

홀더맨 수잔 디.
미국 워싱턴 98103 시애틀 노스 34 스트리트 넘버 56 920

한센 버짓
미국 워싱턴 98102 시애틀 넘버 304 이스트 블레인 스트리트 210 레이
크 유니온 테레스

세파드 폴 오.
미국 워싱턴 98053 레드몬드 노스이스트 2 스트리트 20717

(74) 대리인 박종혁
 장용식
 정진상

심사관 : 김지윤

(54) 섬유아세포 성장인자 상동체

요약

본 발명은 FGF 족의 신규 멤버인 zFGF-5에 대한 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드분자에 관한 것이다. 폴리펩티드 및 그것을 코드화하는 폴리뉴클레오티드는 근세포에 대해 증식성이고 심장조직을 리모델링하고 심장기능을 개선하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명은 또한 zFGF-5 폴리펩티드에 대한 항체를 포함한다.

색인어

섬유아세포 성장인자, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 근세포, 심장기능개선.

명세서

기술분야

최소한 9 개의 별개의 구성원들로 구성된 섬유아세포 성장 인자 (FGF) 패밀리[Basilico et al., Adv. Cancer Res. 59:115-165, 1992 및 Fernig et al., Prog. Growth Factor Res. 5(4):353-377, 1994]는 일반적으로 광범위한 세포 유형에 대하여 유사분열 촉진물질(mitogen)로서 작용한다. 예를 들어, 염기성 FGF (또한 FGF-2로서도 알려져 있음)는 시험관내에서 내피 세포, 심장의 평활근 세포, 섬유아세포, 및 일반적으로 심장 및 골격 근세포를 포함한 증배엽 또는 신경의 배엽 기원의 세포들에 대한 유사분열 촉진물질이다 [Gospodarowicz et al., J. Cell. Biol. 70:395-405, 1976; Gospodarowicz et al., J. Cell. Biol. 89:568-578, 1981 및 Kardami, J. Mol. Cell. Biochem. 92:124-134, 1990]. 생체 내에서 bFGF 는 조류의 심장 발생에 역할을 담당하는 것으로 알려져 있고 [Sugi et al., Dev. Biol. 168:567-574, 1995 및 Mima et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. 92:467-471, 1995], 개에서는 관상동맥에 부수적인 발생을 유도하는 것으로 알려져 있다 [Lazarous et al., Circulation 94:1074-1082, 1996]. 또한 FGF 패밀리의 다양한 구성원들에 대하여 유사분열 촉진성이 아닌 활성도 증명되어 있다. 산성 및/또는 염기성 FGF 와 관련된 비-증식성 활성으로는 다음과 같은 것들이 있다: 조직 플라즈미노겐 활성화제의 증가된 내피 이완, 세포외재성 매트릭스 합성의 자극, 내피 세포에 대한 화학주성, 심근 세포에서의 태아 수축성 유전자의 유도된 발현 [Parker et al., J. Clin. Invest. 85:507-514, 1990], 및 증강된 하수체 호르몬성 반응 [Baird et al., J. Cellular Physiol. 5:101-106, 1987].

배경기술

FGF 패밀리의 구성원들중 여러 개는 신호 서열을 가지고 있지 않으며 (aFGF, bFGF 및 FGF-9) 따라서 분비될 것으로 기대되는 않는다. 또한, 여러 개의 FGF 패밀리 구성원들은 세포 핵으로 이동하는 능력을 가지고 있다 [Friesel et al.,

[FASEB 9:919-925, 1995]. FGF 패밀리의 모든 구성원들은 구조적 유사성을 바탕으로 헤파린에 결합한다. 구조적 상동성은 종(species)사이를 교차하는데, 이것은 종들 사이의 구조/기능 연관성이 보존되었음을 시사한다 [Ornitz et al., J. Biol. Chem. 271(25):15292-15297, 1996].

현재 네가지의 세포외재성 FGF 수용체(FGFR)가 알려져 있으며, 그것들은 모두 티로신 키나제들이다. 일반적으로, FGF 패밀리의 구성원들은 알려져 있는 모든 FGFR 에 결합하지만, 특이한 FGF 들은 친화도가 더 높은 특이한 수용체들에 결합한다. FGF 패밀리에 있는 특이성에 대한 다른 의미는 배발생중에 리간드와 그것들의 수용체들의 공간적 및 일시적인 발현이다. FGF 의 방출 부위로부터의 확산을 제한하는 증거는 FGF 가 그것들의 헤파린 결합 친화성에 기인하여 대부분 자가분비 (autocrine)/측분비(paracrine) 방식으로만 작용하는 것처럼 보이는 것을 시사한다 [Flaumenhaft et al., J. Cell. Biol. 111(4):1651-1659, 1990]. 염기성 FGF 는 신호 서열이 없으며, 그러므로 측분비 또는 자가분비 방식으로 작용하는 것에 제한을 받는다. 염기성 FGF 는 세포내에 저장되어 있다가 조직이 손상을 입을 때에 방출되는 것으로 가정되어 왔다. 염기성 FGF 는 헤파린 결합 부위와는 구별되는 두 개의 수용체 결합 영역을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 [Abraham et al., EMBO J. 5(10):2523-2528, 1986].

FGFR-3 은 뼈의 성장에 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 마우스들에게 FGFR-3 에 대한 동형접합성 널 (null)을 형성시켰고, 그 결과 출생후 골격이 비정상적이 되었다 [Colvin et al., Nature Genet. 12:309-397, 1996 및 Deng et al., Cell 84:911-921, 1996]. 돌연변이 표현형은 정상적인 마우스들에서, FGFR-3 이 뼈의 성장판 영역에서 크론드로사이트(chondrocyte) 세포 분할의 조절에 역할을 담당하고 있음을 시사한다 [Goldfarb, Cytokine and Growth Factor Rev. 7 (4):311-325, 1996]. 뼈의 성장판에서 FGFR-3 에 대한 리간드는 확인되어 있지 않다.

비록 4 개의 FGFR 이 확인되어 있지만, 이것들 모두는 기능을 나타내는 스플라이스 변이체를 가지고 있는 것으로 알려져 있으며, 새로운 FGF 수용체가 존재할 가능성은 꽤 많다. 예를 들어 FGF-8a 이소(iso)형태에 대한 수용체는 확인되어 있지 않다 [MacArthur et al., J. Virol. 69(4):2501-2507, 1995].

FGF-8 은 원래 유방의 암종 세포로부터 안드로젠-유도성 유사분열 촉진물질로서 단리된 FGF 패밀리의 구성원이다. 그것은 사람 염색체 10q25-q26 에 대해 지도화되어 있다 [White et al., Genomics 30:109-11, 1995]. FGF-8 은 배의 가지 (embryonic limb) 발생에 포함된다 [Vogel et al., Development 122:1737-1750, 1996 및 Tanaka et al., Current Biology 5(6):594-597, 1995]. 심장, 비뇨 생식기 및 신경 조직에서의 배발생중에 일어나는 FGF-8 의 발현은 FGF-8 이 이들 조직의 발생에 역할을 담당할 것임을 시사한다 [Crossley et al., Development 121:439-451, 1995]. 뿔족한 머리와 물갈퀴가 달린 손가락 및 발가락으로 표시되는 선천성 질환인 아크로세팔로신다크틸리아 (acrocephalosyndactylia)가 FGF-8 점 돌연변이와 관련이 있음을 입증하는 증거가 여러 가지 있다 [White et al., 1995, 상기 동일].

FGF-8 은 단지 세 개의 엑손만을 가지고 있는 다른 공지의 FGF 들과는 대조적으로 5 개의 엑손을 가지고 있다. FGF-8 의 처음 세 개의 엑손은 다른 FGF 들의 첫 번째 엑손에 상응한다 [MacArthur et al., Development 121:3603-3613, 1995]. FGF-8 에 대한 사람 유전자는 8 개의 FGF-8 이소형태를 발생시키는 쥐의 유전자 [Crossley et al., 1995, 상기 동일]와는 대조적으로, 그것들의 N-말단 영역이 상이한 4 개의 이소형태: FGF 이소형태 a, b, e, 및 f 를 코드한다. 사람 FGF-8a 및 FGF-8b 는 쥐와 동물의 단백질에 대하여 100 의 상동성을 가지고 있으며, FGF-8e 및 FGF-8f 단백질은 사람과 마우스 사이에 98 의 상동성을 가지고 있다 [Gemel et al., Genomics 35:253-257, 1996].

심장 질환은 미국에서 모든 사망의 30 이상을 차지하는 사망의 중요한 원인이다. 심근 경색 (MI)은 미국에서는 해마다 750,000 명이 병원에 입원하는 원인이 되고 있고, 해마다 5 백만명 이상이 관상동맥 질병에 걸려 있는 것으로 진단되고 있다. MI 에 대한 위험 인자들로는 진성 당뇨병, 고혈압, 복부 비만, 흡연, 혈장내의 고농도의 저밀도 리포단백질 또는 유전적 소인이 있다.

심장의 과형성은 심근세포 증식의 증가이며, 사람 및 쥐에서는 정상적인 노화와 함께 [Olivetti et al., J. Am. Coll. Cardiol. 24(1):140-9, 1994 및 Anversa et al., Circ. Res. 67:871-885, 1990], 그리고 쥐에서는 카테콜아민-유도된 심근증에서 [Deisher et al., Am. J. Cardiovasc. Pathol. 5(1):79-88, 1994] 발생하는 것으로 증명되어 있다. 심근세포의 증가가 일부의 선구체로부터 기원된 것이든지 또는 보다 말단에서 분화된 유형의 세포의 증식의 결과이든지 심근 세포의 증가에 대해서는 논쟁의 여지가 남아 있다.

그러나, 경색 및 회복할 수 없는 것으로 보이는 심근 괴사의 다른 원인들 때문에, 심장의 과형성의 정상적인 메카니즘은 집중적인 근세포 죽음을 보상할 수 없고 따라서 과형성 및 궁극적으로는 심장이 제 기능을 수행할 능력의 재생을 촉진하는 외래 인자에 대한 요구가 존재하는 것으로 보인다.

뼈 재구성 (bone remodeling)은 그것에 의하여 조직의 질량과 골격의 구조가 유지되는 역학적인 과정이다. 이 과정은 뼈 재흡수와 뼈 형성 사이의 평형 과정이며, 이 때 두 가지 유형의 세포가 중요한 역할자인 것으로 여겨진다. 이들 세포는 조골 세포와 파골세포이다. 조골세포는 세포간질을 합성하고 침착시켜서 새로운 뼈가 되게 한다. 조골세포와 파골세포의 활성화는 성장 인자를 포함하여 전신적이고 국소적인 많은 인자들에 의해 조절된다.

국소적인 인자들과 전신적인 인자들 사이의 상호관계가 완전하게 설명되어 있지 않은 반면, 성장 인자들이 정상적인 골격 재구성 및 골절 회복 두가지의 조절에 중심되는 역할을 한다는 것에는 일치하는 것 같다. 뼈에서 확인된 성장 인자들은 다음과 같다: IGF-I, IGF-II, TGF- β_1 , TGF- β_2 , bFGF, aFGF, PDGF 및 뼈 형태형성성 단백질의 패밀리가 있다 [Baylink et al., *J. Bone Mineral Res.* 8(Supp. 2):S565-S572, 1993].

뼈 재흡수가 뼈 형성을 초과할 때에는, 그 결과의 뼈의 전체적인 손실 및 골절 성향이 증가된다. 감소된 뼈 형성은 노화 및 특정한 병리학적 상태와 관련이 있다. 미국 단독의 통계로, 매년 골다공증으로 인하여 대략 150 만명의 골절 환자가 있다. 이들 골절이 환자의 삶의 질에 미치는 충격은 막대하다. 미국에서 건강 보호 시스템에 관련된 비용은 장기간 요양 비용을 포함하여 연간 50 억 내지 100 억 달러로 추정된다.

뼈 재구성에 영향을 미치는 성장 인자들에 대한 다른 치료적 적용은 예를 들면 치유를 위하여 조골세포의 증식을 필요로 하는 손상, 예컨대 골절의 치료뿐만 아니라 간엽 세포 증식의 자극 및 골절 회복의 양상으로서 표시되는 막 사이의 뼈의 합성을 들 수 있다 [Joyce et al., 36th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, February 5-8, 1990, New Orleans, LA].

본 발명은 본원 명세서에 나타난 것들로부터 당업자들에게 명백한, 이들 및 다른 용도를 위한 그러한 폴리펩티드들을 제공한다.

발명의 요약

본 발명의 한 측면으로, 본 발명은 a) SEQ ID NO: 1 에 나타난 바와 같이 뉴클레오티드 82 로부터 뉴클레오티드 621 까지의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자; b) (a) 의 대립성 변이체; c) 아미노산 잔기 28 (Glu) 로부터 아미노산 잔기 207 (Ala) 까지의 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 서열과 최소한 60 동일한 폴리펩티드를 코드화하는 폴리뉴클레오티드 분자; 및 d) 뉴클레오티드 82 로부터 뉴클레오티드 621 까지의 SEQ ID NO: 6 에 나타난 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자로 이루어지는 군으로부터 선택된, 섬유아세포 성장 인자 (FGF) 상동체 폴리펩티드를 코드화하는 단리된 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다.

한 구체예에서, 단리된 폴리뉴클레오티드 분자는 뉴클레오티드 1 로부터 뉴클레오티드 621 까지의 SEQ ID NO: 1 에 표시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열 또는 뉴클레오티드 1 로부터 뉴클레오티드 621 까지의 SEQ ID NO: 6 에 표시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

다른 구체예에서, 단리된 폴리뉴클레오티드 분자는 뉴클레오티드 82 로부터 뉴클레오티드 621 까지의 SEQ ID NO: 1 에 표시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

다른 측면으로, 본 발명은 다음의 작동가능하게 연결된 엘레먼트들을 포함하고 있는 발현 벡터를 제공한다: 전사 프로모터; a) SEQ ID NO: 1 에 나타난 바와 같이 뉴클레오티드 82 로부터 뉴클레오티드 621 까지의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자; b) (a) 의 대립성 변이체; c) 아미노산 잔기 28 (Glu) 로부터 아미노산 잔기 207 (Ala) 까지의 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 서열과 최소한 60 동일한 폴리펩티드를 코드화하는 폴리뉴클레오티드 분자; 및 d) 뉴클레오티드 82 로부터 뉴클레오티드 621 까지의 SEQ ID NO: 6 에 나타난 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자로 이루어지는 군으로부터 선택된 DNA 절편; 및 전사 터미네이터.

또 다른 측면으로, 본 발명은 그 안으로 다음의 작동가능하게 연결되어 있는 엘레먼트들: 전사 프로모터; a) SEQ ID NO: 1 에 나타난 바와 같이 뉴클레오티드 82 로부터 뉴클레오티드 621 까지의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자; b) (a) 의 대립성 변이체; c) 아미노산 잔기 28 (Glu) 로부터 아미노산 잔기 207 (Ala) 까지의 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 서열과 최소한 60 동일한 폴리펩티드를 코드화하는 폴리뉴클레오티드 분자; 및 d) 뉴클레오티드 82 로부터 뉴클레오

티드 621까지의 SEQ ID NO: 6에 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자로 이루어지는 균으로부터 선택된 DNA 절편; 및 전사 터미네이터를 포함하고 있는 발현 벡터가 도입되어 세포가 DNA 절편에 의하여 코드화된 폴리펩티드를 발현하게 되는 배양된 세포를 제공한다.

또 다른 측면으로, 본 발명은 다음의 작동가능하게 연결되어 있는 엘레먼트들: 전사 프로모터; a) SEQ ID NO: 1에 나타낸 바와 같이 뉴클레오티드 82로부터 뉴클레오티드 621까지의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자; b) (a)의 대립성 변이체; c) 아미노산 잔기 28 (Glu)로부터 아미노산 잔기 207 (Ala)까지의 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열과 최소한 60 동일한 폴리펩티드를 코드화하는 폴리뉴클레오티드 분자; 및 d) 뉴클레오티드 82로부터 뉴클레오티드 621까지의 SEQ ID NO: 6에 나타낸 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자로 이루어지는 균으로부터 선택된 DNA 절편; 및 전사 터미네이터를 포함하고 있는 발현 벡터가 그 안으로 도입되는 세포를 배양하고, 그로써 상기 세포가 DNA 절편에 의해 코드화된 FGF 상동체 폴리펩티드를 발현하게 되는 단계; 그리고 FGF 상동체 폴리펩티드를 회수하는 단계로 이루어지는, FGF 상동체 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제공한다.

또 다른 측면으로, 본 발명은 a) 잔기 28 (Glu)로부터 잔기 175 (Met)까지의 SEQ ID NO: 2에 표시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 분자; b) (a)의 대립성 변이체; 및 c) 아미노산 잔기 28 (Glu)로부터 아미노산 잔기 175 (Met)까지의 SEQ ID NO: 2에 최소한 60 동일한 폴리펩티드 분자로 이루어지는 균으로부터 선택된 단리된 FGF 상동체 폴리펩티드 분자를 제공한다.

다른 측면으로, 본 발명은 a) 잔기 28 (Glu)로부터 잔기 196 (Lys)까지의 SEQ ID NO: 2에 표시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 분자; b) (a)의 대립성 변이체; 및 c) 아미노산 잔기 28 (Glu)로부터 아미노산 잔기 196 (Lys)까지의 SEQ ID NO: 2에 최소한 60 동일한 폴리펩티드 분자로 이루어지는 균으로부터 선택된 단리된 FGF 상동체 폴리펩티드 분자를 제공한다.

다른 구체예에서, 본 발명은 a) 잔기 28 (Glu)로부터 잔기 207 (Ala)까지의 SEQ ID NO: 2에 표시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 분자; b) (a)의 대립성 변이체; 및 c) 아미노산 잔기 28 (Glu)로부터 아미노산 잔기 207 (Ala)까지의 SEQ ID NO: 2의 아미노산과 최소한 60 동일한 폴리펩티드 분자로 이루어지는 균으로부터 선택된 단리된 FGF 상동체 폴리펩티드 분자를 제공한다.

추가적 구체예에서, 본 발명은 추가로 신호 서열을 포함하고 있는 FGF 상동체 폴리펩티드를 제공한다.

다른 구체예에서, 본 발명은 추가로 아미노산 잔기 1 (Met)로부터 아미노산 잔기 27 (Ala)까지의 SEQ ID NO: 2에 표시된 바와 같은 신호 서열을 포함하고 있는 FGF 상동체 폴리펩티드를 제공한다.

본 발명은 또한 정제된 FGF 상동체 폴리펩티드를 약학적으로 허용되는 부형제와 조합된 상태로 포함하고 있는 약학 조성물을 제공한다.

다른 측면으로, 본 발명은 잔기 1 (Met)로부터 잔기 207 (Ala)까지의 SEQ ID NO: 2에 표시된 바와 같은 아미노산 잔기를 포함하고 있는 폴리펩티드 분자의 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다.

또 다른 구체예에서, 본 발명은 잔기 28 (Glu)로부터 잔기 196 (Lys)까지의 SEQ ID NO: 2에 표시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하고 있는 폴리펩티드 서열에 결합하는 항체를 제공한다.

다른 측면으로, 본 발명은 근세포 또는 근세포 선구체의 증식을 필요로 하는 포유류에게, 이 포유류에서 근세포 또는 근세포 선구체의 수가 임상적으로 상당히 증가되는 것을 유도하기에 충분한 양으로 FGF 상동체 폴리펩티드를 투여하는 것으로 이루어지는, 근세포 또는 근세포 선구체의 증식을 자극하는 방법을 제공한다.

다른 구체예에서, 본 발명은 근세포 또는 근세포 선구체의 증식을 자극하는 방법을 제공한다. 이 때 근세포 또는 근세포 선구체는 삼장 근세포 또는 심장 근세포 선구체이다.

다른 측면으로, 본 발명은 FGF 상동체 폴리펩티드가 없이 배양된 심장 조직의 근세포 선구세포 또는 근세포와 비교할 때, FGF 상동체 폴리펩티드의 존재하에 배양된 심장 조직 세포의 근세포 선구세포 또는 근세포의 수의 증가를 유도하기에 충분한 양의 FGF 상동체 폴리펩티드와 함께 심장 조직 세포를 배양하는 것으로 이루어지는, 근세포 선구세포 또는 근세포를 생체외에서 자극하는 방법을 제공한다.

다른 구체예에서, 본 발명은 근세포 또는 근세포 선구체가 심장의 근세포 또는 근세포 선구체인 경우의, 근세포 선구 세포 또는 근세포를 생체외에서 자극하는 방법을 제공한다.

다른 측면으로, 본 발명은 FGF 상동체 폴리펩티드를 포함하고 있는 첫 번째 분자를 제제 또는 약물을 포함하고 있는 두 번째 분자와 결합시킴으로써 키메라를 형성하는 단계; 그리고 그 키메라를 심장 조직에 투여하는 단계로 이루어지는, 제제 또는 약물을 심장 조직에 선택적으로 전달하는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

도 1 및 도 2 는 사람 섬유아세포 성장 인자 상동 인자 1 (FHF-1), 사람 근세포-활성화 인자 (FGF-10), 사람 섬유아세포 성장 인자 상동 인자 4 (FHF-4), 사람 섬유아세포 성장 인자 상동 인자 2 (FHF-2), 사람 섬유아세포 성장 인자 상동 인자 3 (FHF-3), 사람 FGF-4, 사람 FGF-6, 사람 FGF-2 (염기성), 사람 FGF-1 (산성), 사람 케라틴 생성세포 성장 인자 2 (KGF-2), 사람 케라틴 생성세포 성장 인자 선구체 (FGF-7), 사람 zFGF-5, 사람 FGF-8, 사람 FGF-5, 사람 FGF-9, 및 사람 FGF-3 을 한꺼번에 다중으로 예시한 도면이다. "*" 는 보존된 아미노산을 나타내고; ":" 은 보존된 아미노산 치환을 나타내며; "." 은 덜 규칙적으로 보존된 아미노산 치환을 아타낸다.

도 3 은 사람 FGF-5, 사람 FGF-6, 사람 FGF-7, 사람 FGF-8, 사람 FGF-9, 사람 zFGF-5, 사람 FGF-10, 사람 FGF-1, 사람 FHF-1, 사람 FGF-2, 사람 FHF-2, 사람 FHF-4, 사람 FGF-3, 사람 KGF-2, 사람 FHF-3, 및 사람 FGF-4 사이의 동일성을 예시하는 패밀리-내 유사성 매트릭스이다.

발명의 상세한 설명

용어 "오르토로그 (ortholog)" (또는 "종 상동체 (species homolog)")는 상이한 종으로부터 얻어지는 유사한 폴리펩티드 또는 단백질에 대해 상동성을 가지고 있는 한 종으로부터 얻어지는 폴리펩티드 또는 단백질을 나타낸다.

용어 "파라로그 (paralog)" 는 주어진 종으로부터 얻어지는 것과 비슷하지 않은 폴리펩티드 또는 단백질에 대한 상동성을 가지고 있는 주어진 종으로부터 얻어지는 폴리펩티드 또는 단백질을 나타낸다.

용어 "대립성 변이체" 는 동일한 염색체상의 유전자좌를 차지하고 있는 유전자의 둘 또는 그 이상의 대체 형태중 어느 하나를 나타낸다. 대립성 변이는 돌연변이를 통하여 자연발생적으로 일어나며, 한 집단내에서 표현형의 다형성을 초래할 수도 있다. 유전자 돌연변이는 침묵성 (코드화된 폴리펩티드에 변화가 없는 상태)이거나 또는 변경된 아미노산 서열을 가지고 있는 폴리펩티드를 코드화할 수도 있다. 용어 대립성 변이체는 또한 본원에서 유전자의 대립성 변이체에 의해 코드화된 단백질을 나타내기 위하여 사용되기도 한다.

용어 "발현 벡터" 는 관심의 폴리펩티드의 전사를 제공하는 추가의 절편에 작동가능하게 연결되어 있는 관심의 폴리펩티드를 코드화하는 절편을 포함하고 있는 선형 또는 원형의 DNA 분자를 나타낸다. 상기의 추가의 절편은 프로모터와 터미네이터 서열을 포함할 수 있으며, 임의로 하나 또는 그 이상의 복제 기원, 하나 또는 그 이상의 선택가능한 마아커, 인핸서, 폴리아데닐화 신호, 등을 포함할 수 있다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스성 DNA 로부터 유도되며, 또는 이들 두가지를 모두 함유하기도 한다.

용어 "단리된" 은 폴리뉴클레오티드 분자에 적용되는 경우, 폴리뉴클레오티드가 그것의 천연적인 유전적 환경으로부터 제거된 것을 의미하며, 그로써 다른 외래성 또는 원하지 않는 코딩 서열이 없는 상태이고, 유전학적으로 처리된 단백질 제조 시스템내에서 사용하기에 적당한 형태로 존재한다. 그러한 단리된 분자들은 그것들의 천연적인 환경으로부터 분리되어 있으며 cDNA 및 게놈성 클론을 포함하고 있는 분자들이다. 본 발명의 단리된 DNA 분자들은 통상적으로 결합되는 다른 유전자들은 없지만, 자연적으로 발생하는 5' 및 3' 미번역 영역, 예컨대 프로모터와 터미네이터를 포함할 수 있다. 결합된 영역을 확인하는 것은 당해 기술분야의 숙련자에게는 명백할 것이다 [예를 들면, Dynan and Tjian, *Nature* 316:774-778, 1985]. 단백질에 적용되는 경우 용어 "단리된" 은 단백질이 그것의 천연 환경이외의 상태로 발견되는 것, 예를 들면 혈액 및 동물의 조직으로부터 벗어나서 발견되는 것을 의미한다. 바람직하게는, 단리된 단백질은 실질적으로는 다른 단백질, 특히 동물 기원의 다른 단백질이 없는 것이 좋다. 고도로 정제된 형태, 즉 95 이상 순수한, 더 좋게는 99 이상 순수한 형태의 단백질을 제공하는 것이 바람직하다.

용어 "작동가능하게 연결된" 은 DNA 절편을 언급할 때, 절편이 그것들이 의도된 목적을 위해 조화롭게 작용하도록, 예를 들면 전사는 프로모터에서 시작하고 코딩 절편을 통하여 터미네이터까지 진행되도록 배열되어 있는 것을 의미한다.

용어 "폴리뉴클레오티드" 는 5' 으로부터 3' 끝으로 관독되는 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 염기의 단일- 또는 이중-가닥 중합체를 나타낸다. 폴리뉴클레오티드에는 RNA 와 DNA 가 포함되며, 천연 공급원으로부터 단리될 수 있고, 시험관내에서 합성될 수도 있으며, 또는 천연 분자와 합성 분자의 조합물로부터 제조될 수도 있다.

용어 "폴리뉴클레오티드 분자의 상보물" 은 참조 서열과 비교하였을 때 상보하는 염기 서열 및 역 배향을 가지고 있는 폴리뉴클레오티드 분자를 의미한다. 예를 들면 서열 5' ATGCACGGG 3' 은 5' CCCGTGCAT 3' 과 서로 상보한다.

용어 "축퇴성 뉴클레오티드 서열" 은 (폴리펩티드를 코드화하는 참조 폴리뉴클레오티드 분자와 비교하여) 하나 또는 그 이상의 축퇴 코돈을 포함하는 뉴클레오티드의 서열을 나타낸다. 축퇴성 코돈은 상이한 분자 트리플렛을 함유하지만, 동일한 아미노산 서열을 코드화한다 (즉, GAU 와 GAC 트리플렛은 각각 Asp 을 코드화한다).

용어 "프로모터" 는 RNA 중합효소의 결합 및 전사의 개시를 제공하는 DNA 서열을 함유하고 있는 유전자 부분을 나타내는 것이다. 프로모터 서열은 공통적이지만, 언제나 유전자의 5' 비-코딩 영역에서 발견되지는 않는다.

용어 "분비성 신호 서열" 은 더 큰 폴리펩티드의 한 성분으로서 그것이 합성되는 세포내의 분비 경로를 통하여 더 큰 폴리펩티드를 특정하는 폴리펩티드 ("분비 펩티드")를 코드화하는 DNA 서열을 말한다. 더 큰 펩티드는 통상적으로 절단되어 분비 경로를 통한 운반중에 분비 펩티드가 제거된다.

용어 "수용체" 는 생체내 활성 분자 (즉 리간드)에 결합하여 세포에 미치는 리간드의 영향을 증대하는 세포-결합된 단백질 을 말한다. 막-결합 수용체들은 세포외재성 리간드 결합 도메인과 전형적으로 신호 변환에 포함되는 세포내재성 이펙터 (effector)를 포함하고 있는 다중-도메인 구조를 가지는 것을 특징으로 한다. 리간드와 수용체와의 결합은 결과적으로 수용체의 형태의 변화를 초래하고, 그것은 이펙터 도메인과 세포의 다른 분자(들) 사이의 상호작용을 유발한다. 이 상호작용은 계속해서 세포의 대사의 변경을 유도한다. 수용체-리간드 상호작용에 관련된 대사적 사건들로는 유전자 전사, 인산화, 탈인산화, 고리형 AMP 생성의 증가, 세포의 칼슘의 이동, 막 지질의 이동, 세포 고착, 이노시톨 지질의 가수분해 및 인지질의 가수분해가 있다. 대부분의 핵 수용체들은 또한 아미노-말단, 교차활성화 도메인, DNA 결합 도메인 및 리간드 결합 도메인을 포함하고 있는 다중-도메인 구조를 나타낸다. 일반적으로, 수용체들은 막, 시토솔 (cytosol) 또는 핵에 결합할 수 있으며, 단량체이거나 (예컨대 갑상선 자극 호르몬 수용체, 베타-아드레날린 작용성 수용체) 또는 다량체이다 (예컨대 PDGF 수용체, 성장 호르몬 수용체, IL-3 수용체, GM-CSF 수용체, G-CSF 수용체, 에리트로포이에틴 수용체 및 IL-6 수용체).

용어 "상보물/항-상보물 쌍" 은 적절한 조건하에서 비-공유적으로 결합된 안정한 쌍을 형성하는 동일하지 않은 부분들을 말한다. 예를 들면, 비오틴과 아비딘 (또는 스트렙트아비딘)은 상보물/비-상보물 쌍의 원형적인 구성원중 하나이다. 다른 예시적인 상보물/비-상보물 쌍으로는 수용체/리간드 쌍, 항체/항원 (또는 합텐 또는 에피토프) 쌍, 센스/안티센스 폴리뉴클레오티드 쌍, 등이 있다. 후속해서 상보물/비-상보물 쌍의 분리가 일어나는 것이 바람직하다면, 상보물/비-상보물 쌍의 결합 친화성은 $<10^9 M^{-1}$ 이 되는 것이 바람직하다.

본 발명은 부분적으로는 FGF-8 에 대하여 상동성을 가지고 있는 섬유아세포 성장 인자 (FGF) 상동체 폴리펩티드를 코드화하는 신규한 DNA 서열을 발견한 것에 기초하고 있다. 이 신규한 DNA 에 상응하는 mRNA 의 조직 분포를 분석한 결과, 발현은 태아의 심장 조직 및 성인의 심장 조직에서 가장 높았고, 태아의 폐, 골격 근육, 소장, 결장 및 기관지와 같은 평활근 조직에서는 분명하지만 발현 수준은 감소된 것으로 나타났다. FGF 상동체 폴리펩티드는 zFGF-5 로 표시되었다.

본 발명의 신규한 zFGF-5 폴리펩티드는 처음에는 성장 인자들에 대한 EST 데이터베이스에 대하여 의혹을 가짐으로써 확인되었다. 단일한 EST 서열이 발견되었고 FGF 패밀리에 관련이 있는 것으로 예상되었다. 완전한 길이의 cDNA 에 의해 코드화된 신규한 FGF 상동체 폴리펩티드는 다음과 같은 모티프를 함유하였다: CXXFXEX(6)Y. 상기에서 X 는 모든 아미노산을 나타내고 Y) 는 하나보다 큰 X 아미노산의 수를 나타낸다. 이 모티프는 FGF 패밀리의 모든 공지의 구성원들에게서 일어나고 이들 단백질에 독특하다.

zFGF-5 cDNA 의 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO. 1 로 표시되며, 그것의 추론된 아미노산 서열은 SEQ ID NO. 2 로 표시된다. SEQ ID NO:2 의 아미노산 잔기 28 (Glu) 부터 아미노산 잔기 181 (Gln) 까지를 FGF-8 의 상응하는 영역에 비교하였을 때 (도 1 및 2 참조), 배열되고 추론된 아미노산 서열은 대략 56 의 동일성을 가지고 있다.

본원에서 설명되는 폴리뉴클레오티드에 의해 코드화된 신규한 폴리펩티드는 FGF패밀리의 모든 구성원들에게 존재하는 CXFXE(6)Y 모티프를 함유하고 있다. CXFCE(6)Y 모티프는 매우 보존된 것이다. CXFCE(6)Y 도메인의 일관되는 아미노산 서열로는 사람 섬유아세포 성장 인자 상동 인자 1 (FHF-1; Smallwood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**:9850-9857, 1996), 사람 근세포-활성화 인자 (FGF-10; HSU76381, GENBANK identifier, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 사람 섬유아세포 성장 인자 상동 인자 4 (FHF-4; Smallwood et al., 1996, 상기 동일), 사람 섬유아세포 성장 인자 상동 인자 2 (FHF-2; Smallwood et al., 1996, 상기 동일), 사람 섬유아세포 성장 인자 상동 인자 3 (FHF-3; Smallwood et al., 1996, 상기 동일), 사람 FGF-4 (Basilico et al., Adv. Cancer Res.**59**:115-165, 1992), 사람 FGF-6 (Basilico et al., 1992, 상기 동일), 사람 FGF-2 (염기성; Basilico et al., 1992, 상기 동일), 사람 FGF-1 (산성; Basilico et al., 1992, 상기 동일), 사람 케라틴 생성세포 성장 인자 2 (KGF-2; HSU67918 GENBANK identifier, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 사람 케라틴 생성세포 성장 인자 선구체 (FGF-7; Basilico et al., 1992, 상기 동일), 사람 zFGF-5, 사람 FGF-8 (Gemel et al., Genomics **35**:253-257, 1996), 사람 FGF-5 (Basilico et al., 1992, 상기 동일), 사람 FGF-9 (Miyamoto et al., Mol. Cell. Biol. **13**:4251-4259, 1993), 및 사람 FGF-3 (Basilico et al., 1992, 상기 동일)이 있다.

zFGF-5 폴리펩티드를 코드화하는 cDNA (SEQ ID NO: 1)의 분석 결과 207 개의 아미노산 (SEQ ID NO: 2)을 코드화하는 오픈 리딩 프레임이 180 개의 아미노산 (SEQ ID NO: 2 의 잔기 28 에서 잔기 207 까지)의 성숙한 폴리펩티드를 포함하고 있는 것으로 나타났다. 다른 공지의 FGF 들과 함께 zFGF-5 를 배열한 결과 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 잔기 127 (Cys) 에서 아미노산 잔기 138 (Tyr)까지에 상응하는 높은 백분율의 동일성의 블록이 나타났다 (도면에 도시함). FGF 패밀리의 구성원들중 몇 개는 신호 서열을 가지고 있지 않다.

FGF 패밀리의 구성원들은 헤파린 결합 도메인을 가지고 있는 것을 특징으로 한다. zFGF-5 에 대한 잠재적인 헤파린-결합 도메인은 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 잔기 148 (Gly) 에서 아미노산 잔기 169 (Gln) 까지의 영역에서 확인되었다. 그러므로 수용체가 매개된 신호화는 FGF-리간드 복합체가 세포-표면의 헤파린 술페이트 프로테오글리칸과 결합할 때 시작되는 것으로 여겨진다. 많은 FGF 패밀리의 구성원들이 그것들의 구조와 기능을 토대로 두 개의 관련된 패밀리중에서 하나를 대신할 수 있다. aFGF 와 bFGF 는 가변 길이의 두 개의 인트론만큼 떨어져 있는 세 개의 엑손으로 구성된다. FGF-8 은 5 개의 엑손으로 구성되며, 이중 처음 세 개의 엑손은 aFGF 와 bFGF 의 첫 번째 엑손에 상응한다. 모든 공지의 FGF 패밀리의 구성원들은 스플라이스되어 단일한 폴리펩티드로 형성된다.

SEQ ID NO: 6 은 SEQ ID NO: 2 (아미노산 1 또는 28 에서 아미노산 207 까지)의 zFGF-5 폴리펩티드를 코드화할 수 있는 모든 폴리뉴클레오티드를 포함하는 축퇴성 폴리뉴클레오티드 서열이다. 그러므로, SEQ ID NO: 6 의 뉴클레오티드 1 또는 82 에서 뉴클레오티드 621 에 걸쳐 있는 zFGF-5 폴리펩티드-코드화 폴리뉴클레오티드는 본 발명에 포함된다. 또한 본 발명에는 SEQ ID NO: 6 의 유사 영역으로부터 형성된, SEQ ID NO: 1 에 대하여 상술된 바와 같은 단편들과 융합물들이 포함되며, 이 때 SEQ ID NO: 6 의 뉴클레오티드 82 내지 621 은 성숙한 zFGF-5 분자를 코드화하는 경우 SEQ ID NO: 1 의 뉴클레오티드 82 내지 621 에 상응한다.

SEQ ID NO: 6 에서 사용되는 부호를 하기 표 1 에 요약하였다.

[표 1]

뉴클레오티드	분해(Resolution)	상보물	분해(Resolution)
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A/G	Y	C/T
Y	C/T	R	A/G
M	A/C	K	G/T
K	G/T	M	A/C

S	C/G	S	C/G
C/G	A/T	W	A/T
H	A/C/T	D	A/G/T
B	C/G/T	V	A/C/G
V	A/C/G	B	C/G/T
D	A/G/T	H	A/C/T
N	A/C/G/T	N	A/C/G/T

주어진 아미노산에 대하여 모든 가능한 코돈을 포함하는 SEQ ID NO: 6 에 사용된 축퇴성 코돈을 하기 표 2 에 나타낸다.

[표 2]

아미노산	문자	코돈	축퇴성 코돈
Cys	C	TGC TGT	TGY
Ser	S	AGC AGT TCA TCC TCG TCT	WSN
Thr	T	ACA ACC ACG ACT	ACN
Pro	P	CCA CCC CCG CCT	CCN
Ala	A	GCA GCC GCG GCT	GCN
Gly	G	GGA GGC GGG GGT	GGN
Asn	N	AAC AAT	AAY
Asp	D	GAC GAT	GAY
Glu	E	GAA GAG	GAR
Gln	Q	CAA CAG	CAR
His	H	CAC CAT	CAY
Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGT	MGN
Lys	K	AAA AAG	AAR
Met	M	ATG	ATG
Ile	I	ATA ATC ATT	ATH
Leu	L	CTA CTC CTG CTT TTA TTG	YTN
Val	V	GTA GTC GTG GTT	GTN
Phe	F	TTC TTT	TTY
Tyr	Y	TAC TAT	TAY
Trp	W	TGG	TGG
Ter	.	TAA TAG TGA	TRR
Asn Asp	B		RAY
Glu Gln	Z		SAR
Any	X		NNN
Gap	-	...	

당업자라면 각각의 아미노산을 코드화하는 모든 가능한 코돈을 나타내는 축퇴성 코돈을 결정하는데 약간의 불명확한 부분이 있음을 인지하게 될 것이다. 예를 들면, 세린에 대한 축퇴성 코돈 (WSN)은 어떤 환경에서는 아르기닌 (AGR)을 코드화할 수 있고, 아르기닌에 대한 축퇴성 코돈 (MGN)은 어떤 환경에서는 세린 (AGY)을 코드화할 수 있다. 유사한 관계가 페닐알라닌과 로이신을 코드화하는 코돈들 사이에 존재한다. 그러므로, 축퇴성 서열에 의해 포함되는 일부의 폴리뉴클레오티드는 약간의 부정확한 아미노산을 가질 수 있지만, 당업자는 그러한 잘못된 서열을 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 서열을 참조로 하여 쉽게 확인할 수 있을 것이다.

zFGF-5 에서 고도로 보존된 아미노산들은 새로운 패밀리 구성원들을 확인하기 위한 도구로서 사용될 수 있다. EST 데이터베이스에서 새로운 패밀리 구성원들을 확인하기 위하여, 보존된 CFXEX(6)Y 모티프가 사용될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 프로브와 혼성화 방법을 사용하는 다른 방법에서는, 다양한 조직 공급원으로부터 얻어지는 RNA 가 cDNA 라이브러리를 생성하고, 이들 라이브러리를 새로운 패밀리 구성원들에 대하여 프로브하기 위하여 사용될 수 있다. 특히, 역전사-중합효소 사슬 반응 (RT-PCR)은 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 잔기 127 (Cys) 에서 아미노산 잔기 138 (Tyr)에 상응하는 서열로부터 디자인된 고도로 축퇴된 DNA 프라이머를 코드화하는 서열을 증폭시키기 위하여 사용될 수 있다.

본 발명의 바람직한 구체예내에서, 단리된 폴리뉴클레오티드는 적절한 조건하에서 프로브로서 작용할 것이고 SEQ ID NO: 1 의 유사한 크기의 영역 또는 거기에 상보하는 서열에 혼성화될 것이다. 일반적으로, 엄격한 조건은 규정된 이온 강

도 및 pH 에서 특이한 서열에 대한 열 용점 (Tm)보다 약 5 °C 낮도록 선택된다. Tm 은 그 온도에서 표적 서열의 50 가 완 벽하게 매치된 프로브에 혼성화하는 온도이다 (규정된 이온 강도 및 pH 하에서). 전형적인 엄격한 조건은 염 농도가 pH 7 에서 최소한 약 0.02 M 이고 온도가 최소한 약 60 °C 인 상태이다.

앞서 주지된 바와 같이, 본 발명의 단리된 폴리뉴클레오티드는 DNA 와 RNA 를 포함한다. DNA 와 RNA 를 단리하기 위한 방법은 당해 기술분야에 공지이다. 비록 DNA 가 다른 조직으로부터 RNA 를 사용하여 제조되거나 또는 게놈성 DNA 로서 단리될 수 있긴 하지만, 심장 조직으로부터 RNA 를 단리하는 것이 일반적으로 바람직하다. 총 RNA 는 구아니딘 HCl 추출 후, CsCl 구배에서 원심분리에 의해 단리시킴으로써 제조될 수 있다 [Chirgwin et al., Biochemistry 18:52-94, 1979].

폴리(A)⁺ RNA 는 총 RNA 로부터 Aviv 및 Leder 방법을 사용하여 제조된다 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:1408-1412, 1972]. 상보성 DNA (cDNA)는 폴리 (A)⁺ RNA 로부터 공지의 방법을 사용하여 제조된다. 그런 다음 zFGF-5 폴리 펩티드를 코드화하는 폴리뉴클레오티드가 확인되고 예를 들면 혼성화 또는 PCR 에 의하여 단리된다.

본 발명은 또한 대응하는 폴리펩티드 및 다른 종으로부터 얻어지는 폴리뉴클레오티드들 (오르토로그 또는 파라로그)을 제공한다. 특히 관심의 대상이 되는 것은 쥐과 동물, 쥐, 돼지, 양, 개, 소, 고양이, 말 및 다른 영장류 단백질을 포함한 다른 포 유동물로부터 얻어지는 zFGF-5 폴리펩티드이다. 사람 서열의 파라로그의 확인은 특히 관심의 대상인데, 왜냐하면 쥐과 동물의 FGF-8 에 대해서는 8 개의 파라로그가 확인되어 있는 반면, 사람 파라로그는 단지 4 개만이 알려져 있기 때문이다. 사람 파라로그 또는 사람 단백질의 종 상동체들은 본 발명에 의해 제공되는 정보 및 조성물을 종래의 클로닝 기법과 함께 조합하여 사용함으로써 클론될 수 있다. 예를 들면, cDNA 는 단백질을 발현하는 세포 타입 또는 조직으로부터 얻어지 는 mRNA 를 사용하여 클론될 수 있다. mRNA 의 적당한 공급원은 본원에 개시되는 서열로부터 디자인되는 프로브를 사 용하여 노던 블롯을 프로빙함으로써 확인될 수 있다. 그런 다음 양성의 조직 또는 셀라인의 mRNA 로부터 라이브러리가 제조된다. 그 다음에 cDNA 를 코드화하는 zFGF-5 가 다양한 방법들, 예컨대 완전하거나 또는 부분적인 사람 cDNA 또는 본원에 개시된 서열을 토대로 한 축퇴성 프로브들의 하나 또는 그 이상의 세트를 사용한 프로빙에 의해서 단리될 수 있다. cDNA 는 또한 중합효소 사슬 반응 또는 PCR (Mullis, 미국 특허 제 4,683,202 호)을 사용하여, 본원에 개시된 서열로부터 디자인되는 프라이머를 사용하여 클론될 수 있다. 추가의 방법내에서 cDNA 라이브러리가 숙주 세포의 형질전환을 위해 사용될 수 있으며, 관심의 cDNA 의 발현은 zFGF-5 에 대한 항체를 사용하여 검출될 수 있다. 유사한 기법들이 또한 게놈 클론들을 단리하기 위하여 적용될 수 있다.

당업자들은 SEQ ID NO: 1 및 SEQ ID NO: 2 DP 표시된 서열들이 사람 zFGF-5 유전자 및 폴리펩티드의 단일한 대립형질 을 나타내고, 대립성 변이 및 교대 스플라이싱이 일어날 것으로 기대된다는 것을 인지하게 될 것이다. 대립성 변이체들은 표준 과정에 따라 상이한 개체로부터 얻어진 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 프로브함으로써 클론될 수 있다. 침묵성 돌연 변이를 내포하고 있는 것들과 그 안의 돌연변이가 아미노산 서열의 변화를 초래하는 것들을 포함하여 SEQ ID NO: 1 에 표 시된 DNA 서열의 대립성 변이체들은, SEQ ID NO: 2 의 대립성 변이체들인 단백질이기 때문에 본 발명의 범주내에 있다.

본 발명은 또한 SEQ ID NO: 2 의 폴리펩티드 및 그것들의 종 상동체/오르토로그에 실질적으로 상동하는 단리된 zFGF-5 폴리펩티드들을 제공한다. 용어 "실질적으로 상동하는" 은 본원에서 SEQ ID NO: 2 에 표시된 서열 또는 그것의 오르토로 그 또는 파라로그에 대하여 50 , 바람직하게는 60 , 보다 바람직하게는 80 이상의 서열 동일성을 가지고 있는 폴리펩티드 를 나타내기 위하여 사용된다. 그러한 폴리펩티드들은 보다 바람직하게는 최소한 90 가 동일하며, 가장 바람직하게는 95 또는 그 이상이 SEQ ID NO: 2 또는 그것의 오르토로그 또는 파라로그에 동일할 것이다. 백분율 서열 동일성은 종래의 방 법들에 의하여 결정된다 [예컨대 Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48:603-616, 1986 및 Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, 1992 참조]. 간단히 설명하면, 두 개의 아미노산 서열이 10 의 갭 오프닝 페널티 를 사용하여 배열 스코어를 최적화하기 위하여 배열되고, 갭 연장 페널티는 1 이며, 헨니코프와 헨니코프 (상기 동일)의 매 트릭스를 기록하는 "블로섬 (blosum) 62" 는 하기 표 3 에 나타낸다 (아미노산은 표준 한-문자 코드로 표시한다). 그런 다 음 동일성이 다음과 같이 계산된다:

동일한 매치의 총 수

X 100

(나 긴 서열의 길이 + 두 서열을 배열하기 위하여 더 긴 서열에 도입된 갭의 수)

[표 3]

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-2	-1	1	5				
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

폴리뉴클레오티드 분자의 서열 동일성은 상기에서 설명된 바와 같은 비율을 사용하는 유사한 방법에 의하여 측정된다.

실질적으로 상동성인 단백질 및 폴리펩티드는 하나 또는 그 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 첨가를 가지고 있는 것을 특징으로 한다. 이들 변화는 바람직하게는 소소한 성질의 것이며, 즉 보존성 아미노산 치환 (하기 표 4 참조) 및 단백질 또는 폴리펩티드의 접힘 또는 활성에 유의할만하게 영향을 미치지 않는 다른 치환들; 작은 결실, 전형적으로는 1 내지 약 30 개의 아미노산 결실; 및 작은 아미노- 또는 카르복실-말단 연장, 예컨대 아미노-말단 메티오닌 잔기, 약 20 내지 25 개까지의 잔기의 작은 링커 펩티드, 또는 정제를 용이하게 해주는 작은 연장 (친화성 꼬리표(tag)), 예컨대 폴리-히스티딘관, 단백질 A [Nilsson et al., *EMBO J.* 4:1075, 1985; Nilsson et al., *Methods Enzymol.* 198:3, 1991], 글루타티온 S 트랜스퍼라제 [Smith and Johnson, *Gene* 67:31, 1988], 말토오스 결합 단백질 [Kellerman and Ferenci, *Methods Enzymol.* 90:459-463, 1982; Guan et al., *Gene* 67:21-30, 1987], 또는 다른 항원성 에피토프 또는 결합 도메인이다. [일반적인 것은 Ford et al., *Protein Expression and Purification* 2:95-107, 1991 참조]. 친화성 꼬리표를 코드화하는 DNA 들은 시판자로부터 구매할 수 있다 (예를 들면 Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; New England Biolabs, Beverly, MA).

[표 4]

보존성 아미노산 치환	
염기성	아르기닌 라이신 히스티딘
산성	글루탐산 아스파르트산
극성	글루타민 아스파라긴
소수성	로이신 이소로이신 발린
방향성	페닐알라닌 트립토판 티로신

작은 것	글리신 알라닌 세린 트레오닌 메티오닌
------	----------------------------------

본 발명의 단백질들은 또한 20 개의 표준 아미노산외에 비-자연적으로 발생하는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 비-자연적으로 발생하는 아미노산들로는 그것들에 제한되는 것은 아니지만, 트란스-3-메틸프롤린, 2,4-메타노프롤린, 시스-4-히드록시프롤린, 트란스-4-히드록시프롤린, N-메틸-글리신, 알로-트레오닌, 메틸트레오닌, 히드록시에틸-시스테인, 히드록시에틸호모시스테인, 니트로글루타민, 호모글루타민, 피페콜산, tert-로이신, 노르발린, 2-아자페닐알라닌, 3-아자페닐알라닌, 4-아자페닐알라닌, 4-플루오로페닐알라닌, 4-히드록시프롤린, 6-N-메틸라이신, 2-아미노이소부티르산, 이소발린 및 α-메틸세린이 있다. 비-자연적으로 발생하는 아미노산 잔기들을 단백질안에 통합시키기 위한 여러 가지 방법들이 당해 기술분야에 알려져 있다. 예를 들면, 넨센스 돌연변이가 화학적으로 아미노아실화된 억제자 tRNA 를 사용하여 억제되는 시험관내 시스템이 사용될 수 있다. 아미노산을 합성하는 방법 및 tRNA 를 아미노아실화하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 넨센스 돌연변이를 함유하고 있는 플라스미드의 전사 및 번역은 대장균 (*E. coli*) S30 추출물과 상업적으로 구할 수 있는 효소들 및 다른 시약들을 포함하고 있는 세포-유리 시스템에서 수행된다. 단백질은 크로마토그래피에 의해 정지된다. [예를 들면 Robertson et al., *J. Am. Chem. Soc.* **113**:2722, 1991; Ellman et al., *Meth. Enzymol.* **202**:301, 1991; Chung et al., *Science* **259**:806-809, 1993; 및 Chung et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:10145-10149, 1993 참조]. 두 번째 방법으로 번역은 제노퍼스 오오사이트 (*Xenopus oocytes*)에서 돌연변이된 mRNA 와 화학적으로 아미노아실화된 억제자 tRNA 를 미소주입함으로써 수행된다 [Turcatti et al., *J. Biol. Chem.* **271**:19991-19998, 1996]. 세 번째 방법에서는 대장균 세포가 대체될 천연 아미노산 (예컨대 페닐알라닌)이 없이 및 원하는 비-자연적으로 발생하는 아미노산(들) (예컨대 2-아자페닐알라닌, 3-아자페닐알라닌, 4-아자페닐알라닌, 또는 4-플루오로페닐알라닌)의 존재하에 배양된다. 비-자연적으로 발생하는 아미노산은 그것의 천연적인 대응물대신에 단백질안으로 통합된다 [Koide et al., *Biochem.* **33**:7470-7476, 1994 참조]. 자연적으로 발생하는 아미노산 잔기들은 시험관내 화학적 변형에 의하여 비-자연적으로 발생하는 종들로 전환될 수 있다. 화학적인 변형은 치환의 범위를 보다 더 확장시키기 위하여 부위-특정 돌연변이생성법과 조합될 수 있다 [Wynn and Richards, *Protein Sci.* **2**:395-403, 1993].

본 발명의 zFGF-5 폴리펩티드의 필수 아미노산들은 당해 기술분야에 공지되어 있는 과정들, 예컨대 부위-특정 돌연변이 생성 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이 생성과 같은 과정에 따라 확인될 수 있다 [Cunningham and Wells, *Science* **244**:1081-1085, 1989]. 후자의 기법에서는, 단일한 알라닌 돌연변이가 분자내의 매 잔기에서 도입되고, 그 결과의 돌연변이 분자는 분자의 활성에 중요한 아미노산 잔기를 찾기 위하여 생물학적 활성 (예컨대 심근세포 또는 섬유아세포의 증식, 또는 뼈 형성의 자극)에 대하여 시험된다. [Hilton et al., *J. Biol. Chem.* **271**:4699-4708, 1996]. 리간드-수용체 상호작용의 부위는 또한 핵자기 공명, 결정학, 전자 회절 또는 광친화성 표지화와 같은 기법을 잠재적인 접촉 부위 아미노산의 돌연변이와 조합하여 사용함으로써 측정되는 바와 같이, 구조의 물리적 분석에 의하여 측정될 수 있다. [예컨대 de Vos et al., *Science* **255**:306-312, 1992; Smith et al., *J. Mol. Biol.* **224**:899-904, 1992; Wlodaver et al., *FEBS Lett.* **309**:59-64, 1992 참조.] 필수 아미노산들의 동일성은 또한 관련된 FGF 와의 상동성의 분석으로부터 추론될 수 있고, 그 결과들 도 1 및 2 에 나타낸다.

zFGF-5 의 아미노산 서열의 분석 결과, 폴리펩티드의 C-말단(아미노산 잔기 196-197 (Lys-Arg))에서 이염기성 부위가 있는 것으로 나타났다. 아미노산 잔기 28 (Glu)에서 아미노산 잔기 196 (Lys) 까지, SEQ ID NO: 2 에 표시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하고 있는 C-말단에서 절단된 폴리펩티드는 생물학적 활성을 가지고 있는 것으로 증명되었다. 이염기성 아미노산, 예컨대 Arg-X-X-Arg (여기서 X 는 모든 아미노산이 될 수 있다), Arg-Arg 또는 Lys-Arg 은 그것들에만 한정되는 것은 아니지만 트롬빈 및 카르복시펩티다제를 포함한 여러 가지 효소들에 의한 절단 대상이 된다. 그러므로, 이염기성 아미노산 잔기, 특히 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 잔기 196 및 197 (각각 Lys 및 Arg)에 있는 이염기성 잔기에서 보존성 변화를 만드는 것은 본 발명에서 청구하는 범위내에 있다.

FGF 패밀리에 대한 분석을 토대로 할 때 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 잔기 28 (Glu) 에서 잔기 175 (Met) 를 포함하는 C-말단에서 절단된 분자는 생물학적으로 활성을 나타낼 것이다. 분자내 이황화 결합은 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 잔기 109 (Cys) 와 잔기 129 (Cys) 사이에서 일어날 것으로 예상된다.

FGF-1 및 FGF-2 결정 구조 [Eriksson et al., *Prot. Sci.* **2**:1274, 1993]를 이용한 상동성 배열을 토대로 할 때, zFGF-5 의 베타 가닥 구조에 대한 이차 구조는 SEQ ID NO: 2 의 아미노산 잔기 56-59, 64-69, 73-76, 85-92, 96-102, 106-

111, 115-119, 128-134, 138-144, 149-155, 및 173-177 과 상관관계가 있는 것으로 예상된다. 수용체에 대한 zFGF-5의 결합에 결정적인 아미노산들은 전체 zFGF-5 폴리펩티드의 부위-특정 돌연변이 생성에 의하여 확인될 수 있다. 보다 구체적으로, 그것들은 산성 FGF (FGF1) 및 염기성 FGF(FGF2)에서 이들 FGF 들이 그것들의 수용체에 대한 결합에 결정적인 것으로서 확인된 아미노산 잔기들에 상응하는 zFGF-5 폴리펩티드의 아미노산들의 부위-특정 돌연변이 생성을 사용하여 확인될 수 있다 [Blaber et al., Biochem. 35:2086-2094, 1996]. 그러한 아미노산들로는 도 1 및 도 2 에 도시되어 있는 바와 같이, 사람 FGF2 에서는 Tyr33, Arg53, Asn110, Tyr112, Lys119, Trp123, Leu149 및 Met151 과, 사람 FGF1 에서는 Tyr30, Arg50, Asn107, Tyr109, Lys116, Trp122, Leu148 및 Leu150 이 있다. zFGF-5 에서의 상응하는 아미노산들은 도 1 및 도 2 에 도시되어 있는 바와 같이, Tyr58, Gly77, Asn136, Tyr138, Lys145, Trp149, Met175 및 Arg177 일 것이다. 당업자는 FGF 패밀리의 다른 구성원들이 전체적으로 또는 부분적으로 zFGF-5 에 대하여 구조적으로나 또는 생화학적으로 유사한 성질을 가질 것이며, 치환될 수 있어서 그러한 분석을 가능하게 할 것이다. 그러한 영역들은 분자의 생물학적 기능에 중요할 것이다.

다중 아미노산 치환들은 돌연변이생성 및 스크리닝의 공지 방법들, 예를 들면 라이드하르-올슨과 사우어에 의해 개시된 방법 [Reidhaar-Olson and Sauer, Science 241:53-57, 1988] 또는 보위와 사우어에 의해 개시된 방법 [Bowie and Sauer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-2156, 1989] 을 사용하여 만들어지고 시험될 수 있다. 간단하게 설명하면, 상기의 저자들은 폴리펩티드에서 둘 또는 그 이상의 위치를 동시에 임의 추출하고, 기능을 나타내는 폴리펩티드를 선택한 후, 각각의 위치에서 허용되는 치환의 스펙트럼을 측정하기 위하여 돌연변이를 일으킨 폴리펩티드를 서열화하는 방법들을 개시한다. 사용될 수 있는 다른 방법으로는, 파지 디스플레이 [예컨대 Lowman et al., Biochem. 30:10832-10837, 1991; Ladner et al., 미국 특허 제 5,223,409 호; Huse, WIPO 공보 WO 92/06204] 및 영역-특정된 돌연변이생성 [Derbyshire et al., Gene 46:145, 1986; Ner et al., DNA 7:127, 1988] 이 있다.

상술된 바와 같은 돌연변이생성법은 숙주 세포에서 클론되고 돌연변이를 일으킨 폴리펩티드의 활성을 검출하기 위하여 처리량이 높은 (high-throughput) 자동화된 스크리닝법과 조합될 수 있다. 활성을 나타내는 폴리펩티드 (예컨대 세포 증식) 를 코드화하는 돌연변이된 DNA 분자들은 숙주 세포로부터 회수되어 현대적인 장비를 사용하여 빠르게 서열화될 수 있다. 이들 방법으로 관심의 폴리펩티드의 개별적인 아미노산 잔기들의 중요성을 신속하게 측정하는 것이 가능하게 되었고, 미지의 구조를 가지고 있는 폴리펩티드에게도 적용될 수 있다.

상기에서 논의된 방법들을 사용하여, 당업자는 SEQ ID NO: 2 의 잔기 28 (Glu) 내지 196 (Lys) 또는 잔기 28 (Glu) 내지 207 (Ala) 에 실질적으로 상동하고, 야생형 단백질의 증식 성질을 보유하고 있는 다양한 폴리펩티드, 그것들의 대립성 변이체, 또는 그것들의 생물학적으로 활성을 나타내는 단편들을 확인 및/또는 제조할 수 있다. 그러한 폴리펩티드들은 또한 일반적으로 상술된 바와 같이 추가의 폴리펩티드 절편들을 포함할 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드는 전체 길이의 단백질, 그것들의 단편 및 융합 단백질을 포함하여, 종래 기법에 따라 유전공학적으로 처리된 숙주 세포에서 제조될 수 있다. 적당한 숙주세포는 외래 DNA 에 의해 형질전환될 수 있고 배양액중에서 성장할 수 있는 것들로서, 예를 들면 박테리아, 진균세포, 및 배양된 고등 진핵 세포가 있다. 진핵 세포, 특히 다세포 유기체의 배양된 세포가 바람직하다. 클론된 DNA 분자들을 조작하고 외래 DNA 를 다양한 숙주 세포에 도입시키는 기법들은 참고문헌에 기재되어 있다 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, 및 Ausubel et al.(eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987].

일반적으로, 본 발명의 zFGF-5 폴리펩티드를 코드화하는 DNA 서열은 그것의 발현을 위해 필요한 다른 유전적 요소들, 일반적으로 예를 들면 발현 벡터내에 있는 전사 프로모터와 터미네이터에 작동가능하게 연결되어 있다. 벡터는 또한 비록 당업자가 특정 시스템내에서는 선택가능한 마아커들이 별도의 벡터로 제공되기도 한다는 것을 인지하겠지만, 통상적으로 하나 또는 그 이상의 선택가능한 마아커 및 하나 또는 그 이상의 복제 기원을 함유할 수 있으며, 외래 DNA 의 복제는 숙주 세포 계능안으로의 통합에 의하여 제공될 수 있다. 프로모터, 터미네이터, 선택가능한 마아커, 벡터 및 다른 요소들의 선택은 당해 기술분야의 통상적인 기술 수준내에서 기본적인 디자인의 문제이다. 많은 그러한 요소들이 문헌에 기재되어 있고 시판업자들을 통하여 쉽게 활용할 수 있다.

숙주 세포의 분비 경로안으로 zFGF-5 폴리펩티드를 특정하기 위하여 분비 신호 서열 (또한 리더 서열, 프레프로 서열 또는 프레 서열로도 알려져 있다)이 발현 벡터안에 제공된다. 분비 신호 서열은 천연 서열일 수 있으며, 또는 다른 분비된 단백질로부터 유도된 신호 서열 (예컨대 t-PA 및 α -프레-프로 분비 리더)을 포함하는 키메라일 수도 있으며, 또는 새롭게 합성될 수도 있다. 분비 신호 서열은 정확한 리딩 프레임으로 zFGF-5 DNA 서열에 결합된다. 분비 신호 서열은 비록 특정

한 신호 서열이 관심의 DNA 서열의 그 밖의 위치에 위치할 수도 있지만, 관심의 폴리펩티드를 코드화하는 DNA 서열에 대해 통상적으로 5' 쪽에 위치한다 (예컨대 Welch et al., 미국 특허 제 5,037,743 호; Holland et al., 미국 특허 제 5,143,830 호 참조).

폴리펩티드 용합물을 포함하여 관심의 모든 폴리펩티드를 코드화하는 DNA 를 클론하기 위하여 사용될 수 있는 보편적인 수용체 플라스미드가 개시된다. 수용체 플라스미드는 이중 가닥의 원형 DNA 분자를 제조하기 위한 방법의 범위내에서 유용하다. 그 방법은 (a) 관심의 폴리펩티드를 코드화하는 이중 가닥의 공여 DNA 단편을 제공하는 단계; (b) 블런트의 첫 번째 및 두 번째 단부를 가지고 있고 선택가능한 마아커와 맥주효모균 (*Saccharomyces cerevisiae*)에서 기능할 수 있는 복제 서열을 포함하고 있으며, 본질적으로 관심의 폴리펩티드를 코드화하는 DNA 가 없는 이중 가닥의 선형 수용체 플라스미드를 제공하는 단계; (c) 서열면에서 수용체 플라스미드의 첫 번째 영역과 동일한 첫 번째 절편과 공여 DNA 단편의 첫 번째 영역과 서열면에서 동일한 두 번째 절편을 포함하고 있으며, 첫 번째와 두 번째의 절편의 각각의 길이가 최소한 10 bp 인 첫 번째 이중가닥 DNA 링커를 제공하는 단계; (d) 서열면에서 수용체 플라스미드의 두 번째 영역과 동일한 첫 번째 절편과 공여 DNA 단편의 두 번째 영역과 서열면에서 동일한 두 번째 절편을 포함하고 있으며, 첫 번째와 두 번째의 절편의 각각의 길이가 최소한 10 bp 인 두 번째 이중가닥 DNA 링커를 제공하는 단계; 그리고 (e) 공여 DNA 단편, 수용체 플라스미드, 첫 번째 DNA 링커, 및 두 번째 DNA 링커를 맥주효모균 숙주 세포안에서 조합함으로써 공여 DNA 단편이 공여 DNA, 수용체 플라스미드, 및 링커의 동종 재조합에 의하여 수용체 플라스미드에 결합되어 폐쇄된 원형의 플라스미드가 형성되는 단계로 이루어진다. 수용체 플라스미드는 또한 첫 번째 단부와 가까이 있는 전사 프로모터를 포함하고 있고, 공여 DNA 단편은 폐쇄된 원형의 플라스미드안에서 전사 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있다. 수용체 플라스미드는 또한 리더 펩티드를 코드화하는 DNA 절편 및/또는 펩티드 꼬리표를 코드화하는 하나 또는 그 이상의 DNA 절편을 포함하는데, 이들 절편은 폐쇄된 원형의 플라스미드안에서 이들 DNA 절편이 공여 DNA 단편에 작동가능하게 연결되도록 위치되어 있다. 바람직한 구체예에서, 수용체 플라스미드는 또한 (a) 프로모터, 리더 펩티드를 코드화하는 DNA 절편, 및 첫 번째 펩티드 꼬리표를 코드화하는 DNA 절편; 및 (b) 수용체 플라스미드의 두 번째 단부에 가까이 있는 두 번째 펩티드 꼬리표를 코드화하는 DNA 절편을 포함하며, 상기의 리더 펩티드를 코드화하는 DNA 절편은 프로모터와 수용체 플라스미드의 첫 번째 단부에 가까이 있는 첫 번째 펩티드 꼬리표를 코드화하는 DNA 절편 사이에 위치하고, 프로모터, 리더 펩티드를 코드화하는 DNA 절편, 및 첫 번째 펩티드 꼬리표를 코드화하는 DNA 절편이 작동가능하게 연결되어 있다.

본 발명에서는 (a) 관심의 폴리펩티드를 일괄적으로 코드화하는 다수의 중복하는 이중 가닥 공여 DNA 단편을 제공하는 단계; (b) 첫 번째와 두 번째의 블런트 단부를 가지고 있으며, 맥주효모균내에서 작용될 수 있는 선택가능한 마아커와 복제 기원을 포함하고, 본질적으로 관심의 폴리펩티드를 코드화하는 DNA 가 없는 이중 가닥의 선형 수용체 플라스미드를 제공하는 단계; (c) 서열면에서 수용체 플라스미드의 첫 번째 영역과 동일한 첫 번째 절편과 공여 DNA 단편의 첫 번째 영역과 서열면에서 동일한 두 번째 절편을 포함하고 있으며, 첫 번째와 두 번째의 절편의 각각의 길이가 최소한 10 bp 인 첫 번째 이중가닥 DNA 링커를 제공하는 단계; (d) 서열면에서 수용체 플라스미드의 두 번째 영역과 동일한 첫 번째 절편과 공여 DNA 단편의 두 번째 영역과 서열면에서 동일한 두 번째 절편을 포함하고 있으며, 첫 번째와 두 번째의 절편의 각각의 길이가 최소한 10 bp 인 두 번째 이중가닥의 DNA 링커를 제공하는 단계; 그리고 (e) 공여 DNA 단편, 수용체 플라스미드, 첫 번째 DNA 링커, 및 두 번째 DNA 링커를 맥주효모균 숙주 세포안에서 조합함으로써 공여 DNA 단편들이 동종 재조합에 의하여 수용체 플라스미드에 결합되어 관심의 폴리펩티드를 코드화하는 영역을 포함하고 있는 폐쇄된 원형의 플라스미드가 형성되는 단계로 이루어지는 이중 가닥의 원형 DNA 분자를 제조하는 방법이 개시된다. 수용체 플라스미드는 추가로 상술된 바와 같이 하나 또는 그 이상의 전사 프로모터, 리더 펩티드를 코드화하는 DNA 절편, 및 펩티드 꼬리표를 코드화하는 하나 또는 그 이상의 DNA 절편을 포함한다.

효모 세포, 특히 사카로마이세스 (*Saccharomyces*) 또는 피치아 (*Pichia*) 세포를 포함한 진균 세포가 zFGF-5 단편 또는 폴리펩티드 용합물을 제조하기 위한 숙주로서 특히 바람직한 세포들이다.

외래 DNA 로 효모 세포를 형질전환시키고 그것으로부터 제조한 폴리펩티드를 제조하는 다른 방법들도 개시되어 있다 [예를 들면, Kawasaki, 미국 특허 제 4,599,311 호; Kawasaki et al., 미국 특허 제 4,931,373 호; Brake, 미국 특허 제 4,870,008 호; Welch et al., 미국 특허 제 5,037,743 호; 및 Murray et al., 미국 특허 제 4,845,075 호]. 형질전환된 세포들은 선택가능한 마아커, 통상적으로는 약물 내성 또는 특정한 영양분 (예컨대 로이신)이 없는 상태에서의 성장 능력에 의해 결정되는 표현형에 의해 선택된다. 효모에서 사용하기 위한 대체되는 바람직한 벡터 시스템은 가와사키 등에 의해 개시된 **POT1** 벡터 시스템 [Kawasaki et al., 미국 특허 제 4,931,373 호]인데, 이것은 형질전환된 세포가 글루코오스-함유 배지에서 성장에 의해 선택되는 것을 가능하게 한다. 효모내에서 사용하기에 적당한 프로모터 및 터미네이터로는 당분해 효소 유전자로부터 얻어지는 것들 [예컨대 Kawasaki, 미국 특허 제 4,599,311 호; Kingsman et al., 미국 특허 제 4,615,974 호; 및 Bitter, 미국 특허 제 4,977,092 호 참조] 및 알코올 데히드로게나제 유전자로부터 얻어지는 것들이 있다 (미국 특허 제 4,990,446 호; 5,063,154 호; 5,139,936 호 및 4,661,454 호 참조). 다른 효모에 대한 형질전환 시스템, 예컨대 한세놀라 폴리모르파 (*Hansenula polymorpha*), 시조사카로마이세스 프라길리스 (*Schizosaccharomyces*

fragilis), 우스틸라고 마이디스 (*Ustilago maydis*), 피치아 파스토리스 (*Pichia pastoris*), 피치아 킬레르몽디 (*Pichia guilliermondii*), 및 칸디다 말토사 (*Candida maltosa*)가 당해 기술분야에 공지되어 있다. 특히 바람직한 시스템은 피치아 메탄올리카 (*Pichia methanolica*)를 활용한다 [PCT 출원 WO 97/17450 참조]. 대체 형질전환 시스템에 대해서는 문헌을 참조한다 [Gleeson et al., *J. Gen. Microbiol.* **132**:3459-3465, 1986 및 Cregg, 미국 특허 제 4,882,279 호]. 아스페르길루스 세포들도 맥나이트 등의 방법 [McKnight et al., 미국 특허 제 4,935,349 호]에 따라 활용될 수 있다. 아크레모니움 크리소게눔 (*Acremonium chrysogenum*)을 형질전환시키는 방법이 수미노 등에 의해 개시되어 있다 (Sumino et al., 미국 특허 제 5,162,228 호). 뉴로스포라 (*Neurospora*)를 형질전환시키는 방법도 램보비츠 등에 의해 개시되어 있다 (Lambowitz, 미국 특허 제 4,486,533 호).

배양된 포유동물 세포가 또한 본 발명의 범주내에서 바람직한 숙주이다. 외래 DNA 를 포유류의 숙주 세포안으로 도입시키는 방법들로는 칼슘 포스페이트-중재된 형질전환 [Wigler et al., *Cell* **14**:725, 1978; Corsaro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* **7**:603, 1981; Graham and Van der Eb, *Virology* **52**:456, 1973], 일렉트로포레이션 (electroporation) [Neumann et al., *EMBO J.* **1**:841-845, 1982], DEAE-덱스트란 중재된 형질전환 [Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987], 및 리포솜-중재된 형질전환 [Hawley-Nelson et al., *Focus* **15**:73, 1993; Ciccarone et al., *Focus* **15**:80, 1993]이 있다. 배양된 포유류 세포에서 통합된 폴리펩티드를 제조하는 것도 문헌에 개시되어 있다 [예컨대 Levinson et al., 미국 특허 제 4,713,339 호; Hagen et al., 미국 특허 제 4,784,950 호; Palmiter et al., 미국 특허 제 4,579,821 호; 및 Ringold, 미국 특허 제 4,656,134 호]. 바람직한 배양된 포유류 세포로는 COS-1 (ATCC No. CRL 1650), COS-7 (ATCC No. CRL 1651), BHK 570 (ATCC No. CRL 10314), 293 (ATCC No. CRL 1573; Graham et al., *J. Gen. Virol.* **36**:59-72, 1977) 및 차이니스 햄스터 난소 셀라인 (예컨대 CHO-K1; ATCC No. CCL 61)이 있다. 추가의 적당한 셀라인들은 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 미국 메릴랜드주 록빌시에 있는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (ATCC)과 같은 국제 기탁기관으로부터 활용할 수 있다. 일반적으로, 강력한 전사 프로모터들, 예를 들면 SV-40 또는 사이토메갈로바이러스로부터 얻어지는 프로모터들이 바람직하다 (예컨대 미국 특허 제 4,956,288 호 참조). 다른 적당한 프로모터로는 메탈로티오네인 유전자로부터 얻어지는 것들 (미국 특허 제 4,579,821 호 및 4,601,978 호) 및 아데노바이러스 주요 후기 프로모터가 있다.

약물 선택은 일반적으로 외래 DNA 가 삽입된 배양된 포유류 세포를 선택하기 위하여 사용된다. 그러한 세포들은 통상적으로 "형질전환체"로 언급된다. 선택적인 제제의 존재하에 배양되고 관심의 유전자를 그것의 자손 세포에까지 계대시킬 수 있는 그러한 세포들은 "안정한 형질전환체"로 언급된다. 바람직한 선택가능한 마아커는 항생물질 네오마이신에 대한 내성을 코드화하는 유전자이다. 선택은 G-418 등과 같은 네오마이신-형 약물의 존재하에 수행된다. 선택 시스템은 또한 관심의 유전자의 발현 수준을 증가시키기 위하여 사용될 수 있으며, 그 증가 과정은 "증폭"으로 언급된다. 증폭은 형질전환체를 낮은 수준의 선택제제의 존재하에 배양시킨 후, 도입된 유전자의 생성물을 고수준으로 생성하는 세포를 선택하기 위하여 선택제제의 양을 증가시킴으로써 수행된다. 바람직한 증폭가능한 선택성 마아커는 디히드로폴레이트 환원효소로, 그것은 메토타렉세이트에 대한 내성을 부여한다. 다른 약물 내성 유전자 (예컨대 하이그로마이신 내성, 다중-약물 내성, 퓨로마이신 아세틸트란스페라제)가 또한 사용될 수 있다.

다른 고등 진핵 세포, 예컨대 곤충 세포, 식물 세포 및 조류 세포가 또한 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 곤충 세포의 형질전환 및 그 안에서의 외래 폴리펩티드의 생성에 대해서는 문헌에 기재되어 있다 [Guarino et al., 미국 특허 제 5,162,222 호; Bang et al., 미국 특허 제 4,775,624 호; 및 WIPO 공보 WO 94/06463 호]. 아그로박테리움 리조게네스 (*Agrobacterium rhizogenes*)를 식물 세포에서 유전자를 발현시키기 위한 벡터로서 사용하는 것도 싱커 등에 의해 설명되어 있다 [Sinkler et al., *J. Biosci. (Bangalore)* **11**:47-58, 1987].

형질전환된 (곤충을 포함한) 숙주 세포들은 종래의 과정을 따라 선택된 숙주 세포의 성장을 위해 필요한 영양분 및 다른 성분들을 함유하고 있는 배양 배지에서 배양된다. 규정된 배지 및 복합 배지를 포함하고 있는 다양한 적당한 배지들이 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 일반적으로 배지는 탄소 공급원, 질소 공급원, 필수 아미노산, 비타민 및 미네랄을 함유하고 있다. 배지는 또한 성장 인자 또는 혈청과 같은 성분들을 필요에 따라 함유할 수 있다. 성장 배지는 일반적으로 예를 들면 발현 벡터에 대해 수행된 선택가능한 마아커에 의해 보충되거나 또는 숙주 세포안으로 함께 형질전환된 필수 영양분중에서의 약물 선택 또는 결핍에 의해 외래적으로 첨가된 DNA 를 함유하고 있는 세포를 선택할 것이다.

발현된 재조합 zFGF-5 폴리펩티드 (또는 키메라 zFGF-5 폴리펩티드)는 분획화 및/또는 종래의 정제 방법들 및 배지를 사용하여 정제될 수 있다. 암모늄 술페이트 정제 및 산 또는 케이오토로프 (chaotrope) 추출이 샘플의 분획화를 위해 사용될 수 있다. 예시적인 정제 단계들로는 히드록시아파타이트, 크기 축출, FPLC 및 역상 고성능 액체 크로마토그래피가 있다. 적당한 음이온 교환 배지에는 유도화된 덱스트란, 아가로오스, 셀룰로오스, 폴리아크릴아미드, 특수한 실리카, 등이 포함된다. PEI, DEAE, QAE 및 Q 유도체가 바람직하며, 특히 DEAE 패스트-플로우 (Fast-Flow) 세파로스 (Pharmacia, Piscataway, NJ)가 바람직하다. 예시적인 크로마토그래피 배지로는 페닐, 부틸, 또는 옥틸기로 유도화된 배지, 예컨대 페

닐-세파로스 FF (Pharmacia), 토요퍼얼 부틸 (Toyopearl butyl) 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), 옥틸-세파로스 (Pharmacia) 등; 또는 폴리아크릴산 수지, 예컨대 암버크롬 (Amberchrom) CG 71 (Toso Haas) 등이 있다. 적당한 고체 지지체로는 그것들이 사용되는 조건하에서 불용성인 유리 비이드, 실리카-기초 수지, 셀룰로오스성 수지, 아가로오스 비이드, 교차-결합된 아가로오스 비이드, 폴리스티렌 비이드, 교차-결합된 폴리아크릴아미드 수지 등이 있다. 이들 지지체는 아미노기, 카르복실기, 술폰히드릴기, 히드록실기 및/또는 카보하이드레이트 부분들에 의하여 단백질의 부착을 가능하게 하는 반응성 기들을 사용하여 변형될 수 있다. 커플링 화학의 실례로는 시아노젠 브로마이드 활성화, N-히드록시숙신이미드 활성화, 에폭시드 활성화, 술폰히드릴 활성화, 히드라자이드 활성화, 및 카르복실이 있고, 카르보디이미드 커플링 화학을 위해서는 아미노 유도체가 있다. 이들 및 다른 고체 배지는 당해 기술분야에 잘 알려져 있으며, 당해 기술분야에서 광범위하게 사용되며, 상업적인 공급자들로부터 구입할 수 있다. 수용체 폴리펩티드를 지지체 배지에 결합시키는 방법들은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 특정한 방법을 선택하는 것은 기본적인 디자인 문제이고, 부분적으로는 선택된 지지체의 성질에 의해 측정된다. [예를 들면, Affinity Chromatography: Principles & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988 참조.]

본 발명의 폴리펩티드는 또한 그것들의 헤파린 결합 성질을 이용함으로써 분리될 수 있다. [개관을 위해서는 Burgess et al., Ann. Rev. of Biochem. 58:575-606, 1989 참조]. FGF 패밀리의 구성원들은 헤파린-세파로스 친화성 크로마토그래피 [Gospodarowicz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6963-6967, 1984]에 의해 균질한 정도로 정제될 수 있고 NaCl의 선형식 구배를 사용하여 용출될 수 있다 [Ron et al., J. Biol. Chem. 268(4):2984-2988, 1993; Chromatography: Principles & Methods, pp. 77-80, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1993; in "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Hermanson et al., eds., pp. 165-167, Academic Press, San Diego, 1992; Kjellen et al., Ann. Rev. Biochem. 60:443-474, 1991; 및 Ke et al., Protein Expr. Purif. 3(6):497-507, 1992].

다른 정제 방법으로는 히스티딘-풍부 단백질을 정제하기 위하여 고정된 금속 이온 흡착 (IMAC) 크로마토그래피를 사용하는 것이 있다. 간단히 설명하면, 젤이 먼저 이가의 금속 이온으로 하전되어 킬레이트가 형성된다 [E. Sulkowski, Trends in Biochem. 3:1-7, 1985]. 히스티딘-풍부 단백질은 사용된 금속 이온에 따라 상이한 친화성으로 이 매트릭스에 흡착될 것이고, 경합 용출, pH의 강하, 또는 강력한 킬레이트제의 사용에 의하여 용출될 것이다. 다른 정제 방법으로는 렉틴 친화성 크로마토그래피와 이온 교환 크로마토그래피에 의한 글리코실화된 단백질들의 정제가 있다 [Methods in Enzymol., Vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, (ed.), Acad. Press, San Diego, 1990, pp.529-539]. 또는 달리, 관심의 폴리펩티드의 용해물과 친화성 꼬리표 (예컨대 폴리히스티딘, 말토오스-결합 단백질, 면역글로불린 도메인)가 정제를 용이하게 하기 위하여 구성될 수도 있다.

단백질 재접합 (및 임의로 재산화) 과정이 유익하게 사용되기도 한다. 단백질은 바람직하게는 80 이상의 순도로, 보다 바람직하게는 90 이상의 순도로, 훨씬 더 바람직하게는 95 이상의 순도로 정제되는 것이 좋으며, 특히 바람직한 것은 약학적으로 순수한 상태, 즉 오염시키는 거대분자들, 특히 다른 단백질 및 핵산과 관련하여 99.9 이상의 순도와 감염성 및 발열성 제제가 없는 것이 좋다. 바람직한 것은 정제된 단백질이 실질적으로 다른 단백질, 특히 동물 기원의 다른 단백질이 없는 것이다.

zFGF-5 폴리펩티드 또는 그것들의 단편은 또한 화학적인 합성을 통하여 제조될 수도 있다. zFGF-5 폴리펩티드는 단량체이거나 또는 다중체일 수 있고; 글리코실화되거나 그렇지 않을 수도 있으며; 페길레이트되거나 비-페길레이트될 수 있고; 초기 메티오닌 아미노산 잔기를 포함할 수도 있고 포함하지 않을 수도 있다.

본 발명의 분자들의 활성은 다양한 검정법, 예를 들면, 성인 심장에서의 조직 특이성을 토대로 하여 심장 세포의 재생 또는 과형성 (즉, 증식)을 측정하는 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드와 관련이 있을 것으로 보이는 추가의 활성은 직접적으로 또는 간접적으로 다른 성장 인자들을 통한 내피 세포, 심근세포, 섬유아세포, 골격 근세포의 증식; 내피 세포, 섬유아세포 및/또는 식세포에 대한 화학주성 세포로서의 작용; 및 간엽성 간세포 및 선구 세포 집단의 증식을 위한 인자와 같은 것들이 있다.

증식은 배양된 심장 세포를 사용하여 또는 생체내에서는 적절한 동물 모델에 본 발명에서 청구되는 분자들을 투여함으로써 측정될 수 있다. 일반적으로, 증식 효과는 세포수의 증가로서 알 수 있으며, 그러므로 유사분열 뿐만 아니라 아포토시스 (apoptosis)의 억제를 포함할 것이다. 배양된 세포로는 심장 섬유아세포, 심근세포, 골격 근세포, 일차 배양물로부터 얻어지는 사람 태블 내피 세포가 있다. 수립된 셀라인으로는 다음과 같은 것들이 있다: NIH 3T3 섬유아세포 (ATCC No. CRL-1658), CHH-1 연어 심장 세포 (ATCC No. CRL-1680), H9c2 쥐 심장 근아세포 (ATCC No. CRL-1446), 시오노기 유방 암종 세포 (Tanaka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89:8928-8932, 1992) 및 LNCap.FGC 선암 세포 (ATCC No. CRL-1740). 세포 증식을 측정하는 검정법은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있다. 예를 들면 증식을 측정하는 검정법으로는 중성의 적색 눈에 대한 화학적 감도 [Cavanaugh et al., Investigational New Drugs 8:347-354, 1990], 방사성 표지된

뉴클레오티드의 통합 [Cook et al., Analytical Biochem. 179:1-7, 1989], 5-브로모-2'-데옥시우리딘 (BrdU)의 증식하는 세포의 DNA 안으로의 통합 [Porstmann et al., J. Immunol. Methods 82:169-179, 1985], 및 테트라졸리움 염의 사용 [Mosmann, J. Immunol. Methods 65:55-63, 1983; Alley et al., Cancer Res. 48:589-601, 1988; Marshall et al., Growth Req. 5:69-84, 1995; 및 Scudiero et al., Cancer Res. 48:4827-4833, 1988] 과 같은 검정법들이 있다.

분화는 다능성 간세포 (stem cell)로부터 시작하여 말단 분화된 세포로 끝나는 점진적이고 역학적인 과정이다. 세포 계대에 대한 구속이 있을 때 소실되는 분화 마아커들의 세트를 발현하는 계대에 대한 구속없이 재생될 수 있는 다능성 간세포들이 만들어진다. 선구 세포들은 성숙을 향한 세포 계대 경로 아래쪽으로 세포가 진행하기 때문에 발현이 지속될 수도 있고 또는 지속되지 않을 수도 있는 발현 마아커들의 세트를 발현한다. 성숙한 세포들에 의하여 집중적으로 발현되는 분화 마아커들은 통상적으로 기능성 성질, 예컨대 세포 생성물, 세포 생성물을 생성하기 위한 효소 및 수용체들이다. 세포 집단의 분화의 단계는 세포 집단내에 존재하는 마아커들의 확인에 의해 모니터된다. 근세포, 조골세포, 함지방세포, 크론드로사이트, 섬유아세포 및 망상세포들은 통상적인 간엽성 간세포로부터 기원하는 것으로 여겨진다 [Owen et al., Ciba Fdn. Symp. 136:42-46, 1988]. 간엽성 간세포에 대한 마아커들은 잘 확인되어 있지 않았고 [Owen et al., J. of Cell Sci. 87:731-738, 1987], 따라서 확인은 보통 선구세포 및 성숙한 단계의 세포에서 이루어진다. 초기 단계의 심근세포 선구세포 (때로 심근 간세포로도 언급됨)의 존재가 성인의 심장 조직에서 추측되었지만, 증명되지는 않았다. 본 발명의 신규한 폴리펩티드는 생체내 및 생체외에서 모두 간엽성 간세포 및 심근세포 선구 세포를 단리하기 위한 연구에 유용하다.

말단 분화 또는 역분화를 향한 경로 아래쪽으로 특이한 세포 유형을 자극하는 인자들이 통상적인 선구체 또는 간세포로부터 기원하는 전체 세포 집단에 영향을 미치는 것을 시사하는 증거가 있다. 그러므로, 본 발명은 근세포, 평활근 세포, 조골세포, 함지방세포, 크론드로사이트 및 내피세포의 억제 또는 증식을 자극하는 것을 포함한다. 본 발명의 분자들은 심장 근세포의 증식 또는 분화를 자극하는 한편으로, 그것들의 통상적인 선구체/간세포에 미치는 영향에 의하여 함지방세포의 증식 또는 분화를 억제할 수 있다. 그러므로 본 발명의 분자들은 연골 육종 (chondrosarcoma), 아테로마성 동맥경화증, 재협착증 및 비만을 억제하는 데 사용될 수 있다.

분화를 측정하는 검정법으로는 예를 들면, 조직, 효소 활성, 기능적 활성 또는 형태학적인 변화의 단계-특이적 발현과 관련된 세포-표면 마아커들을 측정하는 방법이 있다 [Watt, FASEB 5:281-284, 1991; Francis, Differentiation 57:63-75, 1994; Raes, Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses, 161-171, 1989].

심장의 괴사 또는 과형성을 평가하기 위한 생체내 검정은 본 발명의 분자로 신생 및 성숙한 쥐를 처리하는 것을 포함한다. 동물의 심장 기능은 심박, 혈압, 및 좌심실 기능을 측정하기 위한 심장의 산출량으로서 측정된다. 심장 개선을 평가하기 위한 사후 처리 (post-mortem) 방법은 증가된 심장 중량, 핵/세포질 부피, 증식하는 세포의 핵항원 (PCNA) 대 세포질의 액틴 수준을 측정하기 위한 심장의 조직학적 절개부분의 염색을 포함한다 [Quaini et al., Circulation Res. 75:1050-1063, 1994 및 Reiss et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8630-8635, 1996].

뼈 형성 속도의 변화를 측정하기 위한 생체내 검정은 뼈 조직학을 수행하는 것 [Recker, R., eds. Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1983]과 컴퓨터로 촬영되는 정량적인 단층 X 선 사진촬영 [QCT; Ferretti, J. Bone 17:353S-364S, 1995; Orphanoludakis et al., Investig. Radiol. 14:122-130, 1979 및 Durand et al., Medical Physics 19:569-573, 1992]을 포함한다. 뼈 형성의 변화를 측정하기 위한 생체의 검정은 예를 들면 칼라바리알 검정 (calavarial assay) [Gowen et al., J. Immunol. 136:2478-2482, 1986] 일 수 있다.

에너지 평형을 조절하는 것과 관련하여, 특히 에너지 평형이 함지방세포의 대사, 증식 및 분화와 관련이 있기 때문에, zFGF-5 폴리펩티드가 대사 반응에 미치는 영향을 조절한다. 그러한 대사 반응으로는 지방질생성 (adipogenesis), 당신생, 글리코겐 분해, 지질 생성, 글루코코스 흡수, 단백질 합성, 열발생, 산소 활용 등이 있다. 당해 기술분야에 공지되어 있는 또는 본원에 개시된 다른 방법들 중에서 포유류의 에너지 평형은 하나 또는 그 이상의 상기 언급된 대사 기능을 모니터함으로써 평가될 수 있다. 이들 대사 기능은 하기에 보다 상세하게 설명되는 바와 같이 당업자에게 공지되어 있는 기법들 (검정 또는 동물 모델)에 의하여 모니터된다. 예를 들면, 인슐린의 당 조절 효과는 간, 골격근육 및 지방 조직에서 지배적으로 발휘된다. 골격근육 및 지방 조직에서 인슐린은 당의 흡수, 저장 및 활용을 자극하는 작용을 한다.

상기에서 인용된 대사 기능을 모두 모니터하기 위한 기술이 인정받은 방법들이 존재한다. 그러므로, 당업자는 zFGF-5 폴리펩티드, 그것의 단편, 융합 단백질, 항체, 아고니스트 및 길항제를 대사 조절 기능에 대하여 평가할 수 있다. 예시적인 조절 기법을 하기에 설명한다.

인슐린-자극된 지질생성은 예를 들면 ^{14}C -아세테이트의 트리글리세리드 안으로의 통합 [Mackall et al., *J. Biol. Chem.* **251**:6462-6464, 1976] 또는 트리글리세리드 축적 [Kletzien et al., *Mol. Pharmacol.* **41**:393-398, 1992] 을 측정함으로써 모니터링될 수 있다.

zFGF-5-자극된 흡수는 예를 들면 인슐린-자극된 글루코오스 운반에 대한 검정으로 평가될 수 있다. 간단히 설명하면, 일차 함지방세포 또는 NIH 3T3 L1 세포 (ATCC No. CCL-92.1) 가 1 g/l 의 글루코오스, 0.5 또는 1.0 의 BSA, 20 mM 의 HEPES, 및 2 mM 의 글루타민이 함유되어 있는 DMEM 에 놓인다. 배양을 시작하고 2 시간 내지 5 시간 후에, 배지를 0.5 또는 1.0 의 BSA, 20 mM 의 HEPES, 1mM 의 피루베이트, 및 2 mM 의 글루타민이 함유되어 있는 글루코오스가 없는 새로운 배지로 교체한다. 적절한 농도의 zFGF-5, 인슐린 또는 IGF-1, 또는 일련적으로 희석된 시험물질을 첨가하고, 20 분 내지 30 분동안 인큐베이션한다. ^3H 또는 ^{14}C -표지된 데옥시글루코오스를 ~ 50 1M 의 최종 농도로 첨가하고, 세포를 대략 10 내지 30 분동안 인큐베이션한다. 그런 다음 세포를 신속하게 저온 완충액 (예컨대 PBS)으로 세정한 후, 적당한 용해제(예컨대 1 의 SDS 또는 1 N 의 NaOH)로 용해시킨다. 세포 용해물을 신틸레이션 카운터에서 카운팅함으로써 평가한다. 세포-결합된 방사능을 글루코오스 운반의 억제제인 시토클라신 b 의 존재하에 세포를 인큐베이션함으로써 측정된 비-특이적 결합을 뺀 후의 글루코오스 운반의 척도로 간주한다. 다른 방법으로는 예를 들면 맨체스터 등에 의해 설명된 방법이 있다 [Manchester et al., *Am. J. Physiol.* **266** (Endocrinol. Metab. **29**):E326-E333, 1994 (인슐린-자극된 글루코오스 운반)].

단백질 합성은 예를 들면 시험 세포를 ^{35}S -메티오닌과 함께 인큐베이션한 후의 ^{35}S -메티오닌-표지된 단백질의 침전을, ^{35}S -메티오닌과 추정되는 단백질 합성의 조절자와 함께 인큐베이션한 후의 표지된 단백질의 침전을 비교함으로써 평가될 수 있다.

열발생은 문헌에 소개된 방법들에 의해 평가될 수 있다 [B. Stanley in *The Biology of Neuropeptide Y and Related Peptides*, W. Colmers and C. Wahlestedt (eds.), Humana Press, Ottawa, 1993, pp. 457-509; C. Billington et al., *Am. J. Physiol.* **260**:R321, 1991; N. Zarjevski et al., *Endocrinology* **133**:1753, 1993; C. Billington et al., *Am. J. Physiol.* **266**:R1765, 1994; Heller et al., *Am. J. Physiol.* **252**(4 Pt 2): R661-7, 1987; 및 Heller et al., *Am. J. Physiol.* **245**(3): R321-8, 1983]. 또한 다양한 기법에 의해 측정될 수 있는 대사 속도는 열발생의 간접적인 척도이다.

산소 활용은 헬러 등에 의해 설명된 대로 평가될 수 있다 [Heller et al., *Pflugers Arch* **369**(1):55-9, 1977]. 이 방법은 또한 시상하부의 온도와 대사로 인한 열 발생의 분석을 포함한다. 산소 활용 및 열조절은 또한 사람에게서 하스켈 등에 의해 설명된 바와 같이 평가되었다 [Haskell et al., *J. Appl. Physiol.* **51**(4):948-954, 1981].

zFGF-5 폴리펩티드는 또한 zFGF-5 에피토프, 펩티드 또는 폴리펩티드에 특이하게 결합하는 항체를 제조하기 위해 사용될 수 있다. 다클론성 및 단클론성 항체들은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다 [예를 들면, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor, NY, 1989; 및 Hurrell, J. G. R., Ed., *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982]. 당업자에게는 명백한 바와 같이 다클론성 항체들은 다양한 온혈동물, 예컨대 말, 소, 염소, 양, 개, 닭, 토끼, 마우스, 및 쥐로부터 생성될 수 있다.

zFGF-5 폴리펩티드의 면역원성은 보조제, 예를 들면 알룸 (수산화 알루미늄) 또는 프로이트 완전 또는 불완전 보조제의 사용을 통하여 증가될 수 있다. 면역화에 유용한 폴리펩티드로는 또한 융합 폴리펩티드, 예컨대 zFGF-5 또는 그것의 일부 분과 면역글로불린 폴리펩티드와의 또는 말토오스 결합 단백질과의 융합물이 있다. 폴리펩티드 면역원은 전체 길이의 분자 또는 그것의 부분일 수 있다. 만약 폴리펩티드 부분이 "합텐-형" 이라면, 그러한 부분은 면역화를 위해 거대분자 담체 (예컨대 키호울 림펩 헤모시아닌 (KLH), 소혈청 알부민 (BSA) 또는 파상풍 유독소)에 유익하게 결합 또는 연결될 수 있다.

본원에서 사용되는 용어 "항체" 는 다클론성 항체, 친화성-정제된 다클론성 항체, 단클론성 항체, 및 항원-결합 단편, 예컨대 F(ab)'_2 및 Fab 단백질분해성 단편들을 포함한다. 유전공학적으로 처리된 무상 항체 또는 단편들, 예컨대 키메라 항체, Fv 단편, 단일 사슬 항체 등과, 합성 항원-결합 펩티드 및 폴리펩티드도 또한 "항체" 에 포함된다. 비-사람 항체는 단지 비-사람 CDR 만을 사람 뼈대 및 불변하는 영역에 이식함으로써 또는 전체의 비-사람 가변 도메인을 통합시킴으로써 인간화될 수 있다 (임의로 노출된 잔기를 대체시킴으로써 사람-유사 표면으로 그것들을 "은폐" 하는 것은 결과적으로 "겉치레" 항체가 초래된다). 어떤 경우에, 인간화된 항체는 사람 가변 영역 뼈대 도메인내에서 적절한 결합 특성을 증강시키기 위하여 비-사람 잔기를 보유할 수도 있다. 항체의 인간화를 통하여, 생물학적 반감기가 증가될 수 있으며, 사람에게 투여될 때

역면역 반응에 대한 가능성이 감소된다. 본원에 유용한 항체를 생성하고 선택하기 위한 대체 기법으로는 시험관내에서 펩 프구를 zFGF-5 단백질 또는 펩티드에 노출시키는 것과, 파지 또는 유사한 벡터에서 항체를 나타내는 라이브러리를 선택하는 것 (예를 들면 고정된 또는 표지된 zFGF-5 단백질 또는 펩티드의 사용을 통하여)이 있다.

항체는 만약 그것들이 zFGF-5 폴리펩티드에 $10^6 M^{-1}$ 또는 그 이상, 바람직하게는 $10^7 M^{-1}$ 또는 그 이상, 보다 바람직하게는 $10^8 M^{-1}$ 또는 그 이상, 가장 바람직하게는 $10^9 M^{-1}$ 또는 그 이상의 결합 친화성(K_d)으로 결합한다면 특이적으로 결합하는 것으로 규정된다. 항체의 결합 친화성은 당업자에 의해 쉽게 측정될 수 있다 (예를 들면, Scatchard 분석에 의하여).

당업자에게 공지되어 있는 다양한 검정법들은 zFGF-5 단백질 또는 펩티드에 특이하게 결합하는 항체들을 검출하기 위하여 활용될 수 있다. 예시적인 검정법은 문헌에 상세하게 설명되어 있다 [Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988]. 그러한 검정법의 대표적인 실례로는 다음과 같은 것들이 있다: 동시적인 면역 전기영동법, 방사성 면역검정법, 방사성면역-침전법, 효소-결합된 면역흡착 검정법 (ELISA), 돛트 블롯 또는 웨스턴 블롯 검정법, 억제 또는 경합 검정법, 및 샌드위치 검정법. 또한, 항체들은 야생형 대 돌연변이 zFGF-5 단백질 또는 펩티드에 대한 결합에 대하여 스크린될 수 있다.

zFGF-5 에 대한 항체들은 zFGF-5 를 발현하는 세포들에 꼬리표를 달기 위하여; 다른 단백질, 작은 분자 또는 화학약품을 심장 조직에 표적화하기 위하여; 친화성 정제에 의하여 zFGF-5 를 단리하기 위하여; zFGF-5 폴리펩티드의 순환하는 수준을 측정하기 위한 진단용 검정을 위하여; 숨겨져 있는 병리학 또는 질병의 마아카로서 가용성 zFGF-5 를 검출 또는 정량하기 위하여; FACS 를 사용하는 분석 방법에서; 발현 라이브러리를 스크리닝하기 위하여; 항-이디오타입 항체를 생성시키기 위하여; 및 시험관내 및 생체내에서 zFGF-5 중재 증식을 차단하기 위한 길항제로서 또는 중화시키는 항체로서 사용될 수 있다. 적당한 직접적인 꼬리표 또는 표지로는 방사성 핵종, 효소, 기질, 보조인자, 억제제, 형광 마아커, 화학발광 마아커, 자기 입자 등이 있으며; 간접적인 꼬리표 또는 표지는 비오틴-아비딘 또는 다른 상보물/항-상보물 쌍을 중간체로서 사용하는 것을 특징으로 한다. 본원에서 항체는 또한 직접적으로 또는 간접적으로 약물, 독소, 방사성 핵종 등에 포함될 수 있으며, 이들 포함체는 생체내에서 진단용으로 또는 치료용으로 사용된다.

본 발명의 분자들은 심장의 심근 증식에 포함된 수용체를 확인하고 단리하기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 단백질 및 펩티드들은 칼럼위에 고정되고 그 칼럼위를 막 체제가 지나갈 수 있다 [Immobilized Affinity Ligand Techniques, Hermanson et al., eds., Academic Press, San Diego, CA, 1992, pp.195-202]. 단백질 및 펩티드들은 또한 방사성표지되거나 [Methods in Enzymol., vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutsher, ed., Acad. Press, San Diego, 1990, 721-737] 또는 광친화성으로 표지될 수 있고 [Brunner et al., Ann. Rev. Biochem. 62:483-514, 1993 및 Fedan et al., Biochem. Pharmacol. 33:1167-1180, 1984], 특이한 세포-표면 단백질이 확인될 수 있다.

길항제는 근세포, 섬유아세포 및 내피 세포를 포함하여 심장 세포, 조골세포 및 크론드로사이트와 같은 유형의 세포에서 zFGF-5 분자의 증식성 활성을 억제하는데 유용하다. zFGF-5 폴리펩티드 결합 도메인을 코드화하는 유전자들은 파지상에 (파지 디스플레이) 또는 대장균과 같은 박테리아상에 디스플레이된 무작위 펩티드 라이브러리를 스크리닝함으로써 얻어질 수 있다. 폴리펩티드를 코드화하는 뉴클레오티드 서열은 많은 방법들, 예컨대 무작위 돌연변이 생성을 통하여 및 무작위 폴리뉴클레오티드 합성을 통하여 얻어질 수 있다. 이들 무작위 펩티드 디스플레이 라이브러리들은 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있는 공지된 표적, 예컨대 리간드 또는 수용체, 생물학적 또는 합성 거대분자, 또는 유기 또는 무기 물질과 상호작용하는 펩티드들을 스크리닝하기 위하여 사용될 수 있다. 그러한 무작위 펩티드 디스플레이 라이브러리를 제작하고 스크리닝하기 위한 기법들은 당해 기술분야에 공지이며 [Ladner et al., 미국 특허 제 5,223,409 호; Ladner et al., 미국 특허 제 4,946,778 호; Ladner et al., 미국 특허 제 5,403,484 호 및 Ladner et al., 미국 특허 제 5,571,698 호], 무작위 펩티드 디스플레이 라이브러리 및 그러한 라이브러리를 스크리닝하기 위한 키트는 예를 들면 Clontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) 및 Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ) 로부터 구입할 수 있다. 무작위 펩티드 디스플레이 라이브러리는 본원에 개시된 zFGF-5 서열을 사용하여 zFGF-5 에 결합하는 단백질을 확인하기 위하여 스크리닝될 수 있다. zFGF-5 폴리펩티드와 상호작용하는 이들 "결합 단백질"은 세포를 표적화하기 위하여; 친화성 정제에 의하여 상동체 폴리펩티드를 단리하기 위하여 사용될 수 있으며; 직접적으로 또는 간접적으로 약물, 독소, 방사성 핵종 등에 포함될 수 있다. 이들 결합 단백질들은 또한 예컨대 발현 라이브러리를 스크리닝하고 활성을 중화시키는 것과 같은 분석 방법에 사용될 수 있다. 결합 단백질들은 또한 폴리펩티드의 순환하는 수준을 측정하기 위한 진단용 검정을 위해; 숨어 있는 병리학 또는 질병의 마아카로서 가용성 폴리펩티드를 검출 또는 정량하기 위하여 사용될 수 있다. 이들 결합 단백질들은 또한 시험관내 및 생체내에서 zFGF-5 결합 및 신호 변환을 차단하기 위한 zFGF-5 "길항제" 로서도 작용할 수 있다. 이들 항-zFGF-5 결합 단백질들은 결과적으로 증식 또는 분화를

조래하는 유전자의 발현을 억제하는데 유용할 것이다. 그러한 항-zFGF-5 결합 단백질들은 예를 들면 횡문근육종, 심장 점액종, 조골세포 기원의 뼈 암, 및 소인증, 관절염, 결찰부 및 연골부 회복의 치료를 위하여 단독으로 또는 다른 치료법과 조합되어 사용될 수 있다.

본 발명의 분자들은 심장 조직 세포, 예컨대 심근세포 또는 심장의 근아세포, 골격 근세포 또는 근아세포 및 평활근세포; 크론드로사이트; 내피 세포; 함지방세포 및 조골세포의 시험관내 증식에 유용할 것이다. 예를 들면, 본 발명의 분자들은 규정된 세포 배양 배지의 성분으로서 유용하며, 단독으로 또는 다른 사이토킨들 및 호르몬들과 조합되어 통상적으로 세포 배양에 사용되는 혈청을 대신하여 사용될 수 있다. 본 발명의 분자들은 특히 배양중의 근세포의 성장 및/또는 발생을 특이적으로 촉진시키는데 유용하며, 또한 심근세포의 과형성 및 재생의 연구에 유용한 것으로 증명될 수 있다.

본 발명의 폴리펩티드, 핵산 및/또는 항체들은 심근 경색, 울혈성 심장 장애, 비만성 심근증 및 팽창된 심근증과 관련된 장애들의 치료에 사용될 수 있다. 본 발명의 분자들은 또한 심장 충격후의 경색의 크기를 제한하고, 안지오플라스티(angiotomy) 또는 동맥내막 절제술 이후의 맥관신생 및 상처 치유를 촉진하기 위하여, 관상동맥에 평행한 순환을 개발하기 위하여, 논의 재혈관신생을 위하여, 당뇨병 발의 궤양과 같은 불량한 순환과 관련된 합병증을 위하여, 스트로크를 위하여, 약리학적 방법들을 사용한 관상동맥의 재관류후에 및 맥관신생이 유익한 경우의 다른 징후에 유용할 수 있다. 본 발명의 분자들은 심근세포의 신생 및/또는 과형성을 유도함에 의해, 관상동맥에 부수적인 형성을 유도함에 의하여, 또는 과사성 심근 영역의 재구성을 유도함에 의하여 심장 기능을 개선하는데 유용할 것이다. 본 발명에 대한 다른 치료적 용도로는 골격 근육 신생 및/또는 과형성의 유도, 신장 재생 및/또는 전신성 및 폐성 고혈압의 치료가 있다.

zFGF-5 유도된 관상동맥에 부수적인 발생은 토끼, 개 또는 돼지에서 만성 관상동맥 폐색 모델을 사용하여 측정된다 [Landau et al., Amer. Heart J. 29:924-931, 1995; Selke et al., Surgery 120(2):182-188, 1996 및 Lazarous et al., 1996, 상기동일]. 스트로크를 치료하기에 유익한 zFGF-5는 생체내에서 좌우대칭의 경동맥 폐색을 활용하여 조직학적 변화와, 뿐만 아니라 메이즈 (maze) 성능을 측정함으로써 시험된다 [Gage et al., Neurobiol. Aging 9:645-655, 1988]. 고혈압에서의 zFGF-5 효력은 생체내에서 전신성 고혈압에 대하여 자연발생적인 고혈압 쥐 (SHR)를 활용하여 시험된다 [Marche et al., Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl. 1:S114-116, 1995].

본 발명의 분자들은 제제 또는 약물의 전달을 심장을 향하여 표적화하기 위하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 분자들은 심장에 대한 발현을, zFGF-5 프로모터에 의해 특정된 조직 특이적 발현에 의하여 제한하는데 유용할 것이다. 예를 들어, 심장-특이적 발현은 zFGF-5-아데노바이러스성 디스시스트론성 (discistrionic) 구성물을 사용하여 이루어질 수 있다 [Rothman et al., Gene Therapy 3:919-926, 1996]. 또한, zFGF-5 폴리펩티드는 zFGF-5 상동체 폴리펩티드로 구성된 첫 번째 분자를 두 번째 제제 또는 약물과 결합시켜서 키메라를 형성시킴에 의해 zFGF-5 폴리펩티드를 다른 단백질에 결합시킴으로써 [Franz et al., Circ. Res. 73:629-638, 1993] 다른 제제 또는 약물을 심장에 제한시키는데 사용될 수 있다. 단백질, 예컨대 항체가 본 발명의 zFGF-5 분자와 함께 키메라를 형성시키는데 사용될 수 있다 [Narula et al., J. Nucl. Cardiol. 2:26-34, 1995]. 제제 또는 약물의 실례로는, 그것들에만 한정되는 것은 아니지만, 생체내에서 활성을 나타내는 폴리펩티드, 유전자, 독소, 방사성 핵종, 작은 분자의 조제약 등이 있다. 결합은 직접적일 수도 있고 간접적일 수도 있으며 (예컨대 리포솜), 재조합 수단, 화학적 연결, 강력한 비-공유 상호작용 등에 의하여 일어날 수 있다.

본 발명의 한 구체예에서, zFGF-5 단백질을 포함하는 조성물이 조골세포-중재된 뼈 형성을 증가시키기 위한 치료제로서 사용된다. 본 발명의 조성물 및 조성물을 사용하는 방법들은 뼈 결합 및 결핍증, 예컨대 폐쇄된, 개방된 및 연합되어 있지 않은 골절의 회복을 촉진시키기 위하여; 성형 수술에서 뼈 치유를 촉진시키기 위하여; 결합되지 않은 보철 결합부 및 치과 이식편안으로 뼈의 내부성장을 자극하기 위하여; 치근막 질병 및 결합의 치료에; 산만한 골형성중에 뼈 형성을 증가시키기 위하여; 그리고 조골세포 활성의 자극에 의하여 치료될 수 있는 다른 골격 장애, 예컨대 골다공증 및 관절염의 치료에 적용될 수 있다. 본 발명에 의해 제공된 새로운 뼈 형성은 뼈의 선천성, 외상으로 인해 유도된, 종양학적 절제 (resection)의 회복에 또는 방사선으로 인해 유도된 뼈의 괴사가 일어난 후에 뼈를 치유하는데 사용될 것이다 [Hart et al., Cancer 37:2580-2585, 1976]. 본 발명의 방법은 또한 성형 수술에도 사용될 수 있다.

약학적으로 사용되기 위하여, 본 발명의 단백질은 종래 방법을 따라 비경구, 특히 정맥내 또는 피하 투여를 위해 제형된다. 정맥내 투여는 한 시간 내지 여러 시간의 전형적인 기간에 걸친 거환 주사 또는 주입에 의한 투여가 될 것이다. 일반적으로, 약학적인 제형에는 zFGF-5 단백질이, 약학적으로 허용되는 부형제, 예컨대 식염수, 완충된 식염수, 물중의 5의 텍스트로스 등과 조합되어 포함될 것이다. 제형은 또한 추가로 하나 또는 그 이상의 부형제, 보존제, 용해제, 완충제, 바이알 표면상에서 단백질의 손실을 방지하기 위한 알부민, 등을 포함할 수 있다. 제형 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 문헌에도 기재되어 있다 [예를 들면, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton PA, 1990]. 치료적 용량은 일반적으로 1 일당 환자의 체중 1 kg 당 0.1 내지 100 μ g의 범위, 바람직하게는 0.5 내지 20 μ g/kg/1 일이며, 정확한 용량은 허용되는 표준에 따라 치료될 질환의 성질 및 심각도, 환자의 특징, 등을 고려하여

담당 임상 의사에 의해 결정된다. 용량의 결정은 당해 기술분야의 통상적인 기술 수준내에 있다. 단백질은 급성 치료를 위해, 1 주 또는 그것보다 짧은 시간에 걸쳐서, 때로는 1 일 내지 3 일의 기간에 걸쳐 투여될 수 있으며, 또는 만성 치료에 여러 달 또는 여러 해에 걸쳐 투여될 수도 있다. 일반적으로, zFGF-5 의 치료적으로 유효한 양은 근세포 증식, 심장 기능, 근세포, 조골세포 및 크론드로사이트에 대한 간엽성 간세포 및 선구세포와 관련된 특이한 세포 유형에서의 뼈 형성 또는 증가에서 임상적으로 상당한 변화를 생성하기에 충분한 양이다. 특히, 근세포 또는 근세포 선구세포의 수의 임상적으로 상당한 증가는, zFGF-5 분자를 투여하기 전 및 후의 좌심실의 분출량을 측정하고, 총 분출량의 최소한 5 의 증가, 바람직하게는 10 또는 그 이상의 증가를 측정함으로써 측정될 수 있다. 분출량을 측정하기 위한 시험은 박동당 분출되는 혈액에 의해 측정되고, 당업자에게는 잘 알려져 있는 시험이다.

본 발명을 하기의 비-제한적인 실시예에 의하여 추가로 예시하기로 한다.

실시예

실시예 1 : EST 서열의 팽창

성장 인자에 대한 의문사항을 이용하여 번역된 DNA 데이터베이스를 스캐닝한 결과, FGF 패밀리의 새로운 구성원일 것으로 발견된 발현된 서열 꼬리표 (EST) 서열을 확인하였고, 그것을 zFGF-5 로 표시하였다.

발현된 서열 꼬리표 (EST)의 서열로부터 올리고뉴클레오티드 프라이머들 ZC11,676 (SEQ ID NO: 3) 및 ZC11,677 (SEQ ID NO: 4) 을 디자인하였다. 프라이머를 EST 내에서 내부적으로 프라이밍하는데 사용하였고, 그 때 PCR 을 중합효소 사슬 반응 (PCR)의 주형으로서 성인의 심장 조직으로부터 얻은 MARATHON READY cDNA (Clontech, Palo Alto, CA)를 사용하여 수행하였다.

PCR 에 사용된 조건들은 94 °C 에서 90 초동안 1 사이클, 94 °C 에서 15 초동안 35 사이클; 68 °C 에서 1 분; 72 °C 에서 10 분동안 1 사이클 및 4 °C 인큐베이션 주기였다. PCR 반응으로 EST 서열의 160 bp 가 재생되었고, EST 서열이 정확하다는 것을 확인하였다.

올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 증폭될 수 있는 다른 라이브러리들로는 골격의 근육, 폐, 위, 소장 및 갑상선이 있다.

실시예 2 : 조직 분포

Clontech (Palo Alto, CA) 로부터 얻은 사람 다중 조직 블롯을 사용하여 노던 블롯팅을 수행하였다. 실시예 1 에서 설명한 160 bp 의 DNA 단편을 1 의 아가로오스 겔상에서 전기영동시키고, 단편을 전기용출시킨 후, 랜덤 프라이밍 MEGAPRIME DNA 표지화 시스템 (Amersham, Arlington Heights, IL)을 사용하여 제조업자의 지시에 따라 방사능으로 표지하였다. 프로브를 NUCTRAP 푸쉬 칼럼 (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA)을 사용하여 정제하였다. EXPRESSHYB (Clontech, Palo Alto, CA) 용액을 예비혼성화를 위하여, 그리고 노던 블롯에 대한 혼성화 용액으로서 사용하였다. 혼성화는 밤새 68 °C 에서 일어났으며, 그런 다음 블롯을 2×SSC 및 0.05 의 SDS 중에서 RT 에서 세척한 후, 0.1×SSC 및 0.1 의 SDS 중에서 50 °C 에서 세척하였다. 단일한 밴드를 대략 2.0 kb 에서 관찰하였다. 신호 강도는 성인의 심장에 대해 가장 높았고, 골격 근육 및 위에서 상대적으로 덜 강한 신호가 나타났다.

실시예 3 : zFGF-5 의 시험관내 활성화에 대한 검정

A.

zFGF-5 의 유사분열 촉진 활성을 일차 배양물로부터 얻은 셀라인과 세포를 사용하여 검정한다. 재조합 단백질 및/또는 정제된 단백질을 발현하는 세포로부터 조절된 배지를 다음의 셀라인의 배양물에 첨가한다: NIH 3T3 섬유아세포 (ATCC No. CRL-1658), CHH-1 연어 심장 세포 (ATCC No. CRL-1680), H9c2 쥐 심장 근아세포 (ATCC No. CRL-1446), 시오노기 유방 암종 세포 (Tanaka et al., 1992, 상기 동일) 및 LNCaP.FGC 선암 세포. zFGF-5 의 증식성 활성을 시험하기 위해 유용한 새롭게 단리된 세포로는 다음과 같은 것들이 있다: 심장의 섬유아세포, 심근세포, 골격의 근세포 및 사람 태줄 정맥 내피 세포.

유사분열 촉진 활성을 라이네스와 로스의 방법을 토대로 하여 ³H-티미딘 통합을 측정함으로써 검증한다 [Raines and Ross, *Meth. Enzymology* 109:749-773, 1985]. 간단히 설명하면, 정지 상태의 세포는 적절한 배지중에 3×10⁴ 세포/ml 의 밀도로 플레이트된 세포이다. 전형적인 성장 배지는 10 의 우태아혈청 (FCS)을 함유하고 있는 돌베코 성장 배지 (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD)이다. 세포를 96-웰 플레이트에서 배양하고 3 내지 4 일동안 성장시켰다. 성장 배지를 제거하고, 0.1 의 FCS 를 함유하고 있는 DFC 를 180 μl 씩 각 웰에 첨가한다 (하기 표 5). 웰중 절반에는 zFGF-5 단백질을 첨가하였고, 나머지 반에는 zFGF-5 가 없는 음의 대조표준으로 하였다. 세포를 3 일까지의 시간동안 37 °C 에서 5 의 CO₂ 중에서 인큐베이션하고, 배지를 제거한다. 0.1 의 FCS 및 2 μCi/ml 의 H-티미딘을 함유하고 있는 100 μl 의 DFC 를 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 추가로 1 내지 24 시간동안 37 °C 에서 인큐베이션한다. 배지를 흡인 제거하고, 150 μl 의 트립신을 각 웰에 첨가한다. 플레이트를 37 °C 에서 세포가 떨어질 때까지 인큐베이션한다 (최소한 10 분동안). 떨어진 세포를 LKB Wallac 1295-001 세포 수득기 (LKB Wallac, Pharmacia, Gaithersburg, MD)를 사용하여 필터상에 수득한다. 필터를 마이크로파 오븐에서 10 분동안 가열함으로써 건조시키고, LKB 베타플레이트 1250 신틸레이션 카운터 (LKB Wallac)에서 공급자에 의해 설명된 바와 같이 카운트한다.

[표 5]

250 ml 의 돌베코 변형 이글스 배지 (DMEM, Gibco-BRL)
250 ml 의 햄(Ham's) F12 배지 (Gibco-BRL)
0.29 mg/ml 의 L-글루타민 (Sigma, St. Louis, MO)
1 mM 의 피루브산 나트륨 (Sigma, St. Louis, MO)
25 mM 의 HEPES (Sigma, St. Louis, MO)
10 μg/ml 의 페투인 (fetuin)(Aldrich, Milwaukee, WI)
50 μg/ml 의 인슐린 (Gibco-BRL)
3 ng/ml 의 셀레늄 (Aldrich, Milwaukee, WI)
20 μg/ml 의 트란스페린 (JRHE, Lenexa, KS)

B.

태어난지 1 일 된 신생 마우스로부터 심장을 단리한 후, 브랜드 등의 프로토콜을 따라 반복적인 콜라게나제 소화에 의해 파괴하였다 [Brand et al., *J. Biol. Chem.* 268:11500-11503, 1993]. 각각의 근세포를 퍼콜 구배상에서 단리하여 2 ml 씩을 0.5×10⁶ 세포/ml 의 밀도로 6 웰 조직 배양 접시에 플레이팅하였다. 3 일이 지난후, 웰을 칼슘 또는 마그네슘이 없는 PBS 로 3 회 세척하고, 1 ml 씩의 혈청이 없는 배지를 다시 공급하였다 (표 6). 웰을 웰당 10¹¹ 입자의 AdCMV-zFGF5 로 또는 대조표준으로서 AdCMV-GFP (녹색의 형광 단백질)로 접종한 후, 37 °C 에서 8 시간동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 웰을 다시 칼슘 또는 마그네슘이 없는 PBS 로 3 회 세척한 후, 2 ml 씩의 혈청이 없는 배지를 다시 공급하였다.

AdCMV-zFGF5 로 접종한 후 48 시간 이내에 배양된 근세포는 박동을 멈추었으며 형태학적인 변경이 진행된 반면, AdCMV-GFP 로 접종된 웰은 자연스럽게 박동을 계속하였고 접종에 의해 형태학적으로도 영향을 받지 않았다. AdCMV-zFGF5로 접종된 웰은 또한 48 시간후에 고착하는 근세포층의 집밀도에 어떠한 손실도 없이 생육가능하고 비-고착성인 세포의 집밀층을 함유하고 있었고, 이것은 배양된 쥐과 동물의 근세포에 대한 AdCMV-zFGF5 의 증식성 활성을 나타낸다.

[표 6]

햄 영양 혼합물 F12 (Gibco-BRL; DMEM 과 1:1 혼합물)
17 mM 의 NaHCO ₃ (Sigma)
2 mM 의 L-글루타민 (Sigma)
1 의 PSN (Sigma)
1 μg/ml 의 인슐린
5 μg/ml 의 트란스페린

1 nM 의 LiCl (Sigma)
1 nM 의 셀레니움
25 μ g/ml 의 아스코르브산 (Sigma)
1 nM 의 티록신 (Sigma)

C.

하기 실시예 9A 에서 설명되는 바와 같고 하기 실시예 10 에서 설명되는 바와 같이 정제되는 말토오스 결합 단백질 (MBP) 에 용해된 zFGF-5 를 0.1 ng/ml 의 농도로 근세포 (실시예 3B)에 첨가하였다. MBP-zFGF5 는 근세포의 증식을 또한 자극하는 것으로 나타났다.

실시예 4 : zFGF-5 의 생체의 활성의 검정

심장의 유사분열 촉진은 전체 심장을 신생 또는 생후 8 주된 마우스 또는 쥐로부터 제거함으로써 생체의에서 측정한다. 절출된 심장을 조클릭 배지 (Joklik's medium, Sigma, St. Louis, MO) 또는 돌베코 배지에 37 °C, 5 의 CO₂ 에서 4 내지 24 시간동안 놓아둔다. 인큐베이션 기간중에 zFGF-5 폴리펩티드를 1 pg/ml 내지 100 μ g/ml 의 농도 범위로 첨가한다. 음의 대조표준은 완충액만을 사용한다. ³H-티미딘을 첨가하고 샘플을 1 내지 4 시간동안 인큐베이션한 후, 심장을 절개하여 유사분열촉진을 방사선 사진에 의하여 측정한다. 절개된 부분들을 사용하여 핵/세포질 부피를 측정하기 위한 조직형태를 측정한다 [McLaughlin, *Am. J. Physiol.* 271:R122-R129, 1996].

또는 달리, 심장을 동결건조시키고 1 ml 의 0.1 N NaOH 에 재현탁시켰다. DNA 를 빙냉 10 의 트리클로로아세트산 (TCA)을 사용하여 침전시켰다. 상층액을 9 ml 의 신틸레이션 액에 첨가하여 비-특이적인 ³H-티미딘 통합을 측정하였다. 그 결과의 펠릿을 1 ml 의 BTS-450 조직 용해제 (Beckman, Fullerton, CA)에 재현탁시켜서 그것을 9 ml 의 신틸레이션 액에 첨가하여 ³H-티미딘의 특이한 통합을 측정하였다.

좌우 심실을 생후 1 일된 CD-1 마우스들 (Jackson Labs, Bar Harbor, ME)로부터 단리하여 4 시간동안 3 ng/ml 의 zFGF5Hep2 (n=13; 실시예 10 참조) 또는 대조표준 (n=10)과 함께 인큐베이션하였다. ³H-티미딘을 1 시간동안 첨가하였다. 심실들을 여러번 세척한 후, 1 ml 의 조클릭 배지중에서 균등화하였다. 그 결과의 균등물을 9 ml 의 신틸레이션 카테일 에 첨가하고 총 ³H-티미딘 흡수 및 DNA 통합에 대해 분석하였다.

zFGF5-Hep2 는 대조표준의 2.068±0.489 배 만큼 ³H-티미딘 흡수와 DNA 로의 통합을 증가시켰고, 이것은 zFGF5 가 심장 세포에 대한 유사분열 촉진물질임을 나타낸다.

실시예 5 : zFGF-5 의 생체내 활성에 대한 검정

zFGF-5 의 증식 효과를 생후 2 주된 쥐 및/또는 2 달된 성숙한 쥐를 사용하여 생체내에서 검정한다. 쥐들에게 복강내로 급성 또는 만성적으로 주사한다.

A.

신생 쥐들을 zFGF-5 로 1 내지 14 일동안 50 ng/일 내지 100 μ g/일의 용량 범위에 걸쳐서 처리한다. 처리후 zFGF-5- 대 모조-처리된 동물들의 효과를 심장 중량의 증가, 생체내 및 생체의 좌심실 기능의 개선, 및 세포질 부피 분획에 대한 심장의 핵의 증가에 의해 평가한다 (상기의 것들은 조직형태계측학적으로 측정된다).

B.

만성 카테콜아민 주입에 의해, 관상동맥의 결찰에 의해 유도된 심근증에 걸려 있는 쥐들 또는 시리아산 심근증에 걸려 있는 햄스터 [Sole et al., *Amer. J. Cardiol.* 62(11):20G-24G, 1988]와 같은 심근증의 모델용 쥐들을 또한 사용하여 심장 기능 및 조직에 미치는 zFGF-5 의 효과를 평가한다.

카테콜아민을 사용하여 심근증을 유도하기 위하여, 생후 7 주 내지 8 주된 쥐들에게 2 주동안 지속적으로 에피네프린을, 어깨 견갑골 사이에 피하 이식된 삼투압 미니펌프를 통하여 주입한다. 에피네프린 주입 결과, 좌심실의 섬유질 병변 스코아가 0.005 ± 0.005 에서 2.11 ± 0.18 로 (스케일 0-3) 증가하였고; 좌심실의 근세포 폭이 $17.36 \pm 0.46 \mu\text{m}$ 에서 $23.05 \pm 0.62 \mu\text{m}$ 로 증가하였으며; 이소프로테레놀에 대한 좌심실 유두 근육의 수축성 반응은 무시할 정도였다 (식염수를 주입한 쥐와 비교하여 0.2 대 1.1 g 의 장력임). 2 주동안의 처리기간이 지난후, 쥐들에게 복강내로 매일 부형제, zFGF-5, bFGF, IGF-I 또는 IGF-II 를 14 일까지의 기간동안 주사한다. 그런 다음 쥐들을 희생시켜서 조직형태계측 및 조직적 세포 화학을 수행한다.

상술된 바와 같이 처리된 쥐들을 또한 카테콜아민 처리가 끝날 때 평가하고, 다시 성장 인자 처리후에 평가하여, 심장의 재생을 좌심실 섬유질 병변 스코아의 감소, 근세포 폭의 감소 및 이소프로테레놀에 대한 좌심실 유두의 수축성 반응의 증가로서 측정한다.

실시예 6 : zFGF-5 의 염색체 지도

zFGF-5 를 Genome Research's "GeneBridge 4 Radiation Hybrid Panel" (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL) 을 위한 화이트헤드 인스티튜트/MIT 센터의 시판중인 버전을 사용하여 염색체 5 에 대해 지도화하였다. 진브릿지 4 라디에이션 하이브리드 패널은 93 개의 방사선 하이브리드 클론들의 각각으로부터 얻어진 PCR 사용에 적당한 DNA 와, 두 개의 대조 DNA (HFL 공여체와 A23 수용체)를 포함한다. 공개적으로 활용할 수 있는 WWW 서버 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>)로 인하여, 진브릿지 4 라디에이션 하이브리드 패널을 사용하여 구성된 사람 유전자의 게놈 리서치의 방사선 하이브리드 지도 ("WICGR" 방사선 하이브리드 지도)에 대한 화이트헤드 인스티튜트/MIT 센터에 관련하여 지도화하는 것이 가능해진다.

"GeneBridge 4 RH Panel" 을 사용하여 zFGF-5 를 지도화하기 위하여, $25 \mu\text{l}$ 의 반응액을 96-웰 미소적정 플레이트 (Stratagene, La Jolla, CA)에 세팅하고, "RoboCycler Gradient 96" 열 사이클러 (cycler) (Stratagene)에서 PCR 을 위해 사용한다. 95 PCR 반응액의 각각은 $2.5 \mu\text{l}$ 의 $50 \times$ "Advantage KlenTaq Polymerase Mix" (Clontech), $2 \mu\text{l}$ 의 dNTP 믹스 (각각 2.5 mM; Perkin-Elmer, Foster City, CA), $1.25 \mu\text{l}$ 의 센스 프라이머, ZC11,677 (SEQ ID NO: 4), $1.25 \mu\text{l}$ 의 안티센스 프라이머, ZC12,053(SEQ ID NO: 5) 으로 구성된다.

각각의 하이브리드 클론으로부터 $2.5 \mu\text{l}$ 의 "RediLoad" (Research Genetics, Inc), $0.5 \mu\text{l}$ 의 "Advantage KlenTaq Polymerase mix" (Clontech Laboratories, Inc.), 25 ng 의 DNA 또는 대조표준과 ddH₂O 을 총 $25 \mu\text{l}$ 의 부피로 만든다. 반응액을 동량의 미네랄 오일로 그위에 덮고 밀봉하였다. PCR 사이클로 조건은 다음과 같았다: 4 분동안 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 초기의 1 사이클, 1 분씩 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 35 사이클, $66 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 1.5 분동안 아닐링, 및 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 1.5 분동안 팽창시킨 후, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 7 분동안 최종 1 사이클의 연장. 반응액을 3 의 NuSieve 아가로오스 겔 (FMC Bioproducts, Rockland, ME)상에서의 전기영동에 의하여 분리하였다.

그 결과, zFGF-5 는 WICGR 방사선 하이브리드 지도상에 사람 염색체 5 연쇄군의 상부로부터 541.12 cR 을 지도화하는 것으로 나타났다. 동원체와 관련하여 그것의 가장 가까운 기부쪽 마아커는 WI-16922 였고 그것의 가장 가까운 원위 마아커는 WI-14692 였다. 둘러싸고 있는 CHLC 마아커들을 사용하여 또한 CHLC 염색체 5 버전 v8c7 통합된 마아커 지도 (The Cooperative Human Linkage Center, WWW 서버 -<http://www.chlc.org/ChlcIntegratedMaps.html>)상에 5q34-q35 영역에 zFGF-5 가 위치하는 것을 도와주었다.

실시예 7 : 백에 미치는 zFGF-5 의 효과

A.

zFGF-5 에 대한 cDNA 를 함유하고 있는 아데노바이러스 벡터를 문헌의 방법을 사용하여 구성하였다 [Becker et al., *Methods in Cell Biology* 43:161-189, 1994]. 간단히 그 방법을 설명하면, zFGF-5 에 대한 cDNA (SEQ ID NO: 1)를 pACCMV 안에 Xba I-Sal I 단편으로서 클론하였다 [Gluzman et al., *In Eucaryotic Viral Vectors*, Gluzman (eds.) pp.187-192, Cold Spring Harboe Press, Cold Spring Harbor, NY, 1982]. pACCMV 벡터는 아데노바이러스 5 게놈의 부분, CMV 프로모터 및 SV40 터미네이터 서열을 함유한다. 벡터와 cDNA 삽입물을 함유하고 있는 플라스미드를 pJM17 로 표시된, 아데노바이러스 5 게놈을 함유하고 있는 플라스미드 [McGrory et al., *Virology* 163:614-617, 1988]와 함께

293 세포 (ATCC No. CRL-1573; 아메리칸 타입 컬처 콜렉션, Rockville, MD)에 공형질전환시켜서 재조합 사건을 유도하였고, 그 결과 zFGF-5 를 함유하는 재조합 아데노바이러스가 생성되었으며, 그것을 AdCMV-zFGF5 로 표시하였다. zFGF-5 cDNA 의 존재는 PCR 에 의하여 확인하였다.

아데노바이러스 벡터 AdCMV-zFGF5 를, 마우스당 1×10^{11} 과 5×10^{11} 입자 사이의 정맥내 주사에 의하여 생체내에서 유전자 전달에 사용하였다. 정맥내 주사후에, 바이러스의 대부분은 간을 표적으로 하여 매우 효과적으로 간세포를 형질유도하였다 [Herz, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2812-2816, 1993]. 세포가 cDNA 에 의하여 코드화된 단백질을 생성하고, 분비된 단백질의 경우에는, 분비된 단백질을 순환계안으로 분비한다는 것이 증명되었다. 높은 수준의 발현 및 생리적인 사건들이 증명되었다 [Ohwada et al., Blood 88:768-774, 1996; Stevenson et al., Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 15:479-484, 1995; Setoguchi et al., Blood 84:2946-2953, 1994; and Sakamoto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:12368-12372, 1994].

생후 6 주된 CD-1 마우스 (Jackson Labs, Bar Harbor, ME)를 cDNA 삽입물을 함유하지 않았거나 (AdCMV-null) 또는 AdCMV-zFGF5 를 함유하지 않은 아데노바이러스로 꼬리 정맥을 통하여 IV 로 제공하거나 또는 복강내로(IPC) 처리하였다. 마우스당 총 5×10^{11} 바이러스 입자/100 μ l 를 주사하였다. 주사후 14 일이 지난후, 동물들을 희생시키고, 경골 및 대퇴골을 분리시키지 않고 제거하여 어떠한 잠재적인 염증 반응을 조사하였다. 뼈를 10 의 중성의 완충된 포르말린중에 고정시켜 놓고 다음 과정을 진행시켰다. 뼈를 시트르산 나트륨이 첨가된 5 의 포름산중에서 석회질을 제거하고, 물에 세척한 후, 70 내지 100 의 에탄올 시리즈에서 탈수시킨 다음, 크실렌중에서 정리한 후, 파라핀에 끼워넣었다. 이 시편들을 경골 및 대퇴골 형이상학을 통하여 수직으로 절단하고 뼈 세포를 확인하기 위하여 헤모톡실린 및 에오신으로 염색하였다. 중심의 음의 골지 영역 및 비정상적인 핵에 의하여 조골세포를 확인한 한편, 파골세포는 다핵화, 균일하지 않은 형상 및 이들 재흡수하는 세포와 관련된 하우스립 열공 (Howship's lacunae)에 의해 확인되었다.

뼈 조직형태측학에 대하여, 대퇴골 샘플을 선택하였다. 그물모양의 뼈 부피는 샘플로 선택하는 부위의 변화 때문에 측정하지 않았다 (즉, 대퇴골 샘플을 정확하게 동일한 평면에서 절개하지 않았다). 세가지의 뼈 매개변수를 조직형태측학적 변화에 대하여 평가하였다.

1. 골내막에 있는 조골세포의 수: 성장판에 대해 기부쪽으로 1.22 mm 영역에서 180 \times 배율에서 그물코모양의 뼈의 골내막 표면을 따라 측정함.
2. 골내막에 있는 파골세포의 수: 성장판에 대하여 기부쪽으로 1.22 mm 영역에서 180 \times 배율에서 그물코모양의 뼈의 골내막 표면을 따라 측정함.
3. 성장판 폭: 성장판 활성을 측정하기 위하여 말단부를 제외하고 전체 성장판을 가로질러 90 \times 배율에서 매 72 μ m 마다 측정함.

데이터 (평균 \pm SD, n=4-7/군)의 분석 결과 다음의 것들이 증명되었다:

1. 경골과 대퇴골 사이의 접합부에서는 검출가능한 염증성 반응이 없는 것으로 여겨짐.
2. 마우스에서 IV 또는 IPC 로 제공된 AdCMV-zFGF5 는 2 주후에 조사되었을 때 기부의 대퇴골 메타피시스 (metaphysis)의 조골 활성을 상당히 증가시켰다. 이 조골 활성의 자극은 다음에 의하여 나타났다:
 - a) 그것들의 관련된 벡터만으로 된 대조표준과 비교하였을 때, AdCMV-zFGF5 의 IV 주입 또는 IPC 주사후에 원위 대퇴골의 그물코모양의 뼈에서 골내막에 있는 조골세포의 수의 각각 530 및 263 로 나타나는 상당한 증가; 및
 - b) 조골세포 계대를 향한 골수 간질세포의 증가된 분화를 시사하는, 뼈 표면상의 증가된 조골조직의 관찰.
3. 골내막의 파골세포의 수는 관련된 벡터만으로 된 대조표준과 비교하였을 때, AdCMV-zFGF5 의 IV 또는 IPC 투여에 의해 유의할만하게 영향을 받지 않았다.
4. 성장판의 폭은 AdCMV-zFGF5 의 IPC 주사에 의해서가 아니라 IV 주입에 의하여 상당히 감소하였고, 이것은 IV 주입후에 성장판 활성이 감소되었음을 시사한다. AdCMV-zFGF5 투여의 차등 효과는 아직 설명되지 못하였다.

이들 결과는 zFGF-5 가 조골세포 증식의 자극을 위한 강력한 유사분열 촉진물질이고 zFGF-5 가 새로운 뼈 형성 능력을 가지고 있음을 시사한다.

B.

실시에 7.A. 에 설명된 것과 본질적으로 동일한 과정을 사용하여, 마우스당 1×10^{11} 입자의 AdCMV-zFGF5 가 주사된 암컷 CD-1 (Jackson Labs)에 대하여 QCT 를 행하였다. 마우스들을 주사후 30 일 후에 희생시켰고, 심장/경골 길이비는 대조표준 (삽입물이 없는 아데노바이러스 또는 식염수로 주사됨)과 비교하여 증가하였다. 경골 길이면에서 변화를 설명해줄 군 사이의 차이는 없었으며, 또한 군 중에 어떠한 다른 기관 중량의 차이도 없었다. 그러므로, 이것은 zFGF-5 아데노바이러스가 QCT 에 의해 측정되는 바, 총 뼈 밀도, 주 (trabecular)의 뼈 밀도, 및 대퇴골의 피질의 두께를 선택적으로 증가시킨다는 것을 나타낸다.

실시에 8 : 심장에 미치는 zFGF-5 의 효과

실시에 7.B. 에서 설명된 바와 같이, CD-1 마우스들에게 AdCMV-zFGF-5 를 1 회 IV 주사하고, 4 주후에 희생시켜서 관찰한 결과, 심장/경골의 길이비가, 삽입물이 없는 아데노바이러스 또는 식염수로 처리된 마우스들에 비교하여 증가된 것으로 나타났다. 이 결과는 이 변화를 설명해줄 경골 길이에서 군들 사이의 차이가 없었으며, 또한 군 중에서 다른 어떠한 기관의 중량에서도 차이가 없었음을 나타낸다. 이 결과는 AdCMV-ZFGF5 가 IV 아데노바이러스 구성물로서 투여될 때 심장의 성장을 선택적으로 증가시켰음을 시사한다.

실시에 9 : zFGF-5 의 발현

A. zFGF5-코드화 플라스미드의 구성

섬유아세포 성장 인자 상동체인 zFGF5 를 뉴 잉글랜드 바이오랩스 (NEB; Beverly, MA)로부터 얻은 MBP (말토오스 결합 단백질) 융합 시스템을 사용하여 대장균내에서 발현시켰다. 이 시스템에서, zFGF5 cDNA 를 malE 유전자의 3' 단부에 부착시켜서 MBP-zFGF5 융합 단백질을 형성시켰다. 융합 단백질 발현은 tac 프로모터에 의해 유도되었고; 발현은 프로모터가 1 mmol 의 IPTG (이소프로필 β-티오갈락토실피라노시드)를 첨가함으로써 유도될 때까지 "정지 (off)" 상태이다. 이 융합 단백질에 대하여 MBP로부터 zFGF5 를 이탈시키기 위한 절단 부위만이 상이한 3 가지의 변이를 만들었다. 한 구성물은 MBP 와 zFGF5 도메인 사이에 공학적으로 처리된 트롬빈 절단 부위를 가지게 되었고, 두 번째 구성물은 트롬빈 절단 부위 대신에 인자 Xa 절단 부위를 가지게 되었으며, 세 번째 구성물은 트롬빈 절단 부위 대신에 엔테로키나제 절단 부위를 가지게 되었다.

구성물들을 pMAL-c2 벡터 (NEB)의 다중 클로닝 부위에 따라, 그리고 제조업자의 지시를 따라 MBP 와의 프레임내 융합물로서 제조하였다. zFGF5 는 편리한 클로닝 부위로 도입된 프라이머와, 또한 다음의 올리고뉴클레오티드 프라이머들: 1) 트롬빈 구성물에 대해서는 zc12,652 (SEQ ID NO: 7) 및 zc12,631 (SEQ ID NO: 8); 2) 인자 Xa 구성물에 대해서는 zc15,290 (SEQ ID NO: 9) 및 zc12,631 (SEQ ID NO: 8); 그리고 3) 엔테로키나제 구성물에 대해서는 zc15,270 (SEQ ID NO: 10)과 zc12,631 (SEQ ID NO: 8)을 사용하는 프라이머를 사용하여 PCR 을 경유하여 증폭시켰다. 각각의 경우에, 천연 zFGF5 단일 서열은 증폭되지 않았으며; 발현되는 zFGF5 는 SEQ ID NO: 2 (Val 이 Ala 로 변경됨)의 아미노산 잔기 26 에서 시작한다. 트롬빈 구성물은 Xba I-Sal I zFGF5 단편을 pMAL-c2 의 Xba I-Sal I 부위에 삽입시킴으로써 제조하였다. 인자 Xa 구성물은 blunt-Sal I 단편을 MCS 의 Xmn I-Sal I 부위에 삽입시킴으로써 제조하였다. 엔테로키나제 구성물은 Xba I-Sal I 단편을 pMAL-c2 의 Xba I-Sal I 부위에 삽입시킴으로써 제조하였다. 일단 구성물이 제조되면, 그것들을 다양한 대장균 숙주 스트레인안으로 형질전환시키고 고수준의 발현에 대하여 분석하였다. 트롬빈 구성물 (pSDH90.5 로 표시함)은 DH10B 세포 (GIBCO-BRL)에 형질전환시킨 반면, 인자 Xa 구성물 (pSDH117.3 으로 표시함) 및 엔테로키나제 구성물 (pSDH116.3 으로 표시함)은 둘다 TOP10 세포 (Invitrogen, San Diego, CA)안에 형질전환시켰다. 세 개의 모든 MBP 융합물이 약 63 kD 였다 (MBP 도메인이 43 kD, zFGF5 도메인이 약 20 kD).

B. 동종 재조합/zFGF5

피치아 메타놀리카 (*Pichia methanolica*)에서의 zFGF5 의 발현은 PCT WO 97/17450 에서 설명되는 발현 시스템을 사용한다. zFGF5 를 코드화하는 폴리뉴클레오티드를 전체 또는 일부분 함유하고 있는 발현 플라스미드는 동종 재조합을 통하여 제조한다. 발현 벡터는 AUG1 프로모터, 이어서 αFpp 리더 서열, 그리고 이어서 아미노-말단 펩티드 꼬리표, 번역 중지

코돈, 이어서 AUG1 터미네이터, ADE2 선택가능한 마아커, 및 마지막으로 AUG1 3' 미번역 영역을 함유하고 있는 pCZR204로부터 제조한다. 또한 상기 벡터에는 맥주효모균에서의 선택 및 복제에 필요한 URA3 과 CEN-ARS 서열 및 대장균에서의 선택 및 복제에 필요한 Amp^R 및 colE1 ori 서열이 포함되어 있다. 이 벡터안에 삽입된 zFGF5 서열은 zFGF5 아미노산 서열의 잔기 27 (Ala)에서 시작한다.

피치아 메타놀리카에서 zFGF5 를 발현시키기 위한 벡터인 pSDH114 를 제조하기 위하여, 다음의 DNA 단편들을 맥주효모균에 형질전환시켰다: Sam I 으로 소화시켜 놓은 100 ng 의 '수용체 벡터' pCZR204; pSDH90.5로부터 자유로워지고 zFGF5 코딩 서열을 포함하고 있는 1 μ g 의 Xba I-Sal I 제한 단편; 한 쪽 단부에 aFpp 코딩 서열의 70 염기쌍이 있고, 그것이 이중 가닥 서열의 센스 가닥이 SEQ ID NO: 19 (5' 링커 서열 (aFpp → zFGF5 N-말단))에 도시되어 있는 4 개의 올리고뉴클레오티드 zc13,497 (SEQ ID NO: 11); zc15,131 (SEQ ID NO: 12); zc15,132 (SEQ ID NO: 18); zc15,134 (SEQ ID NO: 13)로부터 생성된 다른 쪽 단부에 있는 성숙한 zFGF5 서열로부터의 아미노-말단 코딩 서열의 70 염기쌍에 결합되어 있는 1 μ g 의 합성, PCR-생성된 이중 가닥의 링커 절편; 및 한 쪽 단부에 zFGF5 로부터의 카르복시말단 코딩 서열의 70 염기쌍이 있고, 그것의 이중 가닥 서열의 센스 가닥이 SEQ ID NO: 20 (3' 링커 서열 (aFGF5 C-말단 → AUG1 터미네이터))에 도시되어 있는 4 개의 올리고뉴클레오티드 zc13,529 (SEQ ID NO: 14); zc13,525 (SEQ ID NO: 15); zc13,526 (SEQ ID NO: 16); zc13,528 (SEQ ID NO: 17)로부터 생성된 AUG1 터미네이터 서열의 70 염기쌍이 포함되어 있는 1 μ g 의 합성, PCR-생성된 이중 가닥의 링커 절편. Ura⁺ 콜로니를 선택하고, 그 결과의 효모 콜로니로부터 DNA 를 추출하여 대장균에 형질전환시켰다. 정확한 발현 구성물을 은닉하고 있는 개별적인 클론들을, 올리고뉴클레오티드 zc13,497 (SEQ ID NO: 11) 및 zc13,528 (SEQ ID NO: 12) 를 사용한 PCR 스크리닝과 이어서 원하는 zFGF5 삽입물의 존재를 증명하기 위한 제한 소화 및 원하는 DNA 서열들이 서로 결합되어 있는지를 확인하기 위한 DNA 서열화에 의해 확인하였다. 보다 큰 규모의 플라스미드 DNA 를 정확한 클론들중 하나에 대하여 단리하고, DNA 를 Sfi I 로 소화하여 벡터 골격으로부터 피치아-zFGF5 발현 카세트를 이탈시켰다. 그런 다음 Sfi I-절단 DNA 를 PMAD16 으로 표시된 피치아 메타놀리카 발현 숙주안으로 형질전환시키고, 선택을 위해 ADE D 플레이트상에 놓았다. 다양한 클론들을 선택하여 고수준의 zFGF5 발현에 대하여 웨스턴 블롯을 통하여 스크린하였다.

보다 구체적으로, 작은 규모의 단백질 생성 (예컨대 플레이트 또는 진동 플라스크 생성)에 대해서는, 메탄올-조절된 프로모터 (예컨대 AUG1 프로모터)를 포함하고 있는 발현 카세트를 포함하는 피치아 메타놀리카 형질전환체를 메탄올의 존재 하에 및 간섭하는 양의 다른 탄소 공급원 (예컨대 글루코오스)이 없는 상태에서 성장시킨다. 발현 수준의 예비 스크리닝을 포함하는 작은 규모의 실험을 위해서는, 형질전환체들을 30 °C 에서 예컨대 20 g/L 의 박토-아가 (Difco), 6.7 g/L 의 아미노산이 없는 효모 질소 베이스 (Difco), 10 g/L 의 메탄올, 0.4 mg/L 의 비오틴, 및 0.56 g/L 의 -Ade-Thr-Trp 분말을 함유하고 있는 고체 배지상에서 성장시킬 수 있다. 메탄올이 휘발성 탄소 공급원이기 때문에 그것은 연장된 인큐베이션중에 쉽게 소실된다. 메탄올의 연속적인 공급은 물중의 50 메탄올 용액을 뒤집어 놓은 플레이트의 뚜껑에 놓음으로써 제공할 수 있고, 그로써 메탄올이 증발을 통한 전달에 의하여 성장하는 세포에 전달된다. 일반적으로, 100-mm 의 플레이트당 1 ml 이하의 메탄올이 사용된다. 약간 더 큰 규모의 실험들은 진동 플라스크에서 성장된 배양물을 사용하여 수행될 수 있다. 전형적인 과정으로, 세포들은 상술된 바와 같은 최소 메탄올 플레이트상에서 2 일동안 배양된 후, 콜로니들이 작은 부피의 최소 메탄올 배지 (6.7 g/L 의 아미노산이 없는 효모 질소 베이스, 10 g/L 의 메탄올, 0.4 mg/L 의 비오틴)를 약 1×10^6 세포/ml 의 세포 밀도로 접종하기 위하여 사용된다. 세포를 30 °C 에서 성장시킨다. 메탄올상에서 성장하는 세포는 높은 산소 요구량을 가지고 있기 때문에 배양중에 격렬한 진동을 필요로 한다. 메탄올은 매일 새로 보급한다 (전형적으로 1 일당 1/100 부피의 50 메탄올).

규모 배양을 제조하기 위하여, 생산율이 높은 클론들의 신선한 배양물을 진동 플라스크안에서 제조한다. 그런 다음 그 결과의 배양물을 사용하여 발효기안에서 배양 배지를 접종한다. 전형적으로, 격렬한 교반으로 1 내지 2 일동안 30 °C 에서 성장시킨 YEPD 중의 500 ml 의 배양물을 사용하여 5 리터의 발효기를 접종한다. 세포를 염, 글루코오스, 비오틴, 및 미량의 엘레먼트들을 함유하고 있는 적당한 배지에서 28 °C, pH 5.0 및 30 이상의 용해된 O₂ 중에서 성장시킨다. 글루코오스의 초기 충전량이 소모된 후에 (산소 소모량의 감소로 알 수 있음), 글루코오스/메탄올 공급물을 용기에 전달하여 관심의 단백질의 생성을 유도한다. 큰-규모의 발효가 탄소를 한정하는 조건하에서 수행되기 때문에, 공급물중의 글루코오스의 존재는 메탄올-유도성 프로모터를 억제하지 않는다.

실시예 10 : zFGF-5 의 정제

대장균 발효 배지를 말토오스 결합 단백질 용합물로서 zFGF5 를 발현하는 스트레인으로부터 얻었다 (pSDH90.5, 상술된 바와 같음). MBPzFGF5 용합물을 초음파처리 또는 프렌치 프레스로 파괴하는 중에, 20 mM 의 HEPES, 0.4 M 의 NaCl,

0.01 M 의 EDTA, 10 mM 의 DTT, pH 7.4 를 함유하고 있는 완충액을 사용하여 용해시켰다. 추출 완충액에는 또한 5 µg/ml 의 펩스타틴, 로이펙틴, 아프로티닌, 베스타틴이 포함되어 있다. 페닐 메틸 술폰닐플루오라이드 (PMSF)가 또한 0.5 mM 의 최종 농도로 포함되어 있다.

추출물을 18,000×g 에서 30 분동안 4 °C 에서 회전시켰다. 그 결과 생성된 상층액을 용합물의 MBP 도메인에 결합하는 아밀로오스 수지 (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJ)상에서 처리하였다. 칼럼을 세척할 때, 결합된 MBPzFGF5 용합물은 DTT 및 프로테아제 억제제는 없지만 10 mM 의 말토오스를 함유하고 있는 추출 완충액과 같은 완충액으로 용출되었다.

용출된 MBPzFGF5 의 푸울을 MBPzFGF5 용합물에 대하여 1:100 (w/w)의 소의 트롬빈으로 처리하였다. 절단 반응을 6 내지 8 시간동안 실온에서 진행시킨 후, 반응 혼합물을 벤즈아미딘 세파로오스 (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJ) 상 (bed) 위로 통과시켜서 아밀로오스 친화성 크로마토그래피에 대해 상술된 바와 동일한 용출 완충액을 사용하여 트롬빈을 제거하였다.

절단된 생성물 zFGF5 와 유리 MBP 도메인을 함유하고 있는 칼럼을 통과한 분획을, 0.5 M 의 NaCl, 20 mM 의 Hepes, 0.01 M 의 EDTA, pH 7.4 에서 평형화되어 있는 토소 하스 헤파린 (Toso Haas Heparin) 친화성 매트릭스 (Toso Haas, Montgomeryville, PA)에 적용하였다. MBP 와 zFGF5 는 둘다 상기 조건하에서 헤파린에 결합하였다. 결합된 단백질을 0.5 M 의 NaCl 과 2.0 M 의 NaCl 사이에 형성된 2 내지 3 칼럼 부피의 구배로 용출하였다.

MBP 는 초기에, 약 0.7 M 의 NaCl 에서 용출되었고, 절단된 zFGF5 는 약 1.3 M 의 NaCl 에서 용출되었다. zFGF5 분획들을 모아서 다시 한 번 아밀로오스 단계를 통과시킴으로써 소량의 오염물인 잔류하는 모든 MBPzFGF5 를 제거하였다. 정제된 물질을 zFGF5-Hep2 로 표시하였고, 이것은 SDS-PAGE 환원 분석시 약 20 kDa 의 단일한 고도로 순수한 종으로 나타났다.

아미노산 N-말단 서열화로 천연 N-말단 서열을 알았지만, 질량 분광측광 데이터는 C-말단이 반드시 SEQ ID NO: 2 의 잔기 196 (Lys)에서 절단되어야만 하는 것을 나타내는 분자 덩어리를 나타냈고, 이것은 "이염기성 부위" 가 존재한다는 것이다.

zFGF5 단백질은 1.3 M 의 NaCl 에서 매우 안정하다. PBS 로 투석할 때 zFGF5 는 응집하여 용액상에 남아 있었다. 그러므로, 헤파린과 다른 "다중 음이온"을 포함하는 제형들이 순수한 zFGF5 의 응집을 방지하기 위해 사용될 수 있다.

실시예 11 : 항체의 제조

zFGF5 에 대한 항체를 당해 기술분야에 공지되어 있고 앞서 설명된 표준 기법들을 사용하여, 기니아 피그, 토끼 및 마우스 들을 zFGF-1 로 표시된 펩티드 QTRARDDVSRKQLRLYC (SEQ ID NO: 2 아미노산 잔기 40 에서 잔기 56 까지); zFGF-5 로 표시된 펩티드 YTTVTKRSRIRPTHRAC (SEQ ID NO: 2 의 아미노산 잔기 191 에서 207 까지, 추가의 Cys 가 C-말단에 있음); 또는 MBP-FGF5 용합 단백질로 표시된, SEQ ID NO: 2 에 표시된 바와 같은 전 길이의 zFGF5 를 MBP 용합 단백질과 함께 사용하여 면역시킴으로써 제조하였다. 펩티드를 말레이미드-활성화된 KLH (Pierce Chemical Co., Rockford, IL)를 사용하여 Cys 잔기를 통해 포함시켰다.

하기의 표 7 은 동물, 면역화 수준 및 항체 분리를 나타낸 것이다.

[표 7]

단백질 또는 펩티드	동물	면역화 수준	생성된 항체
ZFGF5-1	기니아피그	초기: 50 µg/동물 추가: 25 µg/동물	친화성 정제되고 IgG 분획화됨
	토끼	초기: 100 µg/동물 추가: 50 µg/동물	친화성 정제되고 IgG 분획화됨
ZFGF5-2	기니아피그	초기: 50 µg/동물 추가: 25 µg/동물	친화성 정제되고 IgG 분획화됨
	토끼	초기: 100 µg/동물 추가: 50 µg/동물	친화성 정제되고 IgG 분획화됨

ZFGF5-MBP	마우스	초기: 20 μ g/동물 추가: 10 μ g/동물	
	토끼	초기: 200 μ g/동물 추가: 100 μ g/동물	친화성 정제됨

삭제

실시예 12 : ob/ob 마우스에 미치는 zFGF-5 의 효과

합지방세포 및 지방 대사에 미치는 zFGF-5 의 효과를 암컷의 ob/ob 마우스들(C57B1/6J, Jackson Labs, Bar Harbor, ME)을 사용하여 조사하였다. 마우스들은 비만이었고, 인슐린에 대해 내성이었으며, "지방질 뼈"를 가지고 있었다. 마우스들의 체중을 측정하였고, 그 결과 모두 동일한 체중이었으며, 실시예 7 에서와 같이 마우스당 10¹¹ 입자의 AdCMVzFGF-5 또는 대조표준을 위하여 식염수 또는 Ad5CMV-GEP 를 IV 로 주사하였다. 주사후 17 일이 지난후, Ad5CMV-GEP 를 주사받은 대조 마우스는 주사당일과 비교하여 5.342±0.5 g 의 체중 증가가 있는 반면, AdCMVzFGF-5 로 처리된 마우스들은 3.183±0.743 의 체중 손실이 있었다.

전술한 설명으로부터, 비록 본 발명의 특정한 구체예가 본원에서 예시를 목적으로 설명되긴 하였지만, 본 발명의 사상 및 범주로부터 벗어남이 없이 다양한 변형들이 이루어질 수 있다는 것이 인지될 것이다. 따라서, 본 발명은 첨부되는 청구의 범위에 의해서 한정되는 것을 제외하고는 한정되지 않는다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

- a) SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 82 부터 뉴클레오티드 621 까지 에 표시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드 분자;
- b) SEQ ID NO: 2 의 아미노산 잔기 28 (Glu) 부터 아미노산 잔기 207 (Ala) 까지의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코드화하는 폴리뉴클레오티드 분자; 및
- c) SEQ ID NO: 2의 아미노산 잔기 28부터 아미노산 잔기 207 까지 에 표시된바와 같은 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드 분자

로 이루어지는 군으로부터 선택된 섬유아세포 성장 인자 (FGF) 상동체 폴리펩티드를 코드화하는 단리된 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 폴리뉴클레오티드 분자가 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 82 부터 뉴클레오티드 621 까지 에 표시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열, 또는 SEQ ID NO: 2의 아미노산 잔기 28부터 아미노산 잔기 207 까지 에 표시된 바와 같은 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 단리된 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 폴리뉴클레오티드 분자가 SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 82 부터 뉴클레오티드 621 까지 에 표시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 단리된 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 4.

제 1 항에 있어서, 폴리뉴클레오티드가 DNA 인 것을 특징으로 하는 단리된 폴리뉴클레오티드 분자.

청구항 5.

전사 프로모터;

a) SEQ ID NO: 1의 뉴클레오티드 82 부터 뉴클레오티드 621 까지에 표시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드 분자;

b) SEQ ID NO: 2 의 아미노산 잔기 28 (Glu) 부터 아미노산 잔기 207 (Ala) 까지의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코드화하는 폴리뉴클레오티드 분자; 및

c) SEQ ID NO: 2의 아미노산 잔기 28부터 아미노산 잔기 207 까지에 표시된바와 같은 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드 분자로 이루어지는 균으로부터 선택된 DNA 절편; 및

전사 터미네이터

를 포함하며 이 엘레먼트들이 작동가능하게 연결되어 있는 발현 벡터.

청구항 6.

제 5 항의 발현 벡터가 그 안에 도입되어 있는 배양된 세포로서, 상기 세포가 DNA 절편에 의해 코드화된 폴리펩티드를 발현하는 것을 특징으로 하는 배양된 세포.

청구항 7.

제 5 항의 발현 벡터가 도입되어 있는 세포를 배양함으로써 상기 세포가 DNA 절편에 의해 코드화된 FGF 상동체 폴리펩티드를 발현시키는 단계; 그리고

FGF 상동체 폴리펩티드를 회수하는 단계

로 이루어지는 FGF 상동체 폴리펩티드의 제조 방법.

청구항 8.

삭제

청구항 9.

SEQ ID NO: 2의 잔기 28 (Glu) 부터 잔기 196 (Lys) 까지에 표시된 바와 같은 아미노산 서열로 이루어지는 단리된 FGF 상동체 폴리펩티드.

청구항 10.

SEQ ID NO: 2의 잔기 28 (Glu) 부터 잔기 207 (Ala) 까지에 표시된 바와 같은 아미노산 서열로 이루어지는 단리된 FGF 상동체 폴리펩티드.

청구항 11.

제 9 항 또는 제 10 항에 있어서, 추가로 신호 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 FGF 상동체 폴리펩티드.

청구항 12.

제 9 항 또는 제 10 항에 있어서, 추가로 아미노산 잔기 1 (Met) 부터 아미노산 잔기 27 (Ala) 까지의 SEQ ID NO: 2 에 표시된 바와 같은 신호 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 FGF 상동체 폴리펩티드.

청구항 13.

약학적으로 허용되는 담체와 조합하여 제 9 항 또는 제 10 항의 정제된 FGF 상동체 폴리펩티드로 구성되는, 심장병, 심근 경색, 울혈성심부전증, 비대심장근육병증, 뇌중풍, 전신성 또는 폐동맥 고혈압, 뼈결손증, 뼈골절, 치주병, 골다공증 및 관 절염 치료용 약학 조성물.

청구항 14.

SEQ ID NO: 2의 잔기 1 (Met) 부터 잔기 207 (Ala) 까지에 표시된 바와 같은 아미노산 서열로 구성되는 폴리펩티드에 대한 단일클론 항체.

청구항 15.

제 14 항에 있어서, 잔기 28 (Glu) 부터 잔기 196 (Lys) 까지의 SEQ ID NO: 2 에 표시된 바와 같은 아미노산 서열로 구성 되는 폴리펩티드 분자에 결합하는 것을 특징으로 하는 항체.

청구항 16.

삭제

청구항 17.

삭제

청구항 18.

삭제

청구항 19.

삭제

청구항 20.

삭제

도면

도면1

```

FHF-1 -----MAAAIASSLIRQKROARESNS-DRVSASKRRSSPSKDG-R 38
FGF-10 -----
FHF-4 -----MAAAIASGLIRQKROAREQHW-DRPSASRRRSSPSKN--R 37
FHF-2 -----MAAAIASSLIRQKROARER---EKSNAACKVSSPSKG--K 35
FHF-3 -----MAALASSLIRQKREVREPPG-SRPVSAQRRVCP-RGT-K 36
FGF4_사람 -----MS-GPGTAAVALLPAVLLALL-APWAGRGGAAAPTAPN-G 37
FGF6_사람 MALGQKLFITMSRGAGRLQGLTALVFLGIL-VGMVVP--SPAGTRAN-N 46
FGF2_사람 -----
FGF1_사람 -----
KGF-2 -----MWKWILTHCASAFPHLPGCCC-CCFLLFLVSSVPVTC-Q 38
FGF7_사람 -----MHKWILTWLPTLLYR-S----CFHIICLVGTISLAC-N 33
ZGI_HUZFGE -----MY-SAPSACTCLCLHFLLLCF-QVQ-----VLVAEE-N 30
FGF8_사람 -----MG-SPRSALSCLLLHLLVLCL-QAQEGPGRGPPALGREL-A 37
FGF5_사람 -----MSLSFLLLLFFSHLILSAWAHGEKRLAPKGPQPPAATDRN 40
FGF9_사람 -----MAPLGEVGNVYFGVQDAVFPGNVPLP--VDSPVLLS-D 35
FGF3_사람 -----MGLIWLILLSLLEP-----G----WPAAGPGA 23

FHF-1 SLCKERHV---LGVFSKVRFCSGR-----KRPVRRRPEPQLKGI VT 75
FGF-10 -----MASKEPQLKGI VT 13
FHF-4 GLCNGNL---VDIFSIVRIFGLK-----KRRRLRQ-DPQLKGI VT 73
FHF-2 TSCDKNK---LNVFSRVKLFSGK-----KRRRRRP-EPQLKGI VT 71
FHF-3 SLCQKQ---LILLSKVRLCGGRP-----ARPDGP-EPQLKGI VT 73
FGF4_사람 TLEAELERR-WESLVALSLARLPVAAQPK- AAVOSGAGDYLLG- IKRLR 84
FGF6_사람 TLLDS--RG-WGTLLSRSRAGL---AG--E-IAGVNWESGYLVG- IKRQR 86
FGF2_사람 -----MAAGSITTLPALPE-----DGGSGAFPPGHFKDPK 30
FGF1_사람 -----MAEGEITTFALTE-----KFN--LPPGNYKKPK 27
KGF-2 ALGQDMVSP-EATNSSSSSFSSPSAG----RHVRSYNHLOG-DVRWR 80
FGF7_사람 DMTPEQM---ATNVNCS---SPE-----RHTRSVDYMEGGDIRVR 67
ZGI_HUZFGE VDFRID-----VEK-----QTRARDDVSRKQLRLY 55
FGF8_사람 SLFRAGR---EPOGVSOQHVE-----QSLVTDQLSRRLIRTY 72
FGF5_사람 PIGSSSRQSSSAMSSSASSSPAASLGSQGSGL- EQSSFWQSPS-GRRTG 89
FGF9_사람 HLGQS-----E--AGGLPRGP-----AVTDLHLKG-ILRRR 64
FGF3_사람 RLRRD-----AGG-----RGGVVEHLGG-APRRR 46

FHF-1 RLFSQQ--GYFLQHPDGTIDGTDKENSDFLNLIPVGLR-VVAIQGVK 122
FGF-10 RLFSQQ--GYFLQHPDGTIDGTDKENSDFLNLIPVGLR-VVAIQGVK 60
FHF-4 RLYCRQ--GYFLQHPDGLDGTIDGTDKDDSTNDFLNLIPVGLR-VVAIQGVK 120
FHF-2 KLYSRQ--GYHLQLQADGTIDGTDKEDSTYTLFNLIPVGLR-VVAIQGVK 118
FHF-3 KLFRCQ--GFYLANPDGSIQGTPEDTSSFTFNLIPVGLR-VVTIQSAK 120
FGF4_사람 RLYCNVIGIFHLQALPDGRIGGAHADT-RDSLLELSPVERG-VVSI FGVA 132
FGF6_사람 RLYCNVIGIFHLQVLPDGRISGTHEEN-PYSLLEISTVERG-VVSLFGVR 134
FGF2_사람 RLYCKNG-GFFLRIPHDRVDGVRKSDPHIKLQQAEEERG-VVSIKVC 78
FGF1_사람 LLYCSNG-GHFLRILPDGTVDGTRDRSDQHILQLSAESVG-EVYIKSTE 75
KGF-2 KLFST--KYFLKIEKNGKVSQTKKENCYPYSILEITSVEIG-VVAVKAIN 127
FGF7_사람 RLF CRT--QWYLRIDKRGKVKGTQEMKNYINIMEIRTVAVG-IVAIGVE 114
ZGI_HUZFGE QLYSRTS-GKHIVLQVLR-RRISARGEDGKYAQLLVETDTFGSQRVIRKGE 103
FGF8_사람 QLYSRTS-GKHVQVLANKRINAMAEDGDPFAKLIVETDTFGSRVVRVGA 121
FGF5_사람 SLYCRVIGIFHLQIYPDGKVNGSHEAN-MLSVLEIFAVSQG-IVGIRGVF 137
FGF9_사람 QLYCRT--GFHLEIFPNGTIQGTTRKHSRFGILEFISIAVG-LVSI RGVF 111
FGF3_사람 KLYCAT--KYHLQLHPSGRVNGSLENS-AYSILEITAVEVG-IVAIRGLF 92
*:. :. :. :. :. *:.

```

도면2

FHF-1	ASLYVAMNGEGLYSSDV-FTPECKFKESVFENYVYIYSSTLYRQQESG-	170
FGF-10	ASLYVAMNGEGLYSSDV-FTPECKFKESVFENYVYIYSSTLYRQQESG-	108
FHF-4	TGLYIAMNGEGLYPSEL-FTPECKFKESVFENYVYIYSSTLYRQQESG-	168
FHF-2	TKLYLAMNSEGYLYTSEL-FTPECKFKESVFENYVYIYSSTLYRQQESG-	166
FHF-3	LGHYAMNAEGLLYGSPH-FTAECRFKECVFENYVYIYSSTLYRQQESG-	168
FGF4 사람	SRFFVAMSSKGLYGSPP-FTDECTFKELLLPNNYNAYESYKYPG----	176
FGF6 사람	SALFVAMNSKGRLYATPS-FQECKFRETLLPNNYNAYESDYQYQ----	178
FGF2 사람	ANRYLAMKEDGRLLASK-VDCECFERLESNNYNTYRSRKYTS----	122
FGF1 사람	TGQYLAMDTDGLLYGSQT-PNEECLFLERLEENHYNTYISKKHAEK--N-	121
KGF-2	SNYYLAMNKKGLYGSKE-FNNDCKLKERIEENYNTYASFNWQHN--G-	173
FGF7 사람	SEFYLAMNKEGKLYAKKE-CNEDCNFKELILENHYNTYASAKWTHN--G-	160
ZGI HUZFGF	TEFYLCMNRKGLVGPDPGTSKCEVFEIKVLENNYNTYALMSAKYSG----	148
FGF8 사람	TGLYICMNNKGLIAKSNKGGKDCVFTEIVLENNYNTYALQNAKYEG----	166
FGF5 사람	SNKFLAMSKKGLHASK-FTDDCKFRERFQENSYNTYASAIHRTKGTG-	185
FGF9 사람	SGLYLGMEKGLYGSKE-LTQECVFRQFEEENYNTYSSNLKHKVDTG-	159
FGF3 사람	SGRYLAMNKRGRLYASEH-YSACEFVERIHELGYNTYASRLYRTVSSTP	141
	:: * . * * . : * : * . *	
FHF-1	-----RAWFLGLNKEGQIMKG--NRVKKTKPSSHFPKPIEVCMYR	209
FGF-10	-----RAWFLGLNKEGQIMKG--NRVEKTKPSSHFPKPIEVCMYR	147
FHF-4	-----RAWFLGLNKEGQAMKG--NRVKKTKPAAHFLPKPLEVAMYR	207
FHF-2	-----RGWYLGLENKEGEIMKG--NHVKNKPAAHFLPKPLKVAMYK	205
FHF-3	-----RAWYLGLENKEGQVMKG--NRVKKTKAAAHFLPKLEVAMYQ	207
FGF4 사람	-----MFIALSKNGKTKKG--NRVSPMTKVTHTFLPRL-----	206
FGF6 사람	-----TYIALSKYGRVVRG--SKVSPMTVTHTFLPRL-----	208
FGF2 사람	-----WYVALKRTGOYKLG--SKTGGQKAILFLPMSAKS----	155
FGF1 사람	-----WYVALKKNKSGCKRG--PRTHYGQKAILFLPLVSSD---	155
KGF-2	-----RQMYVALNGKAPRRG--QKTRRKNTSAHFLPMVVHS----	208
FGF7 사람	-----GEMFVALNKGIPVRG--KTKRKEQKTAHFLPMAIT----	194
ZGI HUZFGF	-----WYVGFTKGRPRKG--PKTRENQDVFHMKRYPKGQPEL	185
FGF8 사람	-----WYMAFTRKGRPRKG--SKTRQHQREVFHMKRPLPRGHHT	203
FGF5 사람	-----REWYVALNKRKAKRGCSPRVKQHIHSTHFLPRFKQSEQ-P	225
FGF9 사람	-----RRYVALNKDGTTPREG--TRTKRHQKFTHFLPRVDPDKVP	198
FGF3 사람	GARRQPSAERLWYVSVNGKGRPRG--FKTRRTQKSSFLPRVLDHRDHE	189
	:: . . * * * . : . *	
FHF-1	EPSLHEIGEKG---GRS--RKSSGTPTMNGGKVVNQDST-----	243
FGF-10	EPSLHEIGENK---GVQ--GKFWTPP-----	168
FHF-4	EPSLHDVGETVPKP-GVTPSKSTSASAIMNGGKPVNKSSTT-----	247
FHF-2	EPSLHDLTEFSRSG-SGTPKRSRVSGLVNGGKSMHNEST-----	245
FHF-3	EPSLHVSPEAS-----P--SSPPAP-----	225
FGF4 사람	-----	
FGF6 사람	-----	
FGF2 사람	-----	
FGF1 사람	-----	
KGF-2	-----	
FGF7 사람	-----	
ZGI HUZFGF	QKPFKYTTVTK----RSRR--IRPHTPA-----	207
FGF8 사람	EQSLRFEFLNYPPF--TRSLRGSORTWAPEPR-----	233
FGF5 사람	ELSFTVTVPKKNP--PSPIKSKIPLSAPRKNNTSVKYRLKFRFG-----	268
FGF9 사람	ELYKDILSQS-----	208
FGF3 사람	MVRQLQSGLPRPPGKGVQPRRRQKQSPDNLEPSHVQASRLGSLQLEASA	239

도면3

1	1.00	0.39	0.43	0.29	0.46	0.33	0.36	0.38	0.37	0.41	0.39	0.40	0.42	0.40	0.35	0.38
2	1.00	0.38	0.38	0.34	0.41	0.35	0.38	0.33	0.38	0.44	0.39	0.37	0.37	0.39	0.35	0.60
3	1.00	0.31	0.42	0.34	0.33	0.33	0.36	0.34	0.38	0.35	0.37	0.41	0.46	0.35	0.35	
4	1.00	0.34	0.53	0.26	0.39	0.26	0.31	0.28	0.30	0.30	0.31	0.28	0.31	0.28	0.32	
5	1.00	0.35	0.39	0.43	0.39	0.39	0.43	0.42	0.44	0.43	0.43	0.40	0.43	0.40	0.43	
6	1.00	0.33	0.31	0.33	0.31	0.32	0.34	0.34	0.32	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	
7	1.00	0.34	0.98	0.34	0.54	0.34	0.37	0.36	0.36	0.34	0.38	0.37	0.37	0.37	0.42	
8	1.00	0.33	0.66	0.72	0.34	0.37	0.34	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.42	
9	1.00	0.32	0.35	0.40	0.37	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.43	
10	1.00	0.68	0.36	0.38	0.58	0.41	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.43	
11	1.00	0.36	0.33	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.42	
12	1.00	0.47	0.34	0.32	0.42	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.42	
13	1.00	0.30	0.31	0.30	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.32	
14	1.00	0.30	0.31	0.30	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.32	
15	1.00	0.30	0.31	0.30	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.32	
16	1.00	0.30	0.31	0.30	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.32	

서열목록

<110> ZYMOGENNETICS, INC.
 <120> FIBROBLAST GROWTH FACTOR HOMOLOGS
 <130> 1
 <150> US 60/028,646
 <151> 1996-10-16
 <160> 19
 <170> KOPATIN 1.0
 <210> 1
 <211> 917
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(621)
 <400> 1
 atg tat tca gcg ccc tcc gcc tgc act tgc ctg tgt tta cac ttc ctg
 Met Tyr Ser Ala Pro Ser Ala Cys Thr Cys Leu Cys Leu His Phe Leu
 1 5 10 15

```

ctg ctg tgc ttc cag gta cag gtg ctg gtt gcc gag gag aac gtg gac      96
Leu Leu Cys Phe Gln Val Gln Val Leu Val Ala Glu Glu Asn Val Asp
                20                        25                        30
ttc cgc atc cac gtg gag aac cag acg cgg gct cgg gac gat gtg agc      144
Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser
                35                        40                        45
cgt aag cag ctg cgg ctg tac cag ctc tac agc cgg acc agt ggg aaa      192
Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys
                50                        55                        60
cac atc cag gtc ctg ggc cgc agg atc agt gcc cgc ggc gag gat ggg      240
His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly
                65                        70                        75                        80
gac aag tat gcc cag ctc cta gtg gag aca gac acc ttc ggt agt caa      288
Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln
                85                        90                        95
gtc cgg atc aag ggc aag gag acg gaa ttc tac ctg tgc atg aac cgc      336
Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg
                100                       105                       110
aaa ggc aag ctc gtg ggg aag ccc gat ggc acc agc aag gag tgt gtg      384
Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val
                115                       120                       125
ttc atc gag aag gtt ctg gag aac aac tac acg gcc ctg atg tcg gct      432
Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Met Ser Ala
                130                       135                       140
aag tac tcc ggc tgg tac gtg ggc ttc acc aag aag ggg cgg ccg cgg      480
Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg
                145                       150                       155                       160
aag ggc ccc aag acc cgg gag aac cag cag gac gtg cat ttc atg aag      528
Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp Val His Phe Met Lys
                165                       170                       175
cgc tac ccc aag ggg cag ccg gag ctt cag aag ccc ttc aag tac acg      576
Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr
                180                       185                       190
acg gtg acc aag agg tcc cgt cgg atc cgg ccc aca cac cct gcc      621
Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg Pro Thr His Pro Ala
                195                       200                       205
taggccacc ccgccgcggc cctcaggtcg ccctggccac actcacactc ccagaaaact      680
gcatcagagg aatattttta catgaaaaat aaggatttta ttgttgactt gaaacccccg      740
atgacaaaag actcacgcaa agggactgta gtcaaccac aggtgcttgt ctctctctag      800
gaacagacaa ctctaaactc gtccccagag gaggacttga atgaggaaac caacactttg      860
agaaaccaa gtcctttttc ccaaaggttc tgaaaaaaaa aaaaaaaaaa actcgag      917
<210> 2
<211> 207
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2
Met Tyr Ser Ala Pro Ser Ala Cys Thr Cys Leu Cys Leu His Phe Leu
 1          5          10          15
Leu Leu Cys Phe Gln Val Gln Val Leu Val Ala Glu Glu Asn Val Asp
                20                        25                        30
Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser
                35                        40                        45

```

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

<210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 ggacttgact accgaaggtg tctg 24
 <210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 gtcgatgtga gccgtaagca gct 23
 <210> 5
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 gcatacttgt cccatcctc gccgcg 26
 <210> 6
 <211> 621
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 atgtaywsng cncnwsngc ntgyacntgy ytntgyytnc ayttyytnyt nytntgytty 60
 cargtnrcarg tnytngtngc ngargaraay gtngayttym gnathgaygt ngaraarcar 120
 acnmngnclm gngaygaygt nwsnmgnaar carytnmgny tntaycaryt ntaywsnmgn 180
 acnwsnggna arcayathca rgtnytnggn mgnmgnathw sngcnmgngg ngargayggn 240
 gayaartayg cncarytnyt ngtngaracn gayacnttyg gnwsncargt nmgnathaar 300
 ggnaargara cngarttyta yytntgyatg aaymgnarg gnaarytngt nggnaarccn 360
 gayggnacnw snaargartg ygtnttyath garaargtny tngaraayaa ytayacngcn 420
 ytnatgwsng cnaartayws nggntggtay gtnggnttya cnaaraargg nmgnccnmgn 480
 aarggnccna aracnmnga raaycarcar gaygtncayt tyatgaarmg ntayccnaar 540

ggncarccng arytncaraa rccnttyaar tayacnacng tnacnaarmg nwsnmgnmgn 600
 athmgncna cncayccngc n 621
 <210> 7
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 tatttatcta gactggttcc gcgtgccgcc gaggagaacg tggactt 47
 <210> 8
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 gtatttgtcg actcaggcag ggtgtgtggg ccg 33
 <210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 gccgaggaga acgtggactt cc 22
 <210> 10
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 tatttatcta gagatgacga tgacaaggcc gaggagaacg tggactt 47
 <210> 11
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 agcattgcta aagaagaagg tgtaagcttg gacaagagag a 41
 <210> 12
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 12
 ggtgtaagct tggacaagag agaggagaac gtggacttcc gcatccacgt ggagaaccag 60
 acg 63
 <210> 13
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 ccggctgtag agctggtaca gccgcagctg cttacggct 39
 <210> 14
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 cttcagaagc cttcaagta cacgacgggtg accaagaggt cc 42
 <210> 15

<211> 61
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 15
 acgacggtga ccaagaggtc ccgtcggatc cggcccacac accctgccta gggggaattc 60
 g 61
 <210> 16
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 caaacaggca gccctagaat actagtgtcg actcgaggat ccgaattccc cctaggcagg 60
 g 61
 <210> 17
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 ctcaaaaatt ataaaaatat ccaaacaggc agccctagaa tact 44
 <210> 18
 <211> 62
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 cagccgcagc tgcttagcgc tcacatcgtc ccgagcccgc gtctggttct ccacgtggat 60
 gc 62
 <210> 19
 <211> 141
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 agcattgctg ctaaagaaga aggtgtaagc ttggacaaga gagaggagaa cgtggacttc 60
 cgcatccacg tggagaacca gacgcgggct cgggacgatg tgagccgtaa gcagctgcgg 120
 ctgtaccagc tctacagccg g 141
 <210> 20
 <211> 144
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 cttcagaagc cttcaagta cacgacggtg accaagaggt cccgtcggat ccggcccaca 60
 caccctgcct agggggaatt cggatcctcg agtcgacact agtattctag ggctgcctgt 120
 ttggatattt ttataatttt tgag 144