

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4018028号  
(P4018028)

(45) 発行日 平成19年12月5日(2007.12.5)

(24) 登録日 平成19年9月28日(2007.9.28)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	Z N A
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	

請求項の数 22 (全 190 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-125885 (P2003-125885)	(73) 特許権者	503159678
(22) 出願日	平成15年4月30日(2003.4.30)		ケンブリッジ ニューロサイエンス
(62) 分割の表示	特願平6-525593の分割		アメリカ合衆国、02139 マサチュー
原出願日	平成6年5月6日(1994.5.6)		セッツ州、ケンブリッジ、ワン ケンドー
(65) 公開番号	特開2004-43437 (P2004-43437A)		ル スクウェアー、ビルディング 700
(43) 公開日	平成16年2月12日(2004.2.12)		(番地なし)
審査請求日	平成15年4月30日(2003.4.30)	(74) 代理人	100065226
(31) 優先権主張番号	08/059, 022		弁理士 朝日奈 宗太
(32) 優先日	平成5年5月6日(1993.5.6)	(74) 代理人	100098257
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 佐木 啓二
(31) 優先権主張番号	08/209, 204	(72) 発明者	スクラー、ロバート
(32) 優先日	平成6年3月8日(1994.3.8)		アメリカ合衆国、02159 マサチュー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		セッツ州、ニュートン、スパイアーズ ロ
			ード 36

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 筋肉の疾患または障害の治療または予防のための医薬品

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

筋細胞上の受容体と結合するかまたは筋細胞の第2のメッセンジャーシステムを活性化するポリペプチドまたは化合物を含有してなる、筋細胞の分裂促進、成長、分化または生存を誘導することによって筋組織の疾患または障害を治療または予防するための医薬品であって、該ポリペプチドまたは化合物が、

- a) 配列番号133または159に記載される核酸配列によってコードされるE配列からなるポリペプチド；
- b) 配列番号132に記載される核酸配列によってコードされるF配列からなるポリペプチド；
- c) 式



(式中、Y B A Z C Xは図30に示されるポリペプチドセグメント(配列番号133~135、137~143、146、156および159)から構成され、式中、YはポリペプチドセグメントE(配列番号133および159)からなるかまたは存在せず、式中、ZはポリペプチドセグメントG(配列番号137)からなるかまたは存在せず、そして式中、XはポリペプチドセグメントC/D H K L、C/D H、C/D H L、C/D D、C/D H L、C/D H K L、C/D H、C/D D、C/D C/D H K L、C/D C/D H、C/D C/D H L、C/D C/D D、C/D D H、C/D D H L、C/D D H K L、C/D D H、

C/D D HL、C/D D HKL、C/D C/D D H、C/D  
C/D D HL、またはC/D C/D D HKLからなる；ここで、前  
記ポリペプチドセグメントは、Aが配列番号135、Bが配列番号134、Cが配列番号  
156、C/Dが配列番号138、C/D が配列番号139、Dが配列番号140、D  
が配列番号141、Hが配列番号146、Kが配列番号142、Lが配列番号143で  
示される)によって定義されるポリペプチド；

d) 式

W B A Z C X

(式中、W B A Z C Xは図30に示されるポリペプチドセグメント(配列番号132、1  
34、135、137~143、146および156)から構成され、式中、Wはポリペ  
プチドセグメントF(配列番号132)からなるかまたは存在せず、式中、Zはポリペ  
プチドセグメントG(配列番号137)からなるかまたは存在せず、そして式中、Xはポリ  
ペプチドセグメントC/D HKL、C/D H、C/D HL、C/D D、C/D  
HL、C/D HKL、C/D H、C/D D、C/D C/D HKL、  
C/D C/D H、C/D C/D HL、C/D C/D D、C/D D  
H、C/D D HL、C/D D HKL、C/D D H、C/D D  
HL、C/D D HKL、C/D C/D D H、C/D C/D  
D HL、またはC/D C/D D HKLからなる；ここで、前記ポリペプチ  
ドセグメントは、Aが配列番号135、Bが配列番号134、Cが配列番号156、C/  
Dが配列番号138、C/D が配列番号139、Dが配列番号140、D が配列番号  
141、Hが配列番号146、Kが配列番号142、Lが配列番号143で示される)に  
よって定義されるポリペプチド；

e) 筋細胞のp185<sup>erbB2</sup>受容体と特異的に結合する化合物；

f) 上皮成長因子様(EGF-様)ドメインからなるポリペプチドであって、該上皮成長  
因子様ドメインが

- i) 配列番号150(EGFL1)；
- ii) 配列番号151(EGFL2)；
- iii) 配列番号152(EGFL3)；
- iv) 配列番号153(EGFL4)；
- v) 配列番号154(EGFL5)；および
- vi) 配列番号155(EGFL6)；

からなる群から選択される核酸配列によってコードされるアミノ酸配列からなるポリペ  
チド；

g)

i) ラットI-EJ形質転換された線維芽細胞系から単離された35kDポリペプチド  
因子；

ii) SKBR-3 ヒト胸部細胞系から単離された75kDポリペプチド因子；

iii) ラットI-EJ形質転換された線維芽細胞系から単離された44kDポリペプ  
チド因子；

iv) MDA-MB231 ヒト胸部細胞系から単離された45kDポリペプチド因子；

v) ATL-2ヒトT細胞系から単離された7~14kDポリペプチド因子；

vi) 活性化されたマウス腹腔マクロファージから単離された25kDポリペプチド因子

；

vii) ウシ腎臓から単離された25kDポリペプチド因子；

viii) ARIAポリペプチド；および

ix) 0~2A前グリア細胞を刺激する46~47kDポリペプチド因子

からなる群から選択されるポリペプチド；および

h) GGF-IIIからなるポリペプチド；

からなる群から選択される医薬品。

【請求項2】

10

20

30

40

50

前記ポリペプチドが配列番号133または159に記載される核酸配列によってコードされるE配列からなる請求項1記載の医薬品。

【請求項3】

前記ポリペプチドが配列番号132に記載される核酸配列によってコードされるF配列からなる請求項1記載の医薬品。

【請求項4】

前記ポリペプチドが、式



(式中、YBAZCXは図30に示されるポリペプチドセグメント(配列番号132~143、156、157、159)から構成され、式中、YはポリペプチドセグメントEからなるかまたは存在せず、式中、ZはポリペプチドセグメントGからなるかまたは存在せず、そして式中、XはポリペプチドセグメントC/D HKL、C/D H、C/D HL、C/D D、C/D HL、C/D HKL、C/D H、C/D D、C/D C/D HKL、C/D C/D H、C/D C/D HL、C/D C/D D、C/D D H、C/D D HL、C/D D HKL、C/D D H、C/D C/D D HL、またはC/D C/D D HKLからなる)によって定義されるポリペプチドからなる請求項1記載の医薬品。

10

【請求項5】

前記ポリペプチドが、式



(式中、WBAZCXは図30に示されるポリペプチドセグメント(配列番号132~143、156、157、159)から構成され、式中、WはポリペプチドセグメントFからなるかまたは存在せず、式中、ZはポリペプチドセグメントGからなるかまたは存在せず、そして式中、XはポリペプチドセグメントC/D HKL、C/D H、C/D HL、C/D D、C/D HL、C/D HKL、C/D H、C/D D、C/D C/D HKL、C/D C/D H、C/D C/D HL、C/D C/D D、C/D D H、C/D D HL、C/D D HKL、C/D D H、C/D C/D D HL、またはC/D C/D D HKLからなる)によって定義されるポリペプチドからなる請求項1記載の医薬品。

20

30

【請求項6】

前記化合物が筋細胞のp185<sup>erbB2</sup>受容体と特異的に結合する化合物からなる請求項1記載の医薬品。

【請求項7】

前記ポリペプチドが上皮成長因子様(EGF-様)ドメインからなる医薬品であって、該上皮成長因子様ドメインが

- i) 配列番号150(EGFL1);
- ii) 配列番号151(EGFL2);
- iii) 配列番号152(EGFL3);
- iv) 配列番号153(EGFL4);
- v) 配列番号154(EGFL5);および
- vi) 配列番号155(EGFL6);

40

からなる群から選択される核酸配列によってコードされるアミノ酸配列からなる請求項1記載の医薬品。

【請求項8】

前記ポリペプチドが

- i) ラットI-EJ形質転換された線維芽細胞系から単離された35kDポリペプチド因子;
- ii) SKBR-3 ヒト胸部細胞系から単離された75kDポリペプチド因子;

50

- iii) ラット I - E J 形質転換された線維芽細胞系から単離された 44 kD ポリペプチド因子;
- iv) MDA - MB 231 ヒト胸部細胞系から単離された 45 kD ポリペプチド因子;
- v) ATL - 2 ヒト T 細胞系から単離された 7 ~ 14 kD ポリペプチド因子;
- vi) 活性化されたマウス腹腔マクロファージから単離された 25 kD ポリペプチド因子;
- vii) ウシ腎臓から単離された 25 kD ポリペプチド因子;
- viii) ARIA ポリペプチド; および
- ix) 0 ~ 2 A 前グリア細胞を刺激する 46 ~ 47 kD ポリペプチド因子
- からなる群から選択されるポリペプチドからなる請求項 1 記載の医薬品。

10

## 【請求項 9】

前記ポリペプチドが GGF - III からなる請求項 1 記載の医薬品。

## 【請求項 10】

前記 E 配列からなるポリペプチドが配列番号 185 からなる請求項 1 記載の医薬品。

## 【請求項 11】

50 N - 末端アミノ酸が、前記 E 配列からなる前記ペプチドから開裂される請求項 1 または 2 記載の医薬品。

## 【請求項 12】

前記 F 配列からなるポリペプチドが、図 30 に示されるアミノ酸配列 (配列番号 132、134、135) を有する FBA ポリペプチドセグメント、図 30 に示されるアミノ酸配列 (配列番号 132、134、136) を有する FBA ポリペプチドセグメント、図 30 に示されるアミノ酸配列 (配列番号 132、135、159) を有する FEBA ポリペプチドセグメント、または図 30 に示されるポリペプチドセグメントに対応するアミノ酸配列 (配列番号 132 ~ 134、136、159) を有する FEBA ポリペプチドセグメントからなる請求項 1 記載の医薬品。

20

## 【請求項 13】

前記ポリペプチドが組換えヒト GGF 2 である請求項 2 記載の医薬品。

## 【請求項 14】

前記ポリペプチドが発現可能な遺伝子構造にある DNA 配列によってコードされる請求項 1、2、3、4、5、7、8、9、10、11、12 または 13 記載の医薬品。

30

## 【請求項 15】

前記治療または予防がホ乳動物の筋組織の病理学的コンディションの治療または予防であって、該コンディションが前記ポリペプチドまたは化合物、もしくは該ポリペプチドをコードする DNA に対して感受性であるかまたは反応性である筋細胞タイプを含む請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 または 14 記載の医薬品。

## 【請求項 16】

前記治療または予防がホ乳動物の筋ダメージを含むコンディションの治療または予防である請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 または 14 記載の医薬品。

40

## 【請求項 17】

前記治療または予防が前記筋細胞の萎縮を減少させるためのものである請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 または 14 記載の医薬品。

## 【請求項 18】

前記治療または予防が前記ホ乳動物に存在する筋繊維を増加させるためのものである請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 または 14 記載の医薬品。

## 【請求項 19】

前記治療または予防が前記ホ乳動物での筋再生を増進させるためのものである請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 または 14 記載の医薬品。

50

## 【請求項 20】

前記治療が神経親和性因子を欠く患者を治療するためのものである請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14記載の医薬品。

## 【請求項 21】

筋細胞増殖の疾患または障害の治療または予防のための医薬品であって、請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14に定義されたポリペプチドまたは化合物と結合する抗体を含有してなる医薬品。

## 【請求項 22】

前記治療または予防がヒトの治療または予防である請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20または21記載の医薬品。 10

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、脊椎動物種において見出された、筋細胞のための成長、分化および生存因子であるポリペプチドを投与することによる、筋組織の疾患および障害の予防的または肯定的 (affirmative) 治療法に関する。

## 【0002】

## 【従来の技術および発明が解決しようとする課題】

成長した (adult) 脊椎動物における筋組織は付随細胞 (satellite cells) と呼ばれる予備の筋芽細胞から再生するであろう。付随細胞は筋組織全体に分布しており、損傷または疾患がなければ有糸分裂的に静止している。筋肉損傷ののち、または疾患からの回復の間に、付随細胞は細胞周期に再び入り、増殖して 1) 既存の筋線維に入るか、2) 新しい筋線維を形成する多角性筋管に分化するであろう。筋芽細胞は最終的に既存の筋線維に置きかわる筋線維を生じるか既存の筋線維と融合し、これによって収縮装置成分の合成による線維帯径 (girth) が増す。この過程は、たとえば誘導された筋線維変性 (degradation) に続く哺乳動物において起こるほぼ完全な再生によって例証される；前筋細胞 (muscle progenitor cells) は増殖し再生する筋線維とともに融合する。 20

## 【0003】

成長した (および未成長の (embryonic)) 筋芽細胞のインビトロの増殖および分化を制御するいくつかの成長因子が同定されている。線維芽細胞成長因子 (FGF) は筋細胞に対して分裂促進性 (mitogenic) であり、筋肉分化の阻害剤である。トランフォーミング成長因子 (TGF) は筋芽細胞の増殖には効果がないが、筋肉分化の阻害剤である。インスリン様成長因子類 (IGFs) は齧歯動物における筋芽細胞の増殖および分化の両方を刺激することが示されている。血小板由来成長因子 (PDGF) もまた筋芽細胞に対して分裂促進性であり、筋細胞の分化の有力な阻害剤である (参照: Florini および Magri, 1989:256:C701~C711)。 30

## 【0004】

脊椎動物種において筋組織およびニューロンのいずれもが筋芽細胞の増殖および分化を刺激する因子の有力なソースである。起源が神経系 (すなわち、神経原性) である神経筋システムを冒す疾患において、冒された神経が分布する (innervate) 筋組織は麻痺し進行性で衰える。末梢神経の再生と神経学およびミオパシー性 (myopathic) の疾患からの回復の間に、ニューロンは前記の筋肉の再生を誘い出す成長因子のソースを提供するかもしれない、衰弱と萎縮からの筋肉の修復のメカニズムを提供しうる。 40

## 【0005】

最近記載された成長因子のファミリー、ニューレグリン (neuregulin) 類は駆動ニューロン (motor neurons) (Marchionni ら、Nature 362:313, 1993) および炎症性細胞 (Tarakhovskiy ら、Oncogene 6:2187-2196(1991)) によって合成される。ニューレグリン類および関連の p185<sup>erbB2</sup> 結合因子は精製され、クローン化され、発現されている (Benveniste ら、PNAS 82:3930-3934, 1985; Kimura ら、Nature 348:257-260, 1990; Davis および Stro 50

obant, J. Cell. Biol. 110: 1353-1360, 1990; Wenら、Cell 69:559, 1992; YardenおよびUllrich、Ann. Rev. Biochem. 57:443, 1988; Holmesら、Science 256:1205, 1992; Dobashiら、Proc. Natl. Acad. Sci. 88:8582, 1991; Lupuら、Proc. Natl. Acad. Sci. 89:2287, 1992)。組換えニューレグリン類は末梢グリアに対して分裂促進性であることが示され (Marchionniら、Nature 362:313, 1993)、神経筋接合 (junction) の形成に影響を与えることが示されている (Fallsら、Cell 72:801, 1993)。したがって再生するニューロンと神経原性疾患および神経損傷からの修復に関係する炎症性細胞により駆動ニューロン (motor neurons) の再ミエリン化 (remyelination) およびそれらのターゲットとの適当な連結 (connection) を形成する能力を調整する因子のソースを提供する。筋肉が再度分布した (reinnervated) のち、駆動ニューロンは筋肉の成長および生存を刺激する、筋肉に対する因子を提供するかもしれない。

10

## 【0006】

現在、筋肉の分化および生存を促進する有用な治療法はない。このような治療法は色々な神経性および筋肉の疾患および障害の治療に有用であろう。

## 【0007】

## 【課題を解決するための手段および発明の実施の形態】

我々は筋細胞の増大された分裂促進分化および生存が、グリア成長因子、活性を誘導するアセチルコリン受容体 (A R I A)、ヘレグリン (heregulin) 類、ニュー分化因子 (neuro differentiation factor) およびより一般的なニューレグリン類などの前記したタンパク質を用いて達成されうることを発見した。我々はこれらの化合物が筋細胞の増殖および筋管の分化と生存の両方を誘導しうることを発見した。これらの現象は骨格筋組織に加えて心臓組織および平滑筋組織において起こりうる。したがって、先の化合物、これらの化合物の合成を誘導する制御化合物および筋肉上の受容体に結合することによってまたはリガンド-受容体複合体によって活性化される第2のメッセンジャーシステムをほかの手段によって刺激することによりこれらの化合物をまねる小さな分子は、すべて筋肉疾患のための予防的または肯定的治療法として極めて有用である。

20

## 【0008】

本発明の新規な観点は筋細胞の分裂促進、生存、成長および分化を誘導する成長因子として先に挙げたタンパク質の使用を包含する。これらの効果を達成するための筋細胞の治療はここに記載されたポリペプチドに筋細胞を接触させることによって達成されうる。治療は正味の筋肉の損失を遅らせるまたは停止する、ないしは脊椎動物中にプレウエント (prewent) な筋肉の量または質を増大するために提供されうる。

30

## 【0009】

これらの因子は、脊椎動物に有効量のポリペプチドまたは関連化合物を投与することにより脊椎動物 (好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒト) において筋細胞の分裂促進、分化、および生存を生じるために用いうる。筋肉に対するニューレグリンの効果は、たとえばミオシンの重鎖の緩徐なおよび早いアイソフォームなどの収縮装置の特別のアイソフォームの合成を誘導することによって筋肉のパフォーマンスにおける増加を引き起こすことにより、これに限定されないがジストロフィン (dystrophin) などの保護分子の合成を誘導することによって筋繊維の生存を促進することにより; および/またはたとえば神経筋接合でアセチルコリン受容体分子を増加することによって筋肉への神経の分布 (innervation) を増大することにより発生しうる。

40

## 【0010】

ここで用いられる筋細胞という用語は筋組織に寄与するいかなる細胞をも意味する。菌筋細胞、付随細胞、筋管、および筋原線維組織はすべて「筋細胞」という用語に包含され、すべて本発明の方法を用いて治療されうる。筋細胞効果は骨格筋、心筋および平滑筋に誘導されうる。

## 【0011】

分裂促進は骨格筋、平滑筋または心筋の、筋芽細胞または付随細胞を包含する筋細胞に誘導されうる。ここで用いられる分裂促進とは患者の新しい筋細胞の産生が結果としておこ

50

るいかなる細胞分裂をも意味する。さらに詳しくは、インビトロの分裂促進は2つの倍加時間と等しい時間、標識試薬に細胞がさらされると、処理されていない細胞の50%、より好ましくは100%、もっとも好ましくは300%と比較した分裂指数における増加として定義される。分裂指数はS期(すなわち、BrdU)の間にのみ取込まれるトレーサーの存在において成長するとき、標識された核をもつ培養物中の細胞の分数(fraction)であり倍加時間は培養物中の細胞数が2倍に増加するのに必要な平均時間として定義される。

#### 【0012】

インビボの分裂促進に対する効果は、S期(すなわち、BrdU)の間にのみ取込まれるトレーサーにさらされた哺乳動物の筋組織における標識された付随細胞の外観により測定されるような付随細胞活性化における増加として定義される。有用な治療薬において、哺乳動物が15分間よりも長い期間標識試薬にさらされ、治療用量の分裂促進剤を投与したのち10時間から24時間の間に組織をアッセイするばあい、コントロールの哺乳動物と比較して少なくとも10%、より好ましくは少なくとも50%およびもっとも好ましくは200%よりも多く付随細胞の活性化を増大する化合物としてインビボで定義される。または、インビボの付随細胞活性化は免疫学的またはRNA分析方法によって中間体のフィラメントビメンチン(filament vimentin)の外観をモニターすることによって検出する。ビメンチンがアッセイされるとき、有用な分裂促進剤は治療上有用な投薬用量が与えられたばあい筋組織におけるビメンチンの検出可能なレベルの発現を引き起こすものとして定義される。

10

20

#### 【0013】

ここで用いる筋発生は筋管を生じる筋芽細胞のいかなる融合をも意味する。もっとも好ましくは筋発生に対する効果は筋芽細胞の融合および筋肉の分化プログラムの実施可能性における増大として定義される。有用な筋原性治療薬はインビトロの融合指数におけるいずれかの増加を授与する化合物として定義される。さらに好ましくは、化合物はコントロールと比較して融合指数における少なくとも2.0倍の増加を授与し、もっとも好ましくは、化合物は3倍またはそれより大きい増加を授与する。融合指数は培養物中に存在する核の総数と比較した培養物中の多核化された細胞(multinucleated cells)に存在する核の分数として定義される。先によって与えられた割合は筋原性化合物に6日間さらされたのちにアッセイした細胞についてであり処理されていないコントロールと比較する。筋発生はまた筋管における面積あたりの核数をアッセイすることによりまたはウエスタン分析による筋肉に特異的なタンパク質のレベルを測定することによっても決定する。好ましくは、化合物はたとえばここで与えられたアッセイを用いて筋管の密度において少なくとも2.0倍の増加を授与し、もっとも好ましくは化合物は3倍またはそれより多くの増加を授与する。

30

#### 【0014】

筋肉の成長は線維サイズにおける増大および/または線維の数の増加によって生じる。ここで用いる筋肉の成長とはA)湿重量における増加、B)タンパク質含有量の増加、C)筋線維数の増加、またはD)筋線維の直径における増加によって測定する。筋線維の成長における増加は断面のエリプシス(ellipsis)のマイナーな軸として定義されるとき直径における増加として定義することができる。有用な治療薬として同様に処理されたコントロール動物(すなわち、筋肉成長化合物で処理されていない変性した筋組織を持つ動物)と比較して、筋肉がすでに少なくとも10%変性している動物の10%またはそれよりも多く、より好ましくは50%よりも多く、もっとも好ましくは100%よりも多く、湿重量、タンパク質含有量および/または直径を増大するものである。筋線維の数を増加することにより成長を増大する化合物は、少なくとも1%、より好ましくは少なくとも20%、およびもっとも好ましくは少なくとも50%病んだ組織における線維の数を増加するばあい治療薬として有用である。これらの百分率は化合物が投与され局所的に作用するときの比較する処理されておらず病んでいない哺乳動物におけるまたは対側性(contralateral)の病んでいない筋肉におけるベースレベルと比較して決定される。

40

50

## 【0015】

ここで用いられる筋線維の生存とは壊疽またはアポトーシス (apoptosis) によって証明されるような筋線維の損失の防止 (prevention) または筋線維の損失のほかのメカニズムの防止を意味する。ここで用いられる生存とは処理されていないコントロールと比較して少なくとも10%、より好ましくは少なくとも50%、およびもっとも好ましくは少なくとも300%の細胞死の割合 (rate) における減少を示す。生存の割合は、細胞が分化8日後 (すなわち培地を20%から0.5%血清のものに変えて8日後) に培養物中の死んだ細胞に特異的な染料 (たとえばプロピジウムイオダイドなど) で染色されうる細胞をカウントすることにより測定しうる。

## 【0016】

ここで用いられる筋肉の再生とはそれにより前筋細胞から新しい筋線維を形成する過程を意味する。再生に有用な治療薬は前記のように、少なくとも1%、より好ましくは少なくとも20%、およびもっとも好ましくは少なくとも50%の新しい線維の数における増加を意味する。

## 【0017】

ここで用いられる筋細胞の分化とはたとえば収縮装置などの筋線維の成分 (筋原線維) を特定する筋の発達プログラムの誘導を意味する。分化に有用な治療薬は同様に処理されたコントロール動物における等価な組織と比較して少なくとも10%またはそれより多く、より好ましくは50%またはそれより多く、およびもっとも好ましくは100%よりも多く病んだ組織における筋線維のいずれかの成分の量を増加する。

## 【0018】

ここで用いられる筋肉の萎縮とは筋線維帯径における重大な損失を意味する。重大な萎縮によって病んでいない、損傷されていないまたは正常に利用される組織と比較して少なくとも10%の病んだ損傷されているまたは用いられていない筋組織における筋線維の直径の減少が意味される。

## 【0019】

ここに記載されたポリペプチドまたはほかの化合物を用いる疾患または障害の治療方法もまた本発明の一部である。治療されうる筋障害の例にはたとえばミオパシー、ジストロフィー、神経筋の伝導性疾患 (myoneural conductive diseases)、外傷性筋損傷、および神経損傷などの骨格筋疾患および障害が含まれる。たとえば心筋症、虚血性のダメージ、先天性疾患、および外傷性損傷などの心筋病理も、たとえば動脈硬化、血管病変、および先天性血管疾患などの平滑筋疾患および障害が治療されうるように、本発明の方法を用いて治療されうる。たとえば、デュシェーヌ型筋ジストロフィー、ベッカー型ジストロフィー、および重症筋無力症はしかし本発明の方法を用いて治療されうる3種の疾患である。

## 【0020】

また本発明はたとえば横紋筋肉種などの筋細胞起源の腫瘍の予防または治療のための方法を包含する。これらの方法はここに記載された1つまたはそれより多くのポリペプチドの結合を阻害し、腫瘍に寄与する細胞の増殖を阻害する物質を有効量で投与することを包含する。

## 【0021】

本発明の方法はまた神経親和性因子の欠除によって引き起こされる疾患にかかった患者を治療するためにも用いうる。神経親和性因子の欠除によって意味されることは神経筋接合および/または筋肉強度における検出しうる減少を生じるに足る影響を受けない個体と比較して神経親和性因子の減少した量である。神経親和因子は影響を受けない個体に認められるものよりも10%より低いレベルで存在しうる。より好ましくは、前記因子は影響を受けない個体にみとめられるものよりも20%低いレベルで存在し、もっとも好ましくは同様の状況下で影響を受けない個体と比較して80%レベルが下げられる。

## 【0022】

本発明の方法はニューレグリンタンパク質が同じ遺伝子によってコードされるという事実を利用する。メッセンジャーRNAスプライシング変異体 (およびそれらの結果として生

10

20

30

40

50

じるタンパク質の変種)はこの遺伝子に由来しこれらの産物の多くはp 185<sup>ergB2</sup>への結合およびその活性化を示す。この遺伝子の産物は筋細胞分裂促進活性(以下の実施例1および2参照)、分化(実施例3および6)、および生存(実施例4および5)を示すために用いられている。本発明は筋細胞分裂促進剤、分化因子、および生存因子のような記載された活性をもつニューレグリン遺伝子の既知の産物(ここおよび先に挙げた文献に記載された)のすべてに対する使用を提供する。もっとも好ましくは組換えヒトGGF2(rhGGF2)はこれらの方法に用いられる。

#### 【0023】

本発明はまたほかのまだ天然には単離されていない、ニューレグリン遺伝子のスプライシング変異体の使用に関する。図29はスプライシングの既知のパターンを示す。これらのパターンはポリメラーゼチェーン反応実験(polymerase chain reaction experiments)(逆転写されたRNAについて)、cDNAクローン(その中で表わされたような)の分析、およびニューレグリン類をコードする公開された配列の分析(Pelesら、Cell 69:205(1992)およびWenら、Cell 69:559(1992))に由来する。ここに開示された追加のパターンと同様に、これらのパターンは存在する考えられるスプライシング変異体を表わす。スプライシング変異体は、ここにリファレンスにより組込まれる1993年3月24日に出願された、US 08/036,555、Goodearlらに十分に記載される。

#### 【0024】

さらに詳しくは、筋細胞の細胞分裂、生存、分化および増殖は、式

WBAZCX

(式中、WBAZCXは図30で示されるポリペプチドセグメント(配列番号132、134、135、137~139、156)から構成され、式中、WはポリペプチドセグメントFからなるかまたは存在せず、式中、ZはポリペプチドセグメントGからなるかまたは存在せず、そして式中、XはポリペプチドセグメントC/D HKL、C/D H、C/D HL、C/D D、C/D HL、C/D HKL、C/D H、C/D D、C/D C/D HKL、C/D C/D H、C/D C/D HL、C/D C/D D、C/D D H、C/D D HL、C/D D HKL、C/D D H、C/D D HL、C/D D HKL、C/D C/D D H、C/D C/D D HL、またはC/D C/D D HKLからなる)によって定義されるポリペプチドと筋細胞とを接触させること、および(または)式

YBAZCX

(式中、YBAZCXは図30で示されるポリペプチドセグメント(配列番号133~135、156、159)から構成され、式中、YはポリペプチドセグメントEからなるかまたは存在せず、式中、ZはポリペプチドセグメントGからなるかまたは存在せず、そして式中、XはポリペプチドセグメントC/D HKL、C/D H、C/D HL、C/D D、C/D HL、C/D HKL、C/D H、C/D D、C/D C/D HKL、C/D C/D H、C/D C/D HL、C/D C/D D、C/D D H、C/D D HL、C/D D HKL、C/D D H、C/D D HL、C/D D HKL、C/D C/D D H、C/D C/D D HL、またはC/D C/D D HKLからなる)によって定義されるポリペプチドと筋細胞とを接触させることによって達成される。

#### 【0025】

一般に、前記ポリペプチドのN-末端はFまたはEポリペプチドセグメントメントではじまる。Fポリペプチドが存在するときタンパク質の成熟(maturation)により開裂し成熟したポリペプチドを生じうる。E配列が存在するときN末端のシグナル配列を表わすはじめの50アミノ酸がポリペプチドからなくなりうる。

#### 【0026】

さらに、本発明は、リファレンスによりここに組込まれる、1992年8月17日に出願された米国特許出願SN 07/931,041の

10

20

30

40

50

- MDA - MB 2 3 1 ヒト胸部細胞系 (human breast cell line) から単離された 3 0 k D のポリペプチド因子、または
- グリア細胞に対する形質転換されたラット、I - E J 線維芽細胞系から単離された 3 5 k D のポリペプチド因子、または
- S K B R - 3 ヒト胸部細胞系から単離された 7 5 k D のポリペプチド因子、または
- ラット I - E J 形質転換された線維芽細胞系から単離された 4 4 k D のポリペプチド因子、または
- 活性化されたマウス腹膜マクロファージから単離された 2 5 k D のポリペプチド因子、または
- MDA - MB 2 3 1 ヒト胸部細胞から単離された 4 5 k D のポリペプチド因子、または
- グリア細胞に対する A T L - 2 ヒト T 細胞系から単離された 7 ~ 1 4 k D のポリペプチド因子、または
- ウシ腎臓細胞から単離された 2 5 k D のポリペプチド因子、または
- 脳から単離された 4 2 k D A R I A ポリペプチド因子； 0 ~ 2 A の前グリア細胞 (glial progenitor cells) を刺激する 4 6 ~ 4 7 k D のポリペプチド因子；または
- 4 3 ~ 4 5 k D のポリペプチド因子、G G F I I I、1 7 5 の筋細胞への適用により筋細胞を治療する方法を包含する。

【 0 0 2 7 】

本発明はさらに、インビボおよびインビトロの筋細胞の治療に、E G F L 1、E G F L 2、E G F L 3、E G F L 4、E G F L 5、および E G F L 6 ポリペプチド、図 3 7 から 4 2 および配列番号 1 5 0 から 1 5 5 をそれぞれ用いる方法を包含する。

【 0 0 2 8 】

また本発明には筋細胞の治療のための図 4 4 に示される配列の G G F 2 ポリペプチドの投与が包含される。

【 0 0 2 9 】

本発明の追加の重要な観点は、

( a ) 約 3 0 k D から約 3 6 k D の分子量で、および 1 つまたはそれより多くの以下のペプチド配列をそのアミノ酸配列中に含む、胎児ウシ血漿の存在下、グリア細胞分裂促進活性をもつことも知られているベーシックなポリペプチド因子：

FKGDAHTE (配列番号：1)

ASLADEYEYMXK (配列番号：2)

TETSSSGLXLK (配列番号：3)

ASLADEYEYMRK (配列番号：7)

AGYFAEXAR (配列番号：11)

TTEMASEQGA (配列番号：13)

AKEALAALK (配列番号：14)

FVLQAKK (配列番号：15)

ETQPDPGQILKKVPMVIGAYT  
(配列番号：165)

EYKCLKFKWFKKATVM  
(配列番号：17)

EXKFYVP (配列番号：19)

KLEFLXAK (配列番号：32) ; および

10

20

30

40

50

(b) 約55 kDから約63 kDの分子量をもち、1つまたはそれより多くの以下のペプチド配列をそのアミノ酸配列中に含む、胎児ウシ血漿の存在下グリア細胞分裂促進を刺激することも知られている筋細胞を治療するのに用いられるベーシックなポリペプチド因子：

VHQVWAAK (配列番号：33)

YIFFMEPEAXSSG (配列番号：34)

LGAWGPPAFPVXY (配列番号：35)

WFVVIEGK (配列番号：36)

ASPVSVGQELQR

(配列番号：37)

VCLLTVAALPPT (配列番号：38)

KVHQVWAAK (配列番号：48)

KASLADSGEYMXK (配列番号：49)

DLLLXV (配列番号：39)

10

を用いる筋細胞の治療方法である。

20

【0030】

より小さな分子量のポリペプチド因子に、およびより大きな分子量のポリペプチド因子に由来する、前記したペプチド配列の使用のための方法はまた本発明の観点である。前記ペプチドに対するモノクローナル抗体はそれ自体有用な研究道具および治療薬である。

【0031】

したがって、本発明はさらに筋細胞を治療するのに有用な活性をもち、

(a) それぞれ図27A、27Bまたは27C、配列番号129～131のいずれか1つに示されるDNA配列；

(b) 図21、配列番号85に示されるDNA配列；

(c) 図27A、配列番号129に示される配列のヌクレオチド281～557によって示されるDNA配列；または

(d) (a)、(b)または(c)によるDNA配列のいずれか1つとハイブリダイズするDNA配列

30

によってコードされるアミノ酸配列を含むポリペプチド因子を用いる方法を含む。

【0032】

筋細胞分裂促進剤としての以下の因子：

(a) ウシ脳下垂体材料からえられたばあい、還元コンディションであってもなくても、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で約30 kDから約36 kDのみかけ上の(observed)分子量をもち、筋細胞の分裂を刺激することを含む筋細胞分裂促進活性をもち、逆相HPLCを用いて単離されたばあい4で0.1%トリフルオロ酢酸における10週間のインキュベーションののち該活性の少なくとも50%を保つベーシックなポリペプチド因子；および

40

(b) ウシ脳下垂体材料からえられたばあい、非還元コンディション下、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上約55 kDから約63 kDのみかけ上の分子量をもち、そのヒトの等価物がDNAクローンGGF2HBS5によってコードされ筋細胞分裂促進活性をもち逆相HPLCを用いて単離されたときに4で0.1%トリフルオロ酢酸において4日間インキュベーションしたのち活性の少なくとも50%を保つベーシックなポリペプチド因子。

【0033】

したがって本発明のほかの重要な観点は以下の使用である：

50

( a ) 筋細胞の分裂を刺激することを含む細胞分裂促進活性をもつ一連のヒトおよびウシポリペプチド因子。これらのペプチド配列はそれぞれ図 3 0、3 1、3 2 および 3 3、配列番号 1 3 2 ~ 1 3 3 に示される。

( b ) 筋細胞の分裂を刺激することを含む細胞分裂促進活性をもち、Lupuら、*Science* 249:1552(1990) ; Lupuら、*Proc.Natl.Acad.Sci USA* 89:2287(1992) ; Holmesら、*Science* 256:1205(1992) ; Pelesら、69:205(1992) ; YardenおよびPeles *Biochemistry* 30:3543(1991) ; Dobashiら、*Proc.Natl.Acad.Sci.*88:8582(1991) ; Davisら、*Biochem.Biophys.Res.Commun.*179:1536(1991) ; Beaumontら、特許出願 P C T / U S 9 1 / 0 3 4 4 3 ( 1 9 9 0 ) ; Bottenstein、1 / 4 / 9 4 に発行された、米国特許第 5 , 2 7 6 , 1 4 5 号 ; および Greeneら、特許出願 P C T / U S 9 1 / 0 2 3 3 1 ( 1 9 9 0 ) に概説された手順にしたがい精製および特徴づけられた一連のポリペプチド因子。 10

( c ) 筋細胞の分裂を刺激することを含むグリア細胞分裂促進活性をもつポリペプチド因子 ( G G F B P P 5 ) 。 アミノ酸配列は図 3 1、配列番号 1 4 4 に示される。

#### 【 0 0 3 4 】

筋芽細胞をインビボまたはインビトロの筋細胞分裂促進剤として前記のポリペプチドに接触させることにより筋芽細胞の分裂促進を刺激する方法は本発明の特徴として包含される。

#### 【 0 0 3 5 】

また筋細胞治療は、発現しうる遺伝子構築物における前記のポリペプチド化合物をコードする DNA を投与することによっても達成しうる。ポリペプチドをコードする DNA は細胞へ DNA を送達するための当該技術分野において知られている技術を用いて患者に投与されうる。たとえばレトロウイルスベクター、電気内孔法またはリポソームは DNA を送達するために用いうる。 20

#### 【 0 0 3 6 】

本発明は天然のソース ( 組織または細胞系 ) から抽出されたようなまたは組換え手段により調製されたようなタンパク質の先に挙げたファミリーの使用を包含する。

#### 【 0 0 3 7 】

特異的に p 1 8 5 <sup>erbB2</sup> 受容体に結合する、ほかの化合物、とくにペプチドもまた筋細胞分裂促進剤として本発明にしたがって用いることができる。候補の化合物をルーチンに p 1 8 5 <sup>erbB2</sup> 結合についてスクリーニングすることができ、もしそれが結合すれば、つぎにここに記載された方法を用いてグリア細胞分裂促進活性についてスクリーニングすることができる。 30

#### 【 0 0 3 8 】

本発明は重大な活性の低下を示さない先のポリペプチド因子のいかなる改変物または等価物の使用を包含する。たとえば、アミノ酸含有量 ( content ) または配列が活性に実質的な悪影響なしに変更される改変は含まれる。よってここに含まれる効果および使用は、したがって本発明の一部である。改変されたまたは等価の因子を用いてこのような使用および効果をともなって組立てられるために記載される。

#### 【 0 0 3 9 】

先に記載されそれぞれ図 3 0、3 1、3 2 および 3 3、配列番号 1 3 2 ~ 1 4 6 に示されたヒトペプチド配列は、天然のソース ( 適当な組織から調製された c DNA ライブラリー ) から全長の相補的 DNA ( c DNA S ) として単離することができる、または当業者によって個々のエクソン ( たとえば、別個のエクソンとして誘導された ) をともなう DNA 構築物として組立てることができる一連のスプライシング変異体を示す。 40

#### 【 0 0 4 0 】

本発明はまた先に定義されたようなポリペプチドを有効量投与することによる、筋細胞を治療するための、すなわち筋肉の分裂促進、筋発生、分化、または生存を誘導するための、医薬品を製造する方法を包含する。このような医薬品はポリペプチドを薬学上有効な担体とともに投与することによって製造される。

#### 【 0 0 4 1 】

本発明の別の観点は、それぞれ薬学的または獣医学的 (veterinary) 使用のために製剤化された先に定義された因子のいずれかからなる、適宜許容しうる希釈剤、担体または賦形剤 (excipient) および / または単位投薬用量形態をとる薬学上または獣医学上の製剤の使用である。本発明の因子を用いるばあい、通常の薬学的または獣医学上のプラクティスが適切な製剤または組成物を提供するために用いられる。

【0042】

したがって、本発明の一部として用いるべき製剤は、非経口投与、たとえば静脈内、皮下、筋肉、眼窩内、眼科用、脳室内 (intraventricular)、頭蓋内、嚢内、脊椎内 (intraspinal)、槽内 (intracisternal)、腹腔内、局所、鼻内、エアロゾル、乱切 (scarification) 投与、およびまた経口、頬側、直腸または腔投与に適用できる。

10

【0043】

また本発明の製剤は、本発明の方法に効果のあるポリペプチドをコードするDNAを発現する宿主細胞の患者への移植により、または本発明の製剤を放出する外科的インプラントの使用により投与される。

【0044】

非経口製剤は液体溶液 (liquid solution) または懸濁液の形態であってもよく；経口投与のために、製剤は錠剤またはカプセル剤の形態であってもよく；鼻内製剤として粉末、点鼻液、またはエアロゾルの形態であってもよい。

【0045】

製剤を製造するために当該技術分野において公知の方法は、たとえば「Remington's Pharmaceutical Sciences」において知られている。非経口投与用の製剤は、たとえば賦形剤として滅菌水または滅菌生理食塩水、たとえばポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、野菜起源の油、または水素化されたナフタレンを含有してもよく、生体適合性、生体分解性の (biodegradable) のラクチドポリマー、またはポリオキシエチレン - ポリオキシプロピレンコポリマーを本因子の放出をコントロールするために用いてもよい。因子のためのほかの可能性のある非経口の送達システムはエチレン - ビニルアセテートコポリマー粒子、浸透ポンプ、インプラントできる注入システム、およびリポソームを含む。吸入用製剤は賦形剤として、たとえばラクトースを含んでもよく、またたとえばポリオキシエチレン - 9 - ラウリルエーテル、グリコール酸塩およびデオキシコール酸塩を含有する水性溶液であってもよく、また点鼻液の形態、または鼻内に適用されるゲルとして投与するための油状溶液であってもよい。また非経口投与製剤も頬側投与のためにグリコール酸、直腸投与用にメトキシサリチル酸、または腔投与用にクエン酸を含有してもよい。

20

30

【0046】

本因子は単独の活性試薬として用いてもよく、またほかの活性成分、たとえば、神経学上の疾患においてニューロンの生存を容易にしうるであろうほかの成長因子、またはペプチダーゼまたはプロテアーゼ阻害剤と組合せて用いることができる。

【0047】

本発明の製剤における本因子の濃度は、投与される投薬量、および投与経路を含む、多数の問題に依存して変わるであろう。

40

【0048】

一般的な用語として、本発明の因子は、非経口投与のために約 0.1 から 10% w/v の化合物を含有する水性生理学的緩衝液に提供されてもよい。一般的な用量範囲は 1 日あたり約 1 mg / kg 体重から約 1 g / kg 体重であり；好ましい用量範囲は 1 日あたり 0.01 mg / kg 体重から約 100 mg / kg 体重である。投与されるべき好ましい投薬量 (dosage) は、取りくまれる (addressed) 病理学的コンディションの進行のタイプと程度、患者の全身の健康、製剤の調合および投与経路に依存するであろう。

【0049】

本発明の方法に利用されるポリペプチド因子はまた標準的な技術につづく、たとえばモノクローナル抗体などの抗体を作製するために免疫原として用いることもできる。これらの

50

抗体は、代って治療または診断目的で用いることができる。したがって、因子の正常でないレベルに起因する筋疾患に関係するであろうコンディションがこのような抗体を用いることにより追跡されうる。

【0050】

標準的な方法を用いる単離されたサンプルについてのアッセイを用いるときにインビトロの技術を用いることができる。抗体に、たとえば腫瘍のイメージングの当該技術分野のための技術を用いる体外にイメージされうる放射性アイソトープがつけられるイメージング方法も用いうる。

【0051】

本発明のさらなる一般的な観点は、好ましくは筋肉の疾患または障害の治療のための、医薬品の製造における本発明の因子の使用である。「GGF2」という名称はGGF-11タンパク質に由来するペプチド配列データを用いてすでに単離されたすべてのクローン（すなわち、GGF2HBS5、GGF2BPP3）のために用いられ、単独で存在するとき（すなわちGGF2またはrhGGF2）、GGF-11タンパク質に由来するペプチド配列データを用いて単離されるプラスミドによりコードされる組換えヒトタンパク質（すなわち、プラスミドHBS5からの昆虫細胞において生産されるような）を示すために用いられる。GGFHBS5クローンからの組換えヒトGGFをGGF2、rhGGF2およびGGF2HBS5ポリペプチドとよぶ。

【0052】

ここで用いられる治療（treating）とは筋細胞の分裂促進、生存および/または分化を増大する、および/または筋肉の委縮および変性を減らす目的でここに記載された化合物のいかなる投与も意味する。もっとも好ましくは治療は筋細胞の疾患または障害の徴症または進行を減少または衰えさせるためである。またここで用いられる治療は健康な個体における筋細胞を増加するまたは変えるために化合物を投与することを意味する。治療は前記のように、ここに記載された化合物に感受性のあるまたは反応する筋細胞の有効量の化合物との接触により成し遂げられうる。ここに記載された化合物の阻害剤も筋細胞増殖の疾患を停止するまたは遅らせるためにも用いうる。

【0053】

詳細な説明

本発明は、単離され精製されたニューレグリン因子およびこれらの因子をコードするDNA配列、これらの因子の筋肉外濃度を増加する制御化合物、およびインビボおよびインビトロの筋細胞の生存、分化および筋細胞分裂促進を誘導するこれらの因子の擬態（mimetics）である化合物の使用に適している。GGF/p185<sup>erbB2</sup>と結合するニューレグリンタンパク質をコードする遺伝子は多数の可変的にサイズ化され（variably-sized）、特異的にスプライスされる（differentially-spliced）RNA転写物を産生し、これらにより一連のタンパク質の増加（rise）が与えられるということは明らかである。これらのタンパク質は異なる長さのものであり、いくつかの共通のペプチド配列といくつかの独自のペプチド配列を含む。これらの因子が単一の遺伝子によってコードされるという結論は、ウシ下垂体後葉およびヒト胸部癌細胞（MDA-MB-231）から回収可能な特異的にスプライシングされたRNA配列によって支持される。この結論のさらなる支持は筋組織のための両分裂促進剤（ここに開示されたような）としておよびp185<sup>erbB2</sup>受容体のリガンド（以下参照）として作用するタンパク質のサイズ範囲から導き出される。

【0054】

GGF/p185<sup>erbB2</sup>結合タンパク質をコードする遺伝子は相同であるという事実を支持するさらなる証拠はヌクレオチド配列の比較からくる。Holmesら、（Science 256:1205-1210,1992）は受容体タンパク質p185<sup>erbB2</sup>と特異的に相互に作用する45キログルトンのヒトタンパク質（ヘレグリン）の精製を論証する。Pelesら（Cell 69:205(1992)）およびWenら（Cell 69:559(1992)）は「ニュー分化因子（neuro differentiation factor）」（NDF）と呼ばれるタンパク質をコードするラット細胞から単離された相補的DNAを記載する。NDF cDNAの翻訳産物はp185<sup>erbB2</sup>結合活性をもつ。いくつか

10

20

30

40

50

のほかのグループが p 1 8 5<sup>erbB2</sup> 結合活性をもつ種々の分子量のタンパク質の精製を報告している。これらのグループは Lupuら ( (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2287 ) ; YardenおよびPeles ( (1991) Biochemistry 30:3543 ) ; Lupuら ( (1990) Science 249:1552 ) ; Dobashiら ( (1991) Biochem. Biophys. Res. Comm. 179:1536 ) ; およびHuangら ( (1992) J. Biol. Chem. 257:11508-11512 ) を含む。

#### 【 0 0 5 5 】

我々は p 1 8 5<sup>erbB2</sup> 受容体結合タンパク質は筋細胞分裂促進を刺激し、したがって筋管形成 (筋発生) を刺激することを見出した。この刺激により結果として筋芽細胞の形成の増大および筋管 (筋発生) の形成の増大が起こる。ここに記載された化合物も筋肉の成長、分化、および筋細胞の生存の増大を刺激する。しかしながら、これらのリガンドは限定されないが、GGFの (GGF's) ニューレグリン、ヘレグリン、NDF、およびARIAを含む。この分裂促進活性の結果として、これらのタンパク質、これらのタンパク質をコードするDNA、および関連化合物は筋組織の外傷性のダメージまたは疾患にかかっている患者に投与されうる。分裂促進の目的で提供されるすべての方法は筋発生のために有用であると理解される。これらのリガンド (たとえば抗体またはペプチドフラグメントなど) の阻害剤は筋肉に由来する腫瘍の治療のために投与されうる。

10

#### 【 0 0 5 6 】

これらの化合物はここ (実施例 9 ~ 17) におよびHolmesら、Science 256:1205(1992) ; Pelesら、Cell 69:205(1992) ; Wenら、Cell 69:559(1992);Lupuら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2287(1992);YardenおよびPeles、Biochemistry 30:3543(1991);Lupuら、Science 249:1552(1990);Dobashiら、Biochem. Biophys. Res. Comm. 179:1536(1991) ; Huangら、J. Biol. Chem. 257:11508-11512(1992);Marchionniら、Nature 362:313,(1993)に ; およびここにリファレンスにより組込まれるすべてのGGF-III特許に記載されたプロトコルを用いてることができる。これらの化合物の多くについて配列が提供され特徴が記載される。配列については図 8 ~ 11、20 ~ 27C、29 ~ 34、36 ~ 44、および46を参照。タンパク質の特徴については図 12 ~ 19、28 35、45Aおよび45Bを参照。

20

#### 【 0 0 5 7 】

化合物は以下の実施例に提供された方法を用いてインビトロのそれらの有用性についてアッセイしうる。インビボの試験は実施例 1 およびSklarら、In Vitro Cellular and Developmental Biology 27A:433-434,1991に記載されたように行ないうる。

30

#### 【 0 0 5 8 】

##### ほかの実施の形態

本発明は、筋肉の分裂促進を誘導するためのほかの天然に生じるGGFポリペプチドに加えて図30 (配列番号 132 ~ 143、156、1576 ~ 147、160、および161) のコーディングセグメントと実質的に相同なタンパク質のいずれかの使用のための方法をも包含する。また対立遺伝子のアレル変異体 (allelic variations) ; 天然の突然変異体 (mutants) ; 誘導された突然変異体 ; 天然に生じる核酸と高いまたは低いストリンジェンシーコンディション (stringency conditions) の下、ハイブリダイズするDNAによってコードされるタンパク質 (高いおよび低いストリンジェンシーの定義については、リファレンスによりここに組込まれる、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989, 6.3.1-6.3.6を参照) の使用 ; およびGGFポリペプチドに対する抗血清により特異的に結合されるポリペプチドまたはタンパク質の使用が包含される。用語はまた筋肉の分裂促進の誘導のために図28からの配列からなるGGFポリペプチドを含むキメラポリペプチドの使用も含む。

40

#### 【 0 0 5 9 】

以下の、実施例 8 からわかるであろうように、本因子は細胞のタイプのある範囲に分裂促進活性を示す。製剤および / または医薬品またはそれらの製造に関連する先の本発明の一般的な記述は明確に適切な生産物および使用を包含するために組立てられるべきである。

#### 【 0 0 6 0 】

50

ここに記載される請求の範囲の追加の根拠を提供する一連の実験が続く。本発明に関連する以下の実施例は本発明を特定の限定されるように組立てられるべきではなく、また本発明のこのような変異は現在知られておりのちに開発される。

【0061】

【実施例】

実施例は組換えヒトGGF2 (rhGGF2) が第1代ヒト筋肉培養物に数種の効果を授与するという我々の発見を例証する。rhGGF2は筋肉培養物に対する3つの独立した生物学的活性アッセイにおける重大な効果をもつ。ポリペプチドはサブコンフルエントの静止した筋芽細胞の増殖により測定されるような分裂促進を増大し、成長因子の存在下コンフルエントの筋芽細胞により分化を増大し、染色除外の損失により測定されるような分化された筋管の生存を増大し、アセチルコリン受容体合成を増大した。これらの活性は、筋肉修復、再生、および筋肉変性に対する予防的効果を誘導する際のGGF2およびほかのニューレグリン類の有効性 (efficacy) を示す。

10

【0062】

実施例1

筋芽細胞に対するrhGGFの分裂促進活性

クローンGGF2HBS5を、実施例14に記載したごとくに、組換えバクテリオファグ感染昆虫細胞で発現させ、得られた組換えヒトGGF2を培養 (40  $\mu$ l/mlで添加したならし培地) 中の筋芽細胞に添加した。筋芽細胞 (057A細胞) を24ウェル・ディッシュ中で前密集まで増殖させた。培地を除去し、40  $\mu$ l/mlの濃度にて、GGF2ならし培地と共にあるいはそれ無くして、0.5%胎児ウシ血清を含有するDMEMで置き換えた。培地を2日後に交換し、細胞を固定し、5日後に染色した。合計核を、筋芽細胞における核数として計数した (表1)。

20

【0063】

【表1】

表 1

処 理	核の合計数 /mm <sup>2</sup>	筋 管 に おける核	融合指標
対 照	395 $\pm$ 28.3	204 $\pm$ 9.19	0.515 $\pm$ 0.01
GGF40 $\mu$ l/ml	636 $\pm$ 8.5	381 $\pm$ 82.7	0.591 $\pm$ 0.15

30

【0064】

GGF処理した筋芽細胞は、分裂促進活性を示す未処理対照 (395核) よりも増加した数の合計核 (636核) を示した。rhGGF2処理した筋芽細胞は、未処理対照 (204核) よりもかなり大きい数の核 (381核) を有していた。かくして、rhGGF2は、増殖および細胞生存の増大を通じて、合計核数を増大させる。また、rhGGF2は筋管の形成も増強するようである。

40

【0065】

rhGGF2の分裂促進活性は、浸透圧ミニポンプを介してGGF2および [<sup>3</sup>H] チミンをラット筋肉に継続的に供給することによってin vivoで測定することができる。筋肉のバルクは、処理の1および2週間後の湿重量によって決定される。DNA複製は、ShamおよびrhGGF2-処理筋肉におけるオートラジオグラフィ (Sklar et al., In Vitro Cellular and Developmental Biology 27A:433-434, 1991) のためにコーティングした後にセクション中の標識核を計数することによって測定される。また、脱神経筋をこれらの方法を介してこのラット動物モデルで調べたが、この方法は、筋肉の萎縮および修復におけるrhGGF2の役割の評価を可能とする。また、平均線維径を、萎縮の防止に

50

対する F G F の効果を評価するのに使用することができる。

【 0 0 6 6 】

#### 実施例 2

##### 筋細胞分裂促進に対する r h G G F 2 の効果

休止初代クローン・ヒト筋芽細胞は前記したごとくに調製した (Sklar, R., Hudson, A., Brown, R., In vitro Cellular and Developmental Biology 1991; 27A:433-434)。休止細胞を、D M E M 中の  $10 \mu\text{M}$  B r d U、 $0.5\%$  F C S の存在下で、示した試薬 ( r h G G F 2 ならし培地、メチルプレドニソロンを含むあるいは含まない P D G F、および対照培地) で処理した。2 日後、細胞を P B S 中の  $4\%$  パラホルムアルデヒドで 30 分間固定し、 $70\%$  エタノールで洗浄した。次いで、細胞を抗 - B r d U 抗体と共にインキュベートし、洗浄し、抗体結合をペルオキシダーゼ反応で可視化した。次いで、染色核の数を領域当たりにつき定量した。結果は、G G F 2 は対照よりも大きい、領域当たりの標識核の数の増大を誘導することを示す (表 2 参照)。

【 0 0 6 7 】

【表 2】

表 2

ヒト筋芽細胞に対する GGF の分裂促進効果

処 理	標識核/cm <sup>2</sup>	T - 検定の p 値
対 照	120 ± 22.4	
感染した対照	103 ± 11.9	
GGF 5 μl/ml	223 ± 33.8	0.019
PDGF 20ng/ml	418 ± 45.8	0.0005
IGFI 30ng/ml	280 ± 109.6	0.068
メチルプレドニソロン 1.0 μM	142 ± 20.7	0.293

【 0 0 6 8 】

血小板由来成長因子 ( P D G F ) を陽性対照として用いた。また、r h G G F 2 の他に、メチルプレドニソロン ( コルチコステロイド ) を用いたが、D N A の標識に有意な増加は示さなかった。

【 0 0 6 9 】

また、均質 ( > 95% 純度 ) まで精製した r h G G F 2 は、ヒト筋芽細胞に対して分裂促進を示す ( 図 1 ) 。

【 0 0 7 0 】

また、組換えヒト G G F 2 は、初代ヒト筋芽細胞の分裂促進を引き起こす ( 表 2 および 図 1 参照 ) 。分裂促進アッセイは前記したごとくに行う。次いで、B r d U 陽性細胞の数を細胞の合計数で割ることによって有糸分裂指標が計算される。

【 0 0 7 1 】

#### 実施例 3

##### 筋細胞分化に対する r h G G F 2 の効果

筋肉培養分化に対する精製 r h G G F 2 ( 95% 純度 ) の効果を調査した ( 図 2 ) 。培地の血清含量を  $20\%$  から  $0.5\%$  まで低下させることによって、密集筋芽細胞培養を誘導して分化させた。テスト培養を、6 日間、示した濃度の r h G G F 2 で処理し、培地を 2 日毎に新鮮なものとした。次いで、培養を固定し、染色し、核の数を 1 ミリリットル当た

りで計数した。図2におけるデータは、対照に対する、r h G G F 2が存在した場合における、筋管中の核数の大きな増加を示す。

【0072】

#### 実施例4

##### 分化した筋管の生存に対するr h G G F 2の効果

分化した筋管の生存は、r h G G F 2処理によって有意に増加した。筋肉培養をr h G G F 2の存在下で分化させ、種々の時間において、死んだ筋管の数をヨウ化プロピジウム染色法によって計数した。図3から分かるように、死んだ筋管の数は、分化4、5、6および8日において、r h G G F 2処理培養ではより低かった。筋管における核の数は、分化8日後、非処理培養と比較して、G G F 2処理によって有意に増加した。特に、ギムザ染色の後、同一プレートで計数した場合、対照は8.6筋核/mm<sup>2</sup>を示したのに対し、r h G G F 2処理培養は57.2筋核/mm<sup>2</sup> (P = 0.035)を示した。

10

【0073】

また、筋肉培養に対して公知の効果を有する他の成長因子で生存アッセイを行った。r h G G F 2効果は、テストした成長因子の中でユニークであった(図4)。この実験において、種々の成長因子の示した濃度にて、培養を、r h G G F 2処理プレートと平行して処理した。筋管の生存は、057A筋芽細胞の分化8日後において前記したごとくに測定した。因子の濃度は以下の通りであった：

r h G G F 2 : 100 ng/ml ; ヒト血小板由来成長因子 : 20 ng/ml ; ヒト塩基性線維芽細胞成長因子 : 25 ng/ml ; ヒト上皮成長因子 : 30 ng/ml ; ヒト白血球阻害因子 : 10 ng/ml ; ヒト・インスリン様成長因子I : 30 ng/ml ; ヒト・インスリン様成長因子II : 25 ng/ml。

20

【0074】

分化した筋管の死滅からの観察された保護は、多数の筋疾患によって特徴付けられる筋肉の変性の関与に対する治療として希望が持てるものである。かくして、ニューレグリンの筋肉外濃度を増大させる薬剤は予防効果を有し得るか、あるいは筋肉消耗性障害の進行を遅延させ、および筋肉の分化、修復、コンディショニング、および再生の速度を増大させる。

【0075】

#### 実施例5

##### r h G G F 2は、Duchenne型筋ジストロフィー遺伝子座における遺伝欠陥を持つ分化筋管の生存を促進する

筋管生存に対するr h G G F 2の陽性効果は、変性障害における可能な効力を反映し得た。筋管生存に対するこれらの効果を、クローン化に由来する初代デュシェーヌ(Duchenne)型筋芽細胞についてテストして、正常な筋肉培養で観察される応答が疾患に対する個体に由来する培養でも示され得るか否かを判断した。図5に示すデータは、正常個体で用いる同一筋肉培養条件(前記実施例4)を用いて得られた。r h G G F 2は、対照と比較して、分化したDuchenne型筋肉培養において、死滅した筋管の数を有意に低下させた(p = 0.032)。濃度は以下の通りであった：G G F 2 : 100 ng/ml ; ヒト血小板由来成長因子 : 20 ng/ml ; ヒト・インスリン様成長因子I : 30 ng/ml。

30

40

【0076】

本実施例は、r h G G F 2は分化したDuchenne型筋管の生存も促進し、r h G G F 2は哺乳動物における筋肉の変性および消耗の進行を遅延しもしくは防止し得るという強力な証拠を提供する。

【0077】

#### 実施例6

##### 分化プログラムに対するr h G G F 2効果：MHC slowおよびジストロフィンタンパク質の誘導

培養溶解物のウェスタン分析によって、筋肉培養分化に対する精製r h G G F 2の効果も調べた。筋特異的タンパク質のレベルを、三連処理および未処理培養で測定した。これら

50

の培養を調製し、プレートのサイズを150mmまで増大し、筋肉培養層をSklar, R., およびBrown, R. (J. Neurol. Sci. 101:73-81, 1991)に記載されているごとくにウェスタン分析用に掻き落とした以外は前記したごとくに処理し、テストした。表Aに提示する結果は、rhGGF2処理が、ジストロフィン、ミオシン重鎖(MHC、成人スロー(slow)およびファスト(fast)アイソフォーム)を含めたいくつかの筋肉特異的タンパク質のレベルを増大させるが、HSP72またはMHCネオネイト(neonate)アイソフォームのレベルを、ウェスタンに負荷したタンパク質の量当たり同様のレベルまでは増大させないことを示す。rhGGF2によって誘導された筋肉特異的タンパク質のレベルは、筋核/mm<sup>2</sup>の数の定量的増加と同様であった(表3)。

【0078】

【表3】

10

表 3

対照±SD rhGGF2処理-p値

平均±SD

合計タンパク質(μg)	554±38.4	798±73.6	0.007
筋核/mm <sup>2</sup>	29.0±12.2	106±24.1	0.008
MHC ファスト /μgタンパク質	1.22±0.47	4.00±0.40	0.001
MHC スロー /μgタンパク質	0.17±0.13	1.66±0.27	0.001
MHC ネオネイト /μgタンパク質	0.30±0.27	0.55±0.04	0.199
ジストロフィン /μgタンパク質	6.67±0.37	25.5±11.0	0.042
HSP 72/μgタンパク質	3.30±0.42	4.54±0.08	0.008

20

30

【0079】

成人ミオシン重鎖アイソフォーム(スローはタイプIヒト筋線維で見出され;ファストはタイプ2Aおよび2Bヒト筋線維で見出される)におけるrhGGF2依存性増加は、ネオネイタル(neonatal)アイソフォームがrhGGF2処理によって有意に増加されなかったため、筋管の成熟を表すであろう。ラット筋の発生の間に、MHCアイソフォームはフェイタル(fatal)形態からネオネイタルアイソフォームにスイッチし、続いて、成熟成人スローおよびファストMHCアイソフォームにスイッチする(Periasamy et al. J. Biol. Chem. 259:13573-13578, 1984; Periasamy et al., J. Biol. Chem. 260:15856-15862, 1985; Wieczorek et al. J. Cell Biol. 101:618-629, 1985)。筋肉は、神経細胞もしくは組織の不存在下で、これらのアイソフォームの変換のうちのいくつかを自律的に受け得るが、マウス筋外植体はマウス脊髄の存在下で培養した場合のみ成人ファストMHCアイソフォームを発現する(Ecob-Prince et al. J. Cell Biol. 103:995-1005, 1986)。MHCアイソフォーム変換が神経によって影響されるというさらなる証拠がWhalen et al. (Deve. Biol. 141:24-40, 1990)によって確立され;ノテキシン処理ラットヒウメ筋の再生の後、成人ファストMHCアイソフォームの変換が新しい脱神経筋で産生されたが、神経支配再生筋はファストおよびスロー成人MHCアイソフォームを共に産生した。かくして、rhGGF2は成人MHCアイソフォームの合成を増加させるという表3における証拠は、rhGGF2が、ニューロン神経支配を模擬し得る筋肉の発生的成熟を誘導

40

50

し得ることを示す。

【0080】

実施例 7

rhGGF2を含めたニューレグリンは筋肉におけるアセチルコリン受容体の合成を誘導する

アセチルコリン受容体(AchR)サブユニットタンパク質の発現は筋細胞をニューレグリンに暴露することによって誘導できる。より詳しくは、本発明者らは、筋細胞をrhGGF2と接触させることはAchRサブユニットタンパク質の合成を誘導できることを示した。rhGGF2暴露に続くこの誘導は、2つの方法で観察された：まず、本発明者らは、レポーター遺伝子構築物の産物を介してヒト成長ホルモンの発現の増加を検出し、第2に、本発明者らは、アルファ-ブンガロトキシンの細胞への結合の増加を検出した。

10

【0081】

以下の例では、マウス筋芽細胞系C2を用いた。C2細胞は、ヒト成長ホルモン全長cDNAに連結したマウスのAchRデルタサブユニット遺伝子の5'調節配列を含有するトランスジーンでトランスフェクトした(Baldwin and Burden, 1988. J. Cell Biol. 107: 2271-2279)。このレポーター構築物は、培地に分泌された成長ホルモンの量をアッセイすることによってAchRデルタ遺伝子の発現の誘導の測定を可能とする。該系は、培地中の血清濃度を20%から0.5%に低下させることによって誘導して筋管を形成することができる。

【0082】

特に、AchR-ヒト成長ホルモンレポーター構築物でトランスフェクトしたマウスC2筋芽細胞を、rhGGF2での処理に続くhGHの発現につきアッセイした。2つの別々の実験の結果を表4ならびに図6(hGH発現)および7(hGH発現およびアルファ-ブンガロトキシン結合)にまとめる。示したのは、分泌されたヒト成長ホルモンについての、およびrhGGF2で処理した筋肉培養からのブンガロトキシン結合についての、用量応答曲線である。

20

【0083】

【表4】

表 4

AChR デルタサブユニット/hGH トランスジーンの  
発現および AChR の合成に対する rhGGF2 の効果

実験 1		実験 2		
GGF (ul)	hGH (ng/ml)	hGH (ng/ml)	AChR (cpm/mg タンパク質)	
0	9.3 + 2.1	5.7 + 2.1	822 + 170	10
0.1	-	6.8 + 1.5	891 + 134	
0.5	-	12.0 + 0.9	993 + 35	
1.0	-	9.7 + 2.3	818 + 67	
5.0	17.5 + 2.8	14.7 + 3.5	1300 + 177	
10.0	14.3 + 3.2	14.1 + 3.3	1388 + 137	20
15.0	22.0 + 1.4	-	-	

## 【0084】

C2 筋管を 37 °C にて 1 時間、冷した - BTX (20 nM) で処理し、培地で 2 回洗浄し、次いで、GGF2 で処理した。培地を 1 mg/ml の濃度のウシ血清アルブミンで調整した。24 時間後、培地を取り出し、hGH アッセイのために保存した。37 °C にて、筋肉培養を <sup>125</sup>I - BTX (20 nM) で 1 時間処理し、洗浄し、1% SDS を含有する PBS 中に掻き入れた。非特異的結合は冷した - BTX (40 nM) の存在下で測定した。細胞ホモジネートを放射能につき計数し、合計タンパク質量についてアッセイした。

## 【0085】

rhGGF2 の存在は、hGH 遺伝子発現の増加を 2 倍以上に導き、それにより、rhGGF2 はアセチルコリン受容体のデルタサブユニットの合成を誘導したことが示される。さらに、増大したブンガロトキシン結合は、これらのサブユニットタンパク質の機能的アセチルコリン受容体への取込みと一致する。これらのデータの解釈を補強するために、rhGGF2 に応答するはずのない、メタロチエン・プロモーターに連結された hGH レポーターを有する培養で、分析を繰り返した。その対照実験の結果は、hGH 応答は AChR デルタサブユニット遺伝子対照エレメントの転写活性化を通じて媒介されることを示した。

## 【0086】

これらの結果は、rhGGF2 が、自己免疫疾患重症筋無力症のための治療の一部として AChRs を補給するのに有用であり得ることを示す。また、この活性は、筋肉の再神経支配の鍵となる工程を刺激することによって末梢神経再生およびニューロパシーの治療に有用であり得る。

## 【0087】

## 実施例 8

精製された GGF - I および GGF - II のさらなる分裂促進活性

10

20

30

40

50

単一のマクロ培養をDNA合成、細胞形態学、細胞数および細胞抗原の発現について調査されるのを可能とする定量的方法を用いて、GGFIおよびIIを共に含有する高度に精製された試料の分裂促進活性を実験した。この技術はMuir et al., (Analytical Biochemistry 185, 377-382, 1990)によって従前に報告されている方法を改変した。主な改変は、1) 未被覆マイクロタイタープレートの使用、2) ウェル当たりの細胞数、3) 10%子ウシ血清(FCS)の代わりに5%子ウシ血漿(FBP)の使用、および4) 同時に培養に添加した、分裂促進剤およびブロモデオキシウリジン(BrdU)の存在下におけるインキュベーション時間である。加えて、固定前に細胞単層を洗浄しないで、細胞の喪失を回避し、マウス抗-BrdUモノクローナル抗体およびペルオキシダーゼ結合ヤギ抗-マウス免疫グロブリン(IgG)抗体のインキュベーション時間を2倍にしてアッセイの感度を増大させた。細胞培養条件に対して適当な改変を加えた後、ラット坐骨神経シュワン細胞について最適化したアッセイもいくつかの細胞系で用いた。

10

### 【0088】

#### I. 分裂促進テストの方法

第1日目に、精製したシュワン細胞を、5%FBP/ダルベッコの改良イーグル培地(DMEM)(5,000細胞/ウェル)中の未被覆96ウェルプレートに平板培養した。第2日目に、GGFまたは他のテスト因子、ならびに最終濃度10 $\mu$ mのBrdUを培養に添加した。48時間後(第4日)に、培地にアスピレーターをかけることによってBrdUの取込みを停止させ、室温にて70%エタノールの200 $\mu$ l/ウェルで20分間細胞を固定した。次に、細胞を水で洗浄し、37 $^{\circ}$ Cにて2NHCl 100 $\mu$ lで10分間インキュベートすることによってDNAを変性させた。アスピレーションに続き、ウェルに0.1Mホウ酸緩衝液(pH9.0)を満たすことによって残存する酸を中和し、細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄した。次いで、細胞を50 $\mu$ lのプロッキング緩衝液(0.1%トリトンX 100および2%正常ヤギ血清を含有するPBS)で37 $^{\circ}$ Cにて15分間処理した。アスピレーションの後、マウス抗-BrdUモノクローナル抗体(Dako Corp., Santa Barbara, CA)(50 $\mu$ l/ウェル、プロッキング緩衝液に希釈した1.4 $\mu$ g/ml)を添加し、37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。0.1%トリトンX-100を含有するPBS中で3回洗浄することによって未結合抗体を除去し、ペルオキシダーゼ-結合ヤギ抗-マウスIgG抗体(Dako Corp., Santa Barbara, CA)(50 $\mu$ l/ウェル、プロッキング緩衝液に希釈した2 $\mu$ g/ml)を添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。PBS/トリトン中で3回洗浄し、PBS中で最後に濯いだ後、0.05%可溶性クロモゲンオ-フェニレンジアミン(OPD)および0.02% $H_2O_2$ を含有する50mMリン酸/クエン酸緩衝液(pH5.0)の100 $\mu$ l/ウェルをウェルに与えた。各ウェルからの80 $\mu$ lを、2N硫酸の40 $\mu$ l/ウェルを含有する清浄なプレートにピペットで加えることによって、室温にて5~20分後に反応を停止させた。プレートリーダー(Dynatech Labs)を用い、490nmで吸光度を記録した。細胞単層を含有するアッセイプレートをPBSで2回洗浄し、基質ジアミノベンジジン(DAB)の100 $\mu$ l/ウェルおよび0.02% $H_2O_2$ を添加して不溶性生成物を生じさせることによってBrdU-DNAについて免疫細胞化学的に染色した。10~20分後、水で洗浄することによって染色反応を停止させ、倒立顕微鏡を用いてBrdU-陽性核を観察し、計数した。場合によっては、陰性核が0.001%トルイジンブルーでカウンター染色され、前記したごとくに計数した。

20

30

40

### 【0089】

#### II. 分裂促進アッセイで用いた細胞系

スイス(Swiss) 3T3 線維芽細胞: 空気中10% $CO_2$ の湿潤雰囲気中、37 $^{\circ}$ Cにて、フロー・ラブズ(Flow Labs)からの細胞を、10%FCS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを補足したDMEM中で維持した。細胞に栄養を与え、2日毎に継代培養した。分裂促進アッセイのために、完全培地中5,000細胞/ウェルの密度にて細胞を平板培養し、細胞が密集し休止するまで1週間インキュベートした。血清含有培地を取り出し、細胞単層を無血清培地で2回洗浄した。分裂促進剤および10 $\mu$ MのBrdUを含有

50

する無血清培地 100  $\mu$ l を各ウェルに添加し、48時間インキュベートした。GGF および血清またはPDGF (陽性対照として) に対する用量応答を行った。

【0090】

BHK (ベビーハムスター腎臓) 21 C13 線維芽細胞: 空气中5% CO<sub>2</sub>の湿潤雰囲気中、37 °Cにて、5%トリプトゼホスフェートブロス、5% FCS、ペンシリンおよびストレプトマイシンを補足したグラスゴウ改良イーグル培地 (GMEM) 中で、ユーロピアン・コレクション・オブ・アニマル・セル・カルチャーズ (European Collection of Animal Cell Cultures) (ECCACC) からの細胞を維持した。細胞に栄養を与えるか、あるいは2日ないし3日毎に継代培養した。分裂促進アッセイのために、完全培地中2,000細胞/ウェルの密度で細胞を24時間平板培養した。次いで、血清含有培地を取り出し、無血清培地で洗浄した後、0.1% FCS含有GMEMまたはGMEM単独100  $\mu$ l で置き換えた。GGFおよびFCSまたはbFGF (陽性対照として) を添加し、10  $\mu$ M BrdUと一致させ、48時間インキュベートした。次いで、細胞培養をシュワン細胞について前記したごとく加工した。

10

【0091】

C6ラット膠腫細胞系: 空气中10% CO<sub>2</sub>の湿潤雰囲気中、37 °Cにて、5% FCS、5% ウマ血清 (HS)、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含有するDMEM中で、39継代で得られた細胞を維持した。細胞に栄養を与えるか、あるいは3日毎に継代培養した。分裂促進アッセイのために、完全培地中2,000細胞/ウェルの密度で細胞を平板培養し、24時間インキュベートした。次いで、無血清培地中で洗浄した後、1:1のDMEMおよび0.1% FCS含有F12培地の混合物で置き換えた。次いで、GGF、FCSおよびFCFに対する用量応答を行い、他の細胞型について前記したごとくに細胞をELISA法により加工した。

20

【0092】

PC12 (ラット副腎クロム親和性細胞腫細胞): 空气中5% CO<sub>2</sub>の湿潤雰囲気中、37 °Cにて、コラーゲン被覆フラスコ中、10% HS、5% FCS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを補足したRPMI 1640中で、ECCACCからの細胞を維持した。培地の80%を置き換えることによって、3日毎に細胞を栄養を与えた。コラーゲン被覆プレート (50  $\mu$ l /ウェルコラーゲン、Vitrogen Collagen Corp.、1:50希釈、37 °Cで30分間) 上、完全培地中3,000細胞/ウェルの密度にて細胞を平板培養し、24時間インキュベートした。次いで、新鮮なRPMI単独または1mMインスリンもしくは1% FCSを含有する新鮮なRPMIで培地を置き換えた。陽性対照としてのFCS/HS (1:2) に対するおよびGGFに対する用量応答を前記したごとくに行った。48時間後、細胞を固定し、前記したごとくELISA法を行った。

30

【0093】

III. 分裂促進アッセイの結果

本実施例に示したすべての実験は、GGF-IおよびGGF-II (GGFs) の混合物を含有するセファロース12クロマトグラフィー精製工程からの高度に精製した試料を用いて行った。

【0094】

まず、BrdU取込みアッセイで得られた結果を、J. P. Brockes (Methods Enzymol. 147:217, 1987) によって記載されている、分裂細胞のDNAへの[125]I-UdR取込みに基づいてシュワン細胞についての古典的分裂促進アッセイと比較した。

40

【0095】

図12は、同一細胞培養条件 (5,000細胞/ウェル、5% FBP/DMEM中、GGFの存在下で48時間インキュベート) で行った、2つのアッセイで得られたデータの比較を示す。明らかに示されるごとく、結果は同等であるが、グラフの左側、すなわちGGFの低濃度への曲線のシフトによって示されるごとく、BrdU取込みアッセイは、わずかにより感度が良いようである。

【0096】

50

「分裂促進テスト方法」のセクションで述べたごとく、OPDペルオキシダーゼ反応の可溶性生成物の強度を読むことによって免疫反応性BrdU-DNAを定量した後、細胞単層を含有するオリジナルのアッセイプレートは第2の反応を受けて不溶性DAB生成物が生じ、これはBrdU陽性核を染色する。次いで、マイクロ培養を倒立顕微鏡で調査でき、細胞の形態学およびBrdU-陽性および陰性核の数を観察できる。

【0097】

図13Aおよび図13Bにおいて、490nmにおける吸光度を読むことによって評価したBrdU-DNA免疫反応性を、同一培養で計数した、BrdU-陽性核の数に対して、ウェル当たりの細胞の合計数に対するBrdU-陽性核のパーセンテージに対して比較する。標準偏差は10%未満であった。2つの評価方法は非常に良好な相関を示し、最高用量のGGFにおける値間の矛盾は、BrdU-陽性として検出された細胞におけるDNA合成の異なる程度によって説明できる。

10

【0098】

従って、BrdU取込みアッセイは、(125)I-UdR取込みアッセイと比較した場合、シュワン細胞上のポリペプチドの生物学的活性についてのさらなる有用な情報を提供できる。例えば、図15に報告するデータは、GGFはシュワン細胞に作用してDNA合成を誘導できるが、より低用量では、48時間後にマイクロ培養中に存在する陰性細胞の数を増加させることができることを示す。

【0099】

該アッセイを異なる起源のいくつかの細胞系に用いた。図15において、GGFに対するシュワン細胞およびSwiss 3T3線維芽細胞の分裂促進応答を比較した；3T3線維芽細胞で得られた弱い応答にも拘わらず、いくつかの明瞭にBrdU-陽性の核がこれらの培養で検出された。FCSまたはヒト組換えPDGFのいくつかの用量の存在下で、対照培養を平行して行い、細胞は適当な刺激に対して応答し得ることが示された(図示せず)。

20

【0100】

BHK21C13細胞系を用いて、GGFに応答する線維芽細胞の能力をさらに調べた。腎臓由来のこれらの線維芽細胞は接触阻止を示さないか、あるいは密集した場合には休止状態に達する。従って、細胞活性を危うくすることなく非常に低いバックグラウンド増殖を有するように実験条件を設計した。図16および図17によって示されるごとく、GGFは、BHK21C13細胞に対する有意な分裂促進活性を有する。図16は、0.1%FCSの存在下でGGFによって刺激されたBHK21C13細胞によるBrdUのDNAへの取込みを示す。FCSに対する良好な分裂促進応答は、細胞培養条件が限定的でないことを示す。図17において、GGFの分裂促進効果は、ウェル当たりの、BrdU-陽性およびBrdU-陰性の数として、および計数した細胞の合計数として表す。データは、二連で行った2つの実験の代表であり；ウェル当たり少なくとも3つのフィールドを計数した。低用量における増殖効果に加えてシュワン細胞で観察されたごとく、GGFはまた非応答性細胞の生存数を増加させる。BrdU陽性細胞のパーセンテージは培地に添加したGGFの増加する量に比例する。高濃度のGGFの存在下における48時間後における細胞の合計数は少なくとも2倍となり、GGFはBHK21C13細胞でDNA合成および増殖を誘導することが確認される。同一条件下、2%FCSの存在下で48時間維持した細胞は約6倍の増加を示した(図示せず)。

30

40

【0101】

C6膠腫細胞は、グリア細胞特性を研究する有用なモデルを提供した。発現された表現型は、細胞の継代に依存するらしく、細胞は初期段階における星状膠細胞の表現型、および後の段階における(継代70を超える)稀突起膠細胞の表現型によく似ている。これらの実験で用いたC6細胞は継代39ないし継代52のものであった。C6細胞は高度に増殖性の集団であり、従って、BrdU取込みの非常に低いバックグラウンドを有するように実験条件を最適化した。FCSに対する用量応答によって示されるごとく(図18)、分裂促進応答に有意に影響することなく、細胞活性を維持するのに0.1%の血清の存在が必要であった。

50

## 【 0 1 0 2 】

図 1 9 において、a F G F (酸性線維芽細胞成長因子) および G G F に対する分裂促進応答は、F C S ( 8 % ) の存在下で得られた最大 B r d U 取込みのパーセンテージとして表す。値は、二連で行った 2 つの実験の平均である。G G F の効果は a F G F の純粋な調製物のそれに匹敵するものであった。a F G F は C 6 細胞に特異的な成長因子として記載され (Lim R. et al., Cell Regulation 1:741-746, 1990)、その理由で、それは陽性対照として用いられた。B r d U 陽性および陰性細胞の直接計数は、マイクロ培養における高細胞密度のため可能ではなかった。これまで報告した細胞系とは対照的に、P C 1 2 細胞は、P C 1 2 が血清 (細胞の維持にルーチン的に使用される F C S または H S の混合物) に応答できる培養条件下で処理する場合、G G F S に対するいずれの明らかな応答性も示さな

10

## 【 0 1 0 3 】

## 実施例 9

## 精製した G G F - I および G G F - II のアミノ酸配列

アミノ酸配列分析実験は、高度に精製したウシ下垂体 G G F - I および G G F - II を用いて行った。配列を記載するのに通常の一文字コードを用いた。ペプチドは、1 1 % S D S - P A G E の 5 5 - 6 5 R D 領域から流出 (前記したマーカーに対する M W ) した物質について行った G G F - II のリシルエンドペプチダーゼ消化を用い、還元しカルボキシメチル化した試料につき行った、リシルエンドペプチダーゼおよびプロテアーゼ V 8 消化によ

20

## 【 0 1 0 4 】

合計 2 1 のペプチド配列 (図 8、配列番号 1 ~ 2 0、1 6 5 参照) が G G F - I につき得られ、そのうち 1 2 のペプチド (図 9、配列番号 1、2 2 ~ 2 9、1 7、1 9 および 3 2 参照) が現在のタンパク質データベースには存在せず、従って、ユニークな配列を表す。合計 1 2 のペプチド配列 (図 1 0、配列番号 4 2 ~ 5 0 および 1 6 1 - 1 6 3) が G G F - II について得られ、そのうち 1 0 のペプチド (図 1 1、配列番号 4 2 ~ 5 0) が現在のタンパク質データベースに存在せず、従って、ユニークな配列を表す (例外は、少数の残基であれば恐らくは重要でない多くのタンパク質において同一の配列を示すペプチド G G F - II 0 6 である)。これらの新規な配列は、G G F I および II の真実のアミノ酸配列の一部に極めて対応しているようである。

30

## 【 0 1 0 5 】

明らかに高度に関連する、G G F - I 0 7 および G G F - II 1 2 の配列に特別の注意を払うことができる。類似性は、これらのペプチドの配列は、ほとんど確かに割り当てられた G G F 種のものであり、汚染タンパク質に由来するものではほとんどないようであることを示す。

## 【 0 1 0 6 】

加えて、ペプチド G G F - II 0 2 において、配列 X S S は、X で示される位置のアスパラギン上の N 結合カルボヒドレート残基の存在と合致する。

## 【 0 1 0 7 】

一般に、図 8 および 1 0 において、X は未知の残基を表し、これは、配列決定サイクルには同等のサイズの 1 を超えるシグナルがあるか、あるいはシグナルが存在しないので、単一の位置が確実性を持って呼ばれない配列決定サイクルを示す。星印は、最後であると考えられるアミノ酸がそのペプチドに存在する最後のアミノ酸であるペプチドを示す。残りのペプチドにおいて、最後であると考えられるアミノ酸の後のシグナル強度は、配列の命名をそのペプチド末端まで継続するのに不十分であった。右側のカラムは、N B R F および E M B L 配列データベースを分析するための G C G パッケージ F A S T A および T F A S T A プログラムを用いたコンピューターデータベースサーチの結果を示す。このカラムにおけるタンパク質の名称は、その配列の一部の、最大 2 つのミスマッチを可能とすると考えられるペプチドアミノ酸配列との同一性を示す。疑問符は 3 つの可能なミスマッチを示

40

50

す。用いた略字は以下の通りである。

H M G - 1 高移動性群タンパク質 - 1  
 H M G - 2 高移動性群タンパク質 - 2  
 L H - アルファ 黄体形成ホルモンアルファサブユニット  
 L H - ベータ 黄体形成ホルモンベータサブユニット

【 0 1 0 8 】

#### 実施例 1 0

#### G G F - I および G G F - II ペプチドを含有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列の単離およびクローニング

G G F - IIヌクレオチド配列の単離およびクローニングは、ペプチド配列情報およびライブラリースクリーニングを用い、ここに概略を述べるごとく行い、また、後記するごとくに行った。図 1 0 および 1 1 のペプチドは、G G F - I 配列の単離およびクローニング、続いてのここに記載する技術についての出発点として用いることができるのが認識されよう。事実、図 2 0、配列番号 5 1 ~ 8 4 は、この目的のための可能な変性オリゴヌクレオチドプローブを示し、図 2 2、配列番号 8 6 ~ 1 1 5 は、可能な P C R プライマーをリストする。D N A 配列およびポリペプチド配列は G G F - II に関しこの手段によって得られるはずであり、また、D N A 構築物およびかかる D N A 配列を一体化させる発現ベクター、かかる構築物 / ベクターを一体化させることによって遺伝的に改変された宿主細胞、およびかかる宿主細胞を培養することによって得られるタンパク質も同様である。本発明はかかる主題にも関する。

【 0 1 0 9 】

#### I . オリゴヌクレオチドプローブおよびプライマーの設計および合成

変性 D N A オリゴマープローブは、(精製 G G F タンパク質から生成したペプチドに由来する) アミノ酸配列をヌクレオチド配列に逆翻訳することによって設計した。オリゴマーは、D N A 配列のコーディング鎖または非コーディング鎖いずれかを表す。セリン、アルギニンまたはロイシンがオリゴマー設計に含まれる場合、2 つの別々の合成物を調製して不明確さを回避した。例えば、セリンは 5 3 7 および 5 3 8 または 6 0 9 および 6 1 0 におけるごとく T C N または A G Y によってコードされた。同様のコドン分裂がアルギニンまたはロイシンでなされている (例えば、5 4 4、5 4 5)。D N A オリゴマーは、0 . 2 マクイロモル規模の合成で働く - シアノエチル化学を用い、バイオサーチ (Biosearch) 8 7 5 0 4 - カラムで合成した。オリゴマーをカラム (5 0 0 オングストローム C p G 樹脂) から切断し、5 5 ~ 6 0 で 6 ~ 2 4 時間濃水酸化アンモニウム中で脱保護した。脱保護オリゴマーを真空下 (Speedvac) で乾燥し、1 5 % アクリルアミド (2 0 モノ : 1 ビス) のゲル、7 M 尿素を含有する 5 0 m M トリス - E D T A 緩衝液にての電気泳動によって精製した。U V シャドウイングによって、ゲル中にて全長オリゴマーを検出し、次いで、バンドを切り出し、振とうしつつ 4 ~ 1 6 時間、D N A オリゴマーを 1 . 5 m l ずつの水に溶出させた。溶出物を乾燥し、0 . 1 m l の水に再溶解させ、吸光度測定を 2 6 0 n m で行った。

【 0 1 1 0 】

濃度は以下の式に従って求めた。

$(A_{260} \times \text{ユニット} / \text{ml}) (60.6 / \text{長さ}) = x \mu \text{M}$

【 0 1 1 1 】

すべてのオリゴマーを水の添加によって 5 0  $\mu$  M 濃度に調整した。

【 0 1 1 2 】

前記のごとく設計した変性プローブを図 2 0、配列番号 5 4 ~ 8 8 に示す。

【 0 1 1 3 】

P C R プライマーは、以下の改変を施した、プローブで用いたものと実質的に同一の方法によって調製した。制限部位を含有する 1 3 のヌクレオチドのリンカーを、ベクターにクローニングするのに用いるため縮重オリゴマーの 5 ' 末端に含ませた。D N A 合成は、1 , 0 0 0 オングストローム C p G 樹脂を用いて 1 マイクロモルの規模で行い、すべての 4

10

20

30

40

50

種のヌクレオチドが通常は縮重プローブに一体化される位置でイノシンを用いた。PCRプライマーの精製は、ゲル電気泳動精製に続いてのエタノール沈殿を含むものであった。

【0114】

#### II. ライブラリー構築およびスクリーニング

ウシゲノムDNAライブラリーはStratagene(カタログ番号:945701)から購入した。該ライブラリーはベクターラムダDasHIIにクローン化した $2 \times 10^6$  15 ~ 20 kb Sa u 3 A l 部分ウシDNA断片を含有するものであった。ウシ全脳cDNAライブラリーはClonetech(カタログ番号:BL10139)から購入した。相補DNAライブラリーは、ウシ全脳、ウシ下垂体およびウシ下垂体後葉から調製したmRNAから構築した(ヴァイトロジェン(Vitrogen)中:ストラタジーン(Stratagene))。Vitrogen調製した2つのcDNAライブラリーにおいて; 1のライブラリーはベクターラムダg10におけるものであり、他のライブラリーはベクターpcDNAIにおけるものであった(プラスミドライブラリー)。ストラタジーン(Stratagene)ライブラリーはベクターラムダユニザップ(unizap)にて調製した。集合的に、cDNAライブラリーは1400万の一次組換えファージを含有するものであった。

10

【0115】

プレート当たり150,000ないし200,000ファージブランクにて、ウシゲノムライブラリーを $23 \times 23$  cmのプレート(Nunc)上の大腸菌K12宿主株LE392に平板培養した。各プレートは、約1のウシゲノム当量を示した。37°Cにおける一晩のインキュベーションの後、該プレートを冷却し、Maniatis et al.(2:60-81)の手法に従って複製フィルターを調製した。4つのブランクリフトを各プレートから非荷電ナイロン膜(Pall Biodyne AまたはMSI Nitropure)に調製した。UV光の下で5分間架橋させるか、あるいは80°C、真空下で2時間加熱することによってDNAを該膜に固定化した。供給業者の仕様に従い、ガンマ32P ATP(New England Nuclear:6500 Ci/ミリモル)と共にT4ポリヌクレオチドキナーゼ(New England Biolabs)を用いてDNAプローブを標識した。略言すれば、37°Cにて、600  $\mu$  Ciガンマ<sup>32</sup>P-ATPおよび5ユニットのT4ポリヌクレオチドキナーゼの存在下で、50ピコモルの縮重DNAオリゴマーを30分間インキュベートした。反応を終結させ、ゲル電気泳動負荷緩衝液を添加し、次いで、電気泳動によって放射性同位体標識プローブを精製した。32P標識プローブをゲルスライスから切り出し、水中に溶出させた。別法として、SchowalterおよびSommer, Anal. Biochem 177:90-94 (1989)のプロトコルに従って  $\gamma$ -32P-dATPまたは  $\gamma$ -32P-dCTPを一体化することによって、DNAプローブをPCR増幅を介して標識した。PCR反応で標識したプローブを、セファデックスG-150カラムで脱塩することによって精製した。

20

30

【0116】

GMC緩衝液(0.52 M NaPi、7% SDS、1% BSA、1.5 mM EDTA、0.1 M NaCl 10 mg/ml tRNA)中でプレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションを行った。洗浄は、オリゴウォッシュ(oligowash)(160 ml 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、200 ml 20% SDS、8.0 ml 0.5 M EDTA、100 ml 5 M NaCl、3632 ml H<sub>2</sub>O)中で行った。典型的には、10のウシゲノム当量の複製コピーを表す20のフィルター(各々400 sq.センチメートル)を、100ピコモルの縮重オリゴヌクレオチドプローブ(128 ~ 512倍縮重)を含む200 mlのハイブリダイゼーション溶液中でインキュベートした。ハイブリダイゼーションは、縮重プローブについて計算した最小融解温度の5°C以下で一晩起こさせた。最小融解温度の計算は、AT対につき2°Cを、GC対につき4°Cを見積もっている。

40

【0117】

フィルターは、ハイブリダイゼーション温度で反復して交換したオリゴウォッシュ中で4ないし5時間、および最後には、DNAプローブ長に応じた温度にて1% SDS中、3.2 M塩化テトラメチルアンモニウムで30分間2回洗浄した。20量体については、最終洗浄温度は60°Cであった。フィルターを取り付け、次いで、増感スクリーン(Dupont C

50

ronex Lightening Plus)を用いてX - 線フィルム (Kodak XAR5) に暴露した。通常、 - 80 °C における3日ないし5日間のフィルム暴露が、これらのライブラリースクリーンにおける二連シグナルを検出するのに十分であった。結果の分析に続き、フィルムをストリップし、再プローブできる。フィルターは、10 mM EDTA (pH 8) を含有する1% SDSの溶液中、フルパワーのマイクロ波オープン中での15分間の2回の連続的サイクルを通じてインキュベートすることによってストリップした。少なくとも3ないし4サイクルのストリッピングおよび種々のプローブでの再プロービングによりフィルターを採取した。

【0118】

### III. 組換えファージの単離、増殖およびDNA調製

これらの手法は組換えDNA法で記載されている標準的なプロトコルに従うものであった (Maniatis et al 2:60-2:81)。

【0119】

### IV. DNA消化およびサザンプロットを用いる単離したクローンの分析

制限エンドヌクレアーゼ供給業者 (New England Biolabs) によって推奨される条件に従い、組換えファージDNA試料 (2マイクログラム) を消化した。37 °C における4時間のインキュベーションに続き、0.1 M 酢酸ナトリウムおよび3容量のエタノールの存在下で、反応生成物を沈殿させた。沈殿させたDNAを遠心によって収集し、75%エタノール中で濯ぎ、乾燥した。すべての懸濁した試料をアガロースゲルに負荷した (典型的には、TAE緩衝液; 0.04 M トリスアセテート、0.002 M EDTA 中1%)。1センチメートルあたり1ポルトにて4ないし20時間、ゲルを泳動させた。マーカーはラムダ Hind III DNA断片および/または X174 Hae III DNA (New England Biolabs) を含むものであった。ゲルを0.5マイクログラム/mlの臭化エチジウムで染色し、写真を撮った。サザンプロットティングについては、0.125 N HClでの処理によってDNAをまずゲル中で脱プリン化し、0.5 N NaOHで変性し、20x SSC (3 M 塩化ナトリウム、0.03 M クエン酸ナトリウム) 中にて非荷電ナイロン膜に移した。プロットティングは6時間から24時間まで行い、次いで、0.5 トリス HCl pH 7.5、0.15 M 塩化ナトリウム中で中和し、次いで、50 mM トリス - ホウ酸 EDTA 中で簡単に濯いだ。

【0120】

架橋については、フィルターをまず透明プラスチックラップに包み、次いで、DNA側を紫外光に5分間暴露した。ハイブリダイゼーションおよび洗浄はライブラリーのスクリーニングについて記載したごとくに行った (本実施例のセクション2参照)。同様の遺伝子が他の種に存在するか否かを判断するためのハイブリダイゼーションのためにわずかに修飾を施した。DNAフィルターはコロネテック (Clonetech) (カタログ番号7753-1) から購入し、それは、レーン当たり種々の種からのEcoRI消化DNAを5マイクログラムを含有するものであった。前記したセクション2に記載したごとくPCR増幅反応によってプローブを標識し、ハイブリダイゼーションは、10%硫酸デキストランを含有する80%緩衝液B (2gのポリビニルピロリドン、2gのFicoll-400、2gのウシ血清アルブミン、50mlの1Mトリス - HCl (pH 7.5)、58gのNaCl、1gのピロリン酸ナトリウム、10gのドデシル硫酸ナトリウム、950mlのH<sub>2</sub>O) 中で行った。プローブは、10分間煮沸し、次いで、氷水中で迅速に冷却することによって変性した。プローブを、1mlあたり10<sup>6</sup> dpm<sup>32</sup>Pのハイブリダイゼーション緩衝液に添加し、60 °Cで一晩インキュベートした。フィルターを、60 °Cでまず緩衝液B中で、続いて2x SSC、0.1% SDS、次いで1x SSC、0.1% SDS中で洗浄した。高ストリンジェンシーについては、実験、最終洗浄を0.1x SSC、1% SDS中で温度を65 °Cまで上昇させて行った。

【0121】

サザンプロットデータを用いて、ゲノムクローンの制限地図を作成し、いずれのサブ断片がGGFプローブにハイブリダイズしたかを示した (サブクローニングのための候補)

10

20

30

40

50

。

## 【0122】

V. ハイブリダイゼーションプローブに相同なDNAのセグメントのサブクローニング  
 DNA消化物(例えば、5マイクログラム)を1%アガロースゲルに負荷し、次いで、適  
 当な断片を染色後のゲルから切り出した。ガラスビーズへの吸着および供給業者(Bio 10  
 1)によって記載されているプロトコルを用いる溶出によってDNAを精製した。回収した  
 DNA断片(100~200ng)を、T4リガーゼ(New England Biolabs)を用い、p  
 CU18の誘導体である線状化脱リン酸化ベクター、例えばpT3T7(Ambion)に連結  
 した。このベクターは大腸菌ラクターゼを担持し、よって、形質転換体はアンピシリン  
 を含有するプレートで選択できる。また、該ベクターは、  
 -ガラクトシダーゼ相補性  
 を宿主細胞に供給し、従って、非組換体(ブルー)はイソプロピルチオガラクトシダーゼ  
 およびBluogal(Bethesda Research Labs)を用いて検出できる。連結反応の一部を用いて  
 、大腸菌K12 XLI blueコンピテント細胞(ストラタジーン(Stratagene)カタログ  
 番号:200236)を形質転換し、次いで、アンピシリン1ml当たり50マイクログ  
 ラムを含有するLBプレートで形質転換体を選択した。白色コロニーを選択し、プラスミ  
 ドミニプレブ(preps)をDNA消化およびDNA配列分析のために調製した。選択した  
 クローンを再テストして、そのインサートDNAがGGFプローブにハイブリダイズする  
 か否かを判断した。

10

## 【0123】

VI. DNA配列決定

標準的なプロトコルに従い、5ml培養から二本鎖プラスミドDNA鑄型を調製した。配  
 列決定は、製造業者のプロトコル[Sanger et al. PNAS; USA 74:5463 (1977)]に従い、  
 セクエナーゼ(Sequenase)2.0およびジデオキシヌクレオチド配列決定キット(US B  
 iochemical)を用いてジデオキシ鎖停止法によって行った。別法として、配列決定は、サ  
 イクル配列決定キット(New England Biolabs; Bethesda Research Laboratories)を用い  
 てDNAサーマルサイクラー(Perkin Elmer, モデル4800)で行い、5'末端標識プ  
 ライマーを用い、製造業者の指示に従って行った。配列プライマーは配列キットで供給さ  
 れたものか、あるいはクローンから決定された配列に従って合成したものであった。6%  
 ポリアクリルアミドの0.4mm厚配列決定用ゲルに配列決定反応物を負荷し、解像した  
 。ゲルを乾燥し、X-線フィルムに暴露した。典型的には、標準的な配列決定キットを用  
 いる場合、35Sを取り込み、サイクル配列決定反応のために32P末端標識プライマー  
 を用いた。ゲルの底部から頂部まで(5'方向から3')の配列をDNA配列エディター  
 に読み込み、ジェネティクス・コンピュータ・グループ(Genetics Computer Group)(  
 GCG、ウィスコンシン大学)によって供給されているプログラムを用いてデータを解析  
 した。

20

30

## 【0124】

VII. RNA調製およびPCR増幅

ゲノムDNA中に検出され、かつGGFペプチドをコードする配列を含有するオープンリ  
 ーディングフレームを下垂体RNAのPCR増幅を介して延長した。RNAは、グアニジ  
 ン中性-CsCl手法(Chirgwin et al. Biochemistry 18:5294 (1979))に従い凍結ウ  
 シ組織(Pelfreeze)から調製した。ポリアデニル化RNAはオリゴ-dTセルロースカ  
 ラムクロマトグラフィー(Aviv and Leder PNAS (USA) 69:1408 (1972))によって選択し  
 た。

40

## 【0125】

パーキン・エルマー社製PCR/RNAキット番号:N808-0017を用いてcDNA  
 Aに変換された全RNAまたはポリアデニル化RNA試料いずれかで開始して、特異的D  
 NA標的配列を増幅した。第1鎖逆転写反応は1μgの鑄型RNAと、制限酵素認識部位  
 リンカーを付加したオリゴdTのプライマーまたは制限部位が付加したクローン化配列か  
 ら決定した特異的アンチセンスプライマーいずれかとを用いた。第2鎖を生成するには、  
 プライマーは、3'RACE反応で用いたプラス鎖ユニーク配列(Frohman et. al. PNAS

50

(USA) 85:8998 (1988)) であるか、あるいは第 1 鎖反応生成物を d A T P でターミナルトランスフェラーゼターリングすることによって第 2 の標識部位が付加されている場合には制限部位が付加されたオリゴ d T プライマーであった (例えば、5' race 反応、Frohman et al., 前掲)。別法として、アンカード P C R 反応においては、第 2 鎖プライマーは縮重し、従って、個々のペプチド配列を表す。

#### 【 0 1 2 6 】

増幅プロフィールは以下の一般的スキームの通りである： 1 ) 9 5 における 5 分間の浸漬ファイル； 2 ) 9 5 、 1 分間の加熱サイクルファイル； 1 分間、 4 5 、 5 0 または 5 5 のアニーリング温度に下げる； 1 分間アニーリング温度に維持する； 1 分間にわたって 7 2 まで上げる； 7 2 で 1 分間または 1 分間プラス 1 0 秒間の自己延長にて延長させる； 3 ) 7 2 、 5 分間の延長サイクル、および 4 ) 有限時間での 4 における浸漬ファイル。加熱サイクルファイル (# 2 ) は、通常、 3 0 サイクル行った。 1 センチメートル当たり 4 ボルトにて、 3 時間の、 T A E 緩衝液中における、 2 % N u s i e v e 1 % アガロースゲルでの電気泳動によって、各 1 0 0 μ l の増幅反応の 1 6 μ l の試料を分析した。ゲルを染色し、次いで、非荷電ナイロン膜にプロットし、これを、プライマーに対して内部にある標識 D N A プローブでプローブした。

10

#### 【 0 1 2 7 】

D N A 増幅産物の特異的セットはプロットング実験で同一であり得、その位置を精製および再増幅のガイドとして用いた。適当には、選択した試料の残存部分を分取用ゲルに負荷し、続いて、電気泳動の後に、 0 . 5 m m 厚の 4 ないし 5 のスライス ( 特異的産物の予測される位置を括弧に入れる ) をゲルから採取した。アガロースを漬し、次いで、 4 0 にて、 0 . 5 m l の電気泳動緩衝液に 2 ~ 1 6 時間浸漬した。漬したアガロースを 2 分間遠心し、水性相を新しい試験管に移した。

20

#### 【 0 1 2 8 】

元の反応と同一セットのプライマーおよび反応プロフィールを用い、溶出した物質 5 マイクロリットル ( 生成物の概略 1 % ) について再増幅を行った。再増幅反応が完了すると、クロロホルムで試料を抽出し、新しい試験管に移した。濃縮した制限酵素緩衝液および酵素を反応に添加して、リンカー中に存在する制限部位にて切断した。消化した P C R 産物を電気泳動によって精製し、次いで、サブクロニングのセクションで前記したごとくニベクターにサブクロニングした。 D N A 配列決定は前記したごとくに行った。

30

#### 【 0 1 2 9 】

### VIII . D N A 配列分析

断片組立てプログラムを用いて D N A 配列を組み立て、 G C G プログラム ゲルアセンブル ( Gel Assemble )、地図およびトランスレート ( Translate ) によってアミノ酸配列を推定した。推定したタンパク質配列を疑問配列として用いて、ワードサーチ ( Word Search ) を使用してタンパク質配列データベースをサーチした。分析は、 V M S 5 . 1 下で操作する V A X Station 3 1 0 0 ワークステーションで行った。データベースサーチは、 G C G バージョン 7 . 0 を用いてスイスプロット ( SwissProt ) リリース番号 2 1 で行った。

#### 【 0 1 3 0 】

### IX . G G F - I および G G F - II をコードする遺伝子のクローニングおよび配列決定の結果

40

示したごとく、ウシ G G F - II をコードする D N A 配列を同定するために、縮重オリゴヌクレオチドプローブを G G F - II ペプチド配列から設計した。 G G F - II 1 2 ( 配列番号 4 4 )、すなわち、精製した G G F - II 調製のリシルエンドペプチダーゼ消化を介して生成したペプチドは ( 図 1 6 および 1 2 参照 )、 G G F - I 0 7 ( 配列番号 3 9 )、すなわち、精製した G G F - I 調製から生成したトリプシンペプチドと強いアミノ酸配列相同性を示した。かくして、 G G F - II 1 2 を用いて 1 0 の縮重オリゴヌクレオチドプローブを得た ( 各々、図 2 0 中のオリゴ 6 0 9、 6 1 0 および 6 4 9 ないし 6 5 6、配列番号 6 6、 6 7、 6 8 および 7 5 参照 )。フィルターの二連セットを、 G G F - II 1 2 の

50

2つの重複部分をコードするプローブの2つのセット(セット1 = 609、610; セット2 = 649 ~ 5656)でプローブした。ハイブリダイゼーションシグナルは観察されたが、1つのクローンのみが両プローブセットにハイブリダイズした。クローン(GGF2BG1と命名)を精製した。

#### 【0131】

ファージクローンGGF2BG1からのDNAのサザンブロット分析により、両プローブセットはそのウシDNA配列にハイブリダイズすることが確認され、さらに、両プローブはクローン内の同一セットのDNA断片と反応することが示された。これらの実験に基づき、元のクローンの4 kb EcoRIサブ断片を同定し、サブクローンし、部分的に配列決定した。図21は、ヌクレオチド配列(配列番号89)、ならびにプローブ609および650のハイブリダイゼーション部位を包む最初のDNA配列のリーディングの推定アミノ酸配列を示し、このウシゲノムDNAの一部がペプチド12(KASLADSEYM)をコードすることが確認された。

10

#### 【0132】

さらなる配列分析は、GGF-II12は、推定ウシGGF-II遺伝子およびcDNAを表す重複配列の単離の出発点となった66アミノ酸オープンリーディングフレーム(後記参照)に存在することを示した。

#### 【0133】

いくつかのPCR方法を用いて、推定ウシGGF-II遺伝子についてのさらなるコーディング配列を得た。全RNAおよびオリゴdT-選択(ポリA含有)RNA試料は、ウシ全下垂体、下垂体前葉、下垂体後葉、および視床下部から調製した。図22、配列番号109-119に示したリストからのプライマーを用い、片側PCR反応(RACE)を用いて、3'および5'両方向でcDNA末端を増幅し、アンカードPCR反応はさらなるGGF-IIペプチドを表す縮重オリゴヌクレオチドプライマーで行った。図29は、それらの実験で得られた隣接DNA構造および配列をまとめる。3'RACE反応から、3つの別のスプライスしたcDNA配列が得られ、これをクローン化し、配列決定した。5'RACE反応は、少なくとも52アミノ酸のコーディング配列を含有するさらなるエクソンの発見に導いた。その推定アミノ酸配列の分析により、ペプチドGGF-II-6、およびGGF-I-18(後記参照)に類似の配列が明らかにされた。アンカードPCR反応は、300bpのさらなるcDNAセグメント内に含まれるペプチドGGF-II-1、2、3および10の(cDNA)コーディング配列の同定に導いた。このセグメント(すなわち、セグメントE、図30参照)の5'リミットは、ペプチドGGF-II-1をコードし、かつPCR反応で用いられたオリゴヌクレオチドによって定義される(さらなる5'配列データは、実施例11におけるヒト・クローンについて記載したごとく存在する)。かくして、このクローンは存在する合計して9つの新規なGGF-IIペプチド配列のうちの6つをコードするヌクレオチド配列を含有する。

20

30

#### 【0134】

クローン化遺伝子は、見いだされたコーディング配列(後記、図30参照)の本発明者による位置決めを可能としたGGF2BG1の物理的地図を構築することによってまず特徴付けられた。前記したコーディング配列からのDNAプローブは、このファージクローン上のエクソンを含有するさらなるDNA断片を同定するのに、また、両方向で重複するクローンを同定するのに用いられた。推定ウシGGF-II遺伝子は少なくとも5つのコーディングセグメントに分割される。コーディングセグメントは、普遍的な遺伝暗号を用いてポリペプチド配列に翻訳できる不連続長さのDNA配列と定義される。図36に記載し、本出願で言及したコーディングセグメントは、1)GGF遺伝子内に存在する特定のエクソン(例えば、コーディングセグメントa)、または2)mRNAの特異的サブグループに出現する2以上のエクソンのセットに由来するものであり、ここに、各セットは、示した遺伝子産物におけるごとく特異的ポリペプチドセグメントに翻訳できる。請求の範囲で言及するポリペプチドセグメントは同種DNAコーディングセグメントの翻訳産物である。コーディングセグメントAおよびBのみが、これまでにエクソンとして定義されており

40

50

、配列決定され、マッピングされている。同定された隣接コーディング配列の要約は図31に示す。エクソンはその発見の順に(アルファベット順にて)リストする。イントロン/エクソン境界より、エクソンBは、コーディングセグメントEおよびコーディングセグメントAを結合するcDNA中に包含され得ることが明らかである。すなわち、エクソンBは、リーディングフレームを損なうことなくスプライシングできない。従って、本発明者らは、3つの別のスプライシングパターンが推定ウシGGF-II cDNA配列1、2および3を生じ得ることを示す。各々GGF2BPP1.CDS、GGF2BPP2.CDSおよびGGF2BPP3.CDSと命名されたこれらのコーディング配列を、各々、図27A(配列番号129)、27B(配列番号130)、および27C(配列番号131)に示す。3つのcDNAの推定されるアミノ酸配列も図27A(配列番号129)、27B(配列番号130)、および27C(配列番号131)に示す。

10

#### 【0135】

3つの推定構造は長さ206、281および257アミノ酸のタンパク質をコードする。推定タンパク質配列の第1の183残基はすべての3つの遺伝子産物で同一である。184位において、クローンはかなり異なる。また、GGF2BPP1におけるグリシンについてのコドンGGTは、GGF2BPP2およびGGF2BPP3のためのスプライズドナーとして働き、これは別々に、各々、エクソンC、C/D、C/D'およびDまたはC、C/DおよびDに付加され、図32(配列番号145)に示す。GGFII BPP1は、コーディングセグメントAスプライズ連結部を次の介在配列(イントロン)まで読み過ぎることによって生じる切形(truncated)遺伝子産物である。これは、図30(配列番号136)におけるコーディングセグメントA'を表す。転写体はカノニカルAATAAポリアデニル化配列に隣接して終わり、本発明者らは、この切形遺伝子産物がボナ・ファイド(bona fide)成熟転写体を表すことを示す。他の2つのより長い遺伝子産物は同一の3'非翻訳配列およびポリアデニル化部位を共に有する。

20

#### 【0136】

すべての3つのこれらの分子は、9つの新規なGGF-IIペプチド配列(図11参照)のうち6つを含有し、他のペプチドはGGF-I-18(図26参照)に対し高度に相同である。この知見は、この組換え分子がウシGGF-IIの少なくとも一部をコードする高い確率を与える。さらに、3つのペプチドについての計算された等電点はGGF-IおよびIIの物理的特性に合致する。GGF-IIの分子サイズはだまか60kDであるので、3つのDNAのうち最大のものは、予測されるアミノ酸数のほとんど半分を持つタンパク質をコードする。

30

#### 【0137】

BおよびAエクソンを含むプローブをPCR増幅を介して標識し、ウシ下垂体後葉から単離されたRNAから作製されたcDNAライブラリーをスクリーニングするのに用いた。1のクローン(GGF2BPP5)は図29に示したパターンを示し、コーディングセグメントAおよびCの間にさらなるDNAコーディングセグメント(G)を含有する。全核酸配列を図31に示す(配列番号144)。最長オープンリーディングフレームからの予測される翻訳産物は241アミノ酸である。また、前記したプローブを用い、ウシ下垂体後葉ライブラリーから第2cDNAの一部(GGF2BPP4)を単離した。このクローンは、図29に示すパターンを示した。このクローンは5'末端が不完全であるが、コーディングセグメントGおよびDを欠くという意味でスプライシング変異体である。また、BPP4は領域C/Dを超えて領域H、KおよびLを持つ新規な3'末端を示す。BPP4の配列は図33に示す(配列番号146)。

40

#### 【0138】

##### 実施例11

##### 種々の種におけるGGF配列

GGFタンパク質はタンパク質の新しいスーパーファミリーのメンバーである。他の哺乳動物DNAに関しての高ストリンジェンシ・クロスハイブリダイゼーション実験(DNAプロットング実験)において、本発明者らは、このウシ組換え分子からのDNAプロ

50

ープはテストした種々の試料において特異的配列を容易に検出できることを明らかに示した。また、高度に相同性の配列がヒトゲノムDNAで検出される。オートラジオグラフィは図28に示す。ラットおよびヒトDNAを含有するレーンにおけるシグナルは、GGF遺伝子のラットおよびヒト同等物を表し、この遺伝子によってコードされるいくつかのcDNAの配列は最近Holems et al. (Science 256: 1205 (1992)) およびWen et al. (Cell 69:559 (1992)) によって報告されている。

【0139】

#### 実施例12

##### ヒトGGF2をコードするヒト配列の単離

脳幹から調製したヒトcDNAライブラリー(ストラタジーンカタログ番号935206)をスクリーニングすることによって、ウシGGFIIコーディングセグメントEからの配列を含有するいくつかのヒト・クローンを単離した。この戦略は、GGF2ペプチド(GGF2に対してユニーク)のほとんどおよびウシEセグメントを含有するクローンからの予測されるペプチド配列の間の強力なリンクに基づいて追求されたものであった。このライブラリーは、以下にリストするオリゴヌクレオチド914~919を用いて、実施例8、セクションIIに記載されたごとくにスクリーニングした。

【0140】

【外1】

914TCGGGCTCCATGAAGAAGATGTA	(SEQ ID NO: 179)	
915TCCATGAAGAAGATGTACCTGCT	(SEQ ID NO: 180)	20
916ATGTACCTGCTGTCCTCCTTGA	(SEQ ID NO: 181)	
917TTGAAGAAGGACTCGCTGCTCA	(SEQ ID NO: 182)	
918AAAGCCGGGGCTTGAAGAA	(SEQ ID NO: 183)	
919ATGARGTGTGGGCGGCGAAA	(SEQ ID NO: 184)	

【0141】

これらのプローブで検出されたクローンをハイブリダイゼーションによってさらに分析した。また、セグメントAからのポリメラーゼ鎖反応(PCR)産物を標識することによって産生された、コーディングセグメントA(図30参照)に由来するプローブを用いて初代ライブラリーをスクリーニングした。AおよびE由来プローブの双方にハイブリダイズするいくつかのクローンを選択し、特定クローンGGF2HBS5をさらなる分析のために選択した。このクローンはコーディングセグメントのパターン(図30に示すごとくEBACC/D'D)によって表される。このクローンにおけるEセグメントは図30で示したEの切形ウシバージョンのヒト同等物である。GGF2HBS5が、記載したすべての「推定」GGF-II候補のうちGGF-IIをコードする最もそうであろう候補である。コーディング配列セグメントEの長さは786ヌクレオチドプラス非翻訳配列の264塩基対である。GGF2HBS5によってコードされたタンパク質の予測されるサイズはほぼ423アミノ酸(ほぼ45キロダルトン、図44参照、配列番号:21)であり、これは、GGF-IIからの脱グリコシル化された形態のサイズと同様である(実施例20参照)。加えて、図26にリストしたGGF-IIペプチドの7つは、領域Eから予測されるタンパク質配列の範囲内にある同等配列を有する。ペプチドII-6およびII-12は例外であり、各々、コーディングセグメントBおよびコーディングセグメントAの範囲内である。GGF2HBS5タンパク質をコードするRNAは、GGF2HBS5インサートを含有するベクター(Bluescript SK [Stratagene Inc.] 図47参照)に存在するバクテリオファージT7プロモーターによって駆動されるin vitro転写系で産生された。このRNAは無細胞(ウサギ網状赤血球)転写系で転写され、タンパク質産物のサイズは45kdであった。加えて、無細胞タンパク質をシュワン細胞分裂促進アッセイで検定して、生物学的活性を確認した。ならし培地で処理したシュワン細胞は、<sup>125</sup>I-ウリジンの取込みで測定して増加した増殖、および185キロダルトン範囲におけるタンパク質のチロシン上

のリン酸化の双方を示した。

【0142】

かくして、GGF2HBS5によってコードされる産物のサイズおよび図11に示したウシペプチドに対して高度に相同性のヒトペプチドをコードするDNA配列の存在により、GGF2HBS5がウシGGF2のヒト同等物をコードすることが確認された。このクローンで形質転換された細胞から調製したならし培地はシュワン細胞分裂促進活性を誘導するという事実により、(BPP5遺伝子産物とは異なり)GGFIHBS5遺伝子産物が分泌されることが確認された。加えて、GGFBIBPP5遺伝子産物は、p185<sup>erbB</sup><sub>2</sub>のごとき受容体チロシンキナーゼまたは密接に関連する受容体を介するシュワン細胞増殖応答を媒介するらしい(実施例19参照)。

10

【0143】

実施例13

ホ乳動物および昆虫細胞におけるヒト組換えGGF2の発現

(実施例12に記載し、またHBS5として言及した)ヒトGGF2をコードするGGF2HBS5 cDNAクローンをベクターpcDL-SR296にクローン化し、COS-7細胞をDEAE-デキストラン法によって100mmディッシュにトランスフェクトした。細胞溶解物および一時的に発現するCOS細胞からのならし培地をトランスフェクション後3および4日に収穫した。溶解物を調製するには、細胞単層をPBSで洗浄し、3回の凍結/解凍のサイクルによって溶解したディッシュから0.25Mトリス-HCl、pH8の150μm中に掻き取った。細胞夾雑物をペレット化し、上清を回収した。ならし培地試料(7mls.)を収集し、次いで、濃縮し、製造業者(Amicon, Beverly, MA)によって記載されているごとくセントリプレップ(Centriprep)-10およびセントリコン(Centricon)-10ユニットを用い、緩衝液を10mMトリス、pH7.4と取り替えた。ラット神経シュワン細胞を、前記したごとくに、DNA合成前駆体の取込みについてアッセイした。ならし培地および細胞溶解物試料をMarchionni et al., Nature 362:313 (1993)に記載されているごとくシュワン細胞増殖アッセイでテストした。GGF2をコードするcDNAであるGGF2HBS5は、タンパク質産物の分泌を培地に向けた。細胞溶解物を用いるアッセイによって測定して、最小活性が細胞内部で検出可能であった。GGF2HFB1およびGGFBPP5 cDNAは、産物の分泌を細胞外培地に向けなかった。これらのクローンからのGGF活性は細胞溶解物でのみ検出可能であった。

20

30

【0144】

また、組換えGGF2をCHO細胞で発現させた。GGF2をコードするGGF2HBS5 cDNAをベクターpcdhfrpolyAのEcoRI部位にクローン化し、リン酸カルシウム共沈法によって、DHF R陰性CHO細胞系(GG44)にトランスフェクトした。96-ウェルプレートにおいてヌクレオチドおよびヌクレオシドのない培地(Gibco)でクローンを選択した。3週間後、個々のクローンからのならし培地試料を、Marchionni et al., Nature 362:313 (1993)に記載されているごとくシュワン細胞増殖アッセイによってGGFの発現についてスクリーニングした。有意なレベルのGGF活性を培地に分泌した安定クローンを同定した。CHO細胞ならし培地の異なる容量アリコートからのシュワン細胞増殖活性を用いて、図46に示す用量応答曲線を得た(GrahamおよびVan Der Eb, Virology 52:456, 1973)。この物質を、GGF2特異的ペプチドに対して生起されたポリクローナル抗血清でプローブしたウェスタンブロットで分析した。ほぼ65Kd(下垂体から抽出したGGF2の予測サイズ)のバンドが特異的に標識された(図48、レーン12)。

40

【0145】

また、バクロウイルス発現を用いて、組換えGGF2をインサート細胞中で発現させた。3~5の多重度(10<sup>6</sup>細胞/ml)にて、Sf9インサート細胞を、GGF2HBS5 cDNAクローンを含有するバクロウイルスで感染させ、Sf900-II培地で培養した。シュワン細胞分裂促進活性が細胞外培地に分泌された。フォルスコリンの不存在下、異なる容量の昆虫細胞ならし培地をシュワン細胞増殖アッセイでテストして、用量応答曲

50

線を得た。

【0146】

また、この物質を、前記したGGFII特異的抗体でプローブしたウェスタンブロット(図45B)で分析した。

【0147】

本実施例で用いた方法は以下の通りである。

【0148】

組換えヒトおよびウシ・グリア成長因子のシュワン細胞分裂促進活性は以下のように測定した：一時的ホ乳動物発現実験から得られた粗組換えGGF調製を用い、培養したシュワン細胞の分裂促進応答を5 $\mu$ Mフォルスコリンの存在下で測定した。[<sup>125</sup>I]-Urd 10  
の取込みは、「方法(Methods)」に記載したごとくトランスフェクトしたまたはモックトランスフェクトしたCOS細胞から得られた物質に18~24時間暴露した後に測定した。4セットの平均値および標準偏差のデータを示す。部分的に精製された天然ウシ下垂体GGF(カルボキシメチルセルロース画分; Goodearl et al., 提出)に対する分裂促進応答は、100パーセント活性の標準として示す(GGF)。

【0149】

cDNA(図46、配列番号166~168)をpcDL-SR 296(Takebe et al., Mol. Cell Biol. 8:466-472(1988))にクローン化し、COS-7細胞をDEAE-デキストラン法(Sambrook et al., In Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 第2版(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989))によって 20  
100mmディッシュにトランスフェクトした。トランスフェクション後3または4日に、細胞溶解物またはならし培地を収穫した。溶解物を調製するには、細胞単層をPBSで洗浄し、ディッシュから掻き取り、0.25Mトリス-HCl、pH8の150 $\mu$ l中、3回の凍結/解凍サイクルによって溶解させた。細胞夾雑物をペレット化し、上清を回収した。ならし培地試料(7ml)を収集し、次いで、濃縮し、製造業者(Amicon, Beverly, MA)によって記載されているごとくセントリプレップ-10およびセントリコン-10ユニットを用い、緩衝液を10mMトリス、pH7.4と取り替えた。ラット坐骨神経シュワン細胞を、記載されているごとく(Davis and Stroobant, J. Cell Biol. 110:1353-1360(1990)); Brockes et al., Brain Res. 165:105-118(1979))、DNA合成前駆体の取込みについてアッセイした。 30

【0150】

組換えCHO細胞ならし培地のウェスタンブロットは以下のごとくに行った：組換えCHOクローンをMCDB302無タンパク質中で3日間培養した。ならし培地2mlを収穫し、濃縮し、10mMトリス-HCl、pH7.4に関して緩衝液を交換し、凍結乾燥した。ペレットをSDS-PAGE試料緩衝液に再懸濁し、還元性SDSゲル電気泳動に付し、GGFペプチド抗体でのウェスタンブロットティングによって分析した。CHO対照は、未トランスフェクトCHO-DG44宿主からのならし培地を用いてなし、CHO HB5レベルは、組換えクローンからのならし培地を用いてアッセイした。

【0151】

#### 実施例14

##### GGFの機能的エレメントの同定

GGF配列のファミリーの推定構造は、(GGF2BPP4によって表される)最長形態が、細胞外部分が上皮成長因子に似たドメインを含有する膜貫通タンパク質をコードすることを示す(CarpenterおよびWahl, in Peptide Growth FactorsおよびTheir Receptors I, pp. 69-133, Springer-Verlag, NY 1991参照)。コーディングセグメントCおよびC/DまたはC/D'ペプチド配列に存在するシステインの位置は上皮成長因子(EGF)ペプチド配列中の相同残基に関して保存されている(図32、配列番号147~149参照)。これは、細胞外ドメインが受容体認識部位および生物学的活性化部位として働くことを示す。変異体形態のうちいくつかはH、K、およびLコーディングセグメントを欠き、かくして、分泌される拡散可能な生物学的活性タンパク質として発現され得る。EGF 50

- 様ドメイン (EGFL) を含むポリペプチドをコードする GGF DNA 配列は、グリア細胞分裂促進活性を刺激する十分な生物学的活性を有し得る。

【0152】

このタンパク質の膜結合バージョンは、胚形成の間にまたは神経再生の間にニューロンの表面で発現されれば (ここに、ニューロンの表面は増殖するシュワン細胞の表面に親和性である)、シュワン細胞の増殖を誘導し得る。

【0153】

分泌された (非膜結合) GGF は分泌地点からいくらかの距離にてシュワン細胞と相互反応できる古典的に拡散可能な因子として働き得る。他の形態は、組織の損傷および細胞の破壊を介して源により細胞内から放出され得る。分泌される GGF の例は GGF 2 HBS 5 によってコードされるタンパク質であり; これは、細胞の外部に向けられることが判明している唯一の公知 GGF である。分泌は、恐らくは、GGF 2 HBS 5 によってコードされた組換え GGF 2 内に含有される N - 末端ドメインである、領域 E にのみ見出される N - 末端疎水性配列を介して媒介される。

【0154】

他の GGF 類はスクリーニングされないようである。これら GGF 類は、筋肉の損傷の結果として放出される損傷性反応体 (injury response forms) でありうる。

【0155】

(GGF 2 HBS 5 によってコードされる) GGF 2 の予測されるタンパク質構造ならびに領域 B および A を含有する他のタンパク質の他の領域はヒト基底膜硫酸ヘパリンプロテオグリカンコアタンパク質に対する類似性を示す。これらの GGF 中に畳み込まれた C 2 免疫グロブリンの第 2 システインの隣に位置するペプチド ADSGEY は、その基底膜ラミナタンパク質で見い出される 22 の C - 2 リピートのうち 9 つで生じる。この証拠は、これらのタンパク質は、ニューロンおよびグリアに関連するものごときマトリックスタンパク質と関連し得ることを強く示し、標的部位におけるグリア成長因子の隔離方法を示唆し得る。

【0156】

実施例 15

組換え細胞からの GGF の精製

生物学的活性をアッセイするために GGF の全長または部分を得るには、クローン化 DNA を用いてタンパク質を過剰生産させることができる。いくつかのアプローチを用いることができる。前記配列を含有する組換え大腸菌を構築することができる。pNH8a または pHH16a (Stratagene, Inc.) のごとき発現系を以下の製造方法によってこの目的で用いることができる。別法として、これらの配列をホ乳動物発現ベクターに挿入し、過剰生産細胞系を構築することができる。例として、この目的では、GGF をコードする DNA、クローン GGF 2 BPP5 が COS 細胞で発現されており、pMSXND 発現ベクター (Lee and Nathans, J. Biol. Chem. 263, 3521-3527, (1981)) を用いチャイニースハムスター卵巣細胞で発現させることができる。GGF DNA 配列を含有するこのベクターは確立された手法を用いて宿主細胞にトランスフェクトすることができる。

【0157】

一時的発現を調べることができるか、あるいはメトトレキセートの存在下で G418 - 耐性クローンを増殖させて、(pMSXND ベクターに含有される) dhfr 遺伝子を増幅させ、該過程において、隣接する GGF タンパク質コーディング配列を同時増幅させる細胞について選択することができる。CHO 細胞は全くタンパク質の無い培地 (Hamilton and Ham, In Vitro 13, 537-547 (1977)) で維持することができるので、所望のタンパク質は培地から精製することができる。実施例 17 で産生された抗血清を用いるウェスタン分析を用いて、過剰生産細胞のならし培地中で所望のタンパク質の存在を検出することができる。

【0158】

所望のタンパク質 (rGGF 2) は、以下のごとく COS 細胞を一時的に発現させること

10

20

30

40

50

によってならし培地から精製することができる。rGGFIIをならし培地から収穫し、陽イオン交換クロマトグラフィー(POROS-HS)を用いて部分的に精製した。カラムは33.3mM MES、pH6.0で平衡化した。ならし培地は10ml/分の流速で負荷した。シュワン細胞増殖活性および(前記したGGFペプチドに対するポリクローナル抗血清を用いる)免疫反応性を含有するピークを50mMトリス、1M NaCl、pH8.0で溶出させた。

**【0159】**

また、安定したチャニーズハムスター卵巣細胞系を用いてrhGGF2を発現させる。ならし培地から収穫したrGGF2を、陽イオン交換クロマトグラフィー(POROS-HS)を用いて部分的に精製した。カラムはPBS、pH7.4で平衡化させた。ならし培地は10ml/分で負荷した。シュワン細胞増殖活性および(GGF2ポリクローナル抗血清を用いる)免疫反応性を含有するピークを50mM Hepes、500mM NaCl、pH8.0で溶出させた。増殖ならびに免疫反応性双方に関し、さらなるピークが50mM Hepes、1M NaCl、pH8.0で観察された(図45)。

10

**【0160】**

rhGGF2は、高分解工程としての疎水性相互作用クロマトグラフィー;陽イオン交換/逆相クロマトグラフィー(第2の高分解工程として必要であれば);ウイルス不活性化工程および陰イオン交換クロマトグラフィーのごときDNA除去工程を用いてさらに精製することができる。

**【0161】**

陽イオン交換カラムから溶出させた組換えGGF2ピークのシュワン細胞増殖活性は以下のように測定した:培養したシュワン細胞の分裂促進応答を、50mMトリス 1M NaCl、pH8.0によって溶出させたピークを用い、5Mフォルスコリンの存在下で測定した。ピークは20<sup>1</sup>、10<sup>1</sup>(1:10)および(1:100)10<sup>1</sup>で添加した。<sup>125</sup>I-ウリジンの取込みを測定し、18~24時間の暴露の後に(CPM)として測定し、表した。

20

**【0162】**

GGF2のペプチドに対して生起したポリクローナル抗体を用いるイムノプロットは以下のごとくに行った:10<sup>1</sup>の異なる画分を4~12%のグラジエントゲルで泳動させた。該ゲルをニトロセルロースペーパーに移し、ニトロセルロースプロットを5%BSAでブロックし、GGF2-特異的抗体(1:250希釈)でプローブした。<sup>125</sup>IプロテインA(1:500希釈、比活性=9.0/CI/g)を第2抗体として用いた。イムノプロットをコダック社製X-線フィルムに6時間暴露した。1M NaClで溶出させたピーク画分は69Kで免疫反応性バンドを示した。

30

**【0163】**

陽イオン交換カラムでのGGF2精製は以下のごとくに行った:rGGFIIを発現するCHO細胞ならし培地を10ml/分で陽イオン交換カラムに負荷した。該カラムをPBS、pH7.4で平衡化した。溶出は各々50mM Hepes、500mM NaCl、pH8.0および50mM Hepes、1M NaCl、pH8.0で達成した。前記したシュワン細胞増殖アッセイ(CPM)を用いてすべての画分を分析した。タンパク質濃度(mg/ml)は、標準としてBSAを用いるブラッドフォード(Bradford)アッセイによって測定した。

40

**【0164】**

各画分10<sup>1</sup>を用いるウェスタンプロットを行い、免疫反応性およびシュワン細胞活性は共移動するのが観察された。

**【0165】**

ウェスタンプロットアッセイを用い、タンパク質を手法の種々の時点でアッセイすることができる。別法として、前記したシュワン細胞分裂促進アッセイを用いて、全長クローンまたはそのいずれかの生物学的活性タンパク質の発現産物をアッセイすることができる。全長クローンGGF2HBS5はCOS細胞で一時的に発現される。トランスフェクトさ

50

れたCOS細胞の細胞内抽出物は、実施例8に記載したシュワン細胞増殖アッセイ法でアッセイした場合、生物学的活性を示す。加えて、GGF2BPP5をコードする全長クローンをCOS細胞で一時的に発現させた。この場合、細胞抽出物およびならし培地は共に、実施例8に記載したシュワン細胞増殖アッセイで生物学的活性を示す。(ヘレグリンを包含する)GGF遺伝子に由来するスプライシング変異体相補的DNAのファミリーのいずれのメンバーもこのようにして発現させることができ、当業者がシュワン細胞増殖アッセイでアッセイすることができる。

#### 【0166】

別法として、スプライシング変異体Neu分化因子(NDF)をCOS-7細胞で発現させたWen et al. (Cell 69:559 (1992))に従い、他の変異体から組換え物質を単離することができる。pJT-2真核生物プラスミドベクターに挿入されたcDNAクローンはSV40初期プロモーターの制御下であり、SV40終結およびポリアデニル化シグナルで3'がフラックされている。COS-7細胞を、エレクトロポレーションによって以下のごとくにpJT-2プラスミドDNAでトランスフェクトした:  $6 \times 10^6$ 細胞(DMEMおよび10%FBSの0.8ml中)を0.4cmのキュベットに移し、TE溶液(10mMトリス-HCl(pH8.0)、1mMEDTA)10 $\mu$ l中、プラスミドDNA20 $\mu$ gと混合した。200ohmに設定したパルスコントローラーユニットを装備したBio-Rad Gene パルサー装置を用い、1600Vおよび25 $\mu$ Fにてエレクトロポレーションを室温で行った。次いで、細胞をDMEM、10%FBSの20mlに希釈し、T75フラスコ(Falcon)に移した。37におけるインキュベーションの14時間後、培地をDMEM、1%FBSで置き換え、インキュベーションをさらに48時間継続した。細胞から収穫した組換えタンパク質を含有するならし培地は、このタンパク質についての受容体を発現する細胞系において生物学的活性を示した。この細胞系(培養したヒト胸カルシノーマ細胞系AU565)を組換え物質で処理した。処理した細胞は、erbB2受容体の活性化に特徴的な形態学的変化を示した。また、このタイプのならし培地をシュワン細胞増殖アッセイでテストすることもできる。

#### 【0167】

##### 実施例16

##### N-末端配列分析

hGGF2をコードするcDNAを増幅可能なベクターpcdhfrpolyAにクローン化し、安定な発現のためにCHO-DG44細胞にトランスフェクトした。rhGGF2がならし培地に分泌された。組換えGGF2の分泌される能力は、恐らくは、N-末端疎水性ストレッチ(シグナル配列)により媒介される。一旦粗小胞体を横切って成長するタンパク質の輸送を開始したならば、シグナル配列は特異的部位において成熟タンパク質から切断される。発現され精製されたrhGGF2のN-末端配列分析は後記にて示す切断部位を示す。タンパク質のN-末端における最初の50のアミノ酸残基の配列は、後記するN-末端配列分析によって確認された(表5)。

#### 【0168】

##### 【表5】

10

20

30

表 5  
rhGGF2 の N - 末端配列分析

サイクル #	最初の配列	ピコモル
1	Gly (G)	210.6
2	Asn (N)	163
3	GLU (E)	149
4	Ala (A)	220
5	Ala (A)	180
6	Pro (P)	173
7	Ala (A)	177
8	Gly (G)	154.9
9	Ala (A)	162.4
10	Ser (S)	65.4
11	Val (V)	132.7
12	Val (V) *(Cys)	11.7
13	Tyr (Y)	112.7
14	Ser (S)	47.6
15	Ser (S)	27.1

N-末端配列分析はエドマン分解プロセスによって行う。

\* Cys 残基は分解プロセスによって破壊され、検出できない。

【 0 1 6 9 】

以下の配列 (配列番号 : 1 8 5 ) は、h G G F 2 のアミノ酸配列を表す。影を付けた領域は切断されたシグナル配列を示す。

【 0 1 7 0 】

【 外 2 】

**MTWRRAPRRS GREGPRAORP GSNARSSPPL PPLPRLMMLG LAALAPGAMA**  
 GNEAAPAGAS VCYSSPPSVG SVQELAQRRA VVIEGKVHPQ RRQOGALDRK  
 AAAAAGEAGA WGGDREPPAA GPRALGPPAE EPLLAANGTV PSWPTAPVPS  
 AGEPEGEEAPY LVKVHQVWAV KAGGLKKDSL LTVRLGTWGH PAFPSGRLK  
 EDSRYIFFME PDANSTSRAP AAFRASFPPL ETGRNLKKEV SRVLCRCAL  
 PPQLKEMKSQ ESAAGSKLVL RCETSSEYSS LRFKWFKNGN ELNRKNKPQN  
 IKIQKKPGKS ELRINKASLA DSGEYMCKVI SKLGNDSASA NITIVESNAT  
 STSTTGTHL VKCAEKEKTF CVNGGECFMV KDLSNPSRYL CKCPNEFTGD  
 RCQNYVMASF YSTSTPFLSL PE (SEQ ID NO: 185)

【 0 1 7 1 】

影を付けた領域は、r h G G F 2 の N - 末端における実験的に決定した 1 5 のアミノ酸残基を表し、A<sub>50</sub> - G<sub>51</sub> 結合がシグナル配列の切断部位であることを示す。

【 0 1 7 2 】

#### 実施例 1 7

##### さらなるスプライシング変異体の単離

ここに引用して本明細書の一部とみなす、1992年10月23日付け出願の米国特許出願07/965,173号に記載されている他のニューレグリンを更新する (updating) 方法により、スプライシング変異の結果として生じる4つの密接に関連する配列 (ヘレグリン、1、2、3) が産生されている。Peles et al. (Cell 69:205 (1992))、および Wen et al. (Cell 69:559 (1992)) は、p 1 8 5<sup>erbB2</sup> に結合するタンパク質に關与する実施例 1 ~ 9 および 1 1 に記載されたものと同様の精製およびクローニングアプローチを用いてもう1つのスプライシング変異体を (ラットから) 単離している。cDNA クローンは、(形質転換ラット線維芽細胞系から p 1 8 5<sup>erbB2</sup> 結合タンパク質を精製し配列決定することにより) 以下のようにして得られた。p 1 8 5<sup>erbB2</sup> 結合タンパク質はならし培地から以下のごとくに精製された。500ローラボトル (合計120リットル) の3つの収穫物からのプールされたならし培地を0.2μフィルターを通す濾過によって清澄化し、20kd分子量カットオフの膜を用い、ペリコン (Pellicon) 限外濾過系にて31倍濃縮した。すべての精製工程は、ファルマシア社製のファストタンパク質液体クロマトグラフィシステムを用いることによって行った。濃縮した物質をヘパリン - セファロースのカラム (150ml、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) で予め平衡化) に直接負荷した。280nm波長での吸光度が検出されなくなるまで、0.2M NaCl を含有する PBS でカラムを洗浄した。次いで、結合タンパク質を NaCl の連続的グラジエント (0.2M から 1.0M) (250ml) で溶出し、5ml ずつの画分を収集した。試料 (収集した画分からの 0.01ml) をキナーゼ刺激活性の定量アッセイで用いた。3回カラムを流して (合計容量 = 360ml) 活性画分をプールし、YM10限外濾過膜 (Amicon, Danvers, MA) を用いることによって濃縮し、硫酸アンモニウムを濃度 1.7M に到達するまで添加した。遠心 (10,000 × g、15分) によって清澄化した後、プールした物質をフェニル - セファロースカラム (HR10/10、ファルマシア社製) に負荷した。該カラムを 0.1M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4) 中の (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> のグラジエント (1.7M ないし無塩) 45ml で展開し、2ml ずつの画分を収集し、(実施例 19 に記載した) キナーゼ刺激につきアッセイした (試料当たり 0.002ml)。活性の主要ピークをプールし、50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.3) に対して透析した。モノ - S 陽イオン交換カラム (HR5/5、ファルマシア社製) を 50mM リン酸ナトリウムで予め平衡化した。活性物質 (タンパク質 0.884mg; 35ml) を負荷した後、カラムを出発緩衝液で洗浄し、次いで、NaCl のグラジエントにて、1ml / 分の液速で展開した。キナーゼ刺激活性物を 0.45 ~ 0.55M 塩にて回収し、各 2ml ずつの4つの画分にわたって展開した。これらをプールし、Cu<sup>2+</sup>キレート化カラムに直接負荷した (1.6ml、HR2/5キレート化セファロース、ファルマシア社製)。タンパク質のほとんどは樹脂に吸着したが、それらは、塩化アンモニウムの 30ml 直線グラジエント (0 ~ 1M) で徐々に溶出した。活性は 0.05 ないし 0.2M NH<sub>4</sub>Cl の範囲で、タンパク質の単一ピークにて溶出した。精製の種々の工程からの試料を、ゲル電気泳動、続いての ICN からのキット (Costa Mesa, CA) を用いる銀染色によって分析し、そのタンパク質含量をバイオ - ラド (Bio-Rad) (Richmond, CA) からのキットを用いるクーマシーブルー染料結合アッセイで測定した。

【 0 1 7 3 】

p 4 4 タンパク質 (10μg) を 0.1M 炭酸水素アンモニウム緩衝液 (pH 7.8) 200μl 中で復元した。1:10の酵素 - 対 - 基質の比にて、37℃ で、L - 1 - トシル - アミド 2 - フェニルエチルクロロメチルケトン - 処理トリプシン (Serva) で 18時間消化を行った。得られたペプチド混合物を逆相 HPLC によって分離し、ヴィダック (Vyducc) C4マイクロカラム (2.1mm i.d. × 15cm、300Å) およびダイオード - ア

10

20

30

40

50

レイ検出器およびワークステーションを装備した H P 1 0 9 0 液体クロマトグラフィーシステムを用いて 2 1 5 n m でモニターした。カラムを 0 . 1 % トリフルオロ酢酸 ( 移動相 A ) で平衡化し、溶出は 7 0 分間にわたる 0 % ~ 5 5 % 移動相 B ( 0 . 1 % トリフルオロ酢酸中の 9 0 % アセトニトリル ) からの直線グラジエントで行った。流速は 0 . 2 m l / 分であり、カラム温度は 2 5 で制御した。H P L C 系から手動で収集したペプチドピークの 1 / 3 アリコート、エドマン分解による N - 末端配列分析によって特徴付けた。2 7 . 7 分 ( T 2 7 . 7 ) 後に溶出した画分は混合されたアミノ酸配列を含有し、還元の後、以下のごとくさらに再クロマトグラフィーに付した : ペプチド画分の 7 0 % アリコートを真空中で乾燥し、0 . 2 M 炭酸水素アンモニウム緩衝液 ( p H 7 . 8 ) 1 0 0 μ l 中で還元した。D T T ( 終濃度 2 m M ) を溶液に添加し、これを、次いで、3 7 で 3 0 分間インキュベートした。次いで、ヴィダックカラム ( 2 . 1 m m i . d . x 1 5 c m ) を用い、還元したペプチド混合物を逆相 H P L C によって分離した。溶出条件および流速は前記と同じである。ペプチドのアミノ酸配列分析は、オン - ラインのフェニルチオヒダントイン ( P T H ) アミノ酸アナライザーおよびモデル 9 0 0 データ解析システム ( Hunkapiller et al. (1985) *Methods of Protein Microcharacterization*, J.E. Shively 編 ( Clifton, New Jersey: Humana Press, p. 223-247 ) ) を備えたモデル 4 7 7 タンパク質シーケンサー ( Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA ) で行った。予めポリブレンおよび N a C l でサイクルを行ったトリフルオロ酢酸処理したガラス繊維ディスクにタンパク質を負荷した。P H T - アミノ酸分析は、デュアルシリンジポンプおよび逆相 ( C - 1 8 ) の狭い孔のカラム ( Applied Biosystems, 2 . 1 m m x 2 5 0 m m ) を用いてマイクロ液体クロマトグラフィーシステム ( Model 120 ) で行った。標準的な手法 ( Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* ( Cold Spring Harbor, New York (1982) ) ) によって R N A をラット 1 - E J 細胞から単離し、m R N A セパレータキット ( Clontech Lab, Inc., Palo Alto, CA ) を用いてポリ ( A ) <sup>+</sup> を選択した。 ( B R L Life Technologies, Inc., Bethesda, MD からの ) スーパースクリプト ( Superscript ) キットで c D N A を合成した。カラム分画した二本鎖 c D N A を S a l 1 - および N o t 1 - 消化の p J T - 2 プラスミドベクター、すなわち p C D - X ベクター ( Okayama および Berg, *Mol. Cell Biol.* 3:280 (1983) ) の誘導体に連結し、エレクトロポレーション ( Dower et al., *Nucl. Acids. Res.*, 16:6127 (1988) ) によって D H 1 0 B 大腸菌細胞に形質転換した。N D F の N - 末端のタンパク質配列 ( 残基 5 ~ 2 4 ) および T 4 0 . 0 トリプテック ( tryptic ) ペプチド ( 残基 7 ~ 1 2 ) に由来する 2 つのオリゴヌクレオチドプローブで、ほぼ 5 × 1 0 <sup>5</sup> 初代形質転換体をスクリーニングした。その各配列は以下の通りである ( N はすべての 4 つの n t を示す ) :

【外 3】

(1) 5'-ATA GGG AAG GGC GGG GGA AGG GTC NCC CTC NGC

A T

AGG GCC GGG CTT GCC TCT GGA GCC TCT-3'

(2) 5'-TTT ACA CAT ATA TTC NCC-3'

C G G C

(1: SEQ ID No. 163; 2: SEQ ID No. 164)

【0174】

T 4 ポリヌクレオチドキナーゼと共に [ - <sup>32</sup>P ] A T P で、合成オリゴヌクレオチドを末端標識し、ニトロセルロースフィルターの複製セットをスクリーニングするのに用いた。ハイブリダイゼーション溶液は、6 × S S C、5 0 m M リン酸ナトリウム ( p H 6 . 8 )、0 . 1 % ピロリン酸ナトリウム、2 × デンハート溶液、5 0 μ g / m l サケ精子 D N A、および 2 0 % ホルムアミド ( プローブ 1 につき ) またはホルムアミド無し ( プローブ

10

20

30

40

50

2につき)を含有するものであった。50 で、0.5 x SSC、0.2% SDS、2 mM EDTA (プローブ1につき)でフィルターを洗浄するか、あるいは37 で、2 x SSC、0.2% SDS、2 mM EDTA (プローブ2につき)でフィルターを洗浄した。フィルターのオートラジオグラフィは両プローブにハイブリダイズする10のクローンを与えた。これらのクローンを、前記したごとき再平板培養およびプローブハイブリダイゼーションによって精製した。製造業者の指示に従い、アプライド・バイオシステムズ (Applied Biosystems) 373A自動DNAシーケンサーおよびアプライド・バイオシステムズ・タック・ダイデオキシ (Taq DyeDeoxy) (商品名)ターミネーターサイクル配列決定キットを用いて、cDNAクローンを配列決定した。いくつかの場合、製造業者の指示に従い、米国バイオケミカルズ社 (Biochemicals) からの [<sup>35</sup>S] dATP (Amersham) およびセクエナーゼ (Sequenase) (商品名)キットを用いて配列を得た。cDNAクローン44の両鎖は、プライマーとして合成オリゴヌクレオチドを用いることによって配列決定した。最も5'の350 ntの配列は、7つの独立したcDNAクローンで決定された。得られたクローンは、図27 (NDF) に示したパターンを示した。

【0175】

#### 実施例 19

##### p185<sup>erbB2</sup>受容体に結合する他のタンパク質の精製およびアッセイ

##### I. gp30およびp70の精製

Lupe et al. (Science 249, 1552 (1990))およびここに引用して本明細書の一部とみなす LippmanおよびLupe (国際出願 PCT / US 91 / 03443 (1990)) は、ヒト胸癌細胞系 MDA - MB - 231 のならし培地からタンパク質を精製している。

【0176】

Lupe et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 89, 2287 (1992)) は、p185<sup>erbB2</sup>受容体に結合するもう1つのタンパク質を精製している。この特定のタンパク質 p75 は、10% 子ウシ血清 (GIBCO) を補足した改良イーグル培地 (I MEM : GIBCO) 中で増殖した SKBr-3 (ヒト胸癌細胞系) の増殖で用いたならし培地から精製された。

【0177】

##### II. 他の p185<sup>erbB2</sup>リガンド

また、Pelesら (Cell 69, 205 (1992)) は、ラット細胞から 185<sup>erbB2</sup> 刺激リガンドを精製している。Holmesら (Science 256, 1205 (1992)) は、p185<sup>erbB2</sup> に結合しそれを刺激するヒト細胞からヘレグリン を精製している。Tarakovsky et al., Oncogene 6:218 (1991) は、活性化マクロファージから単離された 25 kD のポリペプチドの Neu 受容体への結合、p185<sup>erbB2</sup> 相同性を示しており、ここに引用して本明細書の一部とみなす。

【0178】

##### III. NDF 単離

Yarden および Peles (Biochemistry 30, 3543 (1991)) は 185<sup>erbB2</sup> 受容体を刺激する 35 キロダルトンの糖タンパク質を同定している。

【0179】

他の文献において、Davisら (Biochem. Biophys. Res. Commun. 179, 1536 (1991)), Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 8582 (1991) および Greeneら (国際出願 PCT / US 91 / 02331 (1990)) は、ヒト T - 細胞 (ATL - 2) 細胞系のならし培地からのタンパク質の精製を記載している。

【0180】

ここに引用して本明細書の一部とみなす、Huangら (1992, J. Biol. Chem. 257:11508-11512) は、ウシ腎臓からさらなる neu / erb B2 リガンド成長因子を単離している。25 kD ポリペプチド因子は、カラム分画、続いての DEAE / セルロース (DE52)、スルファデックス (Sulfadex) (硫酸化セファデックス G-50)、ヘパリン-セファロース 4B、およびスーパーデックス (Superdex) 75 (ファストタンパク質液体クロマトグラフィ) の連続的カラムクロマトグラフィによって単離された。因子 NEL - GF は neu / erb B2 遺伝子産物のチロシン特異的自己リン酸化を刺激する。

10

20

30

40

50

## 【0181】

IV. アセチルコリン受容体誘導活性 (A R I A) の精製

A R I A、アセチルコリン受容体合成を刺激する42 k Dタンパク質は、ジェラルド・フィッシュバッハ (Gerald Fischbach) (Falls et al., (1993) Cell 72:801-815)の研究所で単離されている。A R I Aは185<sup>erbB2</sup>に類似する185 k D a筋肉膜貫通タンパク質のチロシンリン酸化を誘導し、培養した胚性筋管でアセチルコリン受容体合成を刺激する。A R I AはまずはG G F / e r b B 2リガンド群タンパク質のメンバーであるらしく、これは、グリア細胞分裂促進刺激および本明細書に記載した例えばG G F 2の適用で潜在的に有用である。

## 【0182】

実施例 19G G Fによって媒介されるタンパク質チロシンリン酸化

増殖を誘導する十分なレベルのグリア成長因子での処理に続き、ラット・シュワン細胞は、タンパク質チロシンリン酸化の刺激を示す。実施例9に概略を示した手法に従い、種々の量の部分的に精製したG G Fをラット・シュワン細胞の初代培養に適用した。シュワン細胞は、ポリD - リシン被覆した24ウェルプレート中、D M E M / 10%子ウシ血清 / 5 μ M フォルスコリン / G G F - C M 1 m L 当たり 0.5 μ g (ウェル当たり 0.5 m L) で増殖させた。密集したら、D M E M / ウェル当たり 0.5 m L の 10%子ウシ血清を細胞に与え、休止するまでインキュベーター中に一晩放置した。翌日、細胞にD M E M / 10%子ウシ血清の0.2 m L を与え、インキュベーター中に1時間放置した。次いで、テスト試料を、要求される異なる濃度および異なる時間にて直接培地に添加した。次いで、細胞を、沸騰する溶解緩衝液 (リン酸ナトリウム、5 m M、p H 6.8 ; S D S , 2% , -メルカプトエタノール, 5% ; ジチオスレイトール, 0.1 M ; グリセロール, 10% ; プロモフェノールブルー, 0.4% ; パナジン酸ナトリウム, 10 m M) 中で溶解し、沸騰する水浴中で10分間インキュベートし、次いで、直接分析するか、あるいは - 70 で凍結した。7.5% S D S - P A G E ゲル上で泳動させ、次いで、Towbin et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354によって記載されている標準的な手法を用いてニトロセルロースに電気プロットングすることによって、試料を分析した。プロットしたニトロセルロースを、KampsおよびSelton (1988) Oncogene 2:305-315に記載されている標準的な方法を用いて抗ホスホチロシン抗体でプローブした。プローブしたプロットをオートラジオグラフィーフィルムに一晩暴露し、標準的な実験方法を用いて展開した。デントメトリー測定は、ウルトラスキャン (Ultrascan) X L 増強レーザーデントメーター (L K B) を用いて行った。分子量の測定は、予め染色した高分子量のスタンダード (Sigma) に対して行った。タンパク質リン酸化およびシュワン細胞増殖の用量応答は非常に似ている (図33)。リン酸化バンドの分子量はp 185<sup>erbB2</sup>の分子量に非常に近い。G G F 2 H B S 5 クローンでC O S 細胞翻訳体から調製したならし培地でシュワン細胞を処理した場合、同様の結果が得られた。これらの結果は、G G F と、185<sup>erbB2</sup>の活性化との予測される相互作用とよく相関する。

## 【0183】

この実験を組換えG G F 2で反復した。G G F 2クローン (G G F 2 H B S 5) で安定に形質転換したC H O 細胞系に由来するならし培地は、前記したアッセイを用いると、タンパク質チロシンリン酸化を刺激する。モックトランスフェクトしたC H O 細胞はこの活性を刺激しない。

## 【0184】

実施例 20G G F の N - グリコシル化

G G F - II 候補クローン G G F 2 B P P 1、2 および 3 の c D N A 配列から予測されるタンパク質配列は、多数のコンセンサス N - グリコシル化モチーフを含有する。G G F I I 0 2 ペプチド配列におけるギャップは、これらのモチーフのうちの1つにおけるアスパラギン残基に合致し、これは、炭水化物は恐らくはこの部位にて結合していることを示す。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 8 5 】

G G F の N - グリコシル化は、N - グルカナーゼ、すなわち、炭水化物とタンパク質におけるアスパラギン残基との間の共有結合を切断する酵素と共にインキュベーションした後、S D S - P A G E における移動度変化を観察することによって調べた。

## 【 0 1 8 6 】

G G F - II の N - グルカナーゼ処理により、M W 4 0 ~ 4 2 k D の主たるバンドおよび 4 5 ~ 4 8 k D a の従たるバンドが生じた。

## 【 0 1 8 7 】

活性 約 4 5 ~ 5 0 k D a における単一の脱グリコシル化種

また、G G F - I での活性溶出実験は、N - グルカナーゼで処理した場合に電気泳動移動度の増大を示し、これは、M W 2 6 ~ 2 8 k D a の活性種を与える。用いた試料におけるバックグラウンド染色のため N - 脱グリコシル化バンドは割り当てできないにも拘わらず、銀染色により、移動度のシフトがあることが確認された。

10

## 【 0 1 8 8 】

## 【 配列表 】

## SEQUENCE LISTING

- <110> Sklar, Robert  
Marchionni, Mark  
Gwynne, David I.
- <120> METHODS FOR TREATING MUSCLE DISEASES AND DISORDERS 10
- <130> JP-13964
- <150> US 08/209,204  
<151> 1994-03-08 20
- <150> US 08/059,022  
<151> 1993-05-06
- <160> 185
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0 30
- <210> 1  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Bos taurus
- <400> 1 40  
Phe Lys Gly Asp Ala His Thr Glu  
1 5

<210> 2  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

<220> 10  
 <221> VARIANT  
 <222> 1  
 <223> Xaa = Lysine or Arginine

<221> VARIANT  
 <222> 12  
 <223> Xaa = Any Amino Acid 20

<400> 2  
 Xaa Ala Ser Leu Ala Asp Glu Tyr Glu Tyr Met Xaa Lys  
 1                      5                      10

<210> 3  
 <211> 12 30  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 1  
 <223> Xaa = Lysine or Arginine 40

<221> VARIANT

<222> 10

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 3

Xaa Thr Glu Thr Ser Ser Ser Gly Leu Xaa Leu Lys

1

5

10

10

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

20

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Lysine or Arginine.

<400> 4

Xaa Lys Leu Gly Glu Met Trp Ala Glu

1

5

30

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

40

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Lysine or Arginine.

<400> 5

Xaa Leu Gly Glu Lys Arg Ala

1                      5

10

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> VARIANT

20

<222> 1

<223> Xaa = Lysine or Arginine.

<400> 6

Xaa Ile Lys Ser Glu His Ala Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys

1                      5                      10                      15

30

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> VARIANT

40

<222> 1

<223> Xaa = Lysine or Arginine.

<400> 7

Xaa Ala Ser Leu Ala Asp Glu Tyr Glu Tyr Met Arg Lys

1                      5                      10

<210> 8

10

<211> 16

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

20

<223> Xaa = Lysine or Arginine.

<400> 8

Xaa Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys

1                      5                      10                      15

<210> 9

30

<211> 13

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

40

<223> Xaa = Lysine or Arginine

<221> VARIANT

<222> 12

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 9

Xaa Met Ser Glu Tyr Ala Phe Phe Val Gln Thr Xaa Arg

1

5

10

10

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Bos taurus

20

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Lysine or Arginine

<400> 10

Xaa Ser Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Thr Ala Lys

1

5

10

30

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Bos taurus

40

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Lysine or Arginine

<221> VARIANT

<222> 8

<223> Xaa = Any Amino Acid

10

<400> 11

Xaa Ala Gly Tyr Phe Ala Glu Xaa Ala Arg

1

5

10

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Bos taurus

20

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Lysine or Arginine

30

<221> VARIANT

<222> 7

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 12

Xaa Lys Leu Glu Phe Leu Xaa Ala Lys

1

5

40

<210> 13  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

<220> 10  
 <221> VARIANT  
 <222> 1  
 <223> Xaa = Lysine or Arginine.

<400> 13  
 Xaa Thr Thr Glu Met Ala Ser Glu Gln Gly Ala  
 1                      5                      10                      20

<210> 14  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

<220> 30  
 <221> VARIANT  
 <222> 1  
 <223> Xaa = Lysine or Arginine.

<400> 14  
 Xaa Ala Lys Glu Ala Leu Ala Ala Leu Lys  
 1                      5                      10                      40

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

10

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Lysine or Arginine.

<400> 15

Xaa Phe Val Leu Gln Ala Lys Lys

1

5

20

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

30

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Lysine or Arginine.

<400> 16

Xaa Leu Gly Glu Met Trp

1

5

40

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> **Bos taurus**

<400> 17

Glu Tyr Lys Cys Leu Lys Phe Lys Trp Phe Lys Lys Ala Thr Val Met

1

5

10

15

10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> **Bos taurus**

20

<220>

<221> VARIANT

<222> 8

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 18

Glu Ala Lys Tyr Phe Ser Lys Xaa Asp Ala

1

5

10

30

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> **Bos taurus**

40

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 19

Glu Xaa Lys Phe Tyr Val Pro

1

5

10

<210> 20

<211> 26

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 20

20

Glu Leu Ser Phe Ala Ser Val Arg Leu Pro Gly Cys Pro Pro Gly Val

1

5

10

15

Asp Pro Met Val Ser Phe Pro Val Ala Leu

20

25

<210> 21

<211> 2003

30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<222> 31, 32

<223> n = A or G.

40

<221> CDS

<222> (265)... (1530)

<223>

<400> 21

ggaattcctt tttttttttt tttttttctt nttttttttt tgccttata cctcttcgcc	60	
ttctgtggt tccatccact tcttccccct cctctcicca taaacaactc tcttaccctt	120	10
gcacccccaa taaataaata aaaggaggag ggcaaggggg gaggaggagg agtgggtctg	180	
cgaggggaag gaaaaggag gcagcgcgag aagagccggg cagagtcgga accgacagcc	240	
agaagccccg acgcacctcg cacc atg aga tgg cga cgc gcc ccg cgc cgc	291	
Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg		
1 5		
tcc ggg cgt ccc ggc ccc cgg gcc cag cgc ccc ggc tcc gcc gcc cgc	339	20
Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg		
10 15 20 25		
tcg tcg ccg ccg ctg ccg ctg ctg cca cta ctg ctg ctg ctg ggg acc	387	
Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Gly Thr		
30 35 40		30
gcg gcc ctg gcg ccg ggg gcg gcg gcc ggc aac gag gcg gct ccc gcg	435	
Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala		
45 50 55		
ggg gcc tcg gtg tgc tac tcg tcc ccg ccc agc gtg gga tcg gtg cag	483	
Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln		
60 65 70		40

gag cta gct cag cgc gcc gcg gtg gtg atc gag gga aag gtg cac ccg	531	
Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro		
75 80 85		
cag cgg cgg cag cag ggg gca ctc gac agg aag gcg gcg gcg gcg gcg	579	
Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala Leu Asp Arg Lys Ala Ala Ala Ala Ala		
90 95 100 105		10
ggc gag gca ggg gcg tgg ggc ggc gat cgc gag ccg cca gcc gcg ggc	627	
Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly		
110 115 120		
cca cgg gcg ctg ggg ccg ccc gcc gag gag ccg ctg ctc gcc gcc aac	675	
Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro Ala Glu Glu Pro Leu Leu Ala Ala Asn		20
125 130 135		
ggg acc gtg ccc tct tgg ccc acc gcc ccg gtg ccc agc gcc ggc gag	723	
Gly Thr Val Pro Ser Trp Pro Thr Ala Pro Val Pro Ser Ala Gly Glu		
140 145 150		
ccc ggg gag gag gcg ccc tat ctg gtg aag gtg cac cag gtg tgg gcg	771	30
Pro Gly Glu Glu Ala Pro Tyr Leu Val Lys Val His Gln Val Trp Ala		
155 160 165		
gtg aaa gcc ggg ggc ttg aag aag gac tgc ctg ctc acc gtg cgc ctg	819	
Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu		
170 175 180 185		40
ggg acc tgg ggc cac ccc gcc ttc ccc tcc tgc ggg agg ctc aag gag	867	

Gly Thr Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu		
190	195	200
gac agc agg tac atc ttc ttc atg gag ccc gac gcc aac agc acc agc	915	
Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser		
205	210	215
cgc gcg ccg gcc gcc ttc cga gcc tct ttc ccc cct ctg gag acg gcc	963	10
Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly		
220	225	230
cgg aac ctc aag aag gag gtc agc cgg gtg ctg tgc aag cgg tgc gcc	1011	
Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys Ala		
235	240	245
ttg cct ccc caa ttg aaa gag atg aaa agc cag gaa tcg gct gca ggt	1059	
Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly		
250	255	260
tcc aaa cta gtc ctt cgg tgt gaa acc agt tct gaa tac tcc tct ctc	1107	
Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu		30
270	275	280
aga ttc aag tgg ttc aag aat ggg aat gaa ttg aat cga aaa aac aaa	1155	
Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys		
285	290	295
cca caa aat atc aag ata caa aaa aag cca ggg aag tca gaa ctt cgc	1203	40
Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg		

300	305	310		
att aac aaa gca tca ctg gct gat tct gga gag tat atg tgc aaa gtg			1251	
Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val				
315	320	325		
atc agc aaa tta gga aat gac agt gcc tct gcc aat atc acc atc gtg			1299	10
Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val				
330	335	340	345	
gaa tca aac gct aca tct aca tcc acc act ggg aca agc cat ctt gta			1347	
Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val				
350	355	360		20
aaa tgt gcg gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat gga ggg gag tgc			1395	
Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys				
365	370	375		
ttc atg gtg aaa gac ctt tca aac ccc tcg aga tac ttg tgc aag tgc			1443	
Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys				
380	385	390		30
cca aat gag ttt act ggt gat cgc tgc caa aac tac gta atg gcc agc			1491	
Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser				
395	400	405		
ttc tac agt acg tcc act ccc ttt ctg tct ctg cct gaa taggagcatg			1540	
Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu				40
410	415	420		

ctccagttggt gctgctttct tgttgcigca tctcccctca gattccacct agagctagat 1600  
 gtgtcttacc agatctaata ttgactgcct ctgccctgctg catgagaaca ttaacaaaag 1660  
 caattgtatt acttctctcg ttcgcgacta gtiggctctg agatactaat aggtgtgtga 1720  
 ggctccggat gtttctggaa ttgatattga atgatgtgat acaaattgat agtcaataic 1780  
 aagcagtga aatgataat aaaggcattt caaagctca cttttattga taaaataaaa 1840  
 atcattctac tgaacagtcc atcttcttta tacaatgacc acatcctgaa aaggggtgtg 1900  
 ctaagctgta accgatatgc acttgaaatg atggtaagtt aattttgatt cagaatgtgt 1960  
 tattgtcac aaataaacat aataaaaagga aaaaaaaaaa aaa 2003

10

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Bos taurus

20

<220>

<221> VARIANT

<222> 11

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 22

30

Ala Ser Leu Ala Asp Glu Tyr Glu Tyr Met Xaa Lys

1

5

10

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Bos taurus

40

<220>

<221> VARIANT

<222> 9

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 23

Thr Glu Thr Ser Ser Ser Gly Leu Xaa Leu Lys

1

5

10

10

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> Bos taurus

20

<400> 24

Ala Ser Leu Ala Asp Glu Tyr Glu Tyr Met Arg Lys

1

5

10

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Bos taurus

30

<220>

<221> VARIANT

<222> 7

<223> Xaa = Any Amino Acid

40

<400> 25

Ala Gly Tyr Phe Ala Glu Xaa Ala Arg

1 5

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

<213> Bos taurus

10

<400> 26

Thr Thr Glu Met Ala Ser Glu Gln Gly Ala

1 5 10

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Bos taurus

20

<400> 27

Ala Lys Glu Ala Leu Ala Ala Leu Lys

1 5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Bos taurus

30

<400> 28

Phe Val Leu Gln Ala Lys Lys

1 5

40

<210> 29  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

<400> 29 10  
 Glu Thr Gln Pro Asp Pro Gly Gln Ile Leu Lys Lys Val Pro Met Val  
 1                    5                    10                    15  
 Ile Gly Ala Tyr Thr  
                   20

<210> 30  
 <211> 21 20  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 1, 3, 17, 19  
 <223> Xaa = Any Amino Acid 30

<400> 30  
 Xaa Glu Xaa Lys Glu Gly Arg Gly Lys Gly Lys Gly Lys Lys Lys Glu  
 1                    5                    10                    15  
 Xaa Gly Xaa Gly Lys  
                   20

<210> 31 40

<211> 13

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 31

Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu

1

5

10

10

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

20

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 32

Lys Leu Glu Phe Leu Xaa Ala Lys

1

5

30

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

40

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Lysine or Arginine.

<400> 33

Xaa Val His Gln Val Trp Ala Ala Lys

1                      5

10

<210> 34

<211> 14

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> VARIANT

20

<222> 1

<223> Xaa = Lysine or Arginine,

<221> VARIANT

<222> 11

<223> Xaa = Any Amino Acid

30

<400> 34

Xaa Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Glu Ala Xaa Ser Ser Gly

1                      5                      10

<210> 35

<211> 14

<212> PRT

40

<213> Bos taurus

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Lysine or Arginine

<221> VARIANT

10

<222> 13

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 35

Xaa Leu Gly Ala Trp Gly Pro Pro Ala Phe Pro Val Xaa Tyr

1

5

10

20

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> VARIANT

30

<222> 1

<223> Xaa = Lysine or Arginine.

<400> 36

Xaa Trp Phe Val Val Ile Glu Gly Lys

1

5

40

<210> 37

<211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 1  
 <223> Xaa = Lysine or Arginine

10

<400> 37  
 Xaa Ala Ser Pro Val Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Val Gln Arg  
 1                    5                    10                    15

<210> 38  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

20

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 1  
 <223> Xaa = Lysine or Arginine

30

<400> 38  
 Xaa Val Cys Leu Leu Thr Val Ala Ala Leu Pro Pro Thr  
 1                    5                    10

<210> 39  
 <211> 7

40

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Lysine or Arginine

10

<221> VARIANT

<222> 6

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 39

Xaa Asp Leu Leu Leu Xaa Val

20

1

5

<210> 40

<211> 39

<212> PRT

<213> Bos taurus

30

<400> 40

Cys Thr Cys Gly Cys Cys Lys Cys Cys Arg Thr Thr Cys Ala Cys Arg

1

5

10

15

Cys Ala Gly Ala Ala Gly Gly Thr Cys Thr Thr Cys Thr Cys Cys Thr

20

25

30

Thr Cys Thr Cys Ala Gly Cys

35

40

<210> 41  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> **Bos taurus**

<400> 41

Cys	Cys	Thr	Cys	Gly	Cys	Thr	Cys	Cys	Thr	Thr	Cys	Thr	Thr	Cys	Thr		10
1				5					10					15			
Thr	Gly	Cys	Cys	Cys	Thr	Thr	Cys										
				20													

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

20

<213> **Bos taurus**

<400> 42

Val	His	Gln	Val	Trp	Ala	Ala	Lys										
1				5													

<210> 43

30

<211> 13

<212> PRT

<213> **Bos taurus**

<220>

<221> VARIANT

<222> 10

40

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 43

Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Glu Ala Xaa Ser Ser Gly  
 1                      5                      10

<210> 44

<211> 13

10

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> VARIANT

<222> 12

<223> Xaa = Any Amino Acid

20

<400> 44

Leu Gly Ala Trp Gly Pro Pro Ala Phe Pro Val Xaa Tyr  
 1                      5                      10

<210> 45

<211> 8

30

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 45

Trp Phe Val Val Ile Glu Gly Lys  
 1                      5

40

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 46

Ala Ser Pro Val Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Val Gln Arg

1

5

10

15

10

<210> 47

<211> 12

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 47

20

Val Cys Leu Leu Thr Val Ala Ala Leu Pro Pro Thr

1

5

10

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Bos taurus

30

<400> 48

Lys Val His Gln Val Trp Ala Ala Lys

1

5

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

40

<213> Bos taurus

<220>

<221> VARIANT

<222> 12

<223> Xaa = Any Amino Acid

10

<400> 49

Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Xaa Lys

1

5

10

<210> 50

<211> 6

<212> PRT

20

<213> Bos taurus

<220>

<221> VARIANT

<222> 5

<223> Xaa = Any Amino Acid

30

<400> 50

Asp Leu Leu Leu Xaa Val

1

5

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Homo sapiens

<221> misc\_feature

<222> 9, 15

<223> n = A, T, C or G

10

<400> 51

ttyaarggng aygcncayac

20

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Homo sapiens

<221> misc\_feature

<222> 19

<223> n = A, T, C or G

30

<400> 52

catrtaytcr taytcrtcng c

21

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Homo sapiens

<221> misc\_feature

<222> 6, 9, 18

10

<223> n = A, T, C or G

<400> 53

tgytcngang ccatytcngt

20

<210> 54

<211> 20

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Homo sapiens

<221> misc\_feature

30

<222> 9, 18

<223> n = A, T, C or G

<400> 54

tgytcrctng ccatytcngt

20

<210> 55

40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Homo sapiens

<221> misc\_feature

10

<222> 6, 12, 15

<223> n = A, T, C or G

<400> 55

ccdatnacca tnggnacytt

20

<210> 56

20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Homo sapiens

30

<221> misc\_feature

<222> 3, 9, 18

<223> n = A, T, C or G

<400> 56

gcngcccana cytgrtgnac

20

40

<210> 57

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> based on Homo sapiens

10

<221> misc\_feature  
 <222> 6  
 <223> n = A, T, C or G

<400> 57  
 gcytcnggyt ccatraaraa

20

20

<210> 58  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> based on Homo sapiens

30

<221> misc\_feature  
 <222> 9, 12  
 <223> n = A, T, C or G

<400> 58  
 ccytcdatna cnacraacca

20

40

<210> 59

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Homo sapiens

10

<221> misc\_feature

<222> 3, 12, 15

<223> n = A, T, C or G

<400> 59

tengcraart anccngc

17

20

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Homo sapiens

30

<221> misc\_feature

<222> 3, 6, 9, 18

<223> n = A, T, C or G

<400> 60

gcngcnagn cytcttngc

20

40

<210> 61  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220> 10  
<223> based on Homo sapiens

<221> misc\_feature  
<222> 3, 9, 18  
<223> n = A, T, C or G

<400> 61 20  
gcngcyaang cytcttngc 20

<210> 62  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 30

<220>  
<223> based on Homo sapiens

<221> misc\_feature  
<222> 6, 12, 15  
<223> n = A, T, C or G 40

<400> 62

ttytngcyt gnagnacraa

20

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> based on Homo sapiens

<221> misc\_feature

<222> 6, 15

<223> n = A, T, C or G

20

<400> 63

ttytngcyt gyaanacraa

20

<210> 64

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> based on Homo sapiens

<221> misc\_feature

<222> 3, 6, 15

<223> n = A, T, C or G

40

<b>&lt;400&gt; 64</b>	
<b>ignacnagyt cytgnac</b>	<b>17</b>
<b>&lt;210&gt; 65</b>	
<b>&lt;211&gt; 17</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Artificial Sequence</b>	10
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; based on Homo sapiens</b>	
<b>&lt;221&gt; misc_feature</b>	
<b>&lt;222&gt; 3, 15</b>	
<b>&lt;223&gt; n = A, T, C or G</b>	20
<b>&lt;400&gt; 65</b>	
<b>ignacyaayt cytgnac</b>	<b>17</b>
<b>&lt;210&gt; 66</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	30
<b>&lt;213&gt; Artificial Sequence</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; based on Homo sapiens</b>	
<b>&lt;221&gt; misc_feature</b>	
<b>&lt;222&gt; 10, 13, 19</b>	40
<b>&lt;223&gt; n = A, T, C or G</b>	

⟨400⟩ 66	
catrtaytcn ccngartcng c	21
⟨210⟩ 67	
⟨211⟩ 21	
⟨212⟩ DNA	10
⟨213⟩ Artificial Sequence	
⟨220⟩	
⟨223⟩ based on Homo sapiens	
⟨221⟩ misc_feature	
⟨222⟩ 10, 19	20
⟨223⟩ n = A, T, C or G	
⟨400⟩ 67	
catrtaytcn ccrcrtcng c	21
⟨210⟩ 68	
⟨211⟩ 21	30
⟨212⟩ DNA	
⟨213⟩ Artificial Sequence	
⟨220⟩	
⟨223⟩ based on Homo sapiens	
⟨221⟩ misc_feature	40
⟨222⟩ 1, 7, 13, 16	

<223> n = A,T,C or G

<400> 68

ngartengcy aangangcyt t

21

<210> 69

<211> 21

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Homo sapiens

<221> misc\_feature

20

<222> 1, 7, 10, 13, 16

<223> n = A,T,C or G

<400> 69

ngartengcn agngangcyt t

21

<210> 70

30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Homo sapiens

40

<221> misc\_feature

<222> 7, 13, 16

<223> n = A, T, C or G

<400> 70

rcrtctngcy aangangcyt t

21

<210> 71

10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Homo sapiens

20

<221> misc\_feature

<222> 7, 10, 13, 16

<223> n = A, T, C or G

<400> 71

rcrtctngcn agngangcyt t

21

30

<210> 72

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Homo sapiens

40

<221> misc\_feature

<222> 1, 7, 16

<223> n = A,T,C or G

<400> 72

ngartcngcy aarcctngcyt t

21

10

<210> 73

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Homo sapiens

20

<221> misc\_feature

<222> 1, 7, 10, 16

<223> n = A,T,C or G

<400> 73

ngartcngcn agrctngcyt t

21

30

<210> 74

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Homo sapiens

40

<221> misc\_feature

<222> 7, 16

<223> n = A, T, C or G

<400> 74

rcrtctngcy aarctngcyt t

21

10

<210> 75

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> based on Homo sapiens

<221> misc\_feature

<222> 7, 10, 16

<223> n = A, T, C or G

<400> 75

rcrtctngcn agrctngcyt t

21

30

<210> 76

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40

<223> based on Homo sapiens

<221> misc\_feature

<222> 3, 6, 17, 18

<223> n = A, T, C or G

<400> 76

acnacngara tggctcnga

20

10

<210> 77

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> based on Homo sapiens

<221> misc\_feature

<222> 3, 6, 18

<223> n = A, T, C or G

30

<400> 77

acnacngara tggcagynga

20

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> based on Homo sapiens

<221> misc\_feature

<222> 9, 15, 18

<223> n = A, T, C or G

10

<400> 78

caycargtnt gggcngcnaa

20

<210> 79

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> based on Homo sapiens

<221> misc\_feature

<222> 6, 9, 18

<223> n = A, T, C or G

30

<400> 79

ttygtngtna thgarggnaa

20

<210> 80

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> based on Homo sapiens

<221> misc\_feature

<222> 6, 12, 18

<223> n = A, T, C or G

10

<400> 80

aarggngayg cncayacnga

20

<210> 81

<211> 20

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Homo sapiens

<221> misc\_feature

<222> 6, 9, 12, 15, 18

<223> n = A, T, C or G

30

<400> 81

gargcnying cngcnytnaa

20

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Homo sapiens

<221> misc\_feature

<222> 3, 6, 9, 12

10

<223> n = A, T, C or G

<400> 82

gtnggntcng tncargaryt

20

<210> 83

<211> 20

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Homo sapiens

<221> misc\_feature

30

<222> 3, 6, 12

<223> n = A, T, C or G

<400> 83

gtnggnagygtncargaryt

20

<210> 84

40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Homo sapiens

<221> misc\_feature

10

<222> 1, 10, 19

<223> n = A,T,C or G

<400> 84

nacyttyttt ardatytgnc c

21

<210> 85

20

<211> 417

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<221> variation

<222> 14, 23, 90, 100, 126, 135

30

<223> \* = stop codon

<221> CDS

<222> (6)...(416)

<400> 85

tctaa aac tac aga gac tgt att ttc atg atc atc ata gtt ctg tga aat 50

40

Asn Tyr Arg Asp Cys Ile Phe Met Ile Ile Ile Val Leu \* Asn

1	5	10		
ata ctt aaa ccg ctt tgg tcc tga tct tgt agg aag tca gaa ctt cgc			98	
Ile Leu Lys Pro Leu Trp Ser *	Ser Cys Arg Lys Ser Glu Leu Arg			
15	20	25		
att agc aaa gcg tca ctg gct gat tct gga gaa tat atg tgc aaa gtg			146	10
Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val				
30	35	40	45	
atc agc aaa cta gga aat gac agt gcc tct gcc aac atc acc att gtg			194	
Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val				
50	55	60		20
gag tca aac ggt aag aga tgc cta ctg cgt gct att tct cag tct cta			242	
Glu Ser Asn Gly Lys Arg Cys Leu Leu Arg Ala Ile Ser Gln Ser Leu				
65	70	75		
aga gga gtg atc aag gta tgt ggt cac act tga atc acg cag gtg tgt			290	
Arg Gly Val Ile Lys Val Cys Gly His Thr *	Ile Thr Gln Val Cys			
80	85	90		30
gaa atc tca ttg tga aca aat aaa aat cat gaa agg aaa act cta tgt			338	
Glu Ile Ser Leu * Thr Asn Lys Asn His Glu Arg Lys Thr Leu Cys				
95	100	105		
ttg aaa tat ctt atg ggt cct cct gta aag ctc ttc act cca taa ggt			386	
Leu Lys Tyr Leu Met Gly Pro Pro Val Lys Leu Phe Thr Pro *	Gly			40
110	115	120		

gaa ata gac ctg aaa tat ata tag att att t 417  
 Glu Ile Asp Leu Lys Tyr Ile \* Ile Ile  
           125                          130

<210> 86 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Bos taurus

20

<221> misc\_feature

<222> 19, 25, 31

<223> n = Inosine.

<400> 86

ccgaattctg caggaracnc arccngaycc ngg 33

30

<210> 87

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Bos taurus

40

<221> misc\_feature

<222> 14, 20, 23, 29, 35

<223> n = Inosine.

<400> 87

aaggatcctg cagngirtan gencdatna ccatngg

37

10

<210> 88

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Bos taurus

20

<221> misc\_feature

<222> 16, 22, 25

<223> n = Inosine

<400> 88

ccgaattctg caggcngayt cngngarta yatg

34

30

<210> 89

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Bos taurus

40

<221> misc\_feature

<222> 16, 25

<223> n = Inosine

<400> 89

ccgaattctg caggcngaya gyggngarta yat

33

10

<210> 90

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> based on Bos taurus

<221> misc\_feature

<222> 14, 15, 16, 26, 29

<223> n = Inosine

<400> 90

30

aaggatcctg cagnnncatr taytcncng artc

34

<210> 91

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> based on *Bos taurus*

<221> misc\_feature

<222> 14, 15, 16, 26

<223> n = Inosine

<400> 91

aaggatcctg cagnnncatr taytncerc trtc

10

34

<210> 92

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> based on *Bos taurus*

<221> misc\_feature

<222> 22, 28, 31

<223> n = A, T, C or G

30

<400> 92

ccgaattctg cagcaycarg intgggcngc naa

33

<210> 93

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> based on Bos taurus

<221> misc\_feature

<222> 31

<223> n = Inosine

10

<400> 93

ccgaattctg cagathttt tyatggarcc ngarg

35

<210> 94

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> based on Bos taurus

<221> misc\_feature

<222> 18, 21, 24, 27, 33

<223> n = Inosine

30

<400> 94

ccgaattctg cagggggccc nccngcntty ccngt

35

<210> 95

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> based on Bos taurus

<221> misc\_feature

<222> 22, 25

<223> n = Inosine

10

<400> 95

ccgaattctg cagtggcttg tngtnathga rgg

33

<210> 96

<211> 34

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Bos taurus

<221> misc\_feature

<222> 17, 20, 26

<223> n = Inosine

30

<400> 96

aaggatcctg cagytingcn gcccanacyt grtg

34

<210> 97

<211> 33

<212> DNA

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Bos taurus

<221> misc\_feature

<222> 19

10

<223> n = Inosine

<400> 97

aaggatcctg caggcytcng gytccatrra raa

33

<210> 98

<211> 33

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Bos taurus

<221> misc\_feature

30

<222> 16, 22, 25, 28, 31

<223> n = Inosine

<400> 98

aaggatcctg cagacnggra angcngggg ncc

33

<210> 99

40

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Bos taurus

<221> misc\_feature

10

<222> 17, 26, 29

<223> n = Inosine

<400> 99

aaggatcctg cagyttnccy tcdatnacna craac

35

<210> 100

20

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Bos taurus

30

<221> misc\_feature

<222> 18

<223> n = Inosine

<400> 100

catrtaytcr taytctcngc aaggatcctg cag

33

40

<210> 101

<211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> based on Bos taurus

10

<221> misc\_feature  
 <222> 19, 25, 31  
 <223> n = Inosine

<400> 101  
 ccgaattctg cagaargng aygcncayac nga

33

20

<210> 102  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> based on Bos taurus

30

<221> misc\_feature  
 <222> 3, 9, 18  
 <223> n = Inosine

<400> 102  
 gcngcyaang cytcytngc aaggatcctg cag

33

40

<210> 103  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Bos taurus

10

<221> misc\_feature

<222> 3, 6, 9, 18

<223> n = Inosine

<400> 103

gcngcnagn cyctytingc aaggatcctg cag

33

20

<210> 104

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Bos taurus

30

<221> misc\_feature

<222> 3, 12, 15

<223> n = Inosine

<400> 104

tengcraart anccngcaag gatcctgcag

30

40

<210> 105  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220> 10  
<223> based on Bos taurus

<400> 105  
catcgatcig caggctgatt ctggagaata tatgtgca 38

<210> 106  
<211> 37 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> based on Bos taurus

<400> 106 30  
aaggatcctg cagccacatc tcgagtcgac atcgatt 37

<210> 107  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence 40

<220>

<223> based on *Bos taurus*

<400> 107

ccgaattctg cagtgatcag caaactagga aatgaca 37

<210> 108

<211> 37

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on *Bos taurus*

<400> 108

20

catcgatctg cagcctagtt tgcgatcac ttgcaac 37

<210> 109

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> based on *Bos taurus*

<400> 109

aaggatcctg cagtatattc tccagaatca gccagtg 37

<210> 110

40

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Bos taurus

<400> 110

aaggatcctg caggcagca gtaggcattc cttc

34

10

<210> 111

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Bos taurus

<400> 111

ccgaattctg cagcagaact tcgcattagc aaagc

35

20

<210> 112

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Bos taurus

<400> 112

30

40

catcccgga tgaagagica ggagtcgig gca

33

<210> 113

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> based on Bos taurus

<400> 113

ataccgggc tgcagacaat gagattcac acacctgcg

39

<210> 114

20

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> based on Bos taurus

30

<400> 114

aaggatcctg cagttggaa cctgccacag actcct

36

<210> 115

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> based on *Bos taurus*

<400> 115

ataccgggc tgcagatgag atttcacaca cctgcgiga 39

<210> 116

10

<211> 12

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<400> 116

His Gln Val Trp Ala Ala Lys Ala Ala Gly Leu Lys

1

5

10

20

<210> 117

<211> 16

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<400> 117

30

Gly Gly Leu Lys Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Ala Asn

1

5

10

15

<210> 118

<211> 13

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

40

<220>

<221> VARIANT

<222> 12

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 118

Leu Gly Ala Trp Gly Pro Pro Ala Phe Pro Val Xaa Tyr

1

5

10

10

<210> 119

<211> 23

<212> PRT

<213> Bos taurus

20

<400> 119

Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Ala Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser

1

5

10

15

Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp

20

<210> 120

30

<211> 13

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> VARIANT

<222> 10

40

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 120

Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Glu Ala Xaa Ser Ser Gly

1                    5                    10

<210> 121

<211> 23

10

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 121

Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Glu Ala Asn Ser

1                    5                    10                    15

Ser Gly Gly Pro Gly Arg Leu

20

20

<210> 122

<211> 14

<212> PRT

<213> Bos taurus

30

<400> 122

Val Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser

1                    5                    10

<210> 123

<211> 16

<212> PRT

40

<213> Bos taurus

<400> 123

Glu Tyr Lys Cys Leu Lys Phe Lys Trp Phe Lys Lys Ala Thr Val Met  
 1 5 10 15

<210> 124

<211> 26

10

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 124

Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Lys Phe Lys Trp Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Asn Gly Ser Glu Leu Ser Arg Lys Asn Lys  
 20 25

20

<210> 125

<211> 13

<212> PRT

<213> Bos taurus

30

<220>

<221> VARIANT

<222> 12

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 125

Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Xaa Lys  
 1 5 10

40

<210> 126

<211> 23

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 126

10

Glu Leu Arg Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met

1

5

10

15

Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu

20

<210> 127

<211> 12

20

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 127

Ala Ser Leu Ala Asp Glu Tyr Glu Tyr Met Arg Lys

1

5

10

30

<210> 128

<211> 22

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 128

Leu Arg Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys

1

5

10

15

40

Lys Val Ile Ser Lys Leu

20

&lt;210&gt; 129

&lt;211&gt; 744

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bos taurus

10

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (8)... (625)

&lt;400&gt; 129

cctgcag cat caa gtg tgg gcg gcg aaa gcc ggg ggc ttg aag aag gac 49

20

His Gln Val Trp Ala Ala Lys Ala Gly Gly Leu Lys Lys Asp

1

5

10

tcg ctg ctc acc gtg cgc ctg ggc gcc tgg ggc cac ccc gcc ttc ccc 97

Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Ala Trp Gly His Pro Ala Phe Pro

15

20

25

30

30

tcc tgc ggg cgc ctc aag gag gac agc agg tac atc ttc ttc atg gag 145

Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe Met Glu

35

40

45

ccc gag gcc aac agc agc ggc ggg ccc ggc cgc ctt ccg agc ctc ctt 193

Pro Glu Ala Asn Ser Ser Gly Gly Pro Gly Arg Leu Pro Ser Leu Leu

50

55

60

40

ccc ccc tct cga gac ggg ccg gaa cct caa gaa gga ggt cag ccg ggt 241  
 Pro Pro Ser Arg Asp Gly Pro Glu Pro Gln Glu Gly Gly Gln Pro Gly  
           65                          70                          75

gct gtg caa cgg tgc gcc ttg cct ccc cgc ttg aaa gag atg aag agt 289  
 Ala Val Gln Arg Cys Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser  
           80                          85                          90

10

cag gag tct gtg gca ggt tcc aaa cta gtg ctt cgg tgc gag acc agt 337  
 Gln Glu Ser Val Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser  
           95                          100                          105                          110

tct gaa tac tcc tct ctc aag ttc aag tgg ttc aag aat ggg agt gaa 385  
 Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Lys Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Ser Glu  
                           115                          120                          125

20

tta agc cga aag aac aaa cca gaa aac atc aag ata cag aaa agg ccg 433  
 Leu Ser Arg Lys Asn Lys Pro Glu Asn Ile Lys Ile Gln Lys Arg Pro  
                           130                          135                          140

ggg aag tca gaa ctt cgc att agc aaa gcg tca ctg gct gat tct gga 481  
 Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly  
           145                          150                          155

30

gaa tat atg tgc aaa gtg atc agc aaa cta gga aat gac agt gcc tct 529  
 Glu Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser  
           160                          165                          170

40

gcc aac atc acc att gtg gag tca aac ggt aag aga tgc cta ctg cgt 577



Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe Met Glu		
35	40	45
ccc gag gcc aac agc agc ggc ggg ccc ggc cgc ctt ccg agc ctc ctt	193	
Pro Glu Ala Asn Ser Ser Gly Gly Pro Gly Arg Leu Pro Ser Leu Leu		
50	55	60
ccc ccc tct cga gac ggg ccg gaa cct caa gaa gga ggt cag ccg ggt	241	10
Pro Pro Ser Arg Asp Gly Pro Glu Pro Gln Glu Gly Gly Gln Pro Gly		
65	70	75
gct gtg caa cgg tgc gcc ttg cct ccc cgc ttg aaa gag atg aag agt	289	
Ala Val Gln Arg Cys Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser		
80	85	90
cag gag tct gtg gca ggt tcc aaa cta gtg ctt cgg tgc gag acc agt	337	
Gln Glu Ser Val Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser		
95	100	105
tct gaa tac tcc tct ctc aag ttc aag tgg ttc aag aat ggg agt gaa	385	
Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Lys Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Ser Glu		30
115	120	125
tta agc cga aag aac aaa cca gaa aac atc aag ata cag aaa agg ccg	433	
Leu Ser Arg Lys Asn Lys Pro Glu Asn Ile Lys Ile Gln Lys Arg Pro		
130	135	140
ggg aag tca gaa ctt cgc att agc aaa gcg tca ctg gct gat tct gga	481	40
Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly		



acgtccactc cttttctgtc tctgccigaa tagcgcactc cagtcgggtgc cgctttcttg 876  
 ttgccgcata tcccctcaga ttcttcctag agctagatgc gttttaccag gictaacatt 936  
 gactgccctc gccigtgcga tgagaacatt aacacaagcg attgtatgac ttctctgtc 996  
 cgtgactagt gggctctgag ctactcgtag gtgcgtaagg ctccagtgtt tctgaaatig 1056  
 atcttgaatt actgtgatac gacatgatag tccctctcac ccagtgcaat gacaataaag 1116  
 gccttgaaaa gtcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaatcga tctcgactcg agatgtggct 1176  
 gcaggctgac tctagag 1193

10

<210> 131

<211> 1108

<212> DNA

<213> Bos taurus

20

<220>

<221> CDS

<222> (8)... (778)

<400> 131

cctgcag cat caa gtg tgg gcg gcg aaa gcc ggg ggc ttg aag aag gac 49  
 His Gln Val Trp Ala Ala Lys Ala Gly Gly Leu Lys Lys Asp 30  
 1 5 10

tcg ctg ctc acc gtg cgc ctg ggc gcc tgg ggc cac ccc gcc ttc ccc 97  
 Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Ala Trp Gly His Pro Ala Phe Pro  
 15 20 25 30

tcc tgc ggg cgc ctc aag gag gac agc agg tac atc ttc ttc atg gag 145  
 Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe Met Glu

40

	35	40	45		
ccc gag gcc aac agc agc ggc ggg ccc ggc cgc ctt ccg agc ctc ctt				193	
Pro Glu Ala Asn Ser Ser Gly Gly Pro Gly Arg Leu Pro Ser Leu Leu					
	50	55	60		
ccc ccc tct cga gac ggg ccg gaa cct caa gaa gga ggt cag ccg ggt				241	10
Pro Pro Ser Arg Asp Gly Pro Glu Pro Gln Glu Gly Gly Gln Pro Gly					
	65	70	75		
gct gtg caa cgg tgc gcc ttg cct ccc cgc ttg aaa gag atg aag agt				289	
Ala Val Gln Arg Cys Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser					
	80	85	90		20
cag gag tct gtg gca ggt tcc aaa cta gtg ctt cgg tgc gag acc agt				337	
Gln Glu Ser Val Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser					
	95	100	105	110	
tct gaa tac tcc tct ctc aag ttc aag tgg ttc aag aat ggg agt gaa				385	
Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Lys Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Ser Glu					
	115	120	125		30
tta agc cga aag aac aaa cca gaa aac atc aag ata cag aaa agg ccg				433	
Leu Ser Arg Lys Asn Lys Pro Glu Asn Ile Lys Ile Gln Lys Arg Pro					
	130	135	140		
ggg aag tca gaa ctt cgc att agc aaa gcg tca ctg gct gat tct gga				481	
Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly					40
	145	150	155		

gaa tat atg tgc aaa gtg atc agc aaa cta gga aat gac agt gcc tct	529	
Glu Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser		
160	165	170
gcc aac atc acc att gtg gag tca aac gcc aca tcc aca tct aca gct	577	
Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Ala		10
175	180	185
190		
ggg aca agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt	625	
Gly Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys		
195	200	205
gtg aat gga ggc gag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca	673	20
Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser		
210	215	220
aga tac ttg tgc aag tgc cca aat gag ttt act ggt gat cgc tgc caa	721	
Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln		
225	230	235
aac tac gta atg gcc agc ttc tac agt acg tcc act ccc ttt ctg tct	769	
Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser		
240	245	250
ctg cct gaa tagcgcacatc cagtcgggtgc cgcctttcttg ttgccgcac	818	
Leu Pro Glu		
255		40

tccctcaga tccgcctag agctagatgc gtittaccag gtctaacatt gactgccctct 878  
 gccgtctgca tgagaacatt aacacaagcg atigtatgac ttcctctgtc cgtgactagt 938  
 gggctctgag ctactcgtag gtcgtaagg ctccagigti tctgaaattg atcttgaatt 998  
 actgtgatac gacatgatag tccctctcac ccagtgcaat gacaataaag gccctgaaaa 1058  
 gtcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaatcgat gtcgactcga gatgtggctg 1108

<210> 132

10

<211> 559

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<221> CDS

<222> (459)... (557)

20

<223>

<221> misc\_feature

<222> 214

<223> n = A, T, C or G

<400> 132

30

agtttcccc cccaactigt cggaaactctg ggctcgcgcg cagggcagga gcggagcggc 60  
 ggccgctgcc caggcgatgc gagcgcgggc cggacggtaa tcgctctcc ctctcgggc 120  
 tgcgagcgcg ccggaccgag gcagcgacag gagcggaccg cggcgggaac cgaggactcc 180  
 ccagcggcgc gccagcagga gccaccccgc gagnctgctg accgggacgg agcggccgcc 240  
 agtcccaggt ggcccggacc gcacgttgcg tccccgccti ccccgccggc gacaggagac 300  
 gctccccccc acgccgcgcg cgcctcggcc cggctcctgg cccgctcca ctccggggac 360  
 aaactttcc cgaagccgat cccagccctc ggacceaaac ttgtcgcgcg tcgcttctgc 420  
 cgggagccgt ccgcgcagag cgtgcacttc tcgggcga gat gtc gga gcg cag aga 476

40

Asp Val Gly Ala Gln Arg

1

5

agg caa agg caa ggg gaa ggg cgg caa gaa gga ccg agg ctc cgg gaa 524

Arg Gln Arg Gln Gly Glu Gly Arg Gln Glu Gly Pro Arg Leu Arg Glu

10

15

20

10

gaa gcc cgt gcc cgc ggc tgg cgg ccc gag ccc ag

559

Glu Ala Arg Ala Arg Gly Trp Arg Pro Glu Pro

25

30

<210> 133

<211> 252

20

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<221> CDS

<222> (3)... (251)

30

<221> misc\_feature

<222> 8

<223> n = A or G

<221> variation

<222> 2

<223> Xaa = Gln

40

<400> 133

cc cat can gtg tgg gcg gcg aaa gcc ggg ggc ttg aag aag gac tcg 47  
 His Xaa Val Trp Ala Ala Lys Ala Gly Gly Leu Lys Lys Asp Ser  
 1 5 10 15

ctg ctc acc gtg cgc ctg ggc gcc tgg ggc cac ccc gcc ttc ccc tcc 95  
 Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Ala Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser 10  
 20 25 30

tgc ggg cgc ctc aag gag gac agc agg tac atc ttc ttc atg gag ccc 143  
 Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro  
 35 40 45

gag gcc aac agc agc ggc ggg ccc ggc cgc ctt ccg agc ctc ctt ccc 191 20  
 Glu Ala Asn Ser Ser Gly Gly Pro Gly Arg Leu Pro Ser Leu Leu Pro  
 50 55 60

ccc tct cga gac ggg ccg gaa cct caa gaa gga ggt cag ccg ggt gct 239  
 Pro Ser Arg Asp Gly Pro Glu Pro Gln Glu Gly Gly Gln Pro Gly Ala  
 65 70 75

gtg caa cgg tgc g 252  
 Val Gln Arg Cys  
 80

<210> 134

<211> 178

<212> DNA

10

20

30

40

<213> Bos taurus

<220>

<221> CDS

<222> (3)... (176)

<400> 134

cc ttg cct ccc cgc ttg aaa gag atg aag agt cag gag tct gtg gca 47  
 Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Val Ala  
 1 5 10 15

10

ggg tcc aaa cta gtg ctt cgg tgc gag acc agt tct gaa tac tcc tct 95  
 Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser  
 20 25 30

20

ctc aag ttc aag tgg ttc aag aat ggg agt gaa tta agc cga aag aac 143  
 Leu Lys Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Ser Glu Leu Ser Arg Lys Asn  
 35 40 45

aaa cca caa aac atc aag ata cag aaa agg ccg gg 178  
 Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Arg Pro  
 50 55

30

<210> 135

<211> 122

<212> DNA

<213> Bos taurus

40

<220>

<221> CDS

<222> (2)... (121)

<400> 135

g aag tca gaa ctt cgc att agc aaa gcg tca ctg gct gat tct gga gaa 49  
 Lys Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu 10  
 1 5 10 15

tat atg tgc aaa gtg atc agc aaa cta gga aat gac agt gcc tct gcc 97  
 Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala  
 20 25 30

aac atc acc att gtg gag tca aac g 122 20  
 Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn  
 35 40

<210> 136

<211> 417

<212> DNA 30

<213> Bos taurus

<220>

<221> CDS

<222> (84)... (272)

<400> 136 40

tctaaaacta cagagactgt attttcatga tcatcatagt tctgtgaaat atacttaaac 60

cgctttggtc ctgatcttgt agg aag tca gaa ctt cgc att agc aaa gcg tca 113  
 Lys Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys Ala Ser  
 1 5 10

ctg gct gat tct gga gaa tat atg tgc aaa gtg atc agc aaa cta gga 161  
 Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly  
 15 20 25 10

aat gac agt gcc tct gcc aac atc acc att gtg gag tca aac ggt aag 209  
 Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Gly Lys  
 30 35 40

aga tgc cta ctg cgt gct att tct cag tct cta aga gga gtg atc aag 257  
 Arg Cys Leu Leu Arg Ala Ile Ser Gln Ser Leu Arg Gly Val Ile Lys 20  
 45 50 55

gta tgt ggt cac act tgaatcacgc aggtgtgtga aatctcattg tgaacaaata 312  
 Val Cys Gly His Thr  
 60

aaaatcatga aaggaaaact ctatgtttga aatatcttat gggtcctcct gtaaagcct 372 30  
 tcactccata aggtigaaata gacctgaaat atatatagat tattt 417

<210> 137

<211> 102

<212> DNA

<213> Bos taurus

40

<220>

<221> CDS

<222> (3)... (101)

<400> 137

ag atc acc act ggc atg cca gcc tca act gag aca gcg tat gtg tct	47	
Ile Thr Thr Gly Met Pro Ala Ser Thr Glu Thr Ala Tyr Val Ser		
1 5 10 15		10

tca gag tct ccc att aga ata tca gta tca aca gaa gga aca aat act	95
Ser Glu Ser Pro Ile Arg Ile Ser Val Ser Thr Glu Gly Thr Asn Thr	
20 25 30	

tct tca t	102	
Ser Ser		20

<210> 138

<211> 69

<212> DNA

<213> Bos taurus

30

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (69)

<400> 138

aag tgc caa cct gga ttc act gga gcg aga tgt act gag aat gtg ccc	48	40
Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn Val Pro		

1	5	10	15	
atg aaa gtc caa acc caa gaa				69
Met Lys Val Gln Thr Gln Glu				
	20			
<210> 139 <211> 60 <212> DNA <213> Bos taurus				
<220> <221> CDS <222> (1)... (60)				
<400> 139 aag tgc cca aat gag ttt act ggt gat cgc tgc caa aac tac gta atg 48 Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met 1                    5                    10                    15				
gcc agc ttc tac 60 Ala Ser Phe Tyr 20				
<210> 140 <211> 36 <212> DNA				

10

20

30

40

<213> **Bos taurus**

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (33)

<400> 140

agt acg tcc act ccc ttt ctg tct ctg cct gaa tag

36

Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu

1

5

10

10

<210> 141

<211> 27

<212> DNA

<213> **Homo sapiens**

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (27)

<400> 141

aag cat ctt ggg att gaa ttt atg gag

27

Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu

1

5

30

<210> 142

<211> 569

40

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (567)

<400> 142

aaa gcg gag gag ctc tac cag aag aga gtg ctc acc att acc ggc att 48  
 Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln Lys Arg Val Leu Thr Ile Thr Gly Ile  
 1 5 10 15

tgc atc gcg ctg ctc gtg gtt ggc atc atg tgt gtg gtg gtc tac tgc 96  
 Cys Ile Ala Leu Leu Val Val Gly Ile Met Cys Val Val Val Tyr Cys  
 20 25 30

aaa acc aag aaa caa cgg aaa aag ctt cat gac cgg ctt cgg cag agc 144  
 Lys Thr Lys Lys Gln Arg Lys Lys Leu His Asp Arg Leu Arg Gln Ser  
 35 40 45

ctt cgg tct gaa aga aac acc atg atg aac gta gcc aac ggg ccc cac 192  
 Leu Arg Ser Glu Arg Asn Thr Met Met Asn Val Ala Asn Gly Pro His  
 50 55 60

cac ccc aat ccg ccc ccc gag aac gtg cag ctg gtg aat caa tac gta 240  
 His Pro Asn Pro Pro Pro Glu Asn Val Gln Leu Val Asn Gln Tyr Val  
 65 70 75 80

tct aaa aat gtc atc tct agc gag cat att gtt gag aga gag gcc gag 288

10

20

30

40

Ser Lys Asn Val Ile Ser Ser Glu His Ile Val Glu Arg Glu Ala Glu		
85	90	95
agc tct ttt tcc acc agt cac tac act tgg aca gct cat cat tcc act	336	
Ser Ser Phe Ser Thr Ser His Tyr Thr Ser Thr Ala His His Ser Thr		
100	105	110
act gtc act cag act ccc agt cac agc tgg agc aat gga cac act gaa	384	10
Thr Val Thr Gln Thr Pro Ser His Ser Trp Ser Asn Gly His Thr Glu		
115	120	125
agc atc att tgg gaa agc cac tct gtc atc gtg atg tca tcc gta gaa	432	
Ser Ile Ile Ser Glu Ser His Ser Val Ile Val Met Ser Ser Val Glu		
130	135	140
aac agt agg cac agc agc cgg act ggg ggc cgg aga gga cgt ctc aat	480	
Asn Ser Arg His Ser Ser Pro Thr Gly Gly Pro Arg Gly Arg Leu Asn		
145	150	155
ggc ttg gga ggc cct cgt gaa tgt aac agc ttc ctc agg cat gcc aga	528	
Gly Leu Gly Gly Pro Arg Glu Cys Asn Ser Phe Leu Arg His Ala Arg		30
165	170	175
gaa acc cct gac tcc tac cga gac tct cct cat agt gaa ag	569	
Glu Thr Pro Asp Ser Tyr Arg Asp Ser Pro His Ser Glu		
180	185	

<211> 730

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<221> CDS

<222> (2)... (652)

10

<400> 143

g tat gta tca gca atg acc acc ccg gct cgt atg tca cct gta gat ttc 49

Tyr Val Ser Ala Met Thr Thr Pro Ala Arg Met Ser Pro Val Asp Phe

1

5

10

15

cac acg cca agc tcc ccc aag tca ccc cct tcg gaa atg tcc ccg ccc 97

His Thr Pro Ser Ser Pro Lys Ser Pro Pro Ser Glu Met Ser Pro Pro

20

25

30

20

gtg tcc agc acg acg gtc tcc atg ccc tcc atg gcg gtc agt ccc ttc 145

Val Ser Ser Thr Thr Val Ser Met Pro Ser Met Ala Val Ser Pro Phe

35

40

45

30

gtg gaa gag gag aga ccc ctg ctc ctt gtg acg cca cca cgg ctg cgg 193

Val Glu Glu Glu Arg Pro Leu Leu Leu Val Thr Pro Pro Arg Leu Arg

50

55

60

gag aag tat gac cac cac gcc cag caa ttc aac tcg ttc cac tgc aac 241

Glu Lys Tyr Asp His His Ala Gln Gln Phe Asn Ser Phe His Cys Asn

65

70

75

80

40

ccc gcg cat gag agc aac agc ctg ccc ccc agc ccc ttg agg ata gtg	289	
Pro Ala His Glu Ser Asn Ser Leu Pro Pro Ser Pro Leu Arg Ile Val		
85 90 95		
gag gat gag gaa tat gaa acg acc cag gag tac gaa cca gct caa gag	337	
Glu Asp Glu Glu Tyr Glu Thr Thr Gln Glu Tyr Glu Pro Ala Gln Glu		
100 105 110		10
ccg gtt aag aaa ctc acc aac agc agc cgg cgg gcc aaa aga acc aag	385	
Pro Val Lys Lys Leu Thr Asn Ser Ser Arg Arg Ala Lys Arg Thr Lys		
115 120 125		
ccc aat ggt cac att gcc cac agg ttg gaa atg gac aac aac aca ggc	433	
Pro Asn Gly His Ile Ala His Arg Leu Glu Met Asp Asn Asn Thr Gly		20
130 135 140		
gct gac agc agt aac tca gag agc gaa aca gag gat gaa aga gta gga	481	
Ala Asp Ser Ser Asn Ser Glu Ser Glu Thr Glu Asp Glu Arg Val Gly		
145 150 155 160		
gaa gat acg cct ttc ctg gcc ata cag aac ccc ctg gca gcc agt ctc	529	30
Glu Asp Thr Pro Phe Leu Ala Ile Gln Asn Pro Leu Ala Ala Ser Leu		
165 170 175		
gag gcg gcc cct gcc ttc cgc ctg gtc gac agc agg act aac cca aca	577	
Glu Ala Ala Pro Ala Phe Arg Leu Val Asp Ser Arg Thr Asn Pro Thr		
180 185 190		40
ggc ggc ttc tct ccg cag gaa gaa ttg cag gcc agg ctc tcc ggt gta	625	



ggc aaa ggc aag ggg aag ggc ggc aag aag gac cga ggc tcc ggg aag	524	
Gly Lys Gly Lys Gly Lys Gly Gly Lys Lys Asp Arg Gly Ser Gly Lys		
10 15 20		
aag ccc gtg ccc gcg gct ggc ggc ccg agc cca gcc ttg cct ccc cgc	572	
Lys Pro Val Pro Ala Ala Gly Gly Pro Ser Pro Ala Leu Pro Pro Arg		10
25 30 35		
ttg aaa gag atg aag atg cag gag tct gtg gca ggt tcc aaa cta gtg	620	
Leu Lys Glu Met Lys Met Gln Glu Ser Val Ala Gly Ser Lys Leu Val		
40 45 50		
ctt cgg tgc gag acc agt tct gaa tac tcc tct ctc aag ttc aag tgg	668	20
Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Lys Phe Lys Trp		
55 60 65 70		
ttc aag aat ggg agt gaa tta agc cga aag aac aaa cca caa aac atc	716	
Phe Lys Asn Gly Ser Glu Leu Ser Arg Lys Asn Lys Pro Gln Asn Ile		
75 80 85		30
aag ata cag aaa agg ccg ggg aag tca gaa ctt cgc att agc aaa gcg	764	
Lys Ile Gln Lys Arg Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys Ala		
90 95 100		
tca ctg gct gat tct gga gaa tat atg tgc aaa gtg atc agc aaa cta	812	
Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu		
105 110 115		40

gga aat gac agt gcc tct gcc aac atc acc att gtg gag tca aac gag	860	
Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Glu		
120 125 130		
atc acc act ggc atg cca gcc tca act gag aca gcg tat gtg tct tca	908	
Ile Thr Thr Gly Met Pro Ala Ser Thr Glu Thr Ala Tyr Val Ser Ser		
135 140 145 150		10
gag tct ccc att aga ata tca gta tca aca gaa gga aca aat act tct	956	
Glu Ser Pro Ile Arg Ile Ser Val Ser Thr Glu Gly Thr Asn Thr Ser		
155 160 165		
tca tcc aca tcc aca tct aca gct ggg aca agc cat ctt gtc aag tgt	1004	
Ser Ser Thr Ser Thr Ser Thr Ala Gly Thr Ser His Leu Val Lys Cys		20
170 175 180		
gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat gga ggc gag tgc ttc atg	1052	
Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met		
185 190 195		
gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac ttg tgc aag tgc cca aat	1100	30
Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn		
200 205 210		
gag ttt act ggt gat cgc tgc caa aac tac gta atg gcc agc ttc tac	1148	
Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr		
215 220 225 230		40
agt acg tcc act ccc ttt ctg tct ctg cct gaa ta ggcgcatgct	1193	

Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu

235

240

cagtcgggigc cgcittcttg ttgccgcate tcccctcaga ttcaacctag agctagatgc 1253  
 gttttaccag gtctaacatt gactgcctct gccgtgcga tgagaacatt aacacaagcg 1313  
 attgtatgac ttctctgtc cgtgactagt gggctctgag ctactcgtag gtgcgtaagg 1373  
 ctccagtgtt tctgaaatig atcttgaatt actgtgatac gacatgatag tcccctcac 1433  
 ccagtgcaat gacaataaag gccttgaaaa gtctcacttt tattgagaaa ataaaaatcg 1493  
 ttccacggga cagtcctct tctttataaa atgacctat ccttgaaaag gaggtgtgtt 1553  
 aagttgtaac cagtaacacac ttgaaatgat ggtaagttcg ctccggttca gaatgtgttc 1613  
 ttctgacaa ataaacagaa taaaaaaaa aaaaaaaaa 1652

10

<210> 145

<211> 1140

20

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (840)

30

<221> misc\_feature

<222> 6

<223> n = A or G

<221> misc\_feature

<222> 895

<223> n = A, T, C or G

40

<221> variation

<222> 2

<223> Xaa = Gln

<400> 145

cat can gtg tgg gcg gcg aaa gcc ggg ggc ttg aag aag gac tgc ctg	48	
His Xaa Val Trp Ala Ala Lys Ala Gly Gly Leu Lys Lys Asp Ser Leu		10
1                      5                      10                      15		
ctc acc gtg cgc ctg ggc gcc tgg ggc cac ccc gcc ttc ccc tcc tgc	96	
Leu Thr Val Arg Leu Gly Ala Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser Cys		
20                      25                      30		
ggg cgc ctc aag gag gac agc agg tac atc ttc ttc atg gag ccc gag	144	20
Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Glu		
35                      40                      45		
gcc aac agc agc ggc ggg ccc ggc cgc ctt ccg agc ctc ctt ccc ccc	192	
Ala Asn Ser Ser Gly Gly Pro Gly Arg Leu Pro Ser Leu Leu Pro Pro		30
50                      55                      60		
tct cga gac ggg ccg gaa cct caa gaa gga ggt cag ccg ggt gct gtg	240	
Ser Arg Asp Gly Pro Glu Pro Gln Glu Gly Gly Gln Pro Gly Ala Val		
65                      70                      75                      80		
caa cgg tgc gcc ttg cct ccc cgc ttg aaa gag atg aag agt cag gag	288	
Gln Arg Cys Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu		40
85                      90                      95		

caa cgg tgc gcc ttg cct ccc cgc ttg aaa gag atg aag agt cag gag 336  
 Gln Arg Cys Ala Leu Pro Pro Arg Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu  
                   100                                  105                                  110

tac tcc tct ctc aag ttc aag tgg ttc aag aat ggg agt gaa tta agc 384  
 Tyr Ser Ser Leu Lys Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Ser Glu Leu Ser  
                   115                                  120                                  125

10

cga aag aac aaa cca gaa aac atc aag ata cag aaa agg ccg ggg aag 432  
 Arg Lys Asn Lys Pro Glu Asn Ile Lys Ile Gln Lys Arg Pro Gly Lys  
                   130                                  135                                  140

tca gaa ctt cgc att agc aaa gcg tca ctg gct gat tct gga gaa tat 480  
 Ser Glu Leu Arg Ile Ser Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr  
 145                                  150                                  155                                  160

20

atg tgc aaa gtg atc agc aaa cta gga aat gac agt gcc tct gcc aac 528  
 Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn  
                                   165                                  170                                  175

atc acc att gtg gag tca aac gcc aca tcc aca tct aca gct ggg aca 576  
 Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Ala Gly Thr  
                   180                                  185                                  190

30

agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat 624  
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
                   195                                  200                                  205

40

gga ggc gag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac 672

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

ttg tgc aag tgc caa cct gga ttc act gga gcg aga tgt act gag aat 720  
 Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn  
 225 230 235 240

gtg ccc atg aaa gtc caa acc caa gaa aag tgc cca aat gag ttt act 768  
 Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr  
 245 250 255

ggt gat cgc tgc caa aac tac gta atg gcc agc ttc tac agt acg tcc 816  
 Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser  
 260 265 270

act ccc ttt ctg tct ctg cct gaa tagcgcatct cagtcgggtgc cgtttcttg 870  
 Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu  
 275 280

ttgccgcate tcccctcaga ttcncctag agctagatgc gttttaccag gtctaacatt 930  
 gactgccctt gccgtgcga tgagaacatt aacacaagcg attgtatgac ttcctctgtc 990  
 cgtgactagt gggctctgag ctactcgtag gtgcgtaagg ctccagtgtt tctgaaatig 1050  
 atcttgaatt actgtgatac gacatgatag tccctctcac ccagtgcaat gacaataaag 1110  
 gccttgaaaa gtcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1140

<210> 146

<211> 1764

<212> DNA

<213> Bos taurus

10

20

30

40



aat gtg ccc atg aaa gtc caa acc caa gaa aaa gcg gag gag ctc tac	337	
Asn Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr		
100	105	110
cag aag aga gtg ctc acc att acc ggc att tgc atc gcg ctg ctc gtg	385	
Gln Lys Arg Val Leu Thr Ile Thr Gly Ile Cys Ile Ala Leu Leu Val		10
115	120	125
gtt ggc atc atg tgt gtg gtg gtc tac tgc aaa acc aag aaa caa cgg	433	
Val Gly Ile Met Cys Val Val Val Tyr Cys Lys Thr Lys Lys Gln Arg		
130	135	140
aaa aag ctt cat gac cgg ctt cgg cag agc ctt cgg tct gaa aga aac	481	20
Lys Lys Leu His Asp Arg Leu Arg Gln Ser Leu Arg Ser Glu Arg Asn		
145	150	155
160		
acc atg atg aac gta gcc aac ggg ccc cac cac ccc aat ccg ccc ccc	529	
Thr Met Met Asn Val Ala Asn Gly Pro His His Pro Asn Pro Pro Pro		
165	170	175
gag aac gtg cag ctg gtg aat caa tac gta tct aaa aat gtc atc tct	577	
Glu Asn Val Gln Leu Val Asn Gln Tyr Val Ser Lys Asn Val Ile Ser		
180	185	190
agc gag cat att gtt gag aga gag gcg gag agc tct ttt tcc acc agt	625	
Ser Glu His Ile Val Glu Arg Glu Ala Glu Ser Ser Phe Ser Thr Ser		
195	200	205
		40

cac tac act tcg aca gct cat cat tcc act act gtc act cag act ccc	673	
His Tyr Thr Ser Thr Ala His His Ser Thr Thr Val Thr Gln Thr Pro		
210	215	220
agt cac agc tgg agc aat gga cac act gaa agc atc att tcg gaa agc	721	
Ser His Ser Trp Ser Asn Gly His Thr Glu Ser Ile Ile Ser Glu Ser		
225	230	235 240
		10
cac tct gtc atc gtg atg tca tcc gta gaa aac agt agg cac agc agc	769	
His Ser Val Ile Val Met Ser Ser Val Glu Asn Ser Arg His Ser Ser		
	245	250 255
ccg act ggg ggc ccg aga gga cgt ctc aat ggc ttg gga ggc cct cgt	817	
Pro Thr Gly Gly Pro Arg Gly Arg Leu Asn Gly Leu Gly Gly Pro Arg		
	260	265 270
		20
gaa tgt aac agc ttc ctc agg cat gcc aga gaa acc cct gac tcc tac	865	
Glu Cys Asn Ser Phe Leu Arg His Ala Arg Glu Thr Pro Asp Ser Tyr		
	275	280 285
cga gac tct cct cat agt gaa aga cat aac ctt ata gct gag cta agg	913	
Arg Asp Ser Pro His Ser Glu Arg His Asn Leu Ile Ala Glu Leu Arg		
	290	295 300
		30
aga aac aag gcc cac aga tcc aaa tgc atg cag atc cag ctt tcc gca	961	
Arg Asn Lys Ala His Arg Ser Lys Cys Met Gln Ile Gln Leu Ser Ala		
305	310	315 320
		40
act cat ctt aga gct tct tcc att ccc cat tgg gct tca ttc tct aag	1009	

Thr His Leu Arg Ala Ser Ser Ile Pro His Trp Ala Ser Phe Ser Lys			
	325	330	
		335	
acc cct tgg cct tta gga agg tat gta tca gca atg acc acc ccg gct		1057	
Thr Pro Trp Pro Leu Gly Arg Tyr Val Ser Ala Met Thr Thr Pro Ala			
	340	345	
		350	
			10
cgt atg tca cct gta gat ttc cac acg cca agc tcc ccc aag tca ccc		1105	
Arg Met Ser Pro Val Asp Phe His Thr Pro Ser Ser Pro Lys Ser Pro			
	355	360	
		365	
cct tcg gaa atg tcc ccg ccc gtg tcc agc acg acg gtc tcc atg ccc		1153	
Pro Ser Glu Met Ser Pro Pro Val Ser Ser Thr Thr Val Ser Met Pro			
	370	375	
		380	
			20
tcc atg gcg gtc agt ccc ttc gtg gaa gag gag aga ccc ctg ctc ctt		1201	
Ser Met Ala Val Ser Pro Phe Val Glu Glu Glu Arg Pro Leu Leu Leu			
	385	390	
		395	
		400	
gtg acg cca cca cgg ctg cgg gag aag tat gac cac cac gcc cag caa		1249	
Val Thr Pro Pro Arg Leu Arg Glu Lys Tyr Asp His His Ala Gln Gln			
	405	410	
		415	
			30
ttc aac tcg ttc cac tgc aac ccc gcg cat gag agc aac agc ctg ccc		1297	
Phe Asn Ser Phe His Cys Asn Pro Ala His Glu Ser Asn Ser Leu Pro			
	420	425	
		430	
ccc agc ccc ttg agg ata gtg gag gat gag gaa tat gaa acg acc cag		1345	
Pro Ser Pro Leu Arg Ile Val Glu Asp Glu Glu Tyr Glu Thr Thr Gln			
			40

435	440	445	
gag tac gaa cca gct caa gag ccg gtt aag aaa ctc acc aac agc agc			1393
Glu Tyr Glu Pro Ala Gln Glu Pro Val Lys Lys Leu Thr Asn Ser Ser			
450	455	460	
cgg cgg gcc aaa aga acc aag ccc aat ggt cac att gcc cac agg ttg			1441
Arg Arg Ala Lys Arg Thr Lys Pro Asn Gly His Ile Ala His Arg Leu			10
465	470	475	480
gaa atg gac aac aac aca ggc gct gac agc agt aac tca gag agc gaa			1489
Glu Met Asp Asn Asn Thr Gly Ala Asp Ser Ser Asn Ser Glu Ser Glu			
	485	490	495
aca gag gat gaa aga gta gga gaa gat acg cct ttc ctg gcc ata cag			1537
Thr Glu Asp Glu Arg Val Gly Glu Asp Thr Pro Phe Leu Ala Ile Gln			20
500	505	510	
aac ccc ctg gca gcc agt ctc gag gcg gcc cct gcc ttc cgc ctg gtc			1585
Asn Pro Leu Ala Ala Ser Leu Glu Ala Ala Pro Ala Phe Arg Leu Val			
515	520	525	30
gac agc agg act aac cca aca ggc ggc ttc tct ccg cag gaa gaa ttg			1633
Asp Ser Arg Thr Asn Pro Thr Gly Gly Phe Ser Pro Gln Glu Glu Leu			
530	535	540	
cag gcc agg ctc tcc ggt gta atc gct aac caa gac cct atc gct gtc			1681
Gln Ala Arg Leu Ser Gly Val Ile Ala Asn Gln Asp Pro Ile Ala Val			40
545	550	555	560

taaaaccgaa atacacccat agattcacct gtaaaacttt attttatata ataaagtatt 1741  
 ccaccttaa ttaaacaataaaa aaa 1764

<210> 147

<211> 50

<212> PRT

10

<213> Bos taurus

<400> 147

Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys  
 1 5 10 15

Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys  
 20 25 30

20

Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser  
 35 40 45

Phe Tyr  
 50

<210> 148

<211> 50

30

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 148

Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys  
 1 5 10 15

Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys  
 20 25 30

40

Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn Val Pro Met Lys  
                   35                                  40                                  45

Val Gln  
       50

<210> 149

<211> 46

10

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 149

Glu Cys Leu Arg Lys Tyr Lys Asp Phe Cys Ile His Gly Glu Cys Lys  
   1                  5                                  10                                  15

Tyr Val Lys Glu Leu Arg Ala Pro Ser Cys Lys Cys Gln Gln Glu Tyr  
                   20                                  25                                  30

20

Phe Gly Glu Arg Cys Gly Glu Lys Ser Asn Lys Thr His Ser  
                   35                                  40                                  45

<210> 150

<211> 198

<212> DNA

30

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(195)

<400> 150

40

agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtc aat 48



<400> 151

agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat 48  
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
 1 5 10 15

gga ggc gag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac 96  
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr 10  
 20 25 30

ttg tgc aag tgc caa cct gga ttc act gga gcg aga tgt act gag aat 144  
 Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn  
 35 40 45

gtg ccc atg aaa gtc caa acc caa gaa aaa gcg gag gag ctc tac 189 20  
 Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr  
 50 55 60

taa 192

<210> 152

<211> 183 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (180)

40

<400> 152

agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat 48  
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
 1 5 10 15

gga ggc gag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac 96  
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr  
 20 25 30

10

ttg tgc aag tgc cca aat gag ttt act ggt gat cgc tgc caa aac tac 144  
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr  
 35 40 45

gta atg gcc agc ttc tac aaa gcg gag gag ctc tac taa 183  
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr  
 50 55 60

20

<210> 153

<211> 210

<212> DNA

<213> Homo sapiens

30

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (207)

<400> 153

agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat 48  
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

40

1	5	10	15		
gga ggc gag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac				96	
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr					
	20	25	30		
ttg tgc aag tgc cca aat gag ttt act ggt gat cgc tgc caa aac tac				144	10
Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr					
	35	40	45		
gta atg gcc agc ttc tac aag cat ctt ggg att gaa ttt atg gag aaa				192	
Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Lys					
	50	55	60		20
gcg gag gag ctc tac taa				210	
Ala Glu Glu Leu Tyr					
65					
<210> 154					
<211> 267					30
<212> DNA					
<213> Homo sapiens					
<220>					
<221> CDS					
<222> (1)... (264)					
<400> 154					40

agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat	48	
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn		
1                    5                    10                    15		
gga ggc gag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac	96	
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr		
20                    25                    30		10
tig tgc aag tgc caa cct gga ttc act gga gcg aga tgt act gag aat	144	
Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn		
35                    40                    45		
gtg ccc atg aaa gtc caa acc caa gaa aag tgc cca aat gag ttt act	192	
Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr		20
50                    55                    60		
ggt gat cgc tgc caa aac tac gta atg gcc agc ttc tac agt acg tcc	240	
Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser		
65                    70                    75                    80		
act ccc ttt ctg tct ctg cct gaa tag	267	30
Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu		
85		

<210> 155

<211> 252

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (249)

<400> 155

agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat	48	10
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn		
1                    5                    10                    15		
gga ggc gag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac	96	
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr		
20                    25                    30		20
ttg tgc aag tgc caa cct gga ttc act gga gcg aga tgt act gag aat	144	
Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn		
35                    40                    45		
gtg ccc atg aaa gtc caa acc caa gaa aag tgc cca aat gag ttt act	192	
Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr		
50                    55                    60		30
ggt gat cgc tgc caa aac tac gta atg gcc agc ttc tac aaa gcg gag	240	
Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu		
65                    70                    75                    80		
gag ctc tac taa	252	
Glu Leu Tyr		40

<210> 156

<211> 128

<212> DNA

<213> Bos taurus

10

<220>

<221> CDS

<222> (3)... (125)

<400> 156

cc aca tcc aca tct aca gct ggg aca agc cat ctt gtc aag tgt gca 47

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Gly Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala 20

1 5 10 15

gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat gga ggc gag tgc ttc atg gtc 95

Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val

20 25 30

aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac ttg tgc 128 30

Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu

35 40

<210> 157

<211> 141

<212> DNA

<213> Bos taurus

40

<220>

<221> CDS

<222> (2)... (139)

<400> 157

a cat aac ctt ata gct gag cta agg aga aac aag gcc cac aga tcc aaa 49 10

His Asn Leu Ile Ala Glu Leu Arg Arg Asn Lys Ala His Arg Ser Lys

1

5

10

15

tgc atg cag atc cag ctt tcc gca act cat ctt aga gct tct tcc att 97

Cys Met Gln Ile Gln Leu Ser Ala Thr His Leu Arg Ala Ser Ser Ile

20

25

30

20

ccc cat tgg gct tca ttc tct aag acc cct tgg cct tta gga 139

Pro His Trp Ala Ser Phe Ser Lys Thr Pro Trp Pro Leu Gly

35

40

45

ag 141

<210> 158

30

<211> 24

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220>

<221> VARIANT

<222> 15, 22

40

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 158

Ala Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Xaa Phe  
 1                    5                    10                    15  
 Met Val Lys Asp Leu Xaa Asn Pro  
                   20

10

<210> 159

<211> 745

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

20

<222> (1)... (744)

<400> 159

atg aga tgg cga cgc gcc ccg cgc cgc tcc ggg cgt ccc ggc ccc cgg 48  
 Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg  
 1                    5                    10                    15

30

gcc cag cgc ccc ggc tcc gcc gcc cgc tcg tcg ccg ccg ctg ccg ctg 96  
 Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu  
                   20                    25                    30

ctg cca cta ctg ctg ctg ctg ggg acc gcg gcc ctg gcg ccg ggg gcg 144  
 Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala  
                   35                    40                    45

40

gcg gcc ggc aac gag gcg gct ccc gcg ggg gcc tcg gtg tgc tac tcg	192	
Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser		
50 55 60		
tcc ccg ccc agc gtg gga tcg gtg cag gag cta gct cag cgc gcc gcg	240	
Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala		
65 70 75 80		10
gtg gtg atc gag gga aag gtg cac ccg cag cgg cgg cag cag ggg gca	288	
Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala		
85 90 95		
ctc gac agg aag gcg gcg gcg gcg gcg ggc gag gca ggg gcg tgg ggc	336	
Leu Asp Arg Lys Ala Ala Ala Ala Ala Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly		20
100 105 110		
ggc gat cgc gag ccg cca gcc gcg ggc cca cgg gcg ctg ggg ccg ccc	384	
Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro		
115 120 125		
gcc gag gag ccg ctg ctc gcc gcc aac ggg acc gtg ccc tct tgg ccc	432	30
Ala Glu Glu Pro Leu Leu Ala Ala Asn Gly Thr Val Pro Ser Trp Pro		
130 135 140		
acc gcc ccg gtg ccc agc gcc ggc gag ccc ggg gag gag gcg ccc tat	480	
Thr Ala Pro Val Pro Ser Ala Gly Glu Pro Gly Glu Glu Ala Pro Tyr		
145 150 155 160		40
ctg gtg aag gtg cac cag gtg tgg gcg gtg aaa gcc ggg ggc ttg aag	528	

Leu Val Lys Val His Gln Val Trp Ala Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys		
165	170	175
aag gac tgc ctg ctc acc gtg cgc ctg ggg acc tgg ggc cac ccc gcc	576	
Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Thr Trp Gly His Pro Ala		
180	185	190
ttc ccc tcc tgc ggg agg ctc aag gag gac agc agg tac atc ttc ttc	624	10
Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe		
195	200	205
atg gag ccc gac gcc aac agc acc agc cgc gcg ccg gcc gcc ttc cga	672	
Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg		
210	215	220
gcc tct ttc ccc cct ctg gag acg ggc cgg aac ctc aag aag gag gtc	720	
Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val		
225	230	235
agc cgg gtg ctg tgc aag cgg tgc g	745	
Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys		30
245		
<210> 160		
<211> 12		
<212> PRT		
<213> Bos taurus		40

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Lys or Arg

<400> 160

Xaa Ala Leu Ala Ala Ala Gly Tyr Asp Val Glu Lys

1

5

10

10

<210> 161

<211> 5

<212> PRT

<213> Bos taurus

20

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Lys or Arg

<400> 161

Xaa Leu Val Leu Arg

1

5

30

<210> 162

<211> 11

<212> PRT

<213> Bos taurus

40

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa = Lys or Arg

<221> VARIANT

<222> 2, 3

<223> Xaa = Any Amino Acid

10

<400> 162

Xaa Xaa Xaa Tyr Pro Gly Gln Ile Thr Ser Asn

1

5

10

<210> 163

<211> 60

20

<212> DNA

<213> Bos taurus

<220>

<221> misc\_feature

<222> 25, 31

<223> n = A, T, C or G

30

<400> 163

ataggggaagg gcgggggaag ggtcnccctc ngcagggccg ggcttgccctc tggagccctc 60

<210> 164

<211> 18

<212> DNA

40

<213> Bos taurus

<220>

<221> misc\_feature

<222> 16

<223> n = A,T,C or G

<400> 164

tttacacata tattcncc

10

18

<210> 165

<211> 21

<212> PRT

<213> Bos taurus

20

<400> 165

Glu Thr Gln Pro Asp Pro Gly Gln Ile Leu Lys Lys Val Pro Met Val

1

5

10

15

Ile Gly Ala Tyr Thr

20

<210> 166

30

<211> 422

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 166

Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg

1

5

10

15

40

Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu



Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys	
260	265
Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn	
275	280
Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln	
290	295
Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala	10
305	310
Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp	
325	330
Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr	
340	345
Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys	20
355	360
Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser	
370	375
Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp	
385	390
Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro	
405	410
Phe Leu Ser Leu Pro Glu	30
420	

<210> 167

<211> 69

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

<400> 167

Met Ser Glu Arg Lys Glu Gly Arg Gly Lys Gly Lys Gly Lys Lys Lys  
 1                    5                    10                    15  
 Glu Arg Gly Ser Gly Lys Lys Pro Glu Ser Ala Ala Gly Ser Gln Ser  
                   20                    25                    30  
 Pro Arg Glu Ile Ile Thr Gly Met Pro Ala Ser Thr Glu Gly Ala Tyr  
                   35                    40                    45  
 Val Ser Ser Glu Ser Pro Ile Arg Ile Ser Val Ser Thr Glu Gly Ala  
                   50                    55                    60  
 Asn Thr Ser Ser Ser  
 65

10

<210> 168

<211> 19

<212> PRT

20

<213> Bos taurus

<400> 168

Arg Lys Gly Asp Val Pro Gly Pro Arg Val Lys Ser Ser Arg Ser Thr  
 1                    5                    10                    15  
 Thr Thr Ala

30

<210> 169

<211> 231

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 169

cgcgagcggc tcagcgcggc cgctcgcctc cccctcgag ggacaaactt tcccacaaacc    60  
 cgatccgagc cctiggacca aactcgcttg cgccgagagc cgtccgcgta gagcgcctccg    120

40

tctccggcga gatgtccgag cgcaaagaag gcagaggcaa agggaagggc aagaagaagg 180  
 agcgaggctc cggcaagaag cgggagtcg cggcgggcag ccagagccca g 231

<210> 170

<211> 178

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<400> 170

ccctgccctc cggattgaaa gagatgaaaa gccaggaatc ggctgcaggt tccaaactag 60  
 tccttcggtg tgaaccaggt tctgaatact cctctctcag attcaagigg tccaagaatg 120  
 ggaatgaatt gaatcgaaaa aacaaaccac aaaatatcaa gatacaaaaa aagccagg 178

<210> 171

<211> 122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<400> 171

gaagtcagaa ctctgcatta acaaagcatt acitggctgat tctggagagt atatgtgcaa 60  
 agtgatcagc aaattaggaa atgacagtgc ctctgccaat atcaccatcg tggaatcaaa 120  
 cg 122

30

<210> 172

<211> 102

<212> DNA

<213> Homo sapiens

40

<400> 172

agatcatcac tggatgcca gccicaactg aaggagcata tggcttca gagctccca 60  
 ttagaatata agtatccaca gaaggagcaa atacttttc at 102

<210> 173

<211> 128

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<400> 173

ctacatctac atccaccact gggacaagcc atcttgtaaa atgtgaggag aaggagaaaa 60  
 ctttcigtgt gaatggaggg gagtgcttca tggtgaaaga ccttcaaac cccctgagat 120  
 acttgtgc 128

<210> 174

20

<211> 69

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 174

aagtgccaac ctggattcac tggagcaaga tgtactgaga atgtgcccat gaaagtccaa 60  
 aaccaagaa 69 30

<210> 175

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 175

40

aagtgcccaa atgagtttac tggtgatgac tgccaaaact acgtaatggc cagcttctac 60

<210> 176

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 176

agtacgtcca ctccctttct gtctctgctt gaatag 36

10

<210> 177

<211> 569

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 177

aaggcggagg agctgtacca gaagagagtg ctgaccataa ccggcatctg catcgccctc 60  
 ctgtgggtcg gcatcatgtg tgtgggtggc tactgcaaaa ccaagaaaca gcggaaaaag 120  
 ctgcatgacc gtcttcggca gagccttcgg tcigaacgaa acaatatgat gaacattgcc 180  
 aatggggctc accatcctaa cccacccccc gagaatgtcc agctgggtgaa tcaatacgta 240  
 tctaaaaacg tcatctccag tgagcatatt gttagagagag aagcagagac atccttttcc 300  
 accagtcact atacttccac agcccatcac tccactactg tcaccagac tcttagccac 360  
 agctggagca acggacacac tgaagcacc ctttccgaaa gccactctgt aatcgtgatg 420  
 tcatccgtag aaaacagttag gcacagcagc ccaactgggg gcccaagagg acgtcttaat 480  
 ggcacaggag gccctcgtga atgtaacagc ttcttcaggg atgccagaga aacccctgat 540  
 tcttaccgag actctctca tagtgaaag 569

20

30

<210> 178

<211> 730

<212> DNA

40

## &lt;213&gt; Homo sapiens

## &lt;400&gt; 178

gtaatgtgca gccatgacca ccccggtctg taatgacact gtagatticc acacgccaag	60	
ctccccaaa tcgccccctt cggaaatgic tccaccgig tccagcatga cggigtcct	120	
gccttccatg gcggtcagcc ccttcatgga agaagagaga cctctacttc tctgacacc	180	
accaaggctg cgggagaaga agttigacca tcacctcag cagttcagct ccttccacca	240	10
caaccccgcg catgacagta acagctctcc tcttagcccc ttgaggatag tggaggatga	300	
ggagatgaa acgacccaag agtacgagcc agcccaagag cctgttaaga aactcgccaa	360	
tagecggcgg gccaaaagaa ccaagcccaa tggccacatt gctaacagat tggaaagtga	420	
cagcaacaca agctcccaga gcagtaactc agagagtgaa acagaagatg aaagagtagg	480	
tgaagatacg cctttcttgg gcatacagaa ccccttggca gccagctctg aggcaacacc	540	
tgccttccgc ctggctgaca gcaggactaa cccagcaggc cgttctctga cacaggaaga	600	
aatccaggcc aggcctgtct gigttaatgc taaccaagac cctattgctg tataaaacct	660	20
aaataaacac atagattcac ctgtaaaact ttattttata taataaagta ttccacctta	720	
aattaacaaa	730	

## &lt;210&gt; 179

## &lt;211&gt; 23

## &lt;212&gt; DNA

## &lt;213&gt; Artificial Sequence

30

## &lt;220&gt;

## &lt;223&gt; based on Bos taurus

## &lt;400&gt; 179

tcgggctcca tgaagaagat gta	23	
---------------------------	----	--

40

## &lt;210&gt; 180

<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> based on Bos taurus

<400> 180  
tccatgaaga agatgtacct gct

23

10

<210> 181  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> based on Bos taurus

<400> 181  
atgtacctgc tgcctcctt ga

22

30

<210> 182  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> based on Bos taurus

40

〈400〉 182		
ttgaagaagg actcgtctgct ca	22	
〈210〉 183		
〈211〉 20		
〈212〉 DNA		
〈213〉 Artificial Sequence		10
〈220〉		
〈223〉 based on Bos taurus		
〈400〉 183		
aaagccgggg gcttgaagaa	20	
		20
〈210〉 184		
〈211〉 20		
〈212〉 DNA		
〈213〉 Artificial Sequence		
〈220〉		
〈223〉 based on Bos taurus		30
〈400〉 184		
atgargtgtg ggcggcgaaa	20	
〈210〉 185		
〈211〉 422		
〈212〉 PRT		40
〈213〉 Homo sapiens		

<400> 185

Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg  
 1                    5                    10                    15  
 Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu  
                   20                    25                    30  
 Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala  
                   35                    40                    45  
 Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser  
                   50                    55                    60  
 Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala  
 65                    70                    75                    80  
 Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala  
                   85                    90                    95  
 Leu Asp Arg Lys Ala Ala Ala Ala Ala Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly  
                   100                    105                    110  
 Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro  
                   115                    120                    125  
 Ala Glu Glu Pro Leu Leu Ala Ala Asn Gly Thr Val Pro Ser Trp Pro  
                   130                    135                    140  
 Thr Ala Pro Val Pro Ser Ala Gly Glu Pro Gly Glu Glu Ala Pro Tyr  
 145                    150                    155                    160  
 Leu Val Lys Val His Gln Val Trp Ala Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys  
                   165                    170                    175  
 Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Thr Trp Gly His Pro Ala  
                   180                    185                    190  
 Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe  
                   195                    200                    205  
 Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg

10

20

30

40

210	215	220		
Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val				
225	230	235	240	
Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys Ala Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu				
	245	250	255	
Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys				
	260	265	270	10
Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn				
	275	280	285	
Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln				
	290	295	300	
Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala				
305	310	315	320	
Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp				20
	325	330	335	
Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr				
	340	345	350	
Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys				
	355	360	365	
Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser				
	370	375	380	30
Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp				
385	390	395	400	
Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro				
	405	410	415	
Phe Leu Ser Leu Pro Glu				
	420			40

## 【図面の簡単な説明】

【図1】筋芽細胞の分裂促進アッセイにおける rhGGF2 の結果を示すグラフである。

【図2】筋管中の核数に対する rhGGF2 の効果を示すグラフである。

【図3】分化された筋管の生存に対する rhGGF2 の効果を示す生存アッセイのグラフである。

【図4】ヒト血小板由来成長因子、ヒト線維芽細胞成長因子、ヒト上皮成長因子、ヒト白血球阻害因子、およびヒトインシュリン様成長因子 I および II と比較した分化された筋管に対する rhGGF2 の効果を示す生存アッセイのグラフである。

【図5】 rhGGF2 の存在下デュシェーヌ型ジストロフィー細胞の増加した生存を示す 50

グラフである。

【図6】A c h R デルタサブユニット転写コントロール要素のコントロール下 h G H 受容体遺伝子からの C 2 細胞におけるヒト成長ホルモン ( h G H ) 発現の増加のグラフである。この増加は培地への G G F 2 の添加に結びつく。

【図7】C 2 細胞に G G F 2 の量を増加して添加したのちの h G H 受容体合成および A c h R s へのバンガロトキシン ( bungarotoxin ) ( B T X ) の結合の増加のグラフである。

【図8】G G F - I、配列番号 1 ~ 2 0 および 1 6 5 に由来するペプチド配列である ( 以下の実施例 1 1 ~ 1 3 参照 ) 。

【図9】パネル A は変性オリゴヌクレオチドプローブを設計するために用いた G G F - I ペプチドの配列であり、変性 P C R プライマーを示す ( 配列番号 1、1 7 および 2 2 ~ 2 9 ) 。パネル A の配列のうちいくつかは合成ペプチドを設計するためにも用いられた。パネル B は変性プローブまたは変性 P C R プライマーの設計のためには短すぎた ( 6 アミノ酸より少ない ) 新規なペプチド ( 配列番号 1 7 および 3 2 ) の表である。

【図10】G G F - II、配列番号 4 2 ~ 5 0 および 1 6 5 に由来するペプチド配列である ( 以下の実施例 1 1 ~ 1 3 参照 ) 。

【図11】パネル A に、変性オリゴヌクレオチドプローブおよび変性 P C R プライマーを設計するために用いられた G G F - II ペプチドの配列を列挙する ( 配列番号 4 2 ~ 4 9 ) 。パネル A の配列のうちいくつかは合成ペプチドを設計するために用いられた。パネル B は変性プローブまたは変性 P C R プライマーの設計のためには短すぎた ( 6 アミノ酸より少ない ) 新規なペプチド ( 配列番号 5 0 ) を示す。

【図12】実施例 8 に関連し、本発明の因子の分裂促進活性を示す。

【図13】図 1 3 A、1 3 B は実施例 8 に関連し、本発明の因子の分裂促進活性を示す。

【図14】実施例 8 に関連し、本発明の因子の分裂促進活性を示す。

【図15】実施例 8 に関連し、本発明の因子の分裂促進活性を示す。

【図16】実施例 8 に関連し、本発明の因子の分裂促進活性を示す。

【図17】実施例 8 に関連し、本発明の因子の分裂促進活性を示す。

【図18】実施例 8 に関連し、本発明の因子の分裂促進活性を示す。

【図19】実施例 8 に関連し、本発明の因子の分裂促進活性を示す。

【図20】実施例 1 0 に関連し、以下に簡単に説明する。図 2 0 は図 7、パネル A および図 9、パネル A の新規なペプチド配列から設計された変性オリゴヌクレオチドプローブ ( 配列番号 5 1 ~ 8 4 ) を列挙する。

【図21】実施例 1 0 に関連し、以下に簡単に説明する。図 2 1 ( 配列番号 8 5 ) は組換えウシゲノムファージ G G F 2 B G 1 からの推定される ( putative ) 一続きのウシ G G F - II 遺伝子配列を示し、これは変性オリゴヌクレオチドプローブ 6 0 9 および 6 5 0 ( 図 1 8、それぞれ配列番号 6 6 および 6 9 ) の結合部位を含む。図は第 3 リーディングフレーム内の D N A 配列のコーディングストランドおよび推定された ( deduced ) アミノ酸配列である。因子 2 からのペプチド 1 2 の配列 ( ボールド ( bold ) ) は、6 6 アミノ酸のオープンリーディングフレーム ( ヌクレオチド 7 5 2 7 2 ) の一部である。

【図22】実施例 1 0 に関連し、以下に簡単に説明する。図 2 2 は変性 P C R プライマー ( パネル A、配列番号 8 6 ~ 1 0 4 ) および下垂体前葉からの R N A 中に存在するウシ G G F - II をコードする配列のセグメントを単離するための実験において用いられた独自の P C R プライマー ( パネル B、配列番号 1 0 5 ~ 1 1 5 ) を列挙する。

【図23】実施例 1 0 に関連し、以下に簡単に説明する。図 2 3 に、P C R 増幅実験でえられた 9 個の別個の隣接する ( contiguous ) ウシ G G F - II c D N A 構造および配列を示す。図の上に付した線は特徴付けがなされた c D N A 構造に寄与するコーディング配列の図解を示す。

【図24】実施例 1 0 に関連し、以下に簡単に説明する。図 2 4 は G G F 2 B G 1 のウシ組換えファージの物理的地図 ( physical map ) である。ウシフラグメントはおおよそ 2 0 k b の長さでウシ G G F - II 遺伝子の 2 つのエクソン ( ボールド ) を含む。酵素 X b a 1、S p e 1、N d e 1、E c o R I、K p n 1、および S s t I に対する制限部位をこの物

10

20

30

40

50

理的地図に記している。影を付した部分は配列決定のためにサブクローン化されたフラグメントに対応する。

【図25】実施例10に関連し、以下に簡単に説明する。図25は推定されるウシGGF-II遺伝子の3つの副遺伝子産物(alternative gene products)の構造を図式的に示す。エクソンはAからEまでそれらの発見の順に列挙する。選択的スプライシングパターン1、2および3は、3つのオーバーラップする推定されたタンパク質構造(GGF2BPP1、2、および3)をつくり、それらを種々の図27A、27B、27C(後記)に表わす。

【図26】実施例10に関連し、以下に簡単に説明する。図26(配列番号116~128)では、図9および図11に列挙された新規なペプチド配列をもつ、図27A、図27Bおよび図27Cに示す推定されたタンパク質の配列(後記)において同定されるGGF-IおよびGGF-II配列を比較する。図によって9つの新規なGGF-IIペプチド配列のうち6つがこれら推定されたタンパク質の配列に対することが示される。GGF-I配列と類似の2つのペプチド配列もまた見出された。

10

【図27】実施例10に関連し、以下に簡単に説明する。図27(配列番号129)は図25のスプライシングパターン番号1からえられるcDNAのコーディングストランドDNA配列および推定されたアミノ酸配列を示す。この推定されるウシGGF-II遺伝子の部分的なcDNAは、206アミノ酸長のタンパク質をコードする。ポールドで示すペプチドは図9および図11に示すリストから同定されたものである。潜在的なグリコシル化部位に下線を付す(ポリアデニル化シグナルAATAAAに加えて);図27(配列番号130)は図25におけるスプライシングパターン番号3からえられるcDNAのコーディングストランドDNA配列および推定されたアミノ酸配列を示す。この推定されるウシGGF-II遺伝子の部分的なcDNAは、257アミノ酸長のタンパク質をコードする。ポールドで示すペプチドは図9および図11におけるリストから同定されたものである。潜在的なグリコシル化部位に下線を付す(ポリアデニル化シグナルAATAAAに加えて)。

20

【図28】実施例16に関連し、サザンブロット上での種々のホ乳動物DNAへの推定されるウシGGF-II遺伝子配列の交差ハイブリダイゼーション分析のオートラジオグラムを示す。フィルターは図に列挙する種からのEcoRIで消化されたDNA(レーンあたり5μg)のレーンを含む。図24中の物理的地図により予想されるようにウシDNA中の4kbフラグメントを含めて、プローブは各DNAサンプル中に強い単一バンドを検出する。比較的小さい強度のバンドもまた観察され、これらは関連するDNA配列を示しうる。他のホ乳動物DNAサンプルのそれぞれからの強くハイブリダイズするバンドは、おそらくはこれらの種のGGF-II相同物を示す。

30

【図29】代表的なスプライシング変異体のダイアグラムである。コーディングセグメントはF、E、B、A、G、C、C/D、C/D、D、D、H、KおよびLで示される。精製されたタンパク質に由来したペプチド配列の位置を「」によって示す。

【図30A】図30(配列番号136~143、156、157、169~178)は、GGFのコーディングセグメントのDNA配列および予測されるペプチド配列を示す。列1はウシGGFの予測されるアミノ酸配列を表わし、列2はウシGGFのヌクレオチド配列を表わし、列3はヒトGGF(ヘレグリン)のヌクレオチド配列を表わし(ヌクレオチドの塩基のマッチ(matches)を垂直線で示す)また列4はヒトGGF/ヘレグリンの予測されるアミノ酸配列を表わし、この配列は予測されるウシの配列とは異なる。コーディングセグメントE、AおよびKはウシの配列のみを示す。コーディングセグメントDはヒト(ヘレグリン)の配列のみを示す。

40

【図30B】図30(配列番号136~143、156、157、169~178)は、GGFのコーディングセグメントのDNA配列および予測されるペプチド配列を示す。列1はウシGGFの予測されるアミノ酸配列を表わし、列2はウシGGFのヌクレオチド配列を表わし、列3はヒトGGF(ヘレグリン)のヌクレオチド配列を表わし(ヌクレオチドの塩基のマッチ(matches)を垂直線で示す)また列4はヒトGGF/ヘレグリンの予測

50





G G FのコーディングセグメントのDNA配列および予測されるペプチド配列を示す。列1はウシG G Fの予測されるアミノ酸配列を表わし、列2はウシG G Fのヌクレオチド配列を表わし、列3はヒトG G F (ヘレグリン)のヌクレオチド配列を表わし(ヌクレオチドの塩基のマッチ(matches)を垂直線で示す)また列4はヒトG G F /ヘレグリンの予測されるアミノ酸配列を表わし、この配列は予測されるウシの配列とは異なる。コーディングセグメントE、A およびKはウシの配列のみを示す。コーディングセグメントD はヒト(ヘレグリン)の配列のみを示す。

【図31】図31(配列番号144)は、B P P 5の予測されるG G F 2アミノ酸配列およびヌクレオチド配列である。上側の列はヌクレオチド配列を表わし、下側の列は予測されるアミノ酸配列を表わす。

10

【図32】図32(配列番号145)は、G G F 2 B P P 2の予測されるアミノ酸配列およびヌクレオチド配列である。上側の列はヌクレオチド配列を表わし、下側の列は予測されるアミノ酸配列を表わす。

【図33】図33(配列番号146)は、G G F 2 B P P 4の予測されるアミノ酸配列およびヌクレオチド配列である。上側の列はヌクレオチド配列を表わし、下側の列は予測されるアミノ酸配列を表わす。

【図34】図34(配列番号147~149)は、2つのG G F ペプチド配列(G G F 2 B P P 4およびG G F 2 B P P 5)のヒトE G F (h E G F)とのアラインメントを記す。星印は保存されたシステインの位置を示す。

【図35】G G Fの量の増加に応じたG G F活性(シュワン細胞分裂促進能アッセイ)および約200kDタンパク質のチロシンリン酸化(抗ホスホチロシンポリクローナル抗体とともに展開されたウェスタンブロットのオートラジオグラム上での200kDのバンドの強度)のレベルを記す。

20

【図36】図30に示す配列に由来するスプライシング変異体のリストである。

【図37】E G F L 1の予測されるアミノ酸配列、下部、およびヌクレオチド配列、上部である(配列番号150)。

【図38】E G F L 2の予測されるアミノ酸配列、下部、およびヌクレオチド配列、上部である(配列番号151)。

【図39】E G F L 3の予測されるアミノ酸配列、下部、およびヌクレオチド配列、上部である(配列番号152)。

30

【図40】E G F L 4の予測されるアミノ酸配列、下部、およびヌクレオチド配列、上部である(配列番号153)。

【図41】E G F L 5の予測されるアミノ酸配列、下部、およびヌクレオチド配列、上部である(配列番号154)。

【図42】E G F L 6の予測されるアミノ酸配列、下部、およびヌクレオチド配列、上部である(配列番号159)。

【図43】クローンのスケールコーディングセグメント地図である。T 3はクローンからmRNAをつくるために用いられたバクテリオファージプロモーターのことである。R = フランキングするE c o R I制限酵素部位。5' U Tは5' 非翻訳領域のことである。E、B、A、C、C / D およびDはコーディングセグメントのことである。O = 翻訳開始部位。 = ウシEセグメントと相同な領域の5' 限界(実施例17参照)また3' U Tは3' 非翻訳領域のことである。

40

【図44】G G F 2 H B S 5の予測されるアミノ酸配列(中部)およびヌクレオチド配列(上部)である(配列番号21)。下部(間欠(intermittent)配列)は、G G F - II調製物に由来したペプチド配列を表わす(図8、9参照)。

【図45A】分画による陽イオン交換カラム上のr G G Fの精製を示すグラフである。

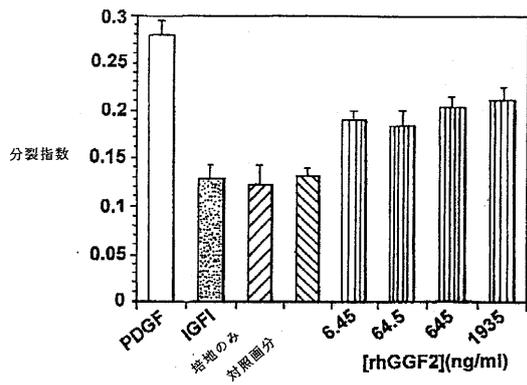
【図45B】図45Aに示された画分とG G F IIに特異的な抗体を用いたウェスタンブロットの写真である。

【図46】G G F H B S 5、G G F H F B 1およびG G F B P P 5ポリペプチドの配列を示す(配列番号: 166、167、および168)。

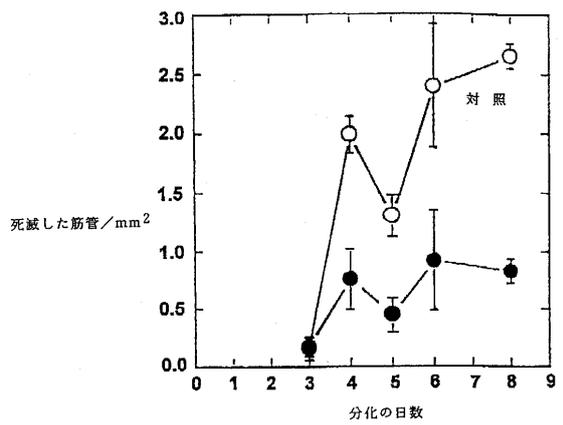
50

【図47】プラスミド p c D H R F p o l y A の地図である。

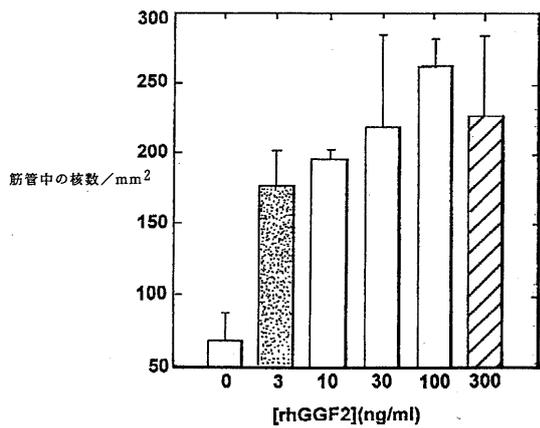
【図1】



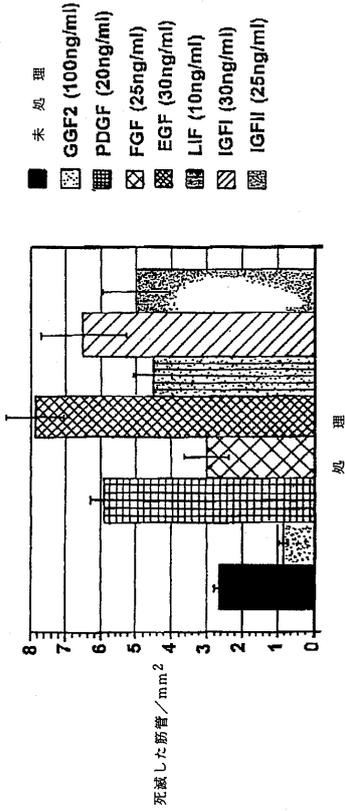
【図3】



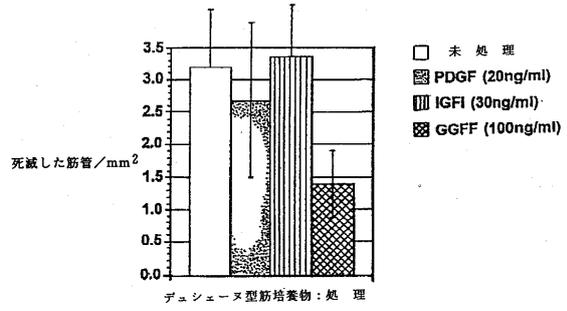
【図2】



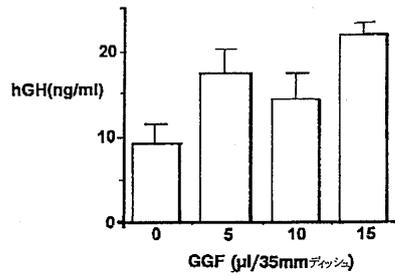
【 図 4 】



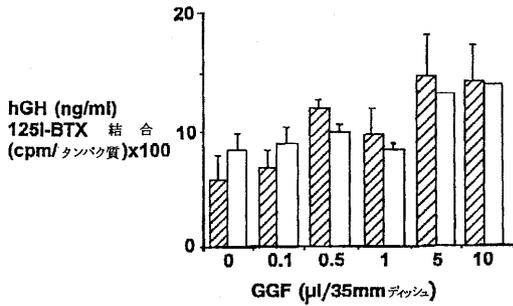
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】

GGF-I 01	N-末端	(SEQ ID NO: 1)
GGF-I 02	トリプシン ペプチド	(SEQ ID NO: 2)
GGF-I 03	K/R A S L A D E Y E Y M X X K *	(SEQ ID NO: 3)
GGF-I 04	K/R T E T S S G L X L K *	(SEQ ID NO: 4)
GGF-I 05	K/R L G E M W A E	(SEQ ID NO: 5)
GGF-I 06	K/R I K S E H A G L S I G D T A K *	(SEQ ID NO: 6)
GGF-I 07	K/R A S L A D E Y E Y M R R K *	(SEQ ID NO: 7)
GGF-I 08	K/R I K G E H P G L S I G D V A K *	(SEQ ID NO: 8)
GGF-I 09	K/R M S E Y A F F V Q T X R *	(SEQ ID NO: 9)
GGF-I 10	K/R S E H F G L S I G D T A K *	(SEQ ID NO: 10)
GGF-I 11	K/R A G Y F A E X X R *	(SEQ ID NO: 11)
GGF-I 12	K/R K L E F L X A K *	(SEQ ID NO: 12)
GGF-I 13	K/R T E M A S E Q G A	(SEQ ID NO: 13)
GGF-I 14	K/R A K E A L A A L K *	(SEQ ID NO: 14)
GGF-I 15	K/R F V L Q A K K *	(SEQ ID NO: 15)
GGF-I 16	K/R L G E M W	(SEQ ID NO: 16)
GGF-I 17	プロテアーゼ V8 ペプチド	(SEQ ID NO: 165)
GGF-I 18	E T Q P D P G Q I L K K V P M V I G A Y T	(SEQ ID NO: 17)
GGF-I 19	E Y K C L K F K W F K K A T V M	(SEQ ID NO: 18)
GGF-I 20	E A K Y F S K X D A	(SEQ ID NO: 19)
GGF-I 21	E L S F A S V R L P L P G C P P G V D P M V S F P V A L	(SEQ ID NO: 20)

【 9 】

A  
GGF-I 01 F X G D A H T E (SEQ ID NO: 1)  
GGF-I 02 A S L A D E V E Y M X X K (SEQ ID NO: 22)  
GGF-I 03 T E T S S G L X L L K (SEQ ID NO: 23)  
GGF-I 07 A S L A D E V E Y M R R K (SEQ ID NO: 24)  
GGF-I 11 A G Y F A E X A R (SEQ ID NO: 25)  
GGF-I 13 T T E M A S E Q G A (SEQ ID NO: 26)  
GGF-I 14 A K E A L A A L L K (SEQ ID NO: 27)  
GGF-I 15 F V L Q A K K (SEQ ID NO: 28)  
GGF-I 17 E T Q P D P G Q I L L K V P M V I G A Y T (SEQ ID NO: 29)  
GGF-I 18 E Y K C L K F K W F K K A T V M (SEQ ID NO: 17)

B  
GGF-I 20 E X K F Y V P (SEQ ID NO: 19)  
GGF-I 12 K L E F F L X A K (SEQ ID NO: 32)

【 1 1 】

A  
GGF-II 01 V H Q V W A A K (SEQ ID NO: 42)  
GGF-II 02 Y I F M E P E A X S S G (SEQ ID NO: 43)  
GGF-II 03 L G A W G P P A F P V X Y (SEQ ID NO: 44)  
GGF-II 04 W F V V I E G K (SEQ ID NO: 45)  
GGF-II 08 A S P V S V G S V Q E L V Q R (SEQ ID NO: 46)  
GGF-II 09 V C L L T V A A P P T (SEQ ID NO: 47)  
GGF-II 11 K V H Q V W A A K K (SEQ ID NO: 48)  
GGF-II 12 K A S L A D S G E Y M X K (SEQ ID NO: 49)

B  
新緑な因子IIペプチド-その他 (SEQ ID NO: 50)  
GGF-II 10 D L L L X V (SEQ ID NO: 50)

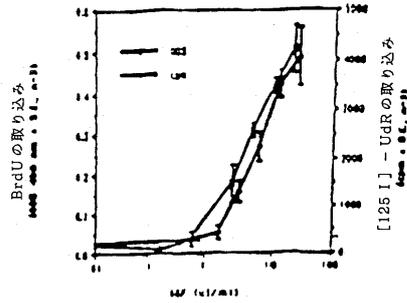
【 1 0 】

GGF-II 01 トリアプシン ペプチド (SEQ ID NO: 42)  
GGF-II 02 K/R V H Q V W A A K \* (SEQ ID NO: 43)  
GGF-II 03 K/R Y I F F N E P E A X S S G (SEQ ID NO: 44)  
GGF-II 04 K/R L G A W G P P A F P V X Y (SEQ ID NO: 45)  
GGF-II 05 K/R W F V V I E G K \* (SEQ ID NO: 164)  
GGF-II 06 K/R A L A A A G Y D V E K \* (SEQ ID NO: 165)  
GGF-II 07 K/R L V L L R \* (SEQ ID NO: 166)  
GGF-II 08 K/R X X Y P P G Q I T S N (SEQ ID NO: 46)  
GGF-II 09 K/R A S P V S V G S V Q E L V Q R \* (SEQ ID NO: 46)  
GGF-II 10 K/R V C L L T V A A P P T (SEQ ID NO: 46)  
GGF-II 10 K/R D L L L L X V (SEQ ID NO: 50)

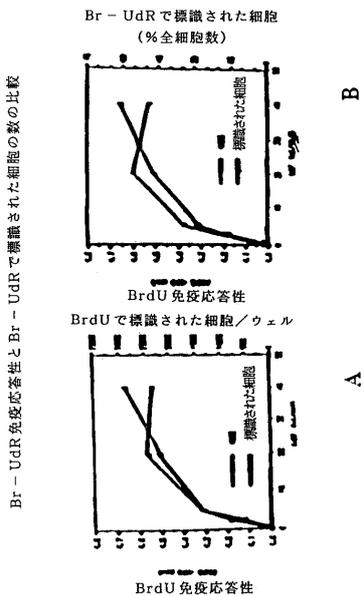
GGF-II 11 リンエンペプチド-ゼーC ペプチド (SEQ ID NO: 48)  
GGF-II 12 K V H Q V W A A K \* (SEQ ID NO: 49)  
K A S L A D S G E Y M X K \*

【 1 2 】

シモワン細胞培養物におけるDNA合成アッセイのためのBrdU-ELISAと[125I]UdRカウント法の比較

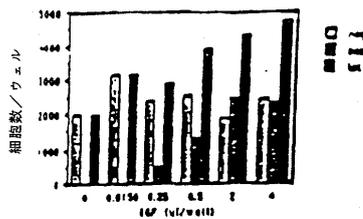


【 図 1 3 】



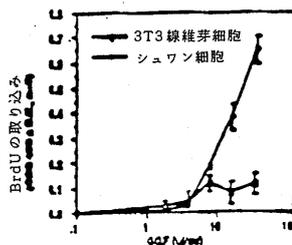
【 図 1 4 】

GGF類に対するラット座骨神経シュワン細胞の分裂促進応答



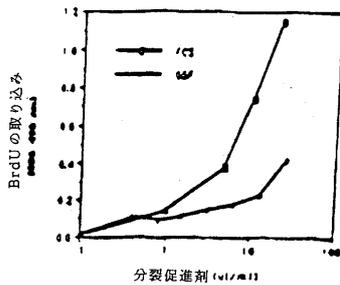
【 図 1 5 】

GGF類存在下でのラット座骨神経シュワン細胞および3T3線維芽細胞のDNA合成



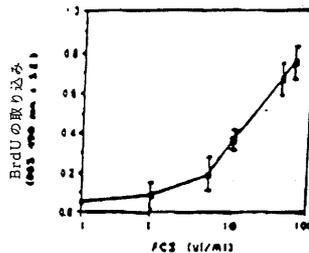
【 図 1 6 】

FCSおよびGGF類に対するBHK21 C13細胞の分裂促進応答



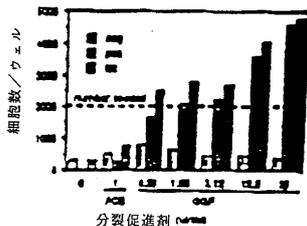
【 図 1 8 】

FCSに対するC6細胞の分裂促進応答



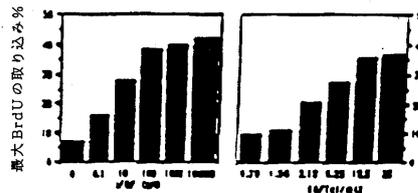
【 図 1 7 】

GGF類存在下48時間後のBHK21 C13細胞微小培養物の生存および増殖



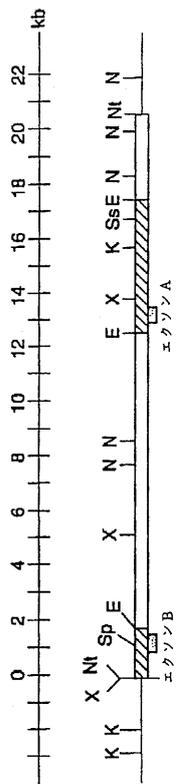
【 図 1 9 】

aFGFおよびGGF類に対するC6細胞の分裂促進応答

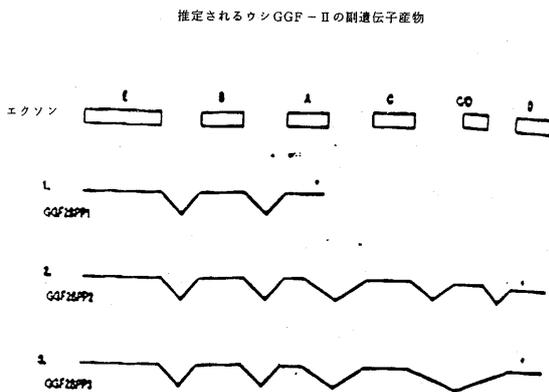




【 図 2 4 】



【 図 2 5 】



【 図 2 6 】

推定されるウシGGF-IIタンパク質の推定されたアミノ酸配列において同定されるGGF-IIペプチド

ペプチド	位置	配列のマッチ	
II-1	1:	VHQVWAAR HQVWAAR AAGLR	(SEQ ID NO: 116)
II-10	14:	DLLLLV DGLLR dellcv RLGM	(SEQ ID NO: 117)
II-03	21:	LGANGPPAFVYK LLTVR lqavghpafpccg RLKED	(SEQ ID NO: 116) (SEQ ID NO: 117)
II-02	41:	VIFPKEPEAKSQQ KEDSR VIFPKEPEAKSQQ GPGRL	(SEQ ID NO: 120) (SEQ ID NO: 121)
II-6	103:	LVLK VAGSK LVLK CETSS	(SEQ ID NO: 122)
I-18	112:	EYKLEKFKVFIQATVW CETSS eyslkfkfvlqgsel SDRK	(SEQ ID NO: 123) (SEQ ID NO: 124)
II-12	151:	KASLADSGEYVCK ELRIS KASLADSGEYVCK VISKL	(SEQ ID NO: 125) (SEQ ID NO: 126)
I-07	152:	ASLADSEYVCK LRIK ASLADSEYVCK VISKL	(SEQ ID NO: 127) (SEQ ID NO: 128)

【 図 2 7 】

GGF2BPP3のスクレオチ F配列  
および推定されたアミノ酸配列

GGF2BPP2のスクレオチ F配列  
および推定されたアミノ酸配列

SEQ ID NO: 129 :

101  
 102  
 103  
 104  
 105  
 106  
 107  
 108  
 109  
 110  
 111  
 112  
 113  
 114  
 115  
 116  
 117  
 118  
 119  
 120  
 121  
 122  
 123  
 124  
 125  
 126  
 127  
 128  
 129  
 130  
 131  
 132  
 133  
 134  
 135  
 136  
 137  
 138  
 139  
 140  
 141  
 142  
 143  
 144  
 145  
 146  
 147  
 148  
 149  
 150  
 151  
 152  
 153  
 154  
 155  
 156  
 157  
 158  
 159  
 160  
 161  
 162  
 163  
 164  
 165  
 166  
 167  
 168  
 169  
 170  
 171  
 172  
 173  
 174  
 175  
 176  
 177  
 178  
 179  
 180  
 181  
 182  
 183  
 184  
 185  
 186  
 187  
 188  
 189  
 190  
 191  
 192  
 193  
 194  
 195  
 196  
 197  
 198  
 199  
 200  
 201  
 202  
 203  
 204  
 205  
 206  
 207  
 208  
 209  
 210  
 211  
 212  
 213  
 214  
 215  
 216  
 217  
 218  
 219  
 220  
 221  
 222  
 223  
 224  
 225  
 226  
 227  
 228  
 229  
 230  
 231  
 232  
 233  
 234  
 235  
 236  
 237  
 238  
 239  
 240  
 241  
 242  
 243  
 244  
 245  
 246  
 247  
 248  
 249  
 250  
 251  
 252  
 253  
 254  
 255  
 256  
 257  
 258  
 259  
 260  
 261  
 262  
 263  
 264  
 265  
 266  
 267  
 268  
 269  
 270  
 271  
 272  
 273  
 274  
 275  
 276  
 277  
 278  
 279  
 280  
 281  
 282  
 283  
 284  
 285  
 286  
 287  
 288  
 289  
 290  
 291  
 292  
 293  
 294  
 295  
 296  
 297  
 298  
 299  
 300  
 301  
 302  
 303  
 304  
 305  
 306  
 307  
 308  
 309  
 310  
 311  
 312  
 313  
 314  
 315  
 316  
 317  
 318  
 319  
 320  
 321  
 322  
 323  
 324  
 325  
 326  
 327  
 328  
 329  
 330  
 331  
 332  
 333  
 334  
 335  
 336  
 337  
 338  
 339  
 340  
 341  
 342  
 343  
 344  
 345  
 346  
 347  
 348  
 349  
 350  
 351  
 352  
 353  
 354  
 355  
 356  
 357  
 358  
 359  
 360  
 361  
 362  
 363  
 364  
 365  
 366  
 367  
 368  
 369  
 370  
 371  
 372  
 373  
 374  
 375  
 376  
 377  
 378  
 379  
 380  
 381  
 382  
 383  
 384  
 385  
 386  
 387  
 388  
 389  
 390  
 391  
 392  
 393  
 394  
 395  
 396  
 397  
 398  
 399  
 400  
 401  
 402  
 403  
 404  
 405  
 406  
 407  
 408  
 409  
 410  
 411  
 412  
 413  
 414  
 415  
 416  
 417  
 418  
 419  
 420  
 421  
 422  
 423  
 424  
 425  
 426  
 427  
 428  
 429  
 430  
 431  
 432  
 433  
 434  
 435  
 436  
 437  
 438  
 439  
 440  
 441  
 442  
 443  
 444  
 445  
 446  
 447  
 448  
 449  
 450  
 451  
 452  
 453  
 454  
 455  
 456  
 457  
 458  
 459  
 460  
 461  
 462  
 463  
 464  
 465  
 466  
 467  
 468  
 469  
 470  
 471  
 472  
 473  
 474  
 475  
 476  
 477  
 478  
 479  
 480  
 481  
 482  
 483  
 484  
 485  
 486  
 487  
 488  
 489  
 490  
 491  
 492  
 493  
 494  
 495  
 496  
 497  
 498  
 499  
 500  
 501  
 502  
 503  
 504  
 505  
 506  
 507  
 508  
 509  
 510  
 511  
 512  
 513  
 514  
 515  
 516  
 517  
 518  
 519  
 520  
 521  
 522  
 523  
 524  
 525  
 526  
 527  
 528  
 529  
 530  
 531  
 532  
 533  
 534  
 535  
 536  
 537  
 538  
 539  
 540  
 541  
 542  
 543  
 544  
 545  
 546  
 547  
 548  
 549  
 550  
 551  
 552  
 553  
 554  
 555  
 556  
 557  
 558  
 559  
 560  
 561  
 562  
 563  
 564  
 565  
 566  
 567  
 568  
 569  
 570  
 571  
 572  
 573  
 574  
 575  
 576  
 577  
 578  
 579  
 580  
 581  
 582  
 583  
 584  
 585  
 586  
 587  
 588  
 589  
 590  
 591  
 592  
 593  
 594  
 595  
 596  
 597  
 598  
 599  
 600  
 601  
 602  
 603  
 604  
 605  
 606  
 607  
 608  
 609  
 610  
 611  
 612  
 613  
 614  
 615  
 616  
 617  
 618  
 619  
 620  
 621  
 622  
 623  
 624  
 625  
 626  
 627  
 628  
 629  
 630  
 631  
 632  
 633  
 634  
 635  
 636  
 637  
 638  
 639  
 640  
 641  
 642  
 643  
 644  
 645  
 646  
 647  
 648  
 649  
 650  
 651  
 652  
 653  
 654  
 655  
 656  
 657  
 658  
 659  
 660  
 661  
 662  
 663  
 664  
 665  
 666  
 667  
 668  
 669  
 670  
 671  
 672  
 673  
 674  
 675  
 676  
 677  
 678  
 679  
 680  
 681  
 682  
 683  
 684  
 685  
 686  
 687  
 688  
 689  
 690  
 691  
 692  
 693  
 694  
 695  
 696  
 697  
 698  
 699  
 700  
 701  
 702  
 703  
 704  
 705  
 706  
 707  
 708  
 709  
 710  
 711  
 712  
 713  
 714  
 715  
 716  
 717  
 718  
 719  
 720  
 721  
 722  
 723  
 724  
 725  
 726  
 727  
 728  
 729  
 730  
 731  
 732  
 733  
 734  
 735  
 736  
 737  
 738  
 739  
 740  
 741  
 742  
 743  
 744  
 745  
 746  
 747  
 748  
 749  
 750  
 751  
 752  
 753  
 754  
 755  
 756  
 757  
 758  
 759  
 760  
 761  
 762  
 763  
 764  
 765  
 766  
 767  
 768  
 769  
 770  
 771  
 772  
 773  
 774  
 775  
 776  
 777  
 778  
 779  
 780  
 781  
 782  
 783  
 784  
 785  
 786  
 787  
 788  
 789  
 790  
 791  
 792  
 793  
 794  
 795  
 796  
 797  
 798  
 799  
 800  
 801  
 802  
 803  
 804  
 805  
 806  
 807  
 808  
 809  
 810  
 811  
 812  
 813  
 814  
 815  
 816  
 817  
 818  
 819  
 820  
 821  
 822  
 823  
 824  
 825  
 826  
 827  
 828  
 829  
 830  
 831  
 832  
 833  
 834  
 835  
 836  
 837  
 838  
 839  
 840  
 841  
 842  
 843  
 844  
 845  
 846  
 847  
 848  
 849  
 850  
 851  
 852  
 853  
 854  
 855  
 856  
 857  
 858  
 859  
 860  
 861  
 862  
 863  
 864  
 865  
 866  
 867  
 868  
 869  
 870  
 871  
 872  
 873  
 874  
 875  
 876  
 877  
 878  
 879  
 880  
 881  
 882  
 883  
 884  
 885  
 886  
 887  
 888  
 889  
 890  
 891  
 892  
 893  
 894  
 895  
 896  
 897  
 898  
 899  
 900  
 901  
 902  
 903  
 904  
 905  
 906  
 907  
 908  
 909  
 910  
 911  
 912  
 913  
 914  
 915  
 916  
 917  
 918  
 919  
 920  
 921  
 922  
 923  
 924  
 925  
 926  
 927  
 928  
 929  
 930  
 931  
 932  
 933  
 934  
 935  
 936  
 937  
 938  
 939  
 940  
 941  
 942  
 943  
 944  
 945  
 946  
 947  
 948  
 949  
 950  
 951  
 952  
 953  
 954  
 955  
 956  
 957  
 958  
 959  
 960  
 961  
 962  
 963  
 964  
 965  
 966  
 967  
 968  
 969  
 970  
 971  
 972  
 973  
 974  
 975  
 976  
 977  
 978  
 979  
 980  
 981  
 982  
 983  
 984  
 985  
 986  
 987  
 988  
 989  
 990  
 991  
 992  
 993  
 994  
 995  
 996  
 997  
 998  
 999  
 1000

(SEQ ID NO: 131)

(SEQ ID NO: 130)







【 30K 】

27

コーディングセグメント D (SEQ ID NO: 141 (ウシ))

Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu  
AAG CAT CTT GGG ATT GAA TTT ATG GAG

【 30M 】

46

94

141

コーディングセグメント K (SEQ ID NO: 142)

A CAT AAC CTT ATA GGT GAG CTA AGG AGA AAC AAG GCC CAC AGA TCC  
His Asn Leu Ile Ala Glu Leu Arg Arg Asn Lys Ala His Arg Ser  
AAA TGC ATG CAG ATC CAG CTT TCC GCA ACT CAT CTT AGA GGT TCT TCC  
Lys Cys Met Gln Ile Gln Leu Arg Ala Thr His Leu Arg Ala Ser Ser  
ATT CCC CAT TGG GCT TCA TTC TCT TAG ACC CCT TCG CTT TTA GGA AG  
Ile Pro His Trp Ala Ser Phe Ser Lys Thr Pro Trp Pro Leu Gly Arg

【 30L 】

コーディングセグメント H (SEQ ID NO: 146 (ウシ) および 181 (ヒト))

Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln Lys Arg Val Leu Thr Ile Thr Gly Ile  
AAA CCG GAG GAG CTC TAC CAG AAG AGA GTG CTC ACC ATT ACC GGC ATT  
RAG CGG GAG GAG CTG TAC CAG AAG AGA GTG CTG ACC ATA ACC GGC ATC

Cys Ile Ala Leu Leu Val Val Gly Ile Met Cys Val Val Val Tyr Cys  
TGC ATC GCG CTG CTC GTG GPT GGC ATC ATG TGT GTG GTG GTC TAC TGC  
TGC ATC GCC CTC CTT GTG GTC GGC ATC ATG TGT CTG CTG GCC TAC TGC

Lys Thr Lys Lys Gln Arg Lys Lys Leu His Asp Arg Leu Arg Gln Ser  
AAA ACC AAG AAA CAA CCG AAA AAG CTT CAT GAC CCG CTT CGG CAG AGC  
AAA ACC AAG AAA CAG CCG AAA AAG CTG CAT GAC CTT CTT CGG CAG AGC

Leu Arg Ser Glu Arg Asn Thr Met Met Asn Val Ala Asn Gly Pro His  
CTT CGG TCT GAA AGA AAC ACC ATG ATG AAC GTA GCC AAC GGG CCC CAC  
CTT CGG TCT GAA CGA AAC AAT ATG ATG AAC ATT GCC AAT GGG CCT CAC

His Pro Asn Pro Pro Pro Glu Asn Val Gln Leu Val Asn Gln Tyr Val  
CAC CCC AAT CCG CCC CCC GAG AAC CTG CAG CTG GTG AAT CAA TAC GTA  
CAT CCT AAC CCA CCC CCC GAG AAT GTC CAG CTG GTG AAT CAA TAC GTA

Ser Lys Asn Val Ile Ser Ser Glu His Ile Val Glu Arg Glu Ala Glu  
TCT AAA AAT CTC ATC TCT AGC GAG CAT ATT GTT CAG AGA GAG CCG GAG  
TCT AAA AAC GTC ATC TCC AGT GAG CAT ATT GTT GAG AGA GAA GCA GAG

Ser Ser Phe Ser Thr Ser His Tyr Thr Ser Thr Ala His His Ser Thr  
AGC TCT TTT TCC ACC AGT CAC TAC ACT TCG ACA GCT CAT CAT TCC ACT  
ACA TCC TTT TCC ACC AGT CAC TAT ACT TCC ACA GCC CAT CAC TCC ACT

Thr Val Thr Gln Thr Pro Ser His Ser Trp Ser Asn Gly His Thr Glu  
ACT GTC ACT CAG ACT CCC AGT CAC AGC GGC ACC AAT GGA CAC ACT GAA  
ACT GTC ACC CAG ACT CCT AGC CAC AGC TGG AGC AAC GGA CAC ACT GAA

Ser Ile Ile Ser Glu Ser His Ser Val Ile Val Met Ser Ser Val Glu  
AGC ATC ATT TCG GAA AGC CAC TCT CTC ATC GTG ATG TCA CCA GTA GAA  
AGC ATC CTT TCC GAA AGC CAC TCT GTA ATC GTG ATG TCA TCC GTA GAA

Asn Ser Arg His Ser Ser Pro Thr Gly Gly Pro Arg Gly Arg Leu Asn  
AAC ACT AGG CAC AGC AGC CCG ACT AGC GGC CCG AGA GGA CCT CTC AAT  
AAC AGT AGG CAC AGC AGC CCA ACT GGG GGC CCA AGA GGA CCT CTT AAT

Gly Leu Gly Gly Pro Arg Glu Cys Asn Ser Phe Leu Arg His Ala Arg  
GGC TTG GGA GGC CCT CGT GAA TGT AAC AGC TTC CTC AGG CAT GCC AGA  
GGC ACA GGA GGC CCT CGT GAA TGT AAC AGC TTC CTC AGG CAT GCC AGA

Glu Thr Pro Asp Ser Tyr Arg Asp Ser Pro His Ser Glu Arg  
GAA ACC CCT GAC TCC TAC CCA GAC TCT CCT CCT CAT AGT GAA AG  
GAA ACC CCT GAT TCC TAC CCA GAC TCT CCT CAT AGT GAA AG

【 30N 】

コーディングセグメント L (SEQ ID NO: 143 (ウシ) および 182 (ヒト))

Tyr Val Ser Ala Met Thr Thr Pro Ala Arg Met Ser Pro Val Asp  
G TAT GTA TCA GCA ATG ACC ACC CCG GCT CGT ATG TCA CCT GTA GAT  
G TAT GTG TCA GCC ATG ACC ACC CCG GCT CGT ATG TCA CCT GTA GAT

Phe His Thr Pro Ser Ser Pro Lys Ser Pro Pro Ser Glu Met Ser Pro  
TTC CAC CCA CCA AGC TCC CCC AAG TCA CCC CCT TCG GAA ATG TCC CCG  
TTC CAC CCG CCA AGC TCC CCC AAA TCG CCC CCT TCG GAA ATG TCT CCA

Pro Val Ser Ser Thr Thr Val Ser Met Pro Ser Met Ala Val Ser Pro  
CCC GTG TCC AGC ATG ACC AGC GTC TCC ATG CCT TCC ATG GCG GTC AGC CCC  
CCC GTG TCC AGC ATG ACC AGC GTC TCC ATG CCT TCC ATG GCG GTC AGC CCC

Phe Val Glu Glu Glu Arg Pro Leu Leu Val Thr Pro Pro Arg Leu  
TTC GTG GAA GAG GAG AGA CCC CTG CTC CTT GTG ACG CCA CCA CCG CTG  
TTC ATG GAA GAA GAG AGA CCT CTA CTT CTC GTG ACA CCA CCA AGG CTG

Arg Glu Lys Tyr Asp His His Ala Gln Gln Phe Asn Ser Phe His  
CGG GAG ARG AAG TTT GAC CAC CAC GCC CAG GAA TTC AAC TCG TTC CAC  
CGG GAG ARG AAG TTT GAC CAC CAC GCC CAG GAA TTC AAC TCG TTC CAC

Cys Asn Pro Ala His Glu Ser Asn Ser Leu Pro Pro Ser Pro Leu Arg  
TGC AAC CCC GCG CAT GAG AGC ACC AGC CTC GCG ACC GCG GCG AAA AGA  
CAC AAC CCC GCG CAT GAG AGT AAC AGC CTC CCT GCT AGC CCC TTG AGG

Ile Val Glu Asp Glu Glu Tyr Glu Thr Thr Gln Glu Tyr Glu Pro Ala  
ATA GTG GAG GAT GAG GAG TAT GAA ACG ACC CAA GAG TAC GAG CCA GCC  
ATA GTG GAG GAT GAG GAG TAT GAA ACG ACC CAA GAG TAC GAG CCA GCC

Gln Glu Pro Val Lys Lys Leu Thr Asn Ser Ser Arg Arg Ala Lys Arg  
TTC TTT  
CAA GAG CCT GTT AAG AAA CTC GCC AA...T AGC CCG CCG GCC AAA AGA

Thr Lys Pro Asn Gly His Ile Ala His Arg Leu Met Asp Asn Asn  
ACC AAG CCC AAT GGT CAC ATT GCC CAC AGG TTG GAA ATG GAC AAC AAC  
ACC AAG CCC AAT GGC CAC ATT GCT AAC AGA TTG GAA GTG GAC AAC AAC

Thr Gly Ala Asp Ser Ser Asn Ser Glu Ser Glu Thr Glu Asp Glu Arg  
ACA GGC GCT GAC AGC AGT AAC TCA GAG AGC GAA ACA GAG GAT GAA AGA  
ACA AGC TCC CAG AGC AGT AAC TCA GAG AGT GAA ACA GAA GAT GAA AGA

Val Gly Glu Asp Thr Pro Phe Leu Ala Ile Gln Asn Pro Leu Ala Ala  
GTA GGA GAA GAT ACG CCT TTC CTG GCC ATA CAG AAC CCC CTG GCA GCC  
GTA GGT GAA GAT ACG CCT TTC CTG GCC ATA CAG AAC CCC CTG GCA GCC

Ser Leu Glu Ala Ala Pro Ala Phe Arg Leu Val Asp Ser Arg Thr Asn  
AGT CTC GAG GCA ACA CCT GCC TTC CGC CTG GTC GAC AGC AGG ACT AAC  
AGT CTT GAG GCA ACA CCT GCC TTC CGC CTG GTC GAC AGC AGG ACT AAC

Pro Thr Gly Gly Phe Ser Pro Gln Glu Glu Leu Gln Ala Arg Leu Ser  
CCA ACA GGC GGC TTC TCT CCG CAG GAA GAA TTU CAG GCG AGG CTC TCC  
CCA GCA GGC GGC TTC TCG ACA CAG GAA GAA ATC CAG GCC AGG CTC TCT

Gly Val Ile Ala Asn Gln Asp Pro Ile Ala Val \*  
GGT GTA ATC GCT AAC CAA GAC CCT ATC CCT GTC TAA AAC CCA AAT ACA  
AGT GTA ATT GCT AAC CAA GAC CCT ATT GCT GTA TAA AAC CTA AAT AAA

CCC ATA GAT TCA CCT GTA AAA CTT TAT TTT ATA TAA TAA AGT ATT CGA  
CAC ATA GAT TCA CCT GTA AAA CTT TAT TTT ATA TAA TAA AGT ATT CGA  
CCT TAA ATT AAA CAA  
CCT TAA ATT AAA CAA

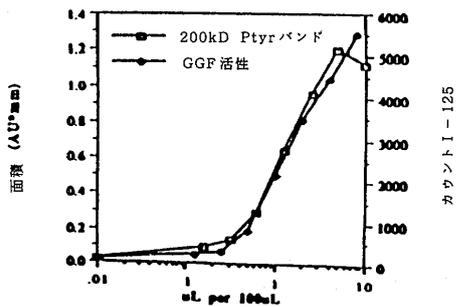


【 3 4 】

ggf2bpb5 (SEQ ID NO: 147) KCAEKEKTFPCVNGGECFMMVADLSNFSRYLCKPCNFEFTGDRCCQNYVMASFY  
 ggf2bpb4 (SEQ ID NO: 148) KCAEKEKTFPCVNGGECFMMVADLSNFSRYLCKPCQPGFTGARCTENVPKRVQ  
 hegf (SEQ ID NO: 149) ECLRKYKDFCIH-GECKYVKELRAPS---CKCQOQYFGERGCEKSNKTHS

【 3 5 】

分裂促進活性と比較した200kDチロシンリン酸化



【 3 6 】

GGF/ヘレグリンサブライミング誘導体の続き



【 3 7 】

EGFL1

AGCCATCTTGTCAAGTGTGCAGAGAAGGAGAAAACTTTCTGTGTGAAATGGAGCCGAGTGC  
 S H L V K C A E K E K T P C V H G G E C  
 TTCATGGTCAAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGATACTTGTGCAAGTGCACCAATGAGTTT  
 F H V K D L S H P S R Y L C K C P H E F  
 ACTGGATGCGTCCAAAACACTACGTAATGGCCAGCTTCTACAGTACGTCACCTCCCTTT  
 T G D R C Q N Y V R A S F Y S T S T P F  
 CTGTCTCTGCGTAATAG  
 L S L P E \*

(SEQ ID NO: 150)

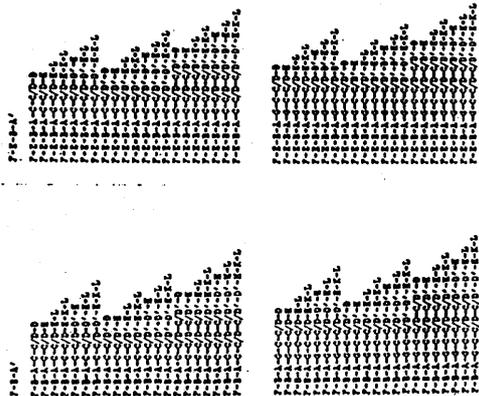
【 3 8 】

EGFL2

AGCCATCTTGTCAAGTGTGCAGAGAAGGAGAAAACTTTCTGTGTGAAATGGAGCCGAGTGC  
 S H L V K C A E K E K T P C V H G G E C  
 TTCATGGTCAAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGATACTTGTGCAAGTGCACCACTGGATT  
 F H V K D L S H P S R Y L C K C Q P G F  
 ACTGGAGCGAGATGTACTGAGAAATGGCCATGAAAGTCCAAAACCAAGAAAAAGCCGAG  
 T G A R C T S H V P H K V Q T Q E K A E  
 GAGCTACTAA  
 E L Y \*

(SEQ ID NO: 151)

GGF/ヘレグリンサブライミング誘導体



【 39 】

EGFL3

AGCCATCTTGTCAAGTGTGCAGAGAGGAGAAAATTCTGTGTGAATGCGAGCGGAGTGC  
 S H L V K C A E K E K T T F C V H G G E C  
 TTCATGGTAAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGATACTTGTGCAAGTCCCAAATGAGTTT  
 F H V K D L S H P S R Y L C K C P H E F  
 ACTGGTATCGCTGCCAAAATACCTAATGGCCAGCTTCTACAAAGCGGAGGAGCTCTAC  
 T G D R C Q H Y V H A S P Y K A E E L Y  
 TAA

(SEQ ID NO: 152)

【 40 】

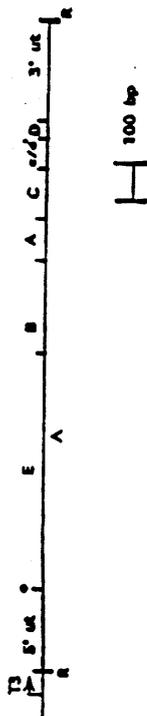
EGFL4

AGCCATCTTGTCAAGTGTGCAGAGAGGAGAAAATTCTGTGTGAATGCGAGCGGAGTGC  
 S H L V K C A E K E K T T F C V H G G E C  
 TTCATGGTAAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGATACTTGTGCAAGTCCCAAATGAGTTT  
 F H V K D L S H P S R Y L C K C P H E F  
 ACTGGTATCGCTGCCAAAATACCTAATGGCCAGCTTCTACAAAGCGGAGGAGCTCTAA  
 T G D R C Q H Y V H A S P Y K E L G I E  
 TTTATGGAGAAAGCGGAGGAGCTCTACTAA  
 F H E K A E E L Y

(SEQ ID NO: 153)

【 43 】

GGF2HBS5



【 41 】

EGFL3

AGCCATCTTGTCAAGTGTGCAGAGAGGAGAAAATTCTGTGTGAATGCGAGCGGAGTGC  
 S H L V K C A E K E K T T F C V H G G E C  
 TTCATGGTAAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGATACTTGTGCAAGTCCCAAATGAGTTT  
 F H V K D L S H P S R Y L C K C Q P G F  
 ACTGGCGGAGATGTAAGTGTGCAAGTCCCAAATGAGTTT  
 T G A R C T E H V P H K V Q T Q E K C P  
 AATGAGTTTACTGGTATCGCTGCCAAAATACCTAATGGCCAGCTTCTACAAAGCGGAG  
 H E P T G D R C Q H Y V H A S P Y T S T S  
 ACTGCCCTTCTGTCTGTGCGCTGAATAG  
 T P P L S L P E

(SEQ ID NO: 154)

【 42 】

EGFL4

AGCCATCTTGTCAAGTGTGCAGAGAGGAGAAAATTCTGTGTGAATGCGAGCGGAGTGC  
 S H L V K C A E K E K T T F C V H G G E C  
 TTCATGGTAAAGACCTTTCAAATCCCTCAAGATACTTGTGCAAGTCCCAAATGAGTTT  
 F H V K D L S H P S R Y L C K C Q P G F  
 ACTGGCGGAGATGTAAGTGTGCAAGTCCCAAATGAGTTT  
 T G A R C T E H V P H K V Q T Q E K C P  
 AATGAGTTTACTGGTATCGCTGCCAAAATACCTAATGGCCAGCTTCTACAAAGCGGAG  
 H E P T G D R C Q H Y V H A S P Y K A E  
 GAGCTCTACTAA  
 E L Y

(SEQ ID NO: 155)

【 44 】

GGF2HBS5 のタレド配列および推定されたアミノ酸配列

64	...
120	...
180	...
240	...
300	...
360	...
420	...
480	...
540	...
600	...
660	...
720	...
780	...
840	...
900	...
960	...
1020	...
1080	...
1140	...
1200	...
1260	...
1320	...
1380	...
1440	...
1500	...
1560	...
1620	...
1680	...
1740	...
1800	...
1860	...
1920	...
1980	...
2040	...
2100	...

(SEQ ID NO: 21)



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
<b>A 6 1 P 19/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	9/10
<b>A 6 1 P 21/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	9/10 1 0 1
<b>A 6 1 P 21/04</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	19/00
<b>A 6 1 P 25/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	21/00
<b>A 6 1 P 35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P	21/04
C 0 7 K 14/47	(2006.01)	A 6 1 P	25/00
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
		C 0 7 K	14/47
		C 1 2 N	15/00 A

(72)発明者 マーシオニ、マーク  
 アメリカ合衆国、0 2 1 7 4 マサチューセッツ州、アーリントン、ツイン サークル ドライブ  
 2 4

(72)発明者 グウィン、デイビッド アイ  
 アメリカ合衆国、0 1 9 1 5 マサチューセッツ州、ピバリー、グローバー ストリート 7 7

審査官 齋藤 真由美

(56)参考文献 Nature , 1 9 9 3年 3月2 5日 , Vol.362 , p.312-318  
 Science , 1 9 9 2年 5月2 2日 , Vol.256 , p.1205-1210

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)

C12N 15/00-90  
 C07K 14/00-16/  
 C12P 21/00-08  
 A61K 31/00-48/00  
 A61P 1/00-43/00  
 G01N 33/50-98  
 PubMed、MEDLINE(STN)  
 BIOSIS/WPI(DIALOG)  
 GenBank/DDBJ/EMBL/GeneSeq  
 UniProt/GeneSeq