



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 215**

51 Int. Cl.:

C12N 15/18 (2006.01)

C07K 14/50 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05021714 .0**

96 Fecha de presentación : **16.10.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **1632574**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.03.2006**

54 Título: **Homólogos del factor de crecimiento de fibroblastos.**

30 Prioridad: **16.10.1996 US 28646 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.04.2011

73 Titular/es: **ZYMOGENETICS, Inc.**
1201 Eastlake Avenue East
Seattle, Washington 98102, US

72 Inventor/es: **Deisher, Theresa A.;**
Conklin, Darrell C.;
Raymond, Fenella C.;
Bukowski, Thomas R.;
Julien, Susan D.;
Hansen, Brigit y
Sheppard, Paul O.

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 357 215 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Homólogos del factor de crecimiento de fibroblastos.

5 La familia del factor de crecimiento de fibroblasto (FGF) consiste de por lo menos nueve miembros distintos (Basilico et al., *Adv. Cancer Res.* 59:115-165, 1992 y Fernig et al., *Prog. Growth Factor Res.* 5(4):353-377, 1994) que actúan generalmente como mitógenos para un espectro amplio de tipos celulares. Por ejemplo, el FGF básico (también conocido como FGF-2) es mitogénico in vitro para células endoteliales, células de músculo liso vascular, fibroblastos, y generalmente para células de origen mesodermo o neuroectodermo, que incluye miocitos esqueléticos y cardíacos (Gospodarowicz et al., *J. Cell. Biol.* 70:395-405, 1976; Gospodarowicz et al., *J. Cell. Biol.* 89:568-578, 1981 y Kardami, *J. Mol. Cell. Biochem.* 92:124-134, 1990). In vivo, se ha mostrado que el bFGF tiene 10 una función en el desarrollo cardíaco aviar (Sugi et al., *Dev. Biol.* 168:567-574, 1995 y Mima et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 92: 467-471, 1995), e induce el desarrollo colateral coronario en perros (Lazarous et al., *Circulation* 94:1074-1082, 1996). Adicionalmente, las actividades no mitogénicas se han demostrado para varios miembros de la familia FGF. Las actividades no proliferativas asociadas con FGF ácido y/o básico incluyen: la liberación endotelial incrementada del activador de plasminógeno de tejido, estimulación de síntesis de matriz extracelular, quimiotaxis 15 para células endoteliales, expresión inducida de genes contráctiles fetales en cardiomiocitos (Parker et al., *J. Clin. Invest.* 85:507-514, 1990), y sensibilidad hormonal mejorada de pituitaria (Baird et al., *J. Cellular Physiol.* 5:101-106, 1987.)

20 Varios miembros de la familia FGF no tienen una secuencia de señal (aFGF, bFGF y posiblemente FGF-9) y así no se esperaría que se secretaran. Adicionalmente, varios de los miembros de la familia FGF tienen la capacidad de migrar al núcleo de la célula (Friesel et al., *FASEB J.* 9:919-925, 1995). Todos los miembros de la familia FGF unen la heparina con base en similitudes estructurales. Las especies cruzadas en homología estructural, sugieren una conservación de su relación de estructura/función (Ornitz et al., *J. Biol. Chem.* 271(25):15292-15297, 1996.)

25 Existen cuatro receptores FGF extracelulares conocidos (FGFR), y ellos son todas las tirosina quinasas. En general, los miembros de la familia FGF se unen a todos los FGFR conocidos, sin embargo, los FGF específicos se unen a receptores específicos con altos grados de afinidad. Otro medio para especificidad dentro de la familia FGF es la expresión espacial y temporal de los ligandos y sus receptores durante embriogenia. La evidencia sugiere que los FGF actúan más probablemente solo en forma autocrina y/o paracrina, debido a su afinidad de unión a heparina, que limita su difusión del sitio de liberación (Flaumenhaft et al., *J. Cell. Biol.* 111(4):1651-1659, 1990.) El FGF básico carece de una secuencia de señal, y por lo tanto se restringe a los modos de acción paracrino o autocrino. Se ha 30 postulado que el FGF se almacena intracelularmente y se libera luego del daño de tejido. Se ha mostrado que el FGF básico tiene dos regiones de unión de receptor que son distintas del sitio de unión a heparina (Abraham et al., *EMBO J.* 5(10):2523-2528, 1986.)

35 Se ha mostrado que el FGFR-3 tiene una función en el crecimiento óseo. Los ratones hechos homocigotos nulos para el FGFR-3 (-/-) resultan en anomalías esqueléticas postnatales (Colvin et al., *Nature Genet.* 12: 309: 397, 1996 y Deng et al., *Cell* 84: 911-921, 1996). El fenotipo mutante sugiere que en ratones normales, el FGFR-3 tiene una función en la regulación de división celular de condrocito en la región de placa de crecimiento del hueso (Goldfarb, *Cytokine and Growth Factor Rev.* 7(4) :311-325, 1996). No se ha identificado el ligando para el FGFR-3 en la placa de crecimiento del hueso.

40 Aunque se han identificado cuatro FGFR, todos los cuales se ha mostrado por tener variantes de división funcionales, la posibilidad que los receptores FGF novedosos existan es bastante probable. Por ejemplo, no se ha identificado el receptor para la isoforma FGF- 8a (MacArthur et al., *J. Virol.* 69(4):2501-2507, 1995.).

45 El FGF-8 es un miembro de la familia FGF que se aísla originalmente de células de carcinoma mamario como un mitógeno inducible de andrógeno. Se ha mapeado un cromosoma humano 10q25-q26 (White et al., *Genomics* 30:109-111, 1995.) El FGF-8 se involucra en el desarrollo de miembro embrionario (Vogel et al., *Development* 122 :1737-1750, 1996 y Tanaka et al., *Current Biology* 5(6) :594-597, 1995.) La expresión del FGF-8 durante embriogenia en el tejido neuronal, urogenital y cardíaco indica que este puede tener una función en el desarrollo de estos tejidos (Crossley et al., *Development* 121:439-451, 1995.) Existe alguna evidencia que la acrocefalosindactilia, una afección congénita marcada por cabeza puntiaguda y dedos de las manos y los pies 50 palmeados, se asocia con mutaciones de punto FGF-8 (White et al., 1995, *ibid.*)

55 El FGF-8 tiene cinco exones, en contraste con los otros FGF conocidos, que solo tienen tres exones. Los primeros tres exones de FGF-8 corresponden al primer exón de otros FGF (MacArthur et al., *Development* 121:3603-3613, 1995.) El gen humano para el FGF-8 codifica cuatro isoformas que difieren en sus regiones de terminal N: isoformas FGF a, b, e, y f; en contraste con el gen de murino que se eleva a ocho isoformas FGF-8 (Crossley et al., 1995, *ibid.*) El FGF-8a y FGF-8b humano tienen 100% de homología en las proteínas de murino, y las proteínas FGF-8e y FGF-8f son 98% homólogas entre humano y ratón (Gemel et al., *Genomics* 35:253-257, 1996.)

La enfermedad cardíaca es la causa principal de muerte en los Estados Unidos, contando hasta 30% de todas las muertes. El infarto del miocardio (MI) cuenta con 750,000 admisiones en el hospital por año en los EE.UU., con más de 5 millones de personas diagnosticadas con enfermedad coronaria. Los factores de riesgo para el MI

incluyen diabetes melitus, hipertensión, obesidad truncal, fumar, altos niveles de lipoproteína de baja densidad en el plasma o predisposición genética.

La hiperplasia cardiaca es un incremento en la proliferación de miocito cardiaco, y ha demostrado que ocurre con el envejecimiento normal en el humano y ratas (Olivetti et al., J. Am. Coll. Cardiol. 24(1):140-9, 1994 y Anversa et al., Circ. Res. 67:871-885, 1990), y en cardiomiopatía inducida por catecolamina en ratas (Deisher et al., Am. J. Cardiovasc. Pathol. 5 (1):79-88, 1994.) Sea el incremento de miocitos originados con algún progenitor, o sean un resultado de la proliferación de un tipo celular terminalmente más diferenciado, permanece en controversia.

Sin embargo, debido a que el infarto y otras causas de necrosis del miocardio parecen ser irreparables, parece que los mecanismos normales de hiperplasia cardiaca no compensan la muerte del miocito extensiva y subsiste una necesidad de factores exógenos que promueven la hiperplasia y finalmente resulten en la renovación de la capacidad de funcionamiento del corazón.

El remodelamiento óseo es el proceso dinámico mediante el cual se mantienen la masa de tejido y la arquitectura esquelética. El proceso es un balance entre la resorción ósea y la formación ósea, con dos tipos de células que se consideran son los principales factores. Estas células son el osteoblasto y osteoclasto. Los osteoblastos sintetizan y depositan la matriz para llegar a ser hueso nuevo. Las actividades de los osteoblastos y osteoclastos se regulan por muchos factores, sistémico y local, que incluye factores de crecimiento.

Aunque la interacción entre los factores sistémico y local no se ha aclarado completamente, parece haber consenso en que los factores de crecimiento jueguen un papel clave en la regulación del remodelamiento esquelético normal y la reparación de la fractura. Algunos de los factores de crecimiento que se han identificado en el hueso incluyen: IGF-I, IGF-II, TGF- β 1, TGF- β 2, bFGF, aFGF, PDGF y la familia de las proteínas morfogénicas del hueso (Baylink et al., J. Bone Mineral Res. 8 (Supp. 2): S565-S572, 1993).

Cuando la resorción ósea excede la formación ósea, resulta una pérdida neta en el hueso, y se incrementa la propensión a las fracturas. La formación ósea reducida se asocia con el envejecimiento y ciertos estados patológicos. Solo en los Estados Unidos,, existen aproximadamente 1.5 millones de fracturas anualmente que son atribuidas a la osteoporosis. El impacto de estas fracturas en la calidad de vida del paciente es inmenso. Los costos asociados con el sistema del cuidado de la salud en los Estados Unidos, se estiman que son \$5-\$10 miles de millones anualmente, excluyendo los costos de cuidado a largo plazo.

Otras aplicaciones terapéuticas para los factores de crecimiento que influyen el remodelamiento óseo incluyen, por ejemplo, el tratamiento de lesiones que requieren la proliferación de osteoblastos a la curación, tal como fracturas, así como también la estimulación de la proliferación de célula mesenquimal y la síntesis del hueso intramembranoso que se ha indicado como aspectos de reparación de la fractura (Joyce et al. 36th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, February 5-8, 1990. New Orleans, LA).

La presente invención proporciona tales polipéptidos para estos y otros usos que deben ser evidentes para aquellos expertos en la técnica a partir de las enseñanzas mostradas aquí.

La presente invención proporciona el uso de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de:

a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo 28 (Glu) al residuo 175 (Met); y

b) moléculas de polipéptido que son por lo menos 80% idénticas a la SEQ ID NO: 2 del residuo de aminoácido 28 (Glu) al residuo de aminoácido 175 (Met);

para la fabricación de un medicamento para promover la reparación de defectos y deficiencias óseas; para promover curación ósea en cirugía plástica; para estimular el crecimiento óseo en articulaciones protésicas no cementadas e implantes dentales; para incrementar la formación ósea durante osteogénesis por distensión; para tratar otros trastornos esqueléticos que se pueden tratar mediante la estimulación de actividad osteoblástica; para reparación congénita, inducida por trauma, osteotomía; o para la curación ósea luego de osteonecrosis inducida por radiación.

La presente invención también proporciona el uso de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de:

a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo 28 (Glu) al residuo 196 (Lys); y

b) moléculas de polipéptido que son por lo menos 80% idénticas a la SEQ ID NO: 2 del residuo de aminoácido 28 (Glu) al residuo de aminoácido 196 (Lys);

para la fabricación de un medicamento para promover la reparación de defectos y deficiencias óseas; para promover curación ósea en cirugía plástica; para estimular el crecimiento óseo en articulaciones protésicas no cementadas e implantes dentales; para incrementar la formación ósea durante osteogénesis por distensión; para tratar otros trastornos esqueléticos que se pueden tratar mediante la

estimulación de actividad osteoblástica; para reparación congénita, inducida por trauma, osteotomía; o para la curación ósea luego de osteonecrosis inducida por radiación.

La presente invención también proporciona el uso de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de:

5 a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo 28 (Glu) al residuo 207 (Ala); y

b) moléculas de polipéptido que son por lo menos 80% idénticas a la SEQ ID NO: 2 del residuo de aminoácido 28 (Glu) al residuo de aminoácido 207 (Ala);

10 para la fabricación de un medicamento para promover la reparación de defectos y deficiencias óseas; para promover curación ósea en cirugía plástica; para estimular el crecimiento óseo en articulaciones protésicas no cementadas e implantes dentales; para incrementar la formación ósea durante osteogénesis por distensión; para tratar otros trastornos esqueléticos que se pueden tratar mediante la estimulación de la actividad osteoblástica; para reparación congénita, inducida por trauma, osteotomía; o para la curación ósea luego de osteonecrosis inducida por radiación.

15 La presente especificación también proporciona un polipéptido aislado seleccionado del grupo que consiste de:

a) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo 28 (Glu) al residuo 175 (Met) más un residuo metionina de terminal amino;

20 b) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo 28 (Glu) al residuo 196 (Lys) más un residuo metionina de terminal amino;

c) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo 28 (Glu) al residuo 207 (Ala) más un residuo metionina de terminal amino.

La presente especificación describe un polinucleótido aislado que codifica dicho polipéptido, en donde el polinucleótido comprende una secuencia de polinucleótido seleccionada del grupo que consiste de:

25 a) una secuencia de polinucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 82 al nucleótido 621;

b) una secuencia de polinucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 1 al nucleótido 621;

30 c) una secuencia de polinucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 6 del nucleótido 82 al nucleótido 621; y

d) una secuencia de polinucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 6 del nucleótido 1 al nucleótido 621.

35 Así, dentro de un aspecto, la presente especificación describe una molécula de polinucleótido aislado que codifica un factor de crecimiento del polipéptido homólogo del factor de crecimiento de fibroblasto (FGF) seleccionado del grupo que consiste de:

a) moléculas de polinucleótido que comprenden una secuencia de nucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 82 al nucleótido 621;

b) las variantes alélicas de (a);

40 c) moléculas de polinucleótido que codifican un polipéptido que es por lo menos 60% idénticas a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2 del residuo de aminoácido 28 (Glu) al residuo de aminoácido 207 (Ala); y

d) moléculas de polinucleótido que comprenden una secuencia de nucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 6 del nucleótido 82 al nucleótido 621.

45 La molécula de polinucleótido aislada puede comprender una secuencia de nucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 1 al nucleótido 621 o una secuencia de nucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 6 del nucleótido 1 al nucleótido 621.

La molécula de polinucleótido aislada puede comprender una secuencia de nucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 82 al nucleótido 621.

50 La especificación describe un vector de expresión que comprende los siguientes elementos ligados operablemente: un promotor de transcripción; un segmento de ADN seleccionado del grupo que consiste de:

a) moléculas de polinucleótido que comprenden una secuencia de nucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 82 al nucleótido 621;

b) las variantes alélicas de (a);

5 c) moléculas de polinucleótido que codifican un polipéptido que es por lo menos 60% idénticas a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2 del residuo de aminoácido 28 (Glu) al residuo de aminoácido 207 (Ala); y

d) moléculas de polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 6 del nucleótido 82 al nucleótido 621; y un terminador de transcripción.

10 La especificación describe una célula cultivada en la que se ha introducido un vector de expresión que comprende los siguientes elementos ligados operablemente: un promotor de transcripción; un segmento de ADN seleccionado del grupo que consiste de:

a) moléculas de polinucleótido que comprenden una secuencia de nucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 82 al nucleótido 621;

b) las variantes alélicas de (a);

15 c) moléculas de polinucleótido que codifican un polipéptido que es por lo menos 60% idénticas a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2 del residuo de aminoácido 28 (Glu) al residuo de aminoácido 207 (Ala); y

20 d) moléculas de polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 6 del nucleótido 82 al nucleótido 621; y un terminador de transcripción, en donde dicha célula expresa un polipéptido codificado por el segmento de ADN.

La especificación describe un método para producir un polipéptido homólogo FGF que comprende: cultivar una célula en la que se ha introducido un vector de expresión que comprende los siguientes elementos ligados operablemente: un promotor de transcripción; un segmento de ADN seleccionado del grupo que consiste de:

25 a) moléculas de polinucleótido que comprenden una secuencia de nucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 1 del nucleótido 82 al nucleótido 621;

b) las variantes alélicas de (a);

c) moléculas de polinucleótido que codifican un polipéptido que es por lo menos 60% idénticas a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2 del residuo de aminoácido 28 (Glu) al residuo de aminoácido 207 (Ala); y

30 d) moléculas de polinucleótido que comprenden una secuencia de nucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 6 del nucleótido 82 al nucleótido 621; y un terminador de transcripción, por lo cual dicha célula expresa un polipéptido homólogo FGF codificado por el segmento de ADN; y recupera el polipéptido homólogo FGF.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido homólogo FGF aislado que comprende una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo 28 (Glu) al residuo 175 (Met). La especificación describe moléculas de polipéptido que son por lo menos 60% idénticas a la SEQ ID NO: 2 del residuo de aminoácido 28 (Glu) al residuo de aminoácido 175 (Met).

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido homólogo FGF aislado que comprende una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo 28 (Glu) al residuo 196 (Lys). La especificación describe moléculas de polipéptido que son por lo menos 60% idénticas a la SEQ ID NO: 2 del residuo de aminoácido 28 (Glu) al residuo de aminoácido 196 (Lys).

45 En otra realización, la presente invención proporciona un polipéptido homólogo FGF aislado que comprende una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo 28 (Glu) al residuo 207 (Ala). La especificación describe moléculas de polipéptido que son por lo menos 60% idénticas a los aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 del residuo de aminoácido 28 (Glu) al residuo de aminoácido 207 (Ala).

En una realización adicional, la presente invención proporciona un polipéptido homólogo FGF (como se define en las Reivindicaciones), que comprende adicionalmente una secuencia de señal.

50 En otra realización, la presente invención proporciona un polipéptido homólogo FGF (como se define en las Reivindicaciones) que comprende adicionalmente una secuencia de señal como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo de aminoácido 1 (Met) al residuo de aminoácido 27 (Ala).

La presente invención también proporciona la composición farmacéutica que comprende un polipéptido homólogo FGF purificado (como se define en las Reivindicaciones) en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente especificación describe un anticuerpo que se une a un epítipo de una molécula de polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo 1 (Met) al residuo 207 (Ala).

5 La especificación describe un anticuerpo que se une a una molécula de polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo 28 (Glu) al residuo 196 (Lys).

La especificación describe un método para estimular la proliferación de miocitos o progenitores de miocito que comprenden administrar a un mamífero en necesidad de estos, una cantidad de un polipéptido homólogo FGF suficiente para producir un incremento clínicamente significativo en el número de miocitos o progenitores de miocito en dicho mamífero.

10 La especificación describe un método para estimular la proliferación de miocitos o progenitores de miocito, en donde los miocitos o progenitores de miocito son miocitos cardíacos o progenitores de miocitos cardíacos.

15 La especificación describe un método para estimulación ex vivo de células progenitoras de miocito o miocitos que comprenden cultivar células de tejido cardíaco con una cantidad de un polipéptido homólogo FGF suficiente para producir un incremento en el número de células progenitoras de miocito o miocitos en las células de tejido cardíaco cultivadas en la presencia de un polipéptido homólogo FGF, cuando se compara con células progenitoras de miocito de tejido cardíaco o miocitos cultivados en la ausencia de un polipéptido homólogo FGF.

La especificación describe un método para estimulación ex vivo de células progenitoras de miocito o miocitos, en donde los miocitos o progenitores de miocito son miocitos cardíacos o progenitores de miocitos cardíacos.

20 La especificación describe un método para suministrar un agente o fármaco selectivamente al tejido cardíaco que comprende: ligar una primera molécula que comprende un polipéptido homólogo FGF con una segunda molécula que comprende un agente o fármaco para formar una quimera; y administrar la quimera al tejido cardíaco.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La Figura 1 y la Figura 2 ilustran una alineación múltiple de factor 1 homólogo al factor de crecimiento de fibroblasto humano (FHF- 1), factor activante de miocito humano (FGF-10), factor 4 homólogo al factor de crecimiento de fibroblasto humano (FHF-4), factor 2 homólogo al factor de crecimiento de fibroblasto humano (FHF-2), factor 3 homólogo al factor de crecimiento de fibroblasto humano (FHF-3), FGF-4 humano, FGF-6 humano, FGF-2 humano (básico), FGF-1 humano (ácido), factor 2 de crecimiento de queratinocito humano (KGF-2), precursor del factor de crecimiento de queratinocito humano (FGF-7), zFGF-5 humano, FGF-8 humano, FGF-5 humano, FGF-9 humano, y FGF-3 humano. "*" designa aminoácidos conservados; ":" designa sustituciones de aminoácido conservadas; y "." designa menos sustituciones exigentes de aminoácido conservadas.

30 La Figura 3 es una matriz de similitud interfamilia que ilustra el porcentaje de identidad entre el FGF-5 humano, FGF-6 humano, FGF-7 humano, FGF-8 humano, FGF-9 humano, zFGF-5 humano, FGF-10 humano, FGF-1 humano, FHF-1 humano, FGF-2 humano, FHF-2 humano, FHF-4 humano, FGF-3 humano, KGF-2 humano, FHF-3 humano, y FGF-4 humano.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 El término "ortólogo" (o "homólogo de especie") denota un polipéptido o proteína obtenida de una especie que tiene homología a un polipéptido análogo o proteína de una especie diferente.

El término "parólogo" denota un polipéptido o proteína obtenida de una especie dada que tiene homología en un polipéptido distinto o proteína de la misma especie.

45 El término "variante alélica" denota cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación, y puede resultar en polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones de gen pueden ser imperceptibles (sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácido alterada. El término variante alélica también se utiliza aquí para denotar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

50 El término "vector de expresión" denota una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés ligado operablemente a segmentos adicionales que se proporcionan para su transcripción. Tales segmentos adicionales pueden incluir las secuencias promotora y terminadora, y pueden incluir opcionalmente uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un mejorador, una señal de poliadenilación, y similares. Los vectores de expresión se derivan generalmente de plásmido o ADN vírico, o pueden contener elementos de ambos.

55 El término "aislado", cuando se aplica a una molécula de polinucleótido, denota que el polinucleótido se ha removido de su milieu genético natural y así es libre de otras secuencias codificantes extrañas o no esperadas, y

está en una forma adecuada para uso dentro de los sistemas de producción de proteína construidos genéticamente por ingeniería. Tales moléculas aisladas son aquellas que se separan de su ambiente natural e incluyen cADN y clones genómicos. Las moléculas de ADN aislado de la presente invención están libres de otros genes con los cuales se asocian ordinariamente, pero pueden incluir regiones no traducidas de ocurrencia natural 5' y 3' tal como promotores y terminadores. La identificación de las regiones asociadas será evidente para una persona medianamente experta en la técnica (ver por ejemplo, Dynan and Tijan, Nature 316:774-78, 1985). Cuando se aplica a una proteína, el término "aislado" indica que la proteína se encuentra en una condición diferente a su ambiente nativo, tal como aparte de tejido de animal y sangre. En una forma preferida, la proteína aislada está sustancialmente libre de otras proteínas, particularmente otras proteínas de origen animal. Se prefiere proporcionar la proteína en una forma altamente purificada, es decir, más de 95% pura, más preferiblemente más de 99% pura.

El término "ligado operablemente", cuando se refiere a segmentos de ADN, denota que los segmentos se disponen de tal manera que ellos funcionan en concierto para sus propósitos destinados, por ejemplo la transcripción inicia en el promotor y procede a través del segmento codificante para el terminador.

El término "polinucleótido" denota un polímero mono o bicatenario de bases de desoxiribonucleótido o ribonucleótido leídas desde el extremo 5' al extremo 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y se pueden aislar de fuentes naturales, sintetizadas in vitro, o preparadas de una combinación de moléculas naturales y sintéticas.

El término "complementos de moléculas de polinucleótido" denota moléculas de polinucleótido que tienen la secuencia base complementaria y orientación inversa cuando se compara con una secuencia de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' es complementaria con 5' CCCGTGCAT 3'.

El término "secuencia de nucleótido degenerada" denota una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados (cuando se compara con una molécula de polinucleótido de referencia que codifica un polipéptido). Los codones degenerados contienen diferentes tripletes de nucleótidos, pero codifican el mismo residuo de aminoácido (es decir, los tripletes GAU y GAC cada uno codifican Asp).

El término "promotor" denota una porción de un gen que contiene las secuencias de ADN que se proporcionan para la unión de polimerasa de ARN y el inicio de la transcripción. Las secuencias promotoras comúnmente, pero no siempre, se encuentran en las regiones no codificantes 5' de los genes.

El término "secuencia de señal secretora" denota una secuencia de ADN que codifica un polipéptido (un "péptido secretor") que, como un componente de un polipéptido grande, dirige el polipéptido más grande a través de la ruta secretora de una célula en la que esta se sintetiza. El péptido más grande se divide comúnmente para remover el péptido secretor durante el tránsito a través de la ruta secretora.

El término "receptor" denota una proteína asociada a célula que se une a una molécula bioactiva (es decir, un ligando) y media el efecto del ligando en la célula. Los receptores vinculados a la membrana se caracterizan por una estructura multidominio que comprende un dominio de unión a ligando extracelular y un dominio efector intracelular que está típicamente involucrado en la traducción de señal. La unión del ligando al receptor resulta en un cambio conformacional en el receptor que origina una interacción entre el dominio efector y otras moléculas en la célula. Esta interacción conduce a su vez a una alteración en el metabolismo de la célula. Los eventos metabólicos que se ligan a las interacciones de receptor-ligando incluyen transcripción de gen, fosforilación, desfosforilación, se incrementa en la producción cíclica de AMP, la movilización de calcio celular, movilización de lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos inositol e hidrólisis de fosfolípidos. Los receptores más nucleares también exhiben una estructura multidominio, que incluye un dominio transactivante de terminal amino, un dominio de unión de ADN y un dominio de unión a ligando. En general, los receptores se pueden vincular a la membrana, citosólica o nuclear; monomérica (por ejemplo, receptor de hormona que estimula la tiroides, receptor adrenérgico beta) o multimérica (por ejemplo, receptor PDGF, receptor de hormona de crecimiento, receptor IL-3, receptor GM-CSF, receptor G-CSF, receptor eritropoyetina y receptor IL-6).

El término "par de complemento/anti-complemento" denota grupos funcionales no idénticos que forman un par estable asociado no covalentemente bajo condiciones apropiadas. Por ejemplo, la biotina y avidina (o estreptavidina) son miembros prototípicos de un par de complemento/anti-complemento. Otros pares de complemento/anti-complemento de ejemplo incluyen pares de receptor/ligando, pares de anticuerpo/antígeno (o hapteno o epitopo), pares de polinucleótido codificante/anticodificante, y similares. En donde es deseable la posterior disociación del par de complemento/anti-complemento, el par de complemento/anti-complemento preferiblemente tiene una afinidad e unión de $<10^9 \text{ M}^{-1}$.

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de una secuencia de ADN novedosa que codifica un polipéptido homólogo del factor de crecimiento de fibroblasto (FGF) que tienen homología a FGF-8. El análisis de la distribución de tejido del mRNA corresponde a este ADN novedoso que muestra que la expresión es mayor en el tejido cardíaco fetal y el tejido cardíaco de adultos, seguido por niveles de expresión evidentes pero reducidos en pulmón fetal, músculo esquelético, tejidos de músculo liso tal como intestino delgado, colon y tráquea. El polipéptido homólogo FGF se ha designado zFGF-5.

Los polipéptidos zFGF-5 novedosos de la presente invención se identifican inicialmente al presentar una base de datos EST para los factores de crecimiento. Una secuencia EST única se descubre y predice que se

relaciona con la familia FGF. El polipéptido homólogo FGF novedoso codificado por el cADN de longitud completa contiene un motivo de la Fórmula: CFXEX{6}Y, en donde X es cualquier aminoácido y X{} es el número de aminoácidos X mayores de uno. Este motivo ocurre en todas las membranas conocidas de la familia FGF y es único para estas proteínas.

5 La secuencia de nucleótido del cADN zFGF-5 se describe en la SEQ ID NO. 1, y esta secuencia de aminoácido deducida se describe en la SEQ ID NO. 2. Cuando el residuo de aminoácido 28 (Glu) al residuo de aminoácido 181 (Gln) de la SEQ ID NO: 2 se compara con la región correspondiente de FGF-8 (Ver Figuras 1 y 2) la secuencia de aminoácido alineada y deducida tiene aproximadamente 56% de identidad.

10 El polipéptido novedoso codificado por el polinucleótido descrito aquí contiene el motivo CFXE{6}Y presente en todos los miembros de la familia FGF. Los motivos CFXE{6}Y son altamente conservados. Una secuencia de aminoácido consensus del dominio CFXEX{6}Y incluye el factor 1 homólogo al factor de crecimiento de fibroblasto humano (FHF-1; Smallwood et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9850-9857, 1996), el factor activante de miocito humano (FGF-10; HSU76381, identificador GENBANK, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), factor 4 homólogo al factor de crecimiento de fibroblasto humano (FHF-4; Smallwood et al., 1996, *ibid.*), factor 2 homólogo al factor de crecimiento de fibroblasto humano (FHF-2; Smallwood et al., 1996, *ibid.*), factor 3 homólogo al factor de crecimiento de fibroblasto humano (FHF-3; Smallwood et al., 1996, *ibid.*), FGF-4 humano (Basilico et al., Adv. Cancer Res. 59: 115-165, 1992), FGF-6 humano (Basilico et al., 1992, *ibid.*), FGF-2 humano (básico; Basilico et al., 1992, *ibid.*), FGF-1 humano (ácido; Basilico et al., 1992, *ibid.*), factor 2 de crecimiento de queratinocito humano (KGF-2; identificador HSU67918 GENBANK, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), precursor del factor de crecimiento de queratinocito humano (FGF-7; Basilico et al., 1992, *ibid.*), zFGF- 5 humano, FGF-8 humano (Gemel et al., Genomics 35:253-257, 1996), FGF-5 humano (Basilico et al., 1992, *ibid.*), FGF- 9 humano (Miyamoto et al., Mol. Cell. Biol. 13:4251-4259, 1993), y FGF-3 humano (Basilico et al., 1992, *ibid.*)

25 El análisis del cADN que codifica un polipéptido zFGF-5 (SEQ ID NO: 1) revela un marco de lectura abierta que codifica 207 aminoácidos (SEQ ID NO: 2) que comprende un polipéptido maduro de 180 aminoácidos (residuo 28 al residuo 207 de la SEQ ID NO: 2). La alineación múltiple de zFGF-5 con otros FGF conocidos revela un bloque de alto porcentaje de identidad que corresponde al residuo de aminoácido 127 (Cys) al residuo de aminoácido 138 (Tyr), of SEQ ID NO: 2 y se muestra en la Figura. Varios de los miembros de la familia FGF no tienen secuencias de señal.

30 Los miembros de la familia FGF se caracterizan por los dominios de unión de heparina. Un dominio de unión a heparina putativo para zFGF-5 se ha identificado en la región del residuo de aminoácido 148 (Gly) al residuo de aminoácido 169 (Gln) de la SEQ ID NO: 2. Se postula que la señalización mediada por el receptor se inicia luego de la unión al complejo de ligando FGF con los proteoglicanos de sulfato de heparina de superficie celular. Muchos miembros de la familia FGF se pueden colocar en una de las dos familias relacionadas en la base de sus estructuras y de sus funciones. El aFGF y bFGF consisten de tres exones separados por dos intrones de longitud variable. El FGF-8 consiste de cinco exones, los primeros tres los cuales corresponden al primer exón de aFGF y bFGF. Todos los miembros de la familia FGF conocidos se dividen para formar polipéptidos únicos.

40 La SEQ ID NO: 6 es una secuencia de polinucleótido degenerada que abarca todos los polinucleótidos que pueden codificar el polipéptido zFGF-5 de la SEQ ID NO: 2 (aminoácidos 1 o 28 a 207). Así, los polinucleótidos que codifican el polipéptido zFGF-5 varían del nucleótido 1 o 82 al nucleótido 621 de la SEQ ID NO: 6 se describen aquí. También se describen aquí fragmentos y fusiones como se describió anteriormente con respecto a la SEQ ID NO: 1, que se forman de regiones análogas de la SEQ ID NO: 6, en donde los nucleótidos 82 a 621 de la SEQ ID NO: 6 corresponden a los nucleótidos 82 a 621 de la SEQ ID NO: 1, para el que codifica una molécula zFGF-5 madura.

Los símbolos en la SEQ ID NO: 6 se resumen en la Tabla 1 adelante.

TABLA 1

Nucleótido	Resoluciones	Complemento	Resoluciones
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

ES 2 357 215 T3

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

Los codones degenerados utilizados en la SEQ ID NO: 6, que abarcan todos los codones posibles para un aminoácido dado, se establecen en la Tabla 2 adelante.

TABLA 2

Aminoácido	Letra	Codones	Codón degenerado
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	AAV
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
Cualquiera	X		NNN
Gap	-	---	

5 Una persona medianamente experta en la técnica apreciará que se introduce alguna ambigüedad para determinar un codón degenerado, representativo de todos los codones posibles que codifican cada aminoácido. Por

ejemplo, el codón degenerado para serina (WSN) puede, en algunas circunstancias, codificar arginina (AGR), y el codón degenerado para arginina (MGN) puede, en algunas circunstancias, codificar serina (AGY). Una relación similar existe entre los codones que codifican fenilalanina y leucina. Así, algunos polinucleótidos abarcados por la secuencia degenerada pueden tener algunos aminoácidos incorrectos, pero una persona medianamente experta en la técnica puede identificar fácilmente tales secuencias erróneas mediante referencia a la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2.

Los aminoácidos altamente conservados en la zFGF-5 se pueden utilizar como una herramienta para identificar nuevos miembros de la familia. Para identificar nuevos miembros de la familia en la base de datos EST, se puede utilizar el motivo conservado CXXEX{6}Y. En otro método utilizando las sondas de polinucleótido y los métodos de hibridación, el ARN obtenido de una variedad de fuentes de tejido se puede utilizar para generar colecciones de cADN y sondear estas colecciones para los nuevos miembros de la familia. En particular, se puede utilizar la reacción de cadena polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) para amplificar las secuencias que codifican los cebadores de ADN altamente degenerados diseñados desde las secuencias correspondientes al residuo de aminoácido 127 (Cys) al residuo de aminoácido 138 (Tyr) de la SEQ ID NO: 2.

Los polinucleótidos aislados pueden servir como una sonda e hibridar en regiones de tamaño similares de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia complementaria a esta, bajo condiciones exigentes. En general, las condiciones exigentes se seleccionan por ser aproximadamente 5°C menores que el punto de ebullición térmico (T_m) para la secuencia específica en una resistencia iónica definida y pH. El T_m es la temperatura (bajo resistencia iónica y pH definido) en el cual 50% de la secuencia objetivo hibrida una sonda perfectamente coincidente. Las condiciones exigentes típicas son aquellas en las cuales la concentración de sal es por lo menos aproximadamente 0.02 M a pH 7 y la temperatura es por lo menos aproximadamente 60°C.

Como se notó previamente, los polinucleótidos aislados incluyen ADN y ARN. Los métodos para aislar el ARN y el ADN son bien conocidos en la técnica. Se prefiere generalmente aislar el ARN del tejido cardiaco, aunque el ADN también se puede preparar utilizando ARN de otros tejidos o aislar como ADN genómico. El ARN total se puede preparar utilizando extracción de HCl guanidina seguido por aislamiento mediante centrifugación en un gradiente CsCl (Chirgwin et al., *Biochemistry* 18:52-94, 1979). El ARN Poli (A)+ RNA se prepara del ARN total utilizando el método de Aviv y Leder (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:1408-1412, 1972). El ADN complementario (cADN) se prepara de ARN poli(A)+ utilizando métodos conocidos. Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos zFGF-5 luego se identifican y se aíslan mediante, por ejemplo, hibridación o PCR.

La especificación describe polipéptidos contraparte y polinucleótidos de otras especies (ortólogos o parálogos). Son de interés particular los polipéptidos zFGF-5 de otras especies de mamífero, que incluye proteínas de murino, rata, porcino, ovino, bovino, canino, felino, equino y otros primates. La identificación de los parálogos de la secuencia humana es de interés particular debido a que se han identificado los 8 parálogos de murino FGF-8, solo se conocen 4 parálogos humanos. Los parálogos humanos o homólogos de especies de las proteínas humanas se pueden clonar utilizando la información y las composiciones proporcionadas por la presente invención en combinación con técnicas de clonación convencionales. Por ejemplo, un cADN se puede clonar utilizando mARN obtenido de un tejido o tipo de célula que expresa la proteína. Las fuentes adecuadas de mARN se pueden identificar mediante sondeo Northern blot con sondas diseñadas de las secuencias descritas aquí. Una colección luego se prepara de mARN de un tejido positivo o estirpe celular. Un cADN que codifica zFGF-5 luego se puede aislar mediante una variedad de métodos, tal como al sondear con un cADN humano completo o parcial o con uno o más conjuntos de sondas degeneradas con base en las secuencias descritas. Un cADN también se puede clonar utilizando la reacción de cadena polimerasa, o PCR (Mullis, Patente Estadounidense 4,683,202), utilizando los cebadores diseñados de las secuencias descritas aquí. Dentro de un método adicional, la colección de cADN se puede utilizar para transformar o transfectar células anfitrionas, y la expresión del cADN de interés se puede detectar con un anticuerpo para zFGF-5. Las técnicas similares también se pueden aplicar al aislamiento de clones genómicos.

Aquellos expertos en la técnica reconocerán que las secuencias descritas en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 representan un alelo único del gen humano zFGF-5 y el polipéptido, y que la variación alélica y la división alternativa se espera que ocurran. Las variantes alélicas se pueden clonar al sondear cADN o colecciones genómicas de diferentes individuos de acuerdo con procedimientos estándar. Las variantes alélicas de la secuencia de ADN se muestran en la SEQ ID NO: 1, que incluye aquellas que contienen mutaciones imperceptibles y aquellos en los cuales las mutaciones resulta en cambios en la secuencia de aminoácido, se describen aquí, como lo son proteínas que son las variantes alélicas de la SEQ ID NO: 2.

La especificación también describe polipéptidos aislados zFGF-5 que son sustancialmente homólogos a los polipéptidos de la SEQ ID NO: 2 y sus homólogos de especie/ ortólogos. El término "sustancialmente homólogo" se utiliza aquí para denotar polipéptidos que tienen 50%, preferiblemente 60%, más preferiblemente por lo menos 80%, la identidad de secuencia para las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 2 o sus ortólogos o parálogos. Tales polipéptidos serán más preferiblemente por lo menos 90% idénticos, y más preferiblemente 95% o más idénticas a la SEQ ID NO: 2 o sus ortólogos o parálogos. El porcentaje de identidad de secuencia se determina mediante métodos convencionales. Ver, por ejemplo, Altschul et al., *Bull. Math. Bio.* 48: 603-616, 1986 y Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-10919, 1992. En resumen, se alinean dos secuencias de aminoácido para optimizar las clasificaciones de alineación utilizando una penalidad de abertura de espacio de 10, una penalidad de extensión de

espacio de 1, y la matriz de clasificación "blosum 62" de Henikoff y Henikoff (ibid.) como se muestra en la Tabla 3 (los aminoácidos se indica por los códigos de una letra estándar). El porcentaje de identidad luego se calcula como:

Tabla 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	-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

Total número de emparejamientos idénticos x 100

$$5 \quad \frac{[\text{longitud de la secuencia mayor más el número de espacios introducidos en la secuencia más larga con el fin de alinear las dos secuencias}]}{\text{de espacios introducidos en la secuencia más larga}}$$

La identidad de secuencia de las moléculas de polinucleótido se determina mediante métodos similares utilizando una relación como se describió anteriormente.

10 Las proteínas sustancialmente homólogas y los polipéptidos se caracterizan como que tienen una o más sustituciones, eliminaciones o adicionales de aminoácido. Estos cambios son preferiblemente de una naturaleza menor, que es sustituciones de aminoácido conservadoras (ver Tabla 4) y otras sustituciones no afectan significativamente el plegamiento o actividad de la proteína o polipéptido; eliminaciones pequeñas, típicamente de una de aproximadamente 30 aminoácidos; y extensiones de terminal amino- o carboxilo pequeñas, tal como un residuo metionina de terminal amino, un péptido ligador pequeño de hasta aproximadamente 20-25 residuos, o una extensión pequeña que facilita la purificación (una etiqueta de afinidad), tal como un tracto polihistidina, proteína A (Nilsson et al., EMBO J. 4:1075, 1985; Nilsson et al., Methods Enzymol. 198:3, 1991), glutathione S transferasa (Smith and Johnson, Gene 67:31, 1988), proteína de unión maltosa (Kellerman and Ferenci, Methods Enzymol. 90:459-463, 1982; Guan et al., Gene 67:21-30, 1987), o otros epítomos antigénicos o dominio de unión. Ver, en general Ford et al., Protein Expression and Purification 2: 95-107, 1991, que se incorpora aquí como referencia. Los ADN que codifican las etiquetas de afinidad están disponibles de proveedores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; New England Biolabs, Beverly, MA).

Tabla 4

Sustituciones de aminoácido conservativa

Básico:	Arginina
	Lisina
	Histidina
Acídico:	ácido glutámico
	ácido aspártico
Polar:	glutamina
	asparagina
Hidrofóbico:	Leucina
	isoleucina
	Valina
Aromático:	fenilalanina
	Triptofan
	Tirosina
Pequeño:	Glicina
	Alanita
	Serina
	Treonina
	metionina

Las proteínas también pueden comprender, en adición a los 20 aminoácidos estándar, residuo de aminoácido de ocurrencia no natural. Los aminoácidos de ocurrencia no natural incluyen, sin limitación, trans-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, cis- 4-hidroxiprolina, trans-4-hidroxiprolina, N-metil-glicina, allo-treonina, metiltreonina, hidroxietil-cisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido piperídico, terc-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3- azafenilalanina, 4-azafenil-alanina, 4-fluorofenilalanina, 4-hidroxiprolina, 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y α -metil serina. Se conocen en la técnica varios métodos para incorporar los residuos de aminoácido de ocurrencia no natural en proteínas. Por ejemplo, se puede emplear un sistema in vitro en donde se suprimen mutaciones no codificantes utilizando los tARN supresores químicamente aminoacilados. Los métodos para sintetizar los aminoácidos y el tARN aminoacilante se conocen en la técnica. La transcripción y traducción de los plásmidos que contiene mutaciones no codificantes se llevan a cabo en un sistema libre de célula que comprende un extracto E. coli S30 y enzimas comercialmente disponibles y otros reactivos. Las proteínas se purifican mediante cromatografía. Ver, por ejemplo, Robertson et al., J. Am. Chem. Soc. 113:2722, 1991; Ellman et al., Meth. Enzymol. 202:301, 1991; Chung et al., Science 259:806-09, 1993; y Chung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10145-49, 1993). En un segundo método, la traducción se lleva a cabo en oocitos Xenopus mediante microinyección del mRNA mutado y los tARN supresores químicamente aminoacilados (Turcatti et al., J. Biol. Chem. 271:19991-98, 1996). Dentro de un tercer método, las células E. coli se cultivan en la ausencia de un aminoácido natural que se reemplaza (por ejemplo, fenilalanina) y en la presencia de los aminoácidos de ocurrencia no natural deseados (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4- azafenilalanina, o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido de ocurrencia no natural se incorpora en la proteína en lugar de su contraparte natural. Ver, Koide et al., Biochem. 33: 7470-76, 1994. Los residuos de aminoácido de ocurrencia no natural se pueden convertir a especies de ocurrencia no natural mediante la modificación química in vitro. La modificación química se puede combinar con mutagenia dirigida a sitio para expandir adicionalmente el rango de las sustituciones (Wynn and Richards, Protein Sci. 2: 395-403, 1993).

Los aminoácidos esenciales en los polipéptidos zFGF-5 de la presente invención se pueden identificar de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica, tal como mutagenia dirigida a sitio o mutagenia de exploración de alanina (Cunningham and Wells, Science 244: 1081-1085, 1989). En la última técnica, las mutaciones de alanina únicas se introducen en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se prueban para actividad biológica (por ejemplo, la proliferación de miocitos cardiacos o fibroblastos, o la estimulación de la formación ósea) para identificar los residuos de aminoácido que son críticos para la actividad de la molécula. Ver también, Hilton et al., J. Biol. Chem. 271:4699-4708, 1996. Los sitios de interacción de ligando-receptor también se pueden determinar mediante análisis físico de la estructura, como se determina mediante tales técnicas como

resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrón o marcado de fotoafinidad, en conjunto con la mutación de los aminoácidos de sitio de contacto putativo. Ver, por ejemplo, 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. Las identidades de aminoácidos esenciales también se pueden inferir de análisis de homología con los FGF relacionados y se muestran en las Figuras 1 y 2.

El análisis de la secuencia de aminoácido de zFGF-5 revela un sitio básico en el terminal C del polipéptido (el residuo de aminoácido 196-197 (Lys-Arg)). Un polipéptido truncado terminal C que comprende una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2, del residuo de aminoácido 28 (Glu) al residuo de aminoácido 196 (Lys) se demuestra por tener actividad biológica. Los aminoácidos básicos, tal como, Arg-X-X-Arg (en donde X es cualquier residuo de aminoácido), Arg-Arg o Lys-Arg; se somete a la división mediante varias enzimas, que incluye, pero no se limita a, trombina y carboxipeptidasas. Por lo tanto, está dentro de las reivindicaciones hacer cambios conservativos en los residuos de aminoácido básicos, en particular los residuos básicos en los residuos de aminoácido 196 y 197 (Lys y Arg, respectivamente) de la SEQ ID NO: 2.

Con base en el análisis de la familia FGF una molécula truncada terminalmente C que comprende el residuo de aminoácido 28 (Glu) al residuo 175 (Met) de la SEQ ID NO: 2 puede ser biológicamente activa. Un enlace de disulfuro intramolecular se predice que ocurre entre el residuo de aminoácido 109 (Cys) y residuo 129 (Cys) de la SEQ ID NO: 2.

Con base en las alineaciones de homología con las estructuras de cristal FGF-1 y FGF-2 (Eriksson et al., *Prot. Sci.* 2:1274, 1993), las predicciones de estructura secundaria para la estructura de cadena beta del zFGF-5 se correlaciona con los residuos de aminoácido 56-59, 64-69, 73-76, 85-92, 96-102, 106-111, 115-119, 128-134, 138-144, 149-155, y 173-177 de la SEQ ID NO: 2. Los aminoácidos críticos para la unión de zFGF-5 a los receptores se pueden identificar mediante mutagenia dirigida a sitio del polipéptido zFGF-5 completo. Más específicamente, ellos se pueden identificar utilizando mutagenia dirigida a sitio de los aminoácidos en el polipéptido zFGF-5 que corresponde a los residuos de aminoácidos en FGF ácido (FGF1) y FGF básico (FGF2) identificado como crítico para la unión de estos FGF a sus receptores (Blaber et al., *Biochem.* 35:2086-2094, 1996). Estos aminoácidos incluyen Tyr33, Arg53, Asn110, Tyr112, Lys119, Trp123, Leu149 y Met151 en FGF2 humano, y Tyr30, Arg50, Asn107, Tyr109, Lys116, Trp122, Leu148 y Leu150 en FGF1 humano, como se muestra en la Fig.1 y Fig.2. Los aminoácidos correspondientes en zFGF-5, como se muestra en la Fig.1 y Fig.2, serían Tyr58, Gly77, Asn136, Tyr138, Lys145, Trp149, Met175 y Arg177. Un experto en la técnica reconocerá que otros miembros, completos o en parte, de la familia FGF pueden tener similitudes estructurales o bioquímicas para zFGF-5, y se pueden sustituir haciendo tales análisis. Tales regiones serían importantes para las funciones biológicas de la molécula.

Se pueden hacer múltiples sustituciones de aminoácido y se prueban utilizando los métodos conocidos de la mutagenia y la detección, tal como aquellos descritos por Reidhaar-Olson y Sauer (*Science* 241:53-57, 1988) o Bowie y Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2152-2156, 1989). En resumen, estos autores describen métodos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionado para el polipéptido funcional, y luego el secuenciamiento de los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de las sustituciones permitibles en cada posición. Otros métodos que se pueden utilizar incluyen exhibición de fago (por ejemplo, Lowman et al., *Biochem.* 30:10832-10837, 1991; Ladner et al., Patente Estadounidense No. 5,223,409; Huse, Publicación WIPO WO 92/06204) y mutagenia dirigida a región (Derbyshire et al., *Gene* 46:145, 1986; Ner et al., *DNA* 7: 127, 1988).

Los métodos de mutagenia como se describió anteriormente se puede combinar con métodos de detección automática, de alto rendimiento para detectar la actividad de los polipéptidos mutagenizados, clonados en células anfitrionas. Las moléculas de ADN mutagenizada que codifican los polipéptidos activos (por ejemplo, proliferación celular) se pueden recuperar de las células anfitrionas y secuenciar rápidamente utilizando el equipo moderno. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de los residuos de aminoácido individuales en un polipéptido de interés, y se puede aplicar a los polipéptidos de estructura no conocida.

Utilizando los métodos discutidos anteriormente, una persona medianamente experta en la técnica puede identificar y/o preparar una variedad de polipéptidos que son sustancialmente homólogos a los residuos 28 (Glu) a 196 (Lys) o residuos 28 (Glu) a 207 (Ala) de la SEQ ID NO: 2, sus variantes alélicas, o sus fragmentos biológicamente activos, y retener las propiedades proliferativas de la proteína tipo natural. Tales polipéptidos también pueden incluir los segmentos de polipéptido adicionales como generalmente se describió anteriormente.

Los polipéptidos de la presente invención, que incluyen las proteínas de longitud completa, sus fragmentos y las proteínas de fusión, se pueden producir en células anfitrionas construidas genéticamente por ingeniería de acuerdo con técnicas convencionales. Las células anfitrionas adecuadas son aquellos tipos de células que se pueden transformar o transfectar con ADN exógeno y crecimiento en el cultivo, e incluyen bacterias, células de hongos, y células eucarióticas mayores cultivadas. Se prefieren las células eucarióticas, particularmente las células cultivadas de organismos multicelulares. Las técnicas para manipular las moléculas de ADN clonadas e introducir el ADN exógeno en una variedad de células anfitrionas se describen por Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2da ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, y Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987, que se incorporan aquí como referencia.

En general, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido zFGF-5 de la presente invención se liga operablemente a otros elementos genéticos requeridos para su expresión, que incluye generalmente un promotor de transcripción y terminador dentro de un vector de expresión. El vector también contendrá comúnmente uno o más marcadores seleccionables y uno o más orígenes de replicación, aunque aquellos expertos en la técnica reconocerán que dentro de ciertos marcadores de sistemas seleccionables se puede proporcionar en vectores separados, y la replicación del ADN exógeno se puede proporcionar mediante la integración en el genoma de célula anfitriona. La selección de promotores, terminadores, marcadores seleccionables, vectores y otros elementos es una materia del diseño de rutina dentro del nivel del experto en la técnica. Muchos tales elementos se describen en la literatura y están disponibles a través de los proveedores comerciales.

Para dirigir un polipéptido zFGF-5 en la ruta secretora de una célula anfitriona, una secuencia de señal secretora (también conocida como una secuencia líder, prepro secuencia o pre secuencia) se proporciona en el vector de expresión. La secuencia de señal secretora puede ser la secuencia nativa, o una quimera que comprende una secuencia de señal derivada de otra proteína secretada (por ejemplo, t-PA y α -pre-pro secretora líder) o se sintetiza de novo. La secuencia de señal secretora se une a la secuencia de ADN zFGF-5 en la estructura de lectura correcta. Las secuencias de señales secretoras se posicionan comúnmente 5' en la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, aunque ciertas secuencias de señal se pueden posicionar en cualquier parte en la secuencia de ADN de interés (ver, por ejemplo, Welch et al., Patente Estadounidense No. 5, 037, 743; Holland et al., Patente Estadounidense No. 5,143,830).

Se describe un plásmido aceptor universal que se puede utilizar para clonar un ADN que codifica cualquier polipéptido de interés, que incluye fusiones de polipéptido. El plásmido aceptor es útil dentro de un método para preparar una molécula de ADN circular, bicatenaria. El método comprende las etapas de (a) proporcionar un fragmento de ADN donante bicatenario que codifica un polipéptido de interés; (b) proporcionar un plásmido aceptor lineal, bicatenario que tiene primeros y segundos extremos como que comprenden un marcador seleccionable y secuencia de replicación que son funcionales en *Saccharomyces cerevisiae*, en donde, el plásmido aceptor es esencialmente libre de ADN que codifica el polipéptido de interés; (c) proporcionar un ligador de ADN bicatenario que comprende un primer segmento idéntico en la secuencia a una primera región del plásmido aceptor y un segundo segmento idéntico en la secuencia a una primera región del fragmento de ADN donante, en donde cada uno del primer y segundo segmentos del primer ligador es por lo menos 10 bp en longitud; (d) proporcionar un ligador de ADN bicatenario que comprende un primer segmento idéntico en la secuencia a una segunda región del plásmido aceptor y un segundo segmento idéntico en la secuencia a una segunda región del fragmento de ADN donante, en donde cada uno del primer y segundo segmentos del segundo ligador es por lo menos 10 bp en longitud; y (e) combinar el fragmento de ADN donante, plásmido aceptor, primer ligador de ADN, y segundo ligador de ADN en una célula anfitriona *Saccharomyces cerevisiae* por lo cual el fragmento de ADN donante se une al plásmido aceptor mediante recombinación homóloga del ADN donante, plásmido aceptor, y ligadores para formar un plásmido circular, cerrado. El plásmido aceptor comprende adicionalmente un promotor de transcripción proximal al primer extremo, y el fragmento de ADN donante se liga operablemente al promotor de transcripción dentro del plásmido circular, cerrado. El plásmido aceptor comprende adicionalmente un segmento de ADN que codifica un péptido líder y/o uno o más Segmentos de ADN que codifica una etiqueta de péptido, posicionada de tal manera que estos segmentos de ADN se ligan operablemente al fragmento de ADN donante dentro del plásmido circular, cerrado. Dentro de una realización preferida, el plásmido aceptor comprende adicionalmente (a) un promotor, un segmento de ADN que codifica un péptido líder, y un segmento de ADN que codifica una primera etiqueta de péptido, en donde el segmento de ADN que codifica un péptido líder se posiciona entre el promotor y el segmento de ADN que codifica una primera etiqueta de péptido proximal al primer extremo del plásmido aceptor, en donde el promotor, Segmento de ADN que codifica un péptido líder, y segmento de ADN que codifica una primera etiqueta de péptido se ligan operablemente; y (b) un segmento de ADN que codifica una segunda etiqueta de péptido proximal al segundo extremo del plásmido aceptor.

Un método para preparar una molécula de ADN circular, bicatenaria que comprende las etapas de (a) proporcionar una pluralidad de fragmentos de ADN donante bicatenarios sobrelapantes que codifican colectivamente un polipéptido de interés; (b) proporcionar un plásmido aceptor lineal, bicatenario que tiene los primeros y segundos extremos como que comprende un marcador seleccionable y secuencia de replicación que son funcionales en *Saccharomyces cerevisiae*, en donde el plásmido aceptor es esencialmente libre de ADN que codifica el polipéptido de interés; (c) proporcionar un ligador de ADN bicatenario que comprende un primer segmento idéntico en la secuencia a una primera región del plásmido aceptor y un segundo segmento idéntico en la secuencia a una primera región de uno de los fragmentos de ADN donante, en donde cada uno del primer y segundo segmentos del primer ligador es por lo menos 10 bp en longitud; (d) proporcionar un ligador de ADN bicatenario que comprende un primer segmento idéntico en la secuencia a una segunda región del plásmido aceptor y un segundo segmento idéntico en la secuencia en una región de otros de los fragmentos de ADN donante, en donde cada uno del primer y segundo segmentos del segundo ligador es por lo menos 10 bp en longitud; y (e) combinar el fragmento de ADN donantes, plásmido aceptor, primer ligador de ADN, y se describe el segundo ligador de ADN en una célula anfitriona *Saccharomyces cerevisiae* por lo cual el fragmento de ADN donantes se unen al plásmido aceptor mediante recombinación homóloga para formar un plásmido circular, cerrado que comprende una región que codifica el polipéptido de interés. El plásmido aceptor comprende adicionalmente uno o más de un promotor de transcripción, un segmento de ADN que codifica un péptido líder, y uno o más segmentos de ADN que codifica una etiqueta de péptido como se describió anteriormente.

Las células fúngicas, que incluye células de levadura, y particularmente células del género *Saccharomyces* o *Pichia*, se prefieren particularmente para anfitriones para producir los fragmentos zFGF-5 o las fusiones de polipéptido.

5 Otros métodos para transformar células de levadura con ADN exógeno y producir polipéptidos recombinantes de las mismas se describen mediante, por ejemplo, Kawasaki, Patente Estadounidense No. 4,599,311; Kawasaki et al., Patente Estadounidense No. 4,931,373; Brake, Patente Estadounidense No. 4,870,008; Welch et al., Patente Estadounidense No. 5,037,743; y Murray et al., Patente Estadounidense No. 4,845,075, que se incorporan aquí como referencia. Las células transformadas se seleccionan mediante fenotipo determinado por el marcador seleccionable, comúnmente resistencia al fármaco o la capacidad de crecer en la ausencia de un nutriente particular (por ejemplo, leucina). Un sistema de vector preferido alternativo para uso en la levadura es el sistema de vector POT1 descrito por Kawasaki et al. (Patente Estadounidense No. 4,931,373), que permite seleccionar células transformadas mediante crecimiento en medio que contiene glucosa. Los promotores o terminadores adecuados para uso en levadura incluyen aquellos de genes de enzima glicolítica (ver, por ejemplo, Kawasaki, Patente Estadounidense No. 4,599,311; Kingsman et al., Patente Estadounidense No. 4,615,974; y Bitter, Patente Estadounidense No. 4,977,092, que se incorporan aquí como referencia) y genes deshidrogenasa alcohol. Ver también Patente Estadounidenses Nos. 4,990,446; 5,063,154; 5,139,936 y 4,661,454, se conoce en la técnica que los sistemas de transformación para otras levaduras, incluyen *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia guilliermondii*, y *Candida maltosa*. Un sistema particularmente preferido utiliza *Pichia metanólica* (ver, aplicación PCT WO 9717450). Para sistemas de transformación alternativa, ver, por ejemplo, Gleeson et al., *J. Gen. Microbiol.* 132:3459-3465, 1986 y Cregg, Patente Estadounidense No. 4,882,279. Se pueden utilizar células *aspergillus* de acuerdo con los métodos de McKnight et al., Patente Estadounidense No. 4,935,349. Los métodos para transformar *Acremonium chrysogenum* se describen mediante Sumino et al., Patente Estadounidense No. 5,162,228. Se describen métodos para transformar *Neurospora* por Lambowitz, Patente Estadounidense No. 4,486,533.

25 Las células de mamífero cultivadas también se prefieren anfitriones dentro de la presente invención. Los métodos para introducir el ADN exógeno en células anfitrionas de mamífero incluyen transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler et al., *Cell* 14:725, 1978; Corsaro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7:603, 1981; Graham y Van der Eb, *Virology* 52:456, 1973), electroporación (Neumann et al., *EMBO J.* 1:841-845, 1982), transfección mediada por dextrano DEAE (Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987), y transfección mediada por liposoma (Hawley- Nelson et al., *Focus* 15:73, 1993; Ciccarone et al., *Focus* 15:80, 1993). La producción de polipéptidos recombinantes en células de mamífero cultivadas se describe, por ejemplo, mediante Levinson et al., Patente Estadounidense No. 4,713,339; Hagen et al., Patente Estadounidense No. 4,784,950; Palmiter et al., Patente Estadounidense No. 4,579,821; y Ringold, Patente Estadounidense No. 4,656,134. Las células de mamífero cultivadas preferidas incluyen las estirpes celulares 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) y ovario de hámster Chino (por ejemplo CHO-K1; ATCC No. CCL 61). Se conocen en la técnica estirpes celulares adecuadas adicionales y están disponibles de depósitos tal como the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. En general, se prefiere promotores de transcripción fuerte, tal como promotores de SV-40 o citomegalovirus. Ver, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 4,956,288. Otros promotores adecuados incluyen aquellos genes de metalotioneina (Patente Estadounidense Nos. 4,579,821 y 4,601,978) y el promotor tardío principal de adenovirus.

45 La selección del fármaco se utiliza generalmente para seleccionar células de mamífero cultivadas en las que se ha insertado el ADN extraño. Tales células se denominan comúnmente como "transfectantes". Las células que se han cultivado en la presencia del agente selectivo y son capaces de pasar al gen de interés a su progenie se denominan como "transfectantes estables." Un marcador seleccionado preferido es un gene que codifica la resistencia al antibiótico de neomicina. La selección se lleva a cabo en la presencia de un fármaco tipo neomicina, tal como G-418 o similares. También se puede utilizar sistemas de selección para incrementar el nivel de expresión del gen de interés, un proceso se denomina como "amplificación." La amplificación se lleva a cabo al cultivar transfectantes en la presencia de un nivel bajo del agente selectivo y luego incrementar la cantidad del agente selectivo para seleccionar células que producen altos niveles de los productos de los genes introducidos. Un marcador seleccionado amplificable preferido es dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia al metotrexato. También se pueden utilizar otros genes de resistencia al fármaco (por ejemplo, resistencia a la higromicina, resistencia multifármaco, puromicina acetiltransferasa).

55 También se pueden utilizar otras células eucarióticas mayores como anfitriones, que incluye células de insecto, células de planta y células de aves. Las transformación de las células de insecto y la producción de polipéptidos extraños allí se describe por Guarino et al., Patente Estadounidense No. 5,162,222; Bang et al., Patente Estadounidense No. 4,775,624; y publicación WIPO WO 94/06463. El uso de *Agrobacterium rhizogenes* como un vector para expresar genes en células de planta se ha revisado por Sinkar et al., *J. Biosci.* (Bangalore) 11: 47-58, 1987.

60 Las células anfitrionas transformadas o transfectadas se cultivan de acuerdo con los procedimientos convencionales en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de las células anfitrionas seleccionadas. Una variedad de medios adecuados, que incluye el medio definido y el

medio de complejo, se conocen en la técnica e incluyen generalmente una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. El medio también puede contener tales componentes como factores de crecimiento o suero, según se requiera. El medio de crecimiento seleccionará generalmente células que contienen el ADN exógenamente agregado mediante, por ejemplo, selección o deficiencia de fármaco en un nutriente esencial que se complementa por el marcador seleccionable llevado dentro del vector de expresión o cotransfectado en la célula anfitriona.

Los polipéptidos zFGF-5 recombinantes expresados (o polipéptidos zFGF-5 quiméricos) se pueden purificar utilizando métodos y medios de fraccionamiento y/o purificación convencional. La precipitación de sulfato de amonio y ácido o la extracción de caotrope se puede utilizar para el fraccionamiento de las muestras. Las etapas de purificación de ejemplo pueden incluir cromatografía líquida de alto desempeño de fase inversa, hidroxapatita, de tamaño de exclusión y FPLC. El medio de intercambio de anión adecuado incluye dextranos derivados, agarosa, celulosa, poli(acrilamida), sílices especiales, y similares. Se prefieren PEI, DEAE, QAE y se prefieren particularmente derivados Q, con Sefarosa de Flujo Rápido DEAE (Pharmacia, Piscataway, NJ). El medio cromatográfico de ejemplo incluye aquellos medios derivados con grupos fenilo, butilo, o octilo, tal como Fenil-Sefarosa FF (Pharmacia), Tocoferil butilo 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octil-Sefarosa (Pharmacia) y similares; o resinas poli(acrílicas), tal como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Los soportes sólidos adecuados incluyen glóbulos de vidrio, resinas con base en sílice, resinas celulósicas, glóbulos de agarosa, glóbulos de azarosa reticulada, glóbulos de poliestireno, resinas de poli(acrilamida) reticulada y similares que son insolubles bajo las condiciones en las que ellas se utilizan. Estos soportes se pueden modificar con grupos reactivos que permite la adhesión de las proteínas mediante los grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o grupos funcionales de carbohidrato. Ejemplos de químicas de acoplamiento incluyen activación de bromuro cianógeno, activación de N-hidroxisuccinimida, activación de epóxido, activación de sulfhidrilo, activación de hidrazida, y derivados carboxilo y amino para químicas de acoplamiento carbodiimida. Estos y otros medios sólidos son bien conocidos y se utilizan ampliamente en la técnica, y están disponibles de proveedores comerciales. Los métodos para la unión de los polipéptidos del receptor soportan medios que son bien conocidos en la técnica. La selección de un método particular es una materia de diseño de rutina y se determina en parte por las propiedades del soporte seleccionado. Ver, por ejemplo, *Affinity Chromatography: Principles & Methods*, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988.

Los polipéptidos de la presente invención también se pueden aislar mediante explotación de sus propiedades de unión de heparina. Para una revisión, ver, Burgess et al., *Ann. Rev. of Biochem.* 58:575-606, 1989. Los miembros de la familia FGF se pueden purificar para homogeneidad evidente mediante cromatografía de afinidad de heparina-Sefarosa (Gospodarowicz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6963-6967, 1984) y se eluye utilizando gradientes de etapa lineal de NaCl (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; y Ke et al., *Proteína Expr. Purif.* 3(6):497-507, 1992.)

Otros métodos de purificación incluyen utilizar cromatografía de adsorción de ión de metal inmovilizado (IMAC) para purificar las proteínas ricas en histidina. En resumen, un gel primero se carga con iones de metal divalente para formar un quelato (E. Sulkowski, *Trends in Biochem.* 3:1-7, 1985). Las proteínas ricas en histidina se adsorberá en esta matriz con diferentes afinidades, dependiendo del ión de metal utilizado, y se eluirá mediante elución competitiva, disminución del pH, o uso de agentes quelantes fuertes. Otros métodos de purificación incluyen la purificación de proteínas glicosiladas mediante cromatografía de afinidad lectina y cromatografía de intercambio de ión (*Methods in Enzymol.*, Vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, (ed.), Acad. Press, San Diego, 1990, pp.529-39). Alternativamente, una fusión del polipéptido de interés y una etiqueta de afinidad (por ejemplo, polihistidina, proteína ligada a maltosa, un domino inmunoglobulina) se puede construir para facilitar la purificación.

Se pueden utilizar ventajosamente los procedimientos de replegamiento de la proteína (y opcionalmente reoxidación). Se prefiere purificar la proteína a >80% de pureza, más preferiblemente a >90% de pureza, aún más preferiblemente >95%, y particularmente se prefiere un estado farmacéuticamente puro, que es más de 99.9% pura con respecto a la macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos, y libre de agentes infecciosos y pirogénicos. Preferiblemente, una proteína purificada es sustancialmente libre de otras proteínas, particularmente otras proteínas de origen animal.

También se pueden preparar el polipéptido zFGF-5 o sus fragmentos a través de síntesis química, los polipéptidos zFGF-5 pueden ser monómeros o multímeros; glicosilados o no glicosilados; pegilados o no pegilados; y pueden o no incluir un residuo de aminoácido metionina inicial.

La actividad de las moléculas de la presente invención se puede medir utilizando una variedad de ensayos que, por ejemplo, miden la neogenia o la hiperplasia (es decir, proliferación) de células cardíacas con base en la especificidad de tejido en el corazón del adulto. Las actividades adicionales como las asociadas con los polipéptidos de la presente invención incluyen la proliferación de células endoteliales, cardiomiocitos, fibroblastos, miocitos esqueléticos directamente o indirectamente a través de otros factores de crecimiento; acción como un factor quimiotáxico para células endoteliales, fibroblastos y/o células fagocíticas; factor osteogénico; y factor para expandir la célula madre mesenquimal y las poblaciones precursoras.

La proliferación se puede medir utilizando células cardíacas cultivadas o in vivo al administrar moléculas de la invención reivindicada para el modelo de animal apropiado. Generalmente, los efectos proliferativos se ven como un incremento en el número celular y por lo tanto, pueden incluir la inhibición de apoptosis, así como también mitogenia. Las células cultivadas incluyen fibroblastos cardíacos, miocitos cardíacos, miocitos esqueléticos, células endoteliales de vena umbilical humana de cultivos primarios. Las estirpes celulares establecidas incluyen: fibroblasto NIH 3T3 (ATCC No. CRL-1658), células de corazón chum CHH-1 (ATCC No. CRL-1680), mioblastos de corazón de rata H9c2 (ATCC No. CRL-1446), células de carcinoma mamario Shionogi (Tanaka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89:8928-8932, 1992) y células de adenocarcinoma LNCap.FGC (ATCC No. CRL-1740.) Los ensayos que miden la proliferación celular son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los ensayos que miden la proliferación incluyen tales ensayos como quimiosensibilidad en tinte rojo neutro (Cavanaugh et al., Investigational New Drugs 8:347-354, 1990, incorporado aquí como referencia), la incorporación de nucleótidos radiomarcados (Cook et al., Analytical Biochem. 179:1-7, 1989) incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) en el ADN de células proliferantes (Porstmann et al., J. Immunol. Methods 82:169-179, 1985, incorporada aquí como referencia), y uso de sales tetrazolio (Mosmann, J. Immunol. Methods 65:55-63, 1983; Alley et al., Cancer Res. 48:589-601, 1988; Marshall et al., Growth Reg. 5:69-84, 1995; y Scudiero et al., Cancer Res. 48:4827-4833, 1988).

La diferenciación es un proceso dinámico y progresivo, que empieza con células madre pluripotentes y finaliza con células terminalmente diferenciadas. Las células madre pluripotentes que se pueden regenerar sin un linaje que expresa un conjunto de marcadores de diferenciación se pierden cuando se hace concomitante en un linaje celular. Las células progenitoras expresan un conjunto de marcadores de diferenciación que pueden o no continuar ser expresados cuando el progreso de las células cae por debajo de la ruta de linaje celular hacia la maduración. Los marcadores de diferenciación que se expresan exclusivamente mediante células maduras tienen usualmente propiedades funcionales tal como productos celulares, las enzimas para producir los productos y receptores celulares. La etapa de una diferenciación de población celular se monitorea mediante la identificación de marcadores presentes en la población celular. Se considera que los miocitos, osteoblastos, adipocitos, condrocitos, fibroblastos y células reticulares se originan de una célula madre mesenquimal común (Owen et al., Ciba Fdn. Symp. 136:42-46, 1988). Los marcadores para las células madre mesenquimales no se han identificado bien (Owen et al., J. of Cell Sci. 87:731-738, 1987), ya que la identificación se hace usualmente en las etapas de las células progenitor y madura. La existencia de células progenitoras de miocito cardíacas de etapa temprana (frecuentemente denominadas como células madre de miocito cardíacas) se ha especulado, pero no demostrado, en tejido cardíaco adulto. Los polipéptidos novedosos de la presente invención son útiles para estudios para aislar las células madre mesenquimales y las células progenitoras de miocito cardíacas, in vivo y ex vivo.

Existe evidencia para sugerir que los factores que estimulan los tipos celulares específicos abajo de una ruta hacia la diferenciación terminal o desdiferenciación, que afecta la población celular completa que se origina de un precursor común o célula madre. Así, la presente especificación describe inhibición estimulante o la proliferación de miocitos, células de músculo liso, osteoblastos, adipocitos, condrocitos y células endoteliales. Las moléculas de la presente invención pueden, todavía estimular la proliferación o la diferenciación de miocitos cardíacos, inhibir la proliferación o diferenciación de los adipocitos, por virtud del efecto de sus células precursoras/madre comunes. Así las moléculas descritas aquí tienen uso en inhibir condrosarcomas, aterosclerosis, reestenosis y obesidad.

Los ensayos para medir la diferenciación incluyen, por ejemplo, medir los marcadores de superficie celular asociados con la expresión específica de etapa de un tejido, actividad enzimática, actividad funcional o cambios morfológicos (Watt, FASEB, 5:281-284, 1991; Francis, Differentiation 57:63-75, 1994; Raes, Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses, 161-171, 1989).

Los ensayos in vivo para evaluar la neogenia cardíaca o la hiperplasia incluyen tratamiento neonatal y ratas maduras con las moléculas descritas aquí. La función cardíaca de los animales se mide como el índice cardíaco, presión sanguínea, y salida cardíaca para determinar la función ventricular izquierda. Los métodos post-mortem para evaluar el mejoramiento cardíaco incluyen: peso cardíaco incrementado, volumen de núcleo/citoplásmico, teñido de secciones de histología cardíaca para determinar el antígeno nuclear de célula proliferante (PCNA) vs. los niveles de actina citoplásmica (Quaini et al., Circulation Res. 75:1050-1063, 1994 y Reiss et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8630-8635, 1996.)

Los ensayos in vivo para medir los cambios en los índices de formación ósea incluyen desarrollar histología ósea (ver, Recker, R., eds. Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1983) y tomografía computarizada cuantitativa (QCT; Ferretti, J. Bone 17:3535-364S, 1995; Orphanoludakis et al., Investig. Radiol. 14:122-130', 1979 y Durand et al., Medical Physics 19:569-573, 1992). Un ensayo ex vivo para medir los cambios en la formación ósea serían, por ejemplo, un ensayo calavarial (Gowen et al., J. Immunol. 136:2478-2482, 1986).

Con respecto a modular el balance de energía, particularmente cuando esto se relaciona con el metabolismo de adipocito, la proliferación y diferenciación, los polipéptidos zFGF-5 modulan los efectos en las reacciones metabólicas. Tales reacciones metabólicas incluyen adipogenia, gluconeogenia, glicogenólisis, lipogenia, retoma de glucosa, síntesis de proteína, termogenia, utilización del oxígeno y similares. Entre otros métodos conocidos en la técnica o descritos aquí, se puede evaluar el balance de energía del mamífero al monitorear una o más de las funciones metabólicas mencionadas anteriormente. Estas funciones metabólicas se monitorean mediante técnicas (ensayos o modelos de animal) conocidas por una persona medianamente experta en la técnica, como se

establece más completamente adelante. Por ejemplo, los efectos glucoreguladores de la insulina se ejercen predominantemente en el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. En el tejido adiposo y músculo esquelético, la insulina actúa para estimular la retoma, almacenamiento y utilización de la glucosa.

El método reconocido en la técnica existe para monitorear todas las funciones metabólicas recitadas anteriormente. Así, una persona medianamente experta en la técnica es capaz de evaluar los polipéptidos zFGF-5, fragmentos, proteínas de fusión, anticuerpos, agonistas y antagonistas para las funciones moduladas metabólicas. Las técnicas de modulación de ejemplo se establecen adelante.

La lipogenia estimula la insulina, por ejemplo, se puede monitorear al medir la incorporación de ¹⁴C-acetato en triglicérido (Mackall et al. J. Biol. Chem. 251:6462-6464, 1976) o acumulación de triglicérido (Kletzien et al., Mol. Pharmacol. 41:393-398, 1992).

Se puede evaluar la captación estimulada por zFGF-5, por ejemplo, en un ensayo para el transporte de glucosa estimulado por insulina. Los adipocitos primarios o células NIH 3T3 L1 (ATCC No. CCL-92.1) que se colocan en DMEM contienen 1 g/l de glucosa, 0.5 o 1.0% de BSA, 20 mM de HEPES, y 2 mM de glutamina. Después de dos a cinco horas de cultivo, el medio se reemplaza con DMEM libre de glucosa, fresco que contiene 0.5 o 1.0% de BSA, 20 mM de HEPES, 1 mM de piruvato, y 2 mM de glutamina. Se agregan las concentraciones apropiadas de zFGF-5, insulina o IGF-1, o una serie de dilución de la sustancia de prueba, y las células se incuban durante 20-30 minutos. Se agrega desoxiglucosa marcada ³H o ¹⁴C a una concentración final de ≈50 nM, y las células se incuban durante aproximadamente 10-30 minutos. Las células luego se enjuagan rápidamente con amortiguador frío (por ejemplo PBS), luego se lisan con un agente de lisado adecuado (por ejemplo 1% de SDS o 1 N de NaOH). El lisato celular luego se evalúa al contar en un contador de centelleo. La radioactividad asociada a la célula se toma como una medición del transporte de glucosa después de sustraer la unión no específica como se determina al incubarse las células en la presencia de citocolasina b, un inhibidor del transporte de glucosa. Otros métodos incluyen aquellos descritos por, por ejemplo, Manchester et al., Am. J. Physiol. 266 (Endocrinol. Metab. 29):E326-E333, 1994 (transporte de glucosa estimulado por insulina).

Se puede evaluar la síntesis de la proteína, por ejemplo, al comparar la precipitación de las proteínas marcadas de ³⁵S-metionina luego de la incubación de las células de prueba con ³⁵S-metionina y ³⁵S-metionina y un modulador putativo de la síntesis de la proteína.

Se puede evaluar la termogenia como se describe por B. Stanley in *The Biology of Neuropeptide Y and Related Peptides*, W. Colmers y 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; y Heller et al., Am. J. Physiol. 245(3): R321-8, 1983. También, el índice metabólico, que se puede medir mediante una variedad de técnicas, es una medición indirecta de termogenia.

La utilización de oxígeno se puede evaluar cómo se describe por Heller et al., Pflugers Arch 369(1): 55-9, 1977. Este método también involucra un análisis de la temperatura hipotálmica y la producción de calor metabólico. La utilización del oxígeno y la termoregulación también se han evaluado en los humanos como se describe por Haskell et al., J. Appl. Physiol. 51(4): 948-54, 1981.

Los polipéptidos zFGF-5 también se pueden utilizar para preparar anticuerpos que se unen específicamente a los epítomos zFGF-5, péptidos o polipéptidos. Los métodos para preparar anticuerpos policlonales y monoclonales son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, NY, 1989; y Hurrell, J. G. R., Ed., *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982, que se incorporan aquí como referencia). Como será evidente para una persona medianamente experta en la técnica, se pueden generar anticuerpos policlonales de una variedad de animales de sangre caliente, tal como caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, pollos, conejos, ratones, y ratas.

La inmunogenicidad de un polipéptido zFGF-5 se puede incrementar a través de uso de un adyuvante, tal como alúmina (hidróxido de aluminio) o adyuvante completo o incompleto de Freund. Los polipéptidos útiles para inmunización también incluyen polipéptidos de fusión, tal como fusiones de zFGF-5 o su porción con un polipéptido inmunoglobulina o con proteína de unión a maltosa. El inmunógeno de polipéptido puede ser una molécula de longitud completa o su porción. Si la porción de polipéptido es "similar a hapteno", tal porción se puede unir o ligar ventajosamente a un portador macromolecular (tal como hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o tétano toxoide) para inmunización.

Como se utiliza aquí, el término "anticuerpos" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados por afinidad, anticuerpos monoclonales, y fragmentos de unión a antígeno, tal como fragmentos proteolíticos F(ab')₂ y Fab. También se incluyen los anticuerpos o fragmentos intactos construidos genéticamente, tal como los anticuerpos quiméricos, fragmentos Fv, anticuerpos monocatenarios y similares, así como también péptidos de unión a antígeno sintético y polipéptidos. Los anticuerpos no humanos se pueden humanizar al injertar solo los CDR no humanos en la estructura humana y las regiones constantes, o al incorporar los dominios variables no humanos completos (opcionalmente "encubriéndolos" con una superficie similar a humano mediante el reemplazo de residuos expuestos, en donde el resultado es un anticuerpo "chapeado"). En algunos casos, los anticuerpos

humanizados pueden retener residuos no humanos dentro de los dominios de estructura de región variable humana para mejorar las características de unión apropiadas. A través de los anticuerpos humanizantes, se puede incrementar la vida útil biológica, y el potencial para reacciones inmunes adversas luego que se reduce la administración a los humanos. Las técnicas alternativas para generar o seleccionar los anticuerpos útiles aquí incluyen exposición in vitro de los linfocitos para la proteína o péptido zFGF-5, y la selección de la colección de exhibición de anticuerpo en fago o vectores similares (por ejemplo, a través del uso de proteína o péptido zFGF-5 marcado o inmovilizado).

Se define que los anticuerpos se unen específicamente si ellos se unen a un polipéptido zFGF-5 con una afinidad de unión (K_a) de $10^6 M^{-1}$ o más, preferiblemente $10^7 M^{-1}$ o más, más preferiblemente $10^8 M^{-1}$ o más, y más preferiblemente $10^9 M^{-1}$ o más. La afinidad de unión de un anticuerpo se puede determinar fácilmente por una persona medianamente experta en la técnica (por ejemplo, mediante análisis Scatchard).

Una variedad de ensayos conocidos por aquellos expertos en la técnica se pueden utilizar para detectar anticuerpos que se unen específicamente a proteínas o péptidos zFGF-5. Los ensayos de ejemplo se describen en detalle en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Los ejemplos representativos de tales ensayos incluyen: inmunolectroforesis concurrente, radioinmunoensayo, radioinmuno-precipitación, ensayo inmunoabsorbente ligado por enzima (ELISA), ensayo dot blot o Western blot, ensayo de inhibición o competición, y ensayo intercalado. Adicionalmente, se pueden detectar anticuerpos para la unión a la proteína o péptido zFGF-5 mutante versus tipo natural.

Se pueden utilizar anticuerpos de zFGF-5 para células marcadas que expresan zFGF-5; a otra proteína objetivo, molécula pequeña o tejido cardíaco químico; para aislar el zFGF-5 mediante purificación de afinidad; para ensayos diagnósticos para determinar los niveles circulantes de los polipéptidos zFGF-5; para detectar o cuantificar el zFGF-5 soluble como un marcador de la patología o enfermedad destacada; en métodos analíticos que emplean FACS; para detectar las colecciones de expresión; para generar los anticuerpos anti-idiopáticos; y como anticuerpos neutralizantes o como antagonistas para bloquear la proliferación mediada por zFGF-5 in vitro y in vivo. Las etiquetas o marcas directas adecuadas incluyen radionúclidos, enzimas, sustrato, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares; las etiquetas o marcas indirectas pueden caracterizar el uso de biotina-avidina u otros pares de complementos/anti-complementos como los intermedios. Los anticuerpos aquí también se pueden conjugar directamente o indirectamente en los fármacos, toxinas, radionúclidos y similares, y estos conjugados utilizados para aplicaciones terapéuticas o diagnósticas in vivo.

Las moléculas de la presente invención se puede utilizar para identificar y aislar los receptores involucrados en la proliferación del miocardio cardíaca. Por ejemplo, las proteínas y péptidos de la presente invención se pueden inmovilizar sobre preparaciones de columna y membrana que corre sobre la columna (*Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Hermanson et al., eds., Academic Press, San Diego, CA, 1992, pp.195-202). Las proteínas y péptidos también se pueden radiomarcarse (*Methods in Enzymol.*, vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, ed., Acad. Press, San Diego, 1990, 721-737) o marca de fotoafinidad (Brunner et al., *Ann. Rev. Biochem.* 62:483-514, 1993 y Fedan et al., *Biochem. Pharmacol.* 33:1167-1180, 1984) y se pueden identificar proteínas de superficie celular específicas.

Los antagonistas se utilizarán para inhibir las actividades proliferativas de las moléculas zFGF-5, en tipos celulares tal como células cardíacas, que incluye miocitos, fibroblastos y células endoteliales; osteoblastos y condrocitos. Los genes que codifican los dominios de unión de polipéptido zFGF-5 se pueden obtener mediante la detección de colecciones de péptido aleatorias en fago (exhibición de fago) o en bacterias, tal como *E. coli*. Las secuencias de nucleótido que codifican los polipéptidos se pueden obtener en un número de formas, tal como a través de mutagenia aleatoria y síntesis de polinucleótido aleatoria. Estas colecciones de exhibición de péptido aleatorio se pueden utilizar para la detección de péptidos que interactúan con un objetivo conocido que puede ser una proteína o polipéptido, tal como un ligando o receptor, una macromolécula biológica o sintética, o sustancias orgánicas o inorgánicas. Las técnicas para crear y detectar tales colecciones de exhibición de péptido aleatorio se conocen en la técnica (Ladner et al., Patente Estadounidense NO: 5,223,409; Ladner et al., Patente Estadounidense NO:4,946,778; Ladner et al., Patente Estadounidense NO:5,403,484 y Ladner et al., Patente Estadounidense NO:5,571,698) y colecciones de exhibición de péptido aleatorio y equipos para la detección de tales colecciones están disponibles comercialmente, por ejemplo de Clontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Se pueden detectar colecciones de exhibición de péptido aleatoria utilizando las secuencias zFGF-5 descritas aquí para identificar proteínas que se unen a zFGF-5. Estas "proteínas de unión" que interactúan con los polipéptidos zFGF-5 se pueden utilizar para células hundidas; para aislar los polipéptidos homólogos mediante purificación de afinidad; ellos se pueden conjugar directamente o indirectamente en fármacos, toxinas, radionúclidos y similares. Estas proteínas de unión también se pueden utilizar en los métodos analíticos tal como para detección de colecciones de expresión y actividad neutralizante. Las proteínas de unión también se pueden utilizar para ensayos diagnósticos para determinar los niveles circulantes de los polipéptidos; para detectar o cuantificar los polipéptidos solubles como el marcador de patología o enfermedad destacada. Estas proteínas de unión también pueden actuar como "antagonistas" zFGF-5 para bloquear la unión zFGF-5 y la transducción de señal in vitro e in vivo. Estas proteínas de unión anti- zFGF-5 serían útiles para inhibir la expresión de genes que resultan en la proliferación o diferenciación.

Tales proteínas de unión anti-zFGF-5 se pueden utilizar para tratamiento, por ejemplo, en rhabdomioma, mixoma cardiaco, cánceres óseos de origen de osteoblasto, y enanismo, artritis, ligamento y reparación de cartilago, solo o en combinación con otras terapias.

5 Las moléculas de la presente invención serán útiles para la proliferación de células de tejido cardiaco, tal como miocitos cardiacos o mioblastos; miocitos o mioblastos esqueléticos y células de músculo liso; condrocitos; células endoteliales; adipocitos y osteoblastos in vitro. Por ejemplo, las moléculas de la presente invención son útiles como componentes del medio de cultivo celular definido, y se puede utilizar solo o en combinación con otras citoquinas y hormonas para reemplazar el suero que se utiliza comúnmente en el cultivo celular. Las moléculas de la presente invención son particularmente útiles en promover específicamente el crecimiento y/o desarrollo de miocitos en el cultivo, y también pueden probar ser útiles en el estudio de hiperplasia de miocito cardiaco y regeneración.

10 Los polipéptidos descritos aquí pueden ser para uso en el tratamiento o trastornos asociados con infarto del miocardio, falla cardiaca congestiva, cardiomiopatía hipertrófica y cardiomiopatía dilatada. Las moléculas descritas aquí también pueden ser para uso en limitar el tamaño del infarto luego de un ataque cardiaco, promover la angiogenia y la curación de la herida luego de angioplastia o endarterectomía, para desarrollar la circulación colateral coronaria, para revascularización en el ojo, para complicaciones relacionadas con pobre circulación tal como úlceras de pie diabético, para apoplejía, luego de repercurción coronaria utilizando métodos farmacológicos y otras indicaciones en donde la angiogenia es de beneficio. Las moléculas descritas aquí pueden ser para uso en mejorar la función cardiaca, al inducir neogenia de miocito cardiaco y/o hiperplasia, al inducir formación colateral coronaria, o al inducir remodelamiento del área miocardiaca necrótica. Otros usos terapéuticos descritos aquí incluyen la inducción de neogenia músculo esquelética y/o hiperplasia, regeneración del riñón y/o para uso en el tratamiento de hipertensión pulmonar y sistémica.

15 Se mide el desarrollo colateral coronaria inducido por zFGF-5 en conejos, perros o cerdos utilizando los modelos de oclusión coronaria crónica (Landau et al., Amer. Heart J. 29:924-931, 1995; Sellke et al., Surgery 120(2):182-188, 1996 y Lazarous et al., 1996, *ibid.*) Los beneficios del zFGF-5 para tratar apoplejía se prueban in vivo en ratas utilizando oclusión de arteria carótida bilateral y medición de los cambios histológicos, así como también desarrollo de masa (Gage et al., Neurobiol. Aging 9:645-655, 1988). La eficacia del zFGF-5 en la hipertensión se prueba in vivo utilizando ratas espontáneamente hipertensas (SHR) para la hipertensión sistémica (Marche et al., Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl. 1:S114-116, 1995).

20 Las moléculas de la presente invención se puede utilizar para objetivar el suministro de agentes o fármacos al corazón. Por ejemplo, las moléculas de la presente invención serán útiles para limitar la expresión al corazón, por virtud de la expresión específica de tejido dirigida por el promotor zFGF-5. Por ejemplo, la expresión específica de corazón se puede lograr utilizando una construcción discintrónica adenovírica zFGF-5 (Rothmann et al., Gene Therapy 3:919-926, 1996). Adicionalmente, los polipéptidos zFGF-5 se pueden utilizar para restringir otros agentes o fármacos al tejido cardiaco al ligar los polipéptidos zFGF-5 a otra proteína (Franz et al., Circ. Res. 73:629-638, 1993) al ligar una primera molécula que se comprende de un polipéptido homólogo zFGF-5 con un segundo objetivo o fármaco para formar una quimera. Las proteínas, por ejemplo anticuerpos, se pueden utilizar para formar quimeras con moléculas zFGF-5 de la presente invención (Narula et al., J. Nucl. Cardiol. 2:26-34, 1995). Los ejemplos de los agentes o fármacos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos bioactivos, genes, toxinas, radionúclidos, farmacéuticos de molécula pequeña y similares. El Ligado puede ser directo o indirecto (por ejemplo, liposomas), y puede ocurrir mediante medios recombinantes, ligado químico, interacción no covalente fuerte y similares.

25 En una realización de la presente invención, una composición que comprende la proteína zFGF-5 se utiliza como un agente terapéutico para mejorar la formación ósea mediada por osteoblasto. Las composiciones y métodos utilizando las composiciones de la invención se pueden aplicar para promover la reparación de defectos y deficiencias óseas, tal como aquellos que ocurren en fracturas sin unión, abiertas y cerradas; para promover la curación ósea en cirugía plástica; para estimular el no crecimiento óseo en articulaciones protésicas no cementadas e implantes dentales; en el tratamiento de enfermedades y defectos periodontales; para incrementar la formación ósea durante osteogenia por distensión; y en el tratamiento de otros trastornos esqueléticos que se pueden tratar mediante la estimulación de actividad osteoblástica, tal como osteoporosis y artritis. De nuevo la formación ósea como se describe aquí tendrá uso en la reparación congénita, inducida por trauma, osteotomía o curación ósea luego de osteonecrosis inducida por radiación (Hart et al, Cancer 37:2580-2585, 1976). Los usos de la presente invención también pueden encontrar uso en cirugía plástica.

30 Para el uso farmacéutico, las proteínas de la presente invención se formulan para administración parenteral, particularmente intravenosa o subcutánea, de acuerdo con métodos convencionales. La administración intravenosa será mediante inyección de bolo o infusión durante un periodo típico de una a varias horas. En general, las formulaciones farmacéuticas incluirán una proteína zFGF-5 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina amortiguada, 5% de dextrosa en agua o similares. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente uno o más excipientes, conservantes, solubilizantes, agentes amortiguantes, albúmina para evitar la pérdida de proteína en las superficies viales, etc. Los métodos para formulación son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton PA, 1990. Las dosis terapéuticas estarán generalmente en el rango de 0.1 a 100 µg/kg del peso corporal del paciente por día, preferiblemente 0.5-20 µg/kg por día, con la dosis exacta determinada por el médico de acuerdo con los estándares aceptados, tomando en cuenta la naturaleza y severidad

de la afección a ser tratada, los rasgos del paciente, etc. La determinación de la dosis está dentro del nivel de la persona mediadamente experta en la técnica. Las proteínas se pueden administrar para tratamiento agudo, durante una semana o menos, frecuentemente durante un periodo de uno a tres días o se puede utilizar en tratamiento crónico, durante varios meses o años. En general, una cantidad terapéuticamente efectiva de zFGF- 5 es una cantidad suficiente para producir un cambio clínicamente significativo en la proliferación de miocito, la función cardiaca, la formación ósea o el incremento en los tipos de células específicos asociados con células madre mesenquimales y progenitores para miocitos, osteoblastos y crondocitos. En particular, un incremento clínico significativo en el número de miocitos o células progenitoras de miocito se puede determinar al medir la fracción de eyección ventricular izquierda, antes de, y luego de la administración de las moléculas zFGF-5, y determinar por lo menos un incremento de 5%, preferiblemente 10% o más, en la fracción de eyección total. Las pruebas para determinar la fracción de eyección, cuando se mide por la sangre eyectada por glóbulo, son bien conocidas para aquellos mediadamente expertos en la técnica.

La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

15 Ejemplo 1

Extensión de la secuencia EST

La exploración de una base de datos de ADN traducida utilizando una consulta para factores de crecimiento resulta en la identificación de una secuencia marcada con la secuencia expresada (EST) que se encuentra que es un miembro novedoso de la familia FGF, y designado zFGF-5.

20 Los cebadores de oligonucleótido ZC11, 676 (SEQ ID NO: 3) y ZC11, 677 (SEQ ID NO: 4) se diseñan desde la secuencia de una etiqueta de secuencia expresada (EST). Se utilizan los cebadores para cebar internamente dentro del EST, y cuando se desarrolla PCR utilizando cADN MARATHON READY (Clontech, Palo Alto, CA) de tejido cardiaco de adultos como plantilla en la reacción de cadena polimerasa (PCR).

25 Las condiciones utilizadas para PCR son 1 ciclo a 94°C durante 90 segundos, 35 ciclos a 94°C durante 15 segundos; 68°C durante 1 minuto; seguido por 1 ciclo durante 10 minutos a 72°C y periodo de incubación a 4° C. La reacción PCR recrea 160 bp de la secuencia EST, y confirma que es correcta la secuencia EST.

Otras colecciones que se pueden amplificar con los cebadores de oligonucleótido incluyen músculo esquelético, pulmón, estómago, intestino delgado y tiroides.

Ejemplo 2

30 Distribución de Tejido

Se desarrollan Northern utilizando Blot de Tejido Múltiple Humano de Clontech (Palo Alto, CA). El fragmento de ADN de 160 bp descrito en el Ejemplo 1 se electrofora en un gel de agarosa al 1%, el fragmento se electroelude, y luego se marca radioactivamente utilizando un sistema de marca de ADN MEGAPRIME de cebado aleatorio (Amersham, Arlington Heights, IL) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La sonda se purifica utilizando una columna NUCTRAP empujada (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA). La solución de EXPRESSHYB (Clontech, Palo Alto, CA) se utiliza para prehibridación y como una solución hibridizante para los Northern blot. La hibridación tiene lugar durante la noche a 68°C, y los blots luego se lavan en 2X SSC y 0.05% de SDS a TA, seguido por un lavado en 0.1X de SSC y 0.1% de SDS a 50°C. Se observa una banda única en aproximadamente 2.0 kb. Es mayor la intensidad de la señal para el corazón de adulto con señales relativamente menos intensas en el músculo esquelético y el estómago.

Ejemplo 3

Ensayo para la actividad In Vitro de zFGF-5

A.

45 La actividad mitogénica del zFGF-5 se evalúa utilizando estirpes celulares y células de un cultivo primaria. El medio acondicionado de las células que expresan la proteína recombinante y/o la proteína purificada se agrega a cultivos de las siguientes estirpes celulares: fibroblasto NIH 3T3 (ATCC No. CRL-1658), células de corazón CHH-1 chum (ATCC No. CRL-1680), H9c2 mioblastos de corazón de rata (ATCC No. CRL-1446), células de carcinoma mamario Shionogi (Tanaka et al., 1992, ibid.) y células de adenocarcinoma LNCaP.FGC. Las células frescamente aisladas útiles para probar la actividad proliferativa zFGF-5 incluyen: fibroblastos cardiacos, miocitos cardiacos, miocitos esqueléticos y células endoteliales de vena umbilical humana.

55 La actividad mitogénica se evalúa mediante la medición de la incorporación de 3H-timidina con base en el método de Raines y Ross (Meth. Enzymology 109:749-773, 1985). En resumen, las células quietas se colocan en células de placa en una densidad de 3×10^4 células/ml en un medio apropiado. Un medio de crecimiento típico es Medio de Crecimiento de Dulbecco (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) que contiene 10% de suero de becerro fetal (FCS). Las células se cultivada en placas de 96 pozos y se les permite crecer 3-4 días. El medio de crecimiento se

remueve, y 180 µl de DFC (Tabla 5) que contiene 0.1% de FCS se agrega por pozo. La mitad de los pozos tiene proteína zFGF-5 agregada a ellos y la otra mitad son un control negativo, son zFGF-5. Las células se incuban durante hasta 3 días a 37°C en 5% de CO₂, y se remueve el medio. Se agrega cien microlitros de DFC que contiene 0.1% de FCS y 2 de PCi/ml de 3H-timidina a cada pozo, y las placas se incuban en 1-24 horas adicionales a 37°C. El medio se aspira, y se agrega 150 µl de triptisina a cada pozo. Las placas se incuban a 37°C hasta que las células se desunen (por lo menos 10 minutos). Las células desunidas se cosechan en filtros utilizando un Cosechador de Células LKB Wallac 1295-001 (LKB Wallac, Pharmacia, Gaithersburg, MD). Los filtros se secan al calentar en un horno microondas durante 10 minutos y se cuentan en un contador de centelleo LKB Betaplate 1250 (LKB Wallac) como se describe por el proveedor.

10

TABLA 5

250 ml de Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco-BRL)
 250 ml de medio F12 de Ham (Gibco-BRL)
 0.29 mg/ml de L-glutamina (Sigma, St. Louis, MO)
 1 mM de piruvato de sodio (Sigma, St. Louis, MO)
 25 mM de Hepes (Sigma, St. Louis, MO)
 10 µg/ml de fetuina (Aldrich, Milwaukee, WI)
 50 µg/ml de insulina (Gibco-BRL)
 3 ng/ml de selenio (Aldrich, Milwaukee, WI)
 20 µg/ml de transferrina (JRH, Lenexa, KS)

15

20

B.

Se aíslan los corazones desde el día 1 de edad de los ratones neonatales y luego se interrumpen al repetir digestiones de collagenasa, siguiendo el protocolo de Brand et al., (J. Biol. Chem. 268:11500-11503, 1993). Se aíslan los miocitos Individuales sobre un gradiente Percoll, y 2 ml de colocan en placas en platos de cultivo de tejido de 6 pozos a 0.5 X 10⁶ células/ml. Tres días después las placas se lavan 3 veces con PBS sin calcio o magnesio, y vuelve a cargar con 1 ml de medio libre de suero (Tabla 6). Los pozos se inoculan con partículas 1011 AdCMV-zFGF5 por pozo o AdCMV-GFP (proteína verde fluorescente) como un control, y se incuba a 37°C durante 8 horas. Los pozos luego se lavan de nuevo 3 veces con PBS sin calcio o magnesio, y luego se vuelve a cargar con 2 mls de medio libre de suero.

25

30

Dentro de las 48 horas después de inoculación con el AdCMV-zFGF5, los miocitos cultivados han cesado de batir y han experimentado una alteración morfológica, aunque los pozos se inoculan con el AdCMV-GFP que continua batiendo espontáneamente y no se afectan morfológicamente mediante la inoculación. Los pozos se inoculan con AdCMV-zFGF5 también contienen, después de 48, horas, una capa confluyente de células no adherentes, viables, sin ninguna pérdida en confluencia de las capas de miocito adherentes, que indica la actividad proliferativa del adCMV-zFGF5 en miocitos de murino cultivados.

35

Tabla 6

DMEM
 Mezcla de Nutriente de Ham F12 (Gibco-BRL; mezcla 1:1 con DMEM)
 17 mM de NaHCO₃ (Sigma)
 2 mM de L-glutamina (Sigma)
 1% de PSN (Sigma)
 1 µg/ml de insulina
 5 µg/ml de transferrina
 1 nM de LiCl (Sigma)
 1 nM de selenio
 25 µg/ml de ácido ascórbico (Sigma)
 1 nM de tiroxina (Sigma)

40

45

C.

El zFGF-5 fusionado en una proteína de unión matosa (MBP), como se describe en el Ejemplo 9A y purificado como se describe en el Ejemplo 10, se agrega a los miocitos (Ejemplo 3B) en una concentración de 0.1 ng/ml de MBP-zFGF5 que muestra que estimula la proliferación de miocitos, muy bien.

Ejemplo 4

5 Ensayo para Actividad Ex Vivo de zFGF-5

10 Se mide la mitogenia cardiaca ex vivo al remover los corazones completos de ratas o ratones neonatales o de 8 semanas de edad. El corazón cortado se coloca en medio de Joklik (Sigma, St. Louis, MO) o en medio de Dulbecco a 37°C, 5% de CO₂ durante 4-24 horas. Durante el periodo de incubación se agrega el polipéptido zFGF-5 en un rango de concentración de 1 pg/ml a 100 µg/ml. Los controles negativos solo utilizan amortiguador. Se agrega 3H-timidina y las muestras se incuban durante 1-4 horas, después de lo cual se secciona el corazón y se determina la mitogenia mediante autoradiografía. Las secciones se utilizan para histomorfometría para determinar el volumen nucleico/citoplásmico (McLaughlin, Am. J. Physiol. 271:R122-R129, 1996.)

15 Alternativamente, se liofiliza el corazón y se resuspende en 1 ml de 0.1 N NaOH. El ADN se precipita utilizando 10% de ácido tricloroacético enfriado en hielo (TCA). El sobrenadante se agrega a 9 ml de fluido de centelleo para medir la incorporación no específica de 3H-timidina. El glóbulo resultante se resuspende en 1 ml de solubilizador de tejido BTS-450 (Beckman, Fullerton, CA) y se agrega a 9 ml del fluido de centelleo para medir la incorporación de ADN específica de 3H-timidina.

20 Se aíslan los ventrículos izquierdo y derecho de aislado de ratones CD-1 de 1 día de edad (Jackson Labs, Bar Harbor, ME), y se incuban durante 4 horas con 3 ng/ml de zFGF5Hep2 (n=13; ver Ejemplo 10) o control (n=10). Se agrega 3H-timidina durante 1 hora. Los ventrículos se lavan varias veces y luego se homogenizan en 1 ml de medio de Joklik. Se agrega el homogenato resultante a 9 ml de cóctel de centelleo y se analiza durante la captación total de 3H-timidina y la incorporación de ADN.

El zFGF5-Hep2 incrementa la captación de 3H-timidina y la incorporación en ADN 2.068 ± 0.489 veces sobre el control, que indica que el zFGF5 es mitogénica para una célula cardiaca.

25 Ejemplo 5

Ensayo de Actividad In Vivo de zFGF-5

Los efectos proliferativos de zFGF-5 se evalúan in vivo utilizando ratas neonatales de dos semanas de edad y/o ratas de adulto de dos meses de edad. Las ratas se inyectan intrapericardialmente agudamente o crónicamente.

30 A.

Las ratas neonatales se tratan con zFGF-5 durante 1 a 14 días sobre un rango de dosis de 50 ng/día a 100 µg/día. Después del tratamiento, los efectos de zFGF-5 versus los animales tratados con placebo se evalúan al medir el peso cardiaco incrementado, que mejora in vivo y ex vivo la función ventricular izquierda, y al incrementar el núcleo cardiaco en fracciones de volumen citosólico, que se determinan histomorfométricamente.

35 B.

Las ratas con cardiomiopatía inducida por infusión de catecolamina crónica, mediante ligado coronario o para modelos de cardiomiopatía tal como el hámster Cardiomiopático Sirio (Sole et al., Amer. J. Cardiol. 62 (11):20G-24G, 1988) también se utilizan para evaluar los efectos de zFGF-5 en la función cardiaca y tejido humano.

40 Para inducir la cardiomiopatía utilizando catecolamina, las ratas de 7-8 semanas de edad se infunden continuamente con epinefrina durante 2 semanas por medio de minibombas osmóticas implantadas subcutáneamente entre sus omóplatos. La infusión de epinefrina resulta en un incremento en la clasificación de lesión fibrótica ventricular izquierda de 0.005±0.005 a 2.11±0.18, escala de 0-3); amplitud de célula de miocito ventricular izquierdo incrementada de 17.36±0.46 µm a 23.05±0.62 µm; y las respuestas contráctiles de músculo papilar ventricular izquierdo insignificante para isoproterenol (0.2 vs 1.1 gramos de tensión comparado con ratas infundidas con solución salina. Después del periodo de tratamiento de dos semanas, las ratas se inyectan intrapericardialmente diariamente con vehículo, zFGF-5, bFGF, IGF-I o IGF-II durante hasta 14 días. Las ratas se sacrifican y se desarrollan histomorfometría y histocitoquímica.

45 Las ratas, tratadas como se describió anteriormente, también se evalúan al final del tratamiento con catecolamina, y de nuevo el después del tratamiento del factor de crecimiento, en donde se mide la regeneración cardiaca cuando se reducen las clasificaciones de lesión fibrótica ventricular izquierda, amplitud celular de miocito reducida y respuestas contráctiles papilares ventriculares izquierdas incrementadas de isoproterenol.

Ejemplo 6

Mapeo Cromosomal de zFGF-5

Se mapea ZFGF-5 en el cromosoma 5 utilizando la versión comercialmente disponible del "Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research's "GeneBridge 4 Radiation Hybrid Panel"" (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). El Panel de Híbrido de Radiación de GeneBridge 4 contiene los ADN adecuados para uso de PCR de cada uno de los 93 clones de híbrido de radiación, más dos ADN de control (el donante HFL y el receptor A23).
 5 Un servidor públicamente disponible WWW (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>) permite el mapeo con relación al mapa híbrido de radiación de "the Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research's" del genoma humano (el mapa híbrido de radiación "WICGR") que se construye con el Panel de Híbrido de Radiación GeneBridge 4.

Para el mapeo de zFGF-5 con el "panel RH GeneBridge 4", las reacciones de 25 µl se establecen en una
 10 placa de microtítulo de 96 pozos (Stratagene, La Jolla, CA) y se utilizan para PCR en un ciclo térmico "RoboCycler Gradient 96" (Stratagene). Cada una de las reacciones 95 PCR consiste de 2.5 µl de 50X "Advantage KlenTaq Polymerase Mix" (Clontech), 2 µl de mezcla de dNTPs (2.5 mM cada una; Perkin-Elmer, Foster City, CA), 1.25 µl del cebador codificante, ZC11, 677 (SEQ ID NO: 4) 1.25 µl del cebador anticodificante, ZC12,053 (SEQ ID NO: 5).

2.5 µl de "RediLoad" (Research Genetics, Inc), 0.5 µl de "Advantage KlenTaq Polymerase Mix" (Clontech
 15 Laboratories, Inc.), 25 ng de ADN de un clon híbrido individual o control y ddH₂O para un volumen total de 25 µl. Las reacciones se superponen con una cantidad igual de aceite mineral y se sellan. Las condiciones de ciclo PCR son como sigue: un ciclo inicial de 4 minutos a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1.5 minuto fijo a 66°C y extensión de 1.5 minutos a 72°C, seguido por una extensión de 1 ciclo final de 7 minutos a 72°C. Las reacciones se separan mediante electroforesis en un gel de agarosa 3% NuSieve GTG (FMC Bioproducts, Rockland, ME).

Los resultados muestran que los mapas zFGF-5 541.12 cR de la parte superior del grupo de ligado 5 de
 20 cromosoma humano del mapa de híbrido de radiación WICGR. Con relación al centrómero, este marcador más próximo es WI-16922 y este marcador distal más cercano es WI-14692. El uso de los marcadores de mapa CHLC circundante también ayuda en la posición zFGF-5 en la región 5q34-q35 en el cromosoma 5 CHLC versión de mapa de marcador integrado v8c7 (El Centro de Ligado Humano Cooperativo, servidor WWW
 25 <http://www.chlc.org/ChlcIntegratedMaps.html>).

Ejemplo 7

Efectos del zFGF-5 en el Hueso

A.

Un vector de adenovirus que contiene el cADN para zFGF-5 se construye utilizando los métodos descritos
 30 por Becker et al. (Methods in Cell Biology 43:161-189, 1994). En resumen, el cADN para zFGF-5 (como se muestra en la SEQ ID NO: 1) se clona como un fragmento de Xba I-Sal I en pACCMV (Gluzman et al., In Eucaryotic Viral Vectors, Gluzman (eds.) pp.187-192, Cold Spring Harbor Press, Cold Springs Harbor NY, 1982). El vector pACCMV contiene parte del genoma de adenovirus 5, el promotor CMV y una secuencia terminadora SV40. El plásmido que contiene el vector y el inserto de cADN se cotransfecta con un plásmido que contiene el genoma de adenovirus 5,
 35 designado pJM17, (McGrory et al., Virology 163:614-617, 1988) en 293 células (ATCC No. CRL-1573; American Type Culture Collection, Rockville, MD), que conduce a un evento de recombinación y la producción de un adenovirus recombinante que contiene zFGF-5, designado AdCMV-zFGF5. La presencia del cADN zFGF-5 se confirma por PCR.

El vector de adenovirus AdCMV-zFGF5 se utiliza para transferencia de gen in vivo mediante inyección
 40 intravenosa de entre 1×10^{11} y 5×10^{11} partículas/ratón. Se ha mostrado que después de inyección intravenosa, la mayoría de los virus objetivan el hígado y transluce muy eficientemente los hepatocitos (Herz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2812-2816, 1993). Se ha demostrado que las células producen la proteína codificada por el cADN, y en el caso de las proteínas secretadas, secretándolas dentro de la circulación. Los altos niveles de expresión y se han demostrado los efectos fisiológicos (Ohwada et al., Blood 88:768-774, 1996; Stevenson et al., Arteriosclerosis,
 45 Thrombosis and Vascular Biology, 15:479-484, 1995; Setoguchi et al., Blood 84:2946-2953, 1994; y Sakamoto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:12368-12372, 1994).

Se tratan ratones CD-1 de seis semanas de edad (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) con adenovirus que no
 50 contiene el inserto de cADN (AdCMV-nulo) o AdCMV-zFGF5 IV a través de la vena de la cola o intrapericardialmente (IPC). Se da un total de 5×10^{11} partículas víricas/100 µl/ratón. 14 días después de inyección, se sacrifican los animales, y se remueven las tibias y los fémures sin ser separados para examinar cualquier respuesta inflamatoria potencial. Los huesos se fijan en 10% de formalina amortiguada neutra y se procesan. Ellos se descalsifican en 5% de ácido fórmico con 10% de citrato de sodio, se lavan en agua, se deshidratan en una serie de 70%-100% de etanol, se depuran en xileno y se embeben en parafina. Los especímenes se cortan longitudinalmente a través de la metafisis tibial y femoral y se tiñe con hemotoxilina y eosina para la identificación de las células del hueso. Se
 55 identifican los osteoblastos mediante el área Golgi negativa central y el núcleo excéntrico, mientras se identifican los osteoclastos mediante multinucleación, forma no uniforme y la alguna de Howship asociada con estas células reabsorbentes.

Para la histomorfometría ósea, se seleccionan las muestras de fémur. El volumen del hueso Esponjoso no se mide debido a la variación en el sitio de la muestra (es decir, las muestras de fémur no se seccionan exactamente en el mismo plano). Se evalúan tres parámetros del hueso para los cambios histomorfométricos.

1. Número de osteoblastos endoóseos: se mide a lo largo de la superficie endoósea del hueso Esponjoso en magnificación al 180 X en un área próxima de 1.22 mm en la placa de crecimiento.

2. Número de osteoclastos endoóseos: se mide a lo largo de la superficie endoósea del hueso Esponjoso en magnificación a 180 X en un área próxima de 1.22 mm para la placa de crecimiento.

3. Amplitud de placa de crecimiento: se mide cada 72 μm en magnificación de 90 X a través de la placa de crecimiento completa excepto en los extremos periféricos para determinar la actividad de placa de crecimiento.

El análisis de los datos (media \pm DE, n=4-7/grupo) se demuestra lo siguiente:

1. Parece no haber respuesta inflamatoria detectable en la articulación entre la tibia y el fémur.

2. El AdCMV-zFGF5 da IV o IPC en ratones que incrementan significativamente la actividad osteogénica en la metafisis femoral distal, cuando se examina en 2 semanas. Esta estimulación de la actividad osteogénica se indica por:

a) incremento significativo en el número de osteoblastos endoóseos en el hueso Esponjoso de los fémures distales luego de infusión IV o inyección IPC de AdCMV-zFGF5, 530% y 263%, respectivamente, cuando se compara con sus controles solo de vector relativo; y

b) la observación de los tejidos osteogénicos incrementados en la superficie del hueso, sugiere diferenciación incrementada de las células estromales de médula ósea hacia el linaje de osteoblasto.

3. El número de osteoclastos endoóseos no se afecta significativamente por la administración de IV o IPC de AdCMV-zFGF5, cuando se compara con sus controles solo de vector relativo.

4. La placa de crecimiento se reduce significativamente mediante infusión de IV, pero no de inyección IPC, de AdCMV-zFGF5, que sugiere la actividad de placa de crecimiento deprimida luego de la infusión IV. Los efectos diferenciales de las administraciones AdCMV-zFGF5 no se han elucidado.

Estos resultados sugieren que el zFGF-5 es un mitógeno fuerte para la estimulación de la proliferación de osteoblasto y que el zFGF- 5 tiene la capacidad de inducir la nueva formación ósea. B.

Utilizando esencialmente los mismos procedimientos descritos anteriormente en 7.A. Se hace QCT en CD-1 hembra (Jackson Labs) que se inyectan con 1×10^{11} partículas de AdCMV-zFGF5 por ratón. Los ratones se sacrifican 30 días después de inyección y se incrementan las relaciones de longitud del corazón/tibia comparado con los controles (inyectado con adenovirus vacío o solución salina). No existen diferencias entre los grupos en las longitudes de la tibia para contar el cambio, ni existen diferencias en cualquier otro peso de órgano entre los grupos. Así, la indicación es que el adenovirus zFGF-5 incrementa selectivamente la densidad ósea total, la densidad ósea trabecular, y el espesor cortical en el fémur, cuando se mide por QCT.

Ejemplo 8

Efectos de zFGF-5 en el Corazón

Como se describe en ratones 7.B. CD-1 se dan una única inyección IV de AdCMV-zFGF5, se sacrifican después de cuatro semanas, y se encuentra que las relaciones de longitud del corazón/tibia se incrementan comparado con adenovirus vacío o ratones tratados con solución salina. Los resultados muestran que no existen diferencias entre los grupos en las longitudes de la tibia para contar este cambio, ni se encuentran diferencias en cualesquier otros pesos de órgano entre los grupos. Este resultado sugiere que el AdCMV-zFGF5 incrementa selectivamente el crecimiento cardíaco, cuando se administra como una construcción adenovírica IV.

Ejemplo 9

Expresión de zFGF-5

A. Construcción de Plásmidos Que Codifican el zFGFS

Se expresa el zFGF5, un homólogo del factor de crecimiento de fibroblasto, en E. coli utilizando el sistema de fusión MBP (proteína de unión maltosa) de New England Biolabs (NEB; Beverly, MA). En este sistema, el cADN zFGFS se une al extremo 3' del gen malE para formar una proteína de fusión MBP-zFGF5. La expresión de la proteína de fusión se controla mediante el promotor tac; la expresión se "apaga" hasta que el promotor se induce mediante la adición de 1 mmol de IPTG (isopropil b-tiogalactosilpiranosida). Se hacen tres variaciones de esta proteína de fusión, que difieren solo de su sitio de división para liberar la zFGF5 de MBP. Una construcción tiene un sitio de división trombina construido por ingeniería entre los dominios MBP y zFGF5. La segunda construcción tiene

un sitio de división de Factor Xa, en lugar de un sitio de división trombina. La tercera construcción tiene un sitio de división enteroquinasa, en lugar del sitio de división de trombina.

Las construcciones se construyen como en fusiones de estructura con MBP de acuerdo con el Sitio de Clonación Múltiple (MCS) del vector pMAL-c2 (NEB), y de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se amplifica el zFGF5 por medio de PCR utilizando los cebadores que introducen los sitios de clonación convenientes, así como también los sitios de división utilizando los siguientes cebadores de oligonucleótido: 1) para la construcción de trombina: zc12,652 (SEQ ID NO: 7) y zc12,631 (SEQ ID No: 8); 2) para la construcción del Factor Xa: zc15,290 (SEQ ID NO: 9) y zc12,631 (SEQ ID NO: 8); y 3) para la construcción enteroquinasa: zc15,270 (SEQ ID NO: 10) y zc12, 631 (SEQ ID NO: 8). En cada caso, la secuencia de señal zFGF5 nativa no se amplifica; el zFGF5 cuando se empieza con el residuo de aminoácido 26 de la SEQ ID NO: 2 (Val se cambia a un Ala). La construcción de trombina se construye al insertar un fragmento Xba I-Sal I zFGF5 en los sitios Xba I-Sal I de pMAL-c2. La construcción del Factor Xa se construye al insertar un fragmento blunt-Sal I en los sitios Xmn I-Sal I del MCS. La construcción enteroquinasa se construye al insertar un fragmento Xba I-Sal I en los sitios Xba-Sal I de pMAL-c2. Una vez las construcciones se construyen, ellos se transforman en una variedad de cepas anfitrionas *E. coli* y se analizan para la expresión de alto nivel. La construcción de trombina (designada pSDH90.5) se transfecta en las células DH10B (GIBCO-BRL), aunque la construcción del Factor Xa (designado pSDH117.3) y la construcción enteroquinasa (designada pSDH116.3) se transfectan en células TOP10 (Invitrogen, San Diego, CA). Todas las tres fusiones MBP son aproximadamente 63kD (43kD en el dominio MBP, y aproximadamente 20kD en el dominio zFGF5).

B. Recombinación Homóloga/zFGF5

La expresión de zFGF5 en *Pichia metanólica* utiliza el sistema de expresión descrito en la PCT WO 9717450 coasignada, incorporado aquí como referencia. Un plásmido de expresión que contiene todo o parte de un polinucleótido que codifica zFGF5 se construye por medio de recombinación homóloga. El vector de expresión se construye de pCZR204, que contiene el promotor AUG1, seguido por la secuencia líder α Fpp, seguido por una etiqueta de péptido de Terminal amino, un sitio de restricción SmaI de extremo romo, una etiqueta de péptido de terminal carboxi, un codón traduccional STOP, seguido por el terminador AUG1, el marcador seleccionable ADE2, y finalmente la región no traducida AUG1 3'. También se incluye en este vector son las secuencias URA3 y CEN-ARS requeridas para selección y replicación en *S. cerevisiae*, y las secuencias AmpR y colE1 ori requeridas para selección o replicación en *E. coli*. La secuencia FGF5 insertada en este vector empieza en el residuo 27 (Ala) de la secuencia de aminoácido zFGF.

Para la construcción de pSDH114, un plásmido para la expresión de zFGF5 en *P. metanólica*, se transforman los siguientes fragmentos de ADN en *S. cerevisiae*: 100 ng del vector pCZR204 acceptor que se ha digerido con SmaI; 1 μ g de un fragmento de restricción XbaI-SalI liberado de pSDH90.5 y abarca la secuencia codificante zFGF5.; 1 μ g de un segmento lineal bicatenario, generado por PCR, sintético que se extiende 70 pares base de la secuencia codificante α Fpp en un extremo y las articulaciones para los 70 pares base de la secuencia codificante de terminal amino de la secuencia zFGF5 madura en el otro se genera de los cuatro oligonucleótidos zc13,497 (SEQ ID NO: 11); zc15,131 (SEQ ID NO: 12); zc15,132; (SEQ ID NO: 18); zc15, 134 (SEQ ID NO: 13), de los que la cadena codificante de una secuencia bicatenaria se muestra en la SEQ ID NO: 19 (secuencia ligadora 5' (Terminal N α Fpp -> zFGF5)) y 1 μ g de un segmento ligador bicatenario, generado por PCR, sintético que se extiende 70 pares base de la secuencia codificante de terminal carboxi de zFGF5 en un extremo con 70 pares base de la secuencia terminadora AUG1 se genera de los cuatro oligonucleótidos 13, 529 (SEQ ID NO: 14) ; zc13, 525 (SEQ ID NO: 15) zc13, 526 (SEQ ID NO: 16); zc13,528 (SEQ ID NO: 17) de los cuales la cadena codificante de una codificante bicatenaria se muestra en la SEQ ID NO: 20 (secuencia ligadora 3' (Terminal C zFGF5 -> terminador AUG1)). Se seleccionan colonias Ura+, y el ADN de las colonias de levadura resultantes se extrae y se transforma en clones individuales *E. coli*. que acoge la construcción de expresión correcta se identifican por detección de PCR con oligonucleótidos zc13,497 (SEQ ID NO: 11) y zc13,528 (SEQ ID NO: 12) seguido por la digestión de restricción para verificar la presencia del inserto zFGF5 y el secuenciamiento del ADN para confirmar las secuencias de ADN deseadas que se han mejorado una con la otra. El ADN de plásmido de escala mayor se aísla para uno de los clones correctos, y el ADN se digiere con Sfi I para liberar el casete de expresión *Pichia*-zFGF5 de la estructura de vector. El ADN corta Sfi I luego se transforma en un anfitrión de expresión metanólica *Pichia*, designado PMAD16, y se coloca en placas de ADE D para selección. Una variedad de clones se recogen y se detectan por medio de Western blot para la expresión zFGF5 de alto nivel.

Más específicamente, para la producción de proteína de escala pequeña (por ejemplo, producción de matraz agitado o placa), los transformantes *P. metanólica* que llevan un casete de expresión que comprende un promotor regulado por metanol (tal como el promotor AUG1) se hacen crecer en la presencia de metanol y la ausencia de cantidades de interferencia de otras fuentes de carbono (por ejemplo, glucosa). Para experimentos de escala pequeña, que incluye la detección preliminar de los niveles de expresión, los transformantes se pueden hacer crecer en 30°C en medio sólido que contiene, por ejemplo, 20 g/L de Bacto-agar (Difco), 6.7 g/L de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos (Difco), 10 g/L de metanol, 0.4 mg/L de biotina, y 0.56 g/L de polvo de -Ade - Thr - Trp. Debido a que el metanol es una fuente de carbón volátil se pierde fácilmente en incubación prolongada. Un suministro continuo de metanol se puede proporcionar al colocar una solución de 50% de metanol en agua en las tapas de las placas invertidas, por lo cual el metanol se transfiere en las células que crecen mediante transferencia

evaporativa. En general, no se utiliza más de 1 ml de metanol por placa de 100-mm. Se pueden llevar a cabo experimentos ligeramente a gran escala utilizando los cultivos que crecen en los matraces agitados. En un procedimiento típico, las células se cultivan durante dos días en placas de metanol mínimo como se describió anteriormente a 30°C, luego se utilizan las colonias para inocular un volumen pequeño de medio de metanol mínimo (6.7 g/L de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos, 10 g/L de metanol, 0.4 mg/L de biotina) en una densidad celular de aproximadamente 1×10^6 células/ml. Las células se hacen crecer a 30°C. Las células se hacen crecer en metanol que tiene un requerimiento alto de oxígeno, necesitando agitación vigorosa durante cultivo. El metanol se repone diariamente (típicamente volumen 1/100 de 50% de metanol por día).

Para el cultivo de escala de producción, los cultivos frescos de los clones productores mayores se preparan en matraces agitados. Los cultivos resultantes luego se utilizan para inocular el medio de cultivo en un fermentador. Típicamente, se utiliza un cultivo de 500 ml en crecimiento de YEPD a 30°C durante 1-2 días con agitación vigorosa para inocular un fermentador de 5-litros. Las células se hacen crecer en un medio adecuado que contiene sales, glucosa, biotina, y elementos de traza a 28°C, pH. 5.0, y >30% de O₂ disuelto. Después que se consume la carga inicial de la glucosa (según se indica por una reducción en el consumo de oxígeno), se suministra una carga de glucosa/metanol en el recipiente para inducir la producción de la proteína de interés. Debido a que se lleva a cabo la fermentación a gran escala bajo condiciones de carbono limitantes, la presencia de glucosa en la carga no reprime el promotor inducible de metanol.

Ejemplo 10

Purificación de zFGF-5

Se obtiene el medio de fermentación E. coli de una cepa que expresa zFGF5 como una Proteína de Fusión de Unión a Maltosa (pSDH90.5, como se describió anteriormente). La fusión se solubiliza MBPzFGFS durante sonicación o ruptura de presión French, utilizando un amortiguador que contiene 20 mM de Hepes, 0.4 M de NaCl, 0.01 M de EDTA, 10 mM de DTT, a pH 7.4. El amortiguador de extracción incluye cantidades de 5 µg/ml de Pepstatina, Leupeptina, Aprotinina, Bestatina. También se incluye sulfonilfluoruro fenil metilo (PMSF) en una concentración final de 0.5 mM.

El extracto se centrifuga a 18,000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se procesa en una resina Amilosa (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJ) que se une al dominio MBP de la fusión. Luego del lavado de la columna, la fusión MBPzFGF5 vinculada se eluye en el mismo amortiguador como el amortiguador de extracción de DTT y los inhibidores proteasa pero que contiene 10 mM de Maltosa.

El grupo eluido de MBPzFGF5 se trata con 1:100 (p/p) de trombina bovina para fusión de MBPzFGF5. La reacción de división se le permite proceder durante 6 a 8 horas a temperatura ambiente, después de lo cual la mezcla de reacción se pasa sobre un lecho de sefarosa Benzamidina (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJ) para remover la trombina, utilizando el mismo amortiguador de elución como se describió anteriormente por cromatografía de afinidad amilosa.

La fracción pasada, que contiene el producto dividido zFGF5 y el dominio MBP libre se aplican a una matriz de afinidad de Heparina Toso Haas (Toso Haas, Montgomeryville, PA) equilibrada en 0.5 M de NaCl, 20 mM de Hepes, 0.01 M de EDTA a pH 7.4. El MBP y zFGF5 se unen a heparina bajo estas condiciones. Las proteínas vinculadas se eluyen con un gradiente de volumen de columna 2 a 3 formado entre 0.5M de NaCl y 2.0 M de NaCl en el amortiguador de columna.

El MBP eluido temprano, a aproximadamente 0.7 M NaCl, y el zFgf5 dividido se eluye en aproximadamente 1.3 M de NaCl. Las fracciones zFGF5 agrupadas se pasan a través de la etapa amilosa una vez se renueva de nuevo cualquier MBPzfgf5 residual que es un contaminante menor. El material purificado se designa zFGF5-Hep2, y muestra una especie única altamente pura a ~20 kDa en análisis reducido SDS-PAGE.

El secuenciamiento de Terminal N de aminoácido produce la secuencia de terminal N nativa pero los datos de Espectrofotometría de Masa revelan masas moleculares que indican que el Terminal C se puede trunca en el residuo 196 (Lys) de la SEQ ID NO: 2, en donde un "sitio dibásico" está presente.

La proteína zFGF5 es muy estable en 1.3 M de NaCl. Luego de diálisis en PBS, el zFGF5 agregado y la fase de solución izquierda. Por lo tanto, las formulaciones que incluyen heparina y otros "polianiones" se pueden utilizar para evitar la agregación del zFGF5 puro.

Ejemplo 11

Producción de Anticuerpos

Se producen los anticuerpos para ZFGF5, utilizando las técnicas estándar conocidos en la técnica y se describen previamente, al inmunizar conejillos de indias, conejos y ratones con péptidos QTRARDDVSRKQLRLYC (SEQ ID NO: 2 el residuo de aminoácido 40 al residuo 56), designado zFGF-1; YTTVTKRSRRIRPTHRAC (SEQ ID NO: 2 el residuo de aminoácido 191 al residuo 207, con un Cys adicional en el terminal C), designado zFGF-5 o el polipéptido zFGF5 de longitud completa como se muestra en la SEQ ID NO: 2, más la proteína de fusión MPB, y

designada MBP-FGF5. Se conjugan los polipéptidos a través de los residuos Cys utilizando KLH activada por Maleimida (Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

La Tabla 7 es una descripción de los animales, niveles de inmunización y separaciones de anticuerpo.

Tabla 7

5

Péptido o proteína	Animal	Nivel de inmun.	Ab producido	
ZFGF5-1	G.P.	50 ug/animal	Afinidad	
		Inicial	Purificado	
		25 ug/animal	y	
		Inoculado	IgG	
			Fraccionado	
	Conejo	100 ug/animal	Afinidad	
		Inicial	Purificado	
		50 ug/animal	y	
		Inoculado	IgG	
			Fraccionado	
	ZFGF5-2	G.P.	50 ug/animal	Afinidad
			Inicial	Purificado
25 ug/animal			Y	
Inoculado			IgG	
			Fraccionado	
Conejo		100 ug/animal	Afinidad	
		Inicial	Purificado	
		50 ug/animal	Y	
		Inoculado	IgG	
			Fraccionado	
ZFGF5-MBP		Ratón	20 ug/animal	
			Inicial	
	10 ug/animal			
	Inoculado			
	Conejo	200 ug/animal	Afinidad	
		Inicial	Purificado	
		100 ug/animal		
		Inoculado		
		Fraccionado		

Ejemplo 12

Efectos de zFGF-5 en Ratones ob/ob

Los efectos de zFGF-5 en adipocitos y se examina el metabolismo de la grasa utilizando ratones ob/ob hembra (C57B1/6J, Jackson Labs, Bar Harbor, ME). Los ratones son obesos, resistentes a la insulina y tienen "hueso graso". Los ratones se pesan y se encuentra que todos son del mismo peso, y se inyectan IV con 1011 partículas por ratón de AdCMVzFGF-5 o solución salina o Ad5CMV-GFP para los controles, como se describe en Ejemplo 7. 17 días después de la inyección, los ratones de control inyectados con Ad5CMV-GFP han ganado 5.342 ± 0.5 gramos de peso corporal comparado con el día de inyección, aunque los ratones tratados con AdCMVzFGF- 5 pierden 3.183 ± 0.743 gramos de peso corporal.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

(i) SOLICITANTE: ZymoGenetics. Inc.

1201 Eastlake Avenue East

Seattle, Washington 98102

15

Estados Unidos de América

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: HOMÓLOGOS FGF NOVEDOSOS

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 20

(iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:

(A) DESTINATARIO: ZymoGenetics. Inc.

20

(B) DIRECCIÓN: 1201 Eastlake Avenue East

(C) CIUDAD: Seattle

(D) ESTADO: WA

(E) PAÍS: ESTADOS UNIDOS

(F) ZIP: 98102

25

(v) FORMA LEGIBLE POR COMPUTADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Diskette

(B) COMPUTADOR: IBM Compatible

(C) SISTEMA DE OPERACIÓN: DOS

(D) SOFTWARE: FastSEQ para Versión Windows 2.0

30

(vi) DATOS DE APLICACIÓN ACTUALES:

(A) NÚMERO DE APLICACIÓN:

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN:

(C) CLASIFICACIÓN:

(vii) DATOS DE APLICACIÓN ANTERIORES:

35

(A) NÚMERO DE APLICACIÓN:

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN:

(viii) INFORMACIÓN DE ABOGADO/AGENTE:

(A) NOMBRE: Sawislak, Deborah A

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 37.438

40

(C) NÚMERO DE REFERENCIA /EXPEDIENTE: 96-20

CAC ATC CAG GTC CTG GGC CGC AGG ATC AGT GCC CGC GGC GAG GAT GGG His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly 65 70 75 80	240
GAC AAG TAT GCC CAG CTC CTA GTG GAG ACA GAC ACC TTC GGT AGT CAA Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln 85 90 95	288
GTC CGG ATC AAG GGC AAG GAG ACG GAA TTC TAC CTG TGC ATG AAC CGC Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg 100 105 110	336
AAA GGC AAG CTC GTG GGG AAG CCC GAT GGC ACC AGC AAG GAG TGT GTG Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val 115 120 125	384
TTC ATC GAG AAG GTT CTG GAG AAC AAC TAC ACG GCC CTG ATG TCG GCT Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Met Ser Ala 130 135 140	432
AAG TAC TCC GGC TGG TAC GTG GGC TTC ACC AAG AAG GGG CGG CCG CGG Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg 145 150 155 160	480
AAG GGC CCC AAG ACC CGG GAG AAC CAG CAG GAC GTG CAT TTC ATG AAG Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp Val His Phe Met Lys 165 170 175	528
CGC TAC CCC AAG GGG CAG CCG GAG CTT CAG AAG CCC TTC AAG TAC ACG Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr 180 185 190	576
ACG GTG ACC AAG AGG TCC CGT CGG ATC CGG CCC ACA CAC CCT GCC TAGGC Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg Pro Thr His Pro Ala 195 200 205	626
CACCCCGCCG CGGCCCTCAG GTCGCCCTGG CCACACTCAC ACTCCCAGAA AACTGCATCA GAGGAATATT TTTACATGAA AAATAAGGAT TTTATTGTTG ACTTGAAACC CCCGATGACA AAAGACTCAC GCAAAGGGAC TGTAGTCAAC CCACAGGTGC TTGTCTCTCT CTAGGAACAG ACAACCTCTAA ACTCGTCCCC AGAGGAGGAC TTGAATGAGG AAACCAACAC TTTGAGAAAC CAAAGTCCTT TTTCCCAAAG GTTCTGAAAA AAAAAAAAAA AAAAACTCGA G	686 746 806 866 917

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 207 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) ENCADENAMIENTO: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

5

10

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		

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) ENCADENAMIENTO: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC11676

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

GGACTTGACT ACCGAAGGTG TCTG

24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) ENCADENAMIENTO: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC11677

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:4:

GTCGATGTGA GCCGTAAGCA GCT 23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 26 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) ENCADENAMIENTO: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (vii) FUENTE INMEDIATA:

10 (B) CLON: ZC12053

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:5:
GCATACTTGT CCCCATCCTC GCCGCG 26

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 621 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) ENCADENAMIENTO: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:6:

ATGTAYWSNG	CNCCNWSNGC	NTGYACNTGY	YTNTGYTNC	AYTTYTNYT	NYTNTGYTTY	60
CARGTNCARG	TNYTNGTNGC	NGARGARAAY	GTNGAYTTYM	GNATHGAYGT	NGARAARCAR	120
ACNMGNGCNM	GNGAYGAYGT	NWSNMGNAAR	CARYTNMGNY	TNTAYCARYT	NTAYWSNMGN	180
ACNWSNGGNA	ARCAYATHCA	RGTNYTNGGN	MGNMGNATHW	SNGCNMGNGG	NGARGAYGGN	240
GAYAARTAYG	CNCARYTNYT	NGTNGARACN	GAYACNTTYG	GNWSNCARGT	NMGNATHAAR	300
GGNAARGARA	CNGARTTYTA	YYTNTGYATG	AAYMGNAARG	GNAARYTNGT	NGGNAARCCN	360
GAYGGNACNW	SNAARGARTG	YGTNTTYATH	GARAARGTNY	TNGARAAYAA	YTAYACNGCN	420
YTNATGWSNG	CNAARTAYWS	NGGNTGGTAY	GTNGGNTTYA	CNAARAARGG	NMGNCNMGN	480
AARGGNCNA	ARACNMGNGA	RAAYCARCAR	GAYGTNCAYT	TYATGAARMG	NTAYCCNAAR	540
GGNCARCCNG	ARYTNCARAA	RCCNTTYAAR	TAYACNACNG	TNACNAARMG	NWSNMGNMGN	600
ATHMGNCNA	CNCAYCCNGC	N				621

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 47 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) ENCADENAMIENTO: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC12652

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:7:

30 TATTTATCTA GACTGGTTCC GCGTGCCGCC GAGGAGAACG TGGACTT
47

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 33 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) ENCADENAMIENTO: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC12631

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:8:

GTATTTGTCG ACTCAGGCAG GGTGTGTGGG CCG

33

10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 22 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) ENCADENAMIENTO: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC15290

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:9:

GCCGAGGAGA ACGTGGACTT CC

22

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 47 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) ENCADENAMIENTO: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC15270

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:10:

TATTTATCTA GAGATGACGA TGACAAGGCC GAGGAGAACG TGGACTT
47

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 41 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) ENCADENAMIENTO: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC13497

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:11:

AGCATTGCTA AAGAAGAAGG TGTAAGCTTG GACAAGAGAG A 41

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 63 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) ENCADENAMIENTO: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (vii) FUENTE INMEDIATA:
- (B) CLON: ZC15131
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:12:

GGTGTAAGCT TGGACAAGAG AGAGGAGAAC GTGGACTTCC GCATCCACGT GGAGAACCAG 60
ACG 63

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 39 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) ENCADENAMIENTO: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (vii) FUENTE INMEDIATA:
- (B) CLON: ZC15134
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:13:

CCGGCTGTAG AGCTGGTACA GCCGCAGCTG CTTACGGCT 39

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 42 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) ENCADENAMIENTO: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (vii) FUENTE INMEDIATA:
- (B) CLON: ZC13529
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:14:

CTTCAGAAGC CCTTCAAGTA CACGACGGTG ACCAAGAGGT CC 42

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 61 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) ENCADENAMIENTO: único
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC13525

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:15:

ACGACGGTGA CCAAGAGGTC CCGTCGGATC CGGCCACAC ACCCTGCCTA GGGGGAATTC 60
G 61

5 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 61 pares base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) ENCADENAMIENTO: único

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC13526

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:16:

CAAACAGGCA GCCCTAGAAT ACTAGTGTG ACTCGAGGAT CCGAATTCCC CCTAGGCAGG 60
G . . 61

15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44 pares base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) ENCADENAMIENTO: único

20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC13528

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:17:

25 CTCAAAAATT ATAAAAATAT CCAAACAGGC AGCCCTAGAA TACT
 44

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 62 pares base

30 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) ENCADENAMIENTO: único

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC15132

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:18:

CAGCCGCAGC TGCTTAGCGC TCACATCGTC CCGAGCCCGC GTCTGGTTCT
 CCACGTGGAT GC 62

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 141 pares base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) ENCADENAMIENTO: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:19:

AGCATTGCTG CTAAGAAGA AGGTGTAAGC TTGGACAAGA GAGAGGAGAA CGTGGACTTC	60
CGCATCCACG TGGAGAACCA GACGCGGGCT CGGGACGATG TGAGCCGTAA GCAGCTGCCG	120
CTGTACCAGC TCTACAGCCG G	141

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 144 pares base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) ENCADENAMIENTO: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:20:

CTTCAGAAGC CCTTCAAGTA CACGACGGTG ACCAAGAGGT CCCGTGGAT CCGGCCACA	60
CACCCTGCCT AGGGGAATT CGGATCCTCG AGTCGACACT AGTATTCTAG GGCTGCCTGT	120
TTGGATATTT TTATAATTTT TGAG	144

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de:
 - a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo 28 (Glu) al residuo 175 (Met); y
 - 5 b) moléculas de polipéptido que son por lo menos 80% idénticas a la SEQ ID NO: 2 del residuo de aminoácido 28 (Glu) al residuo de aminoácido 175 (Met); para uso en promover la reparación de defectos y deficiencias óseas; para uso en promover la curación ósea en cirugía plástica; para uso en la estimulación del crecimiento óseo en articulaciones protésicas no cementadas e implantes dentales; para uso en incrementar la formación ósea durante osteogénesis por distensión; para uso en el tratamiento de otros trastornos esqueléticos que se pueden tratar mediante la estimulación de actividad osteoblástica; para uso en la reparación congénita, inducida por trauma, osteotomía; o para uso en curación ósea luego de osteonecrosis inducida por radiación.
- 10 2. Un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de:
 - 15 a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo 28 (Glu) al residuo 196 (Lys); y
 - 20 b) moléculas de polipéptido que son por lo menos 80% idénticas a la SEQ ID NO: 2 del residuo de aminoácido 28 (Glu) al residuo de aminoácido 196 (Lys); para uso en promover la reparación de defectos y deficiencias óseas; para uso en promover la curación ósea en cirugía plástica; para uso en la estimulación del crecimiento óseo en articulaciones protésicas no cementadas e implantes dentales; para uso en incrementar la formación ósea durante osteogénesis por distensión; para uso en el tratamiento de otros trastornos esqueléticos que se pueden tratar mediante la estimulación de actividad osteoblástica; para uso en la reparación congénita, inducida por trauma, osteotomía; o para uso en curación ósea luego de osteonecrosis inducida por radiación.
- 25 3. Un polipéptido seleccionado del grupo que consiste de:
 - a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo 28 (Glu) al residuo 207 (Ala); y
 - 30 b) moléculas de polipéptido que son por lo menos 80% idénticas a la SEQ ID NO: 2 del residuo de aminoácido 28 (Glu) al residuo de aminoácido 207 (Ala); para uso en promover la reparación de defectos y deficiencias óseas; para uso en promover la curación ósea en cirugía plástica; para uso en la estimulación del crecimiento óseo en articulaciones protésicas no cementadas e implantes dentales; para uso en incrementar la formación ósea durante osteogénesis por distensión; para uso en el tratamiento de otros trastornos esqueléticos que se pueden tratar mediante la estimulación de actividad osteoblástica; para uso en la reparación congénita, inducida por trauma, osteotomía; o para uso en curación ósea luego de osteonecrosis inducida por radiación.
- 35 4. Un polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, en donde dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste de:
 - 40 a) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo 28 (Glu) al residuo 175 (Met);
 - b) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo 28 (Glu) al residuo 196 (Lys);
 - 45 c) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo 28 (Glu) al residuo 207 (Ala).
5. Un polipéptido para uso de acuerdo con la Reivindicación 4, para uso en promover la reparación de un defecto o deficiencia ósea seleccionada de fracturas sin unión, abiertas y cerradas.
6. Un polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1-5, en donde dicho polipéptido comprende adicionalmente un residuo metionina de terminal amino.
- 50 7. Un polipéptido para uso de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1-5, en donde dicho polipéptido comprende adicionalmente una secuencia de señal.
8. Un polipéptido para uso de acuerdo con la Reivindicación 7, en donde dicha secuencia de señal es como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo de aminoácido 1 (Met) al residuo de aminoácido 27 (Ala).

9. Un polipéptido para uso de acuerdo con la Reivindicación 6, en donde el trastorno esquelético es osteoporosis o artritis.
10. Un polipéptido aislado seleccionado del grupo que consiste de:
- 5 a) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo 28 (Glu) al residuo 175 (Met); más un residuo metionina de terminal amino;
- b) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo 28 (Glu) al residuo 196 (Lys); más un residuo metionina de terminal amino;
- c) un polipéptido que consiste de una secuencia de aminoácido como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo 28 (Glu) al residuo 207 (Ala); más un residuo metionina de terminal amino.
- 10 11. Un polipéptido de acuerdo con la Reivindicación 10, que comprende adicionalmente una secuencia de señal.
12. Un polipéptido de acuerdo con la Reivindicación 11, en donde dicha secuencia de señal es como se muestra en la SEQ ID NO: 2 del residuo de aminoácido 1 (Met) al residuo de aminoácido 27 (Ala).
- 15 13. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 10-12 para uso como un medicamento.
14. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido homólogo FGF purificado de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 10-12, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

FHF-1	-----MAAAIASSLIRQKQQARESNS-DRVSASKRRSSPSKDG-R	38
FGF-10	-----	
FHF-4	-----MAAAIASGLIRQKQQAREQHW-DRPSASRRRSPSKN--R	37
FHF-2	-----MAAAIASSLIRQKQQAERER--EKSNAACKCVSSPSKG--K	35
FHF-3	-----MAALASSLIRQKREVREPPG-SRPVSAQRRVCP-RGT-K	36
FGF4 HUMANO	-----MS-GPGTAAVALLPVLLALL-APWAGRGGAAAPTAPN-G	37
FGF6 HUMANO	MALGQKLFITMSRGAGRLQGLWALVFLGIL-VGMVVP--SPAGTRAN-N	46
FGF2 HUMANO	-----	
FGF1 HUMANO	-----	
MGF-2	-----MWKWLTHCASAFPHLPGCC-CCFLLLFLVSSVPVTC-Q	38
FGF7 HUMANO	-----MHKWILTWLPTLLYR-S-----CFHIICLVGTISLAC-N	33
ZGI FUZFGF	-----MY-SAPSACTCLCLHFLLLCF-QVQ-----VLVAEE-N	30
FGF8 HUMANO	-----MG-SPRSALSCLLLHLLVLC-DAQEGPGRGPALGREL-A	37
FGF5 HUMANO	-----MSLSFLLLLFFSHLILSAWAHGEKRLAPKGQPGPAATDRN	40
FGF9 HUMANO	-----MAPLGEVGNYPGVQDAVPFGNVVPLP--VDSPLLS-D	35
FGF3 HUMANO	-----MGLIWLILLSLEP-----G-----WPAAGPGA	23
FHF-1	SLCERHV---LGVFSKVRFCSGR-----KRPVRRRPEPQLKGIVT	75
FGF-10	-----MASKEPQLKGIVT	13
FHF-4	GLCNGNL---VDIFSKVRFGLK-----KRRLRQ-DPQLKGIVT	73
FHF-2	TSCDKNK---LNVFSRVKLFSGK-----KRRRRRP-EPQLKGIVT	71
FHF-3	SLCQKQL---LILLSKVRFCGGRP-----ARPDGRP-EPQLKGIVT	73
FGF4 HUMANO	TLEAELERR-WESLVALSLARLPVAAQPKA-AAVQSGAGDYLLG-IKRLR	84
FGF6 HUMANO	TLLDS--RG-WGTLLSRSRAGL---AG--E-IAGVNWESGYLVG-IKRQR	86
FGF2 HUMANO	-----MAAGSITTLPALPE-----DGGSGAFPFGHFKDPK	30
FGF1 HUMANO	-----MAEGEITTFALTE-----KFN---LPPGNYKPK	27
MGF-2	ALGQDMVSP-EATNSSSSSFSSPSSAG-----RHVRSYNHLQG-DVRWR	80
FGF7 HUMANO	DMTPEQM---ATNVNCS---SPE-----RHTRSVDYMEGGDIRVR	67
ZGI FUZFGF	VDFRID-----VEK-----QTRARDDVSRKQLRLY	55
FGF8 HUMANO	SLFRAGR---EPQGVSOQHVRE-----QSLVTDQLSRRLIRTY	72
FGF5 HUMANO	PIGSSSRQSSSSAMSSSSASSSPAASLGSQSGLEQSSSQWSPS-GRRTG	89
FGF9 HUMANO	HLGQS-----E--AGGLPRGP-----AVTDLDHLKG-ILRRR	64
FGF3 HUMANO	RLRRD-----AGG-----RGGVYEHLLG-APRRR	46
FHF-1	RLFSQQ--GYFLQMHDPGTIDGTDKENS DYTLFNLIPVGLR-VVAIQGVK	122
FGF-10	RLFSQQ--GYFLQMHDPGTIDGTDKENS DYTLFNLIPVGLR-VVAIQGVK	60
FHF-4	RLYCRQ--GYFLQMHDPGALDGTKDDSTNSTL FNLIPVGLR-VVAIQGVK	120
FHF-2	KLYSRQ--GYHLQLQADGTIDGTDKEDSTYTLFNLIPVGLR-VVAIQGVK	118
FHF-3	KLFCRQ--GFYLANPDGSIQGTPEDTSSFTHFNLIPVGLR-VVTIQSAK	120
FGF4 HUMANO	RLYCNVIGIFHLQALPDGRIGGAHADT-RDSLLELSPVERG-VVSIFGVA	132
FGF6 HUMANO	RLYCNVIGIFHLQVLPDGRISGTHEEN-PYSLLEISTVERG-VVSLFGVR	134
FGF2 HUMANO	RLYCKNG-GFFLRIPHDPGRVDGVREKSDPHIKLQLQAEERG-VVSIKGVK	78
FGF1 HUMANO	LLYCSNG-GHFLRILPDGTVDGTRDRSDQHILQLSAESVG-EVYIKSTE	75
MGF-2	KLFSFT--KYFLKIEKNGKVSGTKKENCPSYILEITSVEIG-VVAVKAIN	127
FGF7 HUMANO	RLFCRT--QWYLRIDKRGKVKGTQEMKNYNIMEIRTAVG-IVAIGVE	114
ZGI FUZFGF	QLYSRTS-GKHIQVLG-RRISARGEDGDKYAQLLVETDTFGSRVVRGAE	103
FGF8 HUMANO	QLYSRTS-GKHVQVLANKRINAMAEDGDPFAKLIVETDTFGSRVVRGAE	121
FGF5 HUMANO	SLYCRVIGIFHLQIYPDGKVNCSHEAN-MLSVLEIFAVSQG-IVGIRGVF	137
FGF9 HUMANO	QLYCRT--GFHLEIFPNGTIOGTRKDHSRFGILEFISIAVG-LVSIRGVD	111
FGF3 HUMANO	KLYCAT--KYHLQLHPSGRVNGSLENS-AYSILEITAVEVG-IVAIRGLF	92
	*: * : .	

Fig. 1

FHF-1	ASLYVAMNGEGYLYSSDV-FTPECKFKESVFENYYVIYSSSTLYRQOESG-	170
FGF-10	ASLYVAMNGEGYLYSSDV-FTPECKFKESVFENYYVIYSSSTLYRQOESG-	108
FHF-4	TGLYIAMNGEGYLYPSEL-FTPECKFKESVFENYYVIYSSMLYRQOESG-	168
FHF-2	TKLYLAMNSEGYLYTSEL-FTPECKFKESVFENYYVYSSMIYRQOQSG-	166
FHF-3	LGHYAMNAEGLLYSSPH-FTAECRFKESVFENYYVLYASALYRORRSG-	168
FGF4 HUMANO	SRFFVAMSSKGLYGSFP-FTDECTFKEILLPNNYNAYESYKYPG-----	176
FGF6 HUMANO	SALFVAMNSKGRLYATPS-FQECKFRETLLPNNYNAYESDLYQG-----	178
FGF2 HUMANO	ANRYLAMKEDGRLLASKC-VTDECFFERLESNNYNTYRSRKYTS-----	122
FGF1 HUMANO	TGQYLAMDTDGLLYGSQT-PNEECLFLERLEENHYNTYISKKHAEK--N-	121
KGF-2	SNYYLAMNKKGKLYGSKE-FNNDCKLKERIEENGYNTYASFNWQHN--G-	173
FGF7 HUMANO	SEFYLAMNKEGKLYAKKE-CNEDCNFKELILENHYNTYASAKWTHN--G-	160
ZGI FUZFGF	TEFYLCMNRKGLVKGPDGTSKECVFIEKVLNNYALMSAKYSG-----	148
FGF8 HUMANO	TGLYICMNNKGLIAKSNKGKDCVTFEIVLENNYALQNAKYEG-----	166
FGF5 HUMANO	SNKFLAMSKKGLHASAK-FTDDCKFRERFQENSYNTYASAIHRTEKGT-	185
FGF9 HUMANO	SGLYLGMNEKGLYGESEK-LTQECVFEQFEENWYNTYSSNLYKHVDTG-	159
FGF3 HUMANO	SGRYLAMNKRGLYASEH-YSAECEFVERIHELGYNTYASRLYRTVSSTP	141
	:: * . * * . : * : * . *	
FHF-1	-----RAWFLGLNKEGQIMKG--NRVKKTKPSSHFPKPIEVCMYR	209
FGF-10	-----RAWFLGLNKEGQIMKG--NRVEKTKPSSHFPKPIEVCMYR	147
FHF-4	-----RAWFLGLNKEGQAMKG--NRVKKTKPAAHFLPKPLEVAMYR	207
FHF-2	-----RGWYLGLNKEGEMKG--NHVKKNKPAAHFLPKPLKVAMYK	205
FHF-3	-----RAWYLGLDKEGQVMKG--NRVKKTKAAAHFLPKLLEVAMYQ	207
FGF4 HUMANO	-----MFIALSKNGKTKKG--NRVSPTMKVTHFLPRL-----	206
FGF6 HUMANO	-----TYIALSKYGRVKRG--SKVSPIMTVTHFLPRI-----	208
FGF2 HUMANO	-----WYVALKRTGQYKLG--SKTGPQQAIFLPLMSAKS----	155
FGF1 HUMANO	-----WFVGLKKNKGSCKRG--PRTHYGQKAILFLPLPVSSD---	155
KGF-2	-----ROMYVALNGKGAPRRG--QKTRRKN TSAHFLPMVVHS----	208
FGF7 HUMANO	-----GEMFVALNOKGIPVRG--KKTKEQKTAHFLPMAIT----	194
ZGI FUZFGF	-----WYVGFTTKGRPRKG--PKTRENQDQVHFMKRYPKGQPEL	185
FGF8 HUMANO	-----WYMAFTRKGRPRKG--SKTROHQREVHFMKRPRGHHTT	203
FGF5 HUMANO	-----REWYVALNKRKAKRGCSPRVKQHIHSTHFLPRFKQSEQ-P	225
FGF9 HUMANO	-----RRYYVALNKDGTREG--TRTKRHQKFTHFLPRPVDPKVP	198
FGF3 HUMANO	GARRQPSAERLWYVSVNGKGRPRG--FKTRRTQKSSLFLPRVLDHRDHE	189
	::: . * * * : . *	
FHF-1	EPSSLHEIGEKQ----GRS--RKSSGTPMTMNGGKVVNQDST-----	243
FGF-10	EPSSLHEIGENK----GVQ--GKFWTPP-----	168
FHF-4	EPSLHDVGETVPKP-GVTPSKSTSASAIMNGGKPVNKSKT-----	247
FHF-2	EPSLHDLTEFSRSG-SGTPTKSRSVSGVLNNGGKSMHNEST-----	245
FHF-3	EPSLHSVPEAS-----P--SSPPAP-----	225
FGF4 HUMANO	-----	
FGF6 HUMANO	-----	
FGF2 HUMANO	-----	
FGF1 HUMANO	-----	
KGF-2	-----	
FGF7 HUMANO	-----	
ZGI FUZFGF	QKPFKYTTVTK----RSRR--IRPTHPA-----	207
FGF8 HUMANO	EQSLRFEFLNYPPF-TRSLRGSORTWAPEPR-----	233
FGF5 HUMANO	ELSFTVTVPEKKNP-PSPKSKIPLSAPRKNTNSVKYRLKFRFG-----	268
FGF9 HUMANO	ELYKDILSQS-----	208
FGF3 HUMANO	MVRQLQSQLPRPPGKGVQPRRRRQKQSPDNLEPSHVQASRLGSQLASAH	239

Fig. 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
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	0.34	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	0.36	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	0.24	0.26	0.31	0.28	0.30	0.30	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	0.40	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
7							1.00	0.34	0.98	0.33	0.76	0.81	0.34	0.37	0.67	0.42
8								1.00	0.34	0.54	0.34	0.37	0.36	0.36	0.34	0.38
9									1.00	0.33	0.66	0.72	0.34	0.37	0.62	0.42
10										1.00	0.32	0.35	0.40	0.37	0.32	0.43
11											1.00	0.68	0.36	0.38	0.58	0.41
12												1.00	0.36	0.33	0.62	0.42
13													1.00	0.47	0.34	0.32
14														1.00	0.30	0.31
15															1.00	0.38
16																1.00

Fig. 3