蛋白質またはその断片、およびその生物学的に活性な等価物である。

この発明の他の観点は、受容体蛋白質またはその断片をコードする単離されたDNA配列であって、前記蛋白質がプロテインキナーゼ活性を有する細胞質ドメイン、キナーゼ挿入物、単一の膜横断ドメインおよび3つの免疫グロブリン様反復部を有する細胞外ドメイン

20

を有する単離されたDNA配列およびその生物学的等価物である。
この発明の他の観点は、受容体蛋白質をコードするcDNAからなるベクタ（前記蛋白質はプロテインキナーゼ活性を有する細胞質ドメイン、キナーゼ挿入物、単一の膜横断ドメインおよび3つの免疫グロブリン様反復部を有する細胞外ドメインを有する）である。

【 0 0 1 2 】

この発明の他の観点は、前記ベクタにより形質転換された宿主細胞である。

この発明の他の観点は、プロテインキナーゼ活性を有する細胞質ドメイン、キナーゼ挿入物、単一の膜横断ドメインおよび3つの免疫グロブリン様反復部を有する細胞外ドメインからなるヒト受容体蛋白質の細胞外ドメインまたはその断片（所望しないヘパリン結合生育因子により媒介される細胞応答を阻害するのに有効な量とする）および薬学的に許容し得るキャリアからなる治療組成物である。この発明の他の観点は、プロテインキナーゼ活性を有する細胞質ドメイン、キナーゼ挿入物、単一の膜横断ドメインおよび3つの免疫グロブリン様反復部を有する細胞外ドメインからなるヒト受容体蛋白質の細胞外ドメインまたはその断片（前記受容体蛋白質を担持するヒト細胞に対する日和見病原体の結合を阻害するのに有効な量とする）および薬学的に許容し得るキャリアからなる治療組成物である。

30

【 0 0 1 3 】

この発明の他の観点は、所望しないヘパリン結合生育因子により媒介される細胞応答を特徴とする疾患の患者を処置するに際し、有効量の請求の範囲第25項記載の組成物をこの種の患者に投与することからなる処置方法である。

40

この発明の他の観点は、日和見病原体感染に罹患した患者を処置するに際し（前記病原体はヘパリン結合生育因子受容体に結合し得る）、有効量の請求の範囲第29項記載の組成物をこの種の患者に投与することからなる処置方法である。この発明の他の観点は、細胞受容体に対する繊維芽細胞生育因子の結合を阻害する薬物を検索するに際し、

（a）繊維芽細胞生育因子の存在下に繊維芽細胞生育因子受容体を過剰発現し得る宿主細胞と共に薬物をインキュベートし、

（b）繊維芽細胞生育因子の結合を阻害する薬物の能力を測定する

工程からなる薬物の検索方法である。

この発明の最後の観点は、繊維芽細胞生育因子受容体に対する日和見病原体の結合を阻害する薬物を検索するに際し、

50

(a) 前記病原体の存在下に繊維芽細胞生育因子受容体を過剰発現し得る宿主細胞と共に薬物をインキュベートし、

(b) 病原体の結合を阻害する薬物の能力を測定する
工程からなる薬物の検索方法である。

【 0 0 1 4 】

【 発明の実施の形態 】

ここで使用するように、以下の用語は以下の意味を有する。

ヌクレオチド - 糖部分 (ペントース)、リン酸および含窒素複素環塩基よりなる DNA または RNA の単量体単位。塩基はグリコシド炭素 (ペントースの 1 炭素) を介して糖部分に結合し、塩基と糖との組合せはヌクレオシドと呼ばれる。塩基はヌクレオシドを特徴付ける。4 つの DNA 塩基はアデニン (「 A 」)、グアニン (「 G 」)、シトシン (「 C 」) およびチミン (「 T 」) である。4 つの RNA 塩基は A、G、C およびウラシル (「 U 」) である。

DNA 配列 - 隣接するペントースの 3 および 5 炭素の間のホスホジエステル結合により互いに連結されたヌクレオチドの線状列。異種 DNA は、宿主のものとは通常は DNA を交換しない起源から宿主生物に導入し得る DNA であり、例えばイー・コリを形質転換するのに使用されるヒト DNA がある。

コドン - mRNA を介してアミノ酸、翻訳開始シグナルまたは翻訳終了シグナルをコードする 3 つのヌクレオチド (トリプレット) の DNA 配列。例えば、DNA ヌクレオチドトリプレット TTA、TTG、CTT、CTC、CTA および CTG はアミノ酸ロイシン (「 Leu 」) をコードし、TAG、TAA および TGA は翻訳停止シグナルであり、ATG は翻訳開始シグナルである。

【 0 0 1 5 】

リーディングフレーム - アミノ酸配列への mRNA の翻訳の際のコドンのグループ分け。翻訳に際しては適切なリーディングフレームが維持されなければならない。例えば、DNA 配列 GCTGGTTGTAAG は理論的には 3 つのリーディングフレームまたは相で発現され得て、そのそれぞれが異なるアミノ酸配列を与える：

GCT GGT TGT AAG - Ala - Gly - Cys - Lys

G CTG GTT GTA AG - Leu - Val - Val

GC TGG TTG TAA G - Trp - Leu - (停止)

しかしながら、前記リーディングフレームの 1 つのみが正しい遺伝情報をコードしている。リボソームおよび福次的翻訳開始因子により翻訳開始シグナルが認識され、正しいリーディングフレームが固定される。

ポリペプチド - 隣接する酸の - アミノおよびカルボキシ基の間のペプチド結合により互いに連結されたアミノ酸の線状列。

ゲノム - 細胞またはウイルスの全 DNA。これは就中、個々のポリペプチドをコードする構造遺伝子並びにオペレータ、プロモータおよびリボソーム結合および相互作用配列のような調節配列を包含し、シャイン・ダルガノ配列のような配列を包含する。

【 0 0 1 6 】

構造遺伝子 - 鋳型またはメッセンジャー RNA (「 mRNA 」) を介して特定のポリペプチドに特徴的なアミノ酸の配列をコードする DNA 配列。構造遺伝子は、転移 RNA (tRNA) またはリボソーム RNA (rRNA) のようなその一次産物として RNA を有し得る。

転写 - 構造遺伝子から RNA を生産するプロセス。

翻訳 - mRNA からポリペプチドを生産するプロセス。

発現 - 生成物を生成すべく構造遺伝子が受けるプロセス。蛋白質生成物の場合、これは転写と翻訳との組合せである。

プラスミド - 無傷の「レプリコン」からなる非染色体二本鎖 DNA 配列であり、プラスミドは宿主細胞中で複製される。プラスミドが単細胞生物内に置かれた場合、プラスミドの DNA に起因して、その生物の特徴は変化または形質転換される。例えば、テトラサイク

10

20

30

40

50

リン耐性 (T e t^R) の遺伝子を担持するプラスミドは、先にはテトラサイクリンに感受性であった細胞をこれに耐性のものに形質転換する。プラスミドによって形質転換された細胞を「形質転換体」と呼ぶ。

ファージまたはバクテリオファージ - 細菌のウイルスであって、その多くは蛋白質エンベロープまたはコートに包被された (「カプシド」) D N A 配列よりなる。

【 0 0 1 7 】

クローン化運搬体 - 宿主細胞中で複製し得るプラスミド、ファージ D N A または他の D N A 配列であって、例えば複製、コート蛋白質の生産のような必須の生物学的機能の欠損またはプロモータまたは結合部位のような発現制御領域の欠損を伴うことなく異種 D N A の挿入につき決定し得る様式でこの種の D N A 配列を切断し得る 1 または少数のエンドヌクレアーゼ認識部位を特徴とし、例えばテトラサイクリン耐性またはアンピシリン耐性のような形質転換された細胞の同定に使用するのに適切な選択的遺伝子マーカーを含む。クローン化運搬体はしばしばベクタと呼ばれる。

10

クローン化 - 非性的再生産または D N A 複製により 1 つのこの種の生物または配列から誘導される生物または D N A 配列の集団を得るプロセス。

レプリコン - 特定の生物中での複製に必要な D N A で、複製開始点を含む。

組換え D N A 分子 - 末端 - 末端で接続され、幾つかの宿主細胞に感染する能力を有し、その中で維持され得る異なるゲノムに由来する D N A の断片よりなる分子。

発現制御配列 - 遺伝子に機能的に連結された場合に構造遺伝子の発現を制御および調節するヌクレオチドの配列。これらには l a c 系、ファージ の主オペレータおよびプロモータ領域、ウイルスコート蛋白質の制御領域および原核または真核細胞およびそれらのウイルスの遺伝子の発現を制御することが知られている他の配列が包含される。

20

【 0 0 1 8 】

変異 - 生物の遺伝情報の遺伝し得る変化。

変異体 - 変異を有する生物。一般にその生物が属する種の標準対照株またはその生物の野生型集団と比較した場合に認識し得る表現型を発現する。

ここで使用する、b e k および f l g は、無細胞培養系により生産される繊維芽細胞生育因子受容体またはその断片を示し、天然の b e k および f l g のように試験管内で細胞生育、分化および応答に影響を与える能力を有する生物活性形態のものである。

b e k および f l g の異なる対立形質が天然に存在し得る。これらの変種は、同一の生物学的機能の蛋白質をコードする構造遺伝子のヌクレオチド配列における相異を特徴とし得る。単一または多数のアミノ酸置換、欠失、付加または変更を有する相似体を作製することができる。天然の b e k および f l g のいずれかの生物学的に活性な特性を保持する b e k および f l g の誘導體に帰着する代替的な m R N A スプライシング形態を含むこの種の全ての対立形質変種、修飾体および相似体はこの発明の範囲内に包含される。

30

【 0 0 1 9 】

ここで使用する 1 および 3 文字のアミノ酸省略形は次の意味を有する：

A	A l a	アラニン
C	C y s	システイン
D	A s p	アスパラギン酸
E	G l u	グルタミン酸
F	P h e	フェニルアラニン
G	G l y	グリシン
H	H i s	ヒスチジン
I	I l e	イソロイシン
K	L y s	リジン
L	L e u	ロイシン
M	M e t	メチオニン
N	A s n	アスパラギン
P	P r o	プロリン

40

50

Q	G l n	グルタミン
R	A r g	アルギニン
S	S e r	セリン
T	T h r	スレオニン
V	V a l	バリン
W	T r p	トリプトファン
Y	T y r	チロシン
B	A s x	A s pまたはA s n、区別しない
Z	G l x	G l uまたはG l n、区別しない
X	X	未決定または不定型のアミノ酸

10

【0020】

説明を容易にするため、この発明は3つの別々ではあるが関連する態様を有するものとして示すことができる。第1の態様は、ヒト f l g および b e k 受容体蛋白質をコードする全長 cDNA のクローン化および同定に関する。第2の態様は組換え宿主細胞中でのヒト f l g および b e k 遺伝子産物の発現を構成するものであり、第3の態様は就中受容体分析および薬物検索のための組換えにより誘導した産物の使用を構成するものである。

【0021】

ヒト f l g および b e k のクローン化

一般に組換えDNA技術は公知であり (Methods in Enzymology、(アカデミック・プレス、ニューヨーク、第65および68巻(1979); 100および101(1983))を参照することができる)、この中に引用された参考文献がある。最も普通に使用される組換えDNA方法論を具体化する広範な技術的議論は、マニアイスら、「分子クローン化」、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(1982)および「分子生物学の現代の手順」、第IおよびII巻、アウスベルら編、グリーン・パブリッシング・アソシ・アンド・ウイレイ・インターサイエンス(1987)に認めることができる。種々のポリペプチドをコードする遺伝子は、組換えDNA運搬体、例えば細菌またはウイルスベクター中にポリペプチドをコードするDNA断片を組み込み、適切な宿主を形質転換することによりクローン化することができる。この宿主は典型的にはエシェリキア・コリ(イー・コリ)株であるが、所望の産物に応じて真核宿主を利用することができる。組換えベクターを組み込むクローンを単離し、生育させ、所望のポリペプチドを大規模に生産するのに使用することができる。

20

30

【0022】

幾つかの研究者のグループがメッセンジャーRNA(mRNA)の混合物を真核細胞から単離し、一連の酵素反応を用いてこのmRNA混合物に相補的な二本鎖DNAコピーを合成している(ウェワーら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 7137-7141(1986))。第1の反応において、逆転写酵素とも呼ばれるRNA指向性DNAポリメラーゼによりmRNAは一本鎖相補的DNA(cDNA)に転写される。逆転写酵素は5' - 3' の方向にDNAを合成し、前駆体としてデオキシリボヌクレオチド5' - トリリン酸を利用し、鋳型およびプライマー鎖の両者を必要とするが、その内後者は遊離の3' - ヒドロキシ末端を有さなければならない。mRNA鋳型の部分的または完全なコピーいずれの場合でも、逆転写酵素生成物はしばしばその3' 末端において短い部分的に二本鎖のヘアピン(「ループ」)を有する。第2の反応において、これらの「ヘアピングループ」はDNAポリメラーゼに対するプライマーとして利用され得る。予備形成されたDNAは、DNAポリメラーゼの作用に際して鋳型およびプライマーの両者として必要である。DNAポリメラーゼは遊離の水酸基を有するDNA鎖の存在を必要とし、これに新しいヌクレオチドが付加して5' - 3' 方向に鎖を延長する。このような一連の逆転写酵素およびDNAポリメラーゼ反応の生成物は一端になおループを有する。ループの頂部または二本鎖DNAの「折畳み点」はこのように生じるものであり、実質的に一本鎖の断片である。第3の反応において、一本鎖特異的ヌクレアーゼS1を用いてこの一本鎖断片を開裂させ、「平滑末端」デュープレックスDNA断片を生成する。この一般的な方

40

50

法は全ゆる mRNA 混合物に適用することができ、プエルら、*J. Biol. Chem.*, 253:2483(1978)に記載されている。

【0023】

この結果得られた二本鎖 cDNA 混合物 (ds-cDNA) を、多数の公知の技術のいずれかにより、少なくとも部分的には使用する特定の運搬体に応じてクローン化運搬体に挿入する。多様な挿入方法が、*Methods in Enzymology*, 68:16-18(1980)およびそこに引用された参考文献に相当詳細に論じられている。一旦 DNA 断片を挿入したならば、クローン化運搬体を使用して適切な宿主を形質転換する。このようなクローン化運搬体は通常は宿主に対して抗生物質耐性特性を与えるものである。この種の宿主は一般に原核細胞である。この時点では、少数の形質転換または形質移入された宿主のみが所望の cDNA を含有する。全ての形質転換または形質移入宿主の総計により遺伝子「ライブラリー」が構成される。この方法により作成された全 ds-cDNA ライブラリーにより、出発材料として使用した mRNA 混合物中に存在するコード情報の代表的サンプルが与えられる。

10

【0024】

適切なオリゴヌクレオチド配列が利用可能であるならば、これを使用して以下の様式で意図するクローンを同定することができる。個々の形質転換または形質移入細胞をニトロセルロース紙上でコロニーとして生育させる。これらのコロニーを溶解させる。放出される DNA は加熱することにより紙上に強固に結合する。その後、意図する構造遺伝子に相補的なラベルしたオリゴヌクレオチドプローブと共に紙をインキュベートする。プローブは相補的な cDNA とハイブリダイズし、オートラジオグラフィによって同定される。対応するクローンを特徴付けし、所望の蛋白質の構造情報の全てを含む 1 つまたは組合せたクローンの同定を図る。意図する蛋白質をコードする核酸配列を単離し、発現ベクタに再挿入する。発現ベクタにより、クローン化された遺伝子は、ds-cDNA の効率的な発現 (転写および翻訳) を可能とする特定の原核または真核制御要素の調節制御下に置かれる。よって、この一般的な技術は、少なくとも一部のアミノ酸または DNA 配列が公知であり、これについてオリゴヌクレオチドプローブが利用可能であるような蛋白質に対してのみ適用することができる。一般にはマニアティスら、前記文献を参照することができる。

20

【0025】

更に最近では、意図するコードされた蛋白質に特異的な抗体を用いて細菌コロニーまたはファージプラークをプローブすることにより特定のクローンを同定する方法が開発された。蛋白質産物の獲得が必要であるため、この方法は「発現ベクタ」クローン化運搬体と共にのみ使用することができる。蛋白質の発現を制御する調節遺伝子配列に隣接して構造遺伝子をベクタに挿入する。化学的方法または宿主細胞もしくはベクタにより与えられる機能により細胞を溶解し、特定の抗体および酵素免疫検定のような検出系によって蛋白質を検出する。この例には、ヤングとデービス、*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 80:1194-1198(1983)およびヤングとデービス、*Science*, 222:778(1983)により記載された gt11 系がある。

30

【0026】

前記したように、ヒト f1g の部分的 cDNA クローンは本発明者の先の研究から公知であった。元のヒト f1g 部分的 cDNA クローン C51 並びに幾つかの付加的な独立した単離物のその後のヌクレオチド配列分析により、全ての部分的クローンは、開裂した天然に存在する EcoRI 部位に対応する同一の 5' 配列を有することが明らかとなった。これは、cDNA ライブラリーの構築に際して、この EcoRI 部位は EcoRI による開裂の前に EcoRI メチラーゼにより保護されていなかったことを示唆する。したがってこれは、f1g cDNA の 5' 末端は独立にクローン化された重複していない EcoRI 断片に存する理由によると考えられる。固定ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術 (ローラ、*Science*, 243:217-220(1980)) を使用してこのことを確認し、内部 EcoRI 部位の上流の f1g ヌクレオチド配列の更なる 170 塩基対 (bp)

40

50

を取得した。 gt11 アーム特異的オリゴヌクレオチドプライマーと共にこの新しい配列においてプライマーを使用する PCR 反応の第 2 段階により、同じ H U V E C c D N A ライブラリーに由来する 5 flg クローンの挿入物を増幅した。 PCR により生成する配列変異が時として起こるため、この第 2 の PCR 生成物を放射能ラベルし、 gt11 にて H U V E C c D N A ライブラリーを再検索するプローブとして使用した。内部 E c o R I 部位から 5 非翻訳領域に延在する 1 つの 7 0 0 b p クローンが得られた。ヒト flg の完全な演繹されたアミノ酸配列を図 2 a に示す。

【 0 0 2 7 】

部分的マウス bek およびヒト flg c D N A クローンの公表された配列 (コーンブルスら、 1 9 8 8 前記、ルタら、 1 9 8 8 前記) は高度に相同性であり、キナーゼ挿入物 (5 0 % 同一性) および C O O H 末端にのみ認められる顕著な相違を有している。多少の配列の相異は種の相違に帰し得るが、より大きくはヒトのキナーゼ挿入物およびネズミの P D G F 受容体 (B 型) は 8 5 % 同一であり (ヤーデンら、 N a t u r e , 3 2 3 : 2 2 6 - 2 3 2 (1 9 8 6) 、クラエソン - ウェイシュら、 M o l . C e l l . B i o l . , 8 : 3 4 7 6 - 3 4 8 6 (1 9 8 8)) 、 bek は flg より実際は異なる遺伝子産物であることを示唆していることが銘記された。 bek をクローン化すべく、 gt11 におけるヒト脳幹 c D N A ライブラリーを、マウス bek の C O O H 末端 1 1 コドンに対応する放射能ラベルした 3 3 塩基オリゴヌクレオチドを用いて検索した (コーンブルスら、 1 9 8 8 前記) 。これは、公表された bek および flg 配列の間の非同一性の最長の鎖に対応する。 3 2 のクローンを同定したが、 3 . 2 k b c D N A 挿入物を含有するその内の 1 つの bek 5 を配列決定した。演繹されたアミノ酸配列により、これは flg に極めて類似するが区別され、また翻訳開始 A T G を含む約 2 5 b p のシグナルペプチド配列を欠失することが明確に確定された。 bek 5 の 5 領域に対応する 7 5 0 b p c D N A 断片を用いて脳幹ライブラリーを再検索することにより重複するクローンが得られた。ヒト bek の完全な演繹されたアミノ酸配列を図 2 a に示す。 flg および bek クローン化の詳しい詳細は実施例 I に示す。

【 0 0 2 8 】

flg および bek は類似するがなお別個の遺伝子産物であり (図 2 b) 、受容体結合チロシンキナーゼの P D G F / C S F - 1 / c - k i t 系統群により共有される構造的特徴を有する (ウルリッチとシュレシナー、 1 9 9 0 前記) 。これらのコード配列は 2 1 アミノ酸の疎水性シグナルペプチド配列、 3 5 6 (bek) および 3 5 5 (flg) アミノ酸の細胞外ドメイン、 2 1 アミノ酸の膜横断ドメイン、および 4 2 3 (bek) および 4 2 5 (flg) アミノ酸の細胞質ドメインよりなる。 flg および bek の細胞外ドメインは類似する大きさおよび位置の 3 つの「免疫グロブリン様」 (I g) ドメインを含むものである。興味あることに、第 1 の I g ドメイン内および周囲のアミノ酸配列同一性は、第 2 および第 3 の I g ドメイン (7 4 %) 内および周囲に認められるものより極めて小さい (4 3 %) 。 flg および bek の細胞外ドメインには 8 つの潜在的な N - 結合グリコシル化部位が同一の位置に局在する。 flg はアミノ酸 1 8 5 に付加的な N - 結合グリコシル化部位を含む。リーら (1 9 8 9) は、 8 つの隣接する酸性アミノ酸によりチキン flg の細胞外ドメイン内に 1 つの領域を銘記した。この「酸性ボックス」はヒト flg およびヒト bek にも存在し、それぞれ 8 および 5 の酸性残基よりなる。 bek および flg の細胞質ドメインは、 1 4 のアミノ酸挿入により分割される保存された触媒性キナーゼドメインが後続する長い近位膜領域よりなる。キナーゼドメインには相離するカルボキシ末端尾部が続く。 bek および flg の全体的同一性は 7 1 % であり、その最も高い同一性 (8 8 %) の領域はキナーゼドメインである。

【 0 0 2 9 】

種々の細胞系統における flg および bek m R N A 発現を、これらの非相同 3 非翻訳領域の部分に対応する bek および flg の c D N A プローブを用いてノーザンブロットにより決定した。 A 2 0 4 横紋筋肉腫細胞では約 4 . 3 および 4 . 2 k b の 2 つの flg 転写物が認められるが、 bek m R N A は検出し得ない (図 3) 。 H U V E C およびヒト

10

20

30

40

50

テトラカルシノーマ N T E R A 2 細胞は、それぞれ 4 . 2 および 4 . 3 k b の f l g 転写物を独特に発現する。別個の 4 . 3 および 4 . 2 k g の f l g 転写物の意義は現在知られていない。これらは、図 2 a と図 2 b とを比較すると、細胞外ドメインのアミノ末端システインループを欠失した単離された f l g クローンに関連する可能性がある。4 . 4 k b の b e k 転写物はテトラカルシノーマ細胞系統にのみ認められる。他の研究者により、b e k mRNA は成体マウス肝臓、肺、脳および腎臓では発現されるが、心臓および脾臓には存在しないことが示されている（コーンブルスら、1988 前記）。チキン f l g 蛋白質は胚子の腸、脳、砂嚢、心臓、骨格筋および繊維芽細胞に認められるが、成体チキンでは脳にのみ認められる（パスカレとシンガー、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 5449-5453 (1989))。考え併せると、これらの結果は b e k および f l g が協調的に発現されていないことを示している。 10

【0030】

組換え細胞中での f l g および b e k の発現

f l g および b e k の d s - c D N A は、多くの公知の技術のいずれかにより発現ベクタに挿入することができる。一般に、マニアティスら（1982）前記およびアウスベルら（1987）前記に方法を認めることができる。一般に、少なくとも1つの制限エンドヌクレアーゼによりベクタを線状化し、これにより少なくとも2つの平滑または付着末端を生成するものとする。ベクタ挿入部位に d s - c D N A を連結または接続する。

【0031】

実質的な細胞壁物質を含む原核または他の細胞を用いる場合、発現ベクタを用いる形質転換の最も普通の方法は、コーエン・アール・エヌら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 2110 (1972) により記載された塩化カルシウム前処理である。細胞壁バリアを有さない細胞を宿主細胞として使用する場合は、グラハムとファン・デル・イービー、Virology, 52: 456 (1973) により記載されたリン酸カルシウム沈殿法により感染を行う。核注入、ウイルス感染、エレクトロポレーションまたはプロトプラスト融合のような D N A を細胞に導入する他の方法を成功裡に使用することができる。その後細胞を選択培地上で培養し、発現ベクタがコードする蛋白質を生産する。「発現ベクタ」は含有する D N A 配列を転写および翻訳し得るベクタを指し、その場合この種の配列はこれらの発現に影響を与え得る他の調節配列に結合している。これらの発現ベクタは、宿主生物または系内でエピソーム、バクテリオファージまたは染色体 D N A の一体化部分として複製し得るものでなければならない。発現ベクタの1つの形態は、通常は細菌中に生息し複製するバクテリオファージ、ウイルスである。この目的のために特に望ましいファージは、ヤングとデービス、前記により記載された g t 1 0 および g t 1 1 ファージである。g t 1 1 は、挿入された D N A により特定されるポリペプチドを生産し得る一般的な組換え D N A 発現ベクタである。 20 30

【0032】

分解を最小のものとするため、ラクトースの合成アナログ（I P T G）を用いる誘発に際して、外来蛋白質またはその一部を原核蛋白質 - ガラクトシダーゼに融合させて合成する。蛋白質分解経路を欠損する宿主細胞を使用することにより、誘発された g t 1 1 クローンにより生産される新規蛋白質の生存期間を増加させることもできる。g t 1 1 クローン内での外来 D N A の適切な発現は、- ガラクトシダーゼプロモータおよび翻訳開始コドンに対する挿入された D N A の方向性およびリーディングフレームに依存し得る。組換え D N A 技術に有用な発現ベクタの他の形態はプラスミド、環状で組込まれていない（染色体外）二本鎖 D N A である。同等の機能を与える全ゆる他の形態の発現ベクタがこの発明の目的における使用に適切である。ここに開示する組換えベクタおよび方法論は、広範な範囲の原核および真核生物を包含する宿主細胞における使用に適切である。原核細胞は、D N A 配列のクローン化およびベクタの構築に好適である。例えば、イー・コリ K 1 2 株 H B 1 0 1 （A T C C 第 3 3 9 6 9 4 号）が特に有用である。勿論、他の微生物株を使用することができる。宿主細胞または系と和合性の種から誘導された複製および制御配列を含むベクタをこれらの宿主との関連において使用する。ベクタは通常は複製開始点 40 50

を担持すると共に形質転換された細胞にて表現型選択を与え得る特徴を有する。例えば、イー・コリはベクタ pBR322 を使用して形質転換することができ、これはアンピシリンおよびテトラサイクリン耐性の遺伝子を含む（ポリマーら、Gene, 2: 95 (1977)）。

【0033】

これらの抗生物質耐性遺伝子は形質転換された細胞を同定する手段を与える。発現ベクタは、意図する遺伝子の発現に使用することのできる制御要素を含むことができる。イー・コリ中で外来DNA配列の発現に使用される通常の前核制御要素には、イー・コリの - ガラクトシダーゼおよびトリプトファン (trp) オペロンから誘導されるプロモータおよび制御配列並びにバクテリオファージの pR および pL プロモータが包含される。これらの要素の組合せも使用された（例えば、trp プロモータとラクトースオペレータとの融合体である TAC）。他のプロモータも発見され利用され、それらのヌクレオチド配列に関する詳細が公表され、当業者であればこれらを機能的に組合せて活用することができる。原核生物に加えて、真核微生物、例えば酵母培養物も使用することができる。サッカロミセス・セレビシア、または通常のパン酵母は真核微生物の中で最も普通に使用されるが、他の多数の株が通常は利用可能である。酵母中での外来DNA配列の発現に適切な酵母プロモータには、3-ホスホグリセレートキナーゼまたは他の解糖系酵素のプロモータが包含される。適切な発現ベクタは終止シグナルを含有し得て、これはクローン化された遺伝子の mRNA 転写物のポリアデニル化および終止を与える。酵母和合性プロモータ、複製開始点および適切な終止配列を含む全ゆるベクタが bek または flg の発現に適切である。

10

20

【0034】

多細胞生物から誘導された細胞システムも宿主として使用することができる。原則的に、この種の全ゆる細胞培養が実施可能であり、脊椎動物または無脊椎動物起源の由来を問わない。しかしながら、脊椎動物細胞が最も興味あるものであり、培養した脊椎動物細胞の増殖（組織培養）は近年では日常的な手順となっている。この種の有用な宿主の例には、VERO、HeLa、マウス C127 または 3T3、チャイニーズ・ハムスター卵巣 (CHO)、W138、BHK、COS-7 および MDCK 細胞システムがある。マウス 3T3 および CHO 細胞が特に好適である。この種の細胞の発現ベクタは、通常は複製開始点、発現される遺伝子の前に位置するプロモータ、RNA スプライス部位（必要に応じて）および転写終止配列を含む。

30

哺乳動物細胞で使用するため、発現ベクタ上の制御機能（プロモータおよびエンハンサ）がしばしばウイルス材料によって与えられる。例えば、普通に使用されるプロモータは、ポリオーマ、アデノウイルス 2 および最も多くの場合シミアンウイルス 40 (SV40) から誘導される。ネズミのメタロチオネイン遺伝子のプロモータ（パウラキスとハーマー、Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 397-401 (1983)）のような真核プロモータも使用することができる。更に、この種の制御配列が宿主の系と和合性の場合、所望の遺伝子配列と天然に会合したプロモータまたは制御配列を利用することが可能であり、しばしば望ましい。転写の効率を上げるため、真核エンハンサ配列も構成に加えることができる。これらの配列は、種々の動物細胞またはマウスサルコーマウイルスのような腫瘍性レトロウイルスから得ることができる。

40

【0035】

複製開始点は異種の起源、例えば SV40 または他のウイルス供給源から与えられるものを含むベクタの構築により与えられるか、宿主細胞染色体複製機構により与えられる。ベクタが宿主細胞染色体に組込まれる場合、後者が十分である場合が多い。

宿主細胞は bek または flg を産生することができ、これらは多様な化学的組成とすることができる。最初のアミノ酸としてメチオニンを含む蛋白質を生産する。構造遺伝子の起源に天然に存在する ATG 開始コドンにより、または構造遺伝子の断片の前に操作することにより、このメチオニンが存在するものとする。蛋白質を細胞内または細胞外で切断することができ、蛋白質のアミノ末端に天然に認められるアミノ酸を生成する。蛋白質

50

はそれ自身または異種のシグナルペプチドと共に生産することができ、シグナルペプチドは細胞内外の環境下で特異的に切断することができる。最後に、b e kまたはf l gは、余分のポリペプチドを何ら切断除去する必要なく成熟形態で直接発現により生産することができる。

組換え宿主細胞とは、組換えDNA技術を使用して構成したベクタにより形質転換された細胞を指す。ここに定義するように、b e kまたはf l gはこの形質転換の結果として生産される。この種の細胞により生産されたb e kまたはf l gまたはこれらの断片を「組換えb e kまたはf l g」と言う。

f l gおよびb e kの発現の詳細は実施例 I I に示す。

【 0 0 3 6 】

f l gおよびb e k過剰生産細胞系統の応用

ここに提供する過剰発現 b e k および f l g 細胞系統は、リガンド/レセプション相互作用の検討並びに合理的に設計された薬物の検索プログラムに有用である。治療のための潜在的な部位には、限定されるものではないが、受容体/リガンド結合、シグナル導入、受容体/標的相互作用が包含される。

よって、薬物は競合的阻害または他の機構により天然のリガンド結合を阻害する能力について試験することができる。また、b e k および f l g 過剰生産細胞を免疫源の供給源として使用してモノクローナル抗体のような抗体を生産することができ、これもリガンド結合または受容体凝集に影響を与えるその能力について試験することができる。この系は、キナーゼ/標的相互作用に影響を与える薬物を評価するのにも使用することができる。チルホスチンとして知られるこれらの薬物はその作用部位として受容体キナーゼドメインによる細胞標的のリン酸化を有し、受容体自体の自己リン酸化を含む。リガンド結合とキナーゼ活性とは別のドメインに存するため、全受容体配列を発現させて前記特定した活性に対する薬物の効果の評価を図ることが必要である。よって、この発明は f l g および b e k の生物学的に活性な断片の発現を企図する。例えば、b e k の最初の 3 7 7 アミノ酸または f l g の最初の 3 7 6 アミノ酸（すなわち細胞外プラス膜横断ドメイン）または b e k の C O O H 末端 4 2 3 アミノ酸または f l g の 4 2 5 アミノ酸をコードする c D N A のクローン化および発現の生成物を有用に用いてそれぞれリガンドおよびチルホスチンを評価することができる。実施例 I I I はこれらの応用の幾つかを示すものである。

【 0 0 3 7 】

更に他の態様では、細胞外ドメイン単独またはそのサブドメインは、その標的細胞に感染する手段として内性 b e k または f l g を使用するヘルペスシンプレックスタイプ I または他の病原体のような日和見病原体による感染の阻害剤として有用たり得る。細胞への H S V - 1 の侵入は、過剰発現した f l g をその表面に有する細胞系統では劇的に増加することが報告されている（アール・ジェイ・カナラ、*Science*, 248: 1410 - 1413 (1990)）。よって、過剰発現細胞系統を使用して受容体断片自体のような候補薬物の存在下または非存在下に低減したウイルス結合（直接検定）を測定するかまたは媒体からの低減した感染性またはウイルスの低減によって阻害剤薬物を検索することができる。

この発明は、2つの繊維芽細胞生育因子受容体に対する完全なヒト c D N A 配列を提供するものである。ヒトプロテインキナーゼ末端 f l g の部分的 c D N A 配列は公知であり（ルタラ、前記（1988））、マウスプロテインキナーゼ b e k の部分的配列（コーンブルスラ、前記（1988））についても同様であったが、これらの遺伝子のヒト形態の完全な配列は利用可能ではなかった。完全な配列がない場合、機能的リガンド結合部位の度合および f l g および b e k の相同性の程度は適切に評価できなかった。ここで開示するように、f l g および b e k は a F G F、b F G F および k - F G F に対して高い親和性を有する類似するが別個の遺伝子産物である。b e k および f l g 遺伝子は異なる染色体上に同在し、種々の細胞系統および組織中で異なったものとして発現される。

【 0 0 3 8 】

f l g および b e k は、分割チロシンキナーゼドメインおよび複数の免疫グロブリン様ド

10

20

30

40

50

メインよりなる細胞外領域を含むPDGFおよびCSF-1受容体チロシンキナーゼにより共有される構造的特徴を示す。しかしながら、FGF受容体は次の幾つかの点でPDGFおよびCSF-1受容体とは構造的に別個である：1) FGF受容体の細胞外ドメインは3つの免疫グロブリン(Ig)ドメインよりなるのに対し、PDGFおよびCSF-1受容体のもは5つのIgドメインよりなる。この点についてはFGF受容体はIL-1受容体に類似しており、その細胞外領域は3つのIgドメインよりなる(シムスら、*Science*, 241: 535-589(1988))、2) FGF受容体の近位膜領域、87(f1g)および89(bek)アミノ酸はPDGFおよびCSF-1受容体のも(それぞれ49および51アミノ酸)より顕著に長い、3) FGF受容体のキナーゼ挿入物ドメインは僅か14のアミノ酸よりなるのに対し、PDGFおよびCSF-1受容体キナーゼ挿入物は遥かに長い(それぞれ104および70アミノ酸)(ハンクスら、*Science*, 241: 42-52(1988))。PDGF受容体のキナーゼドメインにおけるコンセンサスチロシン残基および潜在的な自己リン酸化部位は両者のFGF受容体で保存されている(f1g残基654、bek残基657)。生物学的に別個の種々のリガンドに対する受容体の中に共通の構成が存在することは、構造および/または機能の理由について、強い進化の強制を受けたという議論を支持する(ウルリッチとシーシンガー、*Cell*, 60: 203-221(1990))。

【0039】

f1gまたはbekのコード配列を含む哺乳動物発現ベクタにより感染したNIH3T3細胞は、それぞれみかけの分子量150,000および135,000を有する糖蛋白質の合成を指向する。ツニカマイシンの存在下に合成された場合、主要なf1g蛋白質の分子量は110kDaであるのに対し、bekのもは90kDaである。90および110kDaの2つのf1g蛋白質が、ツニカマイシン処理した代謝的にラベルしたヒト横紋筋肉腫細胞の免疫沈降物に先に認められた(ルタら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 8722-8726(1989))。蛋白質分解に関する機構を完全に規定するのは不可能であるが、横紋筋肉腫細胞における90および110kDaのf1g蛋白質は真の一次翻訳産物を表している可能性がある。レイドラ(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 1596-1600(1990))は2つの別個のネズミf1gcDNAの単離を最近報告したが、その1つは明らかにここに開示するヒトf1gcDNAの相同体であり、第2の短いcDNAは代替的スプライシングにより第1のIg様ドメインをコードする領域を欠失するものである。ここに開示する全長のクローンに加えて、HUVECおよびヒト脳cDNAライブラリーに由来する切断形態のf1gおよびbekをコードすると考えられる他のcDNAクローンを回収することができる。第1のIg様ドメインを欠損するが他はそのままであるf1gの変種が単離された。他のcDNA変種には、単一の配列のみ、単一の「Ig様」ドメインおよび停止コドンコードするbekの切断された種類および2つの「Ig様」ドメインをコードするf1gの変種が包含される。これらの2つのクローンはbekまたはf1gの分泌された形態を代表し得る。これらのクローンのヌクレオチド配列と3つの「Ig様」ドメインを有する受容体をコードするf1gおよびbekcDNAとの比較により、これらは代替的なスプライシングによりf1gおよびbekの構造遺伝子から誘導されたことが示唆される。したがって、横紋筋肉腫細胞の溶解物から免疫沈降したf1gの低分子量種は代替的なスプライシングにより生成したf1gの真の形態を表す可能性がある。興味あることに、A204横紋筋肉腫細胞は代替的なスプライス形態を表し得る2つの異なるf1gmRNAを発現するのに対し、NTERA-2および内皮細胞は相異して代替的なf1gmRNAを発現すると思われる。

【0040】

発明の実施に有用な株の寄託

以下の株の生物学的に純粋な培養物の寄託をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、12301パーキロー・ドライブ、ロックビル、メリーランドにより行い、成功裡の生存性試験の後、後記する受託番号が与えられ、必要な手数料を支払った。前記培養物

10 Bek4A GGAATTCAAGCTTCTAGACCACCATGGTCAGCTGGGGTCGTTTCA
 11 Bek1B TCCTATTGTTGGGCCCAAGTGCA

【 0 0 4 3 】

5 f l g クロンの単離

内部 E c o R I 部位の f l g c D N A 5 (p C 5 1 の 5 末端、ルタら、1988、前記) は、固定 P C R (ローら、1989前記) によりプライマー F l g - 1 を使用し 50 μ g ヒト内皮細胞全 R N A から第 1 の鎖 c D N A 合成を特異的にプライムして得た。ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼによる第 1 の鎖の d G 尾部形成の後、プライマー F l g - 2、A N および 10 p m o l A N p o l y C による P C R 増幅 (30 サイクル) を 94 で 1.5 分間、50 で 2 分間および 72 で 4 分間のサイクル時間で行った。C 5 1 配列を 5 方向に 170 b p 延長した単一の P C R 生成物が得られた。新たな配列を使用して 2 つのオリゴヌクレオチドを設計し、これらを g t 1 1 アーム特異的オリゴヌクレオチドと共に使用して P C R により内皮細胞ライブラリーに含まれる 5 f l g クロンを増幅した。第 2 の P C R 反応は、 2×10^6 ファージおよびオリゴヌクレオチド F l g - P E - 165 n o n および G T 1 1 - R 1 を用いて行った。第 3 の反応では、オリゴヌクレオチドプライマー F l g - P E - 14 n o n および G T 1 1 - R 3 について鋳型として 5 μ l の先の反応物を使用した。第 3 の反応に由来する 560 b p 生成物を T 4 D N A ポリメラーゼとインキュベートすることにより平滑末端とし、p G e m - 1 (ストラタジーン) および M 1 3 m p 1 9 の S m a I 部位にクローン化して配列決定した。p G e m - 1 中の 5 f l g P C R 生成物を切出し、ランダムヘキサマープライミングにより放射能ラベルし (フェインバーグとボゲイスティン、A n a l . B i o c h e m . , 137 : 266 (1984))、H U V E C c D N A ライブラリーを再検索するのに使用して潜在的な P C R により生成された人為現象のない c D N A クロンの取得を図った。 2×10^6 の検索した組換えファージ中で唯一つのクローンを検出した。このクローンの c D N A 挿入物のヌクレオチド配列分析により、その配列は P C R により生成した生成物と同一であり、これは部分的 f l g クローン p C 5 1 により共有される E c o R I 部位で終止することが明らかとなった。この c D N A を、翻訳開始 A T G の 50 b p 5 を切断する E c o R I および S a c I により消化し、650 b p の E c o R I / S a c I 断片を同様に開裂した p G e m - 1 にクローン化した。p C 5 1 に由来する 3 E c o R I f l g 挿入物を 5 f l g クロンの E c o R I 部位にクローン化することにより全長の f l g c D N A を構築した。全長の c D N A を S m a I / A p a I により切出し、T 4 D N A ポリメラーゼにより平滑末端とし、p M J 3 0 の E c o R V 部位にクローン化した。p M J 3 0 は、p 267 の a F G F 挿入につき E c o R V クローン化部位を含むリンカの置換により誘導される (ジェイら、E M B O . J . 7 : 963 - 969 (1988)) 。

【 0 0 4 4 】

重複するヒト b e k c D N A クロンの単離

部分的ネズミ b e k コード配列 (コーンブルスら、1988前記) の 3 末端に相補的なアンチセンス 33 塩基オリゴヌクレオチド (3 m b e k) を用いて g t 1 1 中の 1 日保存ヒト脳幹 c D N A ライブラリー (カムホルツら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 83 : 4962 - 4966 (1988)) を検索した。 1.5×10^6 の組換えプラークの検索から 32 の陽性 c D N A クロロンが単離され、最長のクローン、b e k 5 を更なる分析のために選択した。b e k 5 を E c o R I により消化し、5.2 k b および 3.1 k b E c o R I 断片を更なる操作のために M 1 3 m p 1 9 および p G e m - 1 ベクタ中に別々にサブクローン化した。

b e k 5 に由来する 5 基部 750 b p 断片を用いて 2 回目に脳幹ライブラリーを検索することによりヒト b e k の 5 末端についての c D N A クロロンを単離した。ニックトランスレーションにより断片を放射能ラベルし、 1.5×10^6 プラークの検索に使用した。54 のハイブリダイズするプラークが検出され、1 つ、b e k 7 8 が元の c D N A クロロンと重複し、5 方向に更に 218 b p 延長したものであった。

【0045】

RNA単離およびノーザン分析

A204 (ヒト横紋筋肉腫)、U563 (ヒトグリア芽細胞腫) および NTERA-2 cl.D1 (ヒトテトラカルシノーマ) 細胞を10%ウシ胎児血清によるDMEM中で生育させた。ヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC) は、10%ウシ胎児血清、10U/mlヘパリン (アップジョン) および5ng/ml組換えaFGFを含有する培地199中で生育させた。グアニジンHCl (ワンら、Dev. Biol. 107: 75-86 (1985)) により NTERA 2 cl.D1 細胞から、またグアニジンイソチオシアネート (チルグウィンら、Biochem. 18: 5294-89 (1979)) により HUVEC および U563 細胞から全RNAを単離した。RNAはその260nmの光学的吸収により 10

4 μgの全RNAを含有するサンプルをホルムアルデヒドを含有する1.25%アガロースゲルにより分画し、ニトロセルロースに移した後、主として前記したように (シード、Genetic Engineering 中、セトロウら編、第4巻第91~102頁、プレナム・プレス・ニューヨーク、1982) ランダムヘキサマープライミング (フェインバーグとボーゲルシュタイン、Anal. Biochem. 137: 256 (1984)) により生成したプローブを使用してプローブした。flgプローブは3非コード領域内に完全に含まれる550bp Apa I / Eco R I 断片とした。bekプローブは3非コード領域内に完全に含まれる850bp Tth 111 I / Eco R I 断片とした。

【0046】

実施例 I I

この実施例は、哺乳動物発現ベクタにおける全長の flg および bek の発現を示すものである。

先の実施例に記載したように、Sma I / Apa I を用いて全長の flg クローンを切出し、T4 DNAポリメラーゼにより平滑末端とし、発現プラスミド pMJ30 の Eco R V 部位にクローン化した。pMJ30 は、p267におけるaFGF挿入物のリンカ置換により誘導されたものである (ジャイら、EMBO J. 7: 963-969 (1988))。よって、全長の flg 配列を含む pMJ30 を pflgFL24 とする。

オリゴヌクレオチドプライマー Bek4A および Bek1B を用いて Bek78 に由来する276bp断片を増幅することにより哺乳動物発現のためのヒト bek cDNA を調製した。HindIII および Bcl I による消化の後、重複の領域にて独特の Bcl I 部位で bek5 の2.2kbサブクローンに5222bp断片を接続した。PCR増幅断片により、推定されるイニシエータATGコドンの直ぐ上流に制限部位および好適な翻訳開始配列を加えた。31.0kb Eco R I bek cDNA断片を続いて挿入した。NIH3T3細胞への導入のため、全ヒト bek コード領域を含む2.5kb断片を pMJ30 にサブクローン化した。全てのクローンのヌクレオチド配列を連鎖停止により両者の鎖について決定した (サンガーら、Ann. N. Y. Acad. Sci., 51: 660-672 (1977))。よって、全長の bek 配列を含む pMJ30 を pGC37 とする。

【0047】

10%ウシ血清を用いてダルベッコ修飾イーグルズ培地 (DMEM) 中にて NIH3T3 細胞を生育させた。flgcDNA または bek cDNA の全コード配列を含む20μgの発現ベクタと1μg pSV2neo, または1μg pSV2neoのリン酸カルシウム共沈殿により NIH3T3 細胞を感染させた。pSV2neo は単に選択マーカを与えるのみであり、全ゆる同等の共感染系を用いることができることを銘記すべきである。個々のクローンを500μg/mlゲネチシン (ギブコ) 中で選択し、200μg/mlゲネチシンを含有する培地中で維持した。

SV40プロモータおよびサイトメガロウイルスエンハンサの直ぐ下流にて哺乳動物発現ベクタ中に bek および flg に対する cDNA のコード領域を別々に挿入した。pSV2neo (サザンとバーグ、J. Mol. Appl. Gen. 1: 327-341 (19

10

20

30

40

50

82)) および b e k または f l g 発現ベクタの 1 : 20 混合物を用いて N I H 3 T 3 細胞を共感染し、500 μ g / ml ゲネチシン (ギブコ) の存在下の生育により感染体を選択した。[¹²⁵I] a F G F を架橋結合することにより F G F 受容体の過剰発現についてそれぞれの約 50 クローンを検索した。p S V 2 n e o 単独により感染した N I H 3 T 3 細胞を対照とした。a F G F の増加した結合を示す b e k および f l g 感染細胞の両者のクローンをこの方法で同定し、b e k および f l g は共に a F G F 受容体であることを示した。1つの b e k 感染クローン、N b e k 8 および 1つの f l g 感染クローン N f l g 26 を、a F G F 受容体のその増加した発現に基く更なる分析のために選択した。

【0048】

[³⁵S] メチオニンにより N b e k 8 及び N f l g 26 細胞を代謝的にラベルし、細胞抽出物を調製し、b e k および f l g 特異的抗ペプチド抗血清を免疫沈降させることにより、f l g および b e k 発現ベクタの翻訳生成物を分析した。f l g (F l g - 1) の C O O H 末端 15 アミノ酸または b e k (B e k - 1) の C O O H 末端 17 アミノ酸に対応するペプチドを合成し、架橋結合剤 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドを使用してスカシ貝ヘモシアニンに結合させた。完全フロインドアジュバント中で乳化したこれらの試薬を用いてその後ウサギを免疫化してポリクローナル抗血清 A n t i F l g - 1 および A n t i B e k - 1 を生成した。

【0049】

10 cm 組織培養皿 (ファルコン) 中で生育させた 90% 融合の細胞をメチオニンを含有しない D M E により洗浄し、10% ウシ血清および 100 μ C i / m l [³⁵S] メチオニン (アマシャム) を含むメチオニンを含有しない D M E 中で 6 時間インキュベートした。その後 P B S (ギブコ) により細胞を 3 回洗浄し、0.5 ml の溶解緩衝液 (20 mM ヘペス、p H 7.5、150 mM N a C l、10% グリセリン、1% トリトン X - 100、1.5 mM M g C l₂、1 mM E D T A、1 μ g / m l アプロチニン、1 μ g / m l ロイペプチン、1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド) に掻き取り、氷上で 15 分間インキュベートした。エッペンドルフ遠心機により 4 で 15 分間溶解物を遠心分離した。サンプル当たり 3 mg のプロテイン A - セファロースを膨潤させ、20 mM ヘペス、p H 7.5 により洗浄し、その後対応するウサギ抗ペプチド抗血清 (A n t i F l g - 1 および A n t i B e k - 1) を用いて室温で 30 分間混合し、その後 H N T G 緩衝液 (20 mM ヘペス、p H 7.5、150 mM N a C l、0.1% トリトン X - 100、10% グリセリン) により 3 回洗浄を行った。プロテイン A - セファロース / 抗体複合体をその後それぞれ清澄化した細胞溶解物と 60 分間 H N T G 緩衝液中にて 4 でインキュベートし、50 mM ヘペス、p H 8.0、500 mM N a C l、0.2% トリトン X - 100 および 5 mM E G T A により 2 回、50 mM ヘペス、p H 8.0、150 mM N a C l、0.1% トリトン X - 100、5 mM E G T A および 0.1% S D S により 2 回、最後に 10 mM トリス - H C l p H 8 および 0.1% トリトン X - 100 により 2 回洗浄した。ラエムリサンプル緩衝液 (ラエムリ、N a t u r e 227 : 680 - 685 (1970)) を洗浄した免疫沈降物に添加し、これをその後 4 分間煮沸し、S D S - (7%) ポリアクリルアミドゲル上で分離した。コダック X - O m a t フィルム (イーストマン・コダック社、ロチェスター、N Y) により乾燥したゲルのオートラジオグラムを作製した。

【0050】

免疫沈降物を S D S - P A G E に供した後オートラジオグラフィ (図 4) を行った。f l g 抗ペプチド抗血清により f l g 感染細胞から 150 k D a のバンドが特異的に免疫沈降した (レーン 3) ののに対し、b e k 抗ペプチド抗血清は b e k 感染細胞から 135 k D a (レーン 7) のバンドを特異的に免疫沈降させた。対応する抗原性ペプチドの存在下における免疫沈降は、f l g および b e k 特異的蛋白質の沈降を完全に排除する。f l g および b e k の演繹されたアミノ酸配列は、それぞれ 89, 437 および 89, 750 ダルトンの成熟コア蛋白質を予測させ、細胞外ドメインの潜在的な部位でのグリコシル化はより高い分子量形態に帰着すると考えられる。グリコシル化を遮断するためのツニカマイシンによる N F l g 26 および B e k 8 細胞の処理は、低減された分子量の b e k および f l g

10

20

30

40

50

生成物を結果的に与え、これらの予測されたコア蛋白質の大きさと一層一貫している（レ
ーン4および8）。結果は**be k**および**f l g**の両者が糖蛋白質であることを示す。**be
k**と比較して大きい**f l g**の大きさは潜在的なN-結合グリコシル化部位（それぞれで9
対8）の数と一貫性があるが、ツニカマイシン処理細胞から単離された**f l g**生成物は、
そのアミノ酸配列から予測されるより遅く移動する。この遅い移動の理由は知られていな
いが、恐らく組換え**f l g**の構造によるものではない。というのは、NF l g 26および
A 204横紋筋肉腫細胞に由来する**f l g**は、ツニカマイシン処理の前後共同一のみかけ
の分子量を有するからである。

【0051】

対照細胞に由来する免疫沈降物からは**be k**または**f l g**蛋白質は検出されなかった（レ
ーン1、2、5および6）。先の実験では、FGF架橋結合**f l g**蛋白質はNIH3T3
2.2細胞から免疫沈降したが（ルタら、1989前記）、これは明らかに内性**f l g**を
発現している。対照実験で**f l g**を検出できなかったのは、**be k**および**f l g**過剰発現
細胞システムを使用したにも拘らず主として分析した細胞が少数でありオートラジオグラフ露
出時間が短かったことによるものである。

内性繊維芽細胞生育因子受容体の基礎レベルは細胞型の如何によって変動し得る。3T3
細胞はこの種の受容体を約5~10,000含有するが、3T32.2細胞のような幾つか
の3T3サブクローンは細胞当たり30,000までの受容体を含有し得る。ここで使用する
ように「過剰発現」細胞という用語は、約50,000受容体以上を有する細胞を指す。
前記開示したプラスミドによる3T3細胞の最初の感染は約50,000受容体/細胞を
有する細胞を生成する。しかしながら、培養中に時間と共に300,000以上の受容体
/細胞を発現するクローンを選択することができる。DHFR欠失CHO細胞を感染させ
てメソトレキセート選択により増幅すると、これらは細胞当たり百万以上の受容体を生産す
ることが期待される。

【0052】

実施例III

放射能ヨウ素化およびFGFの結合

先に記載されたように精製したウシ誘導aFGF（ブルゲスら、J. Biol. Chem
. , 260: 11389-11392 (1985)）、ヒト組換えbFGF（モスカテリ
博士の好意による贈与）およびヒト組換えkFGF（クラウジオ・バシリコ博士の好意に
よる贈与）を、エンザイモビーズ（バイオラド）の手順を使用して放射能ヨウ素化した。
それぞれの非ラベル競合体を使用するラジオアイソトープ希釈により放射能ヨウ素化した
リガンドの比活性を決定した。非ラベルのリガンドの濃度はアミノ酸分析（ジェイら、1
987前記）により決定した。[¹²⁵I] aFGFの異なる調製物の比活性は130,00
0~760,000 cpm/ngの間で変動し、[¹²⁵I] bFGFについての比活性は50
,000~500,000 cpm/ngの間であった。[¹²⁵I] kFGFの比活性は50
,000~200,000 cpm/ngの間で変動した。

【0053】

結合検定は次のように行った：

1 × 10⁵ 細胞/穴を有するフィブロネクチン被覆24穴皿を氷上に載置し、冷却した結
合緩衝液（DMEM、1mg/ml BSA、5U/ml ヘパリン、50mM ヘペス、pH
7.4）を用いて穴を2回リンスした。1mlの氷冷結合緩衝液を用いて20分間皿を氷
上でインキュベートした後、ヘパリンを有さない冷却結合緩衝液中での[¹²⁵I] FGF
の一連の希釈により4で2時間とした。同一の一連の希釈物を使用するが100倍モル
過剰の非放射能ラベルaFGFの存在下として非特異的結合を行った。インキュベートの
後、細胞を氷上に載置し、ヘパリンを除いた氷冷結合緩衝液により2回リンスした後、0
.3N NaOH、37に15分間溶解させた。[¹²⁵I] bFGFを使用する場合、細
胞をインキュベート後に氷上に載置し、PBSにより3回、20mM ヘペス、pH 7.5
中の1ml 2M NaClにより2回および20mM 酢酸ナトリウム、pH 4.0中の1m
l 2M NaClにより2回洗浄した。酸性2M NaCl洗浄により放出された放射能は、

高い親和性部位に対する特異的な結合を示す（モスカテリ、J. Cell. Physiology, 131: 123-130 (1987)）。

【0054】

無傷細胞に対する $[^{125}\text{I}]$ 酸性FGF、 $[^{125}\text{I}]$ 塩基性FGFおよび $[^{125}\text{I}]$ kFGFの共有結合による架橋結合

ヒトフィブロネクチンで被覆した60mmの組織培養皿中でNFlg26、NBek8およびNNe04細胞を生育させた。融合に際し、結合緩衝液（0.2%BSAおよび20mMヘペス、pH7.5を含有するDMEM）により細胞を2回洗浄し、25ng/mlの $[^{125}\text{I}]$ aFGF、 $[^{125}\text{I}]$ bFGFまたは $[^{125}\text{I}]$ kFGFを含有する結合緩衝液を用いて4で90分間インキュベートした。結合緩衝液で1回およびPBSで1回洗浄した後、架橋結合剤として0.3mMジスクシニミジルスベレート（ピエルセ）（DM50中の30mM保存溶液として調製）を含有するPBSを用いて4で20分間細胞を更にインキュベートした。その後10mMヘペス、pH7.5、200mMグリシン、2mMEDTAにより1回、PBSにより1回細胞を洗浄し、その後PBS中で掻き取り、エペンドルフ遠心機による遠心分離により集めた。100 μ lの溶解緩衝液（20mMヘペス、pH7.5、150mMNaCl、1%トリトンX-100、10%グリセリン、1.5mMMgCl₂、1mMEDTA、1 μ g/mlアプロチニン、1 μ g/mlロイペプチンおよび1mMPMSF）中で細胞ペレットを溶解し、氷上で15分間インキュベートし、エペンドルフ遠心機により4で15分間遠心分離した。略同容積のそれぞれのサンプルの上澄をラエムリサンプル緩衝液（ラエムリ、Nature, 227: 680-685 (1970)）と混合し、4分間煮沸し、SDS-7%ポリアクリルアミドゲル上で分画した。ゲルをクーマシー・ブリリアント・ブルーにより染色し、全てのサンプルが略同量の蛋白質を含有することを確認した。コダックX-Omatフィルムにより乾燥したゲルのオートラジオグラムを作製した。

【0055】

$[^{125}\text{I}]$ aFGFを用いる親和性架橋結合により**bek**および**flg**の過剰発現につきクローンを検索することができることは、**bek**および**flg**の両者は高い親和力でaFGFに結合することを示唆する。**bek**および**flg**過剰発現細胞に対する $[^{125}\text{I}]$ aFGF、 $[^{125}\text{I}]$ bFGFおよび $[^{125}\text{I}]$ kFGFの結合を並列で分析した。 $[^{125}\text{I}]$ aFGF、 $[^{125}\text{I}]$ bFGFまたは $[^{125}\text{I}]$ kFGFを用いる細胞のインキュベートの後、受容体-FGF複合体をジスクシニミジルスベレートと共有結合により架橋結合させ、可溶化し、SDS-PAGEおよびオートラジオグラフィ（図5）に供した。165kDaの単一のバンドは、**flg**過剰発現細胞系統中でaFGFおよびbFGFの両者に架橋結合した（レーン2および5）。同様に、150kDaの単一のバンドは、**bek**過剰発現細胞系統中でaFGFおよびbFGFの両者に架橋結合した（レーン3および6）。リガンドの分子量（約15kDa）を差引いた後、**flg**および**bek**過剰発現細胞系統における架橋結合バンドの大きさ（それぞれ150および135kDa）は免疫沈降した**flg**および**bek**蛋白質（図4）の大きさに正に対応する。aFGFまたはbFGFを架橋結合したもの（図5a）の場合と比較して $[^{125}\text{I}]$ kFGFを架橋結合（図5b）した場合のバンドの大きさがみかけ上僅かに大きいのは、kFGF（22Kd）対aFGFまたはbFGF（16Kd）の大きさの差によるものである。対照細胞では架橋結合した生成物は認められなかったがこれは再度過剰発現細胞系統を用いて得られたシグナルの強度により与えられたオートラジオグラフ露呈時間が短かったことに帰するものである。

【0056】

酸性、塩基性およびk-繊維芽細胞生育因子により放射能ラベルされた**flg**および**bek**の平衡結合分析

酸性および塩基性FGFを放射能ヨウ素化し、前記したようにヘパリン-セファロースにより精製した。ヨウ素化されたりガンドを用いる過剰発現細胞系統の飽和結合分析によりaFGFおよびbFGFに対する**bek**および**flg**の解離定数を確定した。**bek**およ

10

20

30

40

50

び f l g に対する a F G F および b F G F の両者の結合は特異的であり、飽和し得るものであった (図 6 b 及び 図 6 d) 。更に、飽和における $[^{125}I]$ a F G F および $[^{125}I]$ b F G F の結合は 1 0 0 倍モル過剰の a F G F または b F G F の存在下で完全に排除され、それぞれのリガンドは同一の部位に対する結合につき互いに効果的に競合することが示された。典型的な実験 (図 6 a 及び 図 6 c) についての結合データのスキッチャード分析 (Ann . N . Y . A c a d . S c i . 5 1 : 6 6 0 - 6 7 2 (1 9 4 9)) により、f l g 過剰発現細胞は、それぞれ a F G F および b F G F につき 2 4 p M および 4 7 p M の親和力を有する細胞当たり約 5 5 , 0 0 0 の受容体を担持することが示される。同様に、b e k 過剰発現細胞は、それぞれ a F G F および b F G F につき 4 7 p M および 8 2 p M の親和力を有する細胞当たり約 6 4 , 0 0 0 の受容体を担持する。k F G F は、それぞれ 3 2 0 および 8 0 p M の親和力により f l g および b e k に結合する (図 6 e ~ 図 6 h) 。また、k F G F は b F G F と類似する親和力で b e k に結合するが、b F G F の 4 倍の親和力で f l g に結合する。更なる実験からのデータにより、f l g に対して 2 0 ~ 8 0 p M の範囲および b e k に対して 4 0 ~ 1 0 0 p M の範囲の a F G F のみかけの K d が与えられる。f l g (5 0 ~ 1 5 0 p M) および b e k (8 0 ~ 1 5 0 p M) に対する b F G F の K d の類似する変動が認められるが、全ゆる単一の実験の範囲内では b F G F は a F G F と比較すると f l g または b e k に対する約 2 倍低い親和力を常に示す。値の変動は、恐らくヨウ素化リガンドの異なる調製物の比活性および生物学的完全性の決定に起因すると考えられる。いずれにしろ、b e k および f l g は類似する高い親和力で a F G F に結合し、a F G F より約 2 倍低い親和力で b F G F に結合することをデータは明らかに示している。これらの結論は、 $[^{125}I]$ a F G F および $[^{125}I]$ b F G F を用いて f l g および b e k 過剰発現細胞に対する結合について増加する量の非放射活性 a F G F または b F G F を競合させた競合 (アイソトープ希釈) 実験により支持される。

【 0 0 5 7 】

薬物検索

生物学的に活性な形質転換細胞は、そのコグナント (cognant) 受容体に対する F G F の結合を阻害する際のその有効性につき化合物を検索するのに使用することができる。潜在的な阻害剤の非存在下にリガンド / 受容体相互作用のパラメータを確立したならば、評価されるべき化合物、添加したラベルした F G F を含有する試験サンプルを用いて細胞を予備インキュベートし、存在する場合は F G F 結合の低減を測定することは日常的な仕事に過ぎない。

他の検定が可能である。例えば、F G F 結合を直接測定するより寧ろ、F G F の効果 (すなわち細胞内の事態) を検定することができる。この種の事態の 1 つは、受容体自体またはホスホリパーゼ C - のような他の細胞内標的の蛋白質リン酸化である。リン酸化された蛋白質の出現は、この種の蛋白質と抗ホスホチロシン抗体との反応性により測定することができる。

【 0 0 5 8 】

この発明は薬物評価のための有用な細胞系統に関するものであり、用いるいずれかの特定の検定に関するものではない。先に記載したように、有用な検索系を提供するために全受容体分子を発現する必要はない。例えば、第 1 の I g ドメインおよび「酸性ボックス」を欠失した細胞外ドメインでも F G F リガンドと結合することはなお可能であることが突き止められた。前記したように、細胞質ドメインを発現している宿主細胞を、候補 チルホスチン の試験のためのプロテインキナーゼの簡便な供給源として使用することができる。細胞質ドメインのみを含むプラスミドにより形質転換されたイー・コリはこの目的のために有用であることが示された。この発明により提供される f l g および b e k の無傷の配列が与えられたならば、P C R 技術または固相ペプチド合成により種々のドメインの断片を作製し、リガンドまたはリン酸化された蛋白質に対して結合するその能力についてこれを評価することは通常の技術であることは勿論である。

潜在的な治療剤には、限定されるものではないが、小さな有機分子、受容体断片自体または細胞外ドメインに対するリガンドの結合を阻害するかまたはプロテインキナーゼ活性

10

20

30

40

50

を与える抗体が包含される。

【0059】

阻害的活性を有する化合物は、所望しないF G F媒介細胞応答を特徴とする疾患状態の処置のための治療剤として潜在的に有用である。この種の応答を特徴とするものとして示された疾患状態には、ガン、特にある種の形態の胸部ガン、乾癬、関節炎、アテローム硬化症および良性前立腺肥大が包含される。

この発明の治療剤は単独または薬学的に許容し得るキャリアと組合せて投与することができる、その割合は化合物の溶解性および化学的性状、選択した投与の経路および標準的な薬学的慣行により決定される。例えば、これらはデンプン、ミルクシュガー、ある種の粘土等のような他のもの(excepients)を含有する錠剤またはカプセルの形態で経口的に投与することができる。糖およびコーンシロップ、香料および色素と活性成分とを混合した後十分に脱水して固体形態へのプレスを適切なものとするトローチまたはロゼンジの形態でこれらを舌下錠により投与することができる。着色および香料剤を含有し得る溶液の形態でこれらを経口的に投与ことができ、また非経口的に、すなわち筋肉内、静脈内または皮下投与によりこれらを注射することができる。非経口的投与のためには、他の溶質、例えば溶液を等張とするのに十分な塩類またはグルコースを含有する殺菌溶液の形態でこれらを使用することができる。

医師は最も適切な本治療剤の投与量を決定し得るが、これは投与の形態および選択する特定の化合物により変動し得て、更に処置を行う特定の患者によって変動し得る。一般にその化合物の最適投与量より実質的に少ない少量の投薬を用いて最初の処置を行うことが意図され、その状況で最適効果が達成されるまで少量の増加分ずつ投薬を増加させる。組成物を経口的に投与した場合は、非経口的に与える少量の量と同じ効果を与えるには活性薬剤がより大量に必要となることが一般に認められよう。

【図面の簡単な説明】

【図1】受容体チロシンキナーゼサブクラスの概略図を示す。

【図2a】ヒトf l gおよびb e kのアミノ酸配列および構造的類似を示す。

cDNAクローンから演繹されたものとしてヒトf l gおよびb e kのアミノ酸配列を示す。f l gのものとは異なるb e k配列における残基のみを示す。上実線は推定されたシグナルペプチドおよび膜横断配列を強調する一方、上点線はキナーゼ挿入領域を強調するものである。I g様ドメインを特定する保存されたシステイン残基上に黒丸を付ける。潜在的なAsn結合グリコシル化部位の上に下向き三角を付ける。開いた角型括弧は「酸性ボックス」を囲むものであり、対向する矢印はチロシンキナーゼドメインを画定するものである。

【図2b】ヒトb e kおよびf l g蛋白質の異なる領域の間のアミノ酸の同一性の程度を示す。黒塗りのブロック棒は分割した細胞質キナーゼドメインを示し、ループは細胞外I g様ドメインを示す。核酸配列はEMBLデータライブラリーに提出されている。受託番号X 5 2 8 3 2およびX 5 2 8 3 3がヒトb e kおよびf l gのcDNAに対してそれぞれ与えられた。

【図3a】f l gのmRNA発現を明示するノーザンプロットを示すものである。種々の細胞系統に由来する4 μgの全RNAを、f l g発現についてのノーザン分析に供した。この結果得られたプロットのオートラジオグラムの図である。RNAは次の細胞系統に由来する：A 2 0 4横紋筋肉腫(レーン1)、U 5 6 3グリア芽細胞腫(レーン2)、H U V E C(レーン3)、N T E R A - 2テラトカルシノーマ(レーン4)。

【図3b】b e kのmRNA発現を明示するノーザンプロットを示すものである。種々の細胞系統に由来する4 μgの全RNAを、b e k発現についてのノーザン分析に供した。この結果得られたプロットのオートラジオグラムの図である。RNAは次の細胞系統に由来する：A 2 0 4横紋筋肉腫(レーン1)、U 5 6 3グリア芽細胞腫(レーン2)、H U V E C(レーン3)、N T E R A - 2テラトカルシノーマ(レーン4)。

【図4】³⁵Sメチオニンを用いたf l gおよびb e k過剰発現細胞系統の代謝的ラベルを示す。

10

20

30

40

50

実施例 I I で説明するようにツニカマイシンの存在下 (レーン 2、4、6、8) または非存在下 (レーン 1、3、5、7) で [³⁵S] メチオニンを用いて N F l g 2 6、N B e k 8 および N N e o 4 対照細胞をラベルした。細胞溶解物を抗 f l g - 1 (レーン 1 ~ 4) または抗 b e k - 1 (レーン 5 ~ 8) を用いて免疫沈降させ、S D S - P A G E およびオートラジオグラフィに供した。この結果得られたオートラジオグラムの図を示す。溶解物は次のものに由来する : N e o 4 対照細胞 (レーン 1、2、5、6)、F l g 2 6 細胞 (レーン 3、4)、B e k 8 細胞 (レーン 7、8)。分子量標準の位置を示す。対応する抗原性ペプチドの存在下での免疫沈降により、f l g および b e k 特異的蛋白質の沈降が完全に排除される (データは示していない)。

【図 5 a】f l g 及び b e k 過剰発現細胞に対する [¹²⁵I] F G F の架橋結合を示す。実施例 I I I で説明するように、[¹²⁵I] a F G F (レーン 1 ~ 3) および [¹²⁵I] b F G F (レーン 4 ~ 6) を N F l g 2 6 (レーン 3、6)、N B e k 8 (レーン 3、6) および N N e o 4 (レーン 1、4) 細胞のモノレイヤに対して共有結合により架橋結合した。その後細胞を溶解し、S D S - P A G E に供し、ゲルを X 線フィルムに露出した。この結果得られたオートラジオグラムの図を示す。

10

【図 5 b】f l g 及び b e k 過剰発現細胞に対する [¹²⁵I] F G F の架橋結合を示す。[¹²⁵I] a F G F (レーン 1 ~ 3) および [¹²⁵I] k F G F (レーン 4 ~ 6) を N N e o 4 (レーン 1、4)、N F l g 2 6 (レーン 2、5) および N B e k 1 3 (レーン 3、6) のモノレイヤに対して共有結合により架橋結合し、図 5 a と同様に分析した。

【図 6 a】f l g 過剰発現細胞系統に対する a F G F (-) および b F G F (...) 結合のスキッチャード分析結果を示す図面である。

20

【図 6 b】f l g 2 6 (パネル A) 細胞に対する [¹²⁵I] a F G F (-) および [¹²⁵I] b F G F (...) の飽和結合分析結果を示す図面である。

1 0 0 倍モル過剰のいずれかのリガンド存在下におけるバックグラウンドのカウントは、それぞれの点において常に合計 c p m の 1 0 % 未満だった。スキッチャード分析におけるスケールは、それぞれのパネルで同一である。

【図 6 c】b e k 過剰発現細胞系統に対する a F G F (-) および b F G F (...) 結合のスキッチャード分析結果を示す図面である。

【図 6 d】b e k 8 (パネル B) 細胞に対する [¹²⁵I] a F G F (-) および [¹²⁵I] b F G F (...) の飽和結合分析結果を示す図面である。

30

1 0 0 倍モル過剰のいずれかのリガンド存在下におけるバックグラウンドのカウントは、それぞれの点において常に合計 c p m の 1 0 % 未満だった。スキッチャード分析におけるスケールは、それぞれのパネルで同一である。

【図 6 e】f l g 2 6 (パネル A) に対する [¹²⁵I] k F G F 結合のスキッチャード分析結果を示す図面である。

【図 6 f】f l g 2 6 (パネル A) に対する [¹²⁵I] k F G F の飽和結合分析結果を示す図面である。

【図 6 g】b e k 1 3 (パネル B) に対する [¹²⁵I] k F G F 結合のスキッチャード分析結果を示す図面である。

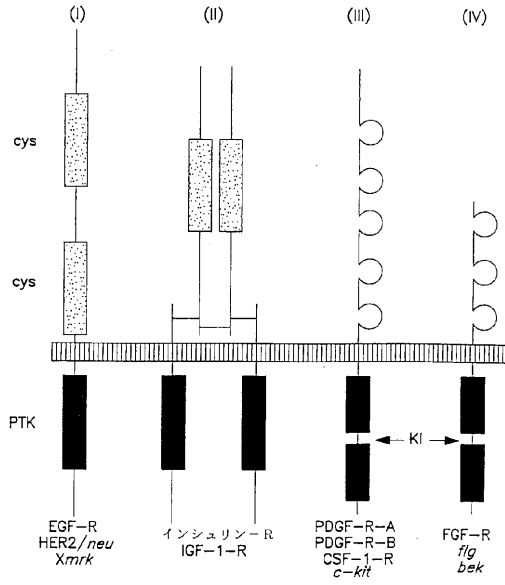
【図 6 h】b e k 1 3 (パネル B) に対する [¹²⁵I] k F G F の飽和結合分析結果を示す図面である。

40

【図 7】図 7 a ~ 図 7 e は f l g の全ヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。

【図 8】図 8 a ~ 図 8 e は b e k の全ヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。

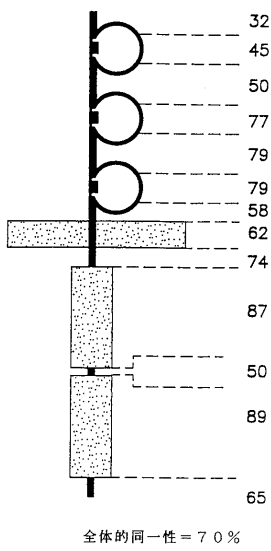
【 図 1 】



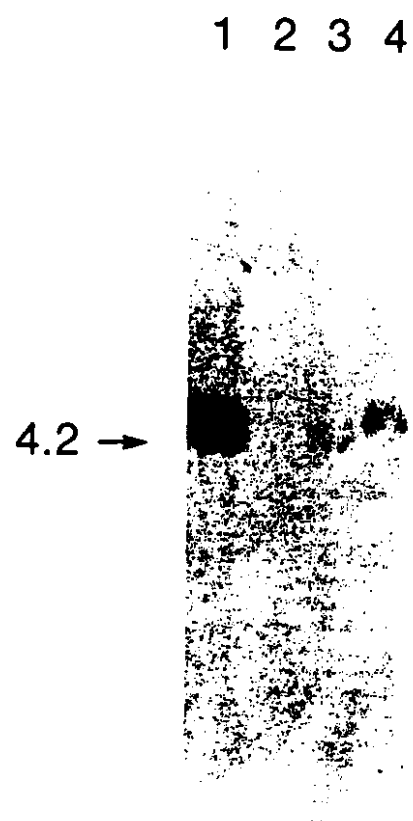
【 図 2 a 】

60	FTL-PEQAPMGARVVESEFLVHPGDLQLEGRD
66	V GRFTICLV VPM SL FSLVEDT E EPFTYIQIQP VYVAA ES EV - LK
127	VASINMLRNGVGLARFRRTETREYEVQDSVPADSGLVACVYSPGSDPTVFSVWVDALESSE
132	AAV S TK H GPH VLL ELQINGAT R TA RTVD E W M T - I E
184	DDDDDSSESEKEDNTKFNHVAVPTSPENKMKLHVPAKTVKPKSPSSGTTPLRWLWNG
195	E - - - - -IDGA DFVSENSNKR NT R N R AG N M M
261	KEFVDRIRIGYVYVATWSIIMDSVPSDKNGYTCIVENEYGSINHTVQLDVWVSPRHFILQAGL
262	QE NQH L E V H
328	PAKTVVAGSNVEFMKGVVSDPPHQLWIKHELEMSKIGFDNLEFVGLKINGVNTPKMEVHLHL
329	ASTVV GD V A I V K Y G LKV A I Y I
395	RNVSPEDAGEYTLAGNSIGLSHSHAMLTVLEAERFAVWISPIVLEIITCYGAFILSCHWGVYI
396	T I P P FGREKEITA D A I V A VT
460	VYKSKGYSKSDHSONVHKLAKSTPLRQVTVSADSSAHNSGCVLVR-FSRLSL-SGTPMLAGY
463	LCR WT P S P T R E S N P IIT TAD
530	SEVELPEPWRWELPRDRLVLRKPLGECFCGVVLAELGLDKNRNTKVAVKMLKSDATEKDLSD
537	K K F K T M V I KEAVT D
594	LISENEMKMTGKHKNIINLLGACTQDGFVIVYVYASKNGLRVYQARRPFGLEYCYNFSHHPDEQ
597	V R M S DTRV
661	ISSKDLVCAVOVARGNEVLASKKCIHRDLAARNVLTQNTWKLADFLGARDLHIIIDYIKYKTVNR
664	MTF T L Q N N N
730	LPVARNAPALVDRIYTHQSDYMGVGLVLEIFLGGSPYGVVPELFLKLEKCHRMKPKNSCTNE
730	V M H I A
795	LYMMWDCWHVPSQRTFKQLVDELDLNVIALTSKQVYLDLSMPLDQISFSPVTRSTCSGSDSV
796	LT T E Q E Y - D
821	FSHFLEFEEFCIPRHPAQLANGLKR
821	PD M Y --QVPHI SV T-

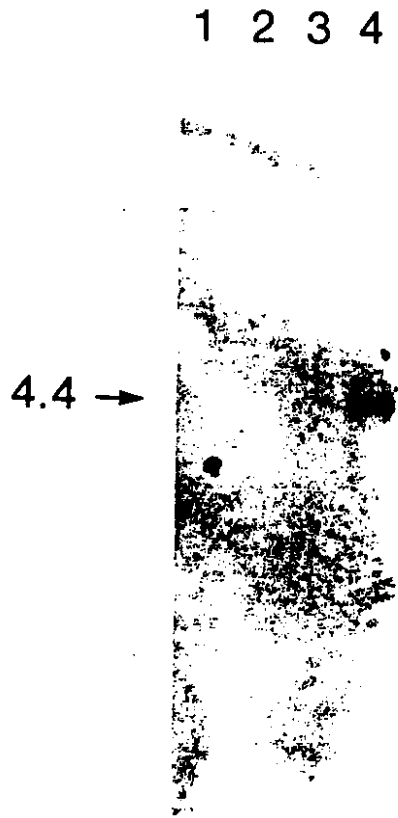
【 図 2 b 】



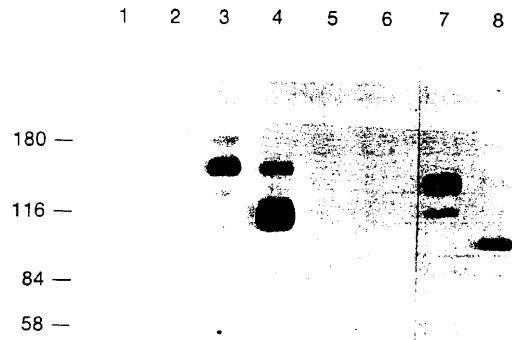
【 図 3 a 】



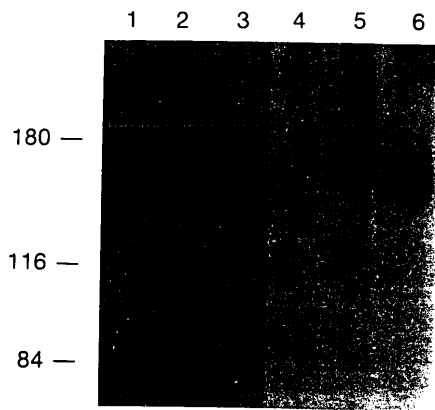
【 図 3 b 】



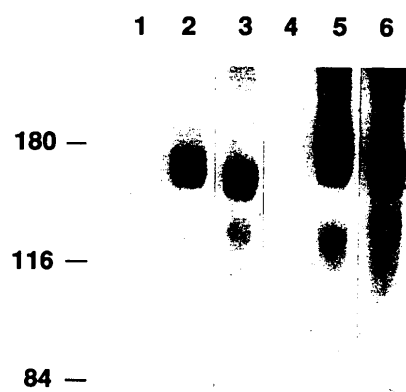
【 図 4 】



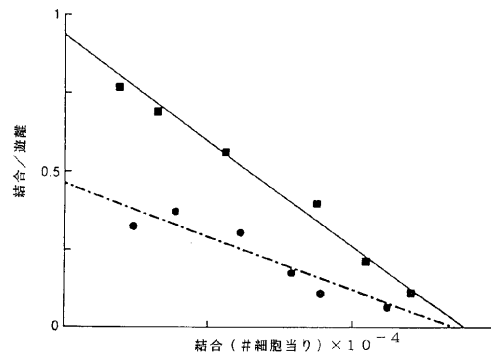
【 図 5 a 】



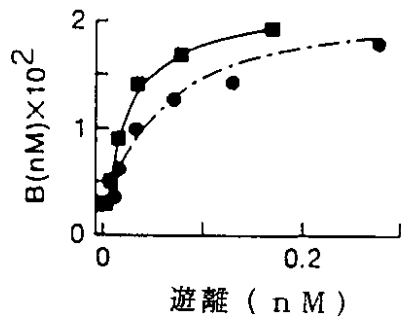
【 図 5 b 】



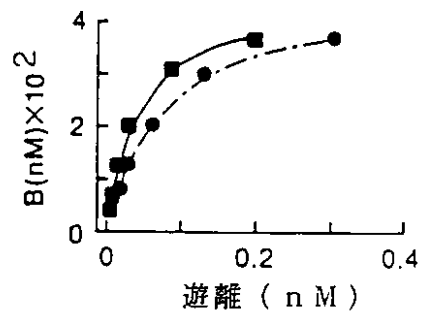
【 図 6 a 】



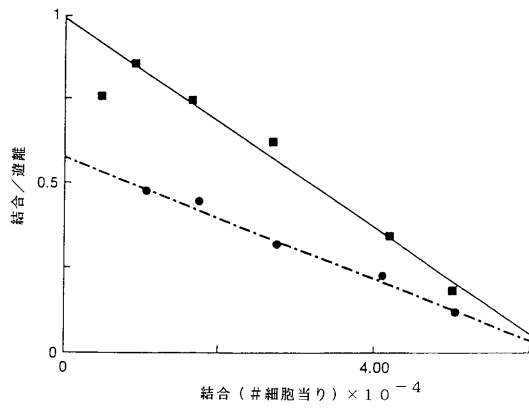
【 図 6 b 】



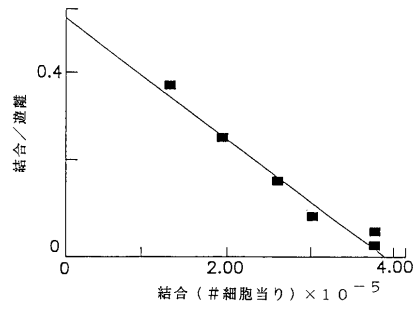
【 図 6 d 】



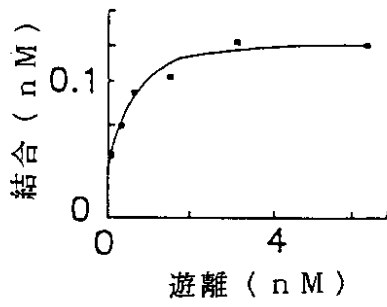
【 図 6 c 】



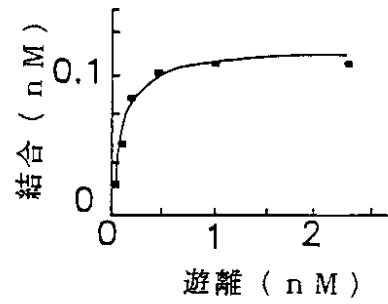
【 図 6 e 】



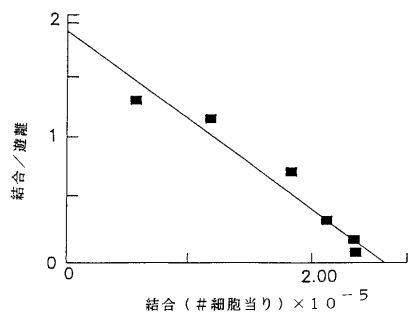
【 図 6 f 】



【 図 6 h 】



【 図 6 g 】



【 7 a 】

1 TACGTTTGAAGAAGGAGTCCGAGCTCACTCGTGGATATCCATGCGAGATGTGGACCTTGTCCACCACC 6
 70 TCTAATCGAGAAGCTGGAGTGTGGAGTGCCTCTCTTCTGGGCTGTGGTCAACCCACA 13
 METTTPSerTrpLysCysLeuLeuPheTrpAlaValLeuValThrAlaThr
 139 CTCTGCACCGCTAGCGCTCCCGCCCTCCCTGCCTGAAACAAGCCAGCCCTGGGAGCCCTGTGGAAGTG 20
 LeuCysThrAlaArgProSerProThrLeuProGluGlnAlaGlnProTrpGlyAlaProValGluVal
 208 GACTCTCTCTGCTCCACCCCGGTGACCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG 27
 GlnSerPheLeuValHisProGlyAspLeuGlnLeuArgCysArgLeuArgAspAspValGlnSer
 277 ATCAACTGGCTGGGAGGGGGTGCAGCTGGCGGAAAGCAACCGCACCCGATCACAGGGGAGGAGTG 34
 IleAsnThrLeuArgAspGlyValGlnLeuAlaGlnSerAsnArgThrArgIleThrGlyGluGluVal
 346 GAGTGCAGACTCCCTGGCCGAGACTCCGGCTCTATGCTTGGTAAACGACGAGCCCTGGGAGT 41
 GlnValGlnAspSerValProAlaAspSerGlyLeuValAlaCysValThrSerSerProSerGlySer
 415 GACCACTACTTCTCGTCAATGTTTCAGATGCTCTCCCTCTCGGAGGATGATGATGATGAT 48
 AspThrThrTyPheSerValAsnValSerAspAlaLeuProSerSerGlnAspAspAspAspAsp
 484 GACTCTCTCCAGAGGAGAAAGAAACAGATACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCAACCA 55
 AspSerSerSerGlnGluGluThrAspAsnThrLysProAsnArgMETProValAlaProTyTrp

【 7 b 】

553 ACATCCCGAAGAAGTGGAAAGAAATTCGATGCTCCGCTGGCTCCCAACAGCATGAGTTCAATGC 62
 ThrSerProGluValMetGlyLysLysLeuHisAlaValProAlaAlaLysThrValLysPheLysCys
 622 CCTCCAGTGGACCCCAACCCCACTCGCTGGTGGTAAATGAAAGAAATTCACAACTGCACCAC 69
 ProSerSerGlyThrProAsnProThrLeuArgTrpLeuLysAsnGlyLysGluPheLysProAspHis
 691 AGAATTTGAGCTACAGAGTCCGTTATGCTCCACTGGAGCATCATATGAGACTCTGTGGTCCCTCTGAC 75
 ArgIleGlyGlyTyPheLysValArgTyAlaThrTrpSerIleIleMETAspSerValValProSerAsp
 760 AAGGCATCTACACCTGCTGGAGAAATGATGAGTACGGAGCATCAACCAACATACCTGAGTGC 82
 LysGlyAsnTyThrCysIleValGluAsnGluTyGlySerIleAsnHisThrTyGlnLeuAspVal
 829 GTGGAGCGTCCCTCCACCCCGCTCCCTCAGCAGGAGTCCCGCCCAACAAACAAACAAACAAACAA 89
 ValGluArgSerProIleArgProIleLeuGlnAlaGlyLeuProAlaAsnLysThrValAlaLeuGly
 898 AGCAAGTGGAGTTCAATGTGTAGGTGTACATGACCGCCGAGCCGACATCCAGCTTAAGCAATC 96
 SerAsnValGluPheMetCysLysValTySerAspProGlnProHisIleGlnTrpLeuLysHisIle
 967 GAGTGAATGGGAGAAAGATTTGGCCGACCACTCCCTATGCTCCAGATCTTGAAGACTGTAGCTG 103
 GlnValAsnGlySerLysIleGlyProAspAsnLeuProTyValGlnIleLeuLysThrAlaGlyVal
 1036 AATACCCAGCAAGAGAGTGGAGTCTTCACTAAGAATGCTCTCTTTGAGGAGCCGAGGGAGTAT 110
 AsnThrThrAspLysGluMetGluValLeuHisLeuArgAsnValSerPheGluAspAlaGlyGluTy
 1105 GAGTCTTGGCGGCTACTCTTGGACTCTCCATCTCTGATGCTGTGATGCTGTGAGCCCTTCTGAGCCCT 117
 ThrCysLeuAlaGlyAsnSerIleGlyLeuSerHisSerAlaTrpLeuThrValLeuGluAlaLeu

【 7 c 】

1174 GAAGAGCGCGGAGTGTGACCTCGCCCTGTACTGAGATCATCATCTATCTATCTATCTATCTATCTAT 124
 GluGluArgProAlaValMetThrSerProLeuTyLeuGluLysIleIleIleTyCysThrGlyAlaPhe
 1243 CTCTCTCTCTGCTAGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT 131
 LeuIleSerCysMetValGlySerValIleValItyLysMetLysSerGlyThrLysLysSerAspPhe
 1312 CACAGCAGTGGCTGTGCACAGCTGGCCAGAGCCCTCTCCGACAGACAGTAACTGTCTGCT 138
 HisSerGlnMetAlaValHisLysLeuAlaLysSerIleProLeuArgGlnValThrValSerAla
 1381 GACTCCATGTCATCCATGAACTCTGGGGTCTCTGGTTCGGCCATACCGCTCTCTCCAGTGGACT 144
 AspSerSerAlaSerMetAsnSerGlyValLeuLeuValArgProSerArgLeuSerSerSerGlyThr
 1450 CCAATGTAGAGGGTCTCTGATGATGAGTCCCGAAGACCCTCGGTGGAGTCCCTCGGAGAGA 151
 ProMetLeuAlaGlyValSerGluTyGlnLeuProArgTrpGluLeuProArgAspArg
 1519 CTGCTTATAGCAAAACCCCTGGGAGAGGCTGCTTTGGGAGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG 158
 LeuValIleGlyLysProLeuGlyGluGlyCysPheGlyGlnValValLeuAlaGluAlaIleGlyLeu
 1588 GACAAGCAAAACCCAGCTGTGACCAAGTGGCTGTGAAGATGTGAACTGGAGCCGCAACAGAGAAA 165
 AspLysAspLysProAsnArgValThrLysValAlaValLysMetLeuLysSerAspAlaThrGluLys
 1657 GACTTCTCAGACTGATCTCAGAAATGAGATGATGAAGATGATCGGACGATGAAGATATCATCAAC 172
 AspLeuSerAspLeuIleSerGluMetGluMetLysMetIleGlyLysHisLysAsnIleIleAsn
 1726 CTGCTGGGGCTCGACGAGGATGCTCTCTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG 179
 LeuLeuGlyAlaCysThrGlnAspGlyProLeuTyValIleValIleGluTyAlaSerLysGlyAsnLeu

【 7 d 】

1795 CGGAGTACTCGAGCCCGGAGCCCGAGGGTGGAAATCTGCTAAACCCCGCCACACCCAGAG 186
 ArgGluTyLeuGlnAlaArgProGlyLeuGluTyCysTyAsnProSerHisAsnProGlu
 1864 GAGCAGCTCTCCAGGACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG 193
 GlnGlnLeuSerSerLysAspLeuValSerCysAlaTyGlnValAlaArgGlyMetGluTyLeuAla
 1933 TCCAAAGATGATACCCGAGACCTGGCAGCAGGAAATGCTCTGTTGACAGAGGCAATGTGATGAG 200
 SerLysLysCysIleHisArgAspLeuAlaAlaArgAsnValLeuValThrGluAspAsnValMetLys
 2002 ATAGCAGACTTGGCTGCGCAGGCAATTCACACATGCTACTATATAAAGAACAACAACCGCCGA 207
 IleAlaAspPheGlyLeuAlaArgAspIleHisIleAspTyTyLysLysThrThrAsnGlyArg
 2071 CTCCTGTGAATGATGGCCCGGCGCATTTTGAACCGGATCTACCCAGAGTGTGATGTGG 213
 LeuProValLysTrpMetAlaProGluAlaLeuPheAspArgIleTyThrHisGlnSerAspValTrp
 2140 TCTTTCCGGTCTCTGTGGAGATCTTCACTGGGGCTCCCATCCCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG 220
 SerPheGlyValLeuLeuTrpLeuIlePheThrLeuGlySerProTyProGlyValProValGlu
 2209 GAACCTTTCAGCTGTCAGAGCTCCAGCAGCCGACAGCCGACAGCCGACAGCCGACAGCCGACAG 227
 GluLeuPheLysLeuLeuLysLysGlyHisArgMetAspLysProSerAsnCysThrAsnGluLeuTy
 2278 ATGATGATGCGGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG 234
 MetMetMetArgAspCysTrpHisAlaValProSerGlnArgProThrPheLysGlnLeuValGluAsp

【 7 e 】

2347 CTGGACCCGATCGTGGCTTGGACCTCCACACAGAGTACTGGACCTGCCATGCTCCATGCTCCCTGGACCCAGTAC 241
 LeuAspArgIleValAlaLeuThrSerAsnGlnGluThrLeuAspLeuSerMetProLeuAspGlnTyr

2416 TCCCCAGCTTCCCGACACCGGAGCTTACGGTCTCCTCAGGGAGGATTCGGTCTTCTCTCATGAG 248
 SerProSerPheProAspThrArgSerSerThrCysSerSerGlyGluAspSerValPheSerHisGlu

2485 CCGCTGCCGAGAGCCCTCTGCTCCCGCACACCCAGCTCCCAATGGCGGACTCAAGAGCCG 255
 ProLeuProGlnGluProCysLeuProArgHisProAlaGlnLeuAlaAsnGlyLeuLeuLysArgArg

2544 TGACTGCCACCCACACGCGCTCCCGACACTCCACCGCTGACTGTAACCCCTCACCCACAGCCCTGCTG 262
 2623 GGCACACGACTGTCCCTCCCTGTCCTCCCTTCTCTGCTGG 2662

【 8 D 】

622 ACTAACCAACAGAGACCCATATCTGGACCAACACAGAAAGATGAAAGGGCTCCATGCTGTGGCT 69
 SerAsnAsnLysArgAlaProTyrTrpThrAsnThrGluLysMetGluLysArgLeuHisAlaValPro

691 CGCGCCAACTGCTCAAGTTTCCGTCGCCAGCGGGGAAACCAATGCCAACCATCGGTGGCTGA 75
 AlaAlaAsnThrValLysPheArgCysProAlaGlyLysAsnProMetProThrMetArgTrpLeuLys

760 AACGGAAAGAGTTTAAAGCAGGAGCATCGATTTGGAGCTACACAGCTCAAGAAACACACCTGAC 82
 AsnGlyLysGluPheLysGlnGlnHisArgIleGlyLysValAlaGlnAsnGlnHisTrpSerLeu

829 ATTTGAAAGTGTCCCTCACTGACAGGAAATTAFACTGTCTGTGGAGAAATGAATACAGCTCC 89
 IleMetGluSerValValProSerAspLysGlyAsnTyrThrCysValValGlnAsnGlnTyrGlySer

898 ATCAATCACACCTACACCTGATGCTGTGGAGCCCTCAGCCGCGCTCCCAAGCCGACTG 96
 IleAsnHisThrTyrHisLeuAspValValGluArgSerProHisArgProIleLeuGlnAlaGlyLeu

967 CCGGAATGCTCCACAGTGTCCGAGGACGTAGTGTCTGCAAGTTTACAGTGTATGATGCCAG 103
 ProAlaAsnAlaSerThrValValGlyAspValGlnPheValCysValValTyrSerAspAlaGln

1036 CCCCAATCCAGTGAACAGCACTGGAAGAAACAGCGAGTAAATACGGCCCGCGGCTGCCCTAC 110
 ProHisIleGlnTrpIleLysHisValGluLysAsnGlySerLysTyrGlyProAspGlyLeuProTyr

1105 CTCAGTGTCTCAGCGCCCGGTGTTACACCGGACAAAGAGTGTGAGTCTCTATATTCGGAAT 117
 LeuLysValLeuLysAlaAlaGlyValAsnThrThrAspLysGluIleGluValLeuTyrIleArgAsn

【 8 a 】

1 CCCCAGTCCGGAGGAGGCTTCCATTCAGTGACTGTCAGCAGCAGCGGCA CCGCTCGGTTCCCTGAGC 6
 70 CCACCGCAGCTCAAGGCAATTGGCGGTAGTCCATCCCGGTAGAGGAAAGTGCAGATGGGATTAACCTCC 13
 139 ACATGGAGATATGGAAGACCGGGGATTGGTACCCTAAACCATGCTCAGCTGGGCTCTTTCATCTGC 20
 METValSerTrpGlyArgPheIleCys

208 CTGGTCTGCTCACCATGGCAACCTTCTCCCTGGCCCGCTCCCTTCCAGTTTGTAGGATACCACA 27
 LeuValValValThrMetValThrLeuSerLeuAlaArgProSerPheSerLeuValGluAspThrThr

277 TTAGAGCCAGAAAGCCCAACCAATACCAATCTCAACCAAGTCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG 34
 LeuGluProGlnGluProPheThrLysTyrGlnIleSerGlnProGlnValValAlaAlaProGly

346 GACTCGCTAGAGCTCCCTGCTGTAAGATGCCCGCTGATCACTGTAAGTCACTGTAAGTGGCTGCTG 41
 GluSerLeuGluValArgCysLeuLeuLysAspAlaAlaValIleSerTrpThrLysAspGlyValHis

415 TTGGGGCCCAACAATGGACAGCTTATTTGGGAGTCTTGCAGATTAAGGGCCCGCTGAGAC 48
 LeuGlyProAsnHisArgThrValLeuIleGlyLysLeuGlnIleLysGlyValAlaThrProArgAsp

484 TCCGGCTCTATGCTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG 55
 SerGlyLeuTyrAlaCysThrAlaSerArgThrValAspSerGluThrTrpIlePheMetValAsnVal

553 ACAGATCCATCTCATCCGGAGATGAGGATGACCCAGTGTGGGAGATTTTGTCTAGTGCAGAAC 62
 ThrAspAlaIleSerSerGlyAspAspGluAspThrAspGlyAlaGluAspPheValSerGluAsn

【 8 C 】

1174 GTAACCTTTTGGAGCCCTGGGAATATACCTGCTGGCGGTAATTTCTATTGGGATATCCTTTACTCT 124
 ValThrPheGluAspAlaGlyLysValThrCysLeuAlaGlyAsnSerIleGlyIleSerPheHisSer

1243 GCATGTTGACACTTCTCCAGCGCTGSAAGAAAGAGATTAACAGTCTCCCGACACTCCTGGAG 131
 AlaTrpLeuThrValLeuProAlaProGlyArgLysGluIleThrAlaSerProAspTyrLeuGlu

1312 ATAGCCATTTACTGATPAGGGTCTTCTTAATCGCTGTATGGTGAACAGTCACTCCCGAATG 138
 IleAlaIleTyrCysIleGlyValPheLeuIleAlaCysMetValValThrValIleLeuCysArgMet

1381 AAGAACAAGCAGGAGGAGTTCAGAGCCCGCTGTCACAAAGCTGACCAAGCTGACCAAAAGTATCCCC 144
 LysAsnThrThrLysLysProAspPheSerSerGlnProAlaValHisLysLeuThrLysArgIlePro

1450 CTGGGAGACAGGTAAACAGTTCGGCTGAGTCCAGCTCCATGAACCTCCACACCCCGCTGAGG 151
 LeuArgArgGlnValThrValSerAlaGluSerSerSerSerMetAsnSerAsnThrProLeuValArg

1519 ATACAAACCGCTCTTCAACGGCAGACACCCCGTGGCAGGGTCTCCGAGTATGAACTTCCA 158
 IleThrThrArgLeuSerSerThrAlaAspThrProMetLeuAlaGlyValSerGluTyrGluLeuPro

1588 GAGACCCAAAATGGAGTTTCCAAAGATAAGCTGACATGGGCAAGCCCTGGGAGAGGTTGCTTT 165
 GluAspProLysTrpGluPheProArgAspLysLeuThrLeuGlyLysProLeuGlyGluClyCysPhe

1657 GGCACAGTGTCTGCGGAGGAGTGAATGACAAAGCAAGCCCAAGGAGCGCTCACCGTGGCC 172
 GlyGlnValValMETAlaGluAlaValGlyIleAspLysAspLysProLysGluAlaValThrValAla

1726 CTGACAGTCTGAAGATGATCCACAGAAAGACTTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG 179
 ValLysMetLeuLysAspAspAlaThrGluLysAspLeuSerAspLeuValSerGluMetGluMetMet

【 8 d 】

1795 AAGATGATGGAAACACAAGAAATATCATAAATCTCTGGAGCGCTGCACACAGGATGGCCCTCTCTAT 186
LysMETIleGlyLysHisLysAsnIleIleAsnLeuLeuGlyAlaCysThrGlnAspGlyProLeuTyr

1864 GTCATAGTTGAGTATGCTCTAAAGCAACCTCCGAGAAATACCTCCGAGCCGCGGACCCGGGATG 193
ValIleValGlnTyrAlaSerLysGlyAsnLeuArgLutyrLeuArgAlaArgArgProProGlyMET

1933 GAGTACTCTATGACATTAACCGTCTGAGGAGCAGACCTTCAGGACTTCGCTCATCCACC 200
GluTyrSerTyrAspIleAsnArgValProGluGlnMETThrPheLysAspLeuValSerCysThr

2002 TACCAGTCGCAGAGGATGAGTACTTGGCTTCCCAAAATGATTCATCCAGATTAGCCGCCAGA 207
TyrGlnLeuAlaArgGlyMETGlnTyrLeuAlaSerGlnLysCysIleHisArgAspLeuAlaIlaArg

2071 AATGTTTTGTAACAGAAACAAATGATGAAATAGCAGACTTGGACTGGCCAGATTCACAAAT 213
AsnValLeuValThrGluAsnAsnValMETLysIleIleAspPheGlyLeuIlaArgAspIleAsnAsn

2140 ATAGACTATTACAAAAGCAACCCAGCCGCTCCAGTCAAGTGGAGCTCCAGAGCCCTCTTT 220
IleAspTyrTyrLysThrThrAsnGlyArgLeuProValLysTrpMetAlaIleProGluIlaLeuPhe

2209 GATAGATATACACTATCAGAGTGTCTCTGGGTAAATGCTGGAGATCTTCACTTTA 227
AspArgValTyrThrHisGlnSerAspValTrpSerPheGlyValLeuMETTrpGluIlePheThrLeu

2278 GGGGCTGGCCCTACCCAGGATTCCTGGAGAACTTTTAAAGCTCTCAGGAGGACACAGATG 234
GlyGlySerProTyrProGlyIleIleProValGluLeuPheLysLeuLysGluGlyHisArgMET

【 8 e 】

2347 GATAAGCCAGCAACTGCCAACAACTGTCATGATGATGAGGGACTGTGGCATGACAGTGCCTCC 241
AspLysProAlaAsnCysThrAsnGluLeuTyrMETMETMETArgSerCysTrpHisAlaValProSer

2416 CAGAGCCAACTGCAAGCTGTGAGAGCTGGATCGAATTCCTCACTCTCAACAACCAATGAGAA 248
GlnArgProThrPheLysGlnLeuValGluAspLeuArgIleLeuThrAsnGluGlu

2485 TACTTGGACTCCGCCACTCCGACAGTTCACAGTTCACCTGACCTGACACAGAGTCTTGTCT 255
TyrLeuAspLeuSerGlnProGluGlnTyrSerProSerTyrProAspIlaArgSerSerCysSer

2554 TCACGAGATCACTCTGTTTTCTCCAGCCCTCAGCTTCAACCCAGCTCCCTGCTGATCCAC 262
SerGlyAspAspSerValPheSerProAspProMetProTyrGlnProCysLeuProGlnTyrPheHis

2623 ATAAACGGCAGTGTAAACATGATGACTGTGTCTGCTGCCCAACAGGACAGCCTGGAACT 269

2692 AGCTACACTGAGCAGGAGACCCTCCAGAGCTGTGTCTCCACTGTATATATGATCAGAGG 276

2761 AGTAAATATGGAAAAGTAAATCAGCATATGTGTAAGAATTTAFACAGTTGAAAACCTGTAACTTCCC 282

2830 CAGGAGGAGAGAGGTTTTCTGGCAGTGGACTGCCAACGCCACCATGTAACTCCCTCACCTGCC 289

2899 tgcgtactgctgpggaccagttaggactcaggggagcggcgttctgcttctgttattttgttaa 296

2968 TAAATGGAGAGATTATGTCACACACTTACAGACACAAATGACAGTATATAGGTGCTGGATGAT 303

3037 GTAATATATTCMAATATGTAAT 310

3106 taaatggatgcccccaatgcaaatgctctctcttttttttattgctattttgcttatttttttttt 317

3175 TCTTACACATAATTTCTTAATTTCCCGCAGAGGTGGAAAATACATTTTTCGCGGAATGG 324

3244 TATAACCTTAATTTTAAATTTGTAATTAACAAAACAAATTAATTAATTAATTTTCTTAAAT 331

3313 TTAAGTGGATTTCTATGACGAGCAGCAGCAGTACTTAAATCTATCTGCTGGACTTAATGATC 338

3382 AGATCCCTTTGAAAAGAGAAATTTTACAAATATATGA 3416

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 31/22 (2006.01)		A 6 1 P 31/22	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 1/19 (2006.01)		C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)		C 1 2 N 1/19	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)		C 1 2 N 1/21	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)		A 6 1 K 37/02	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/566 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	D
		G 0 1 N 33/53	M
		G 0 1 N 33/566	

(74)代理人 100074228

弁理士 今城 俊夫

(74)代理人 100084009

弁理士 小川 信夫

(74)代理人 100082821

弁理士 村社 厚夫

(74)代理人 100086771

弁理士 西島 孝喜

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(72)発明者 ディオン クレイグ エイ

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9 4 3 8 ハーリースヴィル チャーチル コート 4 4
2

(72)発明者 クラムリー グレッグ

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9 1 4 7 フィラデルフィア サウス セヴンス ストリ
ート 8 4 9 アパートメント 3 - イー

(72)発明者 ジェイ マイケル シー

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 1 9 0 3 8 グレンサイド ノース リンウッド アベニュー
ー 1 4 2

(72)発明者 シェルシンガー ジョセフ

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 1 0 0 1 1 ニューヨーク ワシントン スクエア ウェスト
3 7

審査官 斎藤 真由美

(56)参考文献 Oncogene, 3(1988), p. 9-15

Biochem. Biophys. Res. Commun., 169(1990. Jun) p. 680-685

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86(1989), p. 8722-8726

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90

C12N 1/00-5/28

C12P 21/00-08

C07K 14/00-16/46

C12Q 1/00-70

G01N 33/00-98

A61k 31/00-48/00

A61P 1/00-43/00

PubMed、MEDLINE (STN)

BIOSIS/WPI (DIALOG)

GenBank/DDBJ/EMBL/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

专利名称(译)	成纤维细胞生长因子受体		
公开(公告)号	JP3996084B2	公开(公告)日	2007-10-24
申请号	JP2003111330	申请日	2003-04-16
[标]申请(专利权)人(译)	万福潘德ティスファーマシューティカルズインコーポレイテッド		
申请(专利权)人(译)	安万特制药公司		
当前申请(专利权)人(译)	安万特制药公司		
[标]发明人	ディオクレイグエイ クラムリーグレッグ ジェイマイケルシー シエルシンガージョセフ		
发明人	ディオクレイグエイ クラムリーグレッグ ジェイマイケルシー シエルシンガージョセフ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/71 C12N5/10 A61K38/45 A61P31/00 A61P31/22 A61P43/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 A61K38/00 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 A61P9/10 A61P31 /12 C07K14/00 C07K14/705 C12N15/00 C12N15/54 C12P21/00 C12P21/02 C12Q1/18 C12R1/91		
CPC分类号	A61K38/00 A61P9/10 A61P31/00 A61P31/12 A61P31/22 A61P43/00 C07K14/71		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/71 C12N5/00.A A61K37/52 A61P31/00 A61P31/22 A61P43/00.105 A61P43 /00.111 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 A61K37/02 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53. D G01N33/53.M G01N33/566 A61K38/00 A61K38/16 A61K38/45 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/22		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA36 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045 /DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA07 4B024/BA63 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA06 4B024/CA10 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024 /EA04 4B024/FA02 4B024/FA06 4B024/FA10 4B024/GA04 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA01 4B063/QA05 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS36 4B063/QX07 4B065/AA93X 4B065 /AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB06 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/BA25 4B065/CA24 4B065/CA27 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084 /CA18 4C084/CA53 4C084/DB54 4C084/DB63 4C084/DB70 4C084/DC22 4C084/NA14 4C084/ZB21 4C084/ZB31 4C084/ZB33 4C084/ZC03 4C084/ZC19 4C084/ZC42 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045 /BA10 4H045/BA40 4H045/BA53 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA20 4H045/FA40 4H045/FA44 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045 /HA07		
代理人(译)	中村稔 小川伸男 西岛隆义		
审查员(译)	斋藤真由美		
优先权	07/549587 1990-07-06 US		
其他公开文献	JP2004041176A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供特定种类的成纤维细胞生长因子受体参与编码受体和重组系统的核酸中生长因子受体的表达，并在作为受体拮抗剂的候选药物的检索中表达。解决方案：本发明公开了两种名为flg和bek的人类基因的总cDNA克隆。这些基因编码两种相似和不同的表面受体，其由细胞质蛋白组成，所述细胞质蛋白含有包含三个免疫球蛋白样区域的细胞外结构域，单个跨膜结构域和酪氨酸激酶结构域。150kDa和135kDa的蛋白质被转化为NIH3T3细胞中的flg和bek的生物合成。使用放射性同位素标记的酸性FGF，碱性FGF或kFGF的直接键合实验以及使用天然生长因子分析键合抑制和键合数据显示bek和flg可以解离aFGF，bFGF或kFGF，其解离常数为： $(2-15) \times 10^{-11}$ / SP >微米。Ž

【 1 图】

