

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含む単離された核酸分子：

(a) 配列番号4に記載のアミノ酸約1～約209をコードするポリヌクレオチド；

(b) 配列番号4に記載のアミノ酸約2～約209をコードするポリヌクレオチド；

(c) 配列番号4に記載のアミノ酸約1～約177をコードするポリヌクレオチド；

(d) 配列番号4に記載のアミノ酸約40～約209をコードするポリヌクレオチド；

(e) 配列番号4に記載のアミノ酸約40～約177をコードするポリヌクレオチド；

(f) (a)、(b)、(c)、(d)または(e)に記載のポリヌクレオチド相補体；および

(g) (a)、(b)、(c)、(d)または(e)に記載のポリヌクレオチドに少なくとも90%同一のポリヌクレオチド。

【請求項2】 配列番号3のコード領域由来の20～600個連続したヌクレオチドを含む、単離された核酸分子。

【請求項3】 配列番号3のコード領域由来の60～400個連続したヌクレオチドを含む、請求項2に記載の単離された核酸分子。

【請求項4】 配列番号3のコード領域由来の200～300個連続したヌクレオチドを含む、請求項3に記載の単離された核酸分子。

【請求項5】 ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む単離された核酸分子であって、少なくとも1つの保存的なアミノ酸置換を除き、該ポリペプチドが以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、単離された核酸分子：

(a) 配列番号4に記載のアミノ酸約1～約209；

(b) 配列番号4に記載のアミノ酸約2～約209；

- (c) 配列番号4に記載のアミノ酸約1～約177；
- (d) 配列番号4に記載のアミノ酸約40～約209；および
- (e) 配列番号4に記載のアミノ酸約40～約177。

【請求項6】 DNAである、請求項1に記載の単離された核酸分子。

【請求項7】 請求項1に記載の核酸分子を、プロモーターに作動可能に連結して、ベクター中に挿入する工程を包含する、組換えベクターを作製する方法

。

【請求項8】 請求項7に記載の方法によって作製された、組換えベクター

。

【請求項9】 請求項8に記載の組換えベクターを宿主細胞中に導入する工程を包含する、組換え宿主細胞を作製する方法。

【請求項10】 請求項9に記載の方法によって作製された、組換え宿主細胞。

【請求項11】 ポリペプチドを産生するための組換え方法であって、該方法が、該ポリペプチドが発現される条件下で、請求項10に記載の組換え宿主細胞を培養する工程および該ポリペプチドを回収する工程を包含する、方法。

【請求項12】 以下からなる群から選択されるアミノ酸に少なくとも95%同一のアミノ酸を含む単離されたポリペプチド：

- (a) 配列番号4に記載のアミノ酸約1～約209；
- (b) 配列番号4に記載のアミノ酸約2～約209；
- (c) 配列番号4に記載のアミノ酸約1～約177；
- (d) 配列番号4に記載のアミノ酸約40～約209；および
- (e) 配列番号4に記載のアミノ酸約40～約177。

【請求項13】 少なくとも1つの保存的なアミノ酸置換を除き、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、単離されたポリペプチド：

- (a) 配列番号4に記載のアミノ酸約1～約209；
- (b) 配列番号4に記載のアミノ酸約2～約209；
- (c) 配列番号4に記載のアミノ酸約1～約177；
- (d) 配列番号4に記載のアミノ酸約40～約209；および

(e) 配列番号4に記載のアミノ酸約40～約177。

【請求項14】 以下からなる群から選択されるアミノ酸を含む単離されたポリペプチド：

(a) 配列番号4に記載のアミノ酸約1～約209；

(b) 配列番号4に記載のアミノ酸約2～約209；

(c) 配列番号4に記載のアミノ酸約1～約177；

(d) 配列番号4に記載のアミノ酸約40～約209；および

(e) 配列番号4に記載のアミノ酸約40～約177。

【請求項15】 配列番号4に記載のポリペプチドのエピトープ保有部分。

【請求項16】 配列番号4に記載の10～50個連続したアミノ酸を含む、請求項15に記載のエピトープ保有部分。

【請求項17】 アミノ酸RQR YLYTDDAQQT EAH (配列番号7) を含む、請求項15に記載のエピトープ保有部分。

【請求項18】 アミノ酸HLPGNKSPHRDPAPR (配列番号8) を含む、請求項15に記載のエピトープ保有部分。

【請求項19】 請求項12に記載のポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体。

【請求項20】 請求項13に記載のポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体。

【請求項21】 請求項14に記載のポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体。

【請求項22】 薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせた、請求項12に記載のポリペプチドを含む薬学的組成物。

【請求項23】 栄養補助を必要とする患者中の細胞に栄養補助を提供するための方法であって、該方法が、配列番号4に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組成物を該患者に投与する工程を含む、方法。

【請求項24】 請求項23に記載の方法であって、前記ポリヌクレオチドが、前記ポリヌクレオチドを発現する細胞を前記患者に移植することによって投与され、前記細胞が該患者中でFGF-21ポリペプチドを発現する、方法。

【請求項25】 前記移植された細胞が半透膜中にカプセル化される、請求項23に記載の方法。

【請求項26】 前記患者が、不適當な数の肝細胞によって特徴付けられる状態に罹患する、請求項23に記載の方法。

【請求項27】 前記状態が肝硬変である、請求項23に記載の方法。

【請求項28】 前記患者が、不適當な機能または数の精巢細胞によって特徴付けられる状態に罹患する、請求項23に記載の方法。

【請求項29】 前記状態が、不妊症、不能、および精巢癌からなる群から選択される少なくとも1つの状態である、請求項28に記載の方法。

【請求項30】 前記患者が胸腺の不適當な機能によって特徴付けられる状態に罹患する、請求項23に記載の方法。

【請求項31】 請求項30に記載の方法であって、前記状態が、白血病、リンパ腫、自己免疫疾患、胸腺の増殖性障害、および胸腺の分化障害からなる群から選択される少なくとも1つの状態である、方法。

【請求項32】 栄養補助を必要とする患者中の細胞に栄養補助を提供するための方法であって、該方法が、配列番号4に記載のポリペプチドを含む組成物を該患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項33】 前記患者が、不適當な数の肝細胞によって特徴付けられる状態に罹患する、請求項28に記載の方法。

【請求項34】 前記状態が肝硬変である、請求項29に記載の方法。

【請求項35】 ヒト患者の肝臓における疾患状態を軽減する方法であって、該疾患状態は、該ヒト患者中の機能的な肝細胞の変性を遅らせること、機能的な肝細胞の機能を回復すること、および機能的な肝細胞の数を増加させることからなる群から選択される少なくとも1つの方法によって軽減され、該方法が、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む薬学的に有効な組成物を該患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項36】 ヒト患者の胸腺における疾患状態を軽減する方法であって、該疾患状態は、該ヒト患者中の機能的な胸腺細胞の変性を防止すること、機能的な胸腺細胞の変性を遅らせること、および機能的な肝細胞の数を増加させるこ

とからなる群から選択される少なくとも1つの方法によって軽減され、該方法が、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む薬学的に有効な組成物を該患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項37】 ヒト患者の精巣における疾患状態を軽減する方法であって、該疾患状態は、該ヒト患者中の機能的な胸腺細胞の変性を防止すること、機能的な胸腺細胞の変性を遅らせること、および機能的な精巣細胞の数を増加させることからなる群から選択される少なくとも1つの方法によって軽減され、該方法が、配列番号4に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む薬学的に有効な組成物を該患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項38】 患者由来のサンプル中のFGF-21をコードするmRNAの存在を検出するためのキットであって、該キットは、容器にパッケージ化された、請求項3に記載のポリヌクレオチドの少なくとも20個連続したヌクレオチドを有するポリヌクレオチドを含む、キット。

【請求項39】 前記ポリヌクレオチドが、配列番号4に記載の少なくとも6個連続したアミノ酸をコードする、請求項38に記載のキット。

【請求項40】 患者由来のサンプル中のFGF-21ポリペプチドの存在を検出するためのキットであって、該キットが、容器にパッケージ化された、請求項19に記載の抗体を包含する、キット。

【請求項41】 以下からなる群から選択されるポリヌクレオチドを含む単離された核酸分子：

- (a) 配列番号2に記載のアミノ酸約1～約210をコードするポリヌクレオチド；
- (b) 配列番号2に記載のアミノ酸約2～約210をコードするポリヌクレオチド；
- (c) 配列番号2に記載のアミノ酸約1～約177をコードするポリヌクレオチド；
- (d) 配列番号2に記載のアミノ酸約40～約210をコードするポリヌクレオチド；
- (e) 配列番号2に記載のアミノ酸約40～約177をコードするポリヌクレオチド；

チド；

(f)(a)、(b)、(c)、(d)または(e)に記載のポリヌクレオチド相補体；および

(g)(a)、(b)、(c)、(d)または(e)に記載のポリヌクレオチドに少なくとも90%同一のポリヌクレオチド。

【請求項42】 配列番号1のコード領域由来の20～600連続したヌクレオチドを含む、単離された核酸分子。

【請求項43】 配列番号1のコード領域由来の60～400連続したヌクレオチドを含む、請求項42に記載の単離された核酸分子。

【請求項44】 配列番号1のコード領域由来の200～300連続したヌクレオチドを含む、請求項43に記載の単離された核酸分子。

【請求項45】 少なくとも1つの保存的なアミノ酸置換を除き、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、単離された核酸分子：

(a) 配列番号2に記載のアミノ酸約1～約210

(b) 配列番号2に記載のアミノ酸約2～約210

(c) 配列番号2に記載のアミノ酸約1～約177

(d) 配列番号2に記載のアミノ酸約40～約210；および

(e) 配列番号2に記載のアミノ酸約40～約177。

【請求項46】 DNAである、請求項41に記載の単離された核酸分子。

【請求項47】 請求項41に記載の核酸分子をプロモーターに作動可能に連結して、ベクター中に挿入する工程を包含する、組換えベクターを作製する方法。

【請求項48】 請求項47に記載の方法によって作製された、組換えベクター。

【請求項49】 請求項48に記載の組換えベクターを宿主細胞中に導入する工程を包含する、組換え宿主細胞を作製する方法。

【請求項50】 請求項49に記載の方法によって作製された、組換え宿主細胞。

【請求項51】 ポリペプチドを産生するための組換え方法であって、該方法が、該ポリペプチドが発現される条件下で請求項50に記載の組換え宿主細胞を培養する工程および該ポリペプチドを回収する工程を包含する、方法。

【請求項52】 以下からなる群から選択されるアミノ酸に少なくとも95%同一のアミノ酸を含む単離されたポリペプチド：

- (a) 配列番号2に記載のアミノ酸約1～約210；
- (b) 配列番号2に記載のアミノ酸約2～約210；
- (c) 配列番号2に記載のアミノ酸約1～約177；
- (d) 配列番号2に記載のアミノ酸約40～約210；および
- (e) 配列番号2に記載のアミノ酸約40～約177。

【請求項53】 少なくとも1つの保存的なアミノ酸置換を除き、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する、単離されたポリペプチド：

- (a) 配列番号2に記載のアミノ酸約1～約210；
- (b) 配列番号2に記載のアミノ酸約2～約210；
- (c) 配列番号2に記載のアミノ酸約1～約177；
- (d) 配列番号2に記載のアミノ酸約40～約210；および
- (e) 配列番号2に記載のアミノ酸約40～約177。

【請求項54】 以下からなる群から選択されるアミノ酸を含む単離されたポリペプチド：

- (a) 配列番号2に記載のアミノ酸約1～約210；
- (b) 配列番号2に記載のアミノ酸約2～約210；
- (c) 配列番号2に記載のアミノ酸約1～約177；
- (d) 配列番号2に記載のアミノ酸約40～約210；および
- (e) 配列番号2に記載のアミノ酸約40～約177。

【請求項55】 配列番号2に記載のポリペプチドのエピトープ保有部分。

【請求項56】 配列番号2に記載の10～50個連続したアミノ酸を含む、請求項55に記載のエピトープ保有部分。

【請求項57】 請求項52に記載のポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体。

【請求項58】 請求項53に記載のポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体。

【請求項59】 請求項54に記載のポリペプチドに特異的に結合する、単離された抗体。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(技術分野)

本発明は、線維芽細胞増殖因子(FGF)ファミリーのメンバーをコードする核酸配列、およびこの核酸配列によってコードされるポリペプチドに関する。

【0002】

(発明の背景)

原型の線維芽細胞増殖因子(FGF)、FGF-1およびFGF-2を線維芽細胞についての分裂促進因子として脳および下垂体から本来単離した。しかし、FGF-1およびFGF-2は、発育組織および成体組織において広範に発現され、そして、新脈管形成、有糸分裂誘発、細胞分化および組織損傷の修復を含む複数の生物学的活性を有するポリペプチドである(Baird, A.ら、Cancer Cells 3:239-243(1991); Burgess, W. H.ら、Annu. Rev. Biochem. 58:575-606(1989))。公開された文献によると、FGFファミリーは、現在少なくとも19のメンバー(FGF-1~FGF-19)からなる。FGF-3は、マウス乳房腫瘍ウイルスによる活性化の共通の標的であることが同定された(Dicksonら、Ann. N. Y. Acad. Sci. 638:18-26(1991)); FGF-4~FGF-6は、オンコジーン産物として同定された(Yoshidaら、Ann. NY Acad. Sci. 638:27-37(1991); Goldfarbら、Ann. NY Acad. Sci. 638:38-52(1991); Coulierら、Ann. NY Acad. Sci. 638:53-61(1991))。FGF-10は、相同性ベースのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によってラット肺から同定された(Yamasakiら、J. Biol. Chem. 271:15918-15921(1996))。FGF-11~FGF-14(FGF相同性因子(FHF)1~4)をランダムcDNA配列決定、データベース検索および相同性ベースのPCRの組み合わせによって、ヒト網膜から同定した(Smalwoodら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9850-9857(1996))。FGF-15は、キメ

ラホメオドメイン腫瘍性タンパク質の下流標的として同定された (McWhirterら、Development 124:3221-3232 (1997))。FGF-16、FGF-17、およびFGF-18は、それぞれ、相同性ベースのPCRによって、ラット心臓および胚から同定された (Miyakeら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 243:148-152 (1998); Hoshikawaら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 244:187-191 (1998); Ohbayashiら、J. Biol. Chem. 273:18161-18164 (1998))。最近、FGF-19が、データベース検索によってヒト胎児脳から同定された (Nishimuraら、Biochim. Biophys. Acta 1444:148-151 (1999))。これらは、約30~60%のアミノ酸同一性を有する保存された約120アミノ酸残基コアを有する。これらのFGFはまた、発育組織および成体組織の両方において重要な役割を果たしているようである。従って、当該分野で既知のFGFと異なる機能および活性を有するさらなるFGF分子、そしてヒト疾患に關与する組織において特異的に発現されるFGF分子についての必要性が存在する。

【0003】

(発明の要旨)

本発明は、以下からなる群から選択される単離されたポリヌクレオチドを含む組成物を提供する：

(a) 配列番号1または3に記載の少なくとも8個連続したヌクレオチドを含むポリヌクレオチド；

(b) (a)に記載のポリヌクレオチドに少なくとも80%の相同性を有するポリヌクレオチド；

(c) 配列番号1または3に記載の配列を有するポリヌクレオチドによって発現されるタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【0004】

本発明は、診断プローブまたはプライマーとして、単離されたポリヌクレオチドまたはそのフラグメントの使用をさらに提供する。

【0005】

本発明はまた、ポリペプチドを含む組成物を提供し、ここで、前記ポリペプチドは、以下からなる群から選択される：

(a) 配列番号1または3によってコードされる少なくとも6個連続したアミノ酸を含むポリペプチド；

(b) 配列番号1または3を含むポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチド；および

(c) 配列番号2または4に記載のポリペプチド改変体。

【0006】

本発明の特定の好ましい実施形態において、ポリヌクレオチドは、発現制御配列に作動可能に連結されている。本発明は、ポリヌクレオチド配列で形質転換された、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞および哺乳動物細胞を含む宿主細胞をさらに提供する。本発明はまた、配列番号1または3に対応する全長cDNAおよび全長ポリヌクレオチドを提供する。

【0007】

本発明のタンパク質およびポリペプチド組成物は、薬学的に受容可能なキャリアをさらに含み得る。このようなタンパク質またはポリペプチドと特異的に反応する抗体を含む組成物もまた、本発明によって提供される。

【0008】

本発明はまた、前駆細胞または子孫において発現されるまれな分子の単離のためのcDNAライブラリーの作成のために使用される細胞の大量の（さもなければ少量の）細胞集団の生成を提供する；処置によって産生された細胞は、増殖因子または他の分子を直接発現し得、そして培養上清を新規の活性についてのアッセイでスクリーニングした。

【0009】

本発明は、哺乳動物幹細胞の単離、自己再生および生存、ならびにそれらの子孫の分化をさらに提供する。

【0010】

本発明はまた、肝硬変、肝炎、および手術後および手術中の組織変性を含むが

これらに限定されない疾患状態における、肝細胞の変性を防止もしくは遅らせるかまたは肝細胞の数を増加する組成物および方法；不妊症および不能のような疾患状態における精巣中の細胞の変性を防止もしくは遅らせるかまたは細胞の数を増加する組成物および方法、ならびに胸腺および免疫系の疾患における胸腺の細胞変性を防止もしくは遅らせるかまたは細胞の数を増加する組成物および方法を提供する。

【0011】

本発明はまた、肝臓および精巣癌、または白血病、リンパ腫あるいは他の癌のような疾患状態、ならびに胸腺由来の細胞の増殖障害または分化障害において有用であるFGF-21機能のインヒビターを同定するための組成物および方法を提供する。

【0012】

(発明の詳細な説明)

広範な種々の細胞型および組織型の増殖(growth)、増殖(proliferation)、生存および分化を促進するためのそれらの強力な活性のために、FGFは、筋骨格状態のような創傷治癒(例えば、骨折、靭帯および組織修復、腱炎、滑液包炎など)；皮膚状態(例えば、火傷、切断、裂傷、とこずれ、緩慢潰瘍治癒など)；組織保護、修復、および心筋梗塞および虚血の間の新脈管形成の誘導、神経学的状態(例えば、神経変性疾患および発作)の処置、黄斑変性症を含む眼疾患の処置、を含む多数の異なった徴候についての治療剤として追求され続ける。

【0013】

現在までに同定された線維芽細胞増殖因子(FGF)タンパク質は、種々の細胞型の増殖および分化を制御するシグナル分子のファミリーに属する。ヒト生理学および病理学に対するFGFタンパク質の重要性は、胚形成、血管発達および増殖および骨増殖におけるそれらの重要な役割に部分的に関する。インビトロ実験において、内皮細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞、ならびに心筋細胞骨格筋細胞の細胞増殖および分裂を調節する際のFGFの役割を実証してきた。FGFファミリーの他のメンバーおよびそれらの生物学的役割は、Crossleyら

、Development 121:439-451(1995); Ohuchi ら、Development 124:2235-2244(1997); Germel ら、Genomics 35:253-257(1996); および Ghosh ら、Cell Growth and Differentiation 7:1425-1434(1996)において記載されている。

【0014】

癌細胞増殖における役割のために、FGFタンパク質はまた、ヒト健康および疾患に対して重要である。例えば、FGF-8は、乳癌細胞および前立腺癌細胞におけるアンドロゲン誘導増殖因子として同定された(Tanaka ら、FEBS Lett. 363:226-230(1995)およびP.N.A.S. 89:89288-8932(1992))。

【0015】

通常の発達におけるFGFの役割は、FGFレセプターの研究を介して部分的に解明されている。Willke, T. ら、Dev. Dynam. 210:41-52(1997)は、FGFR1、FGFR2、およびFGFR3転写物が、ニワトリにおける胚発生の間、頭の特定の領域に局在化することを検出した。この発現パターンは、クルゾン症候群(異常な膜内骨形成の状態)におけるヒトFGFR変異によって影響される領域と関連していた。Belluardo, N. ら、Jour. Comp. Neur. 379:226-246(1997)は、ラット脳におけるFGFR1、2、および3 mRNAの局在化を研究し、そして、いくつかの能領域における細胞特異性を見出した。さらに、FGFR1およびFGFR2 mRNAは、脳損傷後の大グリア反応細胞において発現され、脳疾患および損傷における特定のFGFの役割を支持する。Ozawa, K. ら、Mol. Brain Res. 41:279-288(1996)は、FGF1およびFGF-5発現が出生後に増加したが、FGF-3、FGF-6、FGF-7およびFGF-8遺伝子は、出生後段階よりも胎児段階後半におけるより高い発現を示した。

【0016】

FGFファミリーの新しいメンバーが本明細書中に記載され、ここで、FGF

タンパク質は、種々の組織において発現されるが、肝臓において最も大量に発現される。本発明のマウスFGFをコードするポリヌクレオチドは、配列番号1に示される配列を有する。本発明のヒトFGFをコードするポリヌクレオチドは、配列番号3に示される配列を有する。マウスポリヌクレオチドをアミノ酸配列全体の保存された領域によって、および既知のFGFタンパク質をコードするポリヌクレオチドおよび遺伝子によって共有される相同性の領域によって、FGFファミリーメンバーをコードするとして同定した。

【0017】

本発明者らは、FGF-21が、FGFファミリーの以前に同定されていないメンバーであると考えている。現在まで、19を超えるヒトFGFタンパク質が同定されてきた。多数の場合において、他の哺乳動物（特に、マウスおよびラット）における相同性タンパク質がまた、同定されてきた。ヒトタンパク質は、アミノ酸配列、レセプター特異性、組織発現パターン、および生物学的活性の点において、異なった程度に変化する。

【0018】

本発明のFGF-21は、刊行物において現在までに記載されたすべてのFGFタンパク質と配列において異なる。本明細書中に記載されるように、種々のFGFタンパク質によって果たされる役割についての知識は、増加し続けているが、はるかに不十分である。

【0019】

本発明は、配列番号1のFGFが肝臓において高度に発現され、そしてヒトFGF-21が、肝疾患の発症および肝疾患からの回復における役割を果たし得ることを開示することによって、この知識を加える。さらに、FGF-21はまた、精巣および胸腺において発現され、従って、精巣機能または胸腺由来の細胞の機能の障害の発生および障害からの回復における役割を果たし得る。従って、本発明は、新しい線維芽細胞増殖因子（FGF-21）の同定、単離および配列決定に基づいている。

【0020】

（FGF-21をコードするマウスcDNAの単離および分析）本発明により

、新規マウスFGFをコードするDNAが同定された。全てのコード領域のヌクレオチド配列が、マウス胚cDNAをテンプレートとして使用するアダプター-ライゲーション媒介ポリメラーゼ連鎖反応により決定された。コード領域のヌクレオチド配列は、マウスFGF(210個のアミノ酸)(図4)の完全なアミノ酸配列の解明を可能にした。このタンパク質は、仮にFGF-21と命名された。

【0021】

(FGF-21をコードするヒトcDNAの単離および分析) FGF-21をコードするヒト遺伝子は、推定のヒト-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子の5'側隣接領域に位置される。ヒトFGF-21の完全なコード領域をコードするcDNAは、以下のようなFGF特異的プライマーを使用するPCRによって胎児脳cDNAから増幅された: センスプライマー: 5' agccattgatggactcggac3' (配列番号5); アンチセンスプライマー: 5' tggcttcaggaaagcgtagct3' (配列番号6)。

【0022】

(成体マウス組織におけるFGF-21mRNAの発現) FGF-21mRNAの発現はポリメラーゼ連鎖反応により脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、肺、胸腺、精巣、筋、皮膚、および小腸を含む成体マウスの主要な組織で調べられた。FGF-21mRNAの発現は、肝臓において高レベルで検出された(図3)。発現は、精巣および胸腺でも見られた。マウス組織におけるFGF-21mRNAの発現を確認するために、マウス組織(A)⁺RNAは、³²P-標識化ラットFGF-21cDNAプローブを使用してノーザンブロット分析により調べられた。結果は、マウス肝臓で高いレベルの発現を確認した。発現はまた、胸腺でも見られた; より大きな転写物が精巣組織で見られた。

【0023】

本明細書中のFGF-21に対する参照は、本明細書中で特徴付けられ、そして記載されたFGF-21と実質的に相同であり、そして生物学的に等価である成長因子の任意の起源を誘導することが解釈されることが意図される。このような実質的に相同な成長因子は、任意の組織または種に対してネイティブであり得

、そして同様に生物学的活性が、任意の多数の生物学的アッセイ系において特徴付けられ得る。

【0024】

用語「生物学的に等価」は、本発明の組成物が、るように単離されるFGF-21または組換えにより生成される本発明のヒトFGF-21とかならずしも同じ程度までではなく、類似の様式で同じ増殖特性のいくつかまたは全てを示し得ることを意味することが意図される。

【0025】

「実質的に相同」により、任意の種由来のFGF-21に対するヒトFGF-21の相同性が、FGF-21とFGFファミリーのメンバー間の以前に報告された相同性よりも大きいことが意味される。

【0026】

配列の同一性または同一性パーセントは、非ヒトFGF-21との同一性パーセントを決定する場合にはヒトFGFを参照して、非FGF-21成長因子との同一性パーセントを決定する場合にはFGF-21を参照して、2つの配列をアラインメントする場合はLasergeneバイオコンピュータソフトウェア(DNA STAR, INC, Madison, WI)における複数配列アラインメントのClustal方法(Higginsら, Cabios 8:189-191, 1992)を用いた、2つの配列間の同じ残基の百分率を意味することが意図される。この方法において、複数アラインメントは、進行的な様式で実施され、この様式では、ますます大きなアラインメント群が、一連の対様式のアラインメントから算出した類似性スコアを用いてアセンブリされる。最適な配列アラインメントは、最大アラインメントスコアを見出すことにより得られる。最大アラインメントスコアは、所定の進化的間隔にわたって2つの関連するタンパク質において生じる所定のアミノ酸の変化の確率を示す、残基の重み付け表から決定された、アラインメントにおける別個の残基間の全てのスコアの平均である。アラインメントにおいてギャップを空けることおよびギャップを伸ばすことについてのペナルティーは、スコアに寄与する。このプログラムで用いられるデフォルトパラメーターは、以下の通りである：複数アラインメントについてのギャップ

ペナルティー = 10 ; 複数アラインメントについてのギャップの長さのペナルティー = 10 ; 対様式でのアラインメントにおける k - タプル値 = 1 ; 対様式でのアラインメントにおけるギャップペナルティー = 3 ; 対様式のアラインメントにおけるウィンドウ値 = 5 ; 対様式のアラインメントにおいて保存されるダイアゴナル = 5。アラインメントプログラムのために用いられる残基の重み付け表は、PAM250 (Dayhoffら, Atlas of Protein Sequence and Structure, Dayhoff編, NDRF, Washington, 第5巻, 別冊3, 345頁, 1978) である。

【0027】

保存パーセントは、2つの残基が保存的置換 (PAM250残基の重み付け表において0.3以上の対数オッズ値を有すると定義される) を示す位置の百分率に対して同一性残基の百分率を足すことによって、上記のアラインメントから算出される。保存は、非ヒトFGF-21との保存パーセントを決定する場合はヒトFGF-21に対して参照され、非FGF-21増殖因子との保存パーセントを決定する場合はFGF-21に対して参照される。この必要条件を満たす保存的アミノ酸変化は、以下の通りである: R - K ; E - D、Y - F、L - M ; V - I、Q - H。

【0028】

本発明は、1以上の反応性アミノ酸側鎖と共有結合した1以上のポリマーを含むFGF-21タンパク質またはこれらの変異体を提供する。方法の例として、これらのポリマーとして、1以上の遊離のシステインスルフヒドリル残基に結合され得るポリエチレングリコール (PEG) が挙げられ (限定ではない)、これにより、ジスルフィド結合およびタンパク質が酸化条件に曝露された場合の凝集の形成をブロックする。さらに、FGF-21タンパク質および/またはムテインのペグ化 (pegylation) は、半減期、溶解性、およびプロテアーゼ耐性を増加するような改善された特性を提供することが期待される。あるいは、FGF-21タンパク質および/またはムテインは、遊離アミノ基 (例えば、リジン またはN末端アミノ基) へのポリマーの共有結合性の付加により改変され得る。共有結合性の改変のための好ましいシステインおよびリジンは、レセプタ

一もしくはヘパリン結合中に含まれないものまたは適正なタンパク質の折り畳み中に含まれないものである。例えば、c y s 2 7およびc y s 1 0 4は、改変され得る。F G F - 2 1の生化学的および/または生物学的活性をアッセイするための方法が、特定のアミノ酸残基の改変が、所望されるタンパク質の活性を生じるか否かを決定するために使用され得ることは、当業者に明らかである。

【0029】

1以上のプロテアーゼ切断部位を改変することによるF G F - 2 1の安定性を改善することは有益であり得る。従って、本発明は、F G F - 2 1改変体を提供し、このF G F - 2 1改変体において、1以上のプロテアーゼ切断部位が（例えば、切断部位での1以上のアミノ酸の置換により）改善された安定性を有するF G F - 2 1改変体を作製するために変更された。このような改善されたタンパク質の安定性は、タンパク質生成物および/または治療的使用の間で有益であり得る。好ましい部位は、プロリンの2つの残基（例えば、配列番号4の近接の残基160）内の一塩基部位である。

【0030】

改変のための適切なプロテアーゼ切断部位は、当該分野で周知であり、そして企図される特定の用途によって変化するようである。例えば、代表的な置換は、リジンまたはアルギニンと他のアミノ酸（例えば、アラニン）との置換を含む。活性の喪失（例えば、レセプター結合またはヘパリン結合）は、本明細書中で記載されるように試験され得る。

【0031】

F G F - 2 1はまた、ハイブリッド形態または改変形態が、F G F - 2 1の生物学的活性を保持する限り、以下を含むF G F - 2 1のハイブリッド形態およびF G F - 2 1改変形態を含む：融合タンパク質；F G F - 2 1フラグメント；特定のアミノ酸が欠失または置換されたハイブリッド形態および改変形態；1以上のアミノ酸が改変アミノ酸または異常アミノ酸に変更されたような改変；グリコシル化のような改変。融合タンパク質は、本発明のF G F - 2 1またはこれらのフラグメントおよびタンパク質生成物の分泌を促進するための非相同性タンパク質のシグナル配列から構成され得る。

【0032】

FGF-21を含む融合タンパク質または生物学的に活性なこれらのフラグメントもしくはこれらの免疫原フラグメントは、当該分野で公知の方法を使用して生成され得る。このような融合タンパク質は、治療的に使用され得、または単離手順および精製手順を単純化するために生成され得る。ヒスチジン残基は、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー精製を可能にするために組込まれ得る。残基EQKLISEEDLは、mycモノクローナル抗体により認識される免疫原性決定基を含み得、そしてmycモノクローナル抗体に基いたアフィニティークロマトグラフィー精製を可能にするために組込まれ得る。トロンビン切断部位は、選択された部位で分子の切断を可能にするために組込まれ得る；好ましいトロンビン切断部位は、残基LVPRGから構成される。分子の精製は、配列（例えば、残基SAWRHPQFGG、これは、常磁性ストレプトアビジンビーズに結合する）を組込むことにより容易にされ得る。このような実施形態は、参照として援用されるWO97/25345に記載される。

【0033】

本発明はさらに、FGF-21とケラチノサイト増殖因子(KGF)間のキメラ分子を含む(Reich-Slotky, Rら、J. Biol. Chem. 270:29813~29818(1995))。このキメラ分子は、FGF-21およびKGF分子の1つまたは両方の特異的領域またはフラグメント（例えば、以下に記載されるFGF-21フラグメント）を含み得る。

【0034】

本発明はまた、FGF-21のフラグメントを含む。配列番号4および2の好ましいフラグメントとしてそれぞれ：約1~約209のアミノ酸（配列番号2については210）；約2~209のアミノ酸（配列番号2については210）；約1~約177のアミノ酸；配列番号2について約40~約177のアミノ酸が挙げられる。このようなフラグメントは、標準的な生化学的方法、またはフラグメントをコードするポリヌクレオチドを発現することによりタンパク質から調製され得る。

【0035】

F G F - 2 1、またはこれらのフラグメントは、ヒト血清アルブミン (H S A) またはこれらの一部を含む融合タンパク質として生成され得る。このような融合構築物は、F G F - 2 1、またはこれらのフラグメントの真核生物宿主細胞における発現を増強するのに適している。模範的なH S A 部分として、本明細書中に参考として援用される米国特許第5, 766, 883号、および開示WO 97/24445に開示されるN末端ポリペプチド(アミノ酸1~369、1~419、およびアミノ酸1で始まる中間の長さ)が挙げられる。他のキメラポリペプチドとして、H S A のC末端およびN末端のそれぞれに結合されるF G F - 2 1またはこれらのフラグメントを有するH S A タンパク質が挙げられる。このようなH S A 構築物は、本明細書中で参考として援用される米国特許番号5, 876, 969に開示される。

【0036】

ネイティブなF G F - 2 1と異なるF G F - 2 1分子はまた、生物学的活性部位における変更の効力により本発明の範囲に含まれる。

【0037】

増殖因子は、特定のレセプターで作用すると考えられる。本発明によると、F G F - 2 1および増殖因子のこのファミリーのまだ未知のメンバーが、他の増殖因子について示された明確な区分を有する特定のレセプターを介して作用する。

【0038】

本発明の好ましいh F G F - 2 1が、同定された。組換えDNA技術により調製されたh F G F - 2 1はまた好ましい。配列番号1または配列番号3に対して80%の相同性; 好ましくは少なくとも85%の相同性、より好ましくは少なくとも90%の相同性、最も好ましくは95%の相同性を有するDNAおよびRNAを含むポリヌクレオチドが、本発明の範囲内に含まれる。配列番号1または3に対して96%、97%、98%、および99%の相同性を有するポリヌクレオチドもまた含まれる。相同性パーセントは、当該分野において公知の方法を使用して計算される。このような方法の例(限定ではない)は、12のギャップオープンペナルティおよび1のギャップエクステンションペナルティとともにアフィンギャップサーチ(affine gap search)を用いてMPSRC

Hプログラムを実行するようなSmith-Waterman相同性検索アルゴリズムである。

【0039】

FGF-21はまた、ハイブリッド形態または改変形態が、FGF-21の生物学的活性を保持する限り、以下を含むFGF-21のハイブリッド形態およびFGF-21改変形態を含む：融合タンパク質；FGF-21フラグメント；特定のアミノ酸が欠失または置換されたハイブリッド形態および改変形態；1以上のアミノ酸が改変アミノ酸または異常アミノ酸に変更されたような改変；グリコシル化のような改変。生物学的活性を保持することにより、応答性の細胞の増殖、生存または分化を促進するFGF-21の能力が、保存されることを意味するが、本明細書中に記載される単離されたFGF-21または組換えで生成されたFGF-21の能力と同じレベルである必要性はない。

【0040】

抗体と本明細書中に記載されたFGF-21またはゲノムDNA、mRNAまたはcDNAを含むヌクレオチド配列との相互反応性の効力によって単離され得る任意のFGF-21が、ゲノムヌクレオチド配列またはサブゲノムヌクレオチド配列または本明細書中のFGF-21のcDNAまたはこれらのフラグメントの相補的配列とのハイブリダイゼーションによって単離され得ることはまた、実質的に相同であるという意味の中に含まれる。変性DNA配列が、ヒトFGF-21をコードし得、変性DNA配列はヒトFGF-21をコードし得、そしてこれらはまた、FGF-21の対立遺伝子変異体であるとして本発明内に含まれることが意図される。

【0041】

組換えヒトFGF-21は、FGF-21をコードするDNA配列を適切な形質転換宿主細胞において発現することにより生成され得る。当該分野で周知の方法を使用して、FGF-21をコードするDNAは、発現ベクターに連結され得、宿主細胞に形質転換され、そして形質転換細胞によりFGF-21の発現に適切な条件が確立された。

【0042】

FGF - 21をコードするDNAは、宿主細胞の好ましいコドンの使用の利益を受けることにより設計され得る。Pseudomonas aeruginosaにおけるコドンの使用は、例えば、Westら、Nucleic Acid Res. 11:9323~9335(1988)に記載される。Saccharomyces cerevisiaeにおけるコドンの使用は、例えば、Lloydら、Nucleic Acids Res. 20:5289~5295(1992)に記載される。コリネバクテリアの好ましいコドンおよびE. coliの好ましいコドンとの比較は、Malubresら、Gene 134:15~24(1993)に提供される。Drosophila melanogasterにおけるコドンの使用は、例えば、Akashi、Genetics 136:927~935(1994)に記載される。酵母におけるコドンの使用はまた、図7に示され、ショウジョウバエにおけるコドンの使用は、図8に示され、そしてE. coliについてのコドンの使用は、図9に示される。

【0043】

任意の適切な発現ベクター（例えば、昆虫細胞で使用するための発現ベクター）を使用して、組換えヒトFGF - 21を産生し得る。バキュロウイルス発現系もまた使用され得る。好ましい方法は、バキュロウイルスベクターを使用する昆虫細胞（例えば、Tr5細胞またはSf9細胞）での発現である。

【0044】

本発明は、ヒトFGF - 21をコードする配列を含む核酸配列を含む。FGF - 21をコードする核酸配列のように実質的に同一である配列はまた、本発明の範囲内に含まれる。このような実質的に同じの配列は、例えば、周知の手順および標準的な手順により所定の宿主細胞（例えば、E. coli）においてより容易に発現されるコドンで置換され得る。このような改変された核酸配列は、本発明の範囲内に含まれる。

【0045】

特定の核酸配列は、当業者により改変され得、従って、FGF - 21のアミノ酸配列をコードする全ての核酸配列は、同様にこのように改変され得る。従って、本発明はまた、適切な場合には、このような核酸、または核酸配列の相補体す

べてとハイブリダイズし、FGF-21の細胞生存、細胞増殖、または細胞分化活性を有するポリペプチドをコードする核酸を含む。本発明はまた、細胞の生存を促進する活性を有するポリペプチドをコードし、そしてFGF-21に結合する抗体により認識される核酸配列を含む。抗体を惹起するための好ましい方法およびエピトープは、実施例4に記載される。

【0046】

本発明はまた、本発明の範囲内に含まれる任意の核酸配列に作動可能に連結された発現調節エレメントを含むベクターを包含する。本発明はまた、本発明の範囲内に含まれる任意の核酸配列に作動可能に連結された発現調節エレメントを含むベクターで形質転換された（任意の種類）宿主細胞を含む。

【0047】

FGF-21を生成するための方法もまた本明細書中で提供される。調製は、細胞型がFGF-21を生成する限り、種々の細胞型からの馴化培地からの単離により行われ得る。第2の、そして好ましい方法は、FGF-21をコードする核酸配列を単離または獲得し、この配列を適切なベクターおよび適切な細胞型に適切な調節配列とともに配列をクローニングし、そしてFGF-21を生成するための配列を発現することによる組換え方法の利用を含む。

【0048】

FGF-21は、肝臓における高い発現レベルに基いて記載されてきたが、この因子は、他の細胞型でも作用し得る。FGF-21は、非肝臓細胞で作用し、これらの生存状態、増殖状態、分化状態または機能を促進するようである。この予測は、公知の増殖因子の活性に基く。FGFファミリーのメンバーは、これらの発現が、1つのまたはわずかな組織に限られる場合でさえ、異なる機能および発生学的起源の多くの細胞型に作用する。

【0049】

発明者は、本明細書中で、FGF-21が肝臓で高いレベルで発現されることを同定した。これは、例えば、前癌性病変、ヘパトーム、肝硬変、炎症性疾患からの回復、外傷または他の型の傷害、および他の肝臓疾患におけるFGF-21の役割を示唆する。さらに、FGF-21はまた、胸腺および精巣で発現される

。これは、例えば、不妊症、テストステロン産生の制御、精巣または関連する細胞の癌、および他の精巣の障害、ならびに細胞（例えば、胸腺由来の免疫細胞）の障害、例えば、自己免疫障害、白血病およびリンパ腫、免疫不全状態などにおけるFGF-21の役割を示唆する。

【0050】

本発明はまた、肝臓疾患、精巣疾患、または胸腺疾患を有する患者を処置するためのFGF-21の有効量を含む治療的組成物または薬学的組成物、およびFGF-21の治療的有効量を投与する工程を包含する方法を含む。これらの組成物および方法は、多くの疾患を処置するために有用であり得る。本明細書中の組成物および方法はまた、変性を予防し、そして/または他の非肝臓組織においても生存を促進する（例えば、血管新生、神経細胞の生存、創傷治癒などを促進する）ために有用であり得る。当業者は、FGF-21が、特定の細胞型の生存または機能を促進することにおいて有用であるか否かを決定するための当該分野で公知の種々のアッセイを容易に使用し得る。神経細胞の生存の促進は、神経系の疾患および状態（パーキンソン病、アルツハイマー病、神経への外傷性傷害、および神経系の変性疾患を含む）の処置において有用である。

【0051】

特定の環境では、FGF-21の発現量を調節または減少することが所望され得る。従って、本発明の別の局面には、FGF-21アンチセンスオリゴヌクレオチドが作製され得、そして細胞によるFGF-21発現のレベルを減少するために、1以上のFGF-21アンチセンスオリゴヌクレオチドを投与する工程を包含する方法が利用され得る。FGF-21アンチセンスオリゴヌクレオチドにより、塩基対合を介して、FGF-21の発現に関与する特異的な相補的核酸配列と相互作用し、その結果、FGF-21の発現が減少する、ヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドが参照される。好ましくは、FGF-21の発現に関与する特異的核酸配列は、FGF-21をコードする、ゲノムDNA分子またはmRNA分子である。このゲノムDNA分子は、FGF-21遺伝子の調節領域、または成熟FGF-21タンパク質についてのコード配列を含み得る。FGF-21アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびそのための方法の状況におい

て、用語、ヌクレオチド配列に対して相補的は、細胞において、すなわち、生理学的条件下で、その配列へのハイブリダイゼーションを可能にするに十分に、このような配列に対して相補的であることを意味する。FGF-21アンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは、約8～約100のヌクレオチドを含む配列を含み、より好ましくはFGF-21アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約15～約30のヌクレオチドを含む。FGF98アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、核酸分解(nucleolytic degradation)への耐性を付与する種々の改変(例えば、改変されたヌクレオシド間結合(参考として援用される、UhlmannおよびPeyman, Chemical Reviews 90:543-548, 1990; SchneiderおよびBanner, Tetrahedron Lett. 31:335, 1990)、改変された核酸塩基、および/または糖など)を含み得る。

【0052】

本発明の治療的または薬学的組成物は、例えば、静脈内、皮下、筋肉内、経皮、髄腔内、または大脳内を含む、当該分野で公知の任意の適切な経路によって投与され得る。投与は、注射によるように迅速であるか、またはゆっくりとした注入または徐放処方物の投与によるようにある期間にわたってかのいずれかであり得る。

【0053】

FGF-21はまた、所望の薬学的または薬力学的特性を提供する薬剤と連結または結合体化され得る。例えば、FGF-21は、血液脳関門を横切る透過または輸送を促進する、当該分野で公知の任意の物質(例えば、トランスフェリンレセプターに対する抗体)にカップリングされ得、そして静脈内注射によって投与され得る(例えば、参考として援用される、Fridenら, Science 259:373-377, 1993を参照のこと)。さらに、FGF-21は、ポリエチレングリコールのようなポリマーに安定に連結されて、溶解度、安定性、半減期、および他の薬学的に有利な特性という所望の特性を獲得し得る(例えば、参考として援用される、Davisら, Enzyme Eng. 4:169-73, 1978; Burnham, Am. J. Hosp. Pharm. 51

: 210 - 218 , 1994を参照のこと)。

【0054】

組成物は、通常、薬学的調製物の形態で用いられる。このような調製物は、製薬の分野で周知の様式で作製される。1つの好ましい調製物は、生理学的食塩水溶液であるビヒクルを利用するが、他の薬学的に受容可能なキャリア（例えば、生理学的濃度の他の非毒性塩、5%グルコース水溶液、滅菌水など）もまた使用され得る。適切な緩衝液が組成物中に存在することもまた所望され得る。このような溶液は、所望であれば、凍結乾燥され、そして迅速な注射のために滅菌水の添加により再構成されるように用意された滅菌アンプル中で保存され得る。一次溶媒は、水性、あるいは非水性であり得る。FGF - 21はまた、処置を必要とする組織中に移植され得る、固体または半固体の生物学的に適合性のマトリックス中に取り込まれ得る。

【0055】

キャリアはまた、pH、容量オスモル濃度、粘度、清澄性、色、滅菌度、安定性、溶解速度、または処方物の臭いを変更または維持するための他の薬学的に受容可能な賦形剤を含み得る。同様に、キャリアは、血液脳関門を横切る、放出、または吸収または透過を変更または維持するための、なお他の薬学的に受容可能な賦形剤を含み得る。このような賦形剤は、単位投薬量形態もしくは多回用量形態のいずれかで非経口投与のための、または連続注入もしくは定期的注入による脳脊髄液への直接注入のための投薬を処方する通常そして慣用的に用いられる物質である。

【0056】

用量投与は、投薬処方物の薬物動態学的パラメータおよび使用される投与経路に依存して繰り返され得る。

【0057】

FGF - 21を含有する特定の処方物が、経口投与されることもまた意図される。このような処方物は、好ましくは、カプセル化され、そして固体投薬形態で適切なキャリアと共に処方される。適切なキャリア、賦形剤、および希釈剤のいくつかの例としては、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール

、マンニトール、デンプン、アカシアゴム、リン酸カルシウム、アルギナート、ケイ酸カルシウム、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、ゼラチン、シロップ、メチルセルロース、メチルヒドロキシベンゾエートおよびプロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、マグネシウム、ステアレート、水、鉱油などが挙げられる。処方物は、滑沢剤、湿潤剤、乳化および懸濁剤、保存剤、甘味剤、または矯味矯臭剤をさらに含み得る。組成物は、当該分野で周知の手順を用いることによって、患者に投与された後の活性成分の迅速な、持続性の、または遅延した放出を提供するように処方され得る。処方物はまた、タンパク質分解性分解を減少させ、そして吸収を促進する物質（例えば、界面活性剤など）を含み得る。

【0058】

意図される処置レジメンに依存して、投与の頻度を最小化した上で長期の処置を提供するために、FGF-21タンパク質またはその改変体の放出速度を制御することが望ましくあり得る。このような処置レジメンは、例えば、活性タンパク質の局所濃度が不十分な期間だけ有効なレベルであるように、このFGF-21タンパク質が比較的不安定であることが見出される場合に所望され得る。従って、例えば、特定の疾患について、繰り返し注入および頻繁な注入を行うことは望ましくないかまたは現実的ではないかもしれない。このような徐放系の主な利点としては、ある濃度の薬物の標的化された局所送達、この疾患状態を処置するために必要とされる少ない薬物、起こり得る副作用の最小化、および処置の効力の増大が挙げられる。また、これらの形態の送達系は、インビボで不安定であり、そして頻繁な投薬間隔を通常必要とする薬物を保護し得る。このような状況下で、徐放は、当該分野で容易に利用可能な方法（例えば、ヘパリン-アルギナートマイクロスフェアを形成するための、FGF-21複合化ヘパリン-セファロースビーズのカプセル化、またはFGF-21 PLGマイクロスフェアの調製）のうちの1つによって達成され得る。

【0059】

ヘパリン-アルギナートマイクロスフェアは、組織に塩基性線維芽細胞成長因子を送達するために首尾よく利用されてきた（Lopezら、Journal o

f Pharmacology and Experimental Therapeutics 282(1):385-390(1997))。同様に、アルギナート/ヘパリン-セファロースのミクロスフェアおよびフィルムは、アルギナート/ヘパリン-セファロースミクロスフェアおよびフィルムが、小用量でのその放出を制御するために、塩基性FGF-サポニン結合体の放出を制御するための薬物キャリアとして使用されている。bFGFの溶液へのヘパリンの添加によって、pHの変化または温度の上昇を伴う、活性の損失を防ぐ。例えば、Gospodarowiczら、J. Cell. Physiol. 128:475~484(1986)を参照のこと。

【0060】

ヘパリンへのFGF-21の結合が、インビボでの発現もしくは投与の間、またはインビトロでのタンパク質精製の種々の段階の間のいずれかでのその安定性を増強するために使用され得る。従って、本発明により、ヘパリンがFGF-21の溶液に添加され得、そしてその活性が本明細書中で開示される方法によって、アッセイされ得る。

【0061】

FGF-21結合ヘパリン-セファロースビーズが、アルギン酸カルシウムミクロスフェア中にカプセル化されて、ヘパリン安定化FGF-21タンパク質の制御された放出を可能にし得る。例えば、ミクロスフェアは、FGF-21結合ヘパリン-セファロースビーズとのアルギン酸ナトリウム混合溶液を、塩化カルシウムの硬化(hardening)溶液中に落とすことによって、構築され得る。球が、この混合物がこの硬化溶液に入るとすぐに形成される。このミクロスフェアのサイズは、FGF-21結合ヘパリン-セファロースビーズを減少した断面積のシリンダー(例えば、皮下針)に通すことによって、調整され得る。

【0062】

カプセル化の効率は、カプセル化された増殖因子の量を、溶液中に最初に存在する量と比較することによって決定され得る。例えば、FGF-21が、3M NaClの溶液を用いてこのヘパリン-セファロースビーズから剥がされ得、そして機能的活性アッセイが、実施され得る。

【0063】

特定の用量は、患者のおおよその体重もしくは体表面積、または占められる身体空間の容積に従って算出される。用量はまた、選択される特定の投与経路に依存して算出され得る。処置の適切な投薬量を決定するために必要な算出のさらなる改善は、当業者によって慣用的に行われる。このような算出は、標的細胞のアクセス調製物において、本明細書中に開示される活性を考慮して、当業者によって過度の実験を伴うことなく行われ得る。正確な投薬量は、標準的な用量応答研究に関連して決定される。実際に投与される組成物の量が、関連する状況（処置されるべき状態、投与されるべき組成物の選択、個々の患者の年齢、体重、および応答、患者の症状の重篤度、ならびに選択される投与経路を含む）を考慮して、実施者によって決定されることが理解される。

【0064】

本発明の1つの実施形態では、FGF-21は、生物学的に活性な形態のFGF-21またはFGF-21の前駆体（すなわち、身体によって生物学的に活性な形態のFGF-21へと容易に変換され得る分子）を生成し得るベクターまたは細胞を患者に移植することにより治療的に投与され得る。1つのアプローチでは、FGF-21を分泌する細胞は、患者への移植のために半透膜中にカプセル化され得る。細胞は、FGF-21もしくはその前駆体を通常発現する細胞、またはFGF-21もしくはその前駆体を発現するように形質転換され得る細胞であり得る。患者がヒトである場合、細胞がヒト起源であること、およびFGF-21がヒトFGF-21であることが好ましい。しかし、本明細書中の処方物および方法は、獣医学的適用ならびにヒトでの適用に用いられ得、そして本明細書中で用いられる用語「患者」は、ヒト患者および獣医学的的患者を含むことが意図される。

【0065】

細胞は、患者への移植または植付けにおける使用のためにエキソビボで増殖させ得る（参考として援用される、Muenchら, Leuk. & Lymph. 16:1-11, 1994）。本発明の別の実施形態では、FGF-21を用いて、移植または植付けのために細胞のエキソビボ増殖を促進し得る。現在の方法

は、因子（例えば、エリスロポエチン、コロニー刺激因子、幹細胞因子、およびインターロイキン）を含有するバイオリクター培養系を用いて、赤血球、単球、好中球、およびリンパ球についての造血前駆細胞を増殖させた（参考として援用される、Verfaillie, Stem Cells 12:466-476, 1994）。これらの幹細胞は、ヒトドナーの骨髄、ヒト末梢血、または臍帯血細胞から単離され得る。増殖させた血球を用いて、特定の疾患状態の結果として、または悪性疾患の処置のための高用量の化学療法の結果として、これらの細胞を欠く患者を処置する（参考として援用される、George, Stem Cells 12(別冊1):249-255, 1994）。化学療法後の細胞移植の場合、化学療法の前に骨髄細胞を取り出し、これらの細胞を、悪性細胞を除去するようにも機能する方法を用いてエキソピボで増殖させ、そして増大した細胞を化学療法後に患者に移植し戻すことにより、自己移植が実施され得る（概説については、参考として援用されるRummelおよびVan Zant, J. Hematotherapy 3:213-218, 1994を参照のこと）。FGF-21は、肝細胞において発現されるので、FGF-21が機能して、肝細胞における肝硬変変化の進行を予防または遅くし、そして損傷後または疾患に起因する肝臓の一部の外科的除去後の、肝細胞の再生を促進し得ると考えられる。

【0066】

多数の環境において、患者におけるFGF-21のレベルを決定することが所望される。FGF-21の発現を示す本報告に加えて、FGF-21の同定は、FGF-21の存在が、細胞の増殖および生存に関連する正常な生理学的機能に役立つという結論の基礎を提供する。内因性に生成されたFGF-21はまた、特定の疾患状態において役割を果たし得る。

【0067】

FGF-21が、肝臓組織、胸腺組織および精巣組織において発現されるとすれば、FGF-21のレベルが、種々の状態において変化し得るようであり、そしてFGF-21レベルの定量が臨床的に有用な情報を提供するようである。さらに、変性状態、変化した生理学的機能の処置において、あるいは肝細胞、精巣

細胞または胸腺細胞への損傷からの回復において、FGF-21を含有する組成物が投与され得、そして血清または任意の所望の組織画分中で特定の標的レベルのFGF-21を達成することが所望されるようである。それゆえ、患者におけるFGF-21のレベルをモニタリングし得ることが有利である。従って、本発明はまた、患者からのサンプルにおけるFGF-21の存在を検出するための方法を提供する。

【0068】

患者においてFGF-21の存在を検出する状況において本明細書中で使用される用語「検出」は、患者におけるFGF-21の量のまたはFGF-21の量を発現する能力を決定すること、FGF-21を他の増殖因子から区別すること、変性疾患の有望な結果および回復の見込みに関する予後を評価すること、この病的状態の状態の尺度としての一定の期間にわたるFGF-21レベルをモニタリングすること、ならびに患者についての好ましい治療レジメを決定するためのFGF-21レベルをモニタリングすることを含むことが意図される。

【0069】

患者におけるFGF-21の存在を検出するために、サンプルは、患者から入手される。サンプルは、組織生検サンプル、または血液、血漿、血清、CSFなどのサンプルであり得る。FGF-21は、実施例2において考察するように、肝臓組織において発現される。FGF-21を検出するためのサンプルは、これらの組織のいずれかから採取され得る。肝臓、胸腺または精巣におけるFGF-21のレベルを評価する場合、好ましいサンプルは、これらの組織またはこれらの組織に流す静脈から採取したサンプルである。

【0070】

いくつかの例では、FGF-21遺伝子が、患者において、または患者内の組織もしくは細胞株においてインタクトであるか否かを決定することが所望される。インタクトなFGF-21遺伝子によって、遺伝子において変更（例えば、点変異、欠失、挿入、染色体切断、染色体再配列など）が存在しないことを意味し、ここで、このような変更は、FGF-21の生成を変更し得るかまたはその生物学的活性、安定性などを変更して、疾患プロセスもしくは細胞変性状態に対す

る感受性をもたらし得る。従って、本発明の1つの実施形態では、FGF-21遺伝子における任意の変化を検出および特徴付けする方法が提供される。この方法は、FGF-21 cDNA、ゲノムDNA、またはそれらのフラグメントもしくはそれらの誘導体を含むオリゴヌクレオチドを提供することを含む。オリゴヌクレオチドの誘導体によって、誘導されたオリゴヌクレオチドが、誘導された配列が、FGF-21遺伝子にハイブリダイズするに十分な配列相補性を誘導前の配列に対して有するという点で、誘導前の配列と実質的に同じであることを意味する。誘導されたヌクレオチド配列は、このヌクレオチド配列から必ずしも物理的に誘導されず、例えば、化学的合成またはDNA複製または逆転写または転写を含む任意の様式で生成され得る。

【0071】

代表的には、患者のゲノムDNAは、患者からの細胞サンプルから単離され、そして1以上の制限エンドヌクレアーゼ（例えば、TaqIおよびAluIなど）で消化される。当該分野で周知であるサザンロットプロトコルを用いて、このアッセイは、患者または患者における特定の組織が、インタクトなFGF-21遺伝子を有するか、またはFGF-21遺伝子の異常を有するかを決定する。

【0072】

FGF-21遺伝子に対するハイブリダイゼーションは、染色体DNAを変性して、一本鎖DNAを得ること；この一本鎖DNAをFGF-21遺伝子配列に関連した遺伝子プローブと接触させること；およびハイブリダイズしたDNAプローブを同定して、少なくとも一部のヒトFGF-21遺伝子を含む染色体DNAを検出することを含む。

【0073】

本明細書中で使用される場合、用語「プローブ」は、標的領域中の配列とのプローブ配列の相補性に起因して、標的配列とハイブリッド構造物を形成するポリヌクレオチドから構成される構造をいう。プローブとして使用するために適切なオリゴマーは、標的された配列に相補的な最少で約8～12の連続したヌクレオチド、好ましくは最少で約20の連続したヌクレオチドを含み得る。

【0074】

本発明の F G F - 2 1 遺伝子プローブは、DNA または RNA のオリゴヌクレオチドであり得、そして例えば、切り出し、転写または化学的合成のような当該分野で公知の任意の方法によって作製され得る。プローブは、例えば、放射性標識もしくは蛍光標識、または酵素マーカーのような、当該分野で公知の任意の検出可能な標識で標識され得る。プローブの標識化は、当該分野で公知の任意の方法によって達成され得る。これらの方法としては、PCR、ランダムプライミング、末端標識化、ニックトランスレーションなどが挙げられる。当業者はまた、標識プローブを用いない他の方法を使用してハイブリダイゼーションを決定し得ることを認識する。ハイブリダイゼーションを検出するために使用され得る方法の例としては、サザンブロットィング、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション、および PCR 増幅を用いた一本鎖コンホメーション多型が挙げられる。

【0075】

ハイブリダイゼーションは、代表的に、25 ~ 45 で行われ、より好ましくは 32 ~ 40 で行われ、そしてより好ましくは、37 ~ 38 で行われる。ハイブリダイゼーションに必要な時間は、約 0.25 ~ 約 9.6 時間であり、より好ましくは、約 1 ~ 約 7.2 時間であり、そして最も好ましくは約 4 ~ 約 2.4 時間である。

【0076】

F G F - 2 1 遺伝子の異常はまた、PCR 方法、および F G F - 2 1 遺伝子に隣接するかまたはその中に位置するプライマーを使用して検出され得る。PCR 方法は、当該分野で周知である。簡潔には、この方法は、標的配列に隣接する核酸配列にハイブリダイズし得る 2 つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行われ、この標的配列は、F G F - 2 1 遺伝子内にあり、そして標的配列を増幅する。本明細書中で使用される用語「オリゴヌクレオチドプライマー」とは、約 8 ~ 約 30 塩基の長さの範囲にある DNA または RNA の短い鎖をいう。上流および下流のプライマーは、代表的には、長さが約 20 ~ 約 30 塩基対であり、そしてヌクレオチド配列の複製のための隣接領域にハイブリダイズする。重合化は、デオキシヌクレオチド三リン酸またはヌクレオチドアナログの存在下で DNA ポリメラーゼによって触媒され、二本鎖 DNA 分子を生成する。次いで、二本鎖は

、物理学的、化学的または酵素的方法を含む任意の変性方法によって分離される。共通して、物理学的変性方法は、約1～約10分間の範囲の時間にわたり、核酸を代表的には、約80～105の温度に加熱することを含んで使用される。このプロセスは、所望のサイクル数にわたって繰り返される。

【0077】

プライマーは、増幅されるDNA鎖に実質的に相補性であるように選択される。従って、プライマーは、テンプレートの正確な配列を反映する必要はないが、増幅される鎖と選択的にハイブリダイズするように十分に相補的でなければならない。

【0078】

PCR増幅後、次いで、FGF-21またはプレプロFGF-21またはそれらのフラグメントを含むDNA配列を、直接配列決定し、そして本明細書中に開示された配列とこの配列を比較することによって分析し、活性または発現レベルなどを変更し得る改変を同定する。

【0079】

別の実施形態において、FGF-21を検出する方法は、FGF-21遺伝子を発現する組織の分析に基づいて提供される。特定の組織（例えば、以下の実施例2で同定されるような組織）は、FGF-21遺伝子を発現することが見出された。この方法は、FGF-21遺伝子を正常に発現する組織サンプルからのmRNAに、ポリヌクレオチドをハイブリダイズさせる工程を包含する。このサンプルは、FGF-21遺伝子または特定の細胞のFGF-21遺伝子に異常性を有すると疑われる患者から得られる。

【0080】

FGF-21タンパク質をコードするmRNAの存在を検出するために、サンプルを患者から得る。サンプルを血液または組織生検サンプルから獲得し得る。サンプルを処理して、そこに含まれる核酸を抽出し得る。サンプルから得られる核酸をゲル電気泳動または他のサイズ分離技術に供する。

【0081】

サンプルのmRNAを、プローブとして供しているDNA配列と接触させて、

ハイブリッド二重鎖を形成する。上記で議論したような標識プローブの使用は、得られた二重鎖の検出を可能にする。

【0082】

FGF-21タンパク質をコードするcDNAまたはこのcDNAの誘導体をプローブとして用いる場合、偽陽性(すなわち、実際は、無傷かつ機能するFGF-21遺伝子が存在しない場合の、FGF-21ヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションおよび見かけの検出)を防ぐために高ストリンジェンシー条件を使用し得る。FGF-21 cDNA由来の配列を使用する場合、あまりストリンジェントでない条件が使用され得るが、これは偽陽性の可能性のためにあまり好ましいアプローチではない。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、ハイブリダイゼーションの間および洗浄手順の間の多くの因子によって決定され、これらの因子としては、温度、イオン強度、時間の長さおよびホルムアミドの濃度が挙げられる。これらの因子は、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版(1989) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NYにおいて概説される。

【0083】

FGF-21タンパク質をコードするmRNAのサンプル中での検出の感度を上げるために、逆転写/ポリメラーゼ連鎖反応(RT/PCR)の技術を使用して、FGF-21タンパク質をコードするmRNAから転写されたcDNAを増幅し得る。RT/PCRの方法は、当該分野で周知であり、そして以下のように行われ得る。総細胞RNAは、例えば、標準的なグアニジウムイソチオシアネート法によって単離され、そして総RNAは、逆転写される。逆転写法は、逆転写酵素および3'末端プライマーを使用する、RNAのテンプレート上でのDNAの合成を包含する。代表的には、プライマーは、オリゴ(dT)配列を含む。次いで、このようにして生成されたcDNAは、PCR法およびFGF-21特異的プライマーを使用して増幅される。(Belyavskyら、Nucleic Acid Res. 17:2919-2932, 1989; KrugおよびBerger、Methods in Enzymology, 152:316-325

, Academic Press, NY, 1987 (これらは、本明細書中に参考として援用される))。

【0084】

ポリメラーゼ連鎖反応法は、増幅されるべきDNAセグメントの2つの隣接領域に実質的に相補性である2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、上記のように行われる。

【0085】

増幅後、次いで、PCR産物を電気泳動し、そしてエチジウムブロミド染色またはホスホイメーキングによって検出する。

【0086】

本発明は、患者から得たサンプル中のFGF-21タンパク質の存在を検出する方法をさらに提供する。タンパク質を検出するために当該分野で公知の任意の方法が使用され得る。このような方法としては、免疫拡散法、免疫電気泳動法、免疫化学的方法、結合剤-リガンドアッセイ、免疫組織化学的技術、凝集および相補性アッセイが挙げられるが、これらに限定されない(例えば、Basic and Clinical Immunology, 217-262、SitesおよびTerr編(Appleton&Lange, Norwalk, CT, 1991を参照のこと(これは、本明細書中に参考として援用される))。抗体をFGF-21タンパク質のエピトープと反応させる工程および標識したFGF-21タンパク質またはその誘導体を競合的に置き換える工程を包含する結合剤-リガンドイムノアッセイ法が好ましい。好ましい抗体は、実施例4に従って調製される。

【0087】

本明細書中で使用されるFGF-21タンパク質の誘導体は、特定のアミノ酸が欠失されているか、あるいは修飾アミノ酸もしくは通常でないアミノ酸と置換されているかまたは変更しているポリペプチドを含むことが意図される。ここでFGF-21誘導体は、FGF-21と生物学的に等価であり、そしてこのポリペプチド誘導体は、FGF-21タンパク質に対して惹起された抗体と交差反応する。交差反応によって、抗体が、その形成を誘導した抗原以外の抗原と反応す

ることが意味される。

【0088】

多くの競合および非競合タンパク質結合イムノアッセイが当該分野で周知である。このようなアッセイで使用される抗体は、例えば、凝集試験で使用されるように非標識であってもよいし、広範な種々のアッセイ方法における使用のために標識されていてもよい。使用され得る標識としては、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素イムノアッセイ(例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA))、蛍光イムノアッセイなどに使用するための放射性核種、酵素、蛍光剤、化学発光剤、酵素基質もしくは補因子、酵素インヒビター、粒子、色素などが挙げられる。

【0089】

FGF-21タンパク質またはそのエピトープに対するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体は、当該分野で公知の任意の多くの方法によってイムノアッセイに使用するために作製され得る。エピトープによって、ポリペプチドの抗原決定基が参照される。エピトープは、そのエピトープに特有の空間的コンホメーションにおいて3つのアミノ酸を含み得る。一般的に、エピトープは、少なくとも5つのこのようなアミノ酸からなる。アミノ酸の空間的なコンホメーションを決定する方法は、当該分野で公知であり、そしてこれらの方法としては、例えば、X線結晶学および二次元核磁気共鳴が挙げられる。

【0090】

タンパク質に対する抗体を調製する1つのアプローチは、このタンパク質の全てまたは一部のアミノ酸配列の選択および調製、この配列の化学合成、および適切な動物(通常は、ウサギまたはマウス)へのその配列の注射である(実施例4を参照のこと)。

【0091】

オリゴペプチドは、親水性領域に存在し、従って、おそらく成熟タンパク質において露出しているオリゴペプチドに基づいて、FGF-21タンパク質に対する抗体の生成のための候補物として選択され得る。好ましいオリゴペプチドは、RQRVLYTDDAQQTEAH(配列番号4の残基46~61)およびHL

PGNKSPHRDPAPR (配列番号4の残基146~160)である。さらなるオリゴペプチドは、例えば、Antigenicity Index of Welling, G.Wら、FEBS Lett. 188:215-218, 1995 (本明細書中に参考として援用される)を使用して決定され得る。

【0092】

FGF-21に対する抗体はまた、この抗体が他のファミリーメンバーと交差反応し得るように、本明細書中で同定される、1つ以上の保存された領域を含むオリゴペプチドに対して惹起され得る。このような抗体を使用して、他のファミリーメンバーを同定および単離し得る。

【0093】

FGF-21タンパク質またはそのエピトープの調製のための方法は、化学合成、組換えDNA技術、または生物学的サンプルからの単離を含むが、これらに限定されない。ペプチドの化学合成は、例えば、固相ペプチド合成の古典的なMerrifield法(Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149, 1963, これは、本明細書中に参考として援用される)またはRapid Automated Multiple Peptide Synthesisシステム(E. I. du Pont de Nemours Company, Wilmington, DE) (CaprinoおよびHan, J Org Chem 37:3404, 1972, これは、本明細書中に参考として援用される)でのFMOCストラテジーによって行われ得る。

【0094】

ポリクローナル抗体は、抗原を注射した後に、適切な間隔で引き続き追加免疫することによって、ウサギまたは他の動物を免疫して調製され得る。この動物は、採血され、そして血清は、通常は、ELISAによって精製したFGF-21タンパク質に対して、または肝臓もしくは他の細胞へのFGF-21の作用をブロックする能力に基づくバイオアッセイによってアッセイされる。トリ種(例えば、ニワトリ、シチメンチョウなど)を用いる場合、抗体はその卵の卵黄から単離され得る。モノクローナル抗体は、骨髓腫細胞またはリンパ腫細胞のような連続的に複製する腫瘍細胞で免疫したマウスからの脾細胞を融合することによるM

ilsteinおよびKohlerの方法にならって調製され得る。(MilsteinおよびKohler, Nature 256:495-497、1975; GulfreおよびMilstein, Methods in Enzymology: Immunochemical Techniques 73:1-46、LangoneおよびBanatis編、Academic Press、1981、これらは、参考として援用される)。次いで、このように形成されたハイブリドーマ細胞は、限界希釈法によりクローニングされ、そして上清をELISA、RIA、もしくはバイオアッセイによって抗体生成についてアッセイする。

【0095】

抗体が標的タンパク質を認識し、かつ特異的に結合する特有の能力は、タンパク質の過剰発現を処置するためのアプローチを提供する。従って、本発明の別の局面は、FGF-21タンパク質の過剰発現を含む疾患を、FGF-21タンパク質に対する特異的な抗体で患者を処置することによって、予防または処置する方法を提供する。

【0096】

FGF-21タンパク質に対する特異的な抗体(ポリクローナルまたはモノクローナルのいずれか)は、上記で議論されたように、当該分野で公知の任意の適切な方法によって生成され得る。例えば、マウスまたはヒトのモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術によって生成され得るか、あるいはFGF-21タンパク質、もしくはその免疫学的に活性なフラグメント、または抗イディオタイプ抗体、もしくはそのフラグメントが動物に投与されて、FGF-21タンパク質を認識し、かつ結合し得る抗体の生成を誘起し得る。このような抗体は、以下に挙げられる任意の抗体クラスおよび任意の抗体サブクラスに由来し得るが、それらに限定されない: IgG、IgA、IgM、IgD、およびIgE、またはトリ種の場合にはIgY。

【0097】

本発明のポリヌクレオチドおよび対応する全長遺伝子によってコードされるポリペプチドを使用して、ペプチドライブラリー、タンパク質ライブラリー、低分

子ライブラリー、およびファージディスプレイライブラリーをスクリーニングし得、そしてこのポリペプチドおよび他の公知の方法を使用して、アナログもしくはアンタゴニストを同定し得る。

【0098】

ネイティブなFGFポリペプチドは、癌において役割を果たし得る。例えば、FGFファミリーメンバーは、NIH3T3細胞の顕著な形態学的形質転換を誘導し得、そしてヌードマウスにおいて強力な腫瘍形成性を示す。脈管形成性活性が、FGFファミリーメンバーによって示された。従って、FGFのインヒビターを使用して、癌（例えば、前立腺）を処置し得る。

【0099】

ペプチドのライブラリーは、米国特許第5,010,175号およびPCT番号WO91/17823において開示される方法に従って、合成され得る。以下に簡潔に記載されるように、ペプチドの混合物を調製して、次いで、これをスクリーニングして、所望のシグナル伝達およびレセプター結合活性を示すペプチドを同定する。'175特許の方法に従って、適切なペプチド合成支持体（例えば、樹脂）は、適切に保護され、活性化されたアミノ酸の混合物にカップリングされる。反応混合物中の各アミノ酸の濃度は平衡化されるか、または産物が、開始樹脂にカップリングしたアミノ酸の等モル混合物であるように、そのカップリング反応速度に対して逆比例で調整される。次いで、結合したアミノ酸は脱保護され、そして別の平衡化されたアミノ酸混合物と反応して、全ての可能なジペプチドの等モル混合物を形成する。このプロセスは、所望の長さ（例えば、ヘキサマー）のペプチド混合物が形成されるまで、繰り返される。各工程で全てのアミノ酸を含む必要はないことに注意のこと：いくつかの工程でわずか1または2アミノ酸を含み得る（例えば、特定のアミノ酸が所定の位置で必須であることが公知の場合）ために、混合物の複雑性を低減し得る。ペプチドライブラリー合成が完了した後に、ペプチドの混合物は、選択したポリペプチドに対する結合についてスクリーニングされる。次いで、このペプチドは、活性を阻害または増強する能力について試験される。次いで、所望の活性を示すペプチドが単離され、そして配列決定される。

【0100】

PCT番号WO91/17823に記載される方法は、類似している。しかし、合成樹脂と活性化されたアミノ酸の混合物とを反応させる代わりに、樹脂を20等分に（または、その工程で添加される異なるアミノ酸の数に対応する多くの部分に）分けて、そして各アミノ酸を樹脂のその部分に個々にカップリングさせる。次いで、この樹脂部分を合わせ、混合し、そして再び第2のアミノ酸との反応のために多くの等分に分ける。この様式で、各反応を容易に完了させ得る。さらに、各工程で全ての樹脂を合わせるよりむしろ、並行して部分进行处理することによって、別個の「サブプール」を維持し得る。これは、どのペプチドが任意の観察されたレセプター結合活性またはシグナル伝達活性を担うかを決定するプロセスを簡単にする。

【0101】

このような場合において、例えば、各々1~2,000の候補物を含むサブプールを本発明の1つ以上のポリペプチドに曝す。次いで、陽性結果を生じる各サブプールは、例えば、20~100の候補物を含む、より小さなサブプール（サブ-サブプール）の群として再合成され、そして再アッセイされる。陽性サブ-サブプールは、個々の化合物として再合成され得、そして最終的にはアッセイされて、高結合定数を示すペプチドを決定し得る。これらのペプチドは、ネイティブな活性を阻害または増強する能力について試験され得る。PCT番号WO91/7823および米国特許第5,194,392号（本明細書中に参考として援用される）に記載される方法は、全ての合成および再合成が数日で行われ得るような、並行した自動化された技術によるこのようなプールおよびサブプールの調製を可能にする。

【0102】

ペプチドアゴニストまたはアンタゴニストを、任意の利用可能な方法（例えば、シグナル伝達、抗体結合、レセプター結合、マイトジェンアッセイ）を使用してスクリーニングする。アッセイ条件は、理想的には、ネイティブな活性がインビボで示される条件（すなわち、生理的pH、温度、およびイオン強度の下で）に似ているべきである。適切なアゴニストまたはアンタゴニストは、被験体で毒

性の副作用を引き起こさない濃度でネイティブな活性の強力な阻害または増強を示す。ネイティブなポリペプチドへの結合について競合するアゴニストまたはアンタゴニストは、ネイティブな濃度以上の濃度を必要とし得るが、一方で、ポリペプチドに不可逆的に結合し得るインヒビターは、ネイティブな濃度の桁における濃度で添加され得る。

【0103】

hFGF-21およびmFGF-21の有効性は、高スループットスクリーニング方法(HTS)の慣例的な適用を介して、そのレセプターへのFGF-21の結合を阻害する低分子および低分子量化合物の同定を可能にする。HTS方法は一般的に、治療的可能性についての主要な化合物の迅速なアッセイを可能にする技術に関する。HTS技術は、試験物質、ポジティブシグナルの検出、およびデータの解釈のロボット処理を使用する。主な化合物は、放射線の取り込みを介してか、または、吸光度、蛍光または読出しのようなルミネセンスに依存する光学的アッセイを介して、同定され得る(Gonzalez, J. E.ら(1998) *Curr. Opin. Biotech.* 9: 624-631)。FGF分子とFGFレセプターとの間の相互作用を検出するためのアッセイは、例えば、Blunt, A. G.ら(1997) *J. Biol. Chem.* 272: 3733-3738に記載され、そして、このようなアッセイは、候補分子がFGF-21とそのレセプターとの間の相互作用を阻害するか否かを決定するために適合され得る。

【0104】

例えば、レセプター結合についてFGF-21と競合することによって、FGF-21とそのレセプターとの相互作用を阻害する化合物のための高スループットスクリーニングにおける使用のために適合され得るモデル系が、利用可能である。Sarubbiら(1996) *Anal. Biochem.* 237: 70-75は、IL-1レセプターの活性部位に結合するための天然リガンドと競合する分子を同定するための無細胞非同位体アッセイを記載する。Martens, C.ら(1999) *Anal. Biochem.* 273: 20-31は、標識されたりガンドが粒子上に固定されたそのレセプターに結合する；レセプター結合

についての標識されたりリガンドと競合する分子の存在下で、粒子上の標識が減少する、一般的な粒子ベースの非放射性方法を記載する。

【0105】

本発明の治療的FGF-21ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、遺伝子送達ビヒクルにおいて利用され得る。遺伝子送達ビヒクルは、ウイルス起源または非ウイルス起源であり得る（一般的には、Jolly、Cancer Gene Therapy 1:51-64(1994); Kimura、Human Gene Therapy 5:845-582(1994); Connelly、Human Gene Therapy 1:185-193(1995); およびKaplit、Nature Genetics 6:148-153(1994)を参照のこと）。本発明の治療薬のコード配列を含む構築物の送達のための遺伝子治療ビヒクルは、局所的にまたは全身的にのいずれかで投与され得る。これらの構築物は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターのアプローチを利用し得る。そのようなコード配列の発現は、内因性の哺乳動物のプロモーターまたは異種のプロモーターの使用により誘導され得る。コード配列の発現は、構成的であり得るか、または調節され得る。

【0106】

本発明は、目的の選択された核酸分子を、保有または発現するために構築される組換えレトロウイルスを利用し得る。利用され得るレトロウイルスベクターは、以下に記載されているものを含む：EP 0 415 731; WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; 米国特許第5,219,740号; WO 93/11230; WO 93/10218; VileおよびHart、Cancer Res. 53:3860-3864(1993); VileおよびHart、Cancer Res. 53:962-967(1993); Ramら、Cancer Res. 53:83-88(1993); Takamiyaら、J. Neurosci. Res. 33:493-503(1992); Babaら、J. Neurosurg. 79:729-735(1993); 米国特許第4,777,127号; GB特許第2,200,651号; およびEP 0 345 242。好ましい組

換えレトロウイルスは、WO 91/02805に記載されるものを含む。

【0107】

前述のレトロウイルスベクター構築物との使用に適したパッケージング細胞株は、容易に調製され得（例えば、PCT公開WO 95/30763およびWO 92/05266を参照のこと）、そして組換えベクター粒子を産生するためのプロデューサー細胞株（ベクター細胞株とも呼ばれる）の作製のために用いられ得る。本発明の特に好ましい実施態様において、パッケージング細胞株は、ヒト（例えば、HT1080細胞）またはミンク親細胞株から作られ、それによって、ヒト血清中での不活化を生き延び得る、組換えレトロウイルスの産生を可能にする。

【0108】

本発明はまた、遺伝子送達ビヒクルとして機能し得る、アルファウイルスを基礎としたベクターも用いる。そのようなベクターは、例えば、シンドビスウイルスベクター、セムリキ森林ウイルス（ATCC VR-67；ATCC VR-1247）、ロス川ウイルス（ATCC VR-373；ATCC VR-1246）およびベネズエラウマ脳炎ウイルス（ATCC VR-923；ATCC VR-1250；ATCC VR-1249；ATCC VR-532）を含む広範な種々のアルファウイルスから構築され得る。そのようなベクター系の代表的な例としては、米国特許第5,091,309号、同第5,217,879号および同第5,185,440号；ならびにPCT公開番号WO 92/10578；WO 94/21792；WO 95/27069；WO 95/27044；およびWO 95/07994に記載されるものが挙げられる。

【0109】

本発明の遺伝子送達ビヒクルはまた、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターのようなパルボウイルスを利用し得る。代表的な例は、WO 93/09239のSrivastava、Samulskiら、J.Vir.63:3822-3828（1989）；Mendelsonら、Virology.166:154-165（1988）；およびFlotteら、P.N.A.S.90:10613-10617（1993）により開示されたAAVベクターを含む。

【0110】

アデノウイルスベクターの代表的な例としては、以下に記載されたものが挙げられる：Berkner、Biotechniques 6:616-627 (Biotechniques)；Rosenfeldら、Science 252:431-434 (1991)；WO 93/19191；Kollisら、P.N.A.S.:215-219 (1994)；Kass-Eislerら、P.N.A.S.90:11498-11502 (1993)；Guzmanら、Circulation 88:2838-2848 (1993)；Guzmanら、Cir.Res.73:1202-1207 (1993)；Zabnerら、Cell 75:207-216 (1993)；Liら、Hum.Gene Ther.4:403-409 (1993)；Cailaudら、Eur.J.Neurosci.5:1287-1291 (1993)；Vincentら、Nat.Genet.5:130-134 (1993)；Jaffeら、Nat.Genet.1:372-378 (1992)；およびLevreroら、Gene 101:195-202 (1992)。本発明に利用可能な例示的なアデノウイルス遺伝子治療ベクターとしては、以下に記載されたものもまた挙げられる：WO94/12649、WO93/03769；WO93/19191；WO94/28938；WO95/11984およびWO95/00655。Curiel、Hum.Gene Ther.3:147-154 (1992)に記載されるように殺したアデノウイルスに連結したDNAの投与が、利用され得る。

【0111】

他の遺伝子送達ビヒクルおよび方法が、利用され得る。これには、以下を含む：殺した単独のアデノウイルスに連結した、または連結していないポリカチオン性の濃縮DNA (例えば、Curiel、Hum.Gene Ther.3:147-154 (1992))；リガンド連結DNA (例えば、Wu、J.Biol.Chem.264:16985-16987 (1989)を参照のこと)；真核生物細胞送達ビヒクル細胞 (例えば、1994年5月9日に出願された米国特許出願第08/240,030号および米国特許出願第08/404,796

号を参照のこと) ; 光重合化ヒドロゲル材料の沈着 ; 米国特許第 5 , 1 4 9 , 6 5 5 号に記載された携帯型遺伝子移入パーティクルガン ; 米国特許第 5 , 2 0 6 , 1 5 2 号および WO 9 2 / 1 1 0 3 3 に記載のような電離放射線 ; 核荷電中性化または細胞膜との融合。さらなるアプローチが、Philip、Mol . Cell Biol . 1 4 : 2 4 1 1 - 2 4 1 8 (1 9 9 4)、および Woffendin、Proc . Natl . Acad . Sci . 9 1 : 1 5 8 1 - 1 5 8 5 (1 9 9 4) に記載される。

【 0 1 1 2 】

裸の DNA もまた、利用し得る。裸の DNA の例示的な導入方法が、WO 9 0 / 1 1 0 9 2 および米国特許第 5 , 5 8 0 , 8 5 9 号に記載される。取り込み効率が、生物分解性ラテックスビーズの使用により改良され得る。DNA でコーティングされたラテックスビーズは、このビーズによるエンドサイトーシスの開始後、細胞内へ効率的に輸送される。本方法は、疎水性を増すためのビーズの処理により、さらに改良され得、そしてそれにより、エンドソームの破壊を容易にし得、そして細胞質内への DNA の放出を容易にし得る。遺伝子送達ビヒクルとして働き得るリポソームが、米国特許第 5 , 4 2 2 , 1 2 0 号 ; PCT 特許公開 WO 9 5 / 1 3 7 9 6 ; WO 9 4 / 2 3 6 9 7 ; WO 9 1 / 1 4 4 4 5 ; および EP 0 5 2 4 9 6 8 に記載される。

【 0 1 1 3 】

使用に適したさらなる非ウイルス送達は、Woffendinら、Proc . Natl . Acad . Sci . USA 9 1 (2 4) : 1 1 5 8 1 - 1 1 5 8 5 (1 9 9 4) に記載されるアプローチのような機械的送達系を含む。さらにコード配列およびそのようなものの発現産物は、光重合したヒドロゲル物質の沈殿物を通じて送達され得る。コード配列の送達に用い得る遺伝子送達の従来の方法は、以下を含む : 例えば、米国特許第 5 , 1 4 9 , 6 5 5 号に記載される携帯型遺伝子移入パーティクルガンの使用 ; 米国特許第 5 , 2 0 6 , 1 5 2 号および PCT 特許公開 WO 9 2 / 1 1 0 3 3 に記載される、移入された遺伝子の活性化のための電離放射線の使用。

【 0 1 1 4 】

F G F は、機能の損失、不適切な機能 / 数、機能または生存が延長 / レスキューされ得る細胞、組織または器官の異常な機能または死、および F G F を用いた治療によって逆転または予防され得る異常によって特徴づけられる疾患に関係づけられている。

【0115】

肺、気管支もしくは肺胞細胞または肺、気管支もしくは肺胞機能の喪失、肺または気管支創傷の治癒、肺亀裂骨折、肺気腫 / 慢性閉塞性肺疾患、喘息、感染性疾患または自己免疫疾患の続発症、肺動脈または静脈性高血圧の続発症、肺線維症、未熟な肺疾患、および嚢胞性繊維症は、F G F の処置を受け入れやすい症状である。

【0116】

虚血性血管疾患は、F G F - 21 で処置することが容易であり得、ここでこの疾患は、器官への不適切な血流によって特徴づけられる。処置は、治療的新脈管形成を誘導し得るか、または細胞の機能 / 生存を保存し得る（心筋虚血 / 心筋梗塞、末梢血管疾患、腎動脈疾患、卒中）。心筋細胞または心臓の支持細胞の機能の損失またはその死によって特徴づけられる心筋症（うっ血性心不全、心筋炎）はまた、F G F - 21 を用いて処置され得、骨格筋細胞、骨細胞または支持細胞の機能の損失、その不適切な機能またはその死によって特徴づけられる筋骨格疾患も同様に処置され得る。例としては、骨格ミオパシー、骨疾患および関節炎が挙げられる。

【0117】

F G F - 21 ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、F G F - 21 分子またはその機能の損失に起因する先天性欠損の矯正を補助し得る（肝臓、心臓、肺、脳、四肢、腎臓など）。

【0118】

創傷治癒（外傷、疾患、医学的または外科的処置（これらの処置によって枯渇した細胞集団および組織の再生を含む）のいずれかに起因する）の処置は、F G F - 21 ポリペプチドおよびポリヌクレオチドのさらに別の使用である。例としては、肝臓再生、手術の創傷治癒、損傷した血管の再内皮形成（re-endo

the l i l i z a t i o n)、外傷創傷の治癒、血管に起因する潰瘍の治癒、代謝性疾患など、骨折、炎症性疾患に起因する細胞の損失などが挙げられる。

【0119】

F G F - 2 1 はまた、この分子の過剰活性を含む癌の処置のための薬物を同定する、または新たな薬物の同定において有用である新たな標的を同定するスクリーニングにおいて使用され得る。

【0120】

前述の実施態様の全てについて、臨床医は、特定の条件に基づいて、F G F - 2 1 ポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、F G F - 2 1 に対する抗体、またはペプチドアナログもしくはアンタゴニストのような低分子が処置の最も適切な形態であるか否かを決定する。これらの形態は、全て本発明の範囲内である。

【0121】

本発明の好ましい実施態様は、以下の実施例に記載される。本明細書中の特許請求の範囲内の他の実施態様は、本明細書中に開示されるように、本発明の明細書または実施の考慮事項から当業者に明らかである。実施例とともに、本明細書は、例示としてのみ見なされ、本発明の範囲およびその思想は、実施例に続く特許請求の範囲によって示されることが意図される。

【0122】

(実施例)

(実施例1)

(マウスF G F - 2 1 の単離および分析) DNAをマウス胚c DNAから調製した。それぞれヒトF G F - 1 9 (R P Y D G Y N および L P M L P M) のアミノ酸配列に対応するすべてのあり得るコドンを示すセンスおよびアンチセンス変性プライマーの各々を含む25 μ l の反応混合液中で30サイクル間、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、マウス胚c DNAからDNAを増幅した。それぞれヒトF G F - 1 9 (R P Y D G Y N および L P M L P M) のアミノ酸配列に対応するすべてのあり得るコドンを示すセンスおよびアンチセンス変性プライマーの各々を用いるPCRによって、増幅された増幅産物をさらに増幅した。予想されたサイズ(約120塩基対)の増幅されたDNAをクローン化した。ク

クローン化されたDNAのヌクレオチド配列を決定することによって、新規のマウスFGF (FGF - 21) cDNAを同定した。新規のFGF cDNAの全コード領域を決定するために、Marathon cDNA増幅キット (Clontech, Palo Alto, California) およびFGFについて特異的なプライマーを使用して、アダプター - ライゲーション媒介PCRによって、コード領域をマウス胚cDNAから増幅した。5' および3' 非コード配列を含むFGF特異的プライマーを使用するPCRによって、FGFの全コード領域をコードするcDNAをマウス胚cDNAから増幅し、そして、pGEM-T DNAベクターにクローン化した。このヌクレオチド配列を配列番号1に示し、そして、アミノ酸配列を配列番号2に示す。

【0123】

(実施例2)

(マウス組織におけるFGF - 21の発現) マウス組織由来のポリ(A)⁺ RNA (10 µg) をホルムアルデヒドを含む変性アガロースゲル(1%)上に溶解し、そして、一晚20×SSC (1×SSC: 0.15M NaCl / 0.015Mクエン酸ナトリウム) 中で、ニトロセルロース膜に転写した。³²P標識したFGF - 21 cDNAプローブ(約650塩基対)をランダムプライマー標識キット(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) およびデオキシシチジン5' [-³²P -]3リン酸(約110TBq/nmol) (ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, California) を用いて標識した。記載されているように、標識されたプローブを含むハイブリダイゼーション溶液中で、この膜をインキュベートし(Hoshikawaら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 244: 187 - 191 (1998))、そして、放射線画像分析機(BAS 2000、富士フイルム株式会社、東京、日本)を用いて分析した。図3に示されるように、FGF - 21発現は、肝臓において最も顕著であり、発現はまた精巣および胸腺においても見出される。

【0124】

(実施例3)

(ヒトFGF-21の単離および分析) ヒトFGF-21遺伝子を推定のヒト1,2-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子の5'隣接領域に位置する。ヒトFGF-21の全コード領域をコードするcDNAを、5'および3'非コード領域配列を含むFGF特異的プライマーを使用するPCRによる胎児脳cDNAから増幅し、そして、pGEM-T DNAベクターにクローン化した。このタンパク質は、配列番号4に示されるように209アミノ酸を含み(図5)、そして配列番号3のポリヌクレオチド配列によってコードされる。cDNAコード領域を含むヒトFGF-21 cDNAの増幅のためのプライマーは以下のようである: FGF-21についてのセンスプライマー: 5' agccattgatggactcggac3'; FGF-21についてのアンチセンスプライマー: 5' tggcttcaggaagcgtagct3'。

【0125】

(実施例4)

(FGF-21ペプチドを使用するウサギの免疫によるFGF-21に対する抗血清の調製) ヒトFGF-21タンパク質の選択された近接するアミノ酸に対するペプチド配列を合成し、そして、記載されるようにキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)に結合する(HarlowおよびLand, Antibodies: A Laboratory Manual, 1988. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, NY)。KLH結合ペプチドを使用してウサギを免疫する。抗血清をFGF-21に対する特異性について、および他のFGFタンパク質との交差反応性について試験した。

【0126】

代表的なペプチド配列は:

1. RQRVLYDDAQQTEAH (配列番号4の残基46~61)
2. HLPGNKSPHRDPAPR (配列番号4の残基146~160)

本明細書中に引用された全ての特許、公開された特許出願および刊行物は、本明細書中で十分に開示されるように、参考として援用される。

【0127】

特定の好ましい実施形態が、本明細書中で記載されているが、これは、上記の特許請求の範囲に開示されることを除き、このような実施形態が、本発明の範囲の制限として解釈されることを意図するものではない。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、ヒトFGF-21とマウスFGF-15とのアミノ酸配列比較を示す。アスタリスクは配列の同一のアミノ酸残基を示す。

【図2】

図2は、ヒトFGF-21およびヒトFGF-19のアミノ酸配列比較を示す。アスタリスクは配列の同一のアミノ酸残基を示す。

【図3】

図3は、マウス組織におけるFGF-21の発現を示す。

【図4A】

図4Aは、マウスFGF-21のDNA配列（配列番号1）およびアミノ酸配列（配列番号2）を示す。

【図4B】

図4Bは、マウスFGF-21のDNA配列（配列番号1）およびアミノ酸配列（配列番号2）を示す。

【図5A】

図5Aは、ヒトFGF-21のDNA配列（配列番号3）およびアミノ酸配列（配列番号4）を示す。

【図5B】

図5Bは、ヒトFGF-21のDNA配列（配列番号3）およびアミノ酸配列（配列番号4）を示す。

【図6】

図6は、ヒト（配列番号4）およびマウス（配列番号2）FGF-21のアミノ酸配列の整列を示す。

【図7A】

図7Aは、酵母についてのコドン使用を提供する。表の各列に関する第1の欄

の情報は、アミノ酸についての三文字コードを含む。第2の欄は、そのアミノ酸についての明白なコドンを含む。第3の欄は、この表が編集された遺伝子中のコドンの出現数を列挙する。第4の欄は、そのコドン使用が、コドン頻度表において編集されたものと同じである遺伝子における1,000コドンあたりのそのコドンの推定出現数を列挙する。最後の欄は、コドンファミリーにおけるその同義コドンの出現の割合を含む。

【図7B】

図7Bは、酵母についてのコドン使用を提供する。表の各列に関する第1の欄の情報は、アミノ酸についての三文字コードを含む。第2の欄は、そのアミノ酸についての明白なコドンを含む。第3の欄は、この表が編集された遺伝子中のコドンの出現数を列挙する。第4の欄は、そのコドン使用が、コドン頻度表において編集されたものと同じである遺伝子における1,000コドンあたりのそのコドンの推定出現数を列挙する。最後の欄は、コドンファミリーにおけるその同義コドンの出現の割合を含む。

【図8A】

図8Aは、ショウジョウバエについてのコドン使用を提供する。

【図8B】

図8Bは、ショウジョウバエについてのコドン使用を提供する。

【図9A】

図9Aは、E.coliについてのコドン使用を提供する。

【図9B】

図9Bは、E.coliについてのコドン使用を提供する。

【図3】

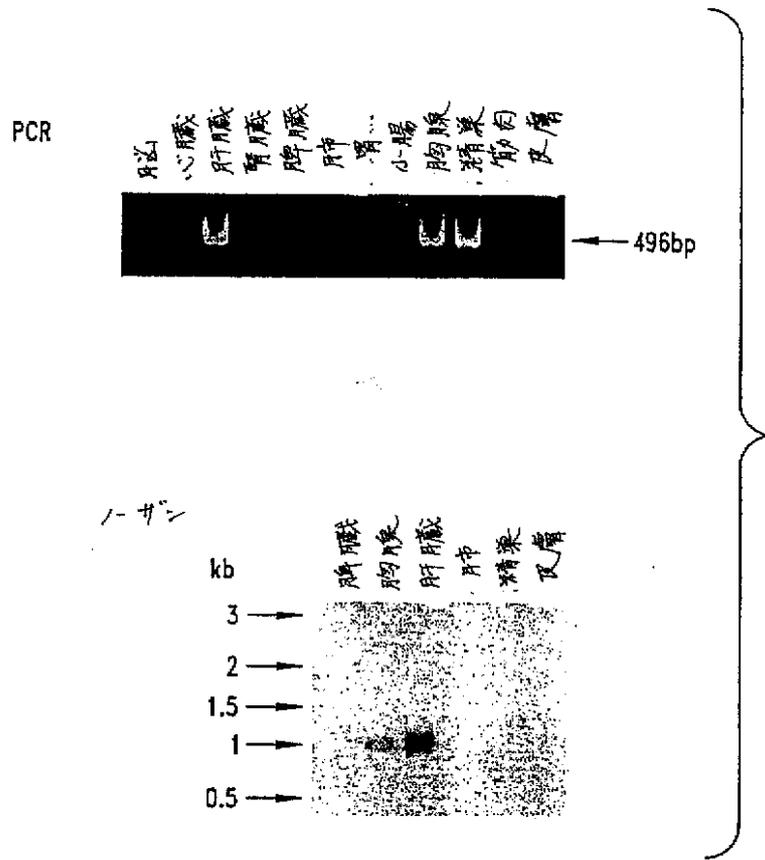


Fig. 3

【図4A】

ファイル名: pGEM-丁中のマウスFGF-21 cDNA
 配列サイズ: 659
 配列位置: 1 - 659
 翻訳位置: 14 - 646

```

      10      20      30      40      50      60
GAGCGCAGCCCTGATGGAATGGATGAGATCTAGAGTTGGGACCCCTGGGACTGTGGGTCCG
      M E W M R S R V G T L G L W V R
      70      80      90     100     110     120
ACTGCTGCTGGCTGTCTTCTGCTGGGGTCTACCAAGCATACCCATCCCTGACTCCAG
      L L L A V F L L G V Y Q A Y P I P D S S
      130     140     150     160     170     180
CCCCCTCCTCCAGTTTGGGGTCAAGTCCGGCAGAGGTACCTCTACACAGATGACGACCA
      P L L Q F G G Q V R Q R Y L Y T D D D Q
      190     200     210     220     230     240
AGACACTGAAGCCACCTGGAGATCAGGGAGGATGGAACAGTGGTAGGCGCAGCACACCG
      D T E A H L E I R E D G T V V G A A H R
      250     260     270     280     290     300
CAGTCCAGAAAGTCTCCTGGAGCTCAAAGCCTTGAAGCCAGGGTCAATCAAATCCTGGG
      S P E S L L E L K A L K P G V I Q I L G
      310     320     330     340     350     360
TGCAAAGCCTCTAGGTTTCTTGCCAACAGCCAGATGGAGCTCTCTATGGATCGCCTCA
      V K A S R F L C Q Q P D G A L Y G S P H
      370     380     390     400     410     420
CTTGATCCTGAGGCTGCAGCTTCAGAGAAGTCTGCTGGAGGACGGTTACAATGTGTA
      F D P E A C S F R E L L L E D G Y N V Y
      430     440     450     460     470     480
CCAGTCTGAAGCCCATGGCCTGCCCTGCGTCTGCCTCAGAAGGACTCCCAAAACCAGGA
      Q S E A H G L P L R L P Q K D S P N Q D
      490     500     510     520     530     540
TGCAACATCCTGGGGACCTGTGCGCTTCTGCCATGCCAGGCCTGCTCCACGAGCCCA
      A T S W G P V R F L P M P G L L H E P Q
  
```

配列番号1
 配列番号2

Fig. 4A

【 4 B】

```
      550      560      570      580      590      600
AGACCAAGCAGGATTCTGCCCCAGAGCCCCAGATGTGGGCTCCTCTGACCCCCTGAG
D Q A G F L P P E P P D V G S S D P L S

      610      620      630      640      650      660
CATGGTAGAGCCTTACAGGGCCGAAGCCCCAGCTATGCGTCCTGACTCTTCCTGAATC
M V E P L Q G R S P S Y A S *
```

Fig. 4B

【図5A】

ファイル名: PGE-M-T 中の 1/FGF-2/ cDNA
 配列サイズ: 643
 配列位置: 1 - 643
 翻訳位置: 9 - 638;

```

      10      20      30      40      50      60
agccattgatggactcggacgagaccgggttcgagcactcaggactgtgggtttctgtgc
      M D S D E T G F E H S G L W V S V L
                                                    配列番号3
                                                    配列番号4

      70      80      90      100     110     120
tggttggttctctgctgggagcctgccaggcacaccccatccctgactccagtcctctcc
      A G L L L G A C Q A H P I P D S S P L L

      130     140     150     160     170     180
tgcaattcggggccaagtccggcagcggtagctctacacagatgatgccagcagacag
      Q F G G Q V R Q R Y L Y T D D A Q Q T E

      190     200     210     220     230     240
aagcccactggagatcaggggagatgggacggtggggggcgtgctgaccagagccccg
      A H L E I R E D G T V G G A A D Q S P E

      250     260     270     280     290     300
aaagtctctgcagctgaaagccttgaagccgggagttattcaaatcttgggagtcaaga
      S L L Q L K A L K P G V I Q I L G V K T

      310     320     330     340     350     360
catccaggttctctgtgccagcggccagatggggccctgtatggatcgctccacttgacc
      S R F L C Q R P D G A L Y G S L H F D P

      370     380     390     400     410     420
ctgaggcctgcagcttccgggagctgcttcttggaggacggatacaatgttaccagtcg
      E A C S F R E L L L E D G Y N V Y Q S E

      430     440     450     460     470     480
aagcccacggcctcccgctgcacctgccagggaacaagtccccacaccgggaccctgcac
      A H G L P L H L P G N K S P H R D P A P

      490     500     510     520     530     540
cccgaggaccagctcgcttctgacctaccaggcctgcccccgactcccggagccac
      R G P A R F L P L P G L P P A L P E P P
  
```

Fig. 5A

【図5B】

```

      550      560      570      580      590      600
ccggaatcctggccccccagcccccgatgtgggctcctcggaccctctgagcatggtgg
  G I L A P Q P P D V G S S D P L S M V G

      610      620      630      640      650
gaccttcccagggccgaagccccagctacgcttcctgaagcca
  P S Q G R S P S Y A S *

```

Fig. 5B

【図6】

```

ヒト FGF-21 MDSDETFEHSGLWVS-VLAGLLLGACQAHPIPDSPLLQFGGQVRQRYLYTDDAQTEA 59
*          **** ** *** ** *****
マウス FGF-21 MEWMRSRVGTLGLWVRLLLAVFLLGVYQAYPIPDSPLLQFGGQVRQRYLYTDDQDTEA 60

HLEIREDGTVGGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCORPDGALYGSLHFDPE 119
***** ** ***** ***** ***** ***** *****
HLEIREDGTVVGAHRSPESLLELALKKPGVIQILGVKASRFLCQOPDGALYGSPHFDPE 120

ACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLHLPGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPGLPPALPEPPG 179
***** ***** ** ** * ** ***** **
ACSFRELLLEDGYNVYQSEAHGLPLRLPQKDSPNQDATSWGPVRFLLPMPGLLHEPQDQAG 180

ILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS 209
* * ***** * *****
FLPPEPPDVGSSDPLSMVEPLQGRSPSYAS 210

```

Fig. 6

【図7A】

酵母(高度に発現された)遺伝子のコードの使用

アミノ酸	コドン	数	/1000	割合	..
Gly	GGG	33.00	0.86	0.01	
Gly	GGA	70.00	1.82	0.02	
Gly	GGT	2672.00	69.62	0.91	
Gly	GGC	171.00	4.46	0.06	
Glu	GAG	277.00	7.22	0.10	
Glu	GAA	2442.00	63.63	0.90	
Asp	GAT	1100.00	28.66	0.48	
Asp	GAC	1211.00	31.55	0.52	
Val	GTC	117.00	3.05	0.04	
Val	GTA	75.00	1.95	0.03	
Val	GTT	1548.00	40.33	0.56	
Val	GTC	1026.00	26.73	0.37	
Ala	GCG	36.00	0.94	0.01	
Ala	GCA	203.00	5.29	0.06	
Ala	GCT	2221.00	57.87	0.65	
Ala	GCC	969.00	25.25	0.28	
Arg	AGG	20.00	0.52	0.01	
Arg	AGA	1336.00	34.81	0.83	
Ser	AGT	116.00	3.02	0.05	
Ser	AGC	94.00	2.45	0.04	
Lys	AAG	2365.00	61.62	0.78	
Lys	AAA	651.00	16.96	0.22	
Asn	AAT	347.00	9.04	0.22	
Asn	AAC	1259.00	32.80	0.78	
Met	ATG	766.00	19.96	1.00	
Ile	ATA	43.00	1.12	0.02	
Ile	ATT	1223.00	31.87	0.52	
Ile	ATC	1070.00	27.88	0.46	
Thr	ACG	28.00	0.73	0.01	

Fig. 7A

【 7 B】

Thr	ACA	126.00	3.28	0.06
Thr	ACT	1129.00	29.42	0.50
Thr	ACC	962.00	25.07	0.43
Trp	TGG	325.00	8.47	1.00
End	TGA	10.00	0.26	0.09
Cys	TGT	254.00	6.62	0.89
Cys	TGC	33.00	0.86	0.11
End	TAG	11.00	0.29	0.10
End	TAA	85.00	2.21	0.80
Tyr	TAT	219.00	5.71	0.19
Tyr	TAC	913.00	23.79	0.81
Leu	TTG	2202.00	57.38	0.69
Leu	TTA	576.00	15.01	0.18
Phe	TTT	432.00	11.26	0.27
Phe	TTC	1145.00	29.83	0.73
Ser	TCG	26.00	0.68	0.01
Ser	TCA	149.00	3.88	0.06
Ser	TCT	1279.00	33.33	0.52
Ser	TCC	818.00	21.31	0.33
Arg	CGG	0.00	0.00	0.00
Arg	CGA	1.00	0.03	0.00
Arg	CGT	249.00	6.49	0.15
Arg	CGC	5.00	0.13	0.00
Gln	CAG	62.00	1.62	0.05
Gln	CAA	1225.00	31.92	0.95
His	CAT	236.00	6.15	0.35
His	CAC	433.00	11.28	0.65
Leu	CTG	52.00	1.35	0.02
Leu	CTA	236.00	6.15	0.07
Leu	CTT	90.00	2.35	0.03
Leu	CTC	14.00	0.36	0.00
Pro	CCG	10.00	0.26	0.01
Pro	CCA	1271.00	33.12	0.80
Pro	CCT	279.00	7.27	0.18
Pro	CCC	33.00	0.86	0.02

Fig. 7B

【図8A】

ショウジョウバエ (高度に発現された) 遺伝子のコドン使用

アミノ酸	コドン	数	/1000	割合
Gly	GGG	6.00	0.28	0.00
Gly	GGA	380.00	18.04	0.22
Gly	GGT	575.00	27.29	0.34
Gly	GGC	746.00	35.41	0.44
Glu	GAG	1217.00	57.77	0.91
Glu	GAA	115.00	5.46	0.09
Asp	GAT	503.00	23.88	0.43
Asp	GAC	654.00	31.04	0.57
Val	GTG	719.00	34.13	0.45
Val	GTA	29.00	1.38	0.02
Val	GTT	226.00	10.73	0.14
Val	GTC	608.00	28.86	0.38
Ala	GCG	94.00	4.46	0.05
Ala	GCA	80.00	3.80	0.04
Ala	GCT	446.00	21.17	0.24
Ala	GCC	1277.00	60.61	0.67
Arg	AGG	48.00	2.28	0.06
Arg	AGA	12.00	0.57	0.01
Ser	AGT	16.00	0.76	0.01
Ser	AGC	267.00	12.67	0.23
Lys	AAG	1360.00	64.55	0.93
Lys	AAA	108.00	5.13	0.07
Asn	AAT	127.00	6.03	0.13
Asn	AAC	878.00	41.67	0.87
Met	ATG	387.00	18.37	1.00
Ile	ATA	4.00	0.19	0.00
Ile	ATT	390.00	18.51	0.29
Ile	ATC	969.00	45.99	0.71

Fig. 8A

【 8 B】

Thr	ACG	114.00	5.41	0.08
Thr	ACA	34.00	1.61	0.02
Thr	ACT	164.00	7.78	0.11
Thr	ACC	1127.00	53.49	0.78
Trp	TGG	243.00	11.53	1.00
End	TGA	1.00	0.05	0.01
Cys	TGT	20.00	0.95	0.08
Cys	TGC	220.00	10.44	0.92
End	TAG	12.00	0.57	0.17
End	TAA	58.00	2.75	0.82
Tyr	TAT	113.00	5.36	0.16
Tyr	TAC	574.00	27.25	0.84
Leu	TTG	210.00	9.97	0.12
Leu	TTA	9.00	0.43	0.01
Phe	TTT	62.00	2.94	0.09
Phe	TTC	635.00	30.14	0.91
Ser	TCG	195.00	9.26	0.17
Ser	TCA	29.00	1.38	0.02
Ser	TCT	103.00	4.89	0.09
Ser	TCC	558.00	26.49	0.48
Arg	CGG	7.00	0.33	0.01
Arg	CGA	25.00	1.19	0.03
Arg	CGT	281.00	13.34	0.34
Arg	CGC	465.00	22.07	0.55
Gln	CAG	703.00	33.37	0.91
Gln	CAA	66.00	3.13	0.09
His	CAT	88.00	4.18	0.22
His	CAC	312.00	14.81	0.78
Leu	CTG	1182.00	56.10	0.69
Leu	CTA	21.00	1.00	0.01
Leu	CTT	55.00	2.61	0.03
Leu	CTC	224.00	10.63	0.13
Pro	CCG	84.00	3.99	0.09
Pro	CCA	135.00	6.41	0.15
Pro	CCT	72.00	3.42	0.08
Pro	CCC	626.00	29.71	0.68

Fig. 8B

【図9A】

腸内細菌(高度に発現された) 遺伝子7/17/83のコドン使用

アミノ酸 コドン 数 / 1000 割合

Gly	GGG	13.00	1.89	0.02
Gly	GGA	3.00	0.44	0.00
Gly	GGU	365.00	52.99	0.59
Gly	GGC	238.00	34.55	0.38
Glu	GAG	108.00	15.68	0.22
Glu	GAA	394.00	57.20	0.78
Asp	GAU	149.00	21.63	0.33
Asp	GAC	298.00	43.26	0.67
Val	GUG	93.00	13.50	0.16
Val	GUA	146.00	21.20	0.26
Val	GUU	289.00	41.96	0.51
Val	GUC	38.00	5.52	0.07
Ala	GCG	161.00	23.37	0.26
Ala	GCA	173.00	25.12	0.28
Ala	GCU	212.00	30.78	0.35
Ala	GCC	62.00	9.00	0.10
Arg	AGG	1.00	0.15	0.00
Arg	AGA	0.00	0.00	0.00
Ser	AGU	9.00	1.31	0.03
Ser	AGC	71.00	10.31	0.20
Lys	AAG	111.00	16.11	0.26
Lys	AAA	320.00	46.46	0.74
Asn	AAU	19.00	2.76	0.06
Asn	AAC	274.00	39.78	0.94
Met	AUG	170.00	24.68	1.00
Ile	AUA	1.00	0.15	0.00
Ile	AUU	70.00	10.16	0.17
Ile	AUC	345.00	50.09	0.83
Thr	ACG	25.00	3.63	0.07
Thr	ACA	14.00	2.03	0.04
Thr	ACU	130.00	18.67	0.35

Fig. 9A

【図9B】

アミノ配	コドン	数	/1000	割合
Thr	ACC	206.00	29.91	0.55
Trp	UGG	55.00	7.98	1.00
End	UGA	0.00	0.00	0.00
Cys	UGU	22.00	3.19	0.49
Cys	UGC	23.00	3.34	0.51
End	UAG	0.00	0.00	0.00
End	UAA	0.00	0.00	0.00
Tyr	UAU	51.00	7.40	0.25
Tyr	UAC	157.00	22.79	0.75
Leu	UUG	18.00	2.61	0.03
Leu	UUA	12.00	1.74	0.02
Phe	UUU	51.00	7.40	0.24
Phe	UUC	166.00	24.10	0.76
Ser	UCG	14.00	2.03	0.04
Ser	UCA	7.00	1.02	0.02
Ser	UCU	120.00	17.42	0.34
Ser	UCC	131.00	19.02	0.37
Arg	CGG	1.00	0.15	0.00
Arg	CGA	2.00	0.29	0.01
Arg	CGU	290.00	42.10	0.74
Arg	CGC	96.00	13.94	0.25
Gln	CAG	233.00	33.83	0.86
Gln	CAA	37.00	5.37	0.14
His	CAU	18.00	2.61	0.17
His	CAC	85.00	12.34	0.83
Leu	CUG	480.00	69.69	0.83
Leu	CUA	2.00	0.29	0.00
Leu	CUU	25.00	3.63	0.04
Leu	CUC	38.00	5.52	0.07
Pro	CCG	190.00	27.58	0.77
Pro	CCA	36.00	5.23	0.15
Pro	CCU	19.00	2.76	0.08
Pro	CCC	1.00	0.15	0.00

Fig. 9B

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		In ternational Application No PCT/US 00/31745
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/50 C12N5/10 C07K16/22 A61K38/18		
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 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, WPI Data, PAJ, STRAND		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL SEQUENCE LIBRARY 'Online! 16 June 1999 (1999-06-16) CARNINCI, P., ET AL. : XP002165897 accession no. AV050323	41-44, 46,52, 54-56
X	DATABASE EMBL SEQUENCE LIBRARY 'Online! 27 August 1997 (1997-08-27) KODA, Y., ET AL. : "changing transcription start sites in H-type alpha (1,2) fucosyltransferase gene (FUT1) during differentiation of the human erythroid lineage" XP002165898 accession no. AB006136	1-4,6, 12,14-18

	-/--	
<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 24 April 2001		Date of mailing of the international search report 10/05/2001
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. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Holtorf, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/US 00/31745

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 27100 A (GENENTECH INC ;BOTSTEIN DAVID (US); GODDARD AUDREY (US); GURNEY AU) 3 June 1999 (1999-06-03) the whole document ---	
P,X	NISHIMURA T ET AL: "IDENTIFICATION OF A NOVEL FGF, FGF-21, PREFERENTIALLY EXPRESSED IN THE LIVER" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA,AMSTERDAM,NL, vol. 1492, no. 1, 21 June 2000 (2000-06-21), pages 203-206, XP000979068 ISSN: 0006-3002 the whole document ---	1-6,12, 14-18, 41-44, 46,52, 54-56
P,X, L	WO 00 54813 A (DWARKI VARAVANI J ;RENDAHL KATHERINE (US); CHIRON CORP (US); MCGEE) 21 September 2000 (2000-09-21) the whole document ---	41-44, 46-52, 54-59
E	WO 01 18210 A (GENENTECH INC) 15 March 2001 (2001-03-15) the whole document ---	1-4, 6-12, 14-18
E	WO 01 18209 A (BURGESS CATHERINE ;QUINN KERRY E (US); RASTELLI LUCA (US); VERNET) 15 March 2001 (2001-03-15) the whole document -----	2-4, 15-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/31745

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9927100 A	03-06-1999	US 6000943 A	14-12-1999
		AU 1703399 A	15-06-1999
		AU 9312198 A	05-04-1999
		EP 1032668 A	06-09-2000
		WO 9914327 A	25-03-1999
		WO 9914328 A	25-03-1999
WO 0054813 A	21-09-2000	AU 3755900 A	04-10-2000
WO 0118210 A	15-03-2001	AU 1748200 A	19-06-2000
		AU 1749800 A	04-10-2000
		AU 2399300 A	28-09-2000
		AU 2600800 A	28-09-2000
		AU 3514400 A	28-09-2000
		AU 5816799 A	03-04-2000
		WO 0053753 A	14-09-2000
		WO 0104311 A	18-01-2001
		WO 0053758 A	14-09-2000
		WO 0077037 A	21-12-2000
		WO 0073348 A	07-12-2000
		WO 0032221 A	08-06-2000
		WO 0055319 A	21-09-2000
		WO 0105836 A	25-01-2001
		WO 0053751 A	14-09-2000
		AU 1749900 A	12-07-2000
		AU 2192800 A	12-07-2000
		AU 3381600 A	28-09-2000
		AU 5922999 A	03-04-2000
		WO 0053757 A	14-09-2000
		WO 0073454 A	07-12-2000
		WO 0073452 A	07-12-2000
		WO 0109327 A	08-02-2001
		WO 0116318 A	08-03-2001
		WO 0119987 A	22-03-2001
		WO 0037638 A	29-06-2000
		WO 0037640 A	29-06-2000
		WO 0075316 A	14-12-2000
WO 0118209 A	15-03-2001	NONE	

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 1/16		A 6 1 P 35/00	4 C 0 7 6
15/08		35/02	4 C 0 8 4
35/00		37/02	4 C 0 8 7
35/02		43/00	1 0 1 4 H 0 4 5
37/02			1 0 7
43/00	1 0 1	C 0 7 K 14/50	
	1 0 7	16/22	
C 0 7 K 14/50		C 1 2 N 1/15	
16/22		1/19	
C 1 2 N 1/15		1/21	
1/19		C 1 2 P 21/02	H
1/21		C 1 2 Q 1/68	A
5/10		G 0 1 N 33/15	Z
C 1 2 P 21/02		33/50	Z
C 1 2 Q 1/68		33/53	D
G 0 1 N 33/15			M
33/50		33/566	
33/53		C 1 2 N 15/00	Z N A A
		5/00	A
33/566		A 6 1 K 37/24	

(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, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13
DA14 DA36 FB02
4B024 AA01 BA03 CA04 CA09 DA02
DA06 EA04 GA11 GA18 GA19
HA03 HA14
4B063 QA01 QA12 QA18 QQ02 QQ53
QR32 QR38 QR55 QR80 QR82
QS20 QS25 QS34 QS39 QX02
4B064 AG13 CA02 CA10 CA19 CC24
DA01
4B065 AA26X AA90X AA93Y AB01
AC14 CA24 CA44
4C076 AA53 AA95 CC07 CC09 CC26
CC27 CC29
4C084 AA01 AA02 AA06 AA07 AA13
BA22 CA53 DB54 MA01 NA14
ZA312 ZA752 ZA812 ZB072
ZB222 ZB262 ZB272
4C087 AA01 AA02 BB33 MA01 ZA31
ZA75 ZA81 ZB07 ZB22 ZB26
ZB27
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
CA40 DA76 DA86 EA20 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2003516731A5	公开(公告)日	2007-11-22
申请号	JP2001538519	申请日	2000-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	希龙公司		
申请(专利权)人(译)	Chiron公司 京都大学长		
当前申请(专利权)人(译)	Chiron公司 京都大学长		
[标]发明人	伊藤信行 カバナウダブリューマイケル		
发明人	伊藤 信行 カバナウ, ダブリュー. マイケル		
IPC分类号	C12N15/09 A61K9/48 A61K35/12 A61K48/00 A61P1/16 A61P15/08 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/50 C07K16/22 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 C12N5/10 A61K38/22		
CPC分类号	C07K14/50 A61P1/16 A61P15/08		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K9/48 A61K35/12 A61K48/00 A61P1/16 A61P15/08 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P43/00.101 A61P43/00.107 C07K14/50 C07K16/22 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.H C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A A61K37/24		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045 /FB02 4B024/AA01 4B024/BA03 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA03 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA12 4B063 /QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR38 4B063/QR55 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS20 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02 4B064/AG13 4B064/CA02 4B064 /CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065 /AB01 4B065/AC14 4B065/CA24 4B065/CA44 4C076/AA53 4C076/AA95 4C076/CC07 4C076/CC09 4C076/CC26 4C076/CC27 4C076/CC29 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084 /AA13 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/DB54 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA312 4C084/ZA752 4C084/ZA812 4C084/ZB072 4C084/ZB222 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB33 4C087/MA01 4C087/ZA31 4C087/ZA75 4C087/ZA81 4C087/ZB07 4C087/ZB22 4C087 /ZB26 4C087/ZB27 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/FA74		
优先权	60/166540 1999-11-18 US 60/203633 2000-05-11 US		
其他公开文献	JP2003516731A		

摘要(译)

本发明涉及人成纤维细胞生长因子 (hFGF-21) , 其变体和编码FGF-21的多核苷酸。 本发明还提供了与多核苷酸和蛋白质相关的诊断和治疗剂, 包括探针和抗体, 以及用于治疗诸如肝硬化和癌症的肝脏疾病的方法, 用于治疗与胸腺功能有关的病症的方法, 以及 本发明涉及治疗睾丸疾病的方法。 本发明还涉及小鼠成纤维细胞生长因子 (mFGF-21) , 以及编码mFGF-21的变体和多核苷酸。

