

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 527858

(P2003 - 527858A)

(43)公表日 平成15年9月24日(2003.9.24)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	4 B 0 2 4
A 0 1 K 67/027		A 6 1 P 1/02	4 B 0 3 3
A 6 1 K 38/00		3/04	4 B 0 6 3
A 6 1 P 1/02		3/10	4 B 0 6 4
3/04		3/14	4 B 0 6 5

審査請求 有 予備審査請求 (全196数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 569360(P2001 - 569360)

(86)(22)出願日 平成13年3月22日(2001.3.22)

(85)翻訳文提出日 平成14年9月20日(2002.9.20)

(86)国際出願番号 PCT/US01/09073

(87)国際公開番号 W001/070977

(87)国際公開日 平成13年9月27日(2001.9.27)

(31)優先権主張番号 60/191,379

(32)優先日 平成12年3月22日(2000.3.22)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 アムジェン インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91320,
サウザンド オークス, ワン アムジェ
ン センター ドライブ

(72)発明者 サリス, クリスティアン エム.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91320,
ニューバリー パーク, コロネット プ
レイス 4027

(72)発明者 ミュー, シャロン エックス.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 91362,
サウザンド オークス, リッカード ド
ライブ 2954

(74)代理人 弁理士 山本 秀策 (外 2 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 線維芽細胞増殖因子レセプター様分子およびその使用

(57)【要約】

本発明は、線維芽細胞増殖因子レセプター様 (F G F R - L) ポリペプチド、およびこのポリペプチドをコードする核酸分子を提供する。本発明はまた、F G F R - L ポリペプチドを産生するための、選択的結合因子、ベクター、宿主細胞、および方法を提供する。本発明は、F G F R - L ポリペプチドに関連する疾患、障害、および状態の、診断、処置、改善、および/または予防のための、薬学的組成物および方法をさらに提供する。F G F R - L ポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック非ヒト動物もまた、本発明に含まれる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号1または配列番号4のいずれかに示される、ヌクレオチド配列；

(b) ATCC受託番号__中のDNAインサートの、ヌクレオチド配列；

(c) 配列番号2または配列番号5に示されるポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列；

(d) (a)～(c)のいずれかの相補体に、中程度にストリンジェントな条件下または高度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；および

(e) (a)～(c)のいずれかと相補的な、ヌクレオチド配列、からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項2】 単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドと少なくとも約70%同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 配列番号1または配列番号4のいずれかに示されるヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするか、ATCC受託番号__中のDNAインサートのヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするか、または(a)の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードする、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも約25アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号1もしくは配列番号4のいずれかのヌクレオチド配列の領域、ATCC受託番号__中のDNAインサートのヌクレオチド配列の領域、(a)または(b)のヌクレオチド配列の領域であって、ここで、該ポリペプチドフラグメントは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるコードされたポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、領域；

(d) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号1もし

くは配列番号4のいずれかのヌクレオチド配列の領域、ATCC受託番号__中のDNAインサートのヌクレオチド配列の領域、または(a)~(c)のいずれかのヌクレオチド配列の領域；

(e) 中程度にストリンジェントな条件下または高度にストリンジェントな条件下で、(a)~(d)のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

(f) (a)~(d)のいずれかと相補的な、ヌクレオチド配列、からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項3】 単離された核酸分子であって、以下：

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C末端短縮および/またはN末端短縮を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番

号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(f) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、(a)~(e)のいずれかのヌクレオチド配列；

(g) 中程度にストリンジェントな条件下または高度にストリンジェントな条件下で、(a)~(f)のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

(h) (a)~(e)のいずれかと相補的な、ヌクレオチド配列、からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項4】 請求項1、請求項2または請求項3のいずれか1項に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項5】 請求項4に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項6】 真核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項7】 原核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項8】 FGFRLポリペプチドを産生するためのプロセスであって、該ポリペプチドを発現するために適切な条件下で請求項5に記載の宿主細胞を培養する工程、および必要に応じて、該培養物から該ポリペプチドを単離する工程を包含する、プロセス。

【請求項9】 請求項8に記載のプロセスによって産生される、ポリペプチド。

【請求項10】 請求項8に記載のプロセスであって、ここで、前記核酸分子は、前記FGFRLポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結された、ネイティブなFGFRLポリペプチドについてのプロモーターDNA以外のプロモーターDNAを含む、プロセス。

【請求項11】 請求項2に記載の単離された核酸分子であって、ここで、前記同一性パーセントは、GAP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、およびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを用いて決定される、単離された核酸分子。

【請求項12】 化合物がFGFRLポリペプチド活性またはFGFRL-

Lポリペプチド産生を阻害するか否かを決定するためのプロセスであって、請求項5、請求項6、または請求項7のいずれか1項に記載の細胞を該化合物に曝す工程、および該細胞におけるFGFR-Lポリペプチド活性またはFGFR-Lポリペプチド産生を測定する工程を包含する、プロセス。

【請求項13】 単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号2または配列番号5のいずれかに示される、アミノ酸配列；および

(b) ATCC受託番号__中のDNAインサートによってコードされる、アミノ酸配列、
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14】 単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号3または配列番号6に示されるアミノ酸配列であって、必要に応じて、アミノ末端メチオニンをさらに含む、アミノ酸配列；

(b) 配列番号2または配列番号5のいずれかのオルソログについての、アミノ酸配列；

(c) 配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) 少なくとも約25アミノ酸残基を含む、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、該フラグメントは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、フラグメント；ならびに

(e) 配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、ATCC受託番号__中のDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、または(a)~(c)のいずれかの対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、
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15】 単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C末端短縮および/またはN末端短縮を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列、

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16】 請求項1、請求項2、または請求項3のいずれか1項に記載の核酸分子によってコードされる単離されたポリペプチドであって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、単離されたポリペプチド。

【請求項17】 請求項14に記載の単離されたポリペプチドであって、ここで、前記同一性パーセントは、GAP、BLASTP、FASTA、BLAS

TA、BLASTX、BestFit、およびSmith-Watermanアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータプログラムを用いて決定される、単離されたポリペプチド。

【請求項18】 請求項13、請求項14、または請求項15のいずれか1項に記載のポリペプチドに特異的に結合する、選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項19】 配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはそのフラグメントに特異的に結合する、請求項18に記載の選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項20】 抗体またはそのフラグメントである、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項21】 ヒト化抗体である、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項22】 ヒト抗体またはそのフラグメントである、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項23】 ポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項24】 モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項25】 キメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項26】 CDR移植抗体またはそのフラグメントである、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項27】 抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメントである、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項28】 可変領域フラグメントである、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項29】 前記可変領域フラグメントが、FabフラグメントまたはFab'フラグメントである、請求項28に記載の選択的結合因子。

【請求項30】 配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を

有するポリペプチドに特異性を有する少なくとも1つの相補性決定領域を含む、選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項31】 検出可能標識に結合された、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項32】 FGFRLポリペプチドの生物学的活性と拮抗する、請求項18に記載の選択的結合因子。

【請求項33】 FGFRLポリペプチド関連の疾患、状態、または障害を、処置、予防、または改善するための組成物であって、有効量の請求項18に記載の選択的結合因子を含む、組成物。

【請求項34】 配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドで動物を免疫することによって産生される、選択的結合因子。

【請求項35】 請求項1、請求項2、または請求項3のいずれか1項に記載のポリペプチドに結合し得る選択的結合因子を産生する、ハイブリドーム。

【請求項36】 請求項18に記載の選択的結合因子またはフラグメントを用いて、FGFRLポリペプチドの量を検出または定量する方法。

【請求項37】 請求項13、請求項14、または請求項15のいずれか1項に記載のポリペプチドと、薬学的に受容可能な処方剤とを含む、組成物。

【請求項38】 前記薬学的に受容可能な処方剤が、キャリア、アジュバント、溶解剤、安定剤、または抗酸化剤である、請求項37に記載の組成物。

【請求項39】 前記ポリペプチドが、配列番号3または配列番号6に示されるアミノ酸配列を含む、請求項38に記載の組成物。

【請求項40】 請求項13、請求項14、または請求項15のいずれか1項に記載のポリペプチドの誘導体を含む、ポリペプチド。

【請求項41】 水溶性ポリマーを用いて共有結合的に改変された、請求項40に記載のポリペプチド。

【請求項42】 請求項41に記載のポリペプチドであって、ここで、前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリ-(N-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシドノ

エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、およびポリビニルアルコールからなる群より選択される、ポリペプチド。

【請求項43】 請求項1、請求項2または請求項3のいずれか1項に記載の核酸分子と、薬学的に受容可能な処方剤とを含む、組成物。

【請求項44】 前記核酸分子が、ウイルスベクター中に含まれる、請求項43に記載の組成物。

【請求項45】 請求項1、請求項2または請求項3のいずれか1項に記載の核酸分子を含む、ウイルスベクター。

【請求項46】 異種アミノ酸配列に融合された、請求項13、請求項14、または請求項15のいずれか1項に記載のポリペプチドを含む、融合ポリペプチド。

【請求項47】 前記異種アミノ酸配列が、IgG定常ドメインまたはそのフラグメントである、請求項46に記載の融合ポリペプチド。

【請求項48】 医学的状态を、処置、予防、または改善するための組成物であって、請求項13、請求項14、もしくは請求項15のいずれか1項に記載のポリペプチド、または請求項1、請求項2、もしくは請求項3のいずれか1項に記載の核酸によってコードされるポリペプチドを含む、組成物。

【請求項49】 請求項48に記載の組生物であって、処置、予防または改善される医学的状态が、造血性障害、骨粗鬆症、大理石骨病、骨形成不全症、パジェット病、歯周疾患、高カルシウム血症、急性糸球体腎炎、慢性糸球体腎炎、癌、糖尿病、肥満、または悪液質である、組成物。

【請求項50】 被験体において病的状態または病的状態に対する感受性を診断する方法であって、以下：

(a) サンプルにおいて、請求項13、請求項14、もしくは請求項15のいずれか1項に記載のポリペプチドの発現の存在または発現量、または請求項1、請求項2、もしくは請求項3のいずれか1項に記載の核酸分子によってコードされるポリペプチドの発現の存在または発現量を、決定する工程；および

(b) 該ポリペプチドの発現の存在または発現量に基づいて、病的状態または病的状態に対する感受性を診断する工程、

を包含する、方法。

【請求項51】 デバイスであって、以下：

(a) 移植に適した膜；および

(b) 該膜内にカプセル化された細胞であって、該細胞は、請求項13、請求項14、もしくは請求項15のいずれか1項に記載のタンパク質を分泌する、細胞；

を備え、

該膜は、該タンパク質に対して透過性であり、かつ該細胞に有害な物質に対して不透過性である、デバイス。

【請求項52】 FGFRLポリペプチドに結合する化合物を同定する方法であって、以下：

(a) 請求項13、請求項14、もしくは請求項15のいずれか1項に記載のポリペプチドを、化合物と接触させる工程；および

(b) 該化合物への該FGFRLポリペプチドの結合の程度を決定する工程、

を包含する、方法。

【請求項53】 前記化合物に結合した場合の前記ポリペプチドの活性を決定する工程をさらに包含する、請求項52に記載の方法。

【請求項54】 動物においてポリペプチドのレベルを調節するための組成物であって、請求項1、請求項2、または請求項3のいずれか1項に記載の核酸分子を含む、組成物。

【請求項55】 請求項1、請求項2、または請求項3のいずれか1項に記載の核酸分子を含む、トランスジェニック非ヒト哺乳動物。

【請求項56】 化合物がFGFRLポリペプチド活性またはFGFRLポリペプチド産生を阻害するか否かを決定するためのプロセスであって、請求項55に記載のトランスジェニック哺乳動物を該化合物に曝す工程、および該哺乳動物におけるFGFRLポリペプチド活性またはFGFRLポリペプチド産生を測定する工程を包含する、プロセス。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本願は、2000年3月22日出願の米国仮特許出願第60/191,379号の継続であり、この仮出願の開示は、本明細書中で参考として明確に援用される。

【0002】**(発明の分野)**

本発明は、線維芽細胞増殖因子レセプター様(FGFR-L)ポリペプチドおよびこのポリペプチドをコードする核酸分子に関する。本発明はまた、FGFR-Lポリペプチドを産生するための、選択的結合因子、ベクター、宿主細胞および方法に関する。本発明はさらに、FGFR-Lポリペプチドと関連する疾患、障害、および状態の、診断、処置、改善、および/または予防のための薬学的組成物および方法に関する。

【0003】**(発明の背景)**

核酸分子の同定、クローニング、発現、および操作における技術進歩ならびにヒトゲノムの解読は、新規治療剤の発見を大きく加速した。現在、高速核酸配列決定技術は、前例のない速度で配列情報を作製し得、そしてコンピュータ分析と合わされて、ゲノムの一部および全体へと重複配列を集合すること、ならびにポリペプチドコード領域の同定を可能にする。既知アミノ酸配列のデータベース編集物に対する推定アミノ酸配列の比較は、以前に同定された配列および/または構造の目印に対して相同性の程度を決定することを可能にする。核酸分子のポリペプチドコード領域のクローニングおよび発現は、構造分析および機能分析のためのポリペプチド産物を提供する。核酸分子およびコードされるポリペプチドの操作は、治療剤としての使用に関して生成物に対して有利な特性を与え得る。

【0004】

過去10年間にわたるゲノム研究における有意な技術進歩にも関わらず、ヒトゲノムに基づく新規治療剤の開発に関する可能性は、未だほとんど実現されていない。潜在的に有利なポリペプチド治療剤をコードする多くの遺伝子またはこれ

らがコードするポリペプチド（これらは、治療分子に対して「標的」としてはた
らき得る）は、未だ同定されていない。従って、診断的な利点または治療的な
利点を有する、新規ポリペプチドおよびこれらをコードする核酸分子を同定する
ことが、本発明の目的である。

【0005】

（発明の要旨）

本発明は、新規 F G F R - L 核酸分子およびコードされるポリペプチドに関す
る。

【0006】

本発明は、単離された核酸分子を提供し、この核酸分子は、以下：

（a）配列番号1または配列番号4のいずれかに示される、ヌクレオチド配列
；

（b）ATCC受託番号__中のDNAインサートの、ヌクレオチド配列；

（c）配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコー
ドするヌクレオチド配列；

（d）（a）～（c）のいずれかの相補体に、中程度にストリンジェントな条
件下または高度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；および

（e）（a）～（c）のいずれかと相補的な、ヌクレオチド配列、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0007】

本発明はまた、単離された核酸分子を提供し、この核酸分子は、

（a）配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドと少な
くとも約70%同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって
、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のい
ずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

（b）配列番号1または配列番号4のいずれかに示されるヌクレオチド配列の
対立遺伝子改変体またはスプライス改変体、ATCC受託番号__中のDNAイン
サートのヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体、または

(a) の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードする、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも約25アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号1または配列番号4のいずれかのヌクレオチド配列の領域、ATCC受託番号__中のDNAインサートのヌクレオチド配列の領域、(a)のヌクレオチド配列の領域または(b)のヌクレオチド配列の領域であって、ここで、上記ポリペプチドフラグメントは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるコードされたポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、ヌクレオチド配列の領域；

(d) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号1または配列番号4のいずれかのヌクレオチド配列の領域、ATCC受託番号__中のDNAインサートのヌクレオチド配列の領域、または(a)~(c)のいずれかのヌクレオチド配列の領域；

(e) 中程度にストリンジントな条件下または高度にストリンジントな条件下で、(a)~(d)のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

(f) (a)~(d)のいずれかと相補的な、ヌクレオチド配列、からなる群より選択される、ヌクレオチド配列を含む。

【0008】

本発明はさらに、単離された核酸分子を提供し、この核酸分子は、

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号2または配列番号5

のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C末端短縮および/またはN末端短縮を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、上記コードされたポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(f) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、(a)~(e)のいずれかの、ヌクレオチド配列；

(g) 中程度にストリンジентな条件下または高度にストリンジентな条件下で、(a)~(f)のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

(h) (a)~(e)のいずれかと相補的な、ヌクレオチド配列、からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0009】

本発明は、単離されたポリペプチドを提供し、このポリペプチドは、

(a) 配列番号2または配列番号5のいずれかに示される、アミノ酸配列；および

(b) ATCC受託番号__中のDNAインサートによってコードされる、アミノ酸配列、からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0010】

本発明はまた、単離されたポリペプチドを提供し、このポリペプチドは、

(a) 配列番号3または配列番号6に示されるアミノ酸配列であって、必要に

応じてさらにアミノ末端メチオニンを含む、アミノ酸配列；

(b) 配列番号2または配列番号5のいずれかのオルソログについての、アミノ酸配列；

(c) 配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列と少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) 少なくとも約25アミノ酸残基を含む、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、上記フラグメントは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、フラグメント；ならびに

(e) 配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、ATCC受託番号__中のDNAインサートによってコードされるアミノ酸配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、または(a)~(c)のいずれかの対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0011】

本発明はさらに、単離されたポリペプチドを提供し、このポリペプチドは、

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配

列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C末端短縮および/またはN末端短縮を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、およびN末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、上記ポリペプチドは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列、からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0012】

F G F R - L アミノ酸配列を含む融合ポリペプチドもまた、提供される。

【0013】

本発明はまた、本明細書中に示されるような単離された核酸分子を含む発現ベクター、本明細書中に示されるような組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞、およびF G F R - L ポリペプチドを産生する方法を提供し、この方法は、この宿主細胞を培養する工程、および必要に応じてそのように産生されたポリペプチドを単離する工程を包含する。

【0014】

F G F R - L ポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック非ヒト動物もまた、本発明に含まれる。F G F R - L 核酸分子は、F G F R - L ポリペプチドの発現およびF G F R - L ポリペプチドの増加したレベル（これは、増加した循環レベルを含み得る）を可能にする様式で、動物中に導入される。あるいは、F G F R - L 核酸分子は、内因性F G F R - L ポリペプチドの発現を阻害する（すなわち、F G F R - L ポリペプチド遺伝子ノックアウトを保有するトランスジェニック動物を作製する）様式で動物に導入される。このトランスジェニック非ヒト動物は、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはげっ歯類（例

えば、ラットまたはマウス)である。

【0015】

本発明のFGFR-Lポリペプチドの誘導体もまた、提供される。

【0016】

本発明のFGFR-Lポリペプチドに特異的に結合し得る選択的結合因子(例えば、抗体およびペプチド)が、さらに提供される。このような抗体およびペプチドは、アゴニストであってもアンタゴニストであってもよい。

【0017】

本発明のヌクレオチド、ポリペプチド、もしくは選択的結合因子と、1つ以上の薬学的に受容可能な処方剤とを含む、薬学的組成物もまた、本発明によって含まれる。この薬学的組成物は、治療有効量の本発明のヌクレオチドまたはポリペプチドを提供するために使用される。本発明はまた、このポリペプチド、核酸分子、および選択的結合因子を使用する方法に関する。

【0018】

本発明のFGFR-LポリペプチドおよびFGFR-L核酸分子は、疾患および障害(本明細書中に列挙されるものを含む)を処置、予防、改善、および/または検出するために使用され得る。

【0019】

本発明はまた、FGFR-Lポリペプチドに結合する試験分子を同定するために、試験分子をアッセイする方法を提供する。この方法は、FGFR-Lポリペプチドを試験分子と接触させて、このポリペプチドへのこの試験分子の結合の程度を決定する工程を包含する。この方法はさらに、このような試験分子が、FGFR-Lポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストであるか否かを決定する工程を包含する。本発明はさらに、FGFR-Lポリペプチドの発現またはFGFR-Lポリペプチドの活性に対する分子の影響を試験する方法を提供する。

【0020】

FGFR-Lポリペプチドの発現を調整する方法およびFGFR-Lポリペプチドのレベルを調節する(すなわち、増加または減少させる)方法もまた、本発明によって含まれる。1つの方法は、FGFR-Lポリペプチドをコードする

核酸分子を動物に投与する工程を包含する。別の方法において、FGFR-Lポリペプチドの発現を調整または調節するエレメントを含む核酸分子が、投与され得る。これらの方法の例としては、本明細書中にさらに記載されるような、遺伝子治療、細胞治療、およびアンチセンス治療が挙げられる。

【0021】

このFGFR-Lポリペプチドは、そのリガンドを同定するために使用され得る。種々の形態の「発現クローニング」が、レセプターについてのリガンドをクローニングするために使用されている（例えば、Davisら、1996、Cell, 87:1161~69）。これらおよび他のFGFR-Lポリペプチドリガンドクローニング実験が、本明細書中により詳細に記載される。FGFR-Lポリペプチドリガンドの単離により、このFGFR-Lポリペプチドシグナル伝達経路の新規なアゴニストまたはアンタゴニストの同定または開発が可能である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、FGFR-Lポリペプチドリガンド、抗FGFR-Lポリペプチドリガンド抗体およびその誘導体、低分子、またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられ、これらのうちのいずれもが、1つ以上の疾患または障害（本明細書中に列挙されるものを含む）を潜在的に処置するために使用され得る。

【0022】

（発明の詳細な説明）

本明細書中で使用される節の表題は、組織的な目的のみのためであり、そして記載される主題を限定するようには解釈されるべきではない。本願において引用される全ての参考文献は、明確に本明細書中に参考として援用される。

【0023】

（定義）

用語「FGFR-L遺伝子」または「FGFR-L核酸分子」また「FGFR-Lポリヌクレオチド」とは、配列番号1または配列番号4のいずれかに示されるヌクレオチド配列、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、ATCC受託番号__におけるDNAインサートのヌクレオチド配列、および本明細書中で定義される核酸分子を含むかま

たはこれらからなる、核酸分子をいう。

【0024】

用語「FGFR-Lポリペプチド対立遺伝子改変体」とは、生物または生物の集団の染色体上の所定の遺伝子座を占める遺伝子の、天然に存在する可能ないくつかの代替形態のうちの1つをいう。

【0025】

用語「FGFR-Lポリペプチドスプライス改変体」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるFGFR-Lポリペプチドアミノ酸配列のRNA転写物中のイントロン配列の選択的プロセッシングによって生成される、核酸分子（通常はRNA）をいう。

【0026】

用語「単離された核酸分子」とは、(1)総核酸が供給源細胞から単離される場合に、ともに天然で見出されるタンパク質、脂質、糖質、または他の物質のうち少なくとも約50パーセントから分離された、本発明の核酸分子、(2)「単離された核酸分子」が天然で連結しているポリヌクレオチドの全てまたは一部に連結していない、本発明の核酸分子、(3)天然では連結しないポリヌクレオチドに作動可能に連結されている、本発明の核酸分子、または(4)より大きなポリヌクレオチド配列の一部として天然には存在しない、本発明の核酸分子をいう。好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、いかなる他の夾雑核酸分子、または天然の環境において見出される他の夾雑物（これらは、ポリペプチド産生における使用、または治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げる）も実質的には含まない。

【0027】

用語「核酸配列」または「核酸分子」は、DNA配列またはRNA配列をいう。この用語は、DNAおよびRNAの公知の塩基アナログのうちのいずれかから形成される分子を含み、この塩基アナログは、例えば、以下であるがこれらに限定されない：4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニル-シトシン、プソイドイソシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-カル

ボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウラシル、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、イノシン、N6 - イソ - ペンテニルアデニン、1 - メチルアデニン、1 - メチルプソイドウラシル、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 - メチルアデニン、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 (β - D - mannosylqueosine)、5' - メトキシカルボニル - 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 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、オキシプトキソシン、プソイドウラシル、キューオシン (queosine)、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、N - 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、プソイドウラシル、キューオシン (queosine)、2 - チオシトシン、および 2 , 6 - ジアミノプリン。

【0028】

用語「ベクター」は、宿主細胞にコード情報を移すために使用される任意の分子（例えば、核酸、プラスミド、またはウイルス）をいうために使用される。

【0029】

用語「発現ベクター」は、宿主細胞の形質転換に適切であり、かつ挿入された異種核酸配列の発現を、指向および/または制御する核酸配列を含む、ベクターをいう。発現としては、転写、翻訳、およびRNAスプライシング（イントロンが存在する場合）のようなプロセスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0030】

用語「作動可能に連結された（されている）」は、隣接配列の配置方法をいうために本明細書中に使用される。ここで、このように記載される隣接配列は、その通常の機能を実行するように構成されるかまたは集合される。従って、コード配列に作動可能に連結された隣接配列は、そのコード配列の複製、転写および/または翻訳をもたらすことができ得る。例えば、プロモーターがコード配列の転

写を指向し得る場合、このコード配列は、このプロモーターに作動可能に連結されている。隣接配列は、それが正確に機能する限り、コード配列と連続している必要はない。従って、例えば、翻訳されないが転写される介在配列が、プロモーター配列とこのコード配列との間に存在し得、そして、このプロモーター配列はなお、このコード配列に「作動可能に連結されている」とみなされ得る。

【0031】

用語「宿主細胞」は、核酸配列で形質転換されたかまたは形質転換され得、次いで目的の選択された遺伝子を発現し得る、細胞をいうために用いられる。この用語は、この選択された遺伝子が存在する限り、子孫が形態学または遺伝的構成においてもとの親と同一であってもなくても、この親細胞の子孫を含む。

【0032】

用語「FGFR-Lポリペプチド」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドおよび関連ポリペプチドをいう。関連ポリペプチドとしては、以下が挙げられる：FGFR-Lポリペプチドフラグメント、FGFR-Lポリペプチドオルソログ、FGFR-Lポリペプチド改変体、およびFGFR-Lポリペプチド誘導体であって、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を有するもの。FGFR-Lポリペプチドは、本明細書中に定義されるように、成熟ポリペプチドであり得、そして調製方法によっては、アミノ末端メチオニン残基を有しても有さなくてもよい。

【0033】

用語「FGFR-Lポリペプチドフラグメント」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドのアミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）の短縮および/またはカルボキシル末端の短縮を含むポリペプチドをいう。用語「FGFR-Lポリペプチドフラグメント」とはまた、FGFR-Lポリペプチドオルソログ、FGFR-Lポリペプチド誘導体、またはFGFR-Lポリペプチド改変体のアミノ末端および/またはカルボキシル末端の短縮物をいうか、あるいはFGFR-Lポリペプチド対立遺伝子改変体またはFGFR-Lポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドの

アミノ末端および/またはカルボキシル末端の短縮物をいう。FGFR-Lポリペプチドフラグメントは、選択的RNAスプライシングから生じ得るか、またはインビボプロテアーゼ活性から生じ得る。FGFR-Lポリペプチドの膜結合形態もまた、本発明によって意図される。好ましい実施形態において、短縮および/または欠失は、約10アミノ酸、または約20アミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または100アミノ酸より多いアミノ酸を含む。このように産生されたポリペプチドフラグメントは、約25個連続するアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ酸、または約200アミノ酸、または200アミノ酸より多いアミノ酸を含む。このようなFGFR-Lポリペプチドフラグメントは、必要に応じて、アミノ末端メチオニン残基を含み得る。このようなフラグメントは、例えば、FGFR-Lポリペプチドに対する抗体を生成するために用いられ得ることが理解される。

【0034】

用語「FGFR-Lポリペプチドオルソログ」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるFGFR-Lポリペプチドアミノ酸配列に対応する、別の種由来のポリペプチドをいう。例えば、マウスおよびヒトのFGFR-Lポリペプチドは、互いにオルソログであるとみなされる。

【0035】

用語「FGFR-Lポリペプチド改変体」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるFGFR-Lポリペプチドアミノ酸配列（リーダー配列を有するか、または有さない）に比べて、1つ以上のアミノ酸配列の置換、欠失（例えば、内部欠失および/もしくはFGFR-Lポリペプチドフラグメント）、ならびに/または付加（例えば、内部付加および/もしくはFGFR-L融合ポリペプチド）を有するアミノ酸配列を含む、FGFR-Lポリペプチドをいう。改変体は、天然に存在し得る（例えば、FGFR-Lポリペプチド対立遺伝子改変体、FGFR-Lポリペプチドオルソログ、およびFGFR-Lスプライス改変体）か、または人工的に構築され得る。このようなFGFR-L-ポリペプチド改変体は、配列番号1または配列番号4のいずれかに示されるDNA配列から

しかるべく変動するDNA配列を有する対応する核酸分子から調製され得る。好ましい実施形態において、この改変体は、1～3個、または1～5個、または1～10個、または1～15個、または1～20個、または1～25個、または1～50個、または1～75個、または1～100個、または100個よりも多いアミノ酸の置換、挿入、付加および/もしくは欠失を有し、ここでその置換は、保存的であっても、または非保存的であってもよいし、あるいはその組み合わせであってもよい。

【0036】

用語「FGFR-Lポリペプチド誘導体」とは、化学的に改変された、本明細書中に定義されるような、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチド、FGFR-Lポリペプチドフラグメント、FGFR-Lポリペプチドオルソログ、またはFGFR-Lポリペプチド改変体をいう。用語「FGFR-Lポリペプチド誘導体」とはまた、化学的に改変された、本明細書中に定義されるような、FGFR-Lポリペプチド対立遺伝子改変体またはFGFR-Lポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドをいう。

【0037】

用語「成熟FGFR-Lポリペプチド」とは、リーダー配列を欠くFGFR-Lポリペプチドをいう。成熟FGFR-Lポリペプチドはまた、アミノ末端(リーダー配列を有するか、または有さない)および/またはカルボキシル末端のタンパク質分解性プロセッシング、より大きい前駆体からのより小さいポリペプチドの切断、N結合型グリコシル化および/またはO結合型グリコシル化などのような、他の改変を含み得る。例示的な成熟CHLポリペプチドは、配列番号3または配列番号6のいずれかのアミノ酸配列によって示される。

【0038】

用語「FGFR-L融合ポリペプチド」とは、本明細書中に定義されるような、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチド、FGFR-Lポリペプチドフラグメント、FGFR-Lポリペプチドオルソログ、FGFR-Lポリペプチド改変体、またはFGFR-Lポリペプチド誘導体の、アミノ末端またはカルボキシル末端での1つ以上のアミノ酸(例えば、異種タンパク質ま

たは異種ペプチド)の融合体をいう。用語「FGFR-L融合ポリペプチド」とはまた、本明細書中に定義されるような、FGFR-Lポリペプチド対立遺伝子改変体またはFGFR-Lポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端での、1つ以上のアミノ酸の融合体をいう。

【0039】

用語「生物学的に活性なFGFR-Lポリペプチド」とは、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドの少なくとも1つの活性の特徴を有する、FGFR-Lポリペプチドをいう。さらに、FGFR-Lポリペプチドは、免疫原として活性であり得る；すなわち、このFGFR-Lポリペプチドは、抗体が惹起され得る少なくとも1つのエピトープを含む。

【0040】

用語「単離されたポリペプチド」とは、以下のような本発明のポリペプチドをいう：(1)供給源細胞から単離された場合に、共に天然に見出されるポリヌクレオチド、脂質、糖質、または他の材料の、少なくとも約50%から分離されたポリペプチド、(2)その「単離されたポリペプチド」が天然において結合されているポリペプチドの全体または一部分に(共有結合性の相互作用または非共有結合性の相互作用によって)結合されていないポリペプチド、(3)天然において結合されないポリペプチドに(共有結合性の相互作用または非共有結合性の相互作用によって)作動可能に連結されているポリペプチド、あるいは(4)天然に存在しないポリペプチド。好ましくは、この単離されたポリペプチドは、その治療用途、診断用途、予防用途または研究用途を妨害する、その天然の環境において見出されるいかなる他の夾雑ポリペプチドまたは他の夾雑物をも実質的に含まない。

【0041】

用語「同一性(identity)」は、当該分野で公知のように、2つ以上のポリペプチド分子、または2つ以上の核酸分子の配列の間にある、これらの配列を比較することによって決定される、関係をいう。当該分野では、「同一性」はまた、核酸分子またはポリペプチドの配列関連性の程度(場合によっては、2

つ以上のヌクレオチド配列または2つ以上のアミノ酸配列のストリングの間の一
致により決定され得る)を意味する。「同一性」は、特定の算術モデルまたはコ
ンピュータープログラム(すなわち、アルゴリズム)によって位置付けられた、
ギャップアライメント(もし存在するならば)を有する2つ以上の配列のうちの
短い方の間の同一適合のパーセントを測定する。

【0042】

用語「類似性(similarity)」は、関連する概念であるが、「同一
性」とは対照的に、「類似性」とは、同一適合および保存的置換適合の両方を含
む関連性の尺度をいう。2つのポリペプチド配列が、例えば、10/20の同一
のアミノ酸を有し、そして残りが全て非保存的置換であるならば、同一性パーセ
ントおよび類似性パーセントは、両方とも50%である。同じ例で、保存的置換
が存在するさらに5つの位置が存在するならば、同一性パーセントは、50%の
ままであるが、類似性パーセントは75%(15/20)である。従って、保存
的置換が存在する場合、2つのポリペプチドの間の類似性パーセントは、これら
の2つのポリペプチドの間の同一性パーセントよりも高い。

【0043】

用語「天然に存在する」または「ネイティブ」は、核酸分子、ポリペプチド、
宿主細胞などのような生物学的材料に関して使用される場合、天然に見出されか
つ人工的に操作されていない材料をいう。同様に、「天然に存在しない」または
「非ネイティブ」は、本明細書中において使用される場合、天然には見出されな
いか、または人工的に構造改変されたかもしくは合成された、材料をいう。

【0044】

用語「有効量」および「治療的に有効な量」とは、各々、本明細書中に示され
るFGFR-Lポリペプチドの1つ以上の生物学的活性の観察可能なレベルを支
持するために使用されるFGFR-LポリペプチドまたはFGFR-L核酸分子
の量をいう。

【0045】

本明細書中に使用される場合、用語「薬学的に受容可能なキャリア」または「
生理学的に受容可能なキャリア」とは、薬学的組成物としてのFGFR-Lポリ

ペプチド、FGFR-L核酸分子、またはFGFR-L選択的結合因子の送達を、達成するかまたは増強するのに適切な、1つ以上の処方材料をいう。

【0046】

用語「抗原」とは、選択的結合因子（例えば、抗体）により結合され得る分子または分子の一部であって、そしてさらに、その抗原のエピトープに結合し得る抗体を産生するために動物において用いられ得る、分子または分子の一部をいう。抗原は、1つ以上のエピトープを有し得る。

【0047】

用語「選択的結合因子」とは、FGFR-Lポリペプチドに対して特異性を有する分子（単数または複数）をいう。本明細書中にて使用される場合、用語「特異的」および「特異性」とは、ヒトFGFR-Lポリペプチドに結合するがヒト非FGFR-Lポリペプチドに結合しない、選択的結合因子の能力をいう。しかし、その選択的結合因子が、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるようなポリペプチドのオルソログ（すなわち、その種間のバージョン（例えば、マウスFGFR-LポリペプチドおよびラットFGFR-Lポリペプチド））もまた結合し得ることが、理解される。

【0048】

用語「形質導入」は、1つの細菌から別のものへの（通常、ファージによる）遺伝子の移入をいうために使用される。「形質導入」はまた、レトロウイルスによる真核生物細胞の配列の捕捉および移入をいう。

【0049】

用語「トランスフェクション」は、細胞による外来DNAまたは外因性DNAの取り込みをいうために使用される。そして、細胞は、その外因性DNAが細胞膜の内側に導入されている場合、「トランスフェクト」されている。多数のトランスフェクション技術が、当該分野で周知であり、そして、本明細書中に開示される。例えば、Grahamら、1973, *Virology* 52:456; Sambrookら、*Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davisら、*Basic Methods i*

n Molecular Biology (Elsevier, 1986); およびChura, 1981, Gene 13:197を参照のこと。このような技術は、1つ以上の外因性DNA部分を適切な宿主細胞に導入するために使用され得る。

【0050】

用語「形質転換」は、本明細書中に使用される場合、細胞の遺伝特徴における変化をいい、そして細胞は、新しいDNAを含むように改変されている場合、形質転換されている。例えば、細胞は、そのネイティブな状態から遺伝的に改変された場合、形質転換されている。トランスフェクションおよび形質導入に続いて、その形質転換DNAは、細胞の染色体へ物理的に組み込むことによってその細胞のDNAと組み換わり得るか、複製されないエピソームエレメントとして一過性に維持され得るか、またはプラスミドとして独立して複製し得る。細胞は、そのDNAが細胞の分裂と共に複製される場合、安定に形質転換されているとみなされる。

【0051】

(核酸分子および/またはポリペプチドの関連性)

関連する核酸分子が、配列番号1または配列番号4のいずれかの核酸分子の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体を含み、そして上記のヌクレオチド配列のいずれかと相補的である配列を含むことが、理解される。関連する核酸分子はまた、配列番号2または配列番号5のいずれかのポリペプチドと比較して、1つ以上のアミノ酸残基の置換、改変、付加、および/または欠失を含むかまたはこれらから本質的になる、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。このような関連するFGFR-Lポリペプチドは、例えば、1つ以上のN結合型グリコシル化部位もしくはO結合型グリコシル化部位の付加および/または欠失、あるいは1つ以上のシステイン残基の付加および/または欠失を含み得る。

【0052】

関連する核酸分子はまた、配列番号2または配列番号5のいずれかのFGFR-Lポリペプチドの、少なくとも約25個連続したアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ

酸、または約200アミノ酸、または約200個より多いアミノ酸残基のポリペプチドをコードする、FGFR-L核酸分子のフラグメントを含む。

【0053】

さらに、関連するFGFR-L核酸分子としてはまた、本明細書中に定義されるような中程度にストリンジェントな条件または高度にストリンジェントな条件下で、配列番号1または配列番号4のいずれかのFGFR-L核酸分子の完全な相補配列とか、または配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるようなアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする分子の完全な相補配列とか、または本明細書中に定義されるような核酸フラグメントの完全な相補配列とか、または本明細書中に定義されるようなポリペプチドをコードする核酸フラグメントの完全な相補配列、とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む分子が挙げられる。ハイブリダイゼーションプローブは、関連する配列に関して、cDNAライブラリー、ゲノムライブラリー、または合成DNAライブラリーをスクリーニングするために、本明細書中に提供されるFGFR-L配列を用いて調製され得る。既知の配列と有意な同一性を示すFGFR-LポリペプチドのDNA配列および/またはアミノ酸配列の領域は、本明細書中に記載されるような配列アラインメントアルゴリズムを用いて容易に決定され、そしてこれらの領域は、スクリーニングのためのプローブを設計するために使用され得る。

【0054】

用語「高度にストリンジェントな条件」は、配列が高度に相補的であるDNA鎖のハイブリダイゼーションを可能にし、そして有意にミスマッチしているDNAのハイブリダイゼーションを除外するように設計された、条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、主に、温度、イオン強度、およびホルムアミドのような変性剤の濃度によって、決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関する「高度にストリンジェントな条件」の例は、65~68での、0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムであるか、または42での、0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウム、および50%ホルムアミドである。Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning

: A Laboratory Manual (第2版、Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Andersonら、Nucleic Acid Hybridization: A Practical approach、第4章 (IRL Press Limited) を参照のこと。

【0055】

よりストリンジェントな条件 (例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミド、または他の変性剤) もまた、使用し得る - しかし、ハイブリダイゼーションの速度は、影響される。他の薬剤が、非特異的なハイブリダイゼーションおよび/またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少させる目的で、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液に含まれ得る。例は、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニル-ピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (NaDodSO_4 (SDS))、フィコール、デンハルト溶液、超音波処理されたサケ精子DNA (または別の非相補的DNA)、および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた、使用され得る。これらの添加物の濃度および型は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は、通常、pH 6.8 ~ 7.4 で実施されるが; 代表的なイオン強度条件において、ハイブリダイゼーションの速度は、ほとんどpHとは無関係である。Andersonら、Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach、第4章 (IRL Press Limited) を参照のこと。

【0056】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基の組成、長さ、および塩基対不一致の程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、これらの変数を適応させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にするように、当業者によって調整され得る。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の式によって概算され得る:

$$T_m () = 81.5 + 16.6 (\log [\text{Na}^+]) + 0.41 (\% G + C$$

) - 600 / N - 0.72 (%ホルムアミド)

ここで、Nは、形成される二重鎖の長さであり、 $[Na^+]$ は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中のナトリウムイオンのモル濃度であり、%G+Cは、ハイブリッド中の(グアニン+シトシン)塩基のパーセンテージである。不完全に一致したハイブリッドに関して、融解温度は、各1%不一致に対して約1ずつ減少する。

【0057】

用語「中程度にストリンジェントな条件」は、「高度にストリンジェントな条件」下で生じ得るよりもより大きい程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が、形成し得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジェントな条件」の例は、50~65 での、0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウムであるか、または37~50 での、0.015M 塩化ナトリウム、0.0015M クエン酸ナトリウム、および20%ホルムアミドである。例として、0.015M ナトリウムイオン中、50 の「中程度にストリンジェントな条件」は、約21%の不一致を許容する。

【0058】

「高度にストリンジェントな条件」と「中程度にストリンジェントな条件」との間に完全な区別は存在しないことが、当業者によって理解される。例えば、0.015M ナトリウムイオン(ホルムアミドなし)において、完全に一致した長いDNAの融解温度は、約71 である。65 (同じイオン強度)で洗浄する場合、これは、約6%不一致を許容する。より遠く関連する配列を捕獲するために、当業者は、単に温度を低下させ得るし、またはイオン強度を上昇させ得る。

【0059】

約20ntまでのオリゴヌクレオチドプローブについて、1M NaCl*における融解温度の適切な概算値は、以下によって提供される：

$$T_m = 1 \text{つのA-T塩基につき } 2 + 1 \text{つのG-C塩基対につき } 4$$

* 6xクエン酸ナトリウム塩(SSC)におけるナトリウムイオン濃度は、1Mである。Suggsら、Developmental Biology Usi

ng Purified Genes、683 (BrownおよびFox (編) 1981)を参照のこと。

【0060】

オリゴヌクレオチドに対して高いストリンジェンシーの洗浄条件は、通常、6×SSC、0.1%SDSにおいて、このオリゴヌクレオチドのTmの0~5下の温度である。

【0061】

別の実施形態において、関連する核酸分子は、配列番号1または配列番号4のいずれかに示されるようなヌクレオチド配列と少なくとも約70パーセント同一であるヌクレオチド配列を含むかもしくはこれからなるか、または配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドと少なくとも約70パーセント同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかもしくはこれから本質的になる。好ましい実施形態において、このヌクレオチド配列は、配列番号1または配列番号4のいずれかに示されるヌクレオチド配列と、約75パーセント、または約80パーセント、または約85パーセント、または約90パーセント、または約95パーセント、96パーセント、97パーセント、98パーセントまたは99パーセント同一であるか、あるいは、このヌクレオチド配列は、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチド配列と、約75パーセント、または約80パーセント、または約85パーセント、または約90パーセント、または約95パーセント、96パーセント、97パーセント、98パーセントまたは99パーセント同一であるポリペプチドをコードする。関連する核酸分子は、配列番号2または配列番号5のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を有するポリペプチドをコードする。

【0062】

核酸配列における差異は、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列に対するアミノ酸配列の保存的改変および/または非保存的改変を生じ得る。

【0063】

配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列に対する保存的改変(

およびコードヌクレオチドに対する対応する改変)は、FGFR-Lポリペプチドに類似した機能的特徴および化学的特徴を有するポリペプチドを生成する。対照的に、FGFR-Lポリペプチドの機能的特徴および/または化学的特徴における実質的な改変は、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列において置換を選択することによって達成され得、これらの置換は、(a)置換領域における分子骨格の構造(例えば、シートコンフォメーションまたはらせんコンフォメーション)、(b)標的部位における分子の電荷または疎水性、あるいは(c)側鎖の大きさを、維持することに対するその影響において有意に異なる。

【0064】

例えば、「保存的アミノ酸置換」は、その位置におけるアミノ酸残基の極性または電荷にほとんど影響がないかまたは全く影響がないような、ネイティブなアミノ酸残基の非ネイティブな残基による置換を含み得る。さらに、ポリペプチド中の任意のネイティブな残基はまた、「アラニンスキャニング変異誘発」に関して以前に記載されたように、アラニンで置換され得る。

【0065】

保存的アミノ酸置換はまた、天然に存在しないアミノ酸残基を含み、これらの残基は、生物系における合成によるよりむしろ化学的ペプチド合成によって代表的に組み込まれる。これらは、ペプチド模倣物、およびアミノ酸部分の他の逆転形態または反転形態を含む。

【0066】

天然に存在する残基は、共通の側鎖の特性に基づいてクラスに分けられ得る：

- 1) 疎水性：N l r、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e；
- 2) 中性親水性：C y s、S e r、T h r；
- 3) 酸性：A s p、G l u；
- 4) 塩基性：A s n、G l n、H i s、L y s、A r g；
- 5) 鎖の方向に影響を与える残基：G l y、P r o；および
- 6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

【0067】

例えば、非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを、別のクラス由来のメンバーへと交換することを含み得る。このような置換された残基は、非ヒトFGFR-Lポリペプチドと相同性であるヒトFGFR-Lポリペプチドの領域、またはこの分子の非相同性領域に、導入され得る。

【0068】

このような変更を作製する場合、アミノ酸のハイドロパシー指標が、考慮され得る。各アミノ酸は、その疎水性特徴および荷電特徴に基づいてハイドロパシー指標が割り当てられている。これらのハイドロパシー指標は、イソロイシン(+4.5); バリン(+4.2); ロイシン(+3.8); フェニルアラニン(+2.8); システイン/シスチン(+2.5); メチオニン(+1.9); アラニン(+1.8); グリシン(-0.4); スレオニン(-0.7); セリン(-0.8); トリプトファン(-0.9); チロシン(-1.3); プロリン(-1.6); ヒスチジン(-3.2); グルタミン酸(-3.5); グルタミン(-3.5); アスパラギン酸(-3.5); アスパラギン(-3.5); リジン(-3.9)およびアルギニン(-4.5)である。

【0069】

タンパク質に対して相互作用的な生物学的機能を付与することにおけるハイドロパシーアミノ酸指標の重要性は、当該分野において一般的に理解されている(Kyteら、1982, J. Mol. Biol. 157:105-31)。特定のアミノ酸が類似のハイドロパシー指標またはハイドロパシースコアを有する他のアミノ酸に代わって置換され得、そして依然として類似の生物学的活性を維持し得ることが、公知である。ハイドロパシー指標に基づいて変化を起こす際に、ハイドロパシー指標が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 ± 1 以内であるものが特に好ましく、そして ± 0.5 以内であるものが、なおより特に好ましい。

【0070】

類似のアミノ酸の置換が親水性に基づいて効果的になされ得る(特に、これによって作製された生物学的機能的に等価なタンパク質またはペプチドが、この場合においてと同様に、免疫学的実施形態における使用に関して考慮される場合)

こともまた、当該分野において理解されている。その隣接するアミノ酸の親水性によって支配される、タンパク質の最も大きな局所的平均親水性は、その免疫原性および抗原性に、すなわち、そのタンパク質の生物学的特性に、相関する。

【0071】

以下の親水性の値が、これらのアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン (+3.0)；リジン (+3.0)；アスパラギン酸 (+3.0 ± 1)；グルタミン酸 (+3.0 ± 1)；セリン (+0.3)；アスパラギン (+0.2)；グルタミン (+0.2)；グリシン (0)；スレオニン (-0.4)；プロリン (-0.5 ± 1)；アラニン (-0.5)；ヒスチジン (-0.5)；システイン (-1.0)；メチオニン (-1.3)；バリン (-1.5)；ロイシン (-1.8)；イソロイシン (-1.8)；チロシン (-2.3)；フェニルアラニン (-2.5)；およびトリプトファン (-3.4)。類似の親水性の値に基づいて変化を行う際に、親水性値が ± 2 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、± 1 以内であるものが特に好ましく、そして ± 0.5 以内であるものが、なおより特に好ましい。一次アミノ酸配列から、エピトープを、親水性に基づいて同定もし得る。これらの領域はまた、「エピトープコア領域」とも呼ばれる。

【0072】

所望のアミノ酸置換（保存的であれ非保存的であれ）は、当業者によって、そのような置換が所望される時点で決定され得る。例えば、アミノ酸置換を使用して、FGFR-Lポリペプチドの重要な残基を同定し得るし、または本明細書中に記載されるFGFR-Lポリペプチドの親和性を増加もしくは減少させ得る。例示的なアミノ酸置換は、表Iに記載される。

【0073】

(表1)

(アミノ酸置換)

【0074】

【表1】

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4ジフェニルアミン誘導体, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Tyr	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

当業者は、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドの適切な改変体を、周知の技術を使用して、決定し得る。生物学的活性を破壊することなく変化され得る分子の適切な領域を同定するために、当業者は、活性のために重要であるとは考えられない領域を標的化し得る。例えば、同じ種由来かまたは他の種由来の、類似の活性を有する類似のポリペプチドが既知である場合には、当業者は、FGFR-Lポリペプチドのアミノ酸配列を、このような類似のポリペプチドと比較し得る。このような比較を用いて、類似のポリペプチド間で保存される分子の残基および部分を同定し得る。このような類似のポリペプチドに対して保存されていない、FGFR-L分子の領域における変化が、FGFR-Lポリペプチドの生物学的活性および/または構造に不利に影響を与える可能性はさほどないことが、理解される。当業者はまた、比較的保存された領域においてさえ、活性を維持しながら、天然に存在する残基を化学的に類似するアミノ酸に置換し得ることを知っている（保存的アミノ酸残基置換）。従って、生物学的活性または構造のために重要であり得る領域でさえ、生物学的活性を破壊するこ

となく、またはポリペプチド構造に不利に影響を与えることなく、保存的アミノ酸置換に供され得る。

【0075】

さらに、当業者は、活性または構造のために重要である、類似のポリペプチドにおける残基を同定する、構造 - 機能研究を再調査し得る。このような比較を考慮して、類似のポリペプチドにおける活性または構造のために重要なアミノ酸残基に対応するFGFR - Lポリペプチドにおける、アミノ酸残基の重要性を予測し得る。当業者は、FGFR - Lポリペプチドのこのような予測された重要なアミノ酸残基に代わる化学的に類似するアミノ酸での置換を、選択し得る。

【0076】

当業者はまた、類似のポリペプチドにおける三次元構造、およびその構造に関連するアミノ酸配列を分析し得る。このような情報を考慮して、当業者は、FGFR - Lポリペプチドのアミノ酸残基のアライメントを、その三次元構造に関して予測し得る。当業者は、そのタンパク質の表面上に存在すると予測されるアミノ酸残基に対する急激な変化を起こさないように、選択し得る。なぜなら、このような残基は、他の分子との重要な相互作用に関与し得るからである。さらに、当業者は、単一のアミノ酸置換を各アミノ酸残基に含む、試験改変体を生成し得る。これらの改変体は、当業者に公知の活性アッセイを使用して、スクリーニングされ得る。このような改変体は、適切な改変体に関する情報を集めるために使用され得る。例えば、特定のアミノ酸残基に対する変化が、破壊された活性、望ましくなく減少した活性、または適切でない活性を生じたことを発見した場合には、このような変化を有する改変体は、回避される。換言すれば、このような慣用的な実験から集めた情報に基づいて、当業者は、さらなる置換が、単独でかまたは他の変異と組み合わせてかのいずれかで回避されるべきであるアミノ酸を、容易に決定し得る。

【0077】

多数の科学刊行物が、二次構造の推定に充てられてきた。Moult, 1996, Curr. Opin. Biotechnol. 7: 422 - 27; Chouら、1974, Biochemistry 13: 222 - 45; Chouら、

1974, *Biochemistry* 113:211-22; Chouら、1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-48; Chouら、1978, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276; および Chouら、1979, *Biophys. J.* 26:367-84を参照のこと。さらに、コンピュータプログラムが、二次構造の予測を補助するために現在利用可能である。二次構造を推測する1つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、30%よりも大きい配列同一性、または40%よりも大きい配列類似性を有する、2つのポリペプチドまたはタンパク質は、しばしば、類似した構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース(PDB)の近年の成長により、二次構造の推測可能性(ポリペプチド構造またはタンパク質構造内の潜在的な折り畳みの数を含む)の促進がもたらされた。Holmら、*Nucleic Acids Res.* 1999、27:244-47を参照のこと。所定のポリペプチドもしくはタンパク質において限定された数の折り畳みが存在すること、および一旦臨界数の構造が決定されると、構造予測が劇的により正確になること、が示唆されている(Brennerら、1997、*Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:369-76)。

【0078】

二次構造を推定するさらなる方法は、「スレッディング(threading)」(Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-87; Sipplら、1996, *Structure* 4:15-19)、「プロフィール分析」(Bowieら、1991, *Science*, 253:164-70; Gribskovら、1990, *Methods Enzymol.* 183:146-59; Gribskovら、1987, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 84:4355-58)、および「進化学的連鎖」(Holmら、前出、およびBrennerら、前出を参照のこと)を包含する。

【0079】

好ましいFGFR-Lポリペプチド改変体としては、グリコシル化部位の数および/または型が配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列

と比較して変化している、グリコシル化改変体が挙げられる。1つの実施形態において、FGFR-Lポリペプチド改変体は、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列より多いかまたはより少ない数のN結合グリコシル化部位を含む。N結合グリコシル化部位は、配列Asn-X-SerまたはAsn-X-Thrによって特徴付けられ、ここで、Xと印されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N結合型糖鎖の付加のための潜在的な新たな部位を提供する。あるいは、この配列を排除する置換は、存在するN結合型糖鎖を除去する。1つ以上のN結合グリコシル化部位（代表的には、天然に存在するグリコシル化部位）が排除され、そして1つ以上の新たなN結合部位が作製される、N結合型糖鎖の再配列もまた、提供される。さらなる好ましいFGFR-L改変体としては、1つ以上のシステイン残基が、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列と比較して欠失しているか、または別のアミノ酸（例えば、セリン）で置換されている、システイン改変体が挙げられる。システイン改変体は、FGFR-Lポリペプチドが、例えば不溶性の封入体の単離の後に、生物学的に活性な立体構造へとリフォールディングされなければならない場合に、有用である。システイン改変体は、一般に、ネイティブタンパク質より少ないシステイン残基を有し、そして代表的には偶数のシステイン残基を有し、対合していないシステインから生じる相互作用を最小にする。

【0080】

他の実施形態において、関連する核酸分子は、少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかまたはこの配列からなり、そしてこのポリペプチドが配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有するか、あるいはこの関連する核酸分子は、少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかまたはこの配列からなり、ここでこのポリペプチドが配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する。関連する核酸分子はまた、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポ

リペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかまたはこの配列からなり、このポリペプチドがカルボキシル末端および/またはアミノ末端の短縮を有し、そしてさらにこのポリペプチドが、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する。関連する核酸分子はまた、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、カルボキシル末端短縮、およびアミノ末端短縮からなる群より選択される少なくとも1つの改変を含む、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかまたはこの配列からなり、そしてポリペプチドが配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する。

【0081】

さらに、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドあるいは他のFGFR-Lポリペプチドは、同種ポリペプチドに融合されてホモダイマーを形成し得るか、あるいは異種ポリペプチドに融合されてヘテロダイマーを形成し得る。異種のペプチドおよびポリペプチドとしては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：FGFR-L融合ポリペプチドの検出および/または単離を可能にするエピトープ；膜貫通レセプタータンパク質またはその部分（例えば、細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン）；膜貫通レセプタータンパク質に結合する、リガンドまたはその部分；触媒的に活性である、酵素またはその部分；オリゴマー化を促進するポリペプチドまたはペプチド（例えば、ロイシンジッパードメイン）；安定性を増加させるポリペプチドまたはペプチド（例えば、免疫グロブリン定常領域）；ならびに配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドあるいは他のFGFR-Lポリペプチドとは異なる治療活性を有する、ポリペプチド。

【0082】

融合は、配列番号2または配列番号5のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他のIL1ra-Rポリペプチドの、アミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、なされ得る。融合は、リンカーもアダプター分子も用いずに直接であっても、リンカーもしくはアダプター分子を介してであってもよい。リンカーまたはアダプター分子は、1つ以上のアミノ酸残基で

あり得、代表的に、約20～約50アミノ酸残基であり得る。リンカーまたはアダプター分子はまた、融合した部分の分離を可能にするために、DNA制限エンドヌクレアーゼまたはプロテアーゼについての切断部位を有して設計され得る。一旦構築されると、融合ポリペプチドは、本明細書中に記載の方法に従って誘導体化され得ることが、理解される。

【0083】

本発明のさらなる実施形態において、配列番号2または配列番号5のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他のFGFR-Lポリペプチドは、ヒトIgGのFc領域の1つ以上のドメインに融合される。抗体は、以下の2つの機能的に独立した部分を含む；抗原を結合する「Fab」として公知の変域ドメイン、ならびに補体活性化および食作用細胞による攻撃のようなエフェクター機能に關与する、「Fc」として公知の定常ドメイン。Fcは、長い血清半減期を有し、一方でFabは、短寿命である。Caponら、1989, Nature 337:525-31。治療タンパク質と一緒に構築される場合には、Fcドメインは、より長い半減期を提供し得るか、またはFcレセプター結合、プロテインA結合、補体結合のような機能、および恐らく、胎盤移入のような機能さえも、組み込み得る(同書)。表IIは、当該分野において公知の特定のFc融合物の使用を要約する。

(表2)

(治療タンパク質とのFc融合物)

【0084】

【表2】

Fcの形態	融合パートナー	治療関連	参考文献
IgG1	CD30-LのN末端	ホジキン病；未分化リンパ腫；T細胞白血病	米国特許第5,480,981号
マウスFcγ2a	IL-10	抗炎症；移植拒絶	Zhengら, 1995, J. Immunol. 154:5590~600
IgG1	TNFレセプター	敗血症性ショック	Fisherら, 1996, N. Engl. J. Med. 334:1697~1702; Van Zeeら, 1996, J. Immunol. 156:2221~30
IgG、IgA、IgM、またはIgE（最初のドメインを除く）	TNFレセプター	炎症、自己免疫疾患	米国特許第5,808,029号
IgG1	CD4レセプター	AIDS	Caponら, 1989, Nature 337:525~31
IgG1、IgG3	IL-2のN末端	抗癌、抗ウイルス	Harvillら, 1995, Immunotech, 1:95~105
IgG1	OPGのC末端	変形性関節症；骨密度	WO 97/23614
IgG1	レプチンのN末端	抗肥満	PCT/US 97/23183 (1997年12月11日出願)
ヒトIgCγ1	CTLA-4	自己免疫疾患	Linsey, 1991, J. Exp. Med. 174:561~69

一例において、ヒトIgGのヒンジ領域、CH2領域、およびCH3領域が、当業者に公知の方法を使用して、FGFR-Lポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、融合され得る。別の例において、ヒトIgGのヒンジ領域、CH2領域、およびCH3領域は、FGFR-Lポリペプチドフラグメント（例えば、FGFR-Lポリペプチドの推定細胞外部分）のアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、融合され得る。

【0085】

得られるFGFR-L融合ポリペプチドは、プロテインAアフィニティーカラムの使用によって、精製され得る。Fc領域に融合したペプチドおよびタンパク質は、融合していない対応物より実質的に長いインビボでの半減期を示すことが

見出された。また、Fc領域への融合は、融合ポリペプチドの二量体化/多量体化を可能にする。このFc領域は、天然に存在するFc領域であってもよいし、または治療品質、循環時間、もしくは減少した凝集のような、特定の品質を改善するよう変更されてもよい。

【0086】

関連する核酸分子およびポリペプチドの同一性および類似性は、公知の方法によって容易に計算され得る。このような方法としては、Computational Molecular Biology (A.M. Lesk編、Oxford University Press 1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (D. W. Smith編、Academic Press 1993); Computer Analysis of Sequence Data (Part 1, A.M. GriffinおよびH.G. Griffin編、Humana Press 1994); G. von Heinle, Sequence Analysis in Molecular Biology (Academic Press 1987); Sequence Analysis Primer (M. GribskovおよびJ. Devereux編、M. Stockton Press 1991); ならびにCarilloら、1988, SIAM J. Applied Math., 48:1073に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0087】

同一性および/または類似性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間での最大の適合を生じるように、設計される。同一性および類似性を決定するための方法は、公に利用可能なコンピュータプログラムにおいて記載されている。2つの配列間の同一性および類似性を決定するための好ましいコンピュータプログラム方法としては、GCGプログラムパッケージ (GAP (Devereuxら、1984, Nucleic Acids Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)、BLASTP、BLASTN、

およびFASTA (Altschulら、1990, J. Mol. Biol. 215:403-10)を含む)が挙げられるが、これらに限定されない。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI)および他の供給源 (Altschulら、BLAST Manual (NCB NLM NIH, Bethesda, MD); Altschulら、1990、前出)から公に利用可能である。周知のSmith Watermanアルゴリズムもまた、同一性を決定するために使用され得る。

【0088】

2つのアミノ酸配列を整列させるための特定のアライメントスキームは、これら2つの配列の短い領域のみの適合を生じ得、そしてこの小さな整列領域は、その2つの全長配列間に有意な関連がない場合でさえも、非常に高い配列同一性を有し得る。従って、好ましい実施形態において、選択されたアライメント方法 (GAPプログラム)は、本願ポリペプチドのうちの少なくとも50個連続するアミノ酸にわたる整列を生じる。

【0089】

例えば、コンピュータアルゴリズムGAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)を使用して、配列同一性の百分率が決定されるべき2つのポリペプチドが、それらのそれぞれのアミノ酸の最適な適合 (このアルゴリズムによって決定される「適合したスパン」)のために、整列される。ギャップオープニングペナルティ (gap opening penalty) (これは、平均対角の3倍として計算される:「平均対角」とは、使用される比較行列 (comparison matrix)の対角の平均である;「対角」とは、特定の比較行列によって各完全なアミノ酸適合に対して割り当てられたスコアまたは数である)およびギャップエクステンションペナルティ (gap extension penalty) (これは通常、ギャップオープニングペナルティの0.1倍である)、ならびにPAM 250またはBLOSUM 62のような比較行列が、このアルゴリズムと組み合わせて使用される。標準的な比較行列もま

た、このアルゴリズムによって使用される (Dayhoffら、5 Atlas of Protein Sequence and Structure (補遺3 1978) (PAM250比較行列); Henikoffら、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19 (BLOSUM 62比較行列) を参照のこと)。

【0090】

ポリペプチド配列比較のための好ましいパラメータとしては、以下が挙げられる：

アルゴリズム：NeedlemanおよびWunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-53;

比較行列：BLOSUM 62 (Henikoffら、前出)；

ギャップペナルティ：12

ギャップ長さペナルティ (Gap Length Penalty)：4

類似性の閾値 (Threshold of Similarity)：0

このGAPプログラムは、上記パラメータを用いて有用である。上記パラメータは、GAPアルゴリズムを用いるポリペプチド比較 (末端ギャップに対してはペナルティがないこととともに) のためのデフォルトパラメータである。

【0091】

核酸分子配列比較のための好ましいパラメータとしては、以下が挙げられる：

アルゴリズム：NeedlemanおよびWunsch, 前出；

比較行列：適合 = +10, 非適合 = 0

ギャップペナルティ：50

ギャップ長さペナルティ：3

このGAPプログラムはまた、上記パラメータを用いて有用である。上記パラメータは、核酸分子比較のためのデフォルトパラメータである。

【0092】

Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997に記載されるものを含む、他の例示的なアルゴリズム、ギャップオープニングペナルティ、ギャップエクステ

ンションペナルティー、比較行列、および類似性の閾値が使用され得る。なされるべき特定の選択は、当業者に明らかであり、そしてなされるべき特定の比較（例えば、DNA対DNA、タンパク質対タンパク質、タンパク質対DNA）；ならびにさらに、その比較が所定の配列対の間（この場合には、GAPまたはBest Fitが一般的に好ましい）であるか、1つの配列と大きな配列データベースとの間（この場合には、FASTAまたはBLASTAが好ましい）であるかに、依存する。

【0093】

（核酸分子）

FGFR-Lポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子は、種々の様式（化学合成、cDNAもしくはゲノムのライブラリーのスクリーニング、発現ライブラリースクリーニング、および/またはcDNAのPCR増幅が挙げられるが、これらに限定されない）で容易に得られ得る。

【0094】

本明細書中において使用される組換えDNA法は、一般に、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) および/または Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994) に記載されている方法である。本発明は、本明細書中に記載されているような核酸分子、およびこのような分子を得るための方法を提供する。

【0095】

FGFR-Lポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子が1つの種から同定された場合には、この遺伝子の全てまたは一部を、オルソログ (ortholog) または同じ種由来の関連遺伝子を同定するためのプローブとして使用し得る。このプローブまたはプライマーを使用して、FGFR-Lポリペプチドを発現すると考えられる種々の組織供給源由来のcDNAライブラリーをスクリーニングし得る。さらに、配列番号1または配列番号4のいずれかに記載されるよ

うな配列を有する核酸分子の部分または全てを使用して、ゲノムライブラリーをスクリーニングし、FGFR-Lポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子を同定および単離し得る。代表的に、中程度または高度のストリンジェンシーの条件が、スクリーニングのために使用されて、このスクリーニングから得られる偽陽性の数を最少にする。

【0096】

FGFR-Lポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子はまた、発現されたタンパク質の特性に基づく陽性クローンの検出を使用する発現クローニングによって、同定され得る。代表的に、核酸ライブラリーは、抗体または他の結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）を、宿主細胞表面において発現および提示されたクローンタンパク質に結合させることによって、スクリーニングされる。抗体または結合パートナーは、所望のクローンを発現する細胞を同定するために、検出可能な標識で改変される。

【0097】

以下に記載される説明に従い実施される組換え発現技術に従って、これらのポリヌクレオチドを産生し得、そしてコードされたポリペプチドを発現させ得る。例えば、FGFR-Lポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を適切なベクターに挿入することによって、当業者は、多量の所望されるヌクレオチド配列を容易に生成し得る。次いで、これらの配列を使用して、検出プローブまたは増幅プライマーを生成し得る。あるいは、FGFR-Lポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを、発現ベクターに挿入し得る。発現ベクターを適切な宿主に導入することによって、コードされたFGFR-Lポリペプチドが、多量に生成され得る。

【0098】

適切な核酸配列を得るための別の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。この方法において、cDNAは、酵素トランスクリプターゼを使用して、ポリ(A)+RNAまたは全RNAから調製される。次いで、2つのプライマー（代表的には、FGFR-Lポリペプチドのアミノ酸配列をコードするcDNAの2つの別個の領域に対して相補的である）が、Taqポリメラーゼのようなポ

リメラーゼとともにこのcDNAに添加され、そしてこのポリメラーゼが、このcDNAにおけるこれら2つのプライマー間の領域を増幅する。

【0099】

FGFR-Lポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を調製する別の手段は、Engelsら、1989, *Angew. Chem. Intl.* 第28版: 716-34によって記載されるような、当業者に周知の方法を使用する、化学合成である。これらの方法としては、とりわけ、核酸合成のためのホスホトリエステル、ホスホルアミダイト、およびH-ホスホネート方法が挙げられる。このような化学合成のために好ましい方法は、標準的なホスホルアミダイト化学を使用する、ポリマーにより支持される合成である。代表的に、FGFR-Lポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、数百ヌクレオチド長である。約100ヌクレオチドより長い核酸は、これらの方法を使用して、いくつかのフラグメントとして合成され得る。次いで、これらのフラグメントと一緒に連結されて、FGFR-L遺伝子の全長ヌクレオチド配列を形成し得る。通常、このポリペプチドのアミノ末端をコードするDNAフラグメントは、ATG（これは、メチオニン残基をコードする）を有する。このメチオニンは、宿主細胞において産生されるポリペプチドがその細胞から分泌されるよう設計されているか否かに依存して、FGFR-Lポリペプチドの成熟形態で存在してもそうでなくてもよい。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

【0100】

特定の実施形態において、核酸改変体は、所定の宿主細胞におけるFGFR-Lポリペプチドの最適な発現のために変更されたコドンを含む。特定のコドン変更は、発現のために選択される宿主細胞およびFGFR-Lポリペプチドに依存する。このような「コドン最適化」は、種々の方法によって（例えば、所定の宿主細胞において高度に発現される遺伝子において使用されるのに好ましいコドンを選択することによって）実施され得る。高度に発現された細菌遺伝子のコドン優先度(codon preference)についての「Eco_high.Cod」のようなコドン頻度表を組み込むコンピュータアルゴリズムが使用され得、そしてUniversity of Wisconsin Package

Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI) によって提供される。他の有用なコドン頻度表としては、「Celegans_high.cod」、「Celegans_low.cod」、「Drosophila_high.cod」、「Human_high.cod」、「Maize_high.cod」、および「Yeast_high.cod」が挙げられる。

【0101】

いくつかの場合において、FGFR-Lポリペプチド改変体をコードする核酸分子を調製することが所望され得る。改変体をコードする核酸分子は、プライマーが所望の点変異を有する部位特異的変異誘発、PCR増幅、または他の適切な方法を使用して生成され得る（変異誘発技術の説明に関しては、Sambrookら、前出、およびAusubelら、前出を参照のこと）。Engelsら、前出によって記載される方法を使用する化学合成もまた、このような改変体を調製するために使用され得る。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

【0102】

（ベクターおよび宿主細胞）

FGFR-Lポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を、標準的な連結技術を使用して適切な発現ベクターに挿入する。ベクターは、代表的に、使用される特定の宿主細胞において機能的であるように選択される（すなわち、ベクターは、遺伝子の増幅および/または遺伝子の発現が生じ得るように、宿主細胞機構と適合性である）。FGFR-Lポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、原核生物宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫（バキュロウイルス系）宿主細胞および/または真核生物宿主細胞において増幅/発現され得る。宿主細胞の選択は、FGFR-Lポリペプチドが翻訳後修飾（例えば、グリコシル化および/またはホスホリル化）されるか否かに一部依存する。その場合、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、または哺乳動物宿主細胞が好ましい。発現ベクターの総説について、Meth.Enz., 第185巻(D.V.Goeddel編, Academic Press 1990)を参照のこと。

【0103】

代表的に、任意の宿主細胞に使用される発現ベクターは、プラスミド維持のための配列ならびに外来性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のための配列を含む。このような配列（集合的に、「隣接配列」という）は、特定の実施形態において、代表的に、以下のヌクレオチド配列の1つ以上を含む：プロモーター、1つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナーおよびアクセプタースプライス部位を含む完全なイントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、ならびに選択可能マーカーエレメント。これらの配列のそれぞれが、以下に議論される。

【0104】

必要に応じて、ベクターは、「タグ」コード配列（すなわち、FGFR-Lポリペプチドコード配列の5'末端または3'末端に配置されるオリゴヌクレオチド分子）を含み得；このオリゴヌクレオチド配列は、ポリHis（例えば、ヘキサHis）、または別の「タグ」（例えば、FLAG、HA（赤血球凝集素インフルエンザウイルス）またはmyc（これに対して、市販の抗体が存在する）をコードする。このタグは、代表的には、ポリペプチドの発現の際にポリペプチドに融合され、宿主細胞からの、FGFR-Lポリペプチドのアフィニティー精製のための手段として役立ち得る。アフィニティー精製は、例えば、アフィニティーマトリクスとして、タグに対する抗体を使用するカラムクロマトグラフィーによって達成され得る。必要に応じて、タグは、引き続いて、切断のために特定のペプチダーゼを使用するような、種々の手段によって、精製されたFGFR-Lポリペプチドから除去され得る。

【0105】

隣接配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種および/または株由来）であり得るか、異種（すなわち、宿主細胞種または株以外の種由来）であり得るか、ハイブリッド（すなわち、1つより多くの供給源由来の隣接配列の組み合わせ）であり得るか、または合成であり得るか、あるいは隣接配列は、FGFR-Lポリペプチド発現を調節するために通常機能するネイティブな配列であり得る。こ

のように、隣接配列の供給源は、任意の原核生物または真核生物、任意の脊椎生物または無脊椎生物、または任意の植物であり得るが但し、隣接配列は、この宿主細胞の機構において機能的であり、そしてこの宿主細胞の機構によって活性化され得る。

【0106】

本発明のベクターに有用な隣接配列は、当該分野において周知である任意のいくつかの方法によって得られ得る。代表的には、FGFR-L遺伝子の隣接配列以外の、本発明で有用な隣接配列は、マッピングおよび/または制限エンドヌクレアーゼ消化によって以前に同定されており、従って、適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して、適切な組織供給源から単離され得る。いくつかの場合において、隣接配列の全長ヌクレオチド配列は公知であり得る。ここで、隣接配列は、核酸合成またはクローニングのために本明細書中で記載される方法を使用して合成され得る。

【0107】

隣接配列の全てまたは一部のみが公知である場合、これは、PCRを使用して、および/または適切なオリゴヌクレオチドおよび/または同種もしくは別の種由来の隣接配列フラグメントを用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得られ得る。隣接配列が公知ではない場合、隣接配列を含むDNAのフラグメントは、例えば、コード配列または別の遺伝子さえも含み得る大きなDNA片から単離され得る。単離は、適切なDNAフラグメントを生成するための制限エンドヌクレアーゼ消化、続くアガロースゲル精製を使用する単離、Qiagen（登録商標）カラムクロマトグラフィー（Chatsworth, CA）、または当業者に公知の他の方法によって達成され得る。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者に容易に明らかである。

【0108】

複製起点は、代表的に、市販から購入された原核生物発現ベクターの一部であり、この起点は、宿主細胞におけるベクターの増幅を補助する。特定のコピー数までのベクターの増幅は、いくつかの場合において、FGFR-Lポリペプチドの最適な発現のために重要であり得る。選択されたベクターが複製起点部位を含

まない場合、複製起点は、既知の配列に基づいて化学的に合成され得、そしてベクターに連結され得る。例えば、プラスミド pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) からの複製起点は、大部分のグラム陰性細菌に適切であり、そして種々の起源 (例えば、SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、または HPV もしくは BPV のようなパピローマウイルス) は、哺乳動物細胞におけるベクターのクローニングのために有用である。一般的に、複製起点の成分は、哺乳動物発現ベクターには必要ない (例えば、SV40 起源は、それが初期プロモーターを含むという理由のみによって、しばしば使用されている)。

【0109】

転写終結配列は、代表的にポリペプチドコード領域の 3' 末端に配置され、そして転写を終結させるのに役立つ。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、G-C リッチフラグメントと、続くポリ-T 配列である。この配列はライブラリーから容易にクローン化されるか、またはベクターの一部としての市販からの購入ですらあるが、これはまた、本明細書中に記載された核酸合成のための方法を使用して容易に合成され得る。

【0110】

選択マーカー遺伝子エレメントは、選択培養培地において増殖される宿主細胞の生存および増殖に必要なタンパク質をコードする。代表的な選択マーカー遺伝子は、(a) 原核生物宿主細胞に対して、抗生物質または他の毒素 (例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、またはカナマイシン) に対する耐性を与えるか；(b) 細胞の栄養要求性の欠損を補うか；あるいは、(c) 複合培地から入手可能でない重要な栄養素を供給する、タンパク質をコードする。好ましい選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、およびテトラサイクリン耐性遺伝子である。ネオマイシン耐性遺伝子もまた、原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞における選択のために使用され得る。

【0111】

他の選択遺伝子は、発現される遺伝子を増幅するために使用され得る。増幅は、増殖に重要なタンパク質の産生のために大いに要求されている遺伝子が、組換

え細胞の継続世代の染色体内でタンデムに反復されているプロセスである。哺乳動物細胞に対する適切な選択マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) およびチミジンキナーゼが挙げられる。哺乳動物細胞の形質転換体は、選択圧下に置かれ、ここで、形質転換体のみが固有に、ベクターに存在する選択遺伝子によって生存するように適応される。選択圧を、培地中の選択因子の濃度を連続的に変化させ、それによって選択遺伝子とFGFR-LポリペプチドをコードするDNAとの両方の増幅を導く条件下で、形質転換された細胞を培養することによって課される。結果として、増加した量のFGFR-Lポリペプチドが、増幅されたDNAから合成される。

【0112】

リボソーム結合部位は、通常、mRNAの翻訳開始に必要であり、そしてShine-Dalgarno配列(原核生物)またはKozak配列(真核生物)によって特徴付けられる。このエレメントは、代表的に、発現されるFGFR-Lポリペプチドのプロモーターに対して3'側およびコード配列に対して5'側に配置される。Shine-Dalgarno配列は、可変であるが、代表的には、ポリプリン(すなわち、高いA-G含有量を有する)である。多くのShine-Dalgarno配列は、同定されており、それぞれが、本明細書中に記載の方法を使用して、容易に合成され得、原核生物ベクターにおいて使用され得る。

【0113】

リーダー配列、またはシグナル配列は、宿主細胞からFGFR-Lポリペプチドを指向させるために使用され得る。代表的には、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列は、FGFR-L核酸分子のコード領域に位置するか、または直接FGFR-Lポリペプチドコード領域の5'側に位置する。多くのシグナル配列が同定されており、選択された宿主細胞において機能的である任意のシグナル配列が、FGFR-L核酸分子と組み合わせて使用され得る。従って、シグナル配列は、FGFR-L核酸分子に対して同種(天然に存在する)または異種であり得る。さらに、シグナル配列は、本明細書中に記載される方法を使用して化学的に合成され得る。大半の場合、シグナルペプチドの存在による宿主細胞からの

F G F R - L ポリペプチドの分泌は、分泌された F G F R - L ポリペプチドからのシグナルペプチドの除去を生じる。シグナル配列は、ベクターの成分であり得るか、またはベクターに挿入された F G F R - L 核酸分子の一部であり得る。

【0114】

F G F R - L ポリペプチドコード領域に結合されたネイティブな F G F R - L ポリペプチドシグナル配列をコードするヌクレオチド配列、または、F G F R - L ポリペプチドコード領域に結合された異種シグナル配列をコードするヌクレオチド配列のいずれかの使用は本発明の範囲内である。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、プロセスされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものであるべきである。ネイティブな F G F R - L ポリペプチドシグナル配列を認識せず、そしてプロセスもしない原核生物宿主細胞について、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、または熱安定エンテロトキシン I I リーダーの群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。酵母分泌のために、ネイティブな F G F R - L ポリペプチドシグナル配列は、酵母インベルターゼ、因子、または酸ホスファターゼリーダーによって置換され得る。哺乳動物細胞発現において、ネイティブなシグナル配列で十分であるが、他の哺乳動物シグナル配列が適切であり得る。

【0115】

真核生物宿主細胞発現系においてグリコシル化が所望されるような、いくつかの場合において、グリコシル化または収量を改善するために種々のプレ配列（*pre sequence*）が操作され得る。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更し得るかまたはプロ配列（*pro - sequence*）を加え得、これはまた、グリコシル化に影響し得る。最終タンパク質産物は、1位に（成熟タンパク質の最初のアミノ酸と相対的に）、発現に付随する1つ以上のさらなるアミノ酸を有し得、これは、完全には除去されない可能性がある。例えば、最終のタンパク質産物は、アミノ末端に結合される、ペプチダーゼ切断部位において見出される1つまたは2つのアミノ酸残基を有し得る。あるいは、いくつかの酵素切断部位の使用は、酵素が成熟ポリペプチド内のこのような領域で切断する場合に所望の F G F R - L ポリペプチドのわずかに短縮された（*tr*

uncate)形態を生じ得る。

【0116】

多くの場合において、核酸分子の転写は、ベクター内の1つ以上のイントロンの存在によって増加する；これは、ポリペプチドが真核生物宿主細胞（特に、哺乳動物宿主細胞）において産生される場合に特に当てはまる。使用されるイントロンは、特に使用される遺伝子が全長ゲノム配列またはそのフラグメントである場合にFGFR-L遺伝子内に天然に存在するものであり得る。イントロンが遺伝子内に天然に存在しない場合（大部分のcDNAについて）、イントロンは、別の供給源から得られ得る。隣接配列およびFGFR-L遺伝子に対してイントロンの位置は、イントロンが有効に転写されなければならないので、一般的に重要である。従って、FGFR-L cDNA分子が転写される場合、イントロンの好ましい位置は、転写開始部位に対して3'側であり、かつポリ-A転写終止配列に対して5'側である。好ましくは、イントロンは、コード配列を妨害しないように、cDNAの1つの側または他の側（すなわち、5'側または3'側）に配置される。任意の供給源（ウイルス、原核生物および真核生物（植物または動物）を含む）由来のイントロンを使用して本発明を実行し得るが、但し、このイントロンは、挿入される宿主細胞に適合性である。合成イントロンもまたここに含まれる。必要に応じて、1つより多くのイントロンがベクター内で使用され得る。

【0117】

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、代表的には、宿主生物によって認識され、FGFR-Lポリペプチドをコードする分子に作動可能に連結されたプロモーターを含む。プロモーターは、構造遺伝子の転写を制御する構造遺伝子（一般的に、約100~1000bp）の開始コドンに対して上流（すなわち、5'側）に配置される非転写配列である。プロモーターは、従来、2つのクラス（誘導プロモーターおよび構成プロモーター）のうちの1つにグループ化されている。誘導プロモーターは、培養条件におけるいくつかの変化（例えば、栄養素の存在または非存在、あるいは温度の変化）に応答して、それらの制御下でDNAからの転写の増加したレベルを開始する。他方、構成プロモーターは

、連続的な遺伝子産物の産生を開始する；すなわち、遺伝子発現に対してほとんど制御しないかまたは全く制御しない。多数のプロモーター（種々の潜在的な宿主細胞によって認識される）が周知である。適切なプロモーターは、供給源のDNAからプロモーターを制限酵素消化によって取り出し、そして所望のプロモーター配列をベクターに挿入することによって、FGFR-LポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結される。ネイティブなFGFR-Lプロモーター配列は、FGFR-L核酸分子の増幅および/または発現を指示するために使用され得る。しかし、ネイティブなプロモーターと比較して多い転写および発現タンパク質のより高い産生を可能とし、そして使用のために選択された宿主細胞系と適合性である場合には異種プロモーターが好ましい。

【0118】

原核生物宿主での使用に適切なプロモーターとしては、 β -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系；アルカリホスファターゼ；トリプトファン（trp）プロモーター系；およびハイブリッドプロモーター（例えば、tacプロモーター）が挙げられる。他の公知の細菌プロモーターもまた適切である。これらの配列は公開されており、これらの配列により、当業者は、任意の有用な制限部位を供給するのに必要とされるリンカーまたはアダプターを使用して、所望のDNA配列にそれらの配列を連結し得る。

【0119】

酵母宿主での使用に適切なプロモーターはまた、当該分野において周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターと共に有利に使用される。哺乳動物宿主細胞での使用に適切なプロモーターは周知であり、限定しないが、ポリオマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、Adenovirus 2）、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよび最も好ましいシミアンウイルス40（SV40）のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーターが挙げられる。他の適切な哺乳動物プロモーターとしては、異種哺乳動物プロモーター（例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーター）が挙げられる。

【0120】

FGFR-L 遺伝子発現を制御する際に目的となり得るさらなるプロモーターとしては、限定しないが、以下が挙げられる：SV40 初期プロモータ領域 (Bernois および Chambon, 1981, Nature 290:304-10)；CMV プロモーター；ラウス肉腫ウイルスの3'側の長末端反復に含まれるプロモーター (Yamamoto ら, 1980, Cell 22:787-97)；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (Wagner ら, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1444-45)；メタロチオネイン遺伝子の調節配列 (Brinster ら, 1982, Nature 296:39-42)； β -ラクタマーゼプロモーターのような原核生物発現ベクター (Villa-Kamaroff ら, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75:3727-31)；または tac プロモーター (DeBoer ら, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:21-25)。組織特異性を示し、そしてトランスジェニック動物において利用されている、以下の動物転写制御領域もまた関心が高い：膵臓腺房細胞において活性なエラスターゼ I 遺伝子制御領域 (Swift ら, 1984, Cell 38:639-46; Ornitz ら, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515)；膵臓細胞において活性なインシュリン遺伝子制御領域 (Hanahan, 1985, Nature 315:115-22)；リンパ系細胞において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域 (Grosschedl ら, 1984, Cell 38:647-58; Adames ら, 1985, Nature 318:533-38; Alexander ら, 1987, Mol. Cell. Biol., 7:1436-44)；精巢細胞、乳房細胞、リンパ系細胞、および肥満細胞において活性なマウス哺乳動物腫瘍ウイルス制御領域 (Leder ら, 1986, Cell 45:485-95)；肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域 (Pinkert ら, 1987, Genes and Devel. 1:268-76)；肝臓において活性な α -フェトタンパク質遺伝子制御領域 (Krumlauf ら, 1985, Mol.

Cell Biol., 5: 1639-48; Hammerら, 1987, Science 235: 53-58); 肝臓において活性な 1 - 抗トリプシン遺伝子制御領域 (Kelseyら, 1987, Genes and Devel. 1: 161-71); 骨髄性細胞において活性な - グロビン遺伝子制御領域 (Mogramら, 1985, Nature 315: 338-40; Kolliasら, 1986, Cell 46: 89-94); 脳の稀突起神経膠細胞において活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 (Readheadら, 1987, Cell 48: 703-12); 骨格筋において活性なミオシン軽鎖 - 2 遺伝子制御領域 (Sani, 1985, Nature 314: 283-86); ならびに視床下部において活性なゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域 (Masonら, 1986, Science 234: 1372-78)。

【0121】

エンハンサー配列は、より高等な真核生物によって本発明の FGF R - L ポリペプチドをコードする DNA の転写を増加するように、ベクターに挿入され得る。エンハンサーは、転写を増加させるためにプロモーターに作用する、通常約 10 ~ 300 bp の長さの DNA のシス作用性エレメントである。エンハンサーは、比較的方向および位置に非依存性である。これらは、転写ユニットに対して 5' 側および 3' 側に見出された。哺乳動物遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が公知である (例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、- フェトタンパク質およびインシュリン)。しかし、代表的には、ウイルス由来のエンハンサーが、使用される。SV40 エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーターの活性化のための例示的な増強エレメントである。エンハンサーは、FGF R - L 核酸分子に対して 5' 位または 3' 位でベクターにスプライシングされ得るが、代表的には、プロモーターから 5' 側に配置される。

【0122】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターのような開始ベクターから構築され得る。このようなベクターは、全ての所望な隣接配列を含んでも良いし、含まな

くても良い。本明細書中に記載される隣接配列の1つ以上が予めベクター内に存在しない場合、これらは、個々に得られ得、ベクターに連結され得る。隣接配列のそれぞれを得るために使用される方法は、当業者に周知である。

【0123】

本発明を実行するために好ましいベクターは、細菌宿主細胞、昆虫宿主細胞、および哺乳動物宿主細胞と適合性のベクターである。このようなベクターとしては、特に、pCRII、pCR3、およびpcDNA3.1 (Invitrogen、San Diego、CA)、pBSII (Stratagene、La Jolla、CA)、pET15 (Novagen、Madison、WI)、pGEX (Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ)、pEGFP-N2 (Clontech、Palo Alto、CA)、pETL (BlueBacII、Invitrogen)、pDSR- (PCT公開番号WO 90/14363)ならびにpFastBacDual (Gibco-BRL、Grand Island、NY)が挙げられる。

【0124】

さらなる適切なベクターとしては、限定しないが、コスミド、プラスミド、または改変ウイルスが挙げられるが、これらのベクター系は、選択された宿主細胞と適合性でなければならないことが理解される。このようなベクターとしては、限定しないが、Bluescript (登録商標) プラスミド誘導体 (高コピー数ColE1-ベースのファージミド、Stratagene Cloning Systems、La Jolla CA)、Taq増幅PCR産物をクローニングするために設計されたPCRクローニングプラスミド (例えば、TOPO™ TA Cloning (登録商標) Kit、PCR2.1 (登録商標) プラスミド誘導体、Invitrogen、Carlsbad、CA)、ならびにバキュロウイルス発現系のような哺乳動物ベクター、酵母ベクターまたはウイルスベクター (pBacPAKプラスミド誘導体、Clontech、Palo Alto、CA)が挙げられる。

【0125】

ベクターが構築され、そしてFGFR-Lポリペプチドをコードする核酸分子

がベクターの適切な部位に挿入された後に、完全なベクターが増幅および/またはポリペプチド発現に適切な宿主細胞に挿入され得る。FGFR-Lポリペプチドについての発現ベクターの選択された宿主細胞への形質転換は、トランスフェクション、感染、カルシウムFGFR-Loride、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、DEAE-デキストラン法、または他の公知の技術のような方法を含む周知の方法によって達成され得る。選択される方法は、使用される宿主細胞の種類にいくぶん関連する。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、例えば、Sambrookら、上記に記載される。

【0126】

宿主細胞は、原核生物宿主細胞（例えば、E. coli）または真核生物宿主細胞（例えば、酵母細胞、昆虫細胞、または脊椎動物細胞）であり得る。宿主細胞は、適切な条件下で培養される場合にFGFR-Lポリペプチドを合成し、これは、続いて、培養培地から（宿主細胞がそのポリペプチドを培地に分泌する場合）収集され得るか、または直接そのポリペプチドを産生する宿主細胞から収集される（そのポリペプチドが分泌されない場合）。適切な宿主細胞の選択は、所望の発現レベル、活性に望ましいかまたは必要なポリペプチド修飾（例えば、グリコシル化またはリン酸化）、および生物学的に活性な分子へと折り畳まれる容易さなどの種々の因子に依存する。

【0127】

多くの適切な宿主細胞が当該分野において公知であり、多くが、American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VAから入手可能である。例としては、限定しないが、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)、CHO DHFR(-)細胞(Urlaubら, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 4216-20)、ヒト胚性腎臓(HEK)293または293T細胞、あるいは3T3細胞のような哺乳動物細胞が挙げられる。適切な哺乳動物宿主細胞の選択および形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物生成、および精製のための方法が当該分野において公知である。他の適切な哺乳動物細胞株は、サルCOS

- 1 およびCOS-7細胞株、およびCV-1細胞株である。さらなる例示的な哺乳動物宿主細胞としては、霊長動物細胞株およびげっ歯類細胞株（形質転換細胞株を含む）が挙げられる。正常な二倍体細胞、初代組織のインビトロ培養物から誘導される細胞株、ならびに初代外植片もまた適切である。候補細胞は、選択遺伝子を遺伝子型的に欠失し得るか、または優性に作用する選択遺伝子を含み得る。他の適切な哺乳動物細胞株としては、限定しないが、マウス神経芽細胞腫N2A細胞、HeLa、マウスL-929細胞、Swissから誘導された3T3株、Balb-cまたはNIHマウス、BHKまたはHakハムスター細胞株が挙げられる。これらの細胞株のそれぞれは、タンパク質発現に関する分野の当業者にとって公知であり入手可能である。

【0128】

同様に、本発明に適切な宿主細胞として有用なのは細菌細胞である。例えば、E. coli（例えば、HB101、DH5、DH10、およびMC1061）の種々の菌株は、生物工学の分野において宿主細胞として周知である。B. subtilis、Pseudomonas spp.、他のBacillus spp.、Streptomyces spp.などの種々の菌株もまた、本方法において使用され得る。

【0129】

当業者に公知の酵母細胞の多くの菌株はまた、本発明のポリペプチドの発現のための宿主細胞として利用可能である。好ましい酵母細胞としては、例えば、Saccharomyces cerevisiaeおよびPichia pastorisが挙げられる。

【0130】

さらに、望ましい場合には、昆虫細胞系が、本発明の方法において利用され得る。このような系は、例えば、Kittsら、1993、Biotechniques、14：810-17；Lucklow、1993、Curr. Opin. Biotechnol. 4：564-72；およびLucklowら、1993、J. Virol.、67：4566-79に記載される。好ましい昆虫細胞は、Sf-9およびHi5（Invitrogen）である。

【0131】

グリコシル化FGFR-Lポリペプチドを発現するために、トランスジェニック動物がまた使用され得る。例えば、トランスジェニック乳汁産生動物（例えば、雌ウシまたはヤギ）を使用し、本発明のグリコシル化ポリペプチドを動物の乳汁中に得ることができる。FGFR-Lポリペプチドを産生するために、植物もまた使用し得るが、一般的に、植物において生じるグリコシル化は、哺乳動物細胞において産生されるものとは異なり、ヒト治療の用途に適切ではないグリコシル化産物を生じ得る。

【0132】

（ポリペプチド産生）

FGFR-Lポリペプチド発現ベクターを含む宿主細胞は、当業者に周知の標準的な培地を使用して培養され得る。この培地は通常、細胞の増殖および生存に必要な全ての栄養素を含む。E.coli細胞を培養するための適切な培地としては、例えば、Luria Broth (LB) および/または Terrific Broth (TB) が挙げられる。真核生物細胞を培養するための適切な培地としては、Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640)、Minimal Essential Medium (MEM) および/または Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) が挙げられ、これらの全ては、培養される特定の細胞株に必要とされるように血清および/または増殖因子を補充され得る。昆虫培養物についての適切な培地は、必要に応じて、イーストレート (yeastolate)、ラクトアルブミン加水分解産物、および/または胎仔ウシ血清を補充したグレース培地である。

【0133】

代表的に、トランスフェクトされた細胞または形質転換された細胞の選択的な増殖に有用な抗生物質または他の化合物が、培地に補充物質として添加される。使用される化合物は、宿主細胞が形質転換されるプラスミドに存在する選択マーカースターメントによって指示される。例えば、選択マーカースターメントがカナマイシン耐性である場合、培養培地に加えらるる化合物は、カナマイシンである。

選択的増殖のための他の化合物としては、アンピシリン、テトラサイクリン、およびネオマイシンが挙げられる。

【0134】

宿主細胞によって産生されるFGFR-Lポリペプチドの量は、当該分野において公知の標準的な方法を使用して評価され得る。このような方法としては、限定しないが、ウェスタンブロット分析、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分離、免疫沈降、および/またはDNA結合ゲルシフトアッセイのような活性アッセイが挙げられる。

【0135】

FGFR-Lポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように設計される場合、ポリペプチドの大部分は、細胞培養培地中に見出され得る。しかし、FGFR-Lポリペプチドが宿主細胞から分泌されない場合、細胞質および/または核（真核宿主細胞について）に、あるいは、細胞質ゾル（グラム陰性細菌宿主細胞について）に存在する。

【0136】

宿主細胞細胞質および/または核（真核生物宿主細胞について）に位置するかまたは細胞質ゾル（細菌宿主細胞について）に位置するFGFR-Lポリペプチドについて、細胞内物質（グラム陰性細菌についての封入体を含む）は、当業者に公知の任意の標準的な技術を使用して宿主細胞から抽出され得る。例えば、宿主細胞は、フレンチプレス、ホモジネート化、および/または超音波処理、続く遠心分離によって、ペリプラズム/細胞質の内容物を放出するように溶解され得る。

【0137】

FGFR-Lポリペプチドが細胞質ゾル内に封入体を形成した場合、この封入体は、しばしば、細胞内膜および/または細胞外膜に結合され得、従って、主に、遠心分離後のペレット材料において見出される。次いで、ペレット材料は、極端なpHで、あるいはジチオトレイトールのような還元剤の存在下アルカリ性のpHで、またはトリスカルボキシエチルホスフィンの存在下酸性のpHで、界面

活性剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素、または尿素誘導体のようなカオトロピック剤で処理されて、封入体を放出させ、分断させ、そして溶解させ得る。次いで、溶解されたFGFR-Lポリペプチドは、ゲル電気泳動、免疫沈降などを使用して分析され得る。FGFR-Lポリペプチドを単離することが望ましい場合、単離は、本明細書中およびMarstonら, 1990, Meth. Enz., 182:264-75に記載される方法のような標準的な方法を使用して達成され得る。

【0138】

いくつかの場合、FGFR-Lポリペプチドは、単離の際に生物学的に活性でなくても良い。ポリペプチドをその三次構造に「再折り畳み」または変換し、そしてジスルフィド結合を生成するための種々の方法を使用して、生物学的活性を回復し得る。このような方法は、溶解されたポリペプチドを、一定のpH（通常は、7より上）および特定の濃度のカオトロピック剤（chaotrope）の存在に曝露する工程を包含する。カオトロピック剤の選択は、封入体溶解に使用される選択肢に非常に類似するが、通常、カオトロピック剤は低い濃度で使用され、溶解に使用されるカオトロピック剤と必ずしも同一ではない。多くの場合、再折り畳み/酸化溶液はまた、還元剤、または特定の比の還元剤およびその酸化形態を含んで、特定の酸化還元電位を生成し、タンパク質のシステイン架橋の形成を生じるジスルフィドシャフリングを可能にする。通常使用される酸化還元対のいくつかとしては、システイン/シスタミン、グルタチオン（GSH）/ジチオビスGSH、塩化銅FGFR-Loride、ジチオトレイトール（DTT）/ジチアンDTT、および2-2-メルカプトエタノール（bME）/ジチオ-b（ME）が挙げられる。多くの場合において、共溶媒が、再折り畳みの効率を増加するのに使用され得るかまたは必要とされ得、この目的のために使用されるより一般的な試薬としては、グリセロール、種々の分子量のポリエチレングリコール、アルギニンなどが挙げられる。

【0139】

封入体がFGFR-Lポリペプチドの発現において有意な程度まで形成されない場合、ポリペプチドは、主に、細胞ホモジネートの遠心分離後の上清中に見出

される。ポリペプチドは、さらに、本明細書中に記載されるような方法を使用して上清から単離され得る。

【0140】

溶液からのFGFR-Lポリペプチドの精製は、種々の技術を使用して達成され得る。ポリペプチドが、ヘキサヒスチジン(FGFR-Lポリペプチド/ヘキサHis)のようなタグまたは他の小さなペプチド(例えば、FLAG(Eastman Kodak Co., New Haven, CT)またはmyc(Invitrogen, Carlsbad, CA))をそのカルボキシル末端またはアミノ末端のいずれかにおいて含むように合成された場合、カラムマトリクスがタグに対して高い親和性を有するアフィニティーカラムに溶液を通すことによって一工程で精製され得る。

【0141】

例えば、ポリヒスチジンは、ニッケルに対して大きな親和性および特異性を有して結合する。従って、ニッケルのアフィニティーカラム(例えば、Qiagen(登録商標)ニッケルカラム)は、FGFR-Lポリペプチド/ポリHisの精製のために使用され得る。例えば、Current Protocols in Molecular Biology § 10.11.8(Ausubelら編, Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1993)を参照のこと。

【0142】

さらに、FGFR-Lポリペプチドは、FGFR-Lポリペプチドを特異的に認識し得、そして結合し得るモノクローナル抗体の使用によって精製され得る。

【0143】

精製のための他の適切な手段はとしては、限定しないが、アフィニティークロマトグラフィー、免疫親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、モレキュラーシーブクロマトグラフィー(molecular sieve chromatography)、HPLC、電気泳動(ネイティブゲル電気泳動を含む)、続くゲル溶出、および分取用等電点電気泳動(「IsoPrime」machine/technique, Hoefer Scientific

c, San Francisco, CA) が挙げられる。いくつかの場合において、2つ以上の精製技術を、増加した純度を達成するために組み合わせ得る。

【0144】

FGFR-Lポリペプチドはまた、Merrifieldら, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149; Houghtenら, 1985, Proc Natl Acad. Sci. USA 82:5132; ならびに、StewartおよびYoung, Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co. 1984) に記載されるような当該分野で公知の技術を使用する、化学合成法(例えば、固相ペプチド合成)によって調製され得る。このようなポリペプチドは、アミノ末端にメチオニンを有するかまたは有さずに合成され得る。化学的に合成されたFGFR-Lポリペプチドは、これらの参考文献に記載される方法を使用して酸化されて、ジスルフィド結合を形成し得る。化学的に合成されたFGFR-Lポリペプチドは、組換え的に産生されるかまたは天然の供給源から精製された対応のFGFR-Lポリペプチドに匹敵する生物学的活性を有すると期待され、従って、組換えまたは天然のFGFR-Lポリペプチドと相互交換可能に使用され得る。

【0145】

FGFR-Lポリペプチドを得る別の手段は、FGFR-Lポリペプチドが天然に見出される供給源の組織および/または流体のような生物学的サンプルからの精製による。このような精製は、本明細書中に記載されるようなタンパク質精製のための方法を使用して行われ得る。精製の間、FGFR-Lポリペプチドの存在が、例えば、組換え的に産生されたFGFR-Lポリペプチドまたはそのペプチドフラグメントに対して調製された抗体を使用してモニターされ得る。

【0146】

核酸およびポリペプチドを産生するための多くのさらなる方法は、当該分野において公知であり、この方法は、FGFR-Lポリペプチドに対して特異性を有するポリペプチドを産生するために使用され得る。例えば、Robertsら, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12297-303を参照のこと。これは、mRNAとそのコードされるペプチドとの

間の融合タンパク質の産生を記載する。Roberts, 1999, Curr. Opin. Chem. Biol. 3:268-73もまた参照のこと。さらに、米国特許第5,824,469号は、特定の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドを得るための方法を記載する。この手順は、異種プールのオリゴヌクレオチドを生成する工程を包含し、この異種プールのオリゴヌクレオチドはそれぞれが、5'ランダム化配列、中央部の予備選択配列、および3'ランダム化配列を有する。得られる異種プールは、所望の生物学的活性を示さない細胞の集団に導入される。次いで、細胞の亜集団を、予め決定された生物学的機能を示すものについてスクリーニングする。その亜集団から、所望の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドが単離される。

【0147】

米国特許第5,763,192号；同第5,814,476号；同第5,723,323号；および同第5,817,483号は、ペプチドまたはポリペプチドを産生するためのプロセスを記載する。これは、確率論的な遺伝子またはそのフラグメントを産生し、次いで、その確率論的な遺伝子によってコードされた1以上のタンパク質を産生する宿主細胞にこれらの遺伝子を導入することによって達成される。次いで、この宿主は、所望の活性を有するペプチドまたはポリペプチドを産生する、これらのクローンを同定するためにスクリーニングされる。

【0148】

ペプチドまたはポリペプチドの産生するための別の方法は、Athersys, Inc.によって出願されたPCT/US98/20094(WO99/15650に記載される。これは、「Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery」(RAGE-GD)として知られており、このプロセスは、インサイチュ組換え方法によって、内因性遺伝子の発現または遺伝子の過剰発現の活性化を含む。例えば、内因性遺伝子の発現は、非相同性組換えまたは異常な組換えによって、遺伝子の発現を活性化し得る標的細胞中に、調節配列を組み込むことによって、活性化または増加される。この標的DNAは、まず、照射に供せられ、そして遺伝子プロモーターが挿入される。このプロモーターは、遺伝子の前方に最終的に配置

され、遺伝子の転写を開始する。これは、所望のペプチドまたはポリペプチドの発現を引き起こす。

【0149】

これらの方法はまた、包括的なFGFR-Lポリペプチド発現ライブラリーを制作するために使用され得、これは、続いて、種々のアッセイ（例えば、生化学的アッセイ、細胞アッセイおよび生物全体のアッセイ（例えば、植物、マウスなど））において、ハイスループット表現型スクリーニングのために使用され得ることが理解される。

【0150】

（合成）

本明細書中に記載される核酸およびポリペプチド分子は、組換えおよび他の手段によって産生され得ることが、当業者によって理解される。

【0151】

（選択的結合因子）

用語「選択的結合因子」は、1以上のFGFR-Lポリペプチドに対して特異性を有する分子をいう。適切な選択的結合因子としては、抗体およびその誘導体、ポリペプチド、ならびに低分子が挙げられるが、これらに限定されない。適切な選択的結合因子は、当該分野で公知の方法を使用して調製され得る。本発明の例示的なFGFR-Lポリペプチド選択的結合因子は、FGFR-Lポリペプチドの特定の部分を結合し得、これにより、ポリペプチドのFGFR-Lポリペプチドレセプターへの結合を阻害する。

【0152】

FGFR-Lポリペプチドと結合する抗体および抗体フラグメントのような選択的結合因子は、本発明の範囲内である。この抗体は、単一特異的なポリクローナルを含むポリクローナル；モノクローナル（MAb）；組換え；キメラ；ヒト化（例えば、CDR移植化）；ヒト；単鎖；および/または二特異的；ならびにフラグメント；改変体；またはそれらの誘導体であり得る。抗体フラグメントとしては、FGFR-Lポリペプチドのエピトープに結合する抗体の部分を含む。このようなフラグメントの例としては、全長抗体の酵素的切断によって産生され

たFabおよびF(ab')フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組換えDNA技術(例えば、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む、組換えプラスミドの発現)によって産生されたフラグメントが挙げられる。

【0153】

FGFR-Lポリペプチドに指向されたポリクローナル抗体は、一般に、FGFR-Lポリペプチドおよびアジュバンドの複数回の皮下注射または腹腔内注射によって動物(例えば、ウサギまたはマウス)において産生される。FGFR-Lポリペプチドをキャリアタンパク質に結合させることは有用であり得る。このキャリアタンパク質は、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、またはダイズトリプシンインヒビターのように、免疫される種において免疫原性である。また、ミョウバンのような凝集剤は、免疫応答を増強させるために使用される。免疫後、この動物は採血され、そして血清を、抗FGFR-L抗体力価についてアッセイする。

【0154】

FGFR-Lポリペプチドに指向されたモノクローナル抗体は、培養中の継代細胞株による抗体分子の産生を提供する任意の方法を使用して産生される。モノクローナル抗体を調製するために適切な方法の例として、Kohlerら、1975、Nature 256:495-97のハイブリドーマ法、およびヒトB細胞ハイブリドーマ法(Kozbor、1984、J. Immunol. 133:3001; Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987))が挙げられる。FGFR-Lポリペプチドと反応性のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた、本発明によって提供される。

【0155】

本発明のモノクローナル抗体は、治療剤として使用するために、改変され得る。1つの実施形態は、「キメラ」抗体であり、この抗体において重鎖(H)および/または軽鎖(L)の一部が、特定の種に由来するかまたは特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか、または相

同性であり、一方で、この鎖の残りの部分は、別の種に由来するか、または別の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応の配列と同一であるか、または相同性である。抗体のフラグメントが所望の生物学的活性を示す限り、このような抗体のフラグメントも含まれる。米国特許第4,816,567号; Morrisonら、1985、Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-55を参照のこと。

【0156】

別の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、「ヒト化」抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。米国特許第5,585,089号および同第5,693,762号を参照のこと。一般に、ヒト化した抗体は、非ヒトである供給源からそれに導入された1以上のアミノ酸残基有する。ヒト化は、例えば、当該分野(Jonesら、1986、Nature 321:522-25; Riechmannら、1998、Nature 332:323-27; Verhoeyenら、1988、Science 239:1534-36)で記載される方法を使用して、げっ歯類の相補性決定領域(CDR)の少なくとも一部をヒトの抗体の対応する領域に対して置換することによって、実施され得る。

【0157】

FGFR-Lポリペプチドと結合するヒト抗体もまた、本発明によって包含される。内因性の免疫グロブリンの産物の非存在下で、ヒト抗体のレポーターを産生し得る、トランスジェニック動物(例えば、マウス)を使用して、このような抗体は、FGFR-Lポリペプチド抗原(すなわち、少なくとも6個の連続するアミノ酸を有する)を用いて免疫することによって産生され、必要に応じて、キャリアに結合される。例えば、Jakobovitsら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. 90:2551-55; Jakobovitsら、1993、Nature 362:255-58; Bruggermannら、1993、Year in Immuno. 7:33を参照のこと。1つの方法において、このようなトランスジェニック動物は、本明細書中の重鎖および軽鎖免疫グロブリン鎖をコードする内因性遺伝子座を無能にし、そしてヒトの重

鎖および軽鎖タンパク質をコードする遺伝子座をそのゲノムに挿入することによって産生される。次いで、部分的に改変された動物（この動物は、完全には補完されていない改変を有する）は、所望の免疫系の改変の全てを有する動物を得るために交雑される。免疫原が投与される場合、これらのトランスジェニック動物が、ヒト（例えば、マウスではない）アミノ酸配列（このアミノ酸配列は、これらの抗原に対して免疫特異性である可変領域を含む）を有する抗体を産生する。PCT出願番号PCT/US96/05928および同PCT/US93/06926を参照のこと。さらなる方法は、米国特許第5,545,807号、PCT出願番号PCT/US91/245および同PCT/GB89/01207、ならびに欧州特許第546073B1号および同第546073A1号に記載される。ヒト抗体はまた、宿主細胞中での組換えDNAの発現または本明細書中に記載されるようなハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【0158】

代替の実施形態において、ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリから産生され得る（Hoogenboomら, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marksら, 1991, J. Mol. Biol. 222:581）。これらのプロセスは、糸状バクテリオファージ表面上の抗体レポーターの提示を介した免疫選択、そして選択した抗原へのこれらの結合によるファージの引き続く選択を模倣する。このような技術の1つは、PCT出願番号PCT/US98/17364に記載されており、これには、このようなアプローチを使用する、MPLレセプターおよびmskレセプターに対して高い親和性の抗体および機能的なアゴニスト抗体の単離が記載される。

【0159】

キメラ抗体、CDR移植抗体、およびヒト化抗体は、代表的には組換え方法によって産生される。抗体をコードする核酸は、宿主細胞中に導入され、そして本明細書中に記載される材料および手順を使用して発現される。好ましい実施形態において、この抗体は、哺乳動物宿主細胞（例えば、CHO細胞）中で産生される。モノクローナル（例えば、ヒト）抗体は、本明細書中に記載されるように、宿主細胞中での組換えDNAの発現またはハイブリドーマ細胞中での発現によっ

て産生され得る。

【0160】

本発明の抗FGFR-L抗体は、FGFR-Lポリペプチドの検出および定量のための任意の公知のアッセイ方法（例えば、競合結合アッセイ、直接的および間接的なサンドイッチアッセイ、および免疫沈降アッセイ）において使用され得る（Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)）。これらの抗体は、使用されるアッセイ方法に適切な親和性でFGFR-Lポリペプチドと結合する。

【0161】

診断的適用のために、特定の実施形態において、抗FGFR-L抗体は、検出可能な部分で標識され得る。この検出可能な部分は、直接的または間接的のいずれかで、検出可能なシグナルを産生し得る任意の部分であり得る。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、または ^{67}Ga ）；蛍光化合物または化学発光化合物（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリン）、または酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、もしくは西洋ワサビペルオキシダーゼ）であり得る（Bayerら, 1990, Meth. Enz. 184: 138-63）。

【0162】

競合結合アッセイは、標識した標準（例えば、FGFR-Lポリペプチド、またはその免疫学的に反応性の部分）の能力に依存し、限定された量の抗FGFR-L抗体との結合に関して、試験サンプル分析物（FGFR-Lポリペプチド）と競合する。試験サンプル中のFGFR-Lポリペプチドの量は、抗体と結合する標準の量と反比例する。結合する標準の量を決定するのを容易にするために、これらの抗体は、代表的には競合前または競合後に不溶化され、その結果これらの抗体と結合する標準および分析物は、結合しないままの標準および分析物から都合よく分離され得る。

【0163】

サンドイッチアッセイは、代表的には2つの抗体の使用に関し、各々の抗体は、検出および/または定量されるべきタンパク質の異なる免疫原性部分またはエピトープに結合し得る。サンドイッチアッセイにおいて、この試験サンプル分析物は、代表的には固体支持体上に固定される第1抗体によって結合され、その後、第2抗体が、この分析物に結合し、不溶性の3部分複合体を形成する。例えば、米国特許第4,376,110号を参照のこと。第2抗体自体は、検出可能な部分で標識され得るか(直接的なサンドイッチアッセイ)、または検出可能な部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を使用して測定され得る(間接的なサンドイッチアッセイ)。例えば、サンドイッチアッセイの1つの型は、酵素結合免疫ソルベントアッセイ(ELISA)(この場合、検出可能な部分は、酵素である)である。

【0164】

抗FGFR-L抗体を含む、選択的結合因子はまた、インビボ画像化のために有用である。検出可能な部分で標識した抗体は、動物に、好ましくは、血流に投与され得、宿主中における標識した抗体の存在および位置がアッセイされる。この抗体は、核磁気共鳴、放射線学、または当該分野で公知の他の検出手段のいずれかによって、動物中で検出可能である任意の部分で標識され得る。

【0165】

抗体を含む、本発明の選択的結合因子は、治療剤として使用され得る。これらの治療剤は、一般に、アゴニストまたはアンタゴニストであり、これらはそれぞれ、FGFR-Lポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を、増強または減少させる。1つの実施形態において、本発明のアンタゴニスト抗体は、FGFR-Lポリペプチドに特異的に結合し得、そしてインビボまたはインビトロでFGFR-Lポリペプチドの機能活性を阻害または排除し得る抗体またはその結合フラグメントである。好ましい実施形態において、選択的結合因子(例えば、アンタゴニスト抗体)は、FGFR-Lポリペプチドの機能活性を、少なくとも約50%、および好ましくは、少なくとも約80%阻害する。別の実施形態において、選択的結合因子は、FGFR-Lポリペプチド結合パートナー(リガンドまたはレセプター)と相互作用し得、これにより、インビトロまたはインビボにお

いてFGFR-Lポリペプチド活性を阻害または排除する抗FGFR-Lポリペプチドであり得る。アゴニストおよびアンタゴニスト抗FGFR-Lポリペプチド抗体を含む、選択的結合因子は、当該分野で周知であるスクリーニングアッセイによって同定される。

【0166】

本発明はまた、FGFR-L選択的結合因子（例えば、抗体）および生物学的サンプル中でFGFR-Lポリペプチドレベルを検出するために有用である他の試薬を含むキットに関する。このような試薬として、検出可能な標識、ブロッキング血清（blocking serum）、ポジティブおよびネガティブコントロールサンプル、ならびに検出試薬が挙げられ得る。

【0167】

（マイクロアレイ）

DNAマイクロアレイ技術は、本発明に従って利用され得ることが、理解される。DNAマイクロアレイは、固体支持体（例えば、ガラス）上に配置された核酸の小型高密度アレイである。このアレイ内の各細胞またはエレメントは、相補的核酸配列（例えば、mRNA）とハイブリダイゼーションするための標識として作用する、単一の核酸種の複数のコピーを含む。DNAマイクロアレイ技術を使用する発現プロファイリングにおいて、mRNAは、最初に細胞サンプルまたは組織サンプルから抽出され、次いで、酵素的に蛍光標識されたcDNAへと変換される。この材料は、マイクロアレイにハイブリダイズされ、そして未結合のcDNAは、洗浄により除去される。次いで、このアレイ上に提示された個々の遺伝子の発現は、各標識核酸分子に特異的に結合された標識cDNAの量を定量することによって視覚化される。この方法において、数千の遺伝子の発現が、生物学的材料の単一サンプルから、ハイスループットの並行様式で定量され得る。

【0168】

このハイスループット発現プロファイリングは、本発明のFGFR-L分子に関連して広範な適用を有し、これには、以下が挙げられるが、これに限定されない：治療のための標的としてのFGFR-L疾患関連遺伝子の同定および確認；関連するFGFR-L分子およびそのインヒビターの分子毒性；集団の層別化お

および臨床試験のための代替マーカーの生成；およびハイスループットスクリーニングにおいて、選択化合物の同定を補助することによって、関連するFGFR-Lポリペプチド低分子薬物の発見を高めること。

【0169】

(化学的誘導体)

FGFR-Lポリペプチドの化学的に改変された誘導体は、本明細書中に記載された開示を考慮して、当業者によって調製され得る。FGFR-Lポリペプチド誘導体は、このポリペプチドに天然に結合した分子の型または位置のいずれかにおいて異なる様式で改変される。誘導体は、1以上の天然に結合した化学的な基の欠失によって形成される分子を含み得る。配列番号2もしくは配列番号5または他のFGFR-Lポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドは、1以上のポリマーの共有結合によって改変され得る。例えば、選択されたポリマーは、代表的に水溶性であり、その結果、それが結合するタンパク質は、水性環境（例えば、生理学的な環境）下で沈殿しない。ポリマーの混合物が、適切なポリマーの範囲内に含まれる。好ましくは、目的産物の調製物の治療学的用途のために、このポリマーは、薬学的に受容可能である。

【0170】

このポリマーの各々は、任意の分子量を有し得、そして分枝または非分枝であり得る。このポリマーの各々は、代表的に、約2kDaと約100kDaとの間の平均分子量を有する（この用語「約（およそ）」は、水溶性ポリマーの調製の際に、いくつかの分子が示された分子量より多く、いくつかは少ない分子量を有することを示す）。各ポリマーの平均分子量は、好ましくは、約5kDaと約50kDaの間、より好ましくは、約12kDaと約40kDaとの間、そして最も好ましくは、約20kDaと約35kDaとの間である。

【0171】

適切な水溶性ポリマーまたはその混合物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：N-結合型またはO-結合型炭水化物、糖、ホスフェート、ポリエチレングリコール(PEG)（これは、モノ-(C₁-C₁₀)、アルコキシ-、またはアリアルオキシ-ポリエチレングリコールを含むタンパク質を誘

導体化するために使用されたPEGの形態を含む)、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、デキストラン(例えば、約6kDの低分子量デキストラン)、セルロース、または他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ-(N-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、およびポリビニルアルコール。共有結合したFGFR-Lポリペプチドマルチマーを調製するために使用され得る、二官能性架橋分子もまた、本発明に包括される。

【0172】

一般に、化学的誘導体化は、活性化したポリマー分子とタンパク質を反応させるために使用される任意の適切な条件下で、実施され得る。ポリペプチドの化学的誘導体を調製するための方法は、一般的に以下の工程を包含する:(a)配列番号2もしくは配列番号5または他のFGFR-Lポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドが、1以上のポリマー分子に結合する条件下で、活性化したポリマー分子(例えば、ポリマー分子の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体)とポリペプチドを反応させる工程、ならびに(b)反応生成物を得る工程。最適の反応条件は、既知のパラメータおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、タンパク質に対するポリマー分子の比が大きくなるほど、結合したポリマー分子の割合も大きくなる。1つの実施形態において、FGFR-Lポリペプチド誘導体は、アミノ末端の単一ポリマー分子部分を有し得る。例えば、米国特許第5,234,784号を参照のこと。

【0173】

ポリペプチドのペグ化(pegylation)は、当該分野で公知の任意のペグ化反応を使用して特異的に実施され得る。このような反応は、例えば、以下の参考文献に記載されている:Francisら,1992,Focus on Growth Factors 3:4-10;欧州特許第0154316号および同第0401384号;ならびに米国特許第4,179,337号。例えば、ペグ化は、本明細書中に記載されるように、反応性ポリエチレングリコール分子(または、類似の反応性水溶性ポリマー)とのアシル化反応またはアルキル

化反応を介して実施され得る。アシル化反応のために、選択されたポリマーは、単一の反応性エステル基を有するべきである。還元的アルキル化について、選択されたポリマーは、単一の反応性アルデヒド基を有するべきである。反応性アルデヒドは、例えば、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド（これは、水溶性である）か、またはモノC₁-C₁₀アルコキシもしくはそのアリアルオキシ誘導体である（米国特許第5,252,714号を参照のこと）。

【0174】

別の実施形態において、FGFR-Lポリペプチドは、ビオチンに化学的に結合され得る。次いで、ビオチン/FGFR-Lポリペプチド分子は、アビジンに結合され得、4価のアビジン/ビオチン/FGFR-Lポリペプチド分子を生じる。FGFR-Lポリペプチドはまた、ジニトロフェノール(DNP)またはトリニトロフェノール(TNP)に共有結合され得、そして生じる結合体は、抗DNPまたは抗TNP-IgMで沈殿され、10価を有する10量体の結合体を形成する。

【0175】

一般的に、本願発明のFGFR-Lポリペプチド誘導体の投与によって、軽減され得るかまたは調節され得る状態としては、FGFR-Lポリペプチドについて本明細書中に記載される状態が挙げられる。しかし、本明細書中で開示されるFGFR-Lポリペプチド誘導体は、さらなる活性、増強されたかまたは減少した生物学的活性あるいは他の特性（例えば、非誘導化分子と比較して増加または減少した半減期）を有し得る。

【0176】

（遺伝子操作した非ヒト動物）

さらに、マウス、ラット、または他のげっ歯類；ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜のような非ヒト動物が本発明の範囲内に含まれ、ここで、ネイティブなFGFR-Lポリペプチドをコードする遺伝子は破壊（すなわち「ノックアウト」）され、その結果FGFR-Lポリペプチドの発現レベルは、有意に減少するか、または完全に破壊される。このような動物は、米国特許第5,557,032号に記載されるような技術および方法を使用して作製され得る。

【0177】

本発明は、マウス、ラット、または他のげっ歯類；ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜のような非ヒト動物をさらに含み、この動物のFGFR-L遺伝子のネイティブな形態または異種FGFR-L遺伝子のいずれかが、この動物によって過剰発現され、これによって、「トランスジェニック」動物を作製する。このようなトランスジェニック動物は、米国特許第5,489,743号およびPCT公開番号WO94/28122号に記載されるような周知の方法を使用して調製され得る。

【0178】

本発明は、非ヒト動物をさらに含み、ここで、本発明の1以上のFGFR-Lポリペプチドのプロモーターは、（例えば、相同組換え方法を使用することによって）活性化されるか、または不活化されるかのいずれかであり、1以上のネイティブなFGFR-Lポリペプチドの発現のレベルを改変する。

【0179】

これらの非ヒト動物は、薬物候補スクリーニングのために使用され得る。このようなスクリーニングにおいて、動物での薬物候補の影響が測定され得る。例えば、薬物候補は、FGFR-L遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、産生されるFGFR-Lポリペプチドの量は、動物を薬物候補に曝露した後に測定され得る。さらに、特定の実施形態において、動物での薬物候補の実際の影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現により、疾患状態または病理学的状態を生じ得るか、またはそれらに関連付けられ得る。このような場合において、遺伝子の発現を減少させるための薬物候補の能力または病理学的状態を予防または阻害するその能力を試験し得る。別の例において、ポリペプチドのフラグメントのような、特定の代謝産物の産生により、疾患状態または病理学的状態を生じ得るか、またはそれらに関連付けられ得る。このような場合において、このような代謝産物の産生を減少させるための薬物候補の能力または病理学的状態を予防または阻害するその能力を試験し得る。

【0180】

（FGFR-Lポリペプチド活性の他の修飾因子についてのアッセイ）

いくつかの状況において、FGFR-Lポリペプチドの活性の修飾因子である分子（例えば、アゴニストまたはアンタゴニスト）を同定することが所望され得る。FGFR-Lポリペプチドを調節する天然または合成分子は、本明細書中に記載されるように、1以上のスクリーニングアッセイを使用して同定され得る。このような分子は、エキソビボ様式またはインビボ様式のいずれかで、注射、または経口送達、移植デバイスなどによって投与され得る。

【0181】

「試験分子」とは、FGFR-Lポリペプチドの活性を調節する（すなわち、増加または減少させる）能力について評価される分子を言う。最も一般的に、試験分子は、FGFR-Lポリペプチドと直接的に相互作用する。しかし、試験分子はまた、例えば、FGFR-L遺伝子発現に影響を与えることによってか、またはFGFR-Lポリペプチド結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）に結合することによって、FGFR-Lポリペプチド活性を間接的に調節し得るということもまた意図される。1つの実施形態において、試験分子は、少なくとも約 10^{-6} M、好ましくは、約 10^{-8} M、より好ましくは、約 10^{-9} M、そしてさらにより好ましくは約 10^{-10} Mの親和性定数（*affinity constant*）でFGFR-Lポリペプチドと結合する。

【0182】

FGFR-Lポリペプチドと相互作用する化合物を同定するための方法は、本発明によって包含される。特定の実施形態において、FGFR-Lポリペプチドは、試験分子とFGFR-Lポリペプチドとの相互作用を可能とする条件下で、試験分子と共にインキュベートされ、そして相互作用の程度が測定される。試験分子は、実質的に精製された形態または粗製の混合物中でスクリーニングされ得る。

【0183】

特定の実施形態において、FGFR-Lポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストは、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量の分子であり得、これは、FGFR-Lポリペプチドと相互作用して、その活性を調節する。FGFR-Lポリペプチドの発現を調節する分子は、FGFR-Lポリペプ

チドをコードする核酸と相補的である核酸分子、またはFGFR-Lポリペプチドの発現を指示または制御する核酸配列に対して相補的である核酸分子、および発現のアンチセンス制御因子として作用する核酸分子を含む。

【0184】

FGFR-Lポリペプチドと相互作用する場合として一旦、試験化合物が同定されると、この分子は、FGFR-Lポリペプチド活性を増加または減少させるその能力についてさらに評価され得る。試験分子とFGFR-Lポリペプチドとの相互作用の測定は、いくつかの形式で実施され得、これには、細胞ベースの結合アッセイ、膜結合アッセイ、液相アッセイ、およびイムノアッセイが挙げられる。一般に、試験分子は、特定の期間、FGFR-Lポリペプチドと共にインキュベートされ、そしてFGFR-Lポリペプチド活性が、生物学的活性を測定するために1以上のアッセイによって決定される。

【0185】

試験分子とFGFR-Lポリペプチドとの相互作用はまた、イムノアッセイにおいて、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を使用して直接的にアッセイされ得る。あるいは、本明細書中に記載されるようなエピトープタグを含むFGFR-Lポリペプチドの改変形態は、溶液およびイムノアッセイ中で使用され得る。

【0186】

FGFR-Lポリペプチドが、結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）との相互作用を介して、生物学的活性を示す場合において、種々のインビトロアッセイが、対応する結合パートナー（例えば、選択的結合因子、レセプター、またはリガンド）へのFGFR-Lポリペプチドの結合を測定するために使用され得る。これらのアッセイは、結合パートナーに対するFGFR-Lポリペプチドの結合の速度および/または程度を増加または減少させるその能力について、試験分子をスクリーニングするために使用され得る。1つのアッセイにおいて、FGFR-Lポリペプチドは、マイクロタイタープレートのウェル中で固定される。次いで、放射標識したFGFR-Lポリペプチド結合パートナー（例えば、ヨウ素化したFGFR-Lポリペプチド結合パートナー）および試験化合

物は、このウェルに、1つずつ（いずれかの順序で）または同時にのいずれかで添加され得る。インキュベーション後に、このウェルを洗浄し、そしてシンチレーション計数器を使用して、放射活性を計数し、結合パートナーがFGFR-Lポリペプチドに結合する程度を決定する。代表的に、分子は、一定の濃度範囲にわたって試験され、そして試験アッセイの1以上のエレメントを欠く一連のコントロールウェルは、結果の評価の正確性のために使用され得る。この方法の代替は、タンパク質の「位置」を逆にする工程（すなわち、マイクロタイタープレートウェルに対してFGFR-Lポリペプチド結合パートナーを固定し、試験分子および放射標識したFGFR-Lポリペプチドをインキュベートし、そしてFGFR-Lポリペプチド結合の程度を決定する工程）を包含する。例えば、Current Protocols in Molecular Biology、第18章（Ausubelら編、Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1995）を参照のこと。

【0187】

放射性標識に対する代替として、FGFR-Lポリペプチドまたはその結合パートナーは、ビオチンと結合体化され得、そしてビオチン化されたタンパク質の存在が、次いで、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）またはアルカリホスファターゼ（AP））（これらは、比色定量的に検出され得る）に結合したストレプトアビジンを使用して検出され得るか、またはストレプトアビジンの蛍光タグ化によって検出され得る。FGFR-LポリペプチドまたはFGFR-Lポリペプチド結合パートナー（これらは、ビオチンに結合されている）に対する抗体はまた、APまたはHRPに連結した酵素連結ストレプトアビジンとの複合体のインキュベーション後に、検出の目的のために使用され得る。

【0188】

FGFR-LポリペプチドまたはFGFR-Lポリペプチド結合パートナーはまた、アガロースビーズ、アクリルビーズ、または他の型のこのような不活性な固相基材への付着によって固定され得る。基材-タンパク質複合体は、相補性タンパク質および試験化合物を含む溶液内に配置され得る。インキュベーション後、これらのビーズは、遠心分離によって沈殿され得、そしてFGFR-Lポリペ

プチドとその結合パートナーとの間の結合の量が、本明細書中に記載の方法を使用して評価され得る。あるいは、基材 - タンパク質複合体はカラム内に固定化され得、試験分子および相補性タンパク質はカラムを通過する。次いで、FGFR - Lポリペプチドとその結合パートナーとの間の複合体の形成が、本明細書中に記載の技術（例えば、放射性標識または抗体結合）のいずれかを使用して評価され得る。

【0189】

FGFR - Lポリペプチド結合タンパク質とFGFR - Lポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させる試験分子を同定するために有用な別のインビトロアッセイは、表面プラズモン共鳴検出器システム（例えば、BIAcoreアッセイシステム（Pharmacia, Piscataway, NJ））である。BIAcoreシステムは、製造業者によって特定されるように利用される。このアッセイは、本質的に、FGFR - LポリペプチドまたはFGFR - Lポリペプチド結合パートナーのいずれかの、デキストランコーティングセンサーチップ（これは、検出器に存在する）への共有結合を含む。次いで、この試験化合物および他の相補性タンパク質が、同時にかまたは連続的にかのいずれかで、センサーチップを含むチャンバーに注入され得る。結合する相補性タンパク質の量は、センサーチップのデキストランコーティング側に物理的に関連付けられる分子量の変化に基づいて評価され得、この分子量の変化は、検出器システムによって測定される。

【0190】

いくつかの場合において、2つ以上の試験化合物と一緒に、FGFR - LポリペプチドとFGFR - Lポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させるそれらの能力について評価することが所望され得る。これらの場合において、本明細書中に記載のアッセイは、第一の試験化合物と同時にか、またはそれに続いてのいずれかで、このようなさらなる試験化合物を添加することによって容易に改変され得る。このアッセイにおける工程の残りは、本明細書中に記載される。

【0191】

インビトロアッセイ（例えば、本明細書中に記載されるもの）は、FGFR-LポリペプチドとFGFR-Lポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成に対する効果について、多数の化合物をスクリーニングするために、有利に使用され得る。これらのアッセイは、ファージディスプレイ、合成ペプチド、および化学合成ライブラリーにおいて生成された化合物をスクリーニングするために、自動化され得る。

【0192】

FGFR-LポリペプチドとFGFR-Lポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少される化合物はまた、FGFR-LポリペプチドまたはFGFR-Lポリペプチド結合パートナーFのいずれかを発現する細胞および細胞株を使用して、細胞培養物においてスクリーニングされ得る。細胞および細胞株は、任意の哺乳動物から得られ得るが、好ましくは、ヒト、または他の霊長類、イヌまたはげっ歯類の供給源由来である。FGFR-Lポリペプチドの、FGFR-Lポリペプチド結合パートナーを発現する細胞表面への結合は、試験分子の存在または非存在下で評価され、そして結合の程度が、例えば、FGFR-Lポリペプチド結合パートナーに対するビオチン化抗体を使用するフローサイトメトリーによって決定され得る。細胞培養アッセイは、本明細書中に記載されるタンパク質結合アッセイにおいて、陽性であるとスコア付けされる化合物をさらに評価するために有利に使用され得る。

【0193】

細胞培養物はまた、薬物候補の影響をスクリーニングするために使用され得る。例えば、薬物候補は、FGFR-L遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、生成されるFGFR-LポリペプチドまたはFGFR-Lポリペプチドフラグメントの量は、細胞培養物の薬物候補への曝露の後に測定され得る。特定の実施形態において、細胞培養物に対する薬物候補の実際の影響が検出され得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、細胞培養物に対する特定の影響を有し得る。このような場合に、遺伝子の発現を増加または減少させる薬物候補の能力、または細胞培養物に対する特定の影響を予防または阻害するその能力が試験され得る。他の例において、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチ

ドのフラグメントなど)の生成が、疾患または病的状態を引き起こし得るか、またはそれらと関連付けられ得る。このような場合、細胞培養物におけるこのような代謝産物の生成を減少する薬物候補の能力が試験され得る。

【0194】

(内部移行タンパク質)

tatタンパク質配列(HIV由来)が、タンパク質を細胞内に内部移行させるために使用され得る。例えば、Falwellら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:664-68を参照のこと。例えば、HIV tatタンパク質の11アミノ酸の配列(Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R;配列番号9)(「タンパク質形質導入ドメイン」、またはTAT PDTと称される)は、細胞の細胞質膜および核膜を横切る送達を媒介するとして記載されている。Schwarzeら、1999、Science 285:1569-72;およびNagaharaら、1998、Nat. Med. 4:1449-52を参照のこと。これらの手順において、FITC構築物(FITC標識G-G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R;配列番号10)(これは、腹腔内投与後に組織に貫入する)が調製され、そしてこのような構築物の細胞への結合が、蛍光細胞分析分離(FACS)分析によって検出される。tat-gal融合タンパク質で処理された細胞は、gal活性を示す。注入後、このような構築物の発現は多くの組織(肝臓、腎臓、肺、心臓および脳組織を含む)において検出され得る。このような構築物は、細胞に入るために幾分の変性を受け、そしてそれ自体、細胞内への進入後に、再折り畳みを必要とし得ると考えられる。

【0195】

従って、tatタンパク質配列は、所望のポリペプチドを細胞に内部移入させるために使用され得ることが理解される。例えば、tatタンパク質配列を使用して、FGFR-Lアンタゴニスト(例えば、抗FGFR-L選択的結合因子、低分子、可溶性レセプター、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド)は、FGFR-L分子の活性を阻害するために、細胞内投与され得る。本明細書中で使用される場合、用語「FGFR-L分子」は、本明細書中に記載されるような、F

G F R - L 核酸分子および F G F R - L ポリペプチドの両方をいう。所望される場合には、F G F R - L タンパク質自体もまた、これらの手順を使用して、細胞に内部投与され得る。Straus, 1999, Science 285:1466-67をまた参照のこと。

【0196】

(F G F R - L ポリペプチドを使用する細胞供給源の同定)

本発明の特定の実施形態に従って、F G F R - L ポリペプチドと関連する特定の細胞型の供給源を決定し得ることが有用であり得る。例えば、適切な治療を選択する際の補助として疾患または病的状態の起源を決定することが有用であり得る。特定の実施形態において、F G F R - L ポリペプチドをコードする核酸は、プローブとして使用されて、このようなプローブを用いて細胞の核酸をスクリーニングすることによって、本明細書中に記載の細胞を同定し得る。他の実施形態において、抗 F G F R - L ポリペプチド抗体を使用して、細胞における F G F R - L ポリペプチドの存在について試験し得、従って、このような細胞が本明細書中に記載される型の細胞か否かを決定し得る。

【0197】

(F G F R - L ポリペプチド組成物および投与)

治療組成物は、本発明の範囲内にある。このような F G F R - L ポリペプチド薬学的組成物は、治療有効量の F G F R - L ポリペプチドまたは F G F R - L 核酸分子を、投与の様式と適合するように選択された薬学的または生理学的に受容可能な処方剤との混合物中に含み得る。薬学的組成物は、治療有効量の1以上の F G F R - L ポリペプチド選択的結合因子を、投与の様式と適合するように選択された薬学的または生理学的に受容可能な処方剤との混合物中に含み得る。

【0198】

受容可能な処方材料は、好ましくは、使用される投薬量および濃度で、レシピエントに対して非毒性である。

【0199】

薬学的組成物は、例えば、組成物の pH、浸透圧、粘度、清澄性、色、等張性、におい、無菌性、安定性、解離もしくは放出の速度、吸着、または透過を改変

、維持または保存するための処方材料を含み得る。適切な処方材料としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン）、抗菌剤、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウムまたは亜硫酸水素ナトリウム（sodium hydrogen-sulfite））、緩衝液（例えば、ホウ酸塩、炭酸水素塩、Tris-HCl、クエン酸塩、リン酸塩または他の有機酸）、バルク剤（例えば、マンニトールまたはグリシン）、キレート化剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA））、錯化剤（例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、 β -シクロデキストリン、またはヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン）、充填剤、単糖類、二糖類、および他の炭水化物（例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン）、タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン）、着色剤、香料および希釈剤、乳化剤、親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）、保存剤（例えば、塩化ベンズアルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸、または過酸化水素）、溶媒（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール）、糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）、懸濁剤、界面活性剤または湿潤剤（例えば、プルロニック（pluronic）；PEG；ソルビタンエステル；ポリソルベート（例えば、ポリソルベート20またはポリソルベート80）；トリトン；トロメタミン；レシチン；コレステロールまたはチロキサポール（tyloxapal））、安定性増強剤（例えば、スクロースまたはソルビトール）、張度増強剤（例えば、ハロゲン化アルカリ金属（好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム）、またはマンニトール、ソルビトール）、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および/または薬学的なアジュバント。Remington's Pharmaceutical Sciences 第18版, A. R. Gennaro編, Mack Publishing Company 1990を参照のこと。

【0200】

最適な薬学的組成物は、当業者によって、例えば、意図される投与経路、送達形式、および所望の投薬量に依存して決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出を参照のこと。このような組成物は、FGFR-L分子の物理的な状態、安定性、インビボ放出の速度およびインビボクリアランスの速度に影響し得る。

【0201】

薬学的組成物における主要なビヒクルまたはキャリアは、本質的には、水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、注入のための適切なビヒクルまたはキャリアは、水、生理食塩水溶液または人工脳脊髄液であり得、これらは、非経口投与のための組成物において一般的な、他の材料で補充され得る。中性の緩衝化生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。他の例示的な薬学的組成物は、約pH7.0~8.5のTris緩衝液または約pH4.0~5.5の酢酸塩緩衝液を含み、これはさらに、ソルビトールまたは適切な代用物を含み得る。本発明の1つの実施形態において、FGFR-Lポリペプチド組成物は、所望の程度の純度を有する選択された組成物を、任意の処方薬剤(Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出)と混合することによって、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で、保存のために調製され得る。さらに、FGFR-Lポリペプチド産物は、スクロースのような適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として処方され得る。

【0202】

このFGFR-Lポリペプチドの薬学的組成物は、非経口送達のために選択され得る。あるいは、これらの組成物は、吸入または消化管を介する送達(例えば、経口的)のために選択され得る。このような薬学的に受容可能な組成物の調製は、当該分野の技術の範囲内にある。

【0203】

処方成分は、投与の部位に受容可能な濃度で存在する。例えば、緩衝液は、生理学的pHまたはわずかにより低いpH(典型的に、約5~約8のpH範囲内)にこの組成物を維持するために使用される。

【0204】

非経口投与が意図される場合、本発明における使用のための治療組成物は、薬学的に受容可能なビヒクル中に所望のFGFR-L分子を含む、発熱物質を含まない非経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。非経口注入のために特に適切なビヒクルは、滅菌蒸留水であり、ここで、FGFR-L分子は、滅菌の等張溶液として処方され、適切に保存される。なお別の調製物としては、所望の薬剤と、その産物の制御された放出または持続された放出（徐放）を提供する、注射可能なマイクロスフェア、生分解性（bio-erodible）粒子、ポリマー化合物（例えば、ポリ乳酸またはポリグリコール酸）、ビーズまたはリポソームのような因子との処方物が挙げられ得、これは、次いで、蓄積注射を介して送達され得る。ヒアルロン酸もまた使用され得、そしてこれは、循環中の持続時間を促進する効果を有し得る。所望の分子の導入のための他の適切な手段としては、移植可能な薬物送達デバイスが挙げられる。

【0205】

1つの実施形態において、薬学的組成物は、吸入のために処方され得る。例えば、FGFR-Lポリペプチドは、吸入のための乾燥粉末として処方され得る。FGFR-Lポリペプチドまたは核酸分子の吸入溶液はまた、エアロゾル送達のための噴霧剤と共に処方され得る。なお別の実施形態において、溶液は、噴霧され得る。肺投与は、PCT公開番号WO94/20069にさらに記載され、これは、化学的に改変されたタンパク質の肺送達を記載する。

【0206】

特定の処方物が、経口投与され得ることもまた意図される。本発明の1つの実施形態において、このよう様式で投与されるFGFR-Lポリペプチドは、固体投薬形態（例えば、錠剤またはカプセル）の調合において慣用的に使用されるキャリアを伴うかまたは伴わず処方され得る。例えば、カプセルは、バイオアベイラビリティが最大化されそして前全身性分解（pre-systemic degradation）が最小化される場合、胃腸管内にある時点でその処方物の活性部分を放出するように設計され得る。さらなる薬剤が、FGFR-Lポリペプチドの吸収を容易にするために含まれ得る。希釈剤、香料、低融点ワックス

、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、および結合剤もまた使用され得る。

【0207】

別の薬学的組成物は、錠剤の製造に適切な非毒性賦形剤との混合物中に、有効量のFGFR-Lポリペプチドを含み得る。錠剤を滅菌水または別の適切なビヒクルに溶解することによって、溶液が、単位用量形態で調製され得る。適切な賦形剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：不活性な希釈剤（例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムまたは炭酸水素ナトリウム、ラクトース、あるいはリン酸カルシウム）；または結合剤（例えば、デンプン、ゼラチンまたはアカシア）；あるいは潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルク）。

【0208】

さらなるFGFR-Lポリペプチドの薬学的組成物は、当業者に明らかであり、これらには、持続送達処方物または制御送達処方物中にFGFR-Lポリペプチドを含む処方物が挙げられる。種々の他の持続送達手段または制御送達手段（例えば、リポソームキャリア、生分解性微粒子あるいは多孔性ビーズ）の処方および蓄積注射のための技術もまた、当業者に公知である。例えば、PCT/US93/00829（これは、薬学的組成物の送達のための多孔性ポリマー性微粒子の制御された放出を記載する）を参照のこと。

【0209】

徐放性調製物のさらなる例としては、成形品の形態（例えば、フィルムまたはマイクロカプセル）の半透過性ポリマーマトリクスが挙げられる。徐放性マトリクスとしては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号および欧州特許第058481号）、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタメートとのコポリマー（Sidmanら, 1983, Biopolymers 22:547-56）、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)（Langerら, 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277およびLanger, 1982, Chem. Tech. 12:98-105）、エチレンビニルアセテート（Langerら, 前出）またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許第133988号）が挙げら

れ得る。徐放性組成物はまた、リポソームを含み得、これは、当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製され得る。例えば、Eppsteinら、1985、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-92；および欧州特許第036676号、同第088046号、および同第143949号を参照のこと。

【0210】

インビボ投与のために使用されるFGFR-Lの薬学的組成物は、代表的に、滅菌されていなければならない。これは、滅菌濾過膜を通す濾過によって達成され得る。組成物が凍結乾燥される場合、この方法を使用する滅菌は、凍結乾燥および再構成の前後のいずれかで実施され得る。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥された形態または溶液中で保存され得る。さらに、非経口組成物は、一般に、滅菌アクセスポートを有する容器（例えば、皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアル）内に配置される。

【0211】

一旦、薬学的組成物が処方されると、それは、滅菌バイアル中に、溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体としてか、あるいは乾燥粉末または凍結乾燥粉末として保存され得る。このような処方物は、すぐに使用できる形態または投与の前に再構成を必要とする形態（例えば、凍結乾燥形態）のいずれかで保存され得る。

【0212】

特定の実施形態において、本発明は、単回用量投与単位を生成するためのキットに関する。このキットは、各々、乾燥タンパク質を有する第一の容器および水性処方物を有する第二の容器の両方を備え得る。単一チャンバおよびマルチチャンバの予め充填されたシリンジ（例えば、液体シリンジおよび分散シリンジ（lyosyringe））を備えるキットもまた、本発明の範囲内に含まれる。

【0213】

治療的に使用されるFGFR-Lの薬学的組成物の有効量は、例えば、治療の内容および目的に依存する。従って、処置のための適切な投薬レベルが、送達される分子、FGFR-L分子が使用される指標、投与の経路、ならびに患者のサ

イズ（体重、体表面、または器官のサイズ）および状態（年齢および全身的な健康状態）に部分的に依存して変化することが、当業者に理解される。従って、臨床家は、最適な治療効果を得るために、投薬量を滴定（titer）し得、そして投与経路を改変し得る。代表的な投薬量は、上記の因子に依存して、約0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約100 mg/kg 以上の範囲にあり得る。他の実施形態において、投薬量は、0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約100 mg/kg ; または1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約100 mg/kg ; または5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約100 mg/kg の範囲にあり得る。

【0214】

投薬の頻度は、使用される処方物中でのFGFR-L分子の薬物動態学的パラメーターに依存する。典型的に、臨床家は、所望の効果を達成する投薬量に達するまで組成物を投与する。従って、組成物は、単回用量として、長期にわたって2回以上の用量（これは、同じ量の所望の分子を含んでも、含まなくてもよい）として、あるいは移植デバイスまたはカテーテルを介する連続的な注入として、投与され得る。適切な投薬量のさらなる改良は、当業者によって慣用的になされ、そして当業者によって慣用的に実施される作業の範囲内にある。適切な投薬量は、適切な用量 - 応答データの使用を介して確認され得る。

【0215】

薬学的組成物の投与の経路は、公知の方法に従い、例えば、経口的にか；静脈内、腹腔内、大脳内（実質内）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内または病巣内の経路による注入を介するか；徐放系によるか；または移植デバイスによる。所望される場合、これらの組成物は、ボラス注射によって投与され得るか、または注入によって連続的に投与され得るか、または移植デバイスによって投与され得る。

【0216】

あるいは、またはさらに、組成物は、膜、スポンジ、または所望の分子が吸収されるかまたはカプセル化される他の適切な材料の移植を介して局所的に投与され得る。移植デバイスが使用される場合、このデバイスは、任意の適切な組織または器官に移植され得、そして所望の分子の送達は、拡散、時限放出ボラスま

たは連続的な投与を介し得る。

【0217】

いくつかの場合において、エキソビボ様式において、FGFR-Lポリペプチドの薬学的組成物を使用することが所望され得る。このような例において、患者から取り出された細胞、組織または器官は、これらの細胞、組織、または器官がその後患者に移植し戻された後に、FGFR-Lポリペプチド薬学的組成物に曝露される。

【0218】

他の場合において、FGFR-Lポリペプチドは、本明細書中に記載されるような方法を使用して遺伝子操作されてFGFR-Lポリペプチドを発現および分泌する特定の細胞を移植することによって送達され得る。このような細胞は、動物またはヒト細胞であり得、そして自己、異種(heterologous)、または異種間(xenogeneic)であり得る。必要に応じて、細胞は、不死化され得る。免疫学的応答の機会を減少するために、細胞は、周囲の組織の浸潤を回避するようにカプセル化され得る。カプセル化材料は、典型的に、生体適合性の半透性ポリマーの包囲物または膜であり、これらは、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系によるかまたは周囲の組織からの他の有害な因子による細胞の破壊を防止する。

【0219】

本明細書中において議論されるように、単離された細胞集団(例えば、幹細胞、リンパ球、赤血球、軟骨細胞、ニューロンなど)を1つ以上のFGFR-Lポリペプチドで処理することが、望ましくあり得る。これは、このポリペプチドが、細胞膜に対して透過性の形態である場合には、単離された細胞をこのポリペプチドに直接曝露することによって達成され得る。

【0220】

本発明のさらなる実施形態は、治療ポリペプチドのインビトロ産生と、遺伝子治療または細胞治療による治療ポリペプチドの産生および送達との両方のための、細胞および方法(例えば、相同組換えおよび/または他の組換え産生方法)に関する。相同組換えおよび他の組換えの方法を使用して、通常は転写的にサイレ

ントなFGFR-L遺伝子(すなわち、過少発現される遺伝子)を含む細胞を改変し得、これによって、治療有効量のFGFR-Lポリペプチドを発現する細胞を産生し得る。

【0221】

相同組換えは、転写的に活性な遺伝子における変異を誘導または矯正するように遺伝子を標的化するために元々開発された技術である(Kucherlapati, 1989, *Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol.* 36:301,)。この基本的技術は、特定の変異を、哺乳動物ゲノムの特定の領域へ導入するための方法として(Thomasら、1986, *Cell*, 44:419-428; ThomasおよびCapecchi, 1987, *Cell*, 51:503-512; Doetschmanら、1988, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:8583-8587)、または欠損遺伝子内の特定の変異を矯正するための方法として(Doetschmanら、*Nature*, 330:576-578, 1987)開発された。例示的な相同組換え技術は、米国特許第5,272,071号、欧州特許番号第913051号、同第505500号; PCT/US90/07642、PCT公開第WO91/09955に記載される。

【0222】

相同組換えを介して、ゲノム中に挿入されるべきDNA配列は、標的化DNAにこのDNA配列を結合することによって、目的の遺伝子の特定の領域に指向され得る。この標的化DNAは、ゲノムDNA領域に相補的である(相同である)ヌクレオチド配列である。ゲノムの特定の領域に相補的である標的化DNAの小片は、DNA複製プロセスの間に親鎖と接触下に置かれる。共有される相同領域を介して内因性DNAの他の小片とハイブリダイズし、そして従って、組み換わることは、細胞内に挿入されたDNAの一般的な特性である。この相補鎖が、変異または異なる配列またはさらなるヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドに結合された場合、これもまた、新たに合成された鎖に組換えの結果として組み込まれる。プルーフリーディング機能の結果として、この新たなDNA配列が、テンプレートとして作用することが可能である。このように、この移入されたDNA

は、ゲノム内に組み込まれる。

【0223】

F G F R - L ポリペプチドと相互作用し得るかまたは F G F R - L ポリペプチドの発現を制御し得る DNA 領域（例えば、隣接配列）が、標的化 DNA のこれらの小片に結合される。例えば、プロモーター/エンハンサーエレメント、サブレッサーまたは外因性転写調節エレメントが、所望の F G F R - L ポリペプチドをコードする DNA の転写に影響を与えるに十分に近位でかつ十分な方向で、その意図される宿主細胞のゲノムに挿入される。制御エレメントは、宿主細胞ゲノム中に存在する DNA の一部を制御する。従って、所望の F G F R - L ポリペプチドの発現は、F G F R - L 遺伝子自体をコードする DNA のトランスフェクションによってではなく、むしろ DNA 調節セグメントと結合された標的化 DNA（その目的の内因性遺伝子と相同な領域を含む）の使用によって達成され得、この調節セグメントは、F G F R - L 遺伝子の転写について認識可能なシグナルを、その内因性遺伝子配列に提供する。

【0224】

例示的な方法において、細胞内の所望の標的化された遺伝子（すなわち、所望の内因性の細胞遺伝子）の発現は、少なくとも調節配列、エキソンおよびスプライドナー部位を含む DNA の導入による、予め選択された部位でのその細胞ゲノムへの相同組換えを介して変更される。これらの成分は、実際には、これらの成分が、新たな転写単位の産生を生じる（ここで、その DNA 構築物中に存在する調節配列、エキソンおよびスプライドナー部位が、内因性遺伝子に作動的に連結される）様式で染色体（ゲノム）DNA 中に導入される。染色体 DNA へのこれらの成分の導入の結果として、所望の内因性遺伝子の発現が変更される。

【0225】

本明細書中に記載されるように、変更された遺伝子発現は、得られたときの細胞において通常サイレントな（発現されない）遺伝子を活性化すること（または発現されるのを引き起こすこと）、ならびに得られたときの細胞において生理学的に重要なレベルで発現されない遺伝子の発現を増大させることを包含する。この実施形態はさらに、得られたときの細胞において生じる調節または誘導のパタ

ーンとは異なるように調節または誘導のパターンを変更すること、ならびに得られたときの細胞において発現される遺伝子の発現を減少させること（除去することを含む）を包含する。

【0226】

相同組換えを用いて、細胞の内因性FGFR-L遺伝子からのFGFR-Lポリペプチド産生を増大させ得るかまたは生じさせ得る1つの方法は、第1に、相同組換えを用いて部位特異的組換え系（例えば、Cre/loxP、FLP/FRIT）（Sauer, 1994, Curr. Opin. Biotechnol. 5: 521-527; およびSauer, 1993, Methods Enzymol. 225: 890-900）由来の組換え配列を、細胞の内因性ゲノムFGFR-Lポリペプチドコード領域の上流に（すなわち、5'側に）配置することを含む。ゲノムFGFR-Lポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された部位に相同な組換え部位を含むプラスミドは、この改変された細胞株に、適切なリコンビナーゼ酵素と共に導入される。このリコンビナーゼ酵素は、このプラスミドを、プラスミドの組換え部位を介して、その細胞株におけるゲノムFGFR-Lポリペプチドコード領域のすぐ上流に位置する組換え部位に組み込ませる（BaubonisおよびSauer, 1993, Nucleic Acids Res., 21: 2025-2029; およびO'Gormanら, 1991, Science, 251: 1351-1355）。転写を増大させることが公知の任意の隣接配列（例えば、エンハンサー/プロモーター、イントロン、翻訳エンハンサー）は、このプラスミド内に適切に配置された場合に、新たな転写単位または改変された転写単位を作製するような様式で組み込み、この細胞の内因性FGFR-L遺伝子からのデノボFGFR-Lポリペプチド産生または増大したFGFR-Lポリペプチド産生をもたらす。

【0227】

部位特異的な組換え配列がその細胞の内因性ゲノムFGFR-Lポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された細胞株を使用するためのさらなる方法は、相同組換えを使用して、第2の組換え部位を、この細胞株のゲノムの他の箇所に導入することである。次いで、適切なリコンビナーゼ酵素が、この2つの組換え部

位の細胞株に導入されて、これが、組換え事象（欠失、反転または転移）を引き起こす。この組換え事象は、新たな転写単位または改変された転写単位を作製し、この転写単位が、この細胞の内因性FGFR-L遺伝子からのデノボFGFR-Lポリペプチド産生または増加したFGFR-Lポリペプチド産生を生じる（Sauer, 1994, Curr. Opin. Biotechnol. 5; 521-27; およびSauer, 1993, Methods Enzymol. 225: 890-900）。

【0228】

細胞の内因性FGFR-L遺伝子からのFGFR-Lポリペプチドの発現を増加させるかまたは引き起こすためのさらなるアプローチは、細胞の内因性FGFR-L遺伝子からのデノボFGFR-Lポリペプチド産生または増加したFGFR-Lポリペプチド産生を生じる様式で、ある遺伝子（単数または複数）（例えば、転写因子）の発現を増加させるかもしくは引き起こすこと、および/またはある遺伝子（単数または複数）（例えば、転写リプレッサー）の発現を減少させることを包含する。この方法は、細胞の内因性FGFR-L遺伝子からのデノボFGFR-Lポリペプチド産生または増加したFGFR-Lポリペプチド産生が生じるように、天然には存在しないポリペプチド（例えば、転写因子ドメインに融合した部位特異的DNA結合ドメインを含むポリペプチド）をその細胞に導入することを包含する。

【0229】

本発明は、さらに、標的遺伝子の発現を変化させる方法において有用なDNA構築物に関する。特定の実施形態において、例示的なDNA構築物は、以下を含む：（a）1つ以上の標的化配列；（b）調節配列；（c）エクソン；および（d）不対（unpaired）スプライドナー部位。このDNA構築物における標的化配列は、細胞中の標的遺伝子へのエレメント（a）～（d）の取り込みを、エレメント（b）～（d）がその内因性標的遺伝子の配列に作動可能に連結されるように、指向する。別の実施形態においては、DNA構築物は、以下を含む：（a）1つ以上の標的化配列、（b）調節配列、（c）エクソン、（d）スプライドナー部位、（e）イントロン、および（f）スプライスアクセプター

部位；ここで、この標的化配列は、エレメント（a）～（f）の取り込みを、（b）～（f）のエレメントが内因性遺伝子に作動可能に連結されるように、指向する。この標的化配列は、相同組換えが生じる細胞染色体DNAにおける所定の部位に相同である。この構築物において、エキソンは、一般に、調節配列の3'側であり、そしてスプライドナー部位は、エキソンの3'側である。

【0230】

特定の遺伝子の配列（例えば、本明細書中に提示されるFGFR-Lポリペプチドの核酸配列）が既知である場合には、この遺伝子の選択された領域に相補的なDNA小片は、合成され得るか、またはさもなければ、例えば、その目的の領域に結合する特異的な認識部位でのネイティブDNAの適切な制限処理によって、得られ得る。この小片は、細胞への導入時に標的化配列として作用し、そしてゲノム内のその相同領域とハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションがDNA複製の間にかかる場合、このDNA小片およびこのDNA小片に結合した任意のさらなる配列は、岡崎フラグメントとして作用し、そして新たに合成されたDNAの娘鎖に組み込まれる。従って、本発明は、FGFR-Lポリペプチドをコードするヌクレオチドを包含し、このヌクレオチドは、標的化配列として使用され得る。

【0231】

FGFR-Lポリペプチド細胞治療（例えば、FGFR-Lポリペプチドを産生する細胞の移植）もまた意図される。この実施形態は、生物学的に活性な形態のFGFR-Lポリペプチドを合成および分泌し得る細胞を移植することを包含する。このような可溶性FGFR-Lポリペプチド産生細胞は、FGFR-Lポリペプチドの天然の産生者である細胞であり得るか、または所望のFGFR-Lポリペプチドをコードする遺伝子もしくはFGFR-Lポリペプチドの発現を増強する遺伝子で形質転換することによってそのFGFR-Lポリペプチドを産生する能力が増強された、組換え細胞であり得る。このような改変は、その遺伝子を送達するため、ならびにその発現および分泌を促進するために適したベクターによって、達成され得る。FGFR-Lポリペプチドを投与される患者において、外来種のポリペプチドの投与によって生じ得るような潜在的な免疫学的反応を

最小化するためには、FGFR-Lポリペプチドを産生する天然の細胞が、ヒト起源でありかつヒトFGFR-Lポリペプチドを産生することが、好ましい。同様に、FGFR-Lポリペプチドを産生する組換え細胞が、ヒトFGFR-Lポリペプチドをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換されることが、好ましい。

【0232】

移植される細胞は、周囲の組織の浸潤を回避するために、カプセル化され得る。ヒトまたは非ヒト動物の細胞は、FGFR-Lポリペプチドの放出を可能にするが患者の免疫系によるかまたは周囲の組織からの他の有害な因子による細胞の破壊を防止する、生体適合性の半透過性のポリマー包皮または膜内で、患者に移植され得る。あるいは、FGFR-Lポリペプチドを産生するようエキソビボで形質転換された患者自身の細胞が、このようなカプセル化なしに、患者に直接移植され得る。

【0233】

生存細胞をカプセル化するための技術は、当該分野において公知であり、そしてカプセル化された細胞の調製およびこれらの患者への移植は、慣例的に達成され得る。例えば、Baetgerら(PCT公開番号WO95/105452およびPCT/US94/09299)は、生物学的に活性な分子の効果的な送達のための、遺伝子操作された細胞を含む膜カプセルを記載する。これらのカプセルは生体適合性であり、そして容易に回収可能である。これらのカプセルは、プロモーターに作動可能に連結された生物学的に活性な分子をコードするDNA配列を含む組換えDNA分子でトランスフェクトされた細胞をカプセル化し、これらの細胞は、哺乳動物宿主への移植の際に、インビボでのダウンレギュレーションに供されない。このデバイスは、生存細胞からレシピエント内の特異的な部位への分子の送達を提供する。さらに、米国特許第4,892,538号、同第5,011,472号、および同第5,106,627号を参照のこと。生存細胞をカプセル化するための系は、PCT公開番号WO91/10425(Aebischerら)に記載されている。PCT公開番号WO91/10470(Aebischerら); Winnら、1991, Exper. Neurol.,

113:322-329, Aebischerら、1991, Exper. Neurol., 111:269-275, ;およびTrescoら、1992, ASAIO, 38:17-23もまた参照のこと。

【0234】

FGFR-Lポリペプチドのインビボおよびインビトロ遺伝子治療送達もまた想定される。遺伝子治療技術の1つの例は、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターに作動可能に連結され得るFGFR-LポリペプチドをコードするFGFR-L遺伝子(ゲノムDNA、cDNA、および/または合成DNAのいずれか)を使用して、「遺伝子治療DNA構築物」を形成することである。このプロモーターは、内因性FGFR-L遺伝子に対して同種であっても異種であってもよいが、但し、この構築物が挿入される細胞または組織型において、このプロモーターは、活性である。遺伝子治療DNA構築物の他の成分は、必要に応じて、部位特異的組み込みのために設計されたDNA分子(例えば、相同組換えのために有用な内因性配列)、組織特異的なプロモーター、エンハンサーまたはサイレンサー、親細胞より優れた選択的利点を提供し得るDNA分子、形質転換された細胞を同定するための標識として有用なDNA分子、ネガティブ選択系、細胞特異的結合因子(例えば、細胞標的化のため)、細胞特異的インターナリゼーション因子、ベクターによる発現を増強するための転写因子、およびベクターの産生を可能にする因子を含み得る。

【0235】

次いで、遺伝子治療DNA構築物は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを使用して、細胞に(エキソビボまたはインビボでのいずれかで)導入され得る。遺伝子治療DNA構築物を導入するための1つの手段は、本明細書中に記載されるようなウイルスベクターによる手段である。特定のベクター(例えば、レトロウイルスベクター)は、DNA構築物を細胞の染色体DNAに送達し、そしてこの遺伝子は、染色体DNAに組み込み得る。他のベクターは、エピソームとして機能し、そして遺伝子治療DNA構築物は、細胞質内に残る。

【0236】

なお別の実施形態において、調節エレメントが、標的細胞におけるFGFR-

L 遺伝子の制御された発現のために含まれ得る。このようなエレメントは、適切なエフェクターに対する応答の際に、オンにされる。この様式で、治療ポリペプチドは、所望のときに発現され得る。1つの従来の制御手段は、小分子結合ドメインおよび生物学的プロセスを開始し得るドメインを含むキメラタンパク質（例えば、DNA結合タンパク質または転写活性化タンパク質）を二量体化するために使用される、小分子二量体化剤またはラパログ（rapalog）の使用を包含する（PCT公開番号WO 96/41865、WO 97/31898、およびWO 97/31899を参照のこと）。このタンパク質の二量体化を使用して、導入遺伝子の転写を開始し得る。

【0237】

代替の調節技術は、目的の遺伝子から発現されたタンパク質を、その細胞の内側で凝集体またはクラスターとして貯蔵する方法を使用する。目的の遺伝子は、融合タンパク質として発現され、この融合タンパク質は、条件的凝集ドメインを含み、このドメインは、小胞体内での凝集したタンパク質の保持を生じる。貯蔵されたタンパク質は、細胞内で安定でありそして不活性である。しかし、これらのタンパク質は、条件的凝集ドメインを除去し、これによってこの凝集体またはクラスターを特異的に破壊する薬物（例えば、小分子リガンド）を投与することによって、放出され得、その結果、これらのタンパク質は、その細胞から分泌され得る。Aridorら、2000、Science 287:816-817 およびRiveraら、2000、Science 287, 826-830を参照のこと。

【0238】

他の適切な制御手段または遺伝子スイッチとしては、本明細書中に記載される系が挙げられるが、これらに限定されない。ミフェプリストン（RU486）が、プロゲステロンアンタゴニストとして使用される。プロゲステロンアンタゴニストに対する、改変されたプロゲステロンレセプターリガンド結合ドメインの結合は、2つの転写因子の二量体の形成し、次いで、これらの転写因子が、核を通過してDNAに結合することによって、転写を活性化する。このリガンド結合ドメインは、そのレセプターがその天然のリガンドに結合する能力を排除するよう改

変される。改変されたステロイドホルモンレセプター系は、米国特許第5,364,791号ならびにPCT公開番号WO96/40911およびWO97/10337に、さらに記載されている。

【0239】

なお別の制御系は、エクジソン（ショウジョウバエのステロイドホルモン）を使用し、これは、エクジソンレセプター（細胞質レセプター）に結合し、そしてこのレセプターを活性化する。次いで、このレセプターは、核に転移して、特定のDNA応答エレメント（エクジソン応答性遺伝子由来のプロモーター）を結合する。エクジソンレセプターは、転写を開始するための、トランス活性化ドメイン、DNA結合ドメインおよびリガンド結合ドメインを含む。エクジソン系は、米国特許第5,514,578号ならびにPCT公開番号WO97/38117、WO96/37609、およびWO93/03162にさらに記載されている。

【0240】

別の制御手段は、ポジティブなテトラサイクリン制御可能トランスアクチベーターを使用する。この系は、転写を活性化させるポリペプチドに連結された、変異tetリプレッサータンパク質DNA結合ドメイン（逆テトラサイクリン調節トランスアクチベータータンパク質（すなわち、これは、テトラサイクリンの存在下で、tetオペレーターに結合する）を生じる変異tet R-4アミノ酸変化）を含む。このような系は、米国特許第5,464,758号、同第5,650,298号、および同第5,654,168号に記載されている。

【0241】

さらなる発現制御系および核酸構築物は、Innovir Laboratories Inc. に対する米国特許第5,741,679号および同第5,834,186号に記載されている。

【0242】

インビボ遺伝子治療は、FGFR-Lポリペプチドをコードする遺伝子を、FGFR-L核酸分子の局所的注射を介してかまたは他の適切なウイルス送達ベクターもしくは非ウイルス送達ベクターによって、細胞に導入することにより達成

され得る (Hef ti, 1994, Neurobiology, 25:1418-1435,)。例えば、FGFR-Lポリペプチドをコードする核酸分子は、標的化された細胞への送達のために、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに含まれ得る(例えば、Johnson, PCT公開番号WO95/34670; およびPCT出願番号PCT/US95/07178)。組換えAAVゲノムは、代表的に、機能的プロモーターおよびポリアデニル化配列に作動可能に連結されたFGFR-LポリペプチドをコードするDNA配列に隣接する、AAV逆方向末端反復を含む。

【0243】

代替の適切なウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、レンチウイルスベクター、肝炎ウイルスベクター、パルボウイルスベクター、パポバウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、コロナウイルスベクター、ラブドウイルスベクター、パラミクソウイルスベクター、およびパピローマウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。米国特許第5,672,344号は、組換え神経栄養性HSV-1ベクターを含む、インビボウイルス媒介遺伝子移入系を記載する。米国特許第5,399,346号は、治療タンパク質をコードするDNAセグメントを挿入するようインビトロで処理されたヒト細胞の送達による、患者に治療タンパク質を提供するためのプロセスの例を、提供する。遺伝子治療技術の実施のさらなる方法および材料は、米国特許第5,631,236号(アデノウイルスベクターを含む);米国特許第5,672,510号(レトロウイルスベクターを含む);および米国特許第5,635,399号(サイトカインを発現するレトロウイルスベクターを含む)に記載されている。

【0244】

非ウイルス送達方法としては、リポソーム媒介移入、裸のDNA送達(直接注入)、レセプター媒介移入(リガンド-DNA複合体)、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、および微粒子ボンバードメント(例えば、遺伝子銃)が挙げられるが、これらに限定されない。遺伝子治療の材料および方法として

はまた、誘導性プロモーター、組織特異的エンハンサー - プロモーター、部位特異的組み込みのために設計されたDNA配列、親細胞より優れた選択的利点を提供し得るDNA配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブ選択系および発現制御系（安全性の尺度）、細胞特異的結合因子（細胞標的化のため）、細胞特異的インターナリゼーション因子、およびベクターによる発現を増強するための転写因子、ならびにベクター作製の方法が挙げられ得る。遺伝子治療技術の実施のための、このようなさらなる方法および材料は、米国特許第4,970,154号（エレクトロポレーション技術を含む）、米国特許第5,679,559号（遺伝子送達のためのリポタンパク質含有系を記載する）、米国特許第5,676,954号（リポソームキャリアを含む）、米国特許第5,593,875号（リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法を記載する）、米国特許第4,945,050号（生物学的に活性な粒子が、細胞において、この粒子がこの細胞の表面を貫通しそしてこの細胞の内側に取り込まれる速度で推進されるプロセス、を記載する）、およびPCT公開番号WO96/40958（核リガンドを含む）に記載されている。

【0245】

FGFR - L 遺伝子治療または細胞治療が、同じまたは異なる細胞における1つ以上のさらなるポリペプチドの送達をさらに含み得ることがまた意図される。このような細胞は、患者に別々に導入され得るか、またはこれらの細胞は、単一の移植可能なデバイス（例えば、上記のカプセル化膜）内に含まれ得るか、または細胞は、ウイルスベクターによって別々に改変され得る。

【0246】

遺伝子治療を介して細胞における内因性FGFR - Lポリペプチド発現を増加させるための手段は、1つ以上のエンハンサーエレメントをFGFR - Lポリペプチドプロモーターに挿入することであり、ここで、このエンハンサーエレメントは、FGFR - L 遺伝子の転写活性を増加させるよう作用し得る。使用されるエンハンサーエレメントは、遺伝子を活性化することが所望される組織に基づいて選択される；この組織においてプロモーター活性化を与えることが公知であるエンハンサーエレメントが、選択される。例えば、FGFR - Lポリペプチドを

コードする遺伝子がT細胞において「オンにされる」場合には、I c kプロモーターエンハンサーエレメントが使用され得る。ここで、不可される転写エレメントの機能性部分は、標準的なクローニング技術を使用して、F G F R - Lポリペプチドプロモーターを含むDNAのフラグメントに挿入され得る（そして必要に応じて、ベクターおよび/または5'および/または3'隣接配列に挿入され得る）。次いで、この構築物（「相同組換え構築物」として公知）が、エキソピボでかまたはインピボでのいずれかで、所望の細胞に導入され得る。

【0247】

遺伝子治療はまた、内因性プロモーターのヌクレオチド配列を改変することによって、F G F R - Lポリペプチド発現を減少させるために、使用され得る。このような改変は、代表的に、相同組換え法を介して達成される。例えば、不活化について選択されたF G F R - L遺伝子のプロモーターの全てまたは一部を含むDNA分子は、転写を調節するプロモーター片を除去および/または置換するように、操作され得る。例えば、プロモーターの転写アクチベーターのT A T Aボックスおよび/または結合部位が、標準的な分子生物学の技術を使用して、欠失され得る；このような欠失は、プロモーター活性を阻害し得、これによって、対応するF G F R - L遺伝子の転写を抑制する。プロモーターにおけるT A T Aボックスまたは転写アクチベーター結合部位の欠失は、（調節されるF G F R - L遺伝子と同じ種かまたは関連する種由来の）F G F R - Lポリペプチドプロモーターの全てまたは関連する部分を含むDNA構築物を生成することによって達成され得、ここで、1つ以上のT A T Aボックスおよび/または転写アクチベーター結合部位のヌクレオチドが、1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失および/または挿入を介して変異される。その結果、T A T Aボックスおよび/またはアクチベーター結合部位は、活性が減少されているか、または完全に不活性にされている。この構築物はまた、代表的に、その改変されたプロモーターセグメントに隣接するネイティブな（内因性の）5'および3' DNA配列に対応する、少なくとも約500塩基のDNAを含む。この構築物は、直接的にかまたは本明細書中に記載されるようなウイルスベクターを介して、適切な細胞に（エキソピボでかまたはインピボでかのいずれかで）導入され得る。代表的に、細胞のゲノムD

NAへのこの構築物の組み込みは、相同組換えを介し、ここで、このプロモーター構築物における5'および3' DNA配列は、ハイブリダイゼーションを介するその内因性染色体DNAへの改変されたプロモーター領域の組み込みを補助するよう作用し得る。

【0248】

(治療的使用)

FGFR-L核酸分子、ポリペプチド、ならびにそれらのアゴニストおよびアンタゴニストは、本明細書中に引用される疾患、障害または状態を含む、多くの疾患、障害または状態を処置、診断、改善または予防するために使用され得る。

【0249】

FGFR-Lポリペプチドアゴニストおよびアンタゴニストとしては、FGFR-Lポリペプチド活性を調節し、そしてFGFR-Lポリペプチドの成熟形態の少なくとも1つの活性を増加または減少する、アゴニスト分子およびアンタゴニスト分子が挙げられる。アゴニストまたはアンタゴニストは、FGFR-Lポリペプチドと相互作用し、それによってそのFGFR-Lの活性を調節する、補因子(例えば、タンパク質、ペプチド、糖質、脂質または低分子量分子)であり得る。潜在的なポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストとしては、FGFR-Lポリペプチドの可溶性形態または膜結合形態のいずれかと反応する抗体が挙げられ、これらの形態は、FGFR-Lタンパク質の細胞外ドメインの全てまたは一部を含む。FGFR-Lポリペプチド発現を調節する分子としては、代表的に、発現のアンチセンス調節因子として作用し得る、FGFR-Lポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。

【0250】

FGFR-Lポリペプチドの細胞外ドメインは、線維芽細胞増殖因子(FGF)レセプターファミリーの遺伝子と配列同一性を共有することが見出され、FGFR-L核酸分子、ポリペプチド、ならびにそれらのアゴニストおよびアンタゴニスト(抗FGFR-L選択的結合因子が挙げられるが、これらに限定されない)は、新規な増殖因子の同定において有用であり得る。

【0251】

FGFR-LポリペプチドとFGFレセプターファミリーとの間の配列同一性はまた、FGFR-Lポリペプチドが、線維芽細胞、内皮細胞および上皮細胞における有糸分裂誘発において役割を果たし得ることを示唆する。このような上皮細胞としては、膵管細胞が挙げられ、これは、FGFに応答して分化し、インスリン産生 島細胞を形成することが示されている。3~4 kb FGFR-L転写物に加えて、膵臓はまた、FGFR-Lポリペプチド改変体をコードし得る、6 kbの転写物を発現する。この潜在的なFGFR-Lポリペプチド改変体は、FGFR-L転写物の活性とは異なる活性を有し得る。従って、FGFR-L核酸分子、ポリペプチド、ならびにそれらのアゴニストおよびアンタゴニストは、組織修復、創傷治癒、脈管形成の調節、ならびに糖尿病の診断および処置に有用であり得る。

【0252】

いくつかの腫瘍細胞株において、FGFR-Lポリペプチドの細胞外ドメインは、培養培地中に流される。このことは、FGFR-Lポリペプチドの細胞外ドメインが、腫瘍細胞の増殖および/または分化において役割を果たし得ることを示唆する。従って、FGFR-L核酸分子、FGFR-Lポリペプチド、ならびにそれらのアゴニストおよびアンタゴニストは、癌の診断および処置に有用であり得る。

【0253】

FGFR-L遺伝子は、造血幹細胞の維持を支持する、骨髄間質細胞株において上方調節されることが見出された。従って、FGFR-L核酸分子およびFGFR-Lポリペプチドは、幹細胞のエキソビボ拡大、遺伝子治療プロトコル、または造血障害の処置に有用であり得る。

【0254】

FGFR-L遺伝子はまた、破骨細胞発生(osteoclastogenesis)の条件下で上方調節されることが見出された。従って、FGFR-L核酸分子、FGFR-Lポリペプチド、ならびにそれらのアゴニストおよびアンタゴニストは、骨の障害(骨粗鬆症、大理石骨病、骨形成不全症、パジェット病、歯周疾患および高カルシウム血症を含むが、これらの限定されない)の診断およ

び処置に有用であり得る。

【0255】

FGFR-Lポリペプチド発現は、腎臓において検出された。従って、FGFR-L核酸分子、FGFR-Lポリペプチド、ならびにそれらのアゴニストおよびアンタゴニストは、腎臓に関連する疾患の診断および/または処置に有用であり得る。このような疾患の例としては、急性糸球体腎炎および慢性糸球体腎炎が挙げられるが、これらに限定されない。腎臓に関連する他の疾患は、本発明の範囲内に包含される。

【0256】

FGFR-L遺伝子は、インサイチュハイブリダイゼーションによって決定された場合に、脂肪組織において最も豊富に発現される。この発現パターンに基づいて、FGFR-Lポリペプチドは、脂肪生成または脂肪細胞機能（エネルギーバランス制御およびリポリシスを含むが、これらに限定されない）において役割を果たし得る。従って、FGFR-L核酸分子、FGFR-Lポリペプチド、ならびにそれらのアゴニストおよびアンタゴニストはまた、食事量の減少、体重の増加の達成、または悪液質の処置に有用であり得る。

【0257】

FGFR-Lポリペプチド機能のアゴニストまたはアンタゴニストは、処置される状態に適切であるように、1以上のサイトカイン、増殖因子、抗生物質、抗炎症剤、および/または化学療法剤と組み合わせて（同時にまたは連続的に）使用され得る。

【0258】

FGFR-Lポリペプチドの所望でないレベルによって生じるかまたは媒介される他の疾患は、本発明の範囲内に包含される。所望でないレベルには、FGFR-Lポリペプチドの過剰なレベルおよびFGFR-Lポリペプチドの正常下のレベルが含まれる。

【0259】

（FGFR-L核酸およびFGFR-Lポリペプチドの使用）

本発明の核酸分子（それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない

核酸分子を含む)を使用して、FGFR-L遺伝子および関連する遺伝子の染色体上の位置をマッピングし得る。マッピングは、当該分野で公知の技術(例えば、PCR増幅およびインサイチュハイブリダイゼーション)により行われ得る。

【0260】

FGFR-L核酸分子(それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む)は、哺乳動物組織または体液サンプル中のFGFR-L核酸分子の存在について、定性的または定量的のいずれかで試験するための、診断アッセイにおけるハイブリダイゼーションプローブとして有用であり得る。

【0261】

他の方法はまた、1つ以上のFGFR-Lポリペプチドの活性を阻害することが所望される場合に使用され得る。このような阻害は、発現制御配列(三重らせん形成)またはFGFR-L mRNAに相補的でありかつ発現制御配列(三重らせん形成)またはFGFR-L mRNAにハイブリダイズする核酸分子によりもたらされ得る。例えば、アンチセンスDNAまたはRNA分子(これらは、FGFR-L遺伝子の少なくとも一部に相補的である配列を有する)が、細胞中に導入され得る。アンチセンスプローブは、本明細書中に開示されるFGFR-L遺伝子の配列を使用して、利用可能な技術により設計され得る。代表的には、このようなアンチセンス分子の各々は、選択された各FGFR-L遺伝子の開始部位(5'末端)に相補的である。このアンチセンス分子が、次いで、対応するFGFR-L mRNAにハイブリダイズする場合、このmRNAの翻訳は、妨げられるかまたは減少される。アンチセンスインヒビターは、細胞または生物におけるFGFR-Lポリペプチドの減少または非存在に関連する情報を提供する。

【0262】

あるいは、遺伝子治療を使用して、1つ以上のFGFR-Lポリペプチドのドミナントネガティブインヒビターを作製し得る。この状況において、各選択されたFGFR-Lポリペプチドの変異体ポリペプチドをコードするDNAが調製され得、そして本明細書中に記載されるウイルスまたは非ウイルスの方法のいずれかを使用して患者の細胞中に導入され得る。このような変異体の各々は、代表的

に、その生物学的役割において内因性ポリペプチドと競合するように設計される。

【0263】

さらに、FGFR-Lポリペプチドは、生物学的に活性であっても活性でなくても、免疫原として使用され得、すなわち、これらのポリペプチドは、それに対して抗体が惹起され得る、少なくとも1つのエピトープを含有する。FGFR-Lポリペプチドに結合する選択的結合因子（本明細書中に記載されるような）は、インビボおよびインビトロでの診断目的のために使用され得、これらの目的としては、体液サンプルまたは細胞サンプル中のFGFR-Lポリペプチドの存在を検出するための標識された形態での使用を含むが、これに限定されない。これらの抗体もまた、本明細書中に列挙される疾患および障害を含む、多数の疾患および障害を、予防、処置または診断するために使用され得る。これらの抗体は、FGFR-Lポリペプチドの少なくとも1つの活性特徴を減少またはブロックするようにFGFR-Lポリペプチドに結合し得るか、またはポリペプチドに結合してFGFR-Lポリペプチドの少なくとも1つの活性特徴を増加し得る（FGFR-Lポリペプチドの薬物動態を増加させることによるものを含む）。

【0264】

FGFR-Lポリペプチドは、「発現クローニング」ストラテジーを使用して、FGFR-Lポリペプチドリガンドをクローニングするために使用され得る。放射性標識（¹²⁵ヨウ素）したFGFR-Lポリペプチドまたは「アフィニティ/活性-タグ化」FGFR-Lポリペプチド（例えば、Fc融合体またはアルカリホスファターゼ融合体）を結合アッセイにおいて使用して、FGFR-Lポリペプチドリガンドを発現する細胞型、細胞株または組織を同定し得る。次いで、このような細胞または組織から単離されたRNAを、cDNAに変換し、哺乳動物発現ベクターにクローニングし、そして哺乳動物細胞（例えば、COSまたは293細胞）にトランスフェクトして発現ライブラリーを作製し得る。次いで、放射性標識化またはタグ化FGFR-Lポリペプチドを、アフィニティ試薬として使用して、FGFR-Lポリペプチドリガンドを発現する、このライブラリー中の細胞のサブセットを同定および単離し得る。次いで、DNAを、これらの

細胞から単離しそして哺乳動物細胞にトランスフェクトして、二次発現ライブラリー（ここで、FGFR-Lポリペプチドリガンドを発現する細胞の画分は、元のライブラリーよりも何倍も高い）を作製し得る。この富化プロセスは、FGFR-Lポリペプチドリガンドを含む単一の組換えクローンが単離されるまで、繰り返し反復され得る。FGFR-Lポリペプチドリガンドの単離は、FGFR-Lポリペプチドシグナル伝達経路の新規なアゴニストおよびアンタゴニストを同定または開発するために有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、FGFR-Lポリペプチドリガンド、抗FGFR-Lポリペプチドリガンド抗体、低分子またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられる。

【0265】

本発明のマウスおよびヒトFGFR-L核酸はまた、対応する染色体FGFR-Lポリペプチド遺伝子を単離するための有用なツールである。例えば、FGFR-L配列を含むマウス染色体DNAは、ノックアウトマウスを構築するために使用され得、それによって、FGFR-Lポリペプチドのインビボでの役割の試験を可能にする。ヒトFGFR-LゲノムDNAは、遺伝性の組織編制疾患を同定するために使用され得る。

【0266】

ヒトFGFR-LポリペプチドをコードするcDNAの寄託（登録番号__を有する）を、2000年1月31日に、American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209に行った。

【0267】

以下の実施例は、例示目的のみのために意図され、本発明の範囲をいずれにも限定するとは解釈されるべきではない。

【0268】

（実施例1：マウスFGFR-Lポリペプチド遺伝子のクローニング）

一般に、Sambrookら（前出）に記載されるような材料および方法を使用して、ラットFGFR-Lポリペプチドをコードする遺伝子をクローニングおよび分析した。

【0269】

マウスFGFR-Lポリペプチドをコードする配列を、造血幹細胞支持性の2つの骨髄間質細胞株(F4およびF10)の混合物に由来するマウスcDNAライブラリーから単離した。マウス骨髄間質細胞株D3、F4およびF10を、R. Ploemacher博士(Erasmus University, Rotterdam, The Netherlands)から得て、そして10% ウシ胎仔血清、5% ウマ血清、2mM グルタミン、0.1mM β -メルカプトエタノールおよび1 μ M ヒドロコルチゾン(コハク酸Na塩)を補充したIMDM中、32% かつ5% CO₂にて培養した。マウス骨髄間質cDNAライブラリーを、Trizol法(LTI)を使用してF4細胞およびF10細胞からRNAを単離することによって調製した。ポリ-A RNAを、オリゴ-dT磁気ビーズ(Dynal)を使用して精製し、そして等量のポリ-A RNA(各1.5 μ gのF4 RNAおよびF10 RNA)を混合した。オリゴ-dTでプライムした全長cDNAライブラリーを、the Superscript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning(LTI)を使用して、このF4/F10 RNA混合物から構築した。

【0270】

マウス骨髄間質cDNAライブラリー(6 \times 10⁶個の形質転換体を含む)をプレートし、そして3.4 \times 10⁴個のコロニーを選択しそして並行して96ウェルプレートに移し、そしてフィルター上にスポットした。次いで、フィルターを、骨髄間質D3細胞株から単離したポリ-A mRNAから生成した、³²P-dCTP標識第1鎖cDNAでプローブした。フィルター上にスポットした3.4 \times 10⁴個のコロニーのうち、11,232個は、D3プローブとハイブリダイズしなかった。プラスミドを、これらのハイブリダイズしなかったコロニーから単離し、そしてそれらのcDNAインサートの5'末端を配列決定した。

【0271】

1個のクローン(smsf2-00017-f4)(これは、FGFレセプターファミリーの種々のメンバーとの相同性を示す)を、この配列分析において同

定した。全長クローン (smsf2 - 00017 - f4 - 41 . 6) を、56個のマウス骨髄間質 cDNA プール (各プールは、マウス骨髄間質 cDNA ライブラリー由来の 1×10^4 個のクローンを含む) のサザンロットをスクリーニングすることによって得た。最も長いインサートを保持するプールを、引き続いてプレートし、そして再度スクリーニングした。

【0272】

マウス FGFR - L ポリペプチドの全長 cDNA の配列分析は、この遺伝子が、I 型膜貫通タンパク質をコードすることを示した (図 1 B、推定膜貫通ドメイン: L - P - W - P - V - V - I - G - I - P - A - G - A - V - F - I - L - G - T - V - L - L - W - L - C ; 配列番号 12)。このマウス FGFR - L ポリペプチド遺伝子は、529 アミノ酸のタンパク質をコードする 1587 bp のオープンリーディングフレームを含み、そしてこのタンパク質は、そのアミノ末端に潜在的なシグナルペプチドを保持する (図 1 A、推定シグナルペプチド: M - T - R - S - P - A - L - L - L - L - L - L - G - A - L - P - S - A - E - A ; 配列番号 11)。図 1 A ~ 1 C は、マウス FGFR - L 核酸配列のヌクレオチド配列およびマウス FGFR - L ポリペプチドの推定アミノ酸配列を示す。マウス細胞外ドメイン - Fc 融合タンパク質は、SDS - PAGE によって決定した場合に、約 55 kD の見かけの分子量を有する。

【0273】

この FGFR - L ポリペプチドの細胞外ドメインは、FGF レセプターファミリーに最も密接に関連するが、このタンパク質の細胞質ドメインは、キナーゼドメインも他の認識可能なドメインも含まない。図 2 A ~ 2 B は、マウス FGFR - L ポリペプチドと、FGFR - L ポリペプチドと最も近い相同性を共有する公知のタンパク質 (イベリアトゲイモリ (*Pleurodeles waltlii*) FGF レセプター 4) のアミノ酸配列アライメントを示す。BLAST プログラムを使用するコンピューター分析もまた、マウス FGFR - L ポリペプチドが、ヒト腎臓から単離された単一の 486 bp ヒト EST (GenBank 登録番号 AI245701) に密接に関連することを示した。この EST の 379 bp のストレッチは、FGFR - L ポリペプチドとの 87% の同一性を示し、これ

は、ヒトオルソログの存在を示唆する。

【0274】

(実施例2：ヒトFGFR-Lポリペプチド遺伝子のクローニング)

一般に、Sambrookら(前出)に記載されるような材料および方法を使用して、ヒトFGFR-Lポリペプチドをコードする遺伝子をクローニングおよび分析した。

【0275】

ヒト脾臓および混合組織cDNAライブラリーを、以下のように調製した。製造業者の推奨プロトコルに従って、総RNAを、Trizol抽出手順(Gibco-BRL, Rockville, MD)を使用してヒト組織から抽出し、そしてポリ-A⁺RNAを、Dynabeads(Dynal, Oslo, Norway)を使用してこの総RNAから選択した。ランダムプライムしたcDNAまたはオリゴ(dT)プライムしたcDNAを、the Superscript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloningキット(Gibco-BRL, Rockville, MD)を製造業者の推奨プロトコルに従って使用して、このポリ-A⁺RNAから合成した。得られたcDNAを、適切な制限酵素で消化し、そしてpSPORT1ベクターにクローニングした。連結産物を、当該分野で公知の標準的な技術を使用してE. coliに形質転換し、そして形質転換体を、適切な抗生物質を含む細菌培地プレート上で選択した。このcDNAライブラリーは、これらの形質転換体の全てまたはサブセットからなった。

【0276】

1 × 10⁴個のコロニーのプールから単離したプラスミドDNAを、以下のプライマーを用いて行うPCR増幅においてテンプレートとして使用した：5' - C - G - C - T - G - A - C - C - A - T - G - T - G - G - A - C - C - A - A - G - G - A - T - G - 3' (配列番号13)および5' - C - T - T - G - A - C - C - C - C - A - G - A - A - G - G - A - G - C - T - G - T - C - G - G - 3' (配列番号14)。これらのPCRプライマーは、実施例1に記載のヒトEST配列AI245701に基づいて設計した。いくつかのプールは、

234bpのフラグメントを生じ、このフラグメントを、サブクローニングし、そして図3Aに示されるヒトFGFR-L核酸配列の208位~441位に対応する核酸配列を有することを決定した。

【0277】

次いで、上記の増幅反応においてこの234bpのPCR産物を生じたプラスミドプールを、コロニーハイブリダイゼーション分析のためにプレートした。プレートしたコロニーを、上記で生成した234bpのPCRフラグメントをRediprime IIランダムプライム標識キット(Amersham, Piscataway, NJ)で放射標識した後にプローブとして使用して、スクリーニングした。1333bpのcDNAインサートは、図3A~3Cに示されるヒトFGFR-L核酸配列の118位~1450位に対応する配列を有すると決定された。この1333bp配列とAI245701の234bp配列のアセンブリは、図3A~3Cに示されるヒトFGFR-L核酸配列を生じた。

【0278】

Bakerら(PCT公開番号WO99/63088)は、ヒトFGFR-Lポリペプチドと配列同一性を共有するPRO943と称する、504アミノ酸のポリペプチド配列(配列番号15)を教示する。RubenおよびYoung(PCT公開番号WO00/24756)は、ヒトFGFR-Lポリペプチドと配列同一性を共有する線維芽細胞増殖因子レセプター-5(FGFR5)と称する、504アミノ酸のポリペプチド(配列番号17)をコードする3112bpの核酸配列(配列番号16)を教示する。最後に、WiedemannおよびTrueb, 2000, Genomics 69:275-79は、ヒトFGFR-Lポリペプチドと配列同一性を共有する線維芽細胞増殖因子レセプター様タンパク質1(FGFR L1)と称する、504アミノ酸のポリペプチド(配列番号19)をコードする3080bpの核酸配列(配列番号18)を教示する。

【0279】

(実施例3: FGFR-L mRNA発現)

FGFR-L mRNAの発現を、ノーザンブロット分析によって試験した。複数のマウスおよびヒト組織のノーザンブロット(Clontech)を、ヒト

F G F R - L 遺伝子の一部に対応する、 32 P - d C T P 標識した 2 3 4 b p P C R フラグメント (実施例 2 を参照のこと) でプローブした。種々の細胞株から単離した R N A を含むさらなるプロットもまた、このプローブでスクリーニングした。

【 0 2 8 0 】

ノーザンプロットを、5 × S S C、3 5 % 脱イオン化ホルムアミド、0 . 0 5 % (w / v) ピロリン酸ナトリウム、2 0 m M リン酸ナトリウム (p H 6 . 8)、5 m M E D T A、5 × デンハルト溶液、0 . 2 % S D S および 9 4 μ g / m l 変性サケ精子 D N A 中、4 2 ° で 2 時間プレハイブリダイズし、ついで、約 1 n g / m L の標識プローブを含む新しいプレハイブリダイゼーション緩衝液中、4 2 ° で一晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、フィルターを、プレハイブリダイゼーション緩衝液中、室温で 5 分間 1 回、2 × S S C および 0 . 1 % S D S 中、室温で 5 分間 1 回、次いで 2 × S S C および 0 . 1 % S D S 中、4 2 ° で 2 0 分間 2 回、洗浄した。次いで、このプロットをオートラジオグラフィーに曝露した。

【 0 2 8 1 】

ノーザンプロットの分析 (図 5 ~ 7) は、2 . 9 k b の分子量を有する単一の転写物が、マウス肝臓、腎臓、F 4 および F 1 0 骨髄間質細胞、N I H - 3 T 3 細胞、ならびに S T 2 骨髄間質細胞 (ビタミン D 3 およびデキサメタゾンでの曝露後の) において高度に発現されることを示した。これらの陽性サンプル中の単一の転写物の検出は、これらの組織において、キナーゼドメインまたは他の認識可能なドメインを含み得るより長い細胞質ドメインをコードする明らかなスプライシング改変体が存在しないことを示唆する。この転写物の弱い発現は、マウス心臓、脳、肺、骨格筋、精巣、F 1 0 骨髄間質細胞、および S T 2 細胞 (ビタミン D 3 およびデキサメタゾンでの曝露前の) において検出された。

【 0 2 8 2 】

ノーザンプロット分析 (図 8 ~ 1 0) はまた、3 . 2 k b の分子量を有する転写物がヒト組織間で高度に発現されること、および 6 . 0 k b の分子量を有する転写物がヒト膵臓で発現されることを示した。この 6 . 0 k b の転写物の存在は

、機能的に異なるFGFR-Lタンパク質改変体が存在し得ることを示唆する。この3.2kb転写物の弱い発現は、肝臓、腎臓、心臓、骨格筋、脳、ならびに細胞株HeLa、K562、SW480、Molt4およびRajiにおいて見られた。

【0283】

ノーザンブロット分析(図11)はまた、単一の転写物が、以下の細胞株において検出され得ることを示した: 266-6(マウス腺房膵臓腫瘍)、AR42J(ラット膵臓腫瘍、外分泌)、CaPan I(ヒト膵臓腺癌)、HIG-82(ウサギ滑膜細胞)、OHS4(ヒト骨芽細胞)、SW1353(ヒト軟骨肉腫、体液性)、SW872(ヒト脂肪肉腫)、K562(古い(すなわち、後期継代);慢性骨髄性白血病;後期継代)、K562(新しい(すなわち、初期継代))、Jurkat(ヒトT細胞株)、およびF4(マウス骨髄由来間質細胞株)。ヒトおよびマウスFGFR-L cDNA由来のプローブはまた、それぞれ、ヒトおよびマウス脂肪組織においてFGFR-L mRNAを検出し得た(図12A~12B)。

【0284】

FGFR-L mRNAの発現をまた、RNAse保護アッセイにおいて試験した(図13)。シグナルは、試験したほとんどの組織において検出され、最も高いシグナルは、褐色脂肪組織、白色脂肪組織および精巣において検出された。

【0285】

FGFR-L mRNAの発現を、標準的な技術を使用して、インサイチュハイブリダイゼーションによって局在化した。最も高いレベルのFGFR-L mRNAは、白色脂肪組織および褐色脂肪組織の両方において見出され; FGFR-L mRNA発現は、副腎および腎臓に隣接する腎周の脂肪貯留部(depot)において検出された(図14)。消化組織において、FGFR-L mRNAに対応するシグナルは、小腸(十二指腸および回腸)において見出されたが、大腸において見出されなかった(図15)。詳細には、FGFR-L mRNAは、陰窩の基部(ほぼおそらく、パーネト細胞)で発現されることが見出された。FGFR-L mRNA発現はまた、気管(シグナルは、気管の周囲の硝子軟

骨の環に隣接する軟骨膜細胞にわたって検出された)および子宮(強いシグナルが、子宮管腔を裏打ちする上皮細胞にわたって検出された;図16)において検出された。線維軟骨(変形性関節症の関節において特徴的に存在する)は硝子軟骨に類似するので、硝子軟骨において検出されたFGFR-Lポリペプチドの高い発現レベルは、変形性関節症の調節におけるFGFR-Lポリペプチドの潜在的な臨床的有用性を示唆する。より低いレベルのFGFR-L mRNA発現もまた、膝関節の関節軟骨および脾臓(白脾髄(リンパ球;図16)とは対照的に、赤脾髄(造血性)にわたって)において検出された。より低いレベルの発現は、卵巣、精巣および小腸において検出された。脂肪組織における高レベルのFGFR-L mRNA発現は、いくつかの組織の脂肪組織による混入の結果としてのノーザンブロットデータの解釈における注意を正当化する。これは、ヒト脾臓において観察された高レベルの発現について特に当てはまる可能性がある。

【0286】

3つの骨髄間質細胞株(すなわち、D3、F4およびF10)において検出されたマウスFGFR-L mRNAの発現レベルは、これらの細胞株が造血幹細胞を支持する能力と相関する。マウスFGFR-L mRNAのもっと高い発現は、最良の支持を提供する間質細胞株(F4およびF10;図7)において検出され、一方、はるかに低いレベルが、造血幹細胞を支持し得ない細胞株(D3)において見出された。マウスFGFR-L mRNAはまた、破骨細胞発生(osteoclastogenesis)(このプロセスは、bFGFによって阻害されることが公知である(Jimira, 1996, J. Cell. Physiol. 168:395-402))の条件下で(すなわち、ビタミンD3およびデキサメタゾンに反応して;図17)骨芽細胞ST2細胞において上方調節された。

【0287】

さらに、発現分析は、マウスFGFR-LポリペプチドのmRNA発現のレベルが、胎児発生の間に増加することを示し、最も低い発現が、分析した最も早い時点(すなわち、7日目)で検出され、そして最も高い発現が、分析した最も遅い時点(すなわち、17日目)に検出された(図5)。

【0288】

最後に、プロテオーム (proteomic) 分析は、マウスおよびヒト F G F R - L ポリペプチドの配列と同一の配列を有するペプチドが、K 5 6 2 細胞および S V 4 0 で形質転換された A G 2 8 0 4 細胞 (ヒト線維芽細胞) から分泌されることを示した。このアプローチにおいて、タンパク質混合物を、種々の細胞株の任意の1つによって馴化した培養培地から単離し、そして質量分析に供して個々のペプチド配列の存在を同定した。プロテオーム分析はまた、ヒト F G F R - L ポリペプチドにおける残基 2 3 1 (A s p) および 2 9 3 (A s p) での N 結合型グリコシル化を示した。

【0289】

(実施例 4 : 抗 F G F R - L ポリペプチド抗体の産生)

F G F R - L ポリペプチド抗体を、マウス F G F R - L ポリペプチドの細胞外ドメイン (E C D) の一部に対応するポリペプチド (D e s 7 - F G F R - L / E C D ; 配列番号 2 0 ; F G F R - L ポリペプチドの残基 2 8 ~ 3 6 8 を含む) でウサギを免疫することによって得た。F G F R - L ポリペプチド - F c 融合体構築物もまた、この細胞外ドメインの残基 1 ~ 3 6 6 (配列番号 2 1 および配列番号 2 2) を使用して調製した。抗体を生成するための適切な手順を使用した (例えば、Hudson および Bay、Practical Immunology (第 2 版、Blackwell Scientific Publications) を参照のこと) 。

【0290】

F G F R - L ポリペプチド抗血清を、S D S - P A G E で分離した E . c o l i 由来 D e s 7 - F G F R - L / E C D および C H O 由来 F G F R - L / E C D - F c タンパク質のウエスタンブロット分析において使用した。9 5 ~ 1 0 0 k D および 4 0 ~ 4 5 k D の免疫反応性のバンドが、それぞれ、C H O 由来サンプルおよび E . c o l i 由来サンプルにおいて検出された (図 1 8) 。6 0 ~ 7 0 k D の免疫反応性のバンドもまた、マウス脂肪組織 (図 1 9) 、2 6 6 - 6 細胞 (マウス腺房膵臓腫瘍) 、A R 4 2 J (ラット膵臓外分泌腫瘍) 、M R C 5 細胞 (ヒト二倍体肺線維芽細胞) 、O H S 4 細胞 (ヒト骨芽細胞) 、S W 1 3 5 3 細

胞（ヒト軟骨肉腫）、およびK562細胞（慢性骨髄性肉腫）において、細胞溶解物ならびにこれらの組織および細胞株から収集した馴化培地の免疫沈降およびウエスタンブロット後に検出された。100～120kDのさらなるバンドが、脂肪組織、OHS4細胞およびK562細胞において検出された。この粗抗血清をまた使用して、両方のタンパク質を免疫沈降し得た。FACS分析においてこの粗抗血清を使用して、FGFR-Lポリペプチド細胞表面染色は、（高いレベルのFGFR-L RNAを発現することが示された）F4骨髄間質細胞上に検出されたが、（低いレベルのFGFR-L RNAを発現することが示された；図20A～20B）D3骨髄間質細胞上には検出されなかった。

【0291】

（実施例5：FGFR-Lポリペプチドのインビトロ特徴付け）

全長FGFR-LポリペプチドまたはFGFR-Lポリペプチドの細胞外ドメインをコードする構築物は、トランスフェクトされた細胞（例えば、CHO、329 HEK、および間質細胞株）（トランスフェクトされていない細胞に対する安定したトランスフェクト体の数の低下および増殖速度の減少によって測定されたように（図21A～21D））またはFGFR-Lポリペプチド点変異体をコードする構築物でトランスフェクトした細胞によって、それほど寛容されないことがわかった。E.coli由来Des7-FGFR-L/ECDを骨髄間質細胞培養物に添加した場合、FGF媒介性であるが血清媒介性でない増殖が、阻害された（図22）。可溶性FGFR-L/ECDが、FGFタンパク質によって誘導される増殖を阻害するが、PDGFまたは血清によって誘導された増殖に対する阻害効果をそれほど有さないという観察は、FGFR-Lポリペプチドが、FGFファミリーに対する相同性を有する天然のリガンドと、単独でかまたはコレセプターと共に相互作用し得ることを示唆する。驚くことに、この効果は、CHO由来FGFR-L/ECD-Fc融合タンパク質を、E.coli由来Des7-FGFR-L/ECDの代わりに使用した場合には、観察されなかった（図23）。同様の効果は、ヒト血管内皮細胞（HUVEC）のFGF媒介増殖およびVEGF媒介増殖について得られた。CHO由来FGFR-LポリペプチドとE.coli由来FGFR-Lポリペプチドとの間の活性における差異は、

これらのC末端および/またはN末端におけるアミノ酸配列の差異に起因し得る。

【0292】

(実施例6：FGFR-Lポリペプチドのインビボ特徴付け)

全長マウスFGFR-Lおよびネオマイシン耐性遺伝子をコードする二シストロン性メッセージ(またはネオマイシン耐性遺伝子単独)を保持するレトロウイルスベクターで形質導入したマウス骨髄細胞を使用して、以前に記載されたように(Yanら、1999、Exp.Hematol.27:1409-17)、10匹の致死的に照射したレシピエントに移植した。

【0293】

これらのマウスのうちの5匹(評価のための無作為に選択した)において、4ヶ月の期間にわたるFGFR-Lポリペプチドの過剰発現が、総体重における15%の減少、血清コレステロールにおける14%の減少、および血清トリグリセリドレベルにおける35%の減少を生じた。しかし、3週間後、残りの5匹のマウスを計量および採血し、そして同様の変化は観察されなかった。

【0294】

FGFR-Lポリペプチドのインビトロ特徴付け(実施例5)は、このタンパク質が、種々の細胞型によってそれほど寛容されず、その結果、FGFR-Lポリペプチド発現に対する選択が予測されないことを示した。上記のレトロウイルス構築物は、1つの二シストロン性メッセージにFGFR-L遺伝子およびネオマイシン耐性遺伝子の両方を保持するので、FGFR-Lポリペプチド発現に対する選択は、転写の下方調節または形質導入された細胞の除去のいずれかによる、neo発現に対する対応する選択を同様に生じる。

【0295】

その表現型を示す2匹のFGFR-L/neo形質導入マウスおよび2匹のneo形質導入コントロールマウス由来の末梢血単核細胞(PBMN)RNAのノーザンブロット分析は、コントロールマウスが、予測されたサイズのneo転写物の豊富な発現を示し、そしてFGFR-L/neo形質導入マウスが、それを示さないことを示した(図24)。このことは、FGFR-Lポリペプチド発現

が、一過性の表現型の最終的な消失に対して活性に選択され、そしてその消失よりも優位にあることを示唆する。

【0296】

本発明を、好ましい実施形態に関して記載したが、改変および変更が当業者に想到されることが理解される。従って、添付の特許請求の範囲は、特許請求される本発明の範囲内にあるこのような全ての等価物を包含することが意図される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1A～1Cは、マウスFGFR-L遺伝子のヌクレオチド配列（配列番号1）、およびマウスFGFR-Lポリペプチドの推定アミノ酸配列（配列番号2）を示す。推定シグナルペプチド（下線部）および膜貫通ドメイン（二重下線部）を示す。

【図2】

図2A～2Bは、マウスFGFR-Lポリペプチド（Smaf2-00017-f4；配列番号2）とイベリアトゲイモリ（Iberian ribbed newt）（Pleurodeles waltlii）線維芽細胞増殖因子レセプター4（PIR：B49151；配列番号7）とのアミノ酸配列アライメントを示す

【図3】

図3A～3Bは、ヒトFGFR-L遺伝子のN末端部分をコードするcDNAクローンのヌクレオチド配列（配列番号4）、およびヒトFGFR-LポリペプチドのN末端部分の推定アミノ酸配列（配列番号5）を示す。推定シグナルペプチド（下線部）および膜貫通ドメイン（二重下線部）を示す。

【図4】

図4は、マウスFGFR-Lポリペプチド（配列番号2）と、配列番号5の残基1～472およびGenBank登録番号AJ277437の残基473～504から構築した仮想ヒトFGFR-Lポリペプチド配列（配列番号8）とのアミノ酸配列アライメントを示す。推定シグナルペプチド（下線部）、膜貫通ドメイン（二重下線部）、およびN結合グリコシル化部位（太字）を示す。

【図5】

図5は、7日目、11日目、15日目、および17日目のマウス胚におけるノーザンブロット分析により検出された、FGFR-L mRNAの発現を示す。

【図6】

図6は、マウスの心臓、脳、脾臓、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、および精巣におけるノーザンブロット分析により検出された、FGFR-L mRNAの発現を示す。

【図7】

図7は、NIH3T3細胞ならびにF10マウス骨髄由来間質細胞株、F4マウス骨髄由来間質細胞株、およびD3マウス骨髄由来間質細胞株におけるノーザンブロット分析により検出された、FGFR-L mRNAの発現を示す。

【図8】

図8は、ヒトの脳、心臓、骨格筋、結腸、胸腺、脾臓、腎臓、肝臓、小腸、胎盤、肺、および末梢血白血球におけるノーザンブロット分析により検出された、FGFR-L mRNAの発現を示す。

【図9】

図9は、前骨髄球白血病HL-60細胞、HeLa S3細胞、慢性骨髄性白血病L-562細胞、リンパ芽球性白血病MOLT-4細胞、バーキットリンパ腫Raji細胞、結腸直腸腺癌SW480細胞、肺癌A549細胞、および黒色腫G361細胞におけるノーザンブロット分析により検出された、FGFR-L mRNAの発現を示す。

【図10】

図10は、ヒトの心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、および膵臓におけるノーザンブロット分析により検出された、FGFR-L mRNAの発現を示す。

【図11】

図11は、266-6細胞、AR42J細胞、CaPan I細胞、HIG-82細胞、OHS4細胞、SW1353細胞、SW872細胞、K562細胞(古い細胞、すなわち、継代後期細胞)、K562細胞(新しい細胞、すなわ

ち、継代初期細胞)、Jurkat細胞、およびF4細胞におけるノーザンブロット分析により検出された、FGFR-L mRNAの発現を示す。

【図12】

図12A~12Bは、ヒト脂肪組織(ヒトFGFR-L由来プローブを使用する)およびマウス脂肪組織(マウスFGFR-L由来プローブを使用する)におけるノーザンブロット分析により検出された、FGFR-L mRNAの発現を示す。

【図13】

図13は、RNアーセプロテクションアッセイにおいて検出された、多数のマウス組織におけるFGFR-L mRNAの発現を示す。膵臓RNAサンプルにおいてサイクロフィリンバンドが存在しないことは、このサンプルが分解されたことを示唆する。

【図14】

図14は、正常成体マウスの腎周囲組織、白色脂肪組織、および褐色脂肪組織におけるインサイチュハイブリダイゼーションにより検出された、FGFR-L mRNAの発現を示す。(H&E=ヘマトキシリンおよびエオシン対比染色; ISH=インサイチュハイブリダイゼーション)。

【図15】

図15は、正常成体マウスの十二指腸、回腸、結腸および膵臓におけるインサイチュハイブリダイゼーションにより検出された、FGFR-L mRNAの発現を示す。(H&E=ヘマトキシリンおよびエオシン対比染色; ISH=インサイチュハイブリダイゼーション)。

【図16】

図16は、正常成体マウスの気管、膝関節の関節軟骨、脾臓、および子宮におけるインサイチュハイブリダイゼーションにより検出された、FGFR-L mRNAの発現を示す。(H&E=ヘマトキシリンおよびエオシン対比染色; ISH=インサイチュハイブリダイゼーション)。

【図17】

図17は、破骨細胞生成条件下での骨芽細胞ST2細胞におけるFGFR-L

mRNAの誘導(すなわち、ビタミンD3およびデキサメタゾンに対する5日間の曝露)を示す。

【図18】

図18は、FGFR-Lポリペプチド抗血清を使用する、E.coli由来Des7-FGFR-L/ECDTンパク質およびCHO由来FGFR-L/EDC-Fcタンパク質のウェスタンブロット分析の結果を示す。

【図19】

図19は、FGFR-Lポリペプチド抗血清を使用する、マウスの眼(レーン1)および脂肪組織(レーン2)のウェスタンブロット分析の結果を示す。

【図20】

図20A~20Bは、FGFR-Lポリペプチド抗血清を使用する、F4骨髄間質細胞およびD3骨髄間質細胞のFACS分析の結果を示す。

【図21A】

図21Aは、rhupDGF(パネルA)に72時間曝露した後の、D3骨髄間質細胞(FGFR-Lポリペプチドをコードする構築物で形質導入されていないか、または形質導入されているかのいずれか)を使用する、増殖アッセイの結果を示す。

【図21B】

図21Bは、rhufGF-2(パネルB)に72時間曝露した後の、D3骨髄間質細胞(FGFR-Lポリペプチドをコードする構築物で形質導入されていないか、または形質導入されているかのいずれか)を使用する、増殖アッセイの結果を示す。

【図21C】

図21Cは、rhufGF-4(パネルC)に72時間曝露した後の、D3骨髄間質細胞(FGFR-Lポリペプチドをコードする構築物で形質導入されていないか、または形質導入されているかのいずれか)を使用する、増殖アッセイの結果を示す。

【図21D】

図21Dは、rhufGF-6(パネルD)に72時間曝露した後の、D3骨

髄間質細胞 (F G F R - L ポリペプチドをコードする構築物で形質導入されていないか、または形質導入されているかのいずれか) を使用する、増殖アッセイの結果を示す。

【図22】

図22は、E . c o l i 由来 D e s 7 - F G F R - L / E C D タンパク質および血清、P D G F、F G F - 2、F G F - 4、または F G F - 6 に曝露した後の、A 5 - F 骨髄間質細胞を使用する、増殖アッセイの結果を示す。

【図23】

図23は、C H O 由来 F G F R - L / E C D - F c タンパク質および血清、P D G F、F G F - 4、または F G F - 6 に曝露した後の、A 5 - F 骨髄間質細胞を使用する、増殖アッセイの結果を示す。

【図24】

図24は、2つの F G F R - L / n e o 形質導入マウス由来の末梢血単核細胞 (P B M N) R N A (レーン1および2)、ならびに2つの n e o 形質導入コントロールマウス由来の末梢血単核細胞 (P B M N) R N A (レーン3および4) のノーザンプロット分析により検出された、ネオマイシン耐性遺伝子の発現を示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Saris, Christiaan M.
 Sharon, Mu X.
 Xia, Min
 Boone, Thomas Charles
 Covey, Todd

<120> Fibroblast Growth Factor Receptor-Like Molecules and
 Uses Thereof

<130> 99-513-A

<140>
 <141>

<150> 60/191,379
 <151> 2000-03-22

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
 <211> 2277
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (87)..(1673)

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (87)..(146)

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1208)..(1271)
 <223> predicted transmembrane domain

<400> 1
 gacctggggtc ttgctgggct gagccctgag tggcgtccag tccagctccc agtgaccgcg 60
 cccctgcttc aggtccgacc ggcgag atg acg cgg agc ccc gcg ctg ctg ctg 113
 Met Thr Arg Ser Pro Ala Leu Leu Leu
 1 5

ctg cta ttg ggg gcc ctc ccg tcc gct gag gcg gcg cga gga ccc cca 161
 Leu Leu Leu Gly Ala Leu Pro Ser Ala Glu Ala Ala Arg Gly Pro Pro
 10 15 20 25

aga atg gca gac aaa gtg gtc cca cgg cag gtg gcc cgc ctg ggc cgc 209
 Arg Met Ala Asp Lys Val Val Pro Arg Gln Val Ala Arg Leu Gly Arg
 30 35 40

act gtg cgg cta cag tgc cca gtg gag ggg gac cca cca ccg ttg acc 257
 Thr Val Arg Leu Gln Cys Pro Val Glu Gly Asp Pro Pro Pro Leu Thr
 45 50 55

atg tgg acc aaa gat ggc cgc aca atc cac agt ggc tgg agc cgc ttc	305
Met Trp Thr Lys Asp Gly Arg Thr Ile His Ser Gly Trp Ser Arg Phe	
60 65 70	
cgt gtg ctg ccc cag ggt ctg aag gtg aag gag gtg gag gcc gag gat	353
Arg Val Leu Pro Gln Gly Leu Lys Val Lys Glu Val Glu Ala Glu Asp	
75 80 85	
gcc ggt gtt tat gtg tgc aag gcc acc aat ggc ttt ggc agc ctc agc	401
Ala Gly Val Tyr Val Cys Lys Ala Thr Asn Gly Phe Gly Ser Leu Ser	
90 95 100 105	
gtc aac tac act ctc atc atc atg gat gat att agt cca ggg aag gag	449
Val Asn Tyr Thr Leu Ile Ile Met Asp Ile Ser Pro Gly Lys Glu	
110 115 120	
agc cct ggg cca ggt ggt tct tcg ggg ggc cag gag gac cca gcc agc	497
Ser Pro Gly Pro Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gln Glu Asp Pro Ala Ser	
125 130 135	
cag cag tgg gca cgg cct cgc ttc aca cag ccc tcc aag atg agg cgc	545
Gln Gln Trp Ala Arg Pro Arg Phe Thr Gln Pro Ser Lys Met Arg Arg	
140 145 150	
cga gtg att gca cgg cct gtg ggt agc tct gtg cgg ctc aag tgt gtg	593
Arg Val Ile Ala Arg Pro Val Gly Ser Ser Val Arg Leu Lys Cys Val	
155 160 165	
gcc agt ggg cac cca cgg cca gac atc atg tgg atg aag gat gac cag	641
Ala Ser Gly His Pro Arg Pro Asp Ile Met Trp Met Lys Asp Asp Gln	
170 175 180 185	
acc ttg acg cat cta gag gct agt gaa cac aga aag aag aag tgg aca	689
Thr Leu Thr His Leu Glu Ala Ser Glu His Arg Lys Lys Lys Trp Thr	
190 195 200	
ctg agc ttg aag aac ctg aag cct gaa gac agt ggc aag tac acg tgc	737
Leu Ser Leu Lys Asn Leu Lys Pro Glu Asp Ser Gly Lys Tyr Thr Cys	
205 210 215	
cgt gta tct aac aag gcc ggt gcc atc aac gcc acc tac aaa gtg gat	785
Arg Val Ser Asn Lys Ala Gly Ala Ile Asn Ala Thr Tyr Lys Val Asp	
220 225 230	
gta atc cag cgg act cgt tcc aag cct gtg ctc aca ggg aca cac cct	833
Val Ile Gln Arg Thr Arg Ser Lys Pro Val Leu Thr Gly Thr His Pro	
235 240 245	
gtg aac aca acg gtg gac ttc ggt ggg aca acg tcc ttc cag tgc aag	881
Val Asn Thr Thr Val Asp Phe Gly Gly Thr Thr Ser Phe Gln Cys Lys	
250 255 260 265	
gtg cgc agt gac gtg aag cct gtg atc cag tgg ctg aag cgg gtg gag	929
Val Arg Ser Asp Val Lys Pro Val Ile Gln Trp Leu Lys Arg Val Glu	
270 275 280	
tac ggc tcc gag gga cgc cac aac tcc acc att gat gtg ggt ggc cag	977
Tyr Gly Ser Glu Gly Arg His Asn Ser Thr Ile Asp Val Gly Gly Gln	

	285	290	295	
aag ttt gtg gtg ttg ccc acg ggt gat gtg tgg tca cgg cct gat ggc				1025
Lys Phe Val Val Leu Pro Thr Gly Asp Val Trp Ser Arg Pro Asp Gly				
	300	305	310	
tcc tac ctc aac aag ctg ctc atc tct cgg gcc cgc cag gat gat gct				1073
Ser Tyr Leu Asn Lys Leu Leu Ile Ser Arg Ala Arg Gln Asp Asp Ala				
	315	320	325	
ggc atg tac atc tgc cta ggt gca aat acc atg ggc tac agt ttc cgt				1121
Gly Met Tyr Ile Cys Leu Gly Ala Asn Thr Met Gly Tyr Ser Phe Arg				
	330	335	340	345
agc gcc ttc ctc act gta tta cca gac ccc aaa cct cca ggg cct cct				1169
Ser Ala Phe Leu Thr Val Leu Pro Asp Pro Lys Pro Pro Gly Pro Pro				
	350	355	360	
atg gct tct tca tcg tca tcc aca agc ctg cca tgg cct gtg gtg atc				1217
Met Ala Ser Ser Ser Ser Thr Ser Leu Pro Trp Pro Val Val Ile				
	365	370	375	
ggc atc cca gct ggt gct gtc ttc atc cta ggc act gtg ctg ctc tgg				1265
Gly Ile Pro Ala Gly Ala Val Phe Ile Leu Gly Thr Val Leu Leu Trp				
	380	385	390	
ctt tgc cag acc aag aag aag cca tgt gcc cca gca tct aca ctt cct				1313
Leu Cys Gln Thr Lys Lys Lys Pro Cys Ala Pro Ala Ser Thr Leu Pro				
	395	400	405	
gtg cct ggg cat cgt ccc cca ggg aca tcc cga gaa cgc agt ggt gac				1361
Val Pro Gly His Arg Pro Pro Gly Thr Ser Arg Glu Arg Ser Gly Asp				
	410	415	420	425
aag gac ctg ccc tca ttg gct gtg ggc ata tgt gag gag cat gga tcc				1409
Lys Asp Leu Pro Ser Leu Ala Val Gly Ile Cys Glu Glu His Gly Ser				
	430	435	440	
gcc atg gcc ccc cag cac atc ctg gcc tct ggc tca act gct ggc ccc				1457
Ala Met Ala Pro Gln His Ile Leu Ala Ser Gly Ser Thr Ala Gly Pro				
	445	450	455	
aag ctg tac ccc aag cta tac aca gat gtg cac aca cac aca cat aca				1505
Lys Leu Tyr Pro Lys Leu Tyr Thr Asp Val His Thr His Thr His Thr				
	460	465	470	
cac acc tgc act cac acg ctc tca tgt gga ggg caa ggt tca tca aca				1553
His Thr Cys Thr His Thr Leu Ser Cys Gly Gly Gln Gly Ser Ser Thr				
	475	480	485	
cca gca tgt cca cta tca gtg cta aat aca gcg aat ctc caa gca ctg				1601
Pro Ala Cys Pro Leu Ser Val Leu Asn Thr Ala Asn Leu Gln Ala Leu				
	490	495	500	505
tgt cct gag gta ggc ata tgg ggg cca agg caa cag gtt ggg aga att				1649
Cys Pro Glu Val Gly Ile Trp Gly Pro Arg Gln Gln Val Gly Arg Ile				
	510	515	520	
gag aac aat gga gga aga gta tct taggggtgcct tatgggtggac actcacaac				1703

Glu Asn Asn Gly Gly Arg Val Ser
525

ttggccatat agatgtatgt actaccagat gaacagccag ccagattcac acacgcacat 1763
gtttaaacgt gtaaacgtgt gcacaactgc acacacaacc tgagaaacct tcaggaggat 1823
ttgtggtgtg actttgcagt gacatgtagc gatggctagt tgaaggaatc tccctcatgt 1883
cttagtggtc atggccactt cccccccct gcccatctgt gttcctgcct ggccttggtg 1943
tgcttccgtg tgccctgggt atcaggagcc tatcatcaac ctgactgggg tgagcagtg 2003
agccatgcct ggaggtttga gccaccctcc ccttgctaga gagaagggcc tcaatattta 2063
tatttaagaa atgaaataat attaataata atgtaaggag ggctgggaca cagggactct 2123
ggccttccct ggggectggg acctgcctgg ccttgtgggt acattgggta cctcactgt 2183
ccatggctgc ctggtctctg taattttata tagagtttga gctgaagcct cgtatattta 2243
atatttttg ttaaacaaga aaaaaaaaaa aaaa 2277

<210> 2

<211> 529

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met	Thr	Arg	Ser	Pro	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Pro	
1				5				10					15		
Ser	Ala	Glu	Ala	Ala	Arg	Gly	Pro	Pro	Arg	Met	Ala	Asp	Lys	Val	Val
			20					25					30		
Pro	Arg	Gln	Val	Ala	Arg	Leu	Gly	Arg	Thr	Val	Arg	Leu	Gln	Cys	Pro
			35				40					45			
Val	Glu	Gly	Asp	Pro	Pro	Pro	Leu	Thr	Met	Trp	Thr	Lys	Asp	Gly	Arg
	50						55					60			
Thr	Ile	His	Ser	Gly	Trp	Ser	Arg	Phe	Arg	Val	Leu	Pro	Gln	Gly	Leu
	65				70					75					80
Lys	Val	Lys	Glu	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Gly	Val	Tyr	Val	Cys	Lys
			85						90					95	
Ala	Thr	Asn	Gly	Phe	Gly	Ser	Leu	Ser	Val	Asn	Tyr	Thr	Leu	Ile	Ile
			100					105					110		
Met	Asp	Asp	Ile	Ser	Pro	Gly	Lys	Glu	Ser	Pro	Gly	Pro	Gly	Gly	Ser
		115					120					125			
Ser	Gly	Gly	Gln	Glu	Asp	Pro	Ala	Ser	Gln	Gln	Trp	Ala	Arg	Pro	Arg
	130					135					140				
Phe	Thr	Gln	Pro	Ser	Lys	Met	Arg	Arg	Arg	Val	Ile	Ala	Arg	Pro	Val
145					150					155					160

Gly Ser Ser Val Arg Leu Lys Cys Val Ala Ser Gly His Pro Arg Pro
 165 170 175
 Asp Ile Met Trp Met Lys Asp Asp Gln Thr Leu Thr His Leu Glu Ala
 180 185 190
 Ser Glu His Arg Lys Lys Lys Trp Thr Leu Ser Leu Lys Asn Leu Lys
 195 200 205
 Pro Glu Asp Ser Gly Lys Tyr Thr Cys Arg Val Ser Asn Lys Ala Gly
 210 215 220
 Ala Ile Asn Ala Thr Tyr Lys Val Asp Val Ile Gln Arg Thr Arg Ser
 225 230 235 240
 Lys Pro Val Leu Thr Gly Thr His Pro Val Asn Thr Thr Val Asp Phe
 245 250 255
 Gly Gly Thr Thr Ser Phe Gln Cys Lys Val Arg Ser Asp Val Lys Pro
 260 265 270
 Val Ile Gln Trp Leu Lys Arg Val Glu Tyr Gly Ser Glu Gly Arg His
 275 280 285
 Asn Ser Thr Ile Asp Val Gly Gly Gln Lys Phe Val Val Leu Pro Thr
 290 295 300
 Gly Asp Val Trp Ser Arg Pro Asp Gly Ser Tyr Leu Asn Lys Leu Leu
 305 310 315 320
 Ile Ser Arg Ala Arg Gln Asp Asp Ala Gly Met Tyr Ile Cys Leu Gly
 325 330 335
 Ala Asn Thr Met Gly Tyr Ser Phe Arg Ser Ala Phe Leu Thr Val Leu
 340 345 350
 Pro Asp Pro Lys Pro Pro Gly Pro Pro Met Ala Ser Ser Ser Ser
 355 360 365
 Thr Ser Leu Pro Trp Pro Val Val Ile Gly Ile Pro Ala Gly Ala Val
 370 375 380
 Phe Ile Leu Gly Thr Val Leu Leu Trp Leu Cys Gln Thr Lys Lys Lys
 385 390 395 400
 Pro Cys Ala Pro Ala Ser Thr Leu Pro Val Pro Gly His Arg Pro Pro
 405 410 415
 Gly Thr Ser Arg Glu Arg Ser Gly Asp Lys Asp Leu Pro Ser Leu Ala
 420 425 430
 Val Gly Ile Cys Glu Glu His Gly Ser Ala Met Ala Pro Gln His Ile
 435 440 445
 Leu Ala Ser Gly Ser Thr Ala Gly Pro Lys Leu Tyr Pro Lys Leu Tyr
 450 455 460
 Thr Asp Val His Thr His Thr His Thr His Thr Cys Thr His Thr Leu

Gly Lys Tyr Thr Cys Arg Val Ser Asn Lys Ala Gly Ala Ile Asn Ala
 195 200 205
 Thr Tyr Lys Val Asp Val Ile Gln Arg Thr Arg Ser Lys Pro Val Leu
 210 215 220
 Thr Gly Thr His Pro Val Asn Thr Thr Val Asp Phe Gly Gly Thr Thr
 225 230 235 240
 Ser Phe Gln Cys Lys Val Arg Ser Asp Val Lys Pro Val Ile Gln Trp
 245 250 255
 Leu Lys Arg Val Glu Tyr Gly Ser Glu Gly Arg His Asn Ser Thr Ile
 260 265 270
 Asp Val Gly Gly Gln Lys Phe Val Val Leu Pro Thr Gly Asp Val Trp
 275 280 285
 Ser Arg Pro Asp Gly Ser Tyr Leu Asn Lys Leu Leu Ile Ser Arg Ala
 290 295 300
 Arg Gln Asp Asp Ala Gly Met Tyr Ile Cys Leu Gly Ala Asn Thr Met
 305 310 315 320
 Gly Tyr Ser Phe Arg Ser Ala Phe Leu Thr Val Leu Pro Asp Pro Lys
 325 330 335
 Pro Pro Gly Pro Pro Met Ala Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ser Leu Pro
 340 345 350
 Trp Pro Val Val Ile Gly Ile Pro Ala Gly Ala Val Phe Ile Leu Gly
 355 360 365
 Thr Val Leu Leu Trp Leu Cys Gln Thr Lys Lys Lys Pro Cys Ala Pro
 370 375 380
 Ala Ser Thr Leu Pro Val Pro Gly His Arg Pro Pro Gly Thr Ser Arg
 385 390 395 400
 Glu Arg Ser Gly Asp Lys Asp Leu Pro Ser Leu Ala Val Gly Ile Cys
 405 410 415
 Glu Glu His Gly Ser Ala Met Ala Pro Gln His Ile Leu Ala Ser Gly
 420 425 430
 Ser Thr Ala Gly Pro Lys Leu Tyr Pro Lys Leu Tyr Thr Asp Val His
 435 440 445
 Thr His Thr His Thr His Thr Cys Thr His Thr Leu Ser Cys Gly Gly
 450 455 460
 Gln Gly Ser Ser Thr Pro Ala Cys Pro Leu Ser Val Leu Asn Thr Ala
 465 470 475 480
 Asn Leu Gln Ala Leu Cys Pro Glu Val Gly Ile Trp Gly Pro Arg Gln
 485 490 495
 Gln Val Gly Arg Ile Glu Asn Asn Gly Gly Arg Val Ser

```

500                                505

<210> 4
<211> 1450
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (33)..(1448)

<220>
<221> sig_peptide
<222> (33)..(104)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1167)..(1229)

<400> 4
gcggccgcga cccaggtcc ggacaggccg ag atg acg ccg agc ccc ctg ttg 53
                                Met Thr Pro Ser Pro Leu Leu
                                1                                5

ctg ctc ctg ctg ccg ccg ctg ctg ctg ggg gcc ttc cca ccg gcc gcc 101
Leu Leu Leu Leu Pro Pro Leu Leu Leu Gly Ala Phe Pro Pro Ala Ala
10                                15                                20

gcc gcc cga ggc ccc cca aag atg gcg gac aag gtg gtc cca cgg cag 149
Ala Ala Arg Gly Pro Pro Lys Met Ala Asp Lys Val Val Pro Arg Gln
25                                30                                35

gtg gcc cgg ctg ggc cgc act gtg cgg ctg cag tgc cca gtg gag ggg 197
Val Ala Arg Leu Gly Arg Thr Val Arg Leu Gln Cys Pro Val Glu Gly
40                                45                                50                                55

gac ccg ccg ccg ctg acc atg tgg acc aag gat ggc cgc acc atc cac 245
Asp Pro Pro Pro Leu Thr Met Trp Thr Lys Asp Gly Arg Thr Ile His
60                                65                                70

agc ggc tgg agc cgc ttc cgc gtg ctg ccg cag ggg ctg aag gtg aag 293
Ser Gly Trp Ser Arg Phe Arg Val Leu Pro Gln Gly Leu Lys Val Lys
75                                80                                85

cag gtg gag cgg gag gat gcc ggc gtg tac gtg tgc aag gcc acc aac 341
Gln Val Glu Arg Glu Asp Ala Gly Val Tyr Val Cys Lys Ala Thr Asn
90                                95                                100

ggc ttc ggc agc ctg agc gtc aac tac acc ctc gtc gtg ctg gat gac 389
Gly Phe Gly Ser Leu Ser Val Asn Tyr Thr Leu Val Val Leu Asp Asp
105                                110                                115

att agc cca ggg aag gag agc ctg ggg ccc gac agc tcc tct ggg ggt 437
Ile Ser Pro Gly Lys Glu Ser Leu Gly Pro Asp Ser Ser Ser Gly Gly
120                                125                                130                                135

caa gag gac ccc gcc agc cag cag tgg gca cga ccg cgc ttc aca cag 485
Gln Glu Asp Pro Ala Ser Gln Gln Trp Ala Arg Pro Arg Phe Thr Gln

```

			140				145				150					
ccc	tcc	aag	atg	agg	cgc	cgg	gtg	atc	gca	cgg	ccc	gtg	ggt	agc	tcc	533
Pro	Ser	Lys	Met	Arg	Arg	Arg	Val	Ile	Ala	Arg	Pro	Val	Gly	Ser	Ser	
			155				160				165					
gtg	cgg	ctc	aag	tgc	gtg	gcc	agc	ggg	cac	cct	cgg	ccc	gac	atc	acg	581
Val	Arg	Leu	Lys	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	His	Pro	Arg	Pro	Asp	Ile	Thr	
			170				175				180					
tgg	atg	aag	gac	gac	cag	gcc	ttg	acg	cgc	cca	gag	gcc	gct	gag	ccc	629
Trp	Met	Lys	Asp	Asp	Gln	Ala	Leu	Thr	Arg	Pro	Glu	Ala	Ala	Glu	Pro	
			185				190				195					
agg	aag	aag	aag	tgg	aca	ctg	agc	ctg	aag	aac	ctg	cgg	ccg	gag	gac	677
Arg	Lys	Lys	Lys	Trp	Thr	Leu	Ser	Leu	Lys	Asn	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	
			200				205				210				215	
agc	ggc	aaa	tac	acc	tgc	cgc	gtg	tcg	aac	cgc	gcg	ggc	gcc	atc	aac	725
Ser	Gly	Lys	Tyr	Thr	Cys	Arg	Val	Ser	Asn	Arg	Ala	Gly	Ala	Ile	Asn	
			220				225				230					
gcc	acc	tac	aag	gtg	gat	gtg	atc	cag	cgg	acc	cgt	tcc	aag	ccc	gtg	773
Ala	Thr	Tyr	Lys	Val	Asp	Val	Ile	Gln	Arg	Thr	Arg	Ser	Lys	Pro	Val	
			235				240				245					
ctc	aca	ggc	acg	cac	ccc	gtg	aac	acg	acg	gtg	gac	ttc	ggg	ggg	acc	821
Leu	Thr	Gly	Thr	His	Pro	Val	Asn	Thr	Thr	Val	Asp	Phe	Gly	Gly	Thr	
			250				255				260					
acg	tcc	ttc	cag	tgc	aag	gtg	cgc	agc	gac	gtg	aag	ccg	gtg	atc	cag	869
Thr	Ser	Phe	Gln	Cys	Lys	Val	Arg	Ser	Asp	Val	Lys	Pro	Val	Ile	Gln	
			265				270				275					
tgg	ctg	aag	cgc	gtg	gag	tac	ggc	gct	gag	ggc	cgc	cac	aac	tcc	acc	917
Trp	Leu	Lys	Arg	Val	Glu	Tyr	Gly	Ala	Glu	Gly	Arg	His	Asn	Ser	Thr	
			280				285				290				295	
atc	gat	gtg	ggc	ggc	cag	aag	ttt	gtg	gtg	ctg	ccc	acg	ggt	gac	gtg	965
Ile	Asp	Val	Gly	Gly	Gln	Lys	Phe	Val	Val	Leu	Pro	Thr	Gly	Asp	Val	
			300				305				310					
tgg	tcg	cgg	ccc	gac	ggc	tcc	tac	ctc	aat	aag	ctg	ctc	atc	acc	cgt	1013
Trp	Ser	Arg	Pro	Asp	Gly	Ser	Tyr	Leu	Asn	Lys	Leu	Leu	Ile	Thr	Arg	
			315				320				325					
gcc	cgc	cag	gac	gat	gcg	ggc	atg	tac	atc	tgc	ctt	ggc	gcc	aac	acc	1061
Ala	Arg	Gln	Asp	Asp	Ala	Gly	Met	Tyr	Ile	Cys	Leu	Gly	Ala	Asn	Thr	
			330				335				340					
atg	ggc	tac	agc	ttc	cgc	agc	gcc	ttc	ctc	acc	gtg	ctg	cca	gac	cca	1109
Met	Gly	Tyr	Ser	Phe	Arg	Ser	Ala	Phe	Leu	Thr	Val	Leu	Pro	Asp	Pro	
			345				350				355					
aaa	ccg	cca	ggg	cca	cct	gtg	gcc	tcc	tcg	tcc	tcg	gcc	act	agc	ctg	1157
Lys	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Val	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Thr	Ser	Leu	
			360				365				370				375	
ccg	tgg	ccc	gtg	gtc	atc	ggc	atc	cca	gcc	ggc	gct	gtc	ttc	atc	ctg	1205

Pro Trp Pro Val Val Ile Gly Ile Pro Ala Gly Ala Val Phe Ile Leu
380 385 390

ggc acc ctg ctc ctg tgg ctt tgc cag gcc cag aag aag ccg tgc acc 1253
Gly Thr Leu Leu Leu Trp Leu Cys Gln Ala Gln Lys Lys Pro Cys Thr
395 400 405

ccc ggc cct gcc cct ccc ctg cct ggg cac cgc ccg ccg ggg acg gcc 1301
Pro Ala Pro Ala Pro Pro Leu Pro Gly His Arg Pro Pro Gly Thr Ala
410 415 420

cgc gac cgc agc gga gac aag gac ctt ccc tcg ttg gcc gcc ctc agc 1349
Arg Asp Arg Ser Gly Asp Lys Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Leu Ser
425 430 435

gct ggc cct ggt gtg ggg ctg tgt gag gag cat ggg tct ccg gca gcc 1397
Ala Gly Pro Gly Val Gly Leu Cys Glu Glu His Gly Ser Pro Ala Ala
440 445 450 455

ccc cag cac tta ctg ggc cca ggc cca gtt gct ggc cct aag ttg tac 1445
Pro Gln His Leu Leu Gly Pro Gly Pro Val Ala Gly Pro Lys Leu Tyr
460 465 470

ccc ta 1450
Pro

<210> 5
<211> 472
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Met Thr Pro Ser Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Pro Leu Leu Leu
1 5 10 15
Gly Ala Phe Pro Pro Ala Ala Ala Ala Arg Gly Pro Pro Lys Met Ala
20 25 30
Asp Lys Val Val Pro Arg Gln Val Ala Arg Leu Gly Arg Thr Val Arg
35 40 45
Leu Gln Cys Pro Val Glu Gly Asp Pro Pro Pro Leu Thr Met Trp Thr
50 55 60
Lys Asp Gly Arg Thr Ile His Ser Gly Trp Ser Arg Phe Arg Val Leu
65 70 75 80
Pro Gln Gly Leu Lys Val Lys Gln Val Glu Arg Glu Asp Ala Gly Val
85 90 95
Tyr Val Cys Lys Ala Thr Asn Gly Phe Gly Ser Leu Ser Val Asn Tyr
100 105 110
Thr Leu Val Val Leu Asp Asp Ile Ser Pro Gly Lys Glu Ser Leu Gly
115 120 125
Pro Asp Ser Ser Ser Gly Gly Gln Glu Asp Pro Ala Ser Gln Gln Trp
130 135 140

Ala Arg Pro Arg Phe Thr Gln Pro Ser Lys Met Arg Arg Arg Val Ile
145 150 155 160

Ala Arg Pro Val Gly Ser Ser Val Arg Leu Lys Cys Val Ala Ser Gly
165 170 175

His Pro Arg Pro Asp Ile Thr Trp Met Lys Asp Asp Gln Ala Leu Thr
180 185 190

Arg Pro Glu Ala Ala Glu Pro Arg Lys Lys Lys Trp Thr Leu Ser Leu
195 200 205

Lys Asn Leu Arg Pro Glu Asp Ser Gly Lys Tyr Thr Cys Arg Val Ser
210 215 220

Asn Arg Ala Gly Ala Ile Asn Ala Thr Tyr Lys Val Asp Val Ile Gln
225 230 235 240

Arg Thr Arg Ser Lys Pro Val Leu Thr Gly Thr His Pro Val Asn Thr
245 250 255

Thr Val Asp Phe Gly Gly Thr Thr Ser Phe Gln Cys Lys Val Arg Ser
260 265 270

Asp Val Lys Pro Val Ile Gln Trp Leu Lys Arg Val Glu Tyr Gly Ala
275 280 285

Glu Gly Arg His Asn Ser Thr Ile Asp Val Gly Gly Gln Lys Phe Val
290 295 300

Val Leu Pro Thr Gly Asp Val Trp Ser Arg Pro Asp Gly Ser Tyr Leu
305 310 315 320

Asn Lys Leu Leu Ile Thr Arg Ala Arg Gln Asp Asp Ala Gly Met Tyr
325 330 335

Ile Cys Leu Gly Ala Asn Thr Met Gly Tyr Ser Phe Arg Ser Ala Phe
340 345 350

Leu Thr Val Leu Pro Asp Pro Lys Pro Pro Gly Pro Pro Val Ala Ser
355 360 365

Ser Ser Ser Ala Thr Ser Leu Pro Trp Pro Val Val Ile Gly Ile Pro
370 375 380

Ala Gly Ala Val Phe Ile Leu Gly Thr Leu Leu Leu Trp Leu Cys Gln
385 390 395 400

Ala Gln Lys Lys Pro Cys Thr Pro Ala Pro Ala Pro Pro Leu Pro Gly
405 410 415

His Arg Pro Pro Gly Thr Ala Arg Asp Arg Ser Gly Asp Lys Asp Leu
420 425 430

Pro Ser Leu Ala Ala Leu Ser Ala Gly Pro Gly Val Gly Leu Cys Glu
435 440 445

Glu His Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gln His Leu Leu Gly Pro Gly Pro

Leu Arg Leu Phe Cys Asp Thr Asn Gln Thr Thr Ile Val Asn Trp Tyr
 65 70 75 80
 Thr Glu Ser Thr Arg Leu Gln His Gly Gly Arg Ile Arg Leu Thr Asp
 85 90 95
 Thr Val Leu Glu Ile Ala Asp Val Thr Tyr Glu Asp Ser Gly Leu Tyr
 100 105 110
 Leu Cys Val Val Pro Gly Thr Gly His Ile Leu Arg Asn Phe Thr Ile
 115 120 125
 Ser Val Val Asp Ser Leu Ala Ser Gly Asp Asp Asp Asp Glu Asp His
 130 135 140
 Gly Arg Glu Asp Ser Ala Gly Asp Met Gly Glu Asp Pro Pro Tyr Ser
 145 150 155 160
 Thr Ser Tyr Arg Ala Pro Phe Trp Ser Gln Pro Gln Arg Met Asp Lys
 165 170 175
 Lys Leu Tyr Ala Val Pro Ala Gly Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro
 180 185 190
 Ser Ala Gly Asn Pro Thr Pro Gly Ile Arg Trp Leu Lys Asn Gly Arg
 195 200 205
 Glu Phe Gly Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Arg Leu Arg His Gln
 210 215 220
 His Trp Ser Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Asn
 225 230 235 240
 Tyr Thr Cys Leu Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Ser Tyr Ser Tyr
 245 250 255
 Leu Leu Asp Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala
 260 265 270
 Gly Leu Pro Ala Asn Thr Thr Ala Met Leu Gly Ser Asp Val Gln Phe
 275 280 285
 Phe Cys Lys Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys
 290 295 300
 His Ile Glu Val Asn Gly Ser Arg Tyr Gly Pro Asp Gly Val Pro Phe
 305 310 315 320
 Val Gln Val Leu Lys Thr Ala Asp Ile Asn Ser Ser Glu Val Glu Val
 325 330 335
 Leu Tyr Leu His Asn Val Ser Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys
 340 345 350
 Leu Ala Gly Asn Ser Ile Gly Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Trp Leu Thr
 355 360 365
 Val Leu Pro Glu Glu Asp Phe Ala Lys Glu Ala Glu Gly Pro Glu Thr

Leu Gln Cys Pro Val Glu Gly Asp Pro Pro Pro Leu Thr Met Trp Thr
 50 55 60
 Lys Asp Gly Arg Thr Ile His Ser Gly Trp Ser Arg Phe Arg Val Leu
 65 70 75 80
 Pro Gln Gly Leu Lys Val Lys Gln Val Glu Arg Glu Asp Ala Gly Val
 85 90 95
 Tyr Val Cys Lys Ala Thr Asn Gly Phe Gly Ser Leu Ser Val Asn Tyr
 100 105 110
 Thr Leu Val Val Leu Asp Asp Ile Ser Pro Gly Lys Glu Ser Leu Gly
 115 120 125
 Pro Asp Ser Ser Ser Gly Gly Gln Glu Asp Pro Ala Ser Gln Gln Trp
 130 135 140
 Ala Arg Pro Arg Phe Thr Gln Pro Ser Lys Met Arg Arg Arg Val Ile
 145 150 155 160
 Ala Arg Pro Val Gly Ser Ser Val Arg Leu Lys Cys Val Ala Ser Gly
 165 170 175
 His Pro Arg Pro Asp Ile Thr Trp Met Lys Asp Asp Gln Ala Leu Thr
 180 185 190
 Arg Pro Glu Ala Ala Glu Pro Arg Lys Lys Lys Trp Thr Leu Ser Leu
 195 200 205
 Lys Asn Leu Arg Pro Glu Asp Ser Gly Lys Tyr Thr Cys Arg Val Ser
 210 215 220
 Asn Arg Ala Gly Ala Ile Asn Ala Thr Tyr Lys Val Asp Val Ile Gln
 225 230 235 240
 Arg Thr Arg Ser Lys Pro Val Leu Thr Gly Thr His Pro Val Asn Thr
 245 250 255
 Thr Val Asp Phe Gly Gly Thr Thr Ser Phe Gln Cys Lys Val Arg Ser
 260 265 270
 Asp Val Lys Pro Val Ile Gln Trp Leu Lys Arg Val Glu Tyr Gly Ala
 275 280 285
 Glu Gly Arg His Asn Ser Thr Ile Asp Val Gly Gly Gln Lys Phe Val
 290 295 300
 Val Leu Pro Thr Gly Asp Val Trp Ser Arg Pro Asp Gly Ser Tyr Leu
 305 310 315 320
 Asn Lys Leu Leu Ile Thr Arg Ala Arg Gln Asp Asp Ala Gly Met Tyr
 325 330 335
 Ile Cys Leu Gly Ala Asn Thr Met Gly Tyr Ser Phe Arg Ser Ala Phe
 340 345 350
 Leu Thr Val Leu Pro Asp Pro Lys Pro Pro Gly Pro Pro Val Ala Ser

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: predicted
signal peptide of murine FGFR-L polypeptide

<400> 11

Met Thr Arg Ser Pro Ala Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Leu Pro
1 5 10 15

Ser Ala Glu Ala
20

<210> 12

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: predicted
transmembrane domain for murine FRL polypeptide

<400> 12

Leu Pro Trp Pro Val Val Ile Gly Ile Pro Ala Gly Ala Val Phe Ile
1 5 10 15

Leu Gly Thr Val Leu Leu Trp Leu Cys
20 25

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide; PCR primer

<400> 13

cgctgaccat gtggaccaag gatg

24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide; PCR primer

<400> 14

cttgacccca gaaggagctg tcgg

24

<210> 15

<211> 504

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15
 Met Thr Pro Ser Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Pro Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Gly Ala Phe Pro Pro Ala Ala Ala Ala Arg Gly Pro Pro Lys Met Ala
 20 25 30
 Asp Lys Val Val Pro Arg Gln Val Ala Arg Leu Gly Arg Thr Val Arg
 35 40 45
 Leu Gln Cys Pro Val Glu Gly Asp Pro Pro Pro Leu Thr Met Trp Thr
 50 55 60
 Lys Asp Gly Arg Thr Ile His Ser Gly Trp Ser Arg Phe Arg Val Leu
 65 70 75 80
 Pro Gln Gly Leu Lys Val Lys Gln Val Glu Arg Glu Asp Ala Gly Val
 85 90 95
 Tyr Val Cys Lys Ala Thr Asn Gly Phe Gly Ser Leu Ser Val Asn Tyr
 100 105 110
 Thr Leu Val Val Leu Asp Asp Ile Ser Pro Gly Lys Glu Ser Leu Gly
 115 120 125
 Pro Asp Ser Ser Ser Gly Gly Gln Glu Asp Pro Ala Ser Gln Gln Trp
 130 135 140
 Ala Arg Pro Arg Phe Thr Gln Pro Ser Lys Met Arg Arg Arg Val Ile
 145 150 155 160
 Ala Arg Pro Val Gly Ser Ser Val Arg Leu Lys Cys Val Ala Ser Gly
 165 170 175
 His Pro Arg Pro Asp Ile Thr Trp Met Lys Asp Asp Gln Ala Leu Thr
 180 185 190
 Arg Pro Glu Ala Ala Glu Pro Arg Lys Lys Lys Trp Thr Leu Ser Leu
 195 200 205
 Lys Asn Leu Arg Pro Glu Asp Ser Gly Lys Tyr Thr Cys Arg Val Ser
 210 215 220
 Asn Arg Ala Gly Ala Ile Asn Ala Thr Tyr Lys Val Asp Val Ile Gln
 225 230 235 240
 Arg Thr Arg Ser Lys Pro Val Leu Thr Gly Thr His Pro Val Asn Thr
 245 250 255
 Thr Val Asp Phe Gly Gly Thr Thr Ser Phe Gln Cys Lys Val Arg Ser
 260 265 270
 Asp Val Lys Pro Val Ile Gln Trp Leu Lys Arg Val Glu Tyr Gly Ala
 275 280 285
 Glu Gly Arg His Asn Ser Thr Ile Asp Val Gly Gly Gln Lys Phe Val
 290 295 300

Val Leu Pro Thr Gly Asp Val Trp Ser Arg Pro Asp Gly Ser Tyr Leu
 305 310 315 320
 Asn Lys Leu Leu Ile Thr Arg Ala Arg Gln Asp Asp Ala Gly Met Tyr
 325 330 335
 Ile Cys Leu Gly Ala Asn Thr Met Gly Tyr Ser Phe Arg Ser Ala Phe
 340 345 350
 Leu Thr Val Leu Pro Asp Pro Lys Pro Pro Gly Pro Pro Val Ala Ser
 355 360 365
 Ser Ser Ser Ala Thr Ser Leu Pro Trp Pro Val Val Ile Gly Ile Pro
 370 375 380
 Ala Gly Ala Val Phe Ile Leu Gly Thr Leu Leu Leu Trp Leu Cys Gln
 385 390 395 400
 Ala Gln Lys Lys Pro Cys Thr Pro Ala Pro Ala Pro Pro Leu Pro Gly
 405 410 415
 His Arg Pro Pro Gly Thr Ala Arg Asp Arg Ser Gly Asp Lys Asp Leu
 420 425 430
 Pro Ser Leu Ala Ala Leu Ser Ala Gly Pro Gly Val Gly Leu Cys Glu
 435 440 445
 Glu His Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gln His Leu Leu Gly Pro Gly Pro
 450 455 460
 Val Ala Gly Pro Lys Leu Tyr Pro Lys Leu Tyr Thr Asp Ile His Thr
 465 470 475 480
 His Thr His Thr His Ser His Thr His Ser His Val Glu Gly Lys Val
 485 490 495
 His Gln His Ile His Tyr Gln Cys
 500

<210> 16
 <211> 3112
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (25)..(1536)

<400> 16
 gacccaggt ccggacaggc cgag atg acg ccg agc ccc ctg ttg ctg ctc 51
 Met Thr Pro Ser Pro Leu Leu Leu Leu
 1 5
 ctg ctg ccg ccg ctg ctg ctg ggg gcc ttc cca ccg gcc gcc gcc gcc 99
 Leu Leu Pro Pro Leu Leu Leu Gly Ala Phe Pro Pro Ala Ala Ala Ala
 10 15 20 25
 cga ggc ccc cca aag atg gcg gac aag gtg gtc cca ccg cag gtg gcc 147

Arg	Gly	Pro	Pro	Lys	Met	Ala	Asp	Lys	Val	Val	Pro	Arg	Gln	Val	Ala		
				30					35					40			
cgg	ctg	ggc	cgc	act	gtg	cgg	ctg	cag	tgc	cca	gtg	gag	ggg	gac	ccg		195
Arg	Leu	Gly	Arg	Thr	Val	Arg	Leu	Gln	Cys	Pro	Val	Glu	Gly	Asp	Pro		
			45					50					55				
ccg	ccg	ctg	acc	atg	tgg	acc	aag	gat	ggc	cgc	acc	atc	cac	agc	ggc		243
Pro	Pro	Leu	Thr	Met	Trp	Thr	Lys	Asp	Gly	Arg	Thr	Ile	His	Ser	Gly		
		60					65					70					
tgg	agc	cgc	ttc	cgc	gtg	ctg	ccg	cag	ggg	ctg	aag	gtg	aag	cag	gtg		291
Trp	Ser	Arg	Phe	Arg	Val	Leu	Pro	Gln	Gly	Leu	Lys	Val	Lys	Gln	Val		
	75					80					85						
gag	cgg	gag	gat	gcc	ggc	gtg	tac	gtg	tgc	aag	gcc	acc	aac	ggc	ttc		339
Glu	Arg	Glu	Asp	Ala	Gly	Val	Tyr	Val	Cys	Lys	Ala	Thr	Asn	Gly	Phe		
	90				95					100					105		
ggc	agc	ctt	agc	gtc	aac	tac	acc	ctc	gtc	gtg	ctg	gat	gac	att	agc		387
Gly	Ser	Leu	Ser	Val	Asn	Tyr	Thr	Leu	Val	Val	Leu	Asp	Asp	Ile	Ser		
				110					115					120			
cca	ggg	aag	gag	agc	ctg	ggg	ccc	gac	agc	tcc	tct	ggg	ggt	caa	gag		435
Pro	Gly	Lys	Glu	Ser	Leu	Gly	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Gln	Glu		
			125					130					135				
gac	ccc	gcc	agc	cag	cag	tgg	gca	cga	ccg	cgc	ttc	aca	cag	ccc	tcc		483
Asp	Pro	Ala	Ser	Gln	Gln	Trp	Ala	Arg	Pro	Arg	Phe	Thr	Gln	Pro	Ser		
		140					145					150					
aag	atg	agg	cgc	cgg	gtg	atc	gca	cgg	ccc	gtg	ggt	agc	tcc	gtg	cgg		531
Lys	Met	Arg	Arg	Arg	Val	Ile	Ala	Arg	Pro	Val	Gly	Ser	Ser	Val	Arg		
	155					160					165						
ctc	aag	tgc	gtg	gcc	agc	ggg	cac	cct	cgg	ccc	gac	atc	acg	tgg	atg		579
Leu	Lys	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	His	Pro	Arg	Pro	Asp	Ile	Thr	Trp	Met		
					175					180					185		
aag	gac	gac	cag	gcc	ttg	acg	cgc	cca	gag	gcc	gct	gag	ccc	agg	aag		627
Lys	Asp	Asp	Gln	Ala	Leu	Thr	Arg	Pro	Glu	Ala	Ala	Glu	Pro	Arg	Lys		
				190					195					200			
aag	aag	tgg	aca	ctg	agc	ctg	aag	aac	ctg	cgg	ccg	gag	gac	agc	ggc		675
Lys	Lys	Trp	Thr	Leu	Ser	Leu	Lys	Asn	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Ser	Gly		
			205					210					215				
aaa	tac	acc	tgc	cgc	gtg	tcg	aac	cgc	gcg	ggc	gcc	atc	aac	gcc	acc		723
Lys	Tyr	Thr	Cys	Arg	Val	Ser	Asn	Arg	Ala	Gly	Ala	Ile	Asn	Ala	Thr		
		220					225					230					
tac	aag	gtg	gat	gtg	atc	cag	cgg	acc	cgt	tcc	aag	ccc	gtg	ctc	aca		771
Tyr	Lys	Val	Asp	Val	Ile	Gln	Arg	Thr	Arg	Ser	Lys	Pro	Val	Leu	Thr		
	235					240					245						
ggc	acg	cac	ccc	gtg	aac	acg	acg	gtg	gac	ttc	ggg	ggg	acc	acg	tcc		819
Gly	Thr	His	Pro	Val	Asn	Thr	Thr	Val	Asp	Phe	Gly	Gly	Thr	Thr	Ser		
	250				255					260					265		

ttc cag tgc aag gtg cgc agc gac gtg aag ccg gtg atc cag tgg ctg	867
Phe Gln Cys Lys Val Arg Ser Asp Val Lys Pro Val Ile Gln Trp Leu	
270 275 280	
aag cgc gtg gag tac ggc gcc gag ggc cgc cac aac tcc acc atc gat	915
Lys Arg Val Glu Tyr Gly Ala Glu Gly Arg His Asn Ser Thr Ile Asp	
285 290 295	
gtg ggc ggc cag aag ttt gtg gtg ctg ccc acg ggt gac gtg tgg tcg	963
Val Gly Gly Gln Lys Phe Val Val Leu Pro Thr Gly Asp Val Trp Ser	
300 305 310	
cgg ccc gac ggc tcc tac ctc aat aag ctg ctc atc acc cgt gcc cgc	1011
Arg Pro Asp Gly Ser Tyr Leu Asn Lys Leu Leu Ile Thr Arg Ala Arg	
315 320 325	
cag gac gat gcg ggc atg tac atc tgc ctt ggc gcc aac acc atg ggc	1059
Gln Asp Asp Ala Gly Met Tyr Ile Cys Leu Gly Ala Asn Thr Met Gly	
330 335 340 345	
tac agc ttc cgc agc gcc ttc ctc acc gtg ctg cca gac cca aaa ccg	1107
Tyr Ser Phe Arg Ser Ala Phe Leu Thr Val Leu Pro Asp Pro Lys Pro	
350 355 360	
caa ggg cca cct gtg gcc tcc tcg tcc tcg gcc act agc ctg ccg tgg	1155
Gln Gly Pro Pro Val Ala Ser Ser Ser Ser Ala Thr Ser Leu Pro Trp	
365 370 375	
ccc gtg gtc atc ggc atc cca gcc ggc gct gtc ttc atc ctg ggc acc	1203
Pro Val Val Ile Gly Ile Pro Ala Gly Ala Val Phe Ile Leu Gly Thr	
380 385 390	
ctg ctc ctg tgg ctt tgc cag gcc cag aag aag ccg tgc acc ccc gcg	1251
Leu Leu Leu Trp Leu Cys Gln Ala Gln Lys Lys Pro Cys Thr Pro Ala	
395 400 405	
cct gcc cct ccc ctg cct ggg cac cgc ccg ccg ggg acg gcc ctc gac	1299
Pro Ala Pro Pro Leu Pro Gly His Arg Pro Pro Gly Thr Ala Leu Asp	
410 415 420 425	
cgc agc gga gac aag gac ctt ccc tcg ttg gcc gcc ctc agc gct ggc	1347
Arg Ser Gly Asp Lys Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Leu Ser Ala Gly	
430 435 440	
cct ggt gtg ggg ctg tgt gag gag cat ggg tct ccg gca gcc ccc cag	1395
Pro Gly Val Gly Leu Cys Glu Glu His Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gln	
445 450 455	
cac tta ctg ggc cca ggc cca gtt gct ggc cct aag ttg tac ccc aaa	1443
His Leu Leu Gly Pro Gly Pro Val Ala Gly Pro Lys Leu Tyr Pro Lys	
460 465 470	
ctc tac aca gac atc cac aca cac aca cac aca cac tct cac aca cac	1491
Leu Tyr Thr Asp Ile His Thr His Thr His Thr His Ser His Thr His	
475 480 485	
tca cac gtg gag ggc aag gtc cac cag cac atc cac tat cag tgc	1536
Ser His Val Glu Gly Lys Val His Gln His Ile His Tyr Gln Cys	
490 495 500	

```

tagacggcac cgtatctgca gtgggcacgg gggggccggc cagacaggca gactgggagg 1596
atggaggacg gagctgcaga cgaaggcagg ggacccatgg cgaggaggaa tggccagcac 1656
cccaggcagt ctgtgtgtga ggcatagccc ctggacacac acacacagac acacacacta 1716
cctggatgca tgtatgcaca cacatgcgcg cacacgtgct ccctgaaggc acacgtacgc 1776
acacacgcac atgcacagat atgccgcctg ggcacacaga taagctgccc aaatgcacgc 1836
acacgcacag agacatgcc aacatacaa ggacatgctg cctgaacata cacacgcaca 1896
cccattgcga gatgtgctgc ctggacacac acacacacac ggatatgctg tctggacgca 1956
cacacgtgca gatatggtat ccggacacac acgtgcacag atatgctgcc tggacacaca 2016
gataatgctg ccttgacaca cacatgcacg gatattgcct ggacacacac acacacacgc 2076
gtgcacagat atgctgtctg gacaggcaca cacatgcaga tatgctgcct ggacacacac 2136
ttccagacac acgtgcacag gcgcagatat gctgcctgga cacacgcaga tatgctgtct 2196
agtcacacac acacgcagac atgctgtccg gacacacaca cgcattgcaca gatatgctgt 2256
ccggacacac acacgcacgc agatatgctg cctggacaca cacacagata atgctgcctc 2316
aacactcaca cacgtgcaga tattgcctgg acacacacat gtgcacagat atgctgtctg 2376
gacatgcaca cacgtgcaga tatgctgtcc ggatacacac gcacgcacac atgcagatat 2436
gctgcctggg cacacacttc cggacacaca tgcacacaca ggtgcagata tgctgcctgg 2496
acacacgcag actgacgtgc ttttgggagg gtgtgccgtg aagcctgcag tacgtgtgcc 2556
gtgaggctca tagttgatga gggactttcc ctgctccacc gtcactcccc caactctgcc 2616
cgctctgtc cccgcctcag tccccgcctc catccccgcc tctgtccctt ggcttggcg 2676
gctatTTTTg ccactgcct tgggtgccca ggagtccct actgctgtgg gctggggttg 2736
ggggcacagc agccccaagc ctgagaggct ggagcccatg gctagtggct catccccact 2796
gcattctccc cctgacacag agaaggggcc ttggtattta tatttaagaa atgaagataa 2856
tattaataat gatggaagga agactgggtt gcagggactg tggctctctc tggggcccgg 2916
gacccgcctg gtctttcagc catgctgatg accacacccc gtccaggcca gacaccacc 2976
ccccccac tgctgtggtg gcccagatc tctgtaattt tatgtagagt ttgagctgaa 3036
gccccgtata tttaatTTat tttgttaaac atgaaagtgc atcctttccc tccaaaaaaa 3096
aaaaaaaaa aaaaaa 3112

```

```

<210> 17
<211> 504
<212> PRT

```

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Thr Pro Ser Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Pro Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Gly Ala Phe Pro Pro Ala Ala Ala Ala Arg Gly Pro Pro Lys Met Ala
 20 25 30

Asp Lys Val Val Pro Arg Gln Val Ala Arg Leu Gly Arg Thr Val Arg
 35 40 45

Leu Gln Cys Pro Val Glu Gly Asp Pro Pro Pro Leu Thr Met Trp Thr
 50 55 60

Lys Asp Gly Arg Thr Ile His Ser Gly Trp Ser Arg Phe Arg Val Leu
 65 70 75 80

Pro Gln Gly Leu Lys Val Lys Gln Val Glu Arg Glu Asp Ala Gly Val
 85 90 95

Tyr Val Cys Lys Ala Thr Asn Gly Phe Gly Ser Leu Ser Val Asn Tyr
 100 105 110

Thr Leu Val Val Leu Asp Asp Ile Ser Pro Gly Lys Glu Ser Leu Gly
 115 120 125

Pro Asp Ser Ser Ser Gly Gly Gln Glu Asp Pro Ala Ser Gln Gln Trp
 130 135 140

Ala Arg Pro Arg Phe Thr Gln Pro Ser Lys Met Arg Arg Arg Val Ile
 145 150 155 160

Ala Arg Pro Val Gly Ser Ser Val Arg Leu Lys Cys Val Ala Ser Gly
 165 170 175

His Pro Arg Pro Asp Ile Thr Trp Met Lys Asp Asp Gln Ala Leu Thr
 180 185 190

Arg Pro Glu Ala Ala Glu Pro Arg Lys Lys Lys Trp Thr Leu Ser Leu
 195 200 205

Lys Asn Leu Arg Pro Glu Asp Ser Gly Lys Tyr Thr Cys Arg Val Ser
 210 215 220

Asn Arg Ala Gly Ala Ile Asn Ala Thr Tyr Lys Val Asp Val Ile Gln
 225 230 235 240

Arg Thr Arg Ser Lys Pro Val Leu Thr Gly Thr His Pro Val Asn Thr
 245 250 255

Thr Val Asp Phe Gly Gly Thr Thr Ser Phe Gln Cys Lys Val Arg Ser
 260 265 270

Asp Val Lys Pro Val Ile Gln Trp Leu Lys Arg Val Glu Tyr Gly Ala
 275 280 285

Glu Gly Arg His Asn Ser Thr Ile Asp Val Gly Gly Gln Lys Phe Val
 290 295 300

Val Leu Pro Thr Gly Asp Val Trp Ser Arg Pro Asp Gly Ser Tyr Leu
 305 310 315 320
 Asn Lys Leu Leu Ile Thr Arg Ala Arg Gln Asp Asp Ala Gly Met Tyr
 325 330 335
 Ile Cys Leu Gly Ala Asn Thr Met Gly Tyr Ser Phe Arg Ser Ala Phe
 340 345 350
 Leu Thr Val Leu Pro Asp Pro Lys Pro Gln Gly Pro Pro Val Ala Ser
 355 360 365
 Ser Ser Ser Ala Thr Ser Leu Pro Trp Pro Val Val Ile Gly Ile Pro
 370 375 380
 Ala Gly Ala Val Phe Ile Leu Gly Thr Leu Leu Leu Trp Leu Cys Gln
 385 390 395 400
 Ala Gln Lys Lys Pro Cys Thr Pro Ala Pro Ala Pro Pro Leu Pro Gly
 405 410 415
 His Arg Pro Pro Gly Thr Ala Leu Asp Arg Ser Gly Asp Lys Asp Leu
 420 425 430
 Pro Ser Leu Ala Ala Leu Ser Ala Gly Pro Gly Val Gly Leu Cys Glu
 435 440 445
 Glu His Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gln His Leu Leu Gly Pro Gly Pro
 450 455 460
 Val Ala Gly Pro Lys Leu Tyr Pro Lys Leu Tyr Thr Asp Ile His Thr
 465 470 475 480
 His Thr His Thr His Ser His Thr His Ser His Val Glu Gly Lys Val
 485 490 495
 His Gln His Ile His Tyr Gln Cys
 500

<210> 18

<211> 3080

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (23)..(1534)

<400> 18

ccccagggtcc ggacagggcog ag atg acg ccg agc ccc ctg ttg ctg ctc ctg 52
 Met Thr Pro Ser Pro Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10

ctg ccg ccg ctg ctg ctg ggg gcc ttc cca ccg gcc gcc gcc gcc cga 100
 Leu Pro Pro Leu Leu Leu Gly Ala Phe Pro Pro Ala Ala Ala Ala Arg
 15 20 25

ggc ccc cca aag atg gcg gac aag gtg gtc cca cgg cag gtg gcc cgg	148
Gly Pro Pro Lys Met Ala Asp Lys Val Val Pro Arg Gln Val Ala Arg	
30 35 40	
ctg ggc cgc act gtg cgg ctg cag tgc cca gtg gag ggg gac cgg cgg	196
Leu Gly Arg Thr Val Arg Leu Gln Cys Pro Val Glu Gly Asp Pro Pro	
45 50 55	
ccg ctg acc atg tgg acc aag gat ggc cgc acc atc cac agc gcc tgg	244
Pro Leu Thr Met Trp Thr Lys Asp Gly Arg Thr Ile His Ser Gly Trp	
60 65 70	
agc cgc ttc cgc gtg ctg ccg cag ggg ctg aag gtg aag cag gtg gag	292
Ser Arg Phe Arg Val Leu Pro Gln Gly Leu Lys Val Lys Gln Val Glu	
75 80 85 90	
cgg gag gat gcc ggc gtg tac gtg tgc aag gcc acc aac gcc ttc gcc	340
Arg Glu Asp Ala Gln Val Tyr Val Cys Lys Ala Thr Asn Gly Phe Gly	
95 100 105	
agc ctt agc gtc aac tac acc ctc gtc gtg ctg gat gac att agc cca	388
Ser Leu Ser Val Asn Tyr Thr Leu Val Val Leu Asp Asp Ile Ser Pro	
110 115 120	
ggg aag gag agc ctg ggg ccc gac agc tcc tct ggg ggt caa gag gac	436
Gly Lys Glu Ser Leu Gly Pro Asp Ser Ser Ser Gly Gly Gln Glu Asp	
125 130 135	
ccc gcc agc cag cag tgg gca cga ccg cgc ttc aca cag ccc tcc aag	484
Pro Ala Ser Gln Gln Trp Ala Arg Pro Arg Phe Thr Gln Pro Ser Lys	
140 145 150	
atg agg cgc cgg gtg atc gca cgg ccc gtg ggt agc tcc gtg cgg ctc	532
Met Arg Arg Arg Val Ile Ala Arg Pro Val Gly Ser Ser Val Arg Leu	
155 160 165 170	
aag tgc gtg gcc agc ggg cac cct cgg ccc gac atc acg tgg atg aag	580
Lys Cys Val Ala Ser Gly His Pro Arg Pro Asp Ile Thr Trp Met Lys	
175 180 185	
gac gac cag gcc ttg acg cgc cca gag gcc gct gag ccc agg aag aag	628
Asp Asp Gln Ala Leu Thr Arg Pro Glu Ala Ala Glu Pro Arg Lys Lys	
190 195 200	
aag tgg aca ctg agc ctg aag aac ctg cgg ccg gag gac agc gcc aaa	676
Lys Trp Thr Leu Ser Leu Lys Asn Leu Arg Pro Glu Asp Ser Gly Lys	
205 210 215	
tac acc tgc cgc gtg tgc aac cgc cgg gcc gcc atc aac gcc acc tac	724
Tyr Thr Cys Arg Val Ser Asn Arg Ala Gly Ala Ile Asn Ala Thr Tyr	
220 225 230	
aag gtg gat gtg atc cag cgg acc cgt tcc aag ccc gtg ctc aca ggc	772
Lys Val Asp Val Ile Gln Arg Thr Arg Ser Lys Pro Val Leu Thr Gly	
235 240 245 250	
acg cac ccc gtg aac acg acg gtg gac ttc ggg ggg acc acg tcc ttc	820
Thr His Pro Val Asn Thr Thr Val Asp Phe Gly Gly Thr Thr Ser Phe	
255 260 265	

cag tgc aag gtg cgc agc gac gtg aag ccg gtg atc cag tgg ctg aag	868
Gln Cys Lys Val Arg Ser Asp Val Lys Pro Val Ile Gln Trp Leu Lys	
270 275 280	
cgc gtg gag tac ggc gcc gag ggc cgc cac aac tcc acc atc gat gtg	916
Arg Val Glu Tyr Gly Ala Glu Gly Arg His Asn Ser Thr Ile Asp Val	
285 290 295	
ggc ggc cag aag ttt gtg gtg ctg ccc acg ggt gac gtg tgg tgg cgg	964
Gly Gly Gln Lys Phe Val Val Leu Pro Thr Gly Asp Val Trp Ser Arg	
300 305 310	
ccc gac ggc tcc tac ctc aat aag ctg ctc atc acc cgt gcc cgc cag	1012
Pro Asp Gly Ser Tyr Leu Asn Lys Leu Leu Ile Thr Arg Ala Arg Gln	
315 320 325 330	
gac gat gcg ggc atg tac atc tgc ctt ggc gcc aac acc atg gcc tac	1060
Asp Asp Ala Gly Met Tyr Ile Cys Leu Gly Ala Asn Thr Met Gly Tyr	
335 340 345	
agc ttc cgc agc gcc ttc ctc acc gtg ctg cca gac cca aaa ccg caa	1108
Ser Phe Arg Ser Ala Phe Leu Thr Val Leu Pro Asp Pro Lys Pro Gln	
350 355 360	
ggg cca cct gtg gcc tcc tcg tcc tcg gcc act agc ctg ccg tgg ccc	1156
Gly Pro Val Ala Ser Ser Ser Ala Thr Ser Leu Pro Trp Pro	
365 370 375	
gtg gtc atc ggc atc cca gcc ggc gct gtc ttc atc ctg ggc acc ctg	1204
Val Val Ile Gly Ile Pro Ala Gly Ala Val Phe Ile Leu Gly Thr Leu	
380 385 390	
ctc ctg tgg ctt tgc cag gcc cag aag aag ccg tgc acc ccc gcg cct	1252
Leu Leu Trp Leu Cys Gln Ala Gln Lys Lys Pro Cys Thr Pro Ala Pro	
395 400 405 410	
gcc cct ccc ctg cct ggg cac cgc ccg ccg ggg acg gcc cgc gac cgc	1300
Ala Pro Pro Leu Pro Gly His Arg Pro Pro Gly Thr Ala Arg Asp Arg	
415 420 425	
agc gga gac aag gac ctt ccc tcg ttg gcc gcc ctc agc gct gcc cct	1348
Ser Gly Asp Lys Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Leu Ser Ala Gly Pro	
430 435 440	
ggt gtg ggg ctg tgt gag gag cat ggg tct ccg gca gcc ccc cag cac	1396
Gly Val Gly Leu Cys Glu Glu His Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gln His	
445 450 455	
tta ctg ggc cca ggc cca gtt gct ggc cct aag ttg tac ccc aaa ctc	1444
Leu Leu Gly Pro Gly Pro Val Ala Gly Pro Lys Leu Tyr Pro Lys Leu	
460 465 470	
tac aca gac atc cac aca cac aca cac aca cac tct cac aca cac tca	1492
Tyr Thr Asp Ile His Thr His Thr His Thr His Ser His Thr His Ser	
475 480 485 490	
cac gtg gag ggc aag gtc cac cag cac atc cac tat cag tgc	1534
His Val Glu Gly Lys Val His Gln His Ile His Tyr Gln Cys	

495 500
 tagacggcac cgtatctgca gtgggcacgg gggggccggc cagacaggca gactgggagg 1594
 atggaggacg gagctgcaga cgaaggcagg ggacccatgg cgaggaggaa tggccagcac 1654
 cccaggcagt ctgtgtgtga ggcatagccc ctggacacac acacacagac acacacacta 1714
 cctggatgca tgtatgcaca cacatgcgcg cacacgtgct cctgaaggc acacgtacgc 1774
 acacacgcac atgcacagat atgccgcctg ggacacacaga taagctgccc aaatgcacgc 1834
 acacgcacag agacatgcc aacatacaa ggacatgctg cctgaacata cacacgcaca 1894
 cccatgcgca gatgtgctgc ctggacacac acacacacac ggatatgctg tctggacgca 1954
 cacacgtgca gatatggat cgggacacac acgtgcacag atatgctgcc tggacacaca 2014
 gataatgctg ccttgacaca cacatgcacg gatattgcct ggacacacac acacacacgc 2074
 gtgcacagat atgctgtctg gacaggcaca cacatgcaga tatgctgcct ggacacacac 2134
 ttccagacac acgtgcacag gcgcagatat gctgcctgga cacacgcaga tatgctgtct 2194
 agtcacacac acacgcagac atgctgtccg gacacacaca cgcacgcaca gatatgctgt 2254
 cggacacac acacgcacgc agatatgctg cctggacaca cacacagata atgctgcctc 2314
 aacctcaca cacgtgcaga tattgcctgg acacacacat gtgcacagat atgctgtctg 2374
 gacatgcaca cacgtgcaga tatgctgtcc ggatacacac gcacgcacac atgcagatat 2434
 gctgcctggg cacacacttc cggacacaca tgacacaca ggtgcagata tgctgcctgg 2494
 acacacgcag actgacgtgc ttttgggagg gtgtgccgtg aagcctgcag tacgtgtgcc 2554
 gtgaggctca tagttgatga gggactttcc ctgctccacc gtcactcccc caactctgcc 2614
 cgcctctgtc cccgcctcag tcccgcctc catccccgcc tctgtcccct ggocctggcg 2674
 gctatTTTTg ccacctgcct tgggtgccc aaggatcccc actgctgtgg gctgggggtg 2734
 ggggcacagc agccccaagc ctgagaggct ggagcccatg gctagtggct catccccact 2794
 gcattctccc cctgacacag agaaggggcc ttggtattta tatttaagaa atgaagataa 2854
 tattaataat gatggaagga agactggggt gcagggactg tggctcttcc tggggcccgg 2914
 gacccgcctg gtctttcagc catgctgatg accacacccc gtccaggcca gacaccacc 2974
 cccacccac tgtcgtggtg gcccagatc tctgtaattt tatgtagagt ttgagctgaa 3034
 gccccgtata ttttaatttat tttgttaaac atgaaagtgc atcctt 3080

<210> 19

<211> 504

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Thr Pro Ser Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Pro Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Gly Ala Phe Pro Pro Ala Ala Ala Ala Arg Gly Pro Pro Lys Met Ala
 20 25 30
 Asp Lys Val Val Pro Arg Gln Val Ala Arg Leu Gly Arg Thr Val Arg
 35 40 45
 Leu Gln Cys Pro Val Glu Gly Asp Pro Pro Pro Leu Thr Met Trp Thr
 50 55 60
 Lys Asp Gly Arg Thr Ile His Ser Gly Trp Ser Arg Phe Arg Val Leu
 65 70 75 80
 Pro Gln Gly Leu Lys Val Lys Gln Val Glu Arg Glu Asp Ala Gly Val
 85 90 95
 Tyr Val Cys Lys Ala Thr Asn Gly Phe Gly Ser Leu Ser Val Asn Tyr
 100 105 110
 Thr Leu Val Val Leu Asp Asp Ile Ser Pro Gly Lys Glu Ser Leu Gly
 115 120 125
 Pro Asp Ser Ser Ser Gly Gly Gln Glu Asp Pro Ala Ser Gln Gln Trp
 130 135 140
 Ala Arg Pro Arg Phe Thr Gln Pro Ser Lys Met Arg Arg Arg Val Ile
 145 150 155 160
 Ala Arg Pro Val Gly Ser Ser Val Arg Leu Lys Cys Val Ala Ser Gly
 165 170 175
 His Pro Arg Pro Asp Ile Thr Trp Met Lys Asp Asp Gln Ala Leu Thr
 180 185 190
 Arg Pro Glu Ala Ala Glu Pro Arg Lys Lys Lys Trp Thr Leu Ser Leu
 195 200 205
 Lys Asn Leu Arg Pro Glu Asp Ser Gly Lys Tyr Thr Cys Arg Val Ser
 210 215 220
 Asn Arg Ala Gly Ala Ile Asn Ala Thr Tyr Lys Val Asp Val Ile Gln
 225 230 235 240
 Arg Thr Arg Ser Lys Pro Val Leu Thr Gly Thr His Pro Val Asn Thr
 245 250 255
 Thr Val Asp Phe Gly Gly Thr Thr Ser Phe Gln Cys Lys Val Arg Ser
 260 265 270
 Asp Val Lys Pro Val Ile Gln Trp Leu Lys Arg Val Glu Tyr Gly Ala
 275 280 285
 Glu Gly Arg His Asn Ser Thr Ile Asp Val Gly Gly Gln Lys Phe Val
 290 295 300

Val Leu Pro Thr Gly Asp Val Trp Ser Arg Pro Asp Gly Ser Tyr Leu
 305 310 315 320
 Asn Lys Leu Leu Ile Thr Arg Ala Arg Gln Asp Asp Ala Gly Met Tyr
 325 330 335
 Ile Cys Leu Gly Ala Asn Thr Met Gly Tyr Ser Phe Arg Ser Ala Phe
 340 345 350
 Leu Thr Val Leu Pro Asp Pro Lys Pro Gln Gly Pro Pro Val Ala Ser
 355 360 365
 Ser Ser Ser Ala Thr Ser Leu Pro Trp Pro Val Val Ile Gly Ile Pro
 370 375 380
 Ala Gly Ala Val Phe Ile Leu Gly Thr Leu Leu Leu Trp Leu Cys Gln
 385 390 395 400
 Ala Gln Lys Lys Pro Cys Thr Pro Ala Pro Ala Pro Pro Leu Pro Gly
 405 410 415
 His Arg Pro Pro Gly Thr Ala Arg Asp Arg Ser Gly Asp Lys Asp Leu
 420 425 430
 Pro Ser Leu Ala Ala Leu Ser Ala Gly Pro Gly Val Gly Leu Cys Glu
 435 440 445
 Glu His Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gln His Leu Leu Gly Pro Gly Pro
 450 455 460
 Val Ala Gly Pro Lys Leu Tyr Pro Lys Leu Tyr Thr Asp Ile His Thr
 465 470 475 480
 His Thr His Thr His Ser His Thr His Ser His Val Glu Gly Lys Val
 485 490 495
 His Gln His Ile His Tyr Gln Cys
 500

<210> 20
 <211> 342
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 20
 Met Ala Asp Lys Val Val Pro Arg Gln Val Ala Arg Leu Gly Arg Thr
 1 5 10 15
 Val Arg Leu Gln Cys Pro Val Glu Gly Asp Pro Pro Pro Leu Thr Met
 20 25 30
 Trp Thr Lys Asp Gly Arg Thr Ile His Ser Gly Trp Ser Arg Phe Arg
 35 40 45
 Val Leu Pro Gln Gly Leu Lys Val Lys Glu Val Glu Ala Glu Asp Ala
 50 55 60
 Gly Val Tyr Val Cys Lys Ala Thr Asn Gly Phe Gly Ser Leu Ser Val

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: murine FGFR-L
extracellular domain-Fc fusion polypeptide

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1782)

<400> 21

```

atg acg cgg agc ccc gcg ctg ctg ctg ctg cta ttg ggg gcc ctc cgg 48
Met Thr Arg Ser Pro Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Leu Pro
  1                    5                    10                    15

tcg gct gag gcg gcg cga gga ccc cca aga atg gca gac aaa gtg gtc 96
Ser Ala Glu Ala Ala Arg Gly Pro Pro Arg Met Ala Asp Lys Val Val
                    20                    25                    30

cca cgg cag gtg gcc cgc ctg ggc cgc act gtg cgg cta cag tgc cca 144
Pro Arg Gln Val Ala Arg Leu Gly Arg Thr Val Arg Leu Gln Cys Pro
                    35                    40                    45

gtg gag ggg gac cca cca ccg ttg acc atg tgg acc aaa gat ggc cgc 192
Val Glu Gly Asp Pro Pro Pro Leu Thr Met Trp Thr Lys Asp Gly Arg
  50                    55                    60

aca atc cac agt ggc tgg agc cgc ttc cgt gtg ctg ccc cag ggt ctg 240
Thr Ile His Ser Gly Trp Ser Arg Phe Arg Val Leu Pro Gln Gly Leu
  65                    70                    75                    80

aag gtg aag gag gtg gag gcc gag gat gcc ggt gtt tat gtg tgc aag 288
Lys Val Lys Glu Val Glu Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Val Cys Lys
                    85                    90                    95

gcc acc aat ggc ttt ggc agc ctc agc gtc aac tac act ctc atc atc 336
Ala Thr Asn Gly Phe Gly Ser Leu Ser Val Asn Tyr Thr Leu Ile Ile
                    100                    105                    110

atg gat gat att agt cca ggg aag gag agc cct ggg cca ggt ggt tct 384
Met Asp Asp Ile Ser Pro Gly Lys Glu Ser Pro Gly Pro Gly Gly Ser
                    115                    120                    125

tcg ggg ggc cag gag gac cca gcc agc cag cag tgg gca cgg cct cgc 432
Ser Gly Gly Gln Glu Asp Pro Ala Ser Gln Gln Trp Ala Arg Pro Arg
                    130                    135                    140

ttc aca cag ccc tcc aag atg agg cgc cga gtg att gca cgg cct gtg 480
Phe Thr Gln Pro Ser Lys Met Arg Arg Arg Val Ile Ala Arg Pro Val
                    145                    150                    155                    160

ggg agc tct gtg cgg ctc aag tgt gtg gcc agt ggg cac cca cgg cca 528
Gly Ser Ser Val Arg Leu Lys Cys Val Ala Ser Gly His Pro Arg Pro
                    165                    170                    175

gac atc atg tgg atg aag gat gac cag acc ttg acg cat cta gag gct 576
Asp Ile Met Trp Met Lys Asp Asp Gln Thr Leu Thr His Leu Glu Ala
                    180                    185                    190

agt gaa cac aga aag aag aag tgg aca ctg agc ttg aag aac ctg aag 624
Ser Glu His Arg Lys Lys Lys Trp Thr Leu Ser Leu Lys Asn Leu Lys

```

195				200				205								
cct	gaa	gac	agt	ggc	aag	tac	acg	tgc	cgt	gta	tct	aac	aag	gcc	ggt	672
Pro	Glu	Asp	Ser	Gly	Lys	Tyr	Thr	Cys	Arg	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Gly	
	210					215						220				
gcc	atc	aac	gcc	acc	tac	aaa	gtg	gat	gta	atc	cag	cgg	act	cgt	tcc	720
Ala	Ile	Asn	Ala	Thr	Tyr	Lys	Val	Asp	Val	Ile	Gln	Arg	Thr	Arg	Ser	
	225				230					235					240	
aag	cct	gtg	ctc	aca	ggg	aca	cac	cct	gtg	aac	aca	acg	gtg	gac	ttc	768
Lys	Pro	Val	Leu	Thr	Gly	Thr	His	Pro	Val	Asn	Thr	Thr	Val	Asp	Phe	
				245					250						255	
ggt	ggg	aca	acg	tcc	ttc	cag	tgc	aag	gtg	cgc	agt	gac	gtg	aag	cct	816
Gly	Gly	Thr	Thr	Ser	Phe	Gln	Cys	Lys	Val	Arg	Ser	Asp	Val	Lys	Pro	
			260					265						270		
gtg	atc	cag	tgg	ctg	aag	cgg	gtg	gag	tac	ggc	tcc	gag	gga	cgc	cac	864
Val	Ile	Gln	Trp	Leu	Lys	Arg	Val	Glu	Tyr	Gly	Ser	Glu	Gly	Arg	His	
		275					280						285			
aac	tcc	acc	att	gat	gtg	ggt	ggc	cag	aag	ttt	gtg	gtg	ttg	ccc	acg	912
Asn	Ser	Thr	Ile	Asp	Val	Gly	Gly	Gln	Lys	Phe	Val	Val	Leu	Pro	Thr	
	290					295						300				
ggt	gat	gtg	tgg	tca	cgg	cct	gat	ggc	tcc	tac	ctc	aac	aag	ctg	ctc	960
Gly	Asp	Val	Trp	Ser	Arg	Pro	Asp	Gly	Ser	Tyr	Leu	Asn	Lys	Leu	Leu	
	305				310					315					320	
atc	tct	cgg	gcc	cgc	cag	gat	gat	gct	ggc	atg	tac	atc	tgc	cta	ggt	1008
Ile	Ser	Arg	Ala	Arg	Gln	Asp	Asp	Ala	Gly	Met	Tyr	Ile	Cys	Leu	Gly	
				325					330						335	
gca	aat	acc	atg	ggc	tac	agt	ttc	cgt	agc	gcc	ttc	ctc	act	gta	tta	1056
Ala	Asn	Thr	Met	Gly	Tyr	Ser	Phe	Arg	Ser	Ala	Phe	Leu	Thr	Val	Leu	
			340					345						350		
cca	gac	ccc	aaa	cct	cca	ggg	cct	cct	atg	gct	tct	tca	tcg	gtc	gac	1104
Pro	Asp	Pro	Lys	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Met	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Asp	
		355					360						365			
aaa	act	cac	aca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	ctc	ctg	ggg	gga	1152
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
	370					375					380					
ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	1200
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
	385				390					395					400	
tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	1248
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
				405					410					415		
gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	1296
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
			420					425					430			
aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	1344

Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg		
		435					440					445					
gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	1392	
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys		
		450				455					460						
gag	tac	aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	1440	
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu		
465					470					475					480		
aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	1488	
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr		
				485				490						495			
acc	ctg	ccc	cca	tcc	cgg	gat	gag	ctg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	1536	
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu		
			500					505						510			
acc	tgc	ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	1584	
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp		
		515					520						525				
gag	agc	aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	1632	
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val		
		530				535					540						
ctg	gac	tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	1680	
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp		
545					550					555					560		
aag	agc	agg	tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	1728	
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His		
				565				570						575			
gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	1776	
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro		
			580					585						590			
ggt	aaa	tgataa														1788	
Gly	Lys																
<210>	22																
<211>	594																
<212>	PRT																
<213>	Artificial Sequence																
<220>																	
<223>	Description of Artificial Sequence: murine FGFR-I																
	extracellular domain-Fc fusion polypeptide																
<400>	22																
Met	Thr	Arg	Ser	Pro	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Pro			
1				5					10				15				
Ser	Ala	Glu	Ala	Ala	Arg	Gly	Pro	Pro	Arg	Met	Ala	Asp	Lys	Val	Val		
			20					25					30				

Pro Arg Gln Val Ala Arg Leu Gly Arg Thr Val Arg Leu Gln Cys Pro
 35 40 45
 Val Glu Gly Asp Pro Pro Pro Leu Thr Met Trp Thr Lys Asp Gly Arg
 50 55 60
 Thr Ile His Ser Gly Trp Ser Arg Phe Arg Val Leu Pro Gln Gly Leu
 65 70 75 80
 Lys Val Lys Glu Val Glu Ala Glu Asp Ala Gly Val Tyr Val Cys Lys
 85 90 95
 Ala Thr Asn Gly Phe Gly Ser Leu Ser Val Asn Tyr Thr Leu Ile Ile
 100 105 110
 Met Asp Asp Ile Ser Pro Gly Lys Glu Ser Pro Gly Pro Gly Gly Ser
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gln Glu Asp Pro Ala Ser Gln Gln Trp Ala Arg Pro Arg
 130 135 140
 Phe Thr Gln Pro Ser Lys Met Arg Arg Arg Val Ile Ala Arg Pro Val
 145 150 155 160
 Gly Ser Ser Val Arg Leu Lys Cys Val Ala Ser Gly His Pro Arg Pro
 165 170 175
 Asp Ile Met Trp Met Lys Asp Asp Gln Thr Leu Thr His Leu Glu Ala
 180 185 190
 Ser Glu His Arg Lys Lys Lys Trp Thr Leu Ser Leu Lys Asn Leu Lys
 195 200 205
 Pro Glu Asp Ser Gly Lys Tyr Thr Cys Arg Val Ser Asn Lys Ala Gly
 210 215 220
 Ala Ile Asn Ala Thr Tyr Lys Val Asp Val Ile Gln Arg Thr Arg Ser
 225 230 235 240
 Lys Pro Val Leu Thr Gly Thr His Pro Val Asn Thr Thr Val Asp Phe
 245 250 255
 Gly Gly Thr Thr Ser Phe Gln Cys Lys Val Arg Ser Asp Val Lys Pro
 260 265 270
 Val Ile Gln Trp Leu Lys Arg Val Glu Tyr Gly Ser Glu Gly Arg His
 275 280 285
 Asn Ser Thr Ile Asp Val Gly Gly Gln Lys Phe Val Val Leu Pro Thr
 290 295 300
 Gly Asp Val Trp Ser Arg Pro Asp Gly Ser Tyr Leu Asn Lys Leu Leu
 305 310 315 320
 Ile Ser Arg Ala Arg Gln Asp Asp Ala Gly Met Tyr Ile Cys Leu Gly
 325 330 335
 Ala Asn Thr Met Gly Tyr Ser Phe Arg Ser Ala Phe Leu Thr Val Leu
 340 345 350

Pro Asp Pro Lys Pro Pro Gly Pro Pro Met Ala Ser Ser Ser Val Asp
 355 360 365
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 370 375 380
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 385 390 395 400
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 405 410 415
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 420 425 430
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 435 440 445
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 450 455 460
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 465 470 475 480
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 485 490 495
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 500 505 510
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 515 520 525
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 530 535 540
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 545 550 555 560
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 565 570 575
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 580 585 590
 Gly Lys

【図 1 B】

FIG. 1B

ctg agc ttg aag aac ctg aag cct gaa gac agt ggc aag tac acg tgc	737
Leu Ser Leu Lys Asn Leu Lys Pro Glu Asp Ser Gly Lys Tyr Thr Cys	
205 210 215	
cgt gta tct aac aag gcc ggt gcc atc aac gcc acc tac aaa gtg gat	785
Arg Val Ser Asn Lys Ala Gly Ala Ile Asn Ala Thr Tyr Lys Val Asp	
220 225 230	
gta atc cag cgg act cgt tcc aag cct gtg ctc aca ggg aca cac cct	833
Val Ile Gln Arg Thr Arg Ser Lys Pro Val Leu Thr Gly Thr His Pro	
235 240 245	
gtg aac aca acg gtg gac ttc ggt ggg aca acg tcc ttc cag tgc aag	881
Val Asn Thr Thr Val Asp Phe Gly Gly Thr Thr Ser Phe Gln Cys Lys	
250 255 260 265	
gtg cgc agt gac gtg aag cct gtg atc cag tgg ctg aag cgg gtg gag	929
Val Arg Ser Asp Val Lys Pro Val Ile Gln Trp Leu Lys Arg Val Glu	
270 275 280	
tac ggc tcc gag gga cgc cac aac tcc acc att gat gtg ggt ggc cag	977
Tyr Gly Ser Glu Gly Arg His Asn Ser Thr Ile Asp Val Gly Gly Gln	
285 290 295	
aag ttt gtg gtg ttg ccc acg ggt gat gtg tgg tca cgg cct gat ggc	1025
Lys Phe Val Val Leu Pro Thr Gly Asp Val Trp Ser Arg Pro Asp Gly	
300 305 310	
tcc tac ctc aac aag ctg ctc atc tct cgg gcc cgc cag gat gat gct	1073
Ser Tyr Leu Asn Lys Leu Leu Ile Ser Arg Ala Arg Gln Asp Asp Ala	
315 320 325	
ggc atg tac atc tgc cta ggt gca aat acc atg ggc tac agt ttc cgt	1121
Gly Met Tyr Ile Cys Leu Gly Ala Asn Thr Met Gly Tyr Ser Phe Arg	
330 335 340 345	
agc gcc ttc ctc act gta tta cca gac ccc aaa cct cca ggg cct cct	1169
Ser Ala Phe Leu Thr Val Leu Pro Asp Pro Lys Pro Pro Gly Pro Pro	
350 355 360	
atg gct tct tca tcg tca tcc aca agc ctg cca tgg cct gtg gtg atc	1217
Met Ala Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ser Leu Pro Trp Pro <u>Val Val Ile</u>	
365 370 375	
ggc atc cca get ggt gct gtc ttc atc cta ggc act gtg ctg ctc tgg	1265
<u>Gly Ile Pro Ala Gly Ala Val Phe Ile Leu Gly Thr Val Leu Leu Trp</u>	
380 385 390	
ctt tgc cag acc aag aag aag cca tgt gcc cca gca tct aca ctt cct	1313
<u>Leu Cys</u> Gln Thr Lys Lys Lys Pro Cys Ala Pro Ala Ser Thr Leu Pro	
395 400 405	

【図1C】

FIG. 1C

```

gtg cct ggg cat cgt ccc cca ggg aca tcc cga gaa cgc agt ggt gac 1361
Val Pro Gly His Arg Pro Pro Gly Thr Ser Arg Glu Arg Ser Gly Asp
410                      415                      420                      425

aag gac ctg ccc tca ttg gct gtg ggc ata tgt gag gag cat gga tcc 1409
Lys Asp Leu Pro Ser Leu Ala Val Gly Ile Cys Glu Glu His Gly Ser
                      430                      435                      440

gcc atg gcc ccc cag cac atc ctg gcc tct ggc tca act gct ggc ccc 1457
Ala Met Ala Pro Gln His Ile Leu Ala Ser Gly Ser Thr Ala Gly Pro
                      445                      450                      455

aag ctg tac ccc aag cta tac aca gat gtg cac aca cac aca cat aca 1505
Lys Leu Tyr Pro Lys Leu Tyr Thr Asp Val His Thr His Thr His Thr
                      460                      465                      470

cac acc tgc act cac acg ctc tca tgt gga ggg caa ggt tca tca aca 1553
His Thr Cys Thr His Thr Leu Ser Cys Gly Gly Gln Gly Ser Ser Thr
                      475                      480                      485

cca gca tgt cca cta tca gtg cta aat aca gcg aat ctc caa gca ctg 1601
Pro Ala Cys Pro Leu Ser Val Leu Asn Thr Ala Asn Leu Gln Ala Leu
490                      495                      500                      505

tgt cct gag gta ggc ata tgg ggg cca agg caa cag gtt ggg aga att 1649
Cys Pro Glu Val Gly Ile Trp Gly Pro Arg Gln Gln Val Gly Arg Ile
                      510                      515                      520

gag aac aat gga gga aga gta tct tag ggtgccttat ggtggacact 1696
Glu Asn Asn Gly Gly Arg Val Ser
                      525                      530

cacaacttg gccatataga tgtatgtact accagatgaa cagccagcca gattcacaca 1756

cgcacatggt taaacgtgta aacgtgtgca caactgcaca cacaaactga gaaaccttca 1816

ggaggatttg tgggtgact ttgcagtgac atgtagcgat ggctagttga aggaatctcc 1876

ctcatgtctt agtggtcacg gccacttccc caccctgcc catctgtggt cctgcctggc 1936

cttgggtgtgc ttccgtgtgc cctgggtatc aggagcctat catcaacctg actgggggtga 1996

gcagtgcagc catgcctgga ggtttgagcc accctcccct tgctagagag aagggcctca 2056

atatttatat ttaagaaatg aaataatatt aataataatg taaggagggc tgggacacag 2116

ggactctggc cttccctggg gcoctgggacc tgctggcct tgtggttaca ttgggtacct 2176

tcaactgtcca tggctgctg gtctctgtaa ttttatatag agtttgagct gaagcctcgt 2236

atatttaatt tattttgtta aacaagaaaa aaaaaaaaaa a 2277

```

【図2A】

FIG. 2A

gcggccgcga cccaggtcc ggacagggcag ag atg acg ccg agc ccc ctg ttg	53
<u>Met Thr Pro Ser Pro Leu Leu</u>	
1 5	
ctg ctc ctg ctg ccg ccg ctg ctg ctg ggg gcc ttc cca ccg gcc gcc	101
<u>Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Gly Ala Phe Pro Pro Ala Ala</u>	
10 15 20	
gcc gcc cga ggc ccc cca aag atg gcg gac aag gtg gtc cca cgg cag	149
<u>Ala Ala Arg Gly Pro Pro Lys Met Ala Asp Lys Val Val Pro Arg Gln</u>	
25 30 35	
gtg gcc cgg ctg ggc cgc act gtg cgg ctg cag tgc cca gtg gag ggg	197
<u>Val Ala Arg Leu Gly Arg Thr Val Arg Leu Gln Cys Pro Val Glu Gly</u>	
40 45 50 55	
gac ccg ccg ccg ctg acc atg tgg acc aag gat ggc cgc acc atc cac	245
<u>Asp Pro Pro Pro Leu Thr Met Trp Thr Lys Asp Gly Arg Thr Ile His</u>	
60 65 70	
agc gcc tgg agc cgc ttc cgc gtg ctg ccg cag ggg ctg aag gtg aag	293
<u>Ser Gly Trp Ser Arg Phe Arg Val Leu Pro Gln Gly Leu Lys Val Lys</u>	
75 80 85	
cag gtg gag cgg gag gat gcc ggc gtg tac gtg tgc aag gcc acc aac	341
<u>Gln Val Glu Arg Glu Asp Ala Gly Val Tyr Val Cys Lys Ala Thr Asn</u>	
90 95 100	
ggc ttc ggc agc ctg agc gtc aac tac acc ctc gtc gtg ctg gat gac	389
<u>Gly Phe Gly Ser Leu Ser Val Asn Tyr Thr Leu Val Val Leu Asp Asp</u>	
105 110 115	
att agc cca ggg aag gag agc ctg ggg ccc gac agc tcc tct ggg ggt	437
<u>Ile Ser Pro Gly Lys Glu Ser Leu Gly Pro Asp Ser Ser Ser Gly Gly</u>	
120 125 130 135	
caa gag gac ccc gcc agc cag cag tgg gca cga ccg cgc ttc aca cag	485
<u>Gln Glu Asp Pro Ala Ser Gln Gln Trp Ala Arg Pro Arg Phe Thr Gln</u>	
140 145 150	
ccc tcc aag atg agg cgc cgg gtg atc gca cgg ccc gtg ggt agc tcc	533
<u>Pro Ser Lys Met Arg Arg Arg Val Ile Ala Arg Pro Val Gly Ser Ser</u>	
155 160 165	
gtg cgg ctc aag tgc gtg gcc agc ggg cac cct cgg ccc gac atc acg	581
<u>Val Arg Leu Lys Cys Val Ala Ser Gly His Pro Arg Pro Asp Ile Thr</u>	
170 175 180	
tgg atg aag gac gac cag gcc ttg acg cgc cca gag gcc gct gag ccc	629
<u>Trp Met Lys Asp Asp Gln Ala Leu Thr Arg Pro Glu Ala Ala Glu Pro</u>	
185 190 195	

【図 2 B】

FIG. 2B

```

agg aag aag aag tgg aca ctg agc ctg aag aac ctg cgg ccg gag gac 677
Arg Lys Lys Lys Trp Thr Leu Ser Leu Lys Asn Leu Arg Pro Glu Asp
200 205 210 215

agc ggc aaa tac acc tgc cgc gtg tgc aac cgc gcg ggc gcc atc aac 725
Ser Gly Lys Tyr Thr Cys Arg Val Ser Asn Arg Ala Gly Ala Ile Asn
220 225 230

gcc acc tac aag gtg gat gtg atc cag cgg acc cgt tcc aag ccc gtg 773
Ala Thr Tyr Lys Val Asp Val Ile Gln Arg Thr Arg Ser Lys Pro Val
235 240 245

ctc aca ggc acg cac ccc gtg aac acg acg gtg gac ttc ggg ggg acc 821
Leu Thr Gly Thr His Pro Val Asn Thr Thr Val Asp Phe Gly Gly Thr
250 255 260

acg tcc ttc cag tgc aag gtg cgc agc gac gtg aag ccg gtg atc cag 869
Thr Ser Phe Gln Cys Lys Val Arg Ser Asp Val Lys Pro Val Ile Gln
265 270 275

tgg ctg aag cgc gtg gag tac ggc gct gag ggc cgc cac aac tcc acc 917
Trp Leu Lys Arg Val Glu Tyr Gly Ala Glu Gly Arg His Asn Ser Thr
280 285 290 295

atc gat gtg ggc ggc cag aag ttt gtg gtg ctg ccc acg ggt gac gtg 965
Ile Asp Val Gly Gly Gln Lys Phe Val Val Leu Pro Thr Gly Asp Val
300 305 310

tgg tgc cgg ccc gac ggc tcc tac ctc aat aag ctg ctc atc acc cgt 1013
Trp Ser Arg Pro Asp Gly Ser Tyr Leu Asn Lys Leu Leu Ile Thr Arg
315 320 325

gcc cgc cag gac gat gcg ggc atg tac atc tgc ctt ggc gcc aac acc 1061
Ala Arg Gln Asp Asp Ala Gly Met Tyr Ile Cys Leu Gly Ala Asn Thr
330 335 340

atg ggc tac agc ttc cgc agc gcc ttc ctc acc gtg ctg cca gac cca 1109
Met Gly Tyr Ser Phe Arg Ser Ala Phe Leu Thr Val Leu Pro Asp Pro
345 350 355

aaa ccg cca ggg cca cct gtg gcc tcc tgc tcc tgc gcc act agc ctg 1157
Lys Pro Pro Gly Pro Pro Val Ala Ser Ser Ser Ser Ala Thr Ser Leu
360 365 370 375

ccg tgg ccc gtg gtc atc ggc atc cca gcc ggc gct gtc ttc atc ctg 1205
Pro Trp Pro Val Val Ile Gly Ile Pro Ala Gly Ala Val Phe Ile Leu
380 385 390

gcc acc ctg ctc ctg tgg ctt tgc cag gcc cag aag aag ccg tgc acc 1253
Gly Thr Leu Leu Leu Trp Leu Cys Gln Ala Gln Lys Lys Pro Cys Thr
395 400 405

```

【図2C】

FIG. 2C

ccc gcg cct gcc cct ccc ctg cct ggg cac cgc ccg ccg ggg acg gcc	1301
Pro Ala Pro Ala Pro Pro Leu Pro Gly His Arg Pro Pro Gly Thr Ala	
410 415 420	
cgc gac cgc agc gga gac aag gac ctt ccc tcg ttg gcc gcc ctc agc	1349
Arg Asp Arg Ser Gly Asp Lys Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Leu Ser	
425 430 435	
gct ggc cct ggt gtg ggg ctg tgt gag gag cat ggg tct ccg gca gcc	1397
Ala Gly Pro Gly Val Gly Leu Cys Glu Glu His Gly Ser Pro Ala Ala	
440 445 450 455	
ccc cag cac tta ctg ggc cca ggc cca gtt gct ggc cct aag ttg tac	1445
Pro Gln His Leu Leu Gly Pro Gly Pro Val Ala Gly Pro Lys Leu Tyr	
460 465 470	
ccc ta	1450
Pro	

【図3A】

FIG. 3A

```

muFGFR-L 1 .....MTRSPALLLLLLGCALPSAEAARGPP.....RMADKV 31
          || |||| | | . || | :|: |
neFGFR-4 1 MGVQKDSRDIRWNRTRPLALLLCCGLLAFSALSFCARTLPEGRKANLAELV 50

muFGFR-L 32 VPRQVARL...GRTVRLQCPVEGDPPPLTMWTKDGRTIHSGWSRFRVLPQ 78
          : | | .|| | . :|. | | | | |.
neFGFR-4 51 SEEEHFLLDPGNALRLFCDT.NQTTIVNWYTESTRLQHGG..RIRLTD 97

muFGFR-L 79 GLKVKEVEAEDAGVYVCKATNGFGSLSVNYTLIIMDDISPG...KESPGP 125
          |.: :| |||.|.|. | | : |: :. | :. | | |
neFGFR-4 98 VLEIADVITYEDSGLYLC.VVPGTGHILRNFTISVVDLSLGGDDDDHGR 146

muFGFR-L 126 GGSSG..GQEDPASQQWARPRFTQPSKMRRRVIARPVGSSVRLKCVASGH 173
          |. | |: | | : |..|| :| :. | | |. | : | ..|.
neFGFR-4 147 EDSAGDMGEDPPYSTSYRAPFWSQPQRMDDKKLYAVPAGNTVVKFRCP 196

muFGFR-L 174 PRPDIMWMKDDQTL...THLEASEHRKKKWTLSLKNLKPEDSGKYTCRVS 220
          | | | |:|. . : | . |. | :.. | | | | |
neFGFR-4 197 PTPGIRWLKNGREFGGEHRIGGIRLRHQHWSLVMESVVPDRGNVTC 246

muFGFR-L 221 NKAGAINATYKVDVIQRTSRKPVLTGTHPVNTTVDFGGTTSFQCKVRS 270
          || |. |. . | .| :| :| | || | | | | |
neFGFR-4 247 NKFGSISYSYLLDVLERSPHRPILQAGLPANTTAMLGSDVQFFCKVYSDA 296

muFGFR-L 271 KPVIQWLKRVEYGSSEGRHNSTIDVGGQKFV.VLPTGDVWSRPDGSYL 319
          . | |||| | :| . | | | | | | | | : | . | . |
neFGFR-4 297 QPHIQWLKHIEV.....NGSRYGPDGVVQVQLKTADI.....NSSEVEVL 337

muFGFR-L 320 LISRARQDDAGMYICLGANTMGYSFRSAFLTVLPDPKPPGPPMASSSSST 369
          : : ||| | | | |. | | :. | | | | | : |
neFGFR-4 338 YLHNVSFPEDAGEYTCLAGNSIGLSYQSAWLTVLPEDFAKEAEGPETRYT 387

muFGFR-L 370 SLPWPVVIGIPAGAVFILGTVLLWLCQTKKPCAPASTLPVPGHRPPGTS 419
          : : | : : | : . | | . . | | | | |
neFGFR-4 388 D....IIITYTSGSLALLMAAVIVVLCRMQLP.....PTKTHLEPATV 425

muFGFR-L 420 RERSGDKDLPSLAVGICEEHGSAMAPQHILASGSTAGPKLYPKLYTDVHT 469
          . | : .. |. . : |. | | | | |.
neFGFR-4 426 HKLSRFPLMRQFSLESSSSGKSSTSLVRVTRLSSSCTPMLPGVLEFDLPL 475

```

【図3B】

FIG. 3B

```

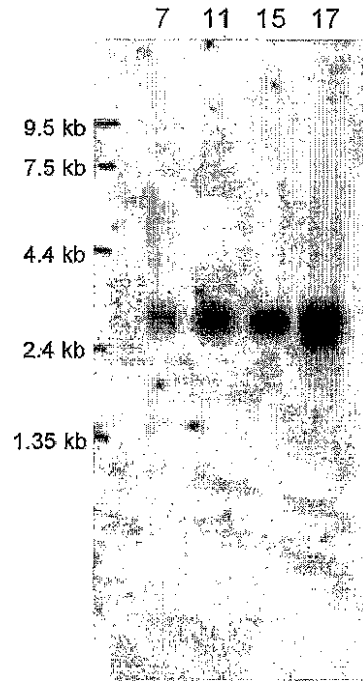
muFGFR-L 470 HTHHTCTHTLSCGGQGSSTPACPLSVLNTANLQALCPEVGIWGPRQQVG 519
      .           | |           .           : | |           .:
neFGFR-4 476 DSKWEFPRERLVLGKPLGEGCFGQVVRAEAYGINKDQPKAI.TVAIKIV 524

muFGFR-L 520 RIENNGGRVS*..... 530
      : . . |
neFGFR-4 525 KDKGTDKELSDLISEMELMKLMGKHKNIINLLGVCTQDGPLYMIVEYASK 574

```

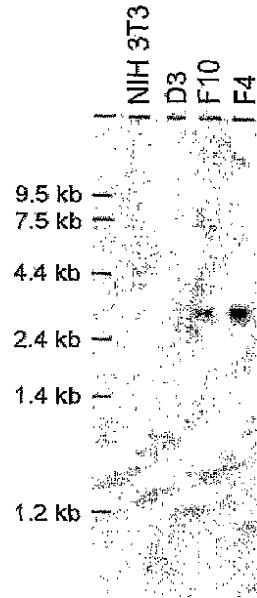

【図 5】

FIG. 5



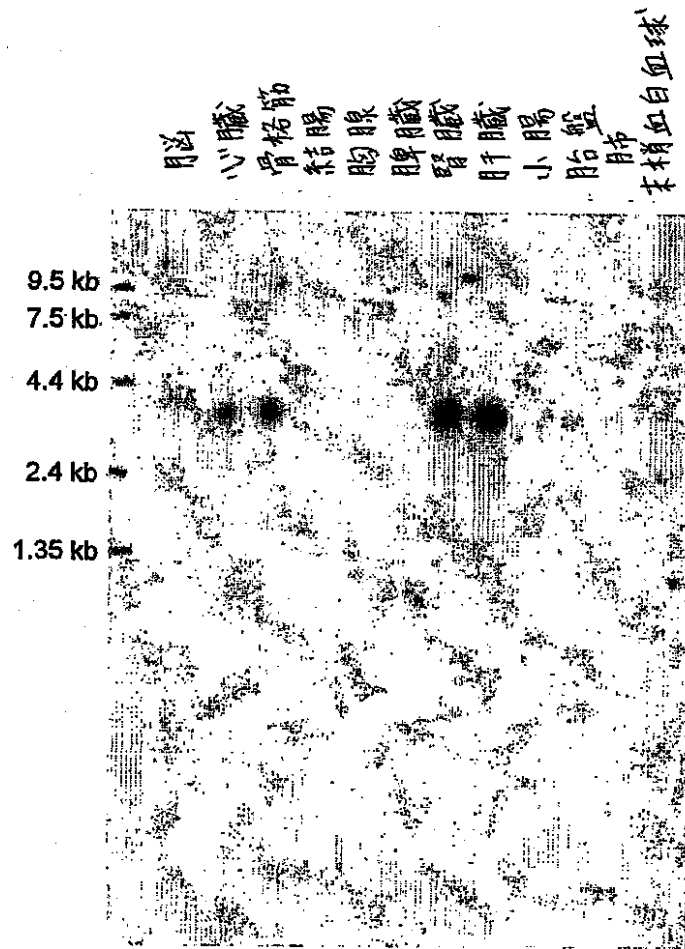
【図7】

FIG. 7



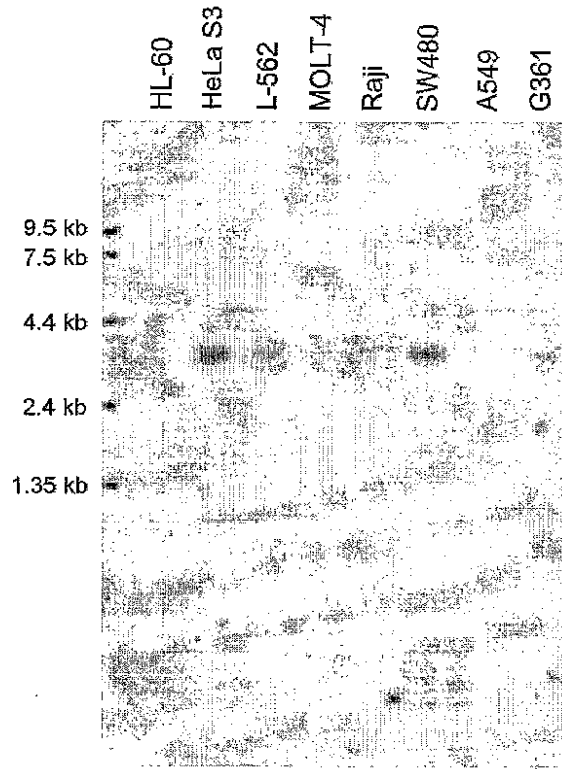
【图8】

FIG. 8



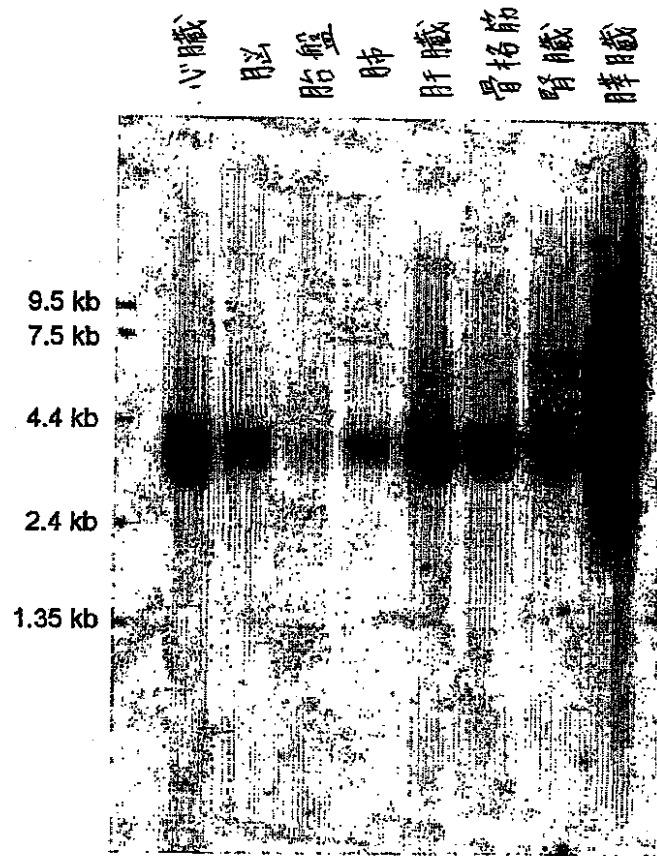
【図9】

FIG. 9



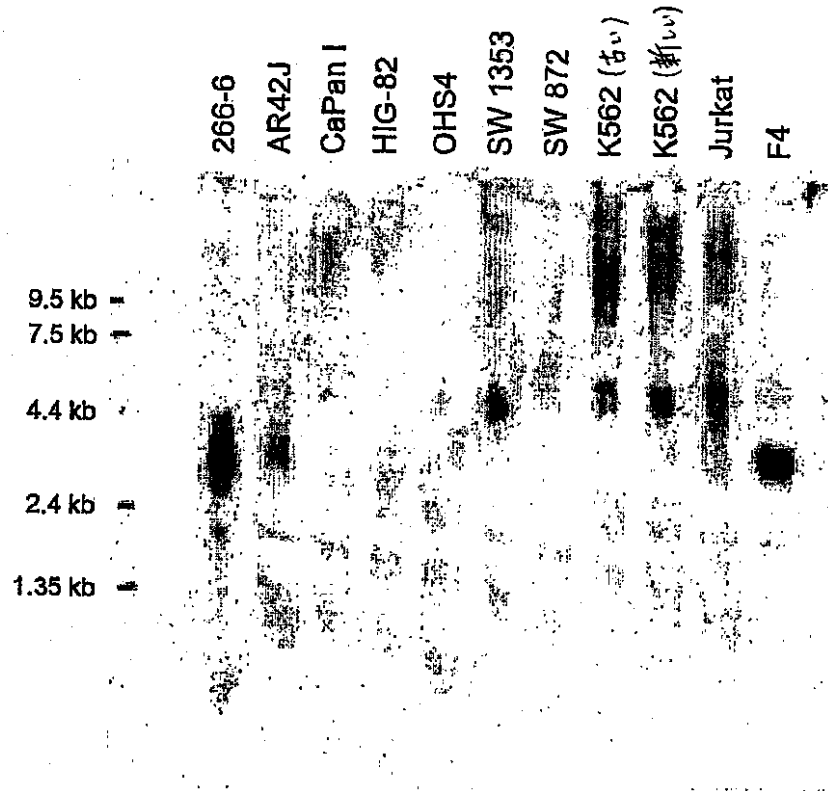
【図10】

FIG. 10



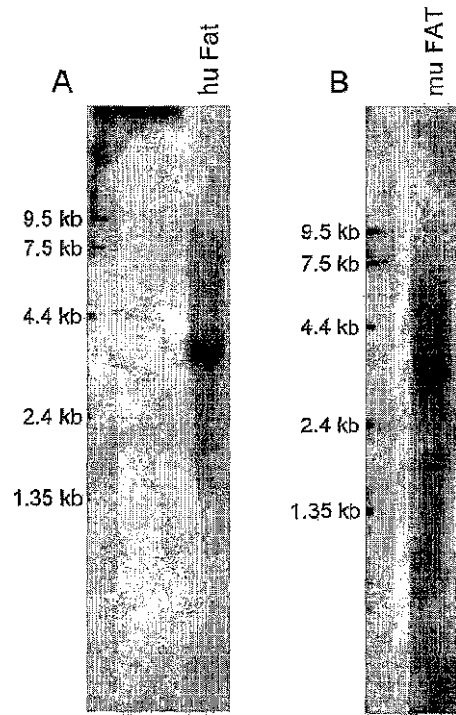
【図11】

FIG. 11



【図12】

FIG. 12



【圖13】

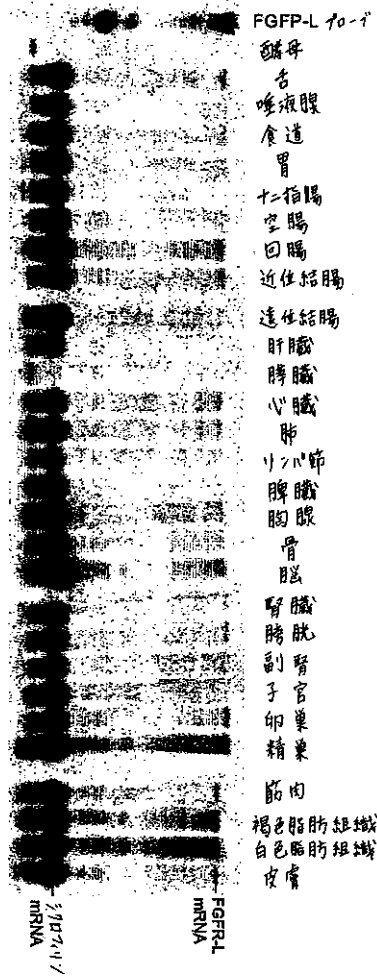
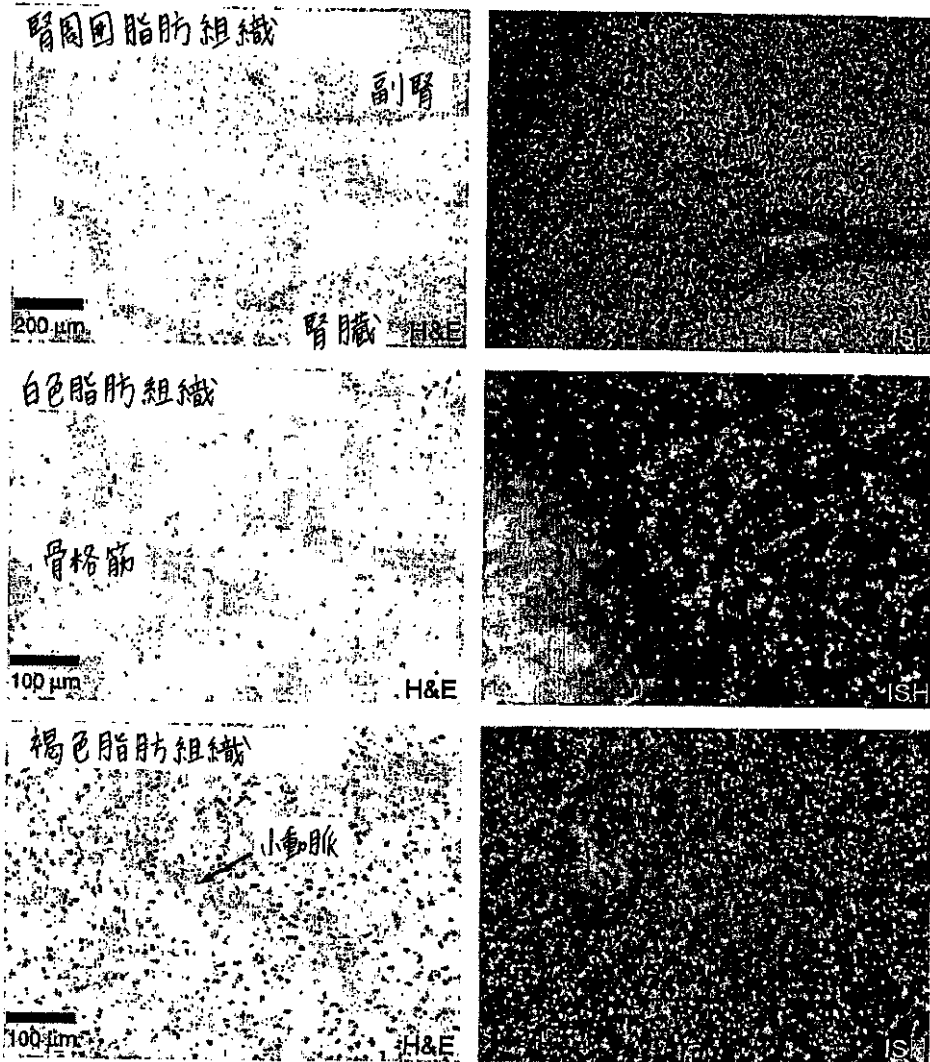


FIG. 13

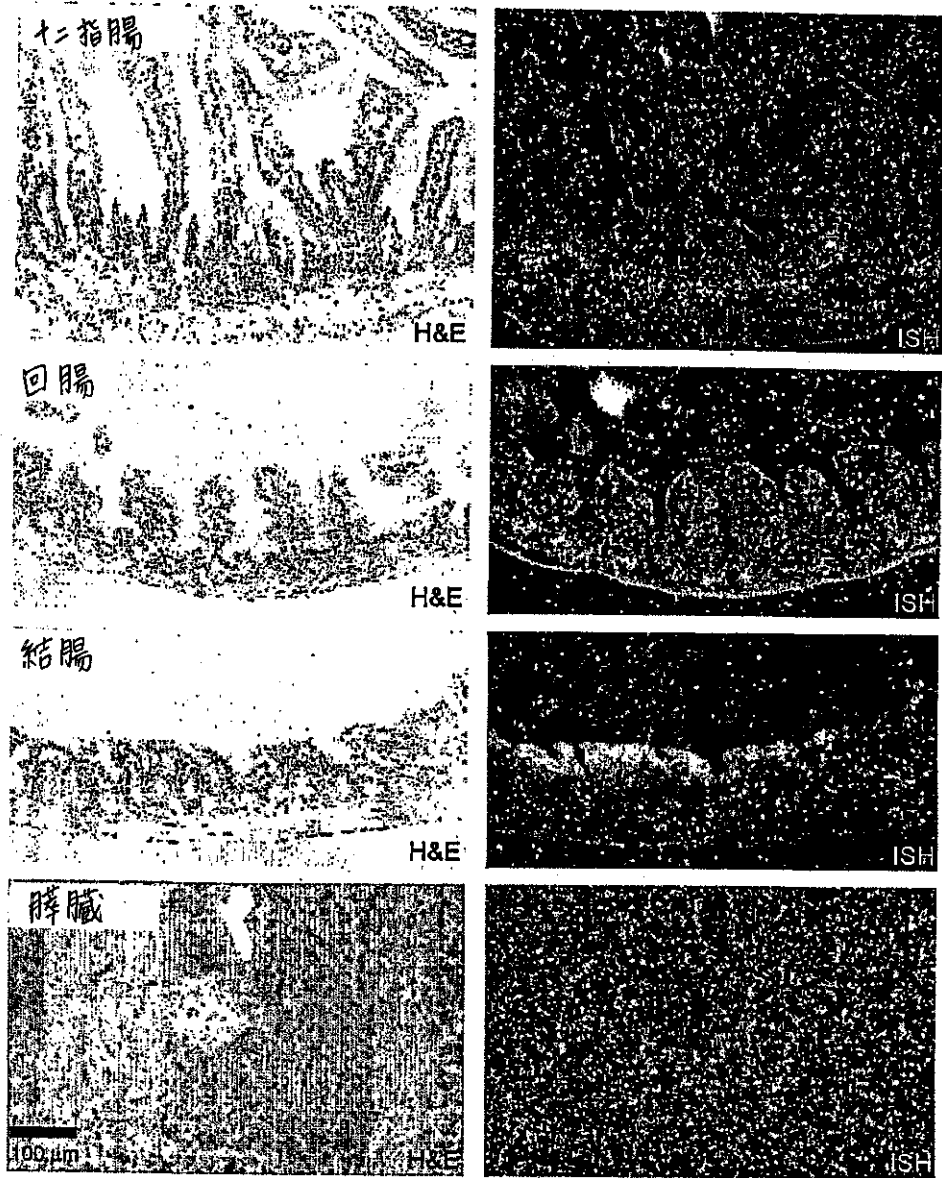
【圖14】

FIG. 14



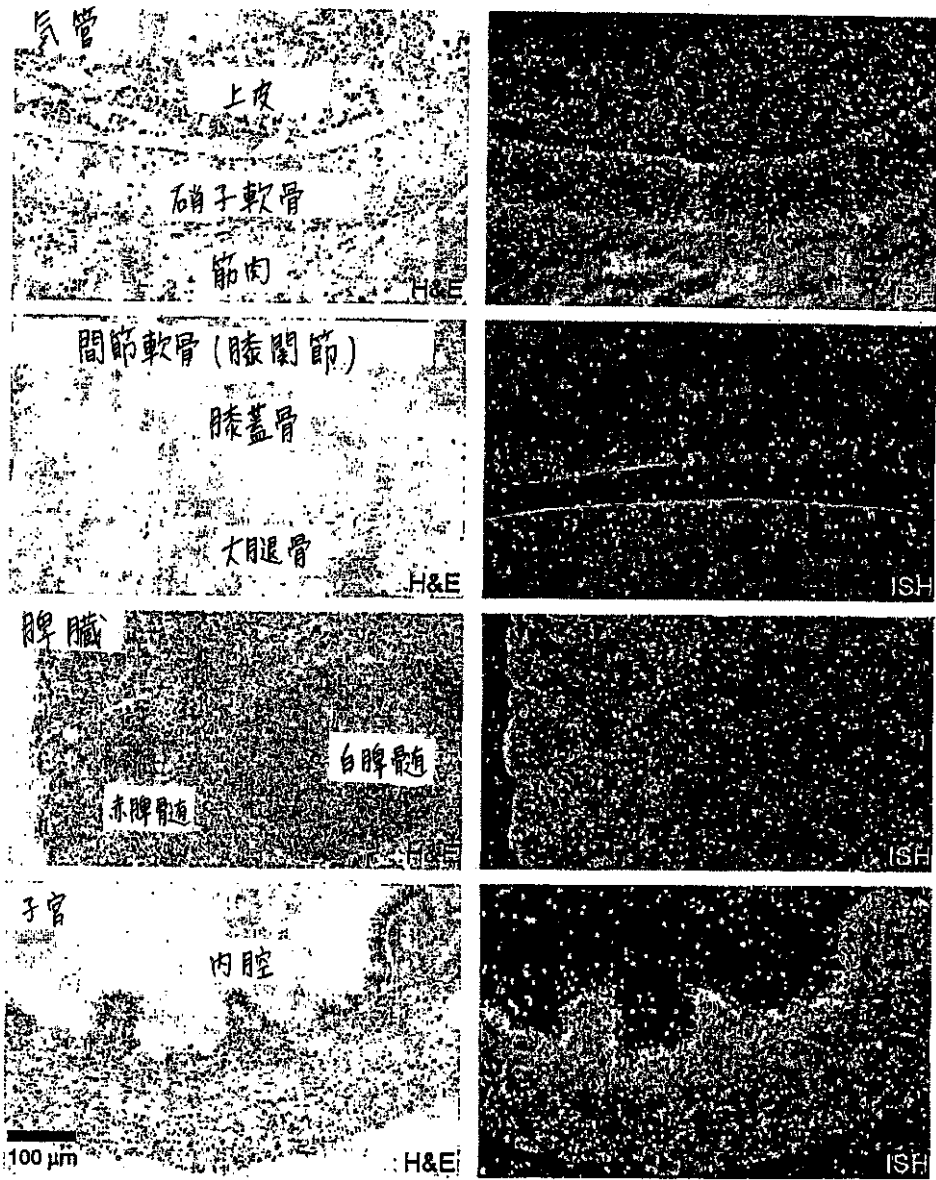
【図15】

FIG. 15



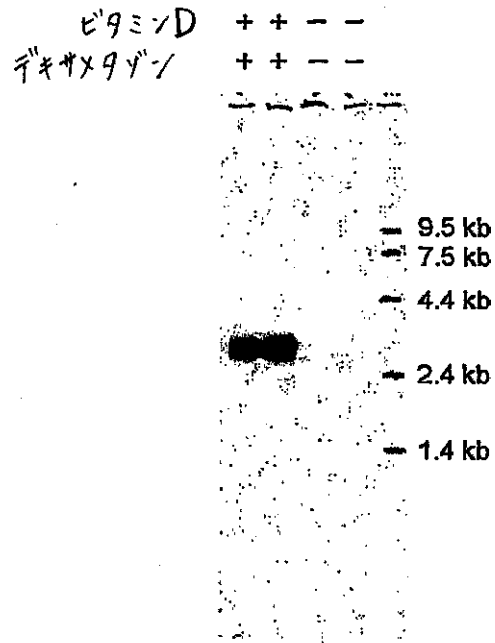
【圖16】

FIG. 16



【図17】

FIG. 17




【 18】

FIG. 18




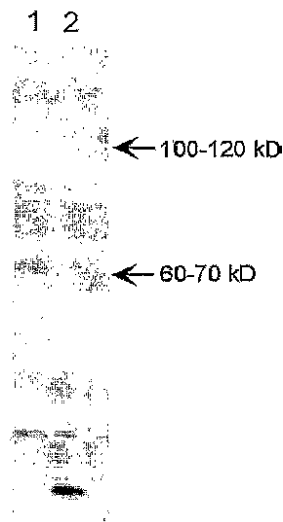
【 19】

FIG. 19



【図20】

FIG. 20A

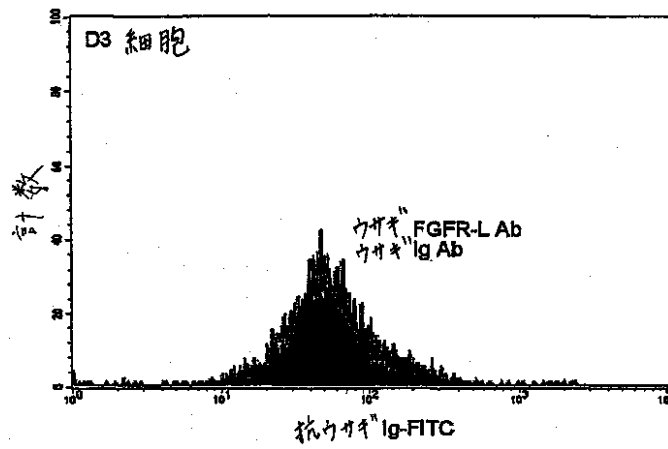
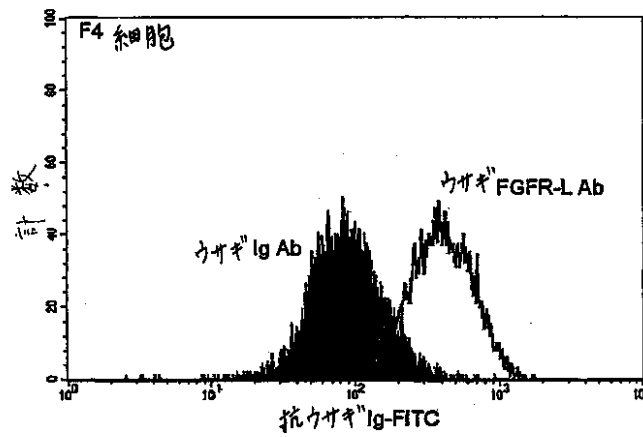
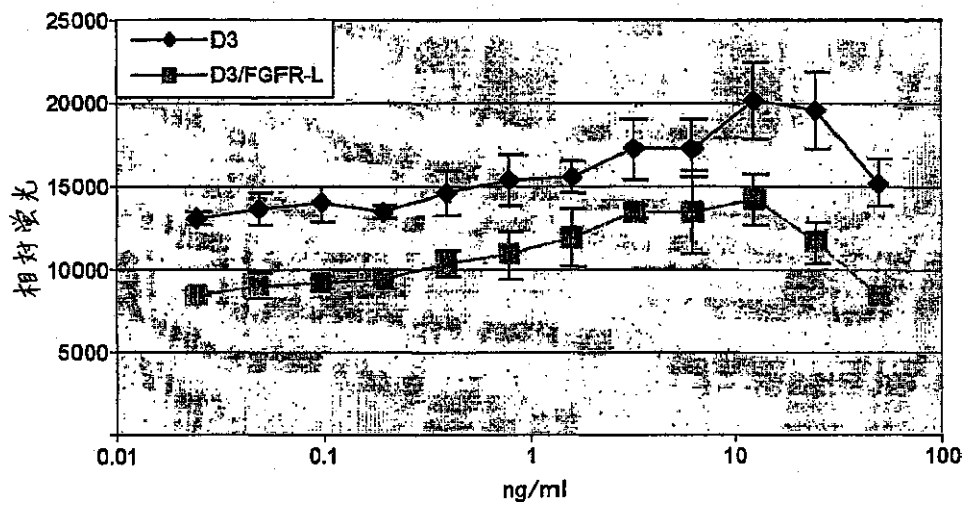


FIG. 20B



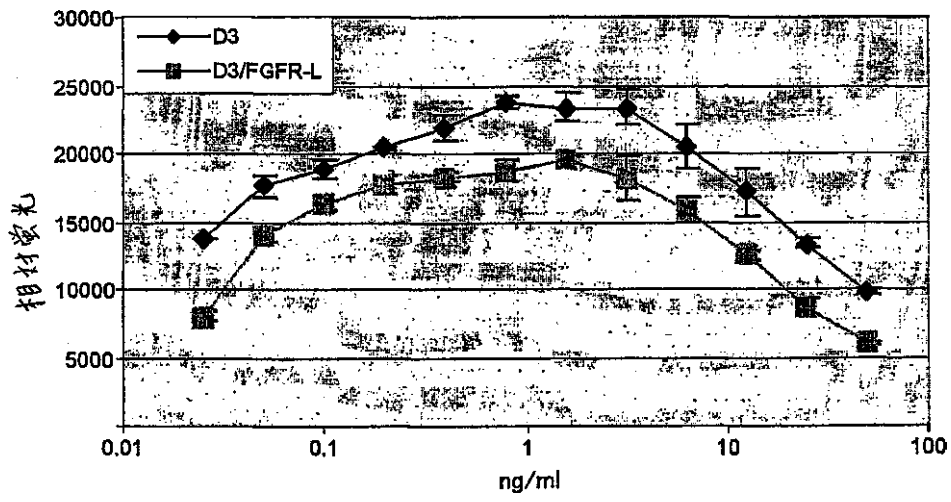
【図21A】

FIG. 21A



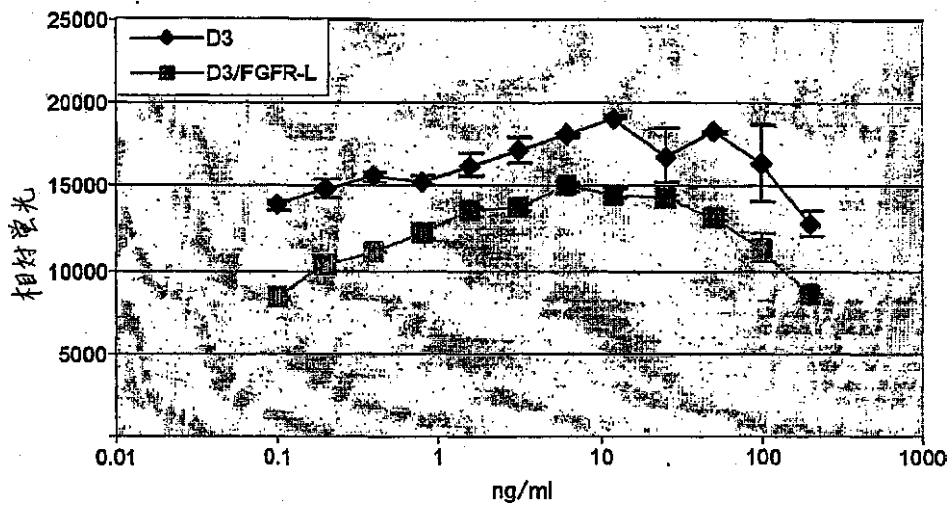
【图21B】

FIG. 21B



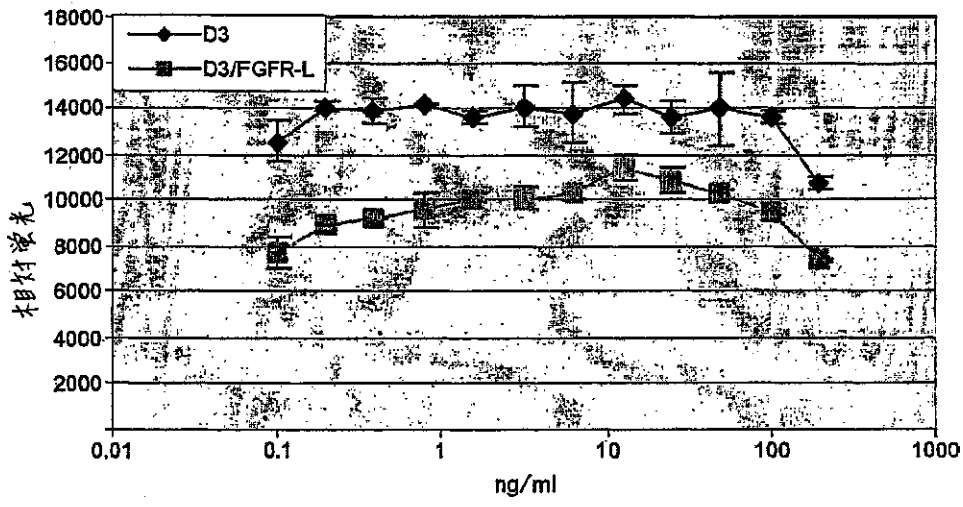
【图21C】

FIG. 21C



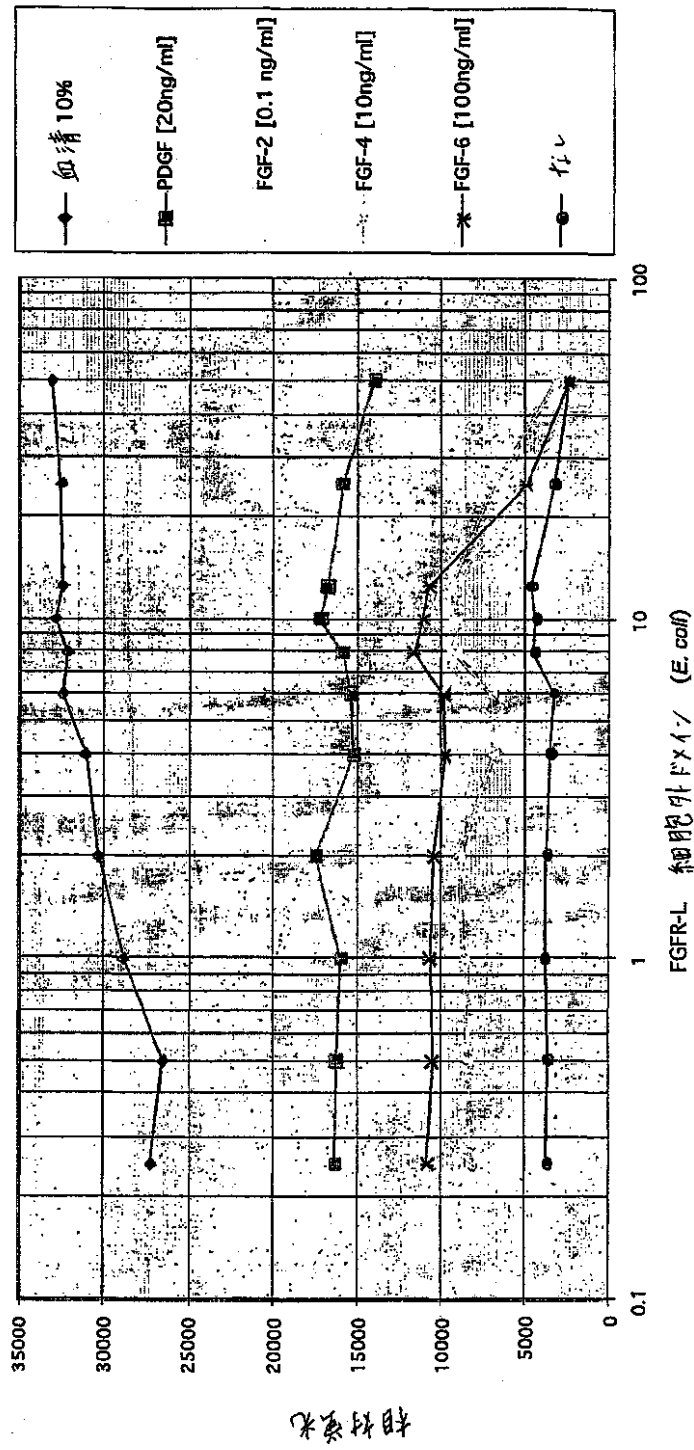
【图21D】

FIG. 21D



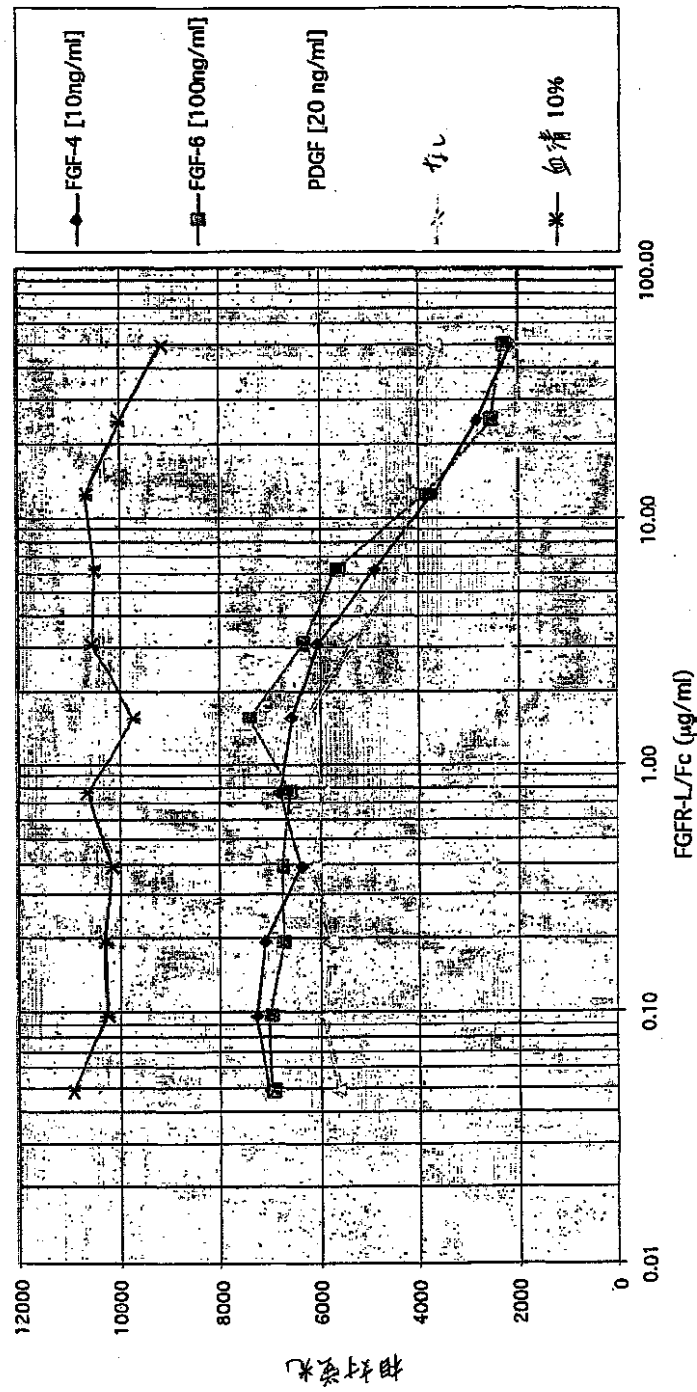
【図22】

FIG. 22



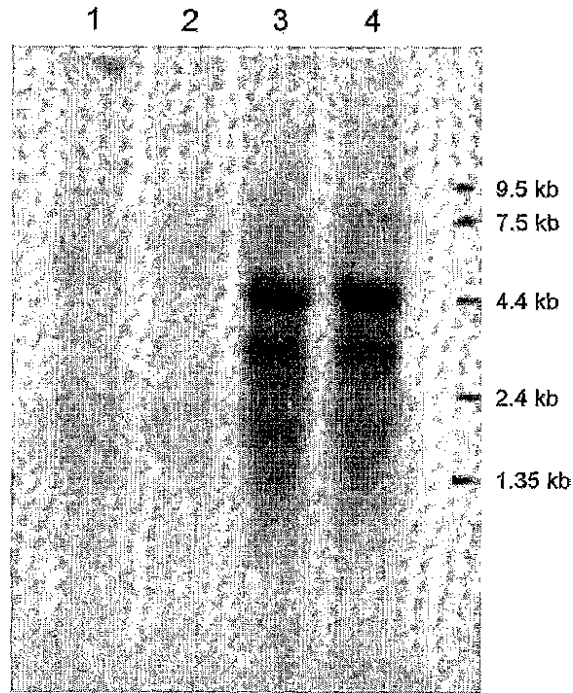
【図23】

FIG. 23



【図24】

FIG. 24



【国際調査報告】

INT. NATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/09073

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/12 C07K16/28 A61K49/00	C12N15/62 A01K67/027 G01N33/68
	C12N15/86 G01N33/68	C12N5/16 A61K38/17
		C07K14/71 A61K31/711
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7	C12N	C07K A01K G01N A61K
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)		
EPO-Internal, BIOSIS, EMBL, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 63088 A (BAKER KEVIN ;CHEN JIAN (US); GENENTECH INC (US); YUAN JEAN (US); G) 9 December 1999 (1999-12-09) cited in the application page 78-81; figures 69,70 ---	1-17, 20-29, 34,35, 37-47, 52,53
P,X	WO 00 24756 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ;RUBEN STEVEN M (US); YOUNG PAUL E (US)) 4 May 2000 (2000-05-04) cited in the application the whole document ---	1-17, 20-29, 34,35, 37-47, 52,53
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" 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. *B* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
20 November 2001		10. 12. 2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lejeune, R

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

INT. NATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/09073

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>WO 00 58463 A (KUMBLE KRISHANAND D ;ONRUST RENE (NZ); ABERNETHY NEVIN (NZ); SLEEM) 5 October 2000 (2000-10-05)</p> <p>example 3 SEQ ID NO 22 and 31</p>	1-17, 20-29, 34,35, 37-47, 52,53
P,X	<p>WIEDEMANN MARKUS ET AL: "Characterization of a novel protein (FGFRL1) from human cartilage related to FGF receptors." GENOMICS, vol. 69, no. 2, 15 October 2000 (2000-10-15), pages 275-279, XP002183418 ISSN: 0888-7543 cited in the application the whole document -& DATABASE EMBL [Online] Accession AJ277437, 20 October 2000 (2000-10-20) TRUEB B: "Homo sapiens mRNA for fibroblast growth factor receptor-like protein 1, (FGFRL1 GENE)" XP002183420 the whole document</p>	1-17, 20-29, 34,35, 37-47, 52,53
T	<p>WIEDEMANN MARKUS ET AL: "The mouse Fgfr1 gene coding for a novel FGF receptor-like protein." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1520, no. 3, 2001, pages 247-250, XP001041440 ISSN: 0006-3002</p>	
T	<p>SLEEMAN M ET AL: "Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, vol. 271, no. 2, 27 June 2001 (2001-06-27), pages 171-182, XP004245888 ISSN: 0378-1119</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/09073**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 33, 48, 49 and 54 are, at least partially and as far as in vivo methods are concerned, 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.: 18,19,30-33,36 (all partially)
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 1.2

Claims Nos.: 18,19,30-33,36 (all partially)

Claims 18,19,30-33 and 36 refer to a selective binding agent which binds to the polypeptide with SEQ ID NO 2 or 5, without giving a true technical characterization. Moreover, no such compounds are defined in the application. In consequence, the scope of said claims is ambiguous and vague, and their subject matter is not sufficiently disclosed and supported.

No search can be carried out for such speculative claims whose wording is, in fact a mere recitation of the results to be achieved.

A partial search has been carried out as far as the selective binding agent is an antibody to the polypeptide.

Some of the claims refer directly or indirectly to sequences present in ATCC deposit No. _____. These sequences could obviously not be searched.

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 01/09073

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9963088	A	09-12-1999	AU 4328699 A	20-12-1999
			WO 9963088 A2	09-12-1999
			AU 2212299 A	26-07-1999
			WO 9935170 A2	15-07-1999
WO 0024756	A	04-05-2000	AU 4688499 A	15-05-2000
			WO 0024756 A1	04-05-2000
			US 2001016335 A1	23-08-2001
WO 0058463	A	05-10-2000	US 6242419 B1	05-06-2001
			AU 2702100 A	16-10-2000
			WO 0058463 A1	05-10-2000

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 P	3/10	A 6 1 P	7/00	4 C 0 8 4
	3/14		7/06	4 H 0 4 5
	7/00		13/12	
	7/06		19/08	
	13/12		19/10	
	19/08	C 0 7 K	14/71	
	19/10		16/28	
C 0 7 K	14/71		16/42	
	16/28		19/00	
	16/42	C 1 2 N	1/15	
	19/00		1/19	
C 1 2 N	1/15		1/21	
	1/19		11/02	
	1/21	C 1 2 P	21/02	C
	5/10	C 1 2 Q	1/02	
	11/02	G 0 1 N	33/53	D
C 1 2 P	21/02		33/566	
C 1 2 Q	1/02	C 1 2 N	15/00	Z N A A
G 0 1 N	33/53		5/00	A
	33/566			B
		A 6 1 K	37/02	

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

(72)発明者 シャ, ミン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 91320,
 ニューバリー パーク, カレ プエナ
 ビスタ 3946

(72)発明者 ブーン, トーマス チャールズ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 91320,
 ニューバリー パーク, ディア バレ
 - アベニュー 3010

(72)発明者 コベイ, トッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 93021,
ムアパーク, オールダーブルック ス
トリート 12060

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 BA43 BA44
BA61 BA63 CA04 DA01 DA02
DA05 DA06 DA11 EA04 HA08
HA11
4B033 NA16 NB70 NC08 ND12 NG05
NH10
4B063 QA18 QQ79 QQ96 QR77
4B064 AG20 AG26 AG27 CA02 CA05
CA10 CA11 CA19 CA20 CA31
CA40 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y
AB01 AB02 BA02 BA08 CA24
CA25 CA44 CA46
4C084 AA01 BA01 BA22 BA23 NA14
ZA51 ZA67 ZA70 ZA81 ZA96
ZA97 ZC35 ZC54
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09
BA41 CA40 DA51 DA75 DA76
EA20 EA50 FA72 FA73 FA74

专利名称(译)	成纤维细胞生长因子受体样分子及其用途		
公开(公告)号	JP2003527858A	公开(公告)日	2003-09-24
申请号	JP2001569360	申请日	2001-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司		
申请(专利权)人(译)	安进公司		
[标]发明人	サリスクリスティアンエム ミューシャロンエックス シャミン ブーントーマスチャールズ コペイトッド		
发明人	サリス, クリスティアン エム. ミュー, シャロン エックス. シャ, ミン ブーン, トーマス チャールズ コペイ, トッド		
IPC分类号	A01K67/027 A61K35/12 A61K38/00 A61K49/00 A61P1/02 A61P3/04 A61P3/10 A61P3/14 A61P7/00 A61P7/06 A61P13/12 A61P19/08 A61P19/10 C07H21/04 C07K14/71 C07K16/28 C07K16/42 C07K19 /00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/06 C12N5/10 C12N11/02 C12N15/09 C12N15/12 C12P21 /02 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K35/12 A61K38/00 A61K49/0004 A61P1/02 A61P13/12 A61P17/02 A61P19/00 A61P19/08 A61P19/10 C07K14/71 C07K2319/00 C12N2799/021		
FI分类号	A01K67/027 A61P1/02 A61P3/04 A61P3/10 A61P3/14 A61P7/00 A61P7/06 A61P13/12 A61P19/08 A61P19/10 C07K14/71 C07K16/28 C07K16/42 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N11/02 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/53.D G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/BA43 4B024/BA44 4B024/BA61 4B024/BA63 4B024 /CA04 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/HA08 4B024/HA11 4B033/NA16 4B033/NB70 4B033/NC08 4B033/ND12 4B033/NG05 4B033/NH10 4B063 /QA18 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR77 4B064/AG20 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA10 4B064/CA11 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CA31 4B064/CA40 4B064 /CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065 /AB01 4B065/AB02 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/NA14 4C084/ZA51 4C084/ZA67 4C084 /ZA70 4C084/ZA81 4C084/ZA96 4C084/ZA97 4C084/ZC35 4C084/ZC54 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA51 4H045/DA75 4H045 /DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA73 4H045/FA74		
优先权	60/191379 2000-03-22 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了成纤维细胞生长因子受体样 (FGFR-L) 多肽, 以及编码该多肽的核酸分子。本发明还提供选择性结合剂, 载体, 宿主细胞和产生FGFR-L多肽的方法。本发明进一步提供了用于诊断, 治疗, 改善和/或预防与FGFR-L多肽有关的疾病, 病症和病状的药物组合物和方法。本发明还包括含有编码FGFR-L多肽的核酸分子的转基因非人动物。

母残基	仔示的置換	女子の置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4-ジフェニルアミン Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu