(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 377 935**

(51) Int. CI.:

C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/50 (2006.01)
C12N 15/18 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **00980829 .6**
(96) Fecha de presentación: **28.11.2000**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1234033**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **28.08.2002**

(54) Título: **Procedimiento para dirigir células que expresan receptor -3 o -2 del factor de crecimiento de fibroblastos**

(30) Prioridad:
02.12.1999 US 452977

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.04.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.04.2012

(73) Titular/es:
ZYMOGENETICS, INC.
1201 EASTLAKE AVENUE EAST
SEATTLE, WA 98102, US

(72) Inventor/es:
WEST, James, W.

(74) Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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

Procedimiento para dirigir células que expresan receptor -3 ó -2 del factor de crecimiento de fibroblastos

Campo técnico

La presente invención se refiere en general a composiciones que contienen un componente del factor de crecimiento de fibroblastos-18 como se define en las reivindicaciones, para dirigir una citotoxina a células que expresan receptor-3 del factor de crecimiento de fibroblastos o receptor-2 del factor de crecimiento de fibroblastos.

Antecedentes de la invención

El mieloma múltiple representa la segunda malignidad hematológica más común, con cerca de 15.000 nuevos casos cada año en los Estados Unidos (Henrick y col., Curr. Opin. Hematol. 5: 254 (1998)). La enfermedad se caracteriza por la proliferación maligna de células plasmáticas que implica más del 10% de la médula ósea (George y Sadovsky, Am. Fam. Physician 59:1885 (1999)). Las células de mieloma múltiple producen inmunoglobulinas monoclonales que se pueden identificar con electroforesis de proteína en suero u orina. Las manifestaciones clínicas más comunes incluyen dolor óseo, debilidad y fatiga (Kyle, Pathol. Biol. (Paris) 47:148 (1999)).

La quimioterapia convencional para mieloma múltiple se introdujo hace más de 30 años y desde entonces, ha habido poca mejora en el índice de supervivencia global (San Miguel y col., Haematologica 84:36 (1999)). A pesar de una amplia diversidad de opciones de tratamiento quimioterapéutico y paliativo, el mieloma múltiple es casi invariablemente fatal (Anderson y col., Semin. Hematol. 36 (Supl. 3): 3 (1999)). Aunque la quimioterapia de dosis elevadas seguida por trasplante de células madre produce índices de remisión más elevados, los pacientes rara vez, si acaso alguna vez, se curan mediante un régimen único (Anderson y col., Semin. Hematol. 36 (Supl. 3): 3 (1999)). La recaída es inevitable en todos excepto un pequeño número de casos y para la mayoría de los casos, el tratamiento únicamente produce, en el mejor de los casos, periodos de remisión con morbilidad y mortalidad relacionada con el tratamiento mínima (Smith y Newland, QJM 92: 11 (1999)). La supervivencia promedio total para todas las etapas de mieloma múltiple es de aproximadamente 3 años (Henrick y col., Curr. Opin. Hemetol. 5: 254 (1998); George y Sadovsky, Am. Fam. Physician 59: 1885 (1999)).

El documento WO 98/16644 describe homólogos de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF).

El documento WO 90/12597 describe conjugados de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF).

Hu Mickey CT y col., Molecular and Cellular Biology, Vol.18, Nº 10, octubre de 1998, págs 6063-6074, describen proliferación hepática e intestinal estimulada por FGF-18.

Colt-Fresno PM y col., Oncogene (16 de enero de 1997) Vol. 14(2), páginas 243-247, describen la actividad citolítica de una toxina de difteria/mitotoxina de FGF-6 sobre líneas de células tumorales humanas.

Por consiguiente, todavía existe una necesidad de procedimientos y composiciones mejorados para tratar el mieloma múltiple.

La presente invención proporciona una composición que comprende un polipéptido de FGF-18 o un fragmento funcional del mismo y una citotoxina, para su uso en la dirección de células tumorales que sobreexpresan Receptor-2 de FGF y/o Receptor-3 de FGF, en la que el polipéptido de FGF-18 o fragmento funcional dirige la composición al receptor de FGF-2 y/o el receptor de FGF-3; y

en la que el polipéptido de FGF-18 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

(i) restos de aminoácidos 28-207 de SEC ID Nº: 2; y
(ii) restos de aminoácidos 28-207 de SEC ID Nº: 4; y

en la que el fragmento funcional de FGF-18 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

(i) restos de aminoácidos 28-196 de SEC ID Nº: 2;
(ii) restos de aminoácidos 28-175 de SEC ID Nº: 2;
(iii) restos de aminoácidos 28-196 de SEC ID Nº: 4; y
(iv) restos de aminoácidos 28-175 de SEC ID Nº: 4.

Por tanto, la presente invención proporciona composiciones para su uso como se ha definido en las reivindicaciones, que se dirigen a células humorales que expresan receptor-2 ó 3 del factor de crecimiento de fibroblastos. La presente invención también proporciona la inhibición de la proliferación celular usando tales composiciones. Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada.

La familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) consiste en al menos dieciocho miembros diferentes, que generalmente actúan como mitógenos para un amplio espectro de tipos celulares (Basilico y col., Adv. Cancer Res. 59: 115 (1992); Fernig y col., Prog. Growth Factor Res. 5: 353 (1994)). Por ejemplo, FGF básico (también conocido como FGF-2) es mitógeno *in vitro* para células endoteliales, células de músculo liso vascular, fibroblastos y en general para células de origen mesodérmico o neuroectodérmico, incluyendo miocitos cardíacos y esqueléticos (Gospodarowicz y col., J. Cell. Biol. 70: 395 (1976); Gospodurowicz y col., J. cell Biol. 89: 568 (1981); Kardami, J. Mol. Cell. Biochem. 92: 124 (1990)). Diversos miembros de la familia de FGF también estimulan efectos no mitógenos, incluyendo liberación endotelial aumentada de activador de plasminógeno tisular, estimulación de síntesis de matriz extracelular, quimiotaxis de células endoteliales, expresión inducida de genes contráctiles fetales en cardiomiocitos y respuesta hormonal de la pituitaria potenciada (Baird y col., J. Cellular Physiol. 5: 101 (1987); Parker y col., J. Clin. Invest 85: 507 (1990)).

Deisher y col., publicación internacional Nº WO98/16644, describieron el descubrimiento de una nueva secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido homólogo de FGF que comparte homología con FGF-8 y FGF-17 (Hoshikawa y col., Biochem Biophys. Res. Comm. 244: 187 (1998)). El análisis de secuencia de una molécula de ADNc que codifica el nuevo FGF, denominada “zFGF5”, reveló la secuencia de nucleótidos de SEC ID Nº: 1, que incluye una fase de lectura abierta que codifica 207 aminoácidos (SEC ID Nº: 2) que comprende un polipéptido maduro de 180 aminoácidos (resto 28 a resto 207 de SEC ID Nº: 2). El alineamiento múltiple de zFGF5 con otros polipéptidos de FGF conocidos reveló un bloque de porcentaje de identidad significativo correspondiente al resto de aminoácido Cys127 con el resto de aminoácido Tyr138 de SEC ID Nº: 2. El análisis de la distribución de tejido del ARNm humano que corresponde a este ADN novedoso mostró que la expresión fue más elevada en tejido cardíaco fetal y tejido cardíaco adulto, seguido por niveles de expresión evidentes pero disminuidos en pulmón fetal, músculo esquelético, tejidos de músculo liso tales como intestino delgado, colon y tráquea.

Un ADNc de zFGF5 murino se clonó usando la reacción en cadena de la polimerasa con una biblioteca de ADNc de embrión de ratón como un molde y cebadores oligonucleotídicos diseñados a partir de los extremos 5’ y 3’ del ADNc de zFGF5 humano (Deisher y col., publicación internacional Nº WO98/16644). La secuencia polinucleotídica de zFGF5 murina se muestra en SEC ID Nº: 3 y la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra en SEC ID Nº: 4. A nivel de aminoácido, los polipéptidos murino y humano son aproximadamente el 98% idénticos, con los siguientes tres cambios de aminoácidos: resto de aminoácido 26 es valina en la secuencia humana y alanina en la secuencia murina, el resto de aminoácido 183 es prolina en la secuencia humana y alanina en la secuencia murina y el resto de aminoácido 207 es alanina en la secuencia humana y glicina en la secuencia murina. Ya que los veintiséis restos de aminoácido de ambas secuencias aparecen en la secuencia señal secretora, existen únicamente dos diferencias de aminoácido en los polipéptidos maduros.

La nueva forma de FGF también se ha descrito por Hu y col., Mol. Cell. Biol. 18: 6063 (1998), Ohbayashi y col., J. Biol. Chem. 273: 18161 (1998) y Hu y col., Oncogene 18: 2635 (1999)). Siguiendo la convención de nomenclatura de FGF, estos grupos designaron el nuevo polipéptido como “FGF-18”. Por consiguiente, zFGF5 se denomina en el presente documento FGF-18.

Existen cuatro receptores de FGF extracelulares conocidos y los mismos son todos tirosina quinasas. En general, los miembros de la familia FGF se unen a todos los receptores de FGF conocidos, sin embargo, formas de FGF específicas se unen a receptores específicos con grados más elevados de afinidad. Hu y col., Oncogene 18: 2635 (1999), indicaron que no está claro si FGF-18 se une a cualquier miembro conocido de la familia de receptores de FGF o si FGF-18 se une a un receptor novedoso. El presente inventor ha descubierto que FGF-18 tiene una especificidad elevada por el receptor-3 de FGF y una especifidad más baja por el receptor-2 de FGF. FGF-18 no se une a otros miembros de la familia de receptores de FGF incluso a concentraciones relativamente elevadas del ligando. Estas observaciones indican que FGF-18 se puede usar para dirigirse a células que expresan receptor-3 de FGF y en un alcance más reducido, receptor-2 de FGF. Por ejemplo, FGF-18 se puede usar como un resto de dirección para explorar bancos celulares o cortes de tejido para la identificación de células que expresan receptores afines. Por el contrario, una composición que comprende un componente de FGF-18 y una citotoxina se puede usar para eliminar células que expresan receptores afines de preparaciones de líneas celulares continuas o tejido primario.

Como se ha definido en las reivindicaciones, la presente invención proporciona composiciones de dirección de FGF-18 que comprenden un componente de FGF-18 y una citotoxina. Los componentes de FGF-18 incluyen polipéptidos de FGF-18 y fragmentos funcionales de FGF-18. Un polipéptido de FGF-18 es un polipéptido que comprende restos de aminoácidos 28 a 207 de SEC ID Nº: 2 o SEC ID Nº: 4. Un fragmento funcional de FGF-18 es un polipéptido que comprende restos de aminoácidos 28 a 175 de SEC ID Nº: 2 o SEC ID Nº: 4 o restos de aminoácidos 28 a 196 de SEC ID Nº: 2 o SEC ID Nº: 4.

Los restos de citotoxina adecuados incluyen proteínas inactivadoras de ribosomas, inmunomoduladores, fármacos quimioterapéuticos, inhibidores de tirosina quinasa, quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos e isótopos radiactivos.

Las composiciones de dirección de FGF-18 pueden comprender un componente de FGF-18 y citotoxina que están enlazados covalentemente entre sí. Por ejemplo, una composición de dirección de FGF-18 puede comprender un

conjugado de FGF-18. Un ejemplo de un conjugado de FGF-18 es un conjugado de FGF-18-saporina.

Como alternativa, las composiciones de dirección de FGF-18 pueden comprender una proteína de fusión de dirección de FGF-18. Las proteínas de fusión ilustrativas incluyen polipéptidos que comprenden una citotoxina seleccionada entre el grupo que consiste en proteína inactivadora de ribosomas de tipo I, proteína inactivadora de ribosomas de tipo II, inmunomodulador, ribonucleasa, ADNasa I, enterotoxina-A estafilocócica, toxina de difteria, exotoxina de *Pseudomonas* y endotoxina de *Pseudomonas*.

En otra variación, la composición de dirección de FGF-18 comprende un liposoma de dirección de FGF-18.

La presente invención también proporciona la inhibición de la proliferación de células que expresan receptor-3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o receptor-2 del FGF, usando una composición que comprende una composición de dirección de FGF-18 como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, la composición administrada puede ser una composición farmacéutica y la composición farmacéutica es para administración en una cantidad terapéuticamente eficaz a un sujeto que tiene un tumor, en el que el tumor comprende células que expresan receptor-3 de FGF o receptor-2 de FGF. Tales composiciones pueden ser para su uso para inhibir células *in vitro* o *in vivo*, incluyendo células de mieloma múltiple, células de carcinoma de vejiga, células de carcinoma de cérvix, células de carcinoma de tiroides, células de osteosarcoma y células de músculo liso de la íntima.

La presente invención también contempla composiciones (como se define en las reivindicaciones) que comprenden una composición de dirección de FGF-18 y un vehículo. El vehículo puede ser un vehículo orgánico o inorgánico convencional. Los ejemplos de vehículos incluyen agua, solución tampón, alcohol, propilenglicol, macrogol, aceite de sésamo, aceite de maíz y similares. Como una ilustración, la composición puede ser una composición farmacéutica y el vehículo puede ser un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los aspectos adicionales de la presente invención se describen más adelante.

2. Definiciones

En la descripción a continuación, se usan ampliamente varios términos. Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar la compresión de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, “ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico” se refiere a polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y fragmentos generados por cualquiera de ligamiento, escisión, acción de endonucleasa y acción de exonucleasa. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas de monómeros que son nucleótidos de origen natural (tales como ADN y ARN) o análogos de nucleótidos de origen natural (por ejemplo, formas α-enantioméricas de nucleótidos de origen natural) o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en restos de azúcar y/o en restos de base de pirimidina o purina. Las modificaciones de azúcar incluyen, por ejemplo, remplazo de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido o azúcares que se pueden funcionalizar como éteres o ésteres. Además, el resto de azúcar entero se puede remplazar con estructuras estéricamente y electrónicamente similares, tales como aza-azúcares y análogos de azúcar carbocíclicos. Los ejemplos de modificación en un resto de base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Los monómeros de ácido nucleico se pueden enlazar mediante puentes de fosfodiéster o análogos de tales enlaces. Los análogos de los enlaces de fosfodiéster incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosfomanilotioato, fosforanilidato, fosforamidato y similares. El término “molécula de ácido nucleico” también incluye los denominados “ácidos nucleicos peptídicos”, que comprenden bases de ácido nucleico de origen natural o modificadas unidas a una estructura de poliamida. Los ácidos nucleicos pueden ser de cadena única o de doble cadena.

La expresión “complemento de una molécula de ácido nucleico” se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de nucleótidos de referencia.

El término “contig” indica una molécula de ácido nucleico que tiene un tramo contiguo de secuencia idéntica o complementaria a otra molécula de ácido nucleico. Las secuencias contiguas se dice que “solapan” un tramo determinado de una molécula de ácido nucleico en su totalidad o a lo largo de un tramo parcial de la molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, los contigs ilustrativos de la secuencia polinucleotídica 5’ ATGGAGCTT 3’ son 5’ AGCTTgagt 3’ y 3’ tcgacTACC 5’.

La expresión “secuencia de nucleótidos degenerada” indica una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados en comparación con una molécula de ácido nucleico de referencia que codifica un polipéptido. Los codones degenerados contienen diferentes tripletes de nucleótidos, pero codifican el mismo resto de aminoácido (es decir, los tripletes GAU y GAC cada uno codifica Asp).

El término “gen estructural” se refiere a una molécula de ácido nucleico que se transcribe en ARN mensajero (ARNm), que después se traduce en una secuencia de aminoácidos característica de un polipéptido específico.

Una “molécula de ácido nucleico aislada” es una molécula de ácido nucleico que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica un factor del crecimiento que se ha separado del ADN genómico de una célula es una molécula de ADN aislada. Otro ejemplo de una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico sintetizada químicamente que no está integrada en el genoma de un organismo. Una molécula de ácido nucleico que se ha aislado a partir de una especie particular es más pequeña que la molécula de ADN completa de un cromosoma de esa especie.

Una “construcción de molécula de ácido nucleico” es una molécula de ácido nucleico, de cadena única o doble, que se ha modificado a través de intervención humana para que contenga segmentos de ácido nucleico combinados y yuxtapuestos en una disposición que no existe en la naturaleza.

“ADN lineal” indica moléculas de ADN no circulares que tienen extremos 5’ y 3’ libres. El ADN lineal se puede preparar a partir de moléculas de ADN circulares cerradas, tales como plásmidos, mediante digestión enzimática o alteración física.

“ADN complementario (ADNc)” es una molécula de ADN de cadena única que se forma a partir de un molde de ARNm mediante la enzima transcriptasa inversa. Típicamente, se emplea un cebador complementario a partes de ARNm para el inicio de la transcripción inversa. Los expertos en la materia usan el término “ADNc” para referirse a una molécula de ADN de doble cadena que consiste en una molécula de ADN de cadena única de este tipo y su cadena de ADN complementaria. El término “ADNc” también se refiere a un clon de una molécula de ADN sintetizado a partir de un molde de ARN.

Un “promotor” es una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de un gen estructural. Típicamente, un promotor se localiza en la región no codificante 5’ de un gen, proximal al sitio de inicio de la transcripción de un gen estructural. Los elementos de secuencia dentro de los promotores que funcionan en el inicio de la transcripción con frecuencia se caracterizan por secuencias de nucleótidos de consenso. Estos elementos promotores incluyen sitios de unión a ARN polimerasa, secuencias TATA, secuencias CAAT, elementos específicos de diferenciación (DSE; McGehee y col., Mol. Endocrinol. 7: 551 (1993)), elementos de respuesta de AMP cíclico (CRE), elementos de respuesta de suero (SRE; Treisman, Seminars in Cancer Biol. 1: 47 (1990)), elementos de respuesta de glucocorticoide (GRE) y sitios de unión para otros factores de transcripción, tales como CRE/ATF (O’Reilly y col., J. Biol. Chem. 267: 19938 (1992)), AP2 (Ye y col., J. Biol. Chem. 269: 25728 (1994)), SP1, proteína de unión a elemento de respuesta de AMPc (CREB; Loeken, Gene Expr. 3: 253 (1993)) y factores octaméricos (véase, en general, Watson y col., eds., Molecular Biology of the Gene, 4ª ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987), y Lemaigre y Rousseau, Biochem. J. 303: 1 (1994)). Si un promotor es un promotor inducible, entonces el índice de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. Por el contrario, el índice de transcripción no está regulado por un agente de inducción si el promotor es un promotor constitutivo. También se conocen promotores represibles.

Un “promotor mínimo” contiene secuencias de nucleótidos esenciales para función promotora, incluyendo la caja TATA y el inicio de la transcripción. Mediante esta definición, un promotor mínimo puede o no tener actividad detectable en ausencia de secuencias específicas que pueden potenciar la actividad o conferir actividad específica de tejido.

Un “elemento regulador” es una secuencia de nucleótidos que modula la actividad de un promotor mínimo. Por ejemplo, un elemento regulador puede contener una secuencia de nucleótidos que se une a factores celulares que posibilitan la transcripción exclusivamente o preferentemente en células, tejidos u organelas particulares. Estos tipos de elementos reguladores están asociados normalmente con genes que se expresan de una manera “específica de célula”, “específica de tejido” o “específica de organela”.

Un “potenciador” es un tipo de elemento regulador que puede aumentar la eficacia de la transcripción, independientemente de la distancia u orientación del potenciador con relación al sitio de inicio de la transcripción.

“ADN heterólogo” se refiere a una molécula de ADN o una población de moléculas de ADN, que no existe de forma natural dentro de una célula huésped determinada. Las moléculas de ADN heterólogas para una célula huésped particular pueden contener ADN obtenido a partir de las especies de células huésped (es decir, ADN endógeno) siempre y cuando ese ADN de huésped esté combinado con ADN no de huésped (es decir, ADN exógeno). Por ejemplo, una molécula de ADN que contiene un segmento de ADN no de huésped que codifica un polipéptido unido operativamente a un segmento de ADN de huésped que comprende un promotor de transcripción se considera que es una molécula de ADN heteróloga. Por el contrario, una molécula de ADN heteróloga puede comprender un gen endógeno unido operativamente a un promotor exógeno. Como otra ilustración, una molécula de ADN que comprende un gen obtenido a partir de una célula de tipo silvestre se considera que es ADN heterólogo si esa molécula de ADN se introduce en una célula mutante que carece del gen de tipo silvestre.

Un “polipéptido” es un polímero de restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, producidos naturalmente o sintéticamente. Los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 restos de aminoácidos se denominan comúnmente “péptidos”.

Una “proteína” es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos de carbohidrato. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos se pueden añadir a una proteína por la célula en la cual se produce la proteína y variarán con el tipo de célula. Las proteínas se definen en el presente documento en términos de sus estructuras de cadena principal de aminoácidos; los sustituyentes tales como grupos de carbohidrato generalmente no se especifican, pero sin embargo pueden estar presentes.

Un péptido o polipéptido codificado por una molécula de ADN no de huésped es un péptido o polipéptido “heterólogo”.

Un “elemento genético integrado” es un segmento de ADN que se ha incorporado en un cromosoma de una célula huésped después de que ese elemento se introduce en la célula a través de manipulación humana. Dentro de la presente invención, los elementos genéticos integrados se obtienen más comúnmente a partir de plásmidos linealizados que se introducen en las células mediante electroporación u otras técnicas. Los elementos genéticos integrados se pasan de la célula huésped original a su progenie.

Un “vector de clonación” es una molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido, cósmido o bacteriófago, que tiene la capacidad de replicarse de forma autónoma en una célula huésped. Los vectores de clonación típicamente contienen uno o una cantidad pequeña de sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción que permiten la inserción de una molécula de ácido nucleico de una manera determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vector, así como secuencias de nucleótidos que codifican un gen marcador que es adecuado para su uso en la identificación y selección de células transformadas con el vector de clonación. Los genes marcadores típicamente incluyen genes que proporcionan resistencia a tetraciclina o resistencia a ampicilina.

Un “vector de expresión” es una molécula de ácido nucleico que codifica un gen que se expresa en una célula huésped. Típicamente, un vector de expresión comprende un promotor de transcripción, un gen y un terminador de la transcripción. La expresión génica habitualmente se coloca bajo el control de un promotor y un gen de este tipo se dice que está “unido operativamente” al promotor. De forma similar, un elemento regulador y un promotor mínimo están unidos operativamente si el elemento regulador modula la actividad del promotor mínimo.

Un “huésped recombinante” es una célula que contiene una molécula de ácido nucleico heteróloga, tal como un vector de clonación o un vector de expresión. En el presente contexto, un ejemplo de un huésped recombinante es una célula que produce FGF-18 a partir de un vector de expresión. Por el contrario, FGF-18 se puede producir por una célula que es una “fuente natural” de FGF-18 y que carece de un vector de expresión.

“Transformantes integrativos” son células huésped recombinantes, en las cuales el ADN heterólogo se ha integrado en el ADN genómico de las células.

Una “proteína de fusión” es una proteína híbrida expresada por una molécula de ácido nucleico que comprende secuencias de nucleótidos de al menos dos genes. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender al menos parte de un polipéptido de FGF-18 fusionado a un polipéptido que se une a una matriz de afinidad. Una proteína de fusión de este tipo proporciona un medio para aislar grandes cantidades de FGF-18 usando cromatografía de afinidad.

El término “receptor” indica una proteína asociada a célula que se une a una molécula bioactiva denominada un “ligando”. Esta interacción media el efecto del ligando sobre la célula. Los receptores pueden ser unidos a membrana, citosólicos o nucleares, monoméricos (por ejemplo, receptor de la hormona estimulante de tiroides, receptor beta adrenérgico) o multiméricos (por ejemplo, receptor de PDGF, receptor de la hormona de crecimiento, receptor de IL-3, receptor de GM-CSF, receptor de G-CSF, receptor de eritropoyetina y receptor de IL-6). Los receptores unidos a membrana se caracterizan por una estructura multidominio que comprende un dominio de unión a ligando extracelular y un dominio efector intracelular que está implicado típicamente en la traducción de señal. En determinados receptores unidos a membrana, el dominio de unión a ligando extracelular y el dominio efector intracelular se localizan en polipéptidos separados que comprenden el receptor funcional completo.

En general, la unión de ligando a receptor da como resultado un cambio conformacional en el receptor que provoca una interacción entre el dominio efector y otra molécula o moléculas en la célula, que a su vez conduce a una alteración en el metabolismo de la célula. Los acontecimientos metabólicos que con frecuencia están vinculados a interacciones de receptor-ligando incluyen transcripción génica, fosforilación, desfosforilación, aumentos en la producción de AMP cíclico, movilización de calcio celular, movilización de lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos.

El término “secuencia señal secretora” indica una secuencia de ADN que codifica un péptido (un “péptido secretor”) que, como un componente de un polipéptido más grande, dirige al polipéptido más grande a través de una ruta secretora de una célula en la cual el mismo se sintetiza. El polipéptido más grande comúnmente se escinde para eliminar el péptido secretor durante el tránsito a través de la ruta secretora.

Un “polipéptido aislado” es un polipéptido que está básicamente libre de componentes celulares contaminantes, tales como carbohidratos, lípidos u otras impurezas proteínicas asociadas con el polipéptido en la naturaleza.

Típicamente, una preparación de polipéptido aislado contiene el polipéptido en una forma altamente purificada, es decir, al menos aproximadamente el 80% pura, al menos aproximadamente el 90% pura, al menos aproximadamente el 95% pura, más del 95% pura o más del 99% pura. Una manera de mostrar que una preparación de proteína particular contiene un polipéptido aislado es mediante la aparición de una banda única a continuación de electroforesis en gel de (SDS)-poliacrilamida de dodecil sulfato sódico de la preparación de proteína y tinción de Azul Brillante de Coomassie del gel. Sin embargo, el término “aislado” no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros o formas alternativamente glicosiladas o derivatizadas.

Los términos “amino-terminal” y “carboxilo-terminal” se usan en el presente documento para indicar posiciones dentro de los polipéptidos. Cuando el contexto lo permite, estos términos se usan con referencia a una secuencia o parte particular de un polipéptido para indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una secuencia determinada posicionada carboxilo-terminal a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido se localiza proximal al extremo carboxilo de la secuencia de referencia, pero no está necesariamente en el extremo carboxilo del polipéptido completo.

El término “expresión” se refiere a la biosíntesis de un producto génico. Por ejemplo, en el caso de un gen estructural, la expresión implica la transcripción del gen estructural en ARNm y la traducción de ARNm en uno o más polipéptidos.

El término “variante de corte y empalme” se usa en el presente documento para indicar formas alternativas de ARN transcritas a partir de un gen. La variación de corte y empalme surge de forma natural a través del uso de sitios de corte y empalme alternativos dentro de una molécula de ARN transcrita o menos comúnmente entre moléculas de ARN transcritas por separado y puede dar como resultado varios ARNm transcritos a partir del mismo gen. Las variantes de corte y empalme pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. El término variante de corte y empalme también se usa en el presente documento para indicar un polipéptido codificado por una variante de corte y empalme de un ARNm transcrito a partir de un gen.

El término “par complemento/anticomplemento” indica restos no idénticos que forman un par asociado no covalentemente estable en condiciones apropiadas. Por ejemplo, biotina y avidina (o estreptavidina) son miembros prototípicos de un par complemento/anticomplemento. Otros pares complemento/anticomplemento ilustrativos incluyen pares receptor/ligando, pares anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítopo), pares de polinucleótidos sentido/antisentido y similares. Cuando se desea la disociación posterior del par complemento/anticomplemento, el par complemento/anticomplemento preferentemente tiene una afinidad de unión de menos de 10^9 M^{-1}.

Un “anticuerpo antiidiotipo” es un anticuerpo que se une con el dominio de región variable de una inmunoglobulina. En el presente contexto, un anticuerpo antiidiotipo se une a la región variable de un anticuerpo anti-FGF-18 y mimetiza un epítopo de FGF-18. Por ejemplo, un anticuerpo antiidiotipo de FGF-18 se une a al menos uno del receptor-2 de FGF o el receptor-3 de FGF.

Un “fragmento de anticuerpo” es una parte de un anticuerpo tal como $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab’, Fab y similares. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une al mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo monoclonal anti-FGF-18 se une a un epítopo de FGF-18.

El término “fragmento de anticuerpo” también incluye un polipéptido sintético o sometido a ingeniería genética que se une a un antígeno específico, tal como polipéptidos que consisten en la región variable de cadena ligera, fragmento “Fv” que consisten en las regiones variables de las cadena pesada y ligera, moléculas de polipéptidos de cadena única recombinantes en las cuales las regiones variables ligera y pesada están conectadas por un engarce peptídico (“proteínas scFv”) y unidades de reconocimiento mínimas que consisten en los restos de aminoácidos que mimetizan la región hipervariable.

Un “anticuerpo quimérico” es una proteína recombinante que contiene los dominios variables y regiones determinantes de complementariedad obtenidas a partir de un anticuerpo de roedor, mientras que el resto de la molécula de anticuerpo se obtiene a partir de un anticuerpo humano.

“Anticuerpo humanizados” son proteínas recombinantes en las cuales las regiones determinantes de complementariedad murinas de un anticuerpo monoclonal se han transferido desde las cadenas variables pesada y ligera de la inmunoglobulina murina a un dominio variable humano.

El término “etiqueta de afinidad” se usa en el presente documento para indicar un segmento polipeptídico que se puede unir a un segundo polipéptido para proporcionar purificación o detección del segundo polipéptido o proporciona sitios de unión del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, cualquier péptido o proteína para los cuales un anticuerpo u otro agente de unión específico está disponible se puede usar como una etiqueta de afinidad. Las etiquetas de afinidad incluyen tracto de poli-histidina, proteína A (Nilsson y col., EMBO J. 4: 1075 (1985); Nilsson y col., Methods Enzymol. 198: 3 (1991)), glutatión S transferasa (Smith y Johnson, Gene 67: 31 (1988)), etiqueta de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer y col., Proc. Natl. Acad Sci. USA 82: 7952 (1985)), sustancia P, péptido FLAG (Hopp y col., Biotechnology 6: 1204 (1988)), péptido de unión a estreptavidina u otro epítopo antigénico o dominio de unión. Véase, en general, Ford y col., Protein Expression and Purification 2: 95 (1991). Las moléculas de ADN que

codifican etiquetas de afinidad están disponibles en distribuidores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Un “anticuerpo desnudo” es un anticuerpo completo, a diferencia de un fragmento de anticuerpo, que no está conjugado con un agente terapéutico, tal como una citotoxina. Los anticuerpos desnudos incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, así como determinados anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos quiméricos y humanizados.

Como se usa en el presente documento, el término “componente de anticuerpo” incluye tanto un anticuerpo completo como un fragmento de anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, el término “proteína de fusión de anticuerpo” se refiere a una molécula recombinante que comprende un componente de anticuerpo y un componente de polipéptido FGF-18. Los ejemplos de una proteína de fusión de anticuerpo incluyen una proteína que comprende un polipéptido FGF-18 y un dominio Fc o una región de unión a antígeno.

El término “gen de *FGF-18* variante” se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es una modificación de SEC ID Nº: 2. Tales variantes incluyen polimorfismos de origen natural de genes de *FGF-18*, así como también genes sintéticos que contienen sustituciones de aminoácidos conservativas de la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 2. Las formas variantes adicionales de genes de *FGF-18* son moléculas de ácido nucleico que contienen inserciones o supresiones de las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento. Un gen de *FGF-18* variante se puede identificar, por ejemplo, determinando si el gen se hibrida con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de SEC ID Nº: 1 o su complemento, en condiciones rigurosas.

Como alternativa, los genes de *FGF-18* variantes se pueden identificar mediante comparación de secuencias. Dos secuencias de aminoácidos tienen una “identidad de secuencia de aminoácidos del 100%” si los restos de aminoácidos de las dos secuencias de aminoácidos son los mismos cuando se alinean para correspondencia máxima. De forma similar, dos secuencias de nucleótidos tienen “identidad de secuencia del 100% de nucleótidos” si los restos de nucleótidos de las dos secuencias de nucleótidos son iguales cuando se alinean para correspondencia máxima. Las comparaciones de secuencia se pueden realizar usando programas de software convencionales tales como los incluidos en la suite informática de bioinformática de LASERGENE, producida por DNASTAR (Madison, Wisconsin). Los expertos en la materia conocen bien otros procedimientos para comparar dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos determinando el alineamiento óptimo (véase, por ejemplo, Peruski y Peruski, The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research (ASM Press, Inc. 1997), Wu y col. (eds.), "Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins," en Methods in Gene Biotechnology, páginas 123-151 (CRC Press, Inc. 1997) y Bishop (ed.), Guide to Human Genome Computing, 2ª edición (Academic Press, Inc. 1998)). Los procedimientos particulares para determinar identidades de secuencia se describen más adelante.

Independientemente del procedimiento particular usado para identificar un gen de *FGF-18* variante o polipéptido de FGF-18 variante, un gen o polipéptido variante codificado por un gen variante se puede caracterizar funcionalmente por la habilidad de unirse específicamente a un anticuerpo anti-FGF-18 o con la capacidad de unirse a un receptor-2 de FGF o receptor-3 de FGF.

El término “variante alélica” se usa en el presente documento para indicar cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge de forma natural a través de la mutación y puede dar como resultado polimorfismos fenotípicos dentro de poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silentes (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. El término variante alélica también se usa en el presente documento para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

El término “ortólogo” indica un polipéptido o proteína obtenido a partir de una especie que es el homólogo funcional de un polipéptido o proteína a partir de una especie diferente. Las diferencias de secuencias entre ortólogos son el resultado de la especiación.

Los “parálogos” son proteínas diferentes pero relacionadas estructuralmente preparadas por un organismo. Los parálogos se cree que surgen a través de la duplicación génica. Por ejemplo, α-globina, βP-globina y mioglobina son parálogos entre sí.

Un “polipéptido de FGF-18” es un polipéptido que se une al menos uno del receptor-2 de FGF y receptor-3 de FGF, como se ilustra por un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 2. Como se describe en el presente documento, determinadas variantes del polipéptido de FGF-18 ilustrativo se identifican mediante al menos una de identidad de secuencia e hibridación de molécula de ácido nucleico con referencia al polipéptido de FGF-18 ilustrativo. Un ejemplo adicional de un polipéptido de FGF-18 es un anticuerpo anti-idiotipo de FGF-18.

Dentro del contexto de la presente invención, un “fragmento funcional de FGF-18” se refiere a una parte de un polipéptido de FGF-18 que se une a al menos uno del receptor-2 de FGF y el receptor-3 de FGF.

Como se usa en el presente documento, el término “componente de FGF-18” incluye tanto un polipéptido de FGF-18 como un fragmento funcional de FGF-18.

Como se usa en el presente documento, una “citotoxina” es una molécula o átomo que es capaz de causar la muerte de una célula o es capaz de inhibir el crecimiento de una célula. Los ejemplos de citotoxinas incluyen fármacos, proteínas inactivadoras de ribosomas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos o colorantes, isótopos radiactivos y similares.

Como se usa en el presente documento, el término “inmunomodulador” incluye citoquinas, factores de crecimiento de células madre, linfotoxinas, moléculas co-estimuladoras, factores hematopoyéticos y análogos sintéticos de estas moléculas. Los ejemplos de inmunomoduladores incluyen factor de necrosis tumoral, interleuquinas (por ejemplo, interleuquina-1 (EL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, e IL-18), factores estimulantes de colonias (por ejemplo, factor estimulante de colonias de granulocitos y factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos), interferones (por ejemplo, interferones-α, -β, -γ, -ω, -ε, -τ), el factor de crecimiento de células madre denominado “factor S1”, eritropoyetina y trombopoyetina.

Una “composición de dirección de FGF-18” comprende un componente de FGF-18 y una citotoxina y se une a al menos uno del recetor-2 de FGF y el receptor-3 de FGF. La asociación entre el componente de FGF-18 y la citotoxina puede ser covalente o no covalente. Por ejemplo, la asociación de componente de FGF-18-citotoxina en conjugados de FGF-18 y proteínas de fusión de dirección de FGF-18 es covalente, mientras que los liposomas de dirección de FGF-18 ilustran una asociación no covalente.

Un “conjugado de FGF-18” es un tipo de composición de dirección de FGF-18, que se produce enlazando covalentemente un componente de FGF-18 y una citotoxina directamente o a través de un agente de enlace.

Como se usa en el presente documento, el término “proteína de fusión de dirección de FGF-18” se refiere a una molécula recombinante que comprende un componente de polipéptido de FGF-18 y una citotoxina.

Debido a la imprecisión de procedimientos analíticos convencionales, los pesos moleculares y longitudes de polímeros se comprende que son valores aproximados. Cuando un valor de este tipo se expresa como “alrededor de” X o “aproximadamente” X, el valor indicado de X se comprenderá que es preciso hasta ±10%.

3. Preparación de Componentes de FGF-18

A. Producción de Polipéptidos de FGF

Las moléculas de ácido nucleico que codifican un gen de *FGF-18* humano se pueden obtener seleccionando un ADNc o biblioteca genómica humano usando sondas polinucleotídicas basadas en SEC ID Nº: 1 o secuencias divulgadas en referencias descritas anteriormente. Estas técnicas son convencionales y están bien establecidas. Véase, por ejemplo, White (ed.), Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications (Humana Press, Inc. 1993), Ausubel y col. (eds.), Short Protocols in Molecular Biology, 3ª edición (John Wiley & Sons 1995) ["Ausubel (1995)"] y Wu y col., Methods in Gene Biotechnology (CRC Press, Inc. 1997) ["Wu (1997)"].

Como una alternativa, un gen de *FGF-18* se puede obtener sintetizando moléculas de ácido nucleico usando oligonucleótidos largos cebados mutuamente y las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento (véase, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 8-8 a 8-9). Las técnicas establecidas que usan la reacción en cadena de la polimerasa proporcionan la capacidad de sintetizar moléculas de ADN de al menos dos kilobases de longitud (Adang y col., Plant Molec. Biol. 21: 1131 (1993), Bambot y col., PCR Methods and Applications 2: 266 (1993), Dillon y col., "Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes," en Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications, White (ed.), páginas 263-268, (Humana Press, Inc. 1993) y Holowachuk y col., PCR Methods Appl. 4: 299 (1995)).

Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento también se pueden sintetizar con “máquinas génicas” usando protocolos tales como el procedimiento de fosforamidita. Si se necesita ADN de doble cadena sintetizado químicamente para una aplicación tal como la síntesis de un gen o un fragmento génico, entonces cada cadena complementaria se prepara por separado. La producción de genes cortos (60 a 80 pares de bases) es técnicamente sencilla y se puede conseguir sintetizando las cadenas complementarias y después hibridándolas. Para la producción de genes más largos (>300 pares de base), sin embargo, se pueden necesitar estrategias especiales, debido a que la eficacia de acoplamiento de cada ciclo durante la síntesis de ADN química es rara vez el 100%. Para superar este problema, los genes sintéticos (de doble cadena) se ensamblan en forma modular a partir de fragmentos de cadena única que tienen de 20 a 100 nucleótidos de longitud. Para revisiones en síntesis de polinucleótidos, véase, por ejemplo, Glick y Pasternak, Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA (ASM Press 1994), Itakura y col., Annu. Rev. Biochem. 53: 323 (1984) y Climie y col., Proc. Nat'l Acad Sci. Estados Unidos 87: 633 (1990).

Los expertos en la materia reconocerán que la secuencia divulgada en SEC ID Nº: 1 representa un alelo único de *FGF-18* humano y que se espera que ocurran la variación alélica y el corte y empalme alternativo. Las variantes

alélicas de esta secuencia se pueden clonar sondeando ADNc o bibliotecas genómicas a partir de individuos diferentes de acuerdo con procedimientos convencionales. Las variantes alélicas de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID Nº: 1, incluyendo aquellas que contienen mutaciones silentes y aquellas en las cuales las mutaciones dan como resultado cambios de secuencia de aminoácidos, se describen en el presente documento, al igual que proteínas que son variantes alélicas de *FGF-18*. Las moléculas de ADNc generadas a partir de ARNm de corte y empalme alternativo, que conservan las propiedades del polipéptido de FGF-18 se describen en el presente documento, al igual que los polipéptidos codificados por tales ADNc y ARNm. Las variantes alélicas y variantes de corte y empalme de estas secuencias se pueden clonar sondeando ADNc o bibliotecas genómicas a partir de individuos o tejidos diferentes de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica.

Los polipéptidos de FGF-18, incluyendo polipéptidos de longitud completa, fragmentos funcionales y proteínas de fusión, se pueden producir en células huésped recombinantes siguiendo técnicas convencionales. Para expresar un gen de *FGF-18*, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido se tiene que unir operativamente a secuencias reguladoras que controlan la expresión transcripcional en un vector de expresión y después, introducirlo en una célula huésped. Además, de las secuencias reguladoras transcripcionales, tales como promotores y potenciadores, los vectores de expresión pueden incluir secuencias reguladoras traduccionales y un gen marcador que es adecuado para selección de células que portan el vector de expresión.

Los vectores de expresión que son adecuados para producción de una proteína extraña en células eucariotas típicamente contienen (1) elementos de ADN procariota que codifica un origen de replicación bacteriano y un marcador de resistencia a antibiótico para proporcionar el crecimiento y selección del vector de expresión en un huésped bacteriano; (2) elementos de ADN eucariota que controlan el inicio de la transcripción, tales como un promotor y (3) elementos de ADN que controlan el procesamiento de transcritos, tal como una secuencia de terminación de la transcripción/poliadenilación. Como se ha descrito anteriormente, los vectores de expresión también pueden incluir secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia secretora que dirige al polipéptido heterólogo a la ruta secretora de una célula huésped. Por ejemplo, un vector de expresión de *FGF-18* puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido y una secuencia secretora obtenida a partir de cualquier gen secretado, incluyendo FGF-18.

Las proteínas de FGF-18 se pueden expresar en células procariotas o eucariotas. Las células procariotas ilustrativas incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilus*. Las células eucariotas ilustrativas incluyen células de mamífero, células fúngicas, células de aves, células de levadura, células de insecto y células de planta. Los procedimientos para expresar proteínas en células huésped recombinantes se conocen bien por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Murray (ed.), Gene Transfer and Expression Protocols (Humana Press 1991), Ausubel (1995), Williams y col., "Expression of foreign proteins in E. coli using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies," en DNA Cloning 2: Expression Systems, 2ª edición, Glover y col. (eds.), página 15 (Oxford University Press 1995), Ward y col., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," en Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, página 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995), Georgiou, "Expression of Proteins in Bacteria," en Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland y col. (eds.), página 101 (John Wiley & Sons, Inc. 1996) y Fernandez y Hoeffler (eds.), Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression (Academic Press, Inc. 1999)).

Los procedimientos generales para expresar y recuperar proteína extraña producida por un sistema de células de mamífero se proporcionan, por ejemplo, por Etcheverry, "expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture," en Protein Engineering: Principles and Practice. Cleland y col. (eds.), páginas 163 (Wiley-Liss. Inc. 1996). Las técnicas convencionales para recuperar proteínas producidas por un sistema bacteriano se proporcionan por, por ejemplo, Grisshammer y col., "Purification of overproduced proteins from E. coli cells," en DNA Cloning 2: Expression Systems, 2ª Edición, Glover y col. (eds.), páginas 59-92 (Oxford University Press 1995). Los procedimientos establecidos para aislar proteínas recombinantes a partir de sistema de baculovirus se describen por Richardson (ed), Baculovirus Expression. Protocols (The Humana Press, Inc. 1995).

Como una alternativa, los polipéptidos de FGF-18 se pueden sintetizar mediante síntesis en fase sólida exclusiva, procedimientos en fase sólida parciales, condensación de fragmento o síntesis de solución clásica. Estos procedimientos de síntesis se conocen bien por los expertos en la materia. Por ejemplo, la síntesis de péptidos en fase sólida convencional se describe por Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 (1963) y Lloyd-Williams y col., Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins (CRC Press 1997). Las variaciones en las estrategias de síntesis química totales, tales como “ligamiento químico nativo” y “ligamiento de proteína expresada” también son convencionales (véase, por ejemplo, Dawson y col., Science 266: 776 (1994), Hackeng y col., Proc. Nat’l Acad Sci. Estados Unidos 94: 7845 (1997), Dawson, Methods Enzymol. 287: 34 (1997), Muir y col, Proc. Nat’l Acad. Sci. Estados Unidos 95: 6705 (1998) y Severinov y Muir, J. Biol. Chem. 273: 16205 (1998)).

Los polipéptidos se pueden purificar hasta al menos aproximadamente el 80% de pureza, hasta al menos aproximadamente el 90% de pureza, hasta al menos aproximadamente el 95% de pureza o más del 95% de pureza con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos y libres de agentes infecciosos y pirógenos. Los polipéptidos también se pueden purificar hasta un estado farmacéuticamente puro, que es más del 99,9% puro. Determinadas preparaciones de polipéptidos purificadas están sustancialmente libres de otros polipéptidos, particularmente otros polipéptidos de origen animal.

Los procedimientos de fraccionamiento y/o de purificación convencionales se pueden usar para obtener preparaciones de FGF-18 purificadas a partir de fuentes naturales (por ejemplo, tejido cardíaco), polipéptidos de FGF-18 sintéticos y polipéptidos FGF-18 recombinantes y polipéptidos de FGF-18 de fusión purificados a partir de las células huésped recombinantes. En general, la precipitación de sulfato de amonio y la extracción con ácido o caótropo se pueden usar para fraccionamiento de muestras. Las etapas de purificación ilustrativas pueden incluir cromatografía de hidroxiapatita, de exclusión por tamaño, FPLC y cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa. Los medios cromatográficos adecuados incluyen dextranos derivatizados, agarosa, celulosa, poliacrilamida, sílices de especialidad y similares. Se prefieren derivados de PEI, DEAE, QAE y Q. Los medios cromatográficos ilustrativos incluyen aquellos medios derivatizados con grupos fenilo, butilo u octilo, tales como Fenil-Sefarosa FF (Pharmacia), Toyopearl butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octil-Sefarosa (Pharmacia) y similares; o resinas poliacrílicas, tales como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Los soportes sólidos adecuados incluyen perlas de vidrio, resinas en basadas en sílice, resinas celulósicas, perlas de agarosa, perlas de agarosa reticulada, perlas de poliestireno, resinas de poliacrilamida reticuladas y similares que son insolubles en las condiciones en las cuales se tienen que usar. Estos soportes se pueden verificar con grupos reactivos que permiten la unión de proteínas mediante grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o restos de carbohidrato.

Las variaciones adicionales en el aislamiento y purificación de proteínas se pueden diseñar por los expertos en la materia. Por ejemplo, los anticuerpos anti-FGF-18, obtenidos como se ha descrito más adelante, se pueden usar para aislar grandes cantidades de proteína mediante purificación de inmunoafinidad.

B. Polipéptidos de FGF-18 Variante

(1) Mutaciones del Polipéptido de FGF-18 ilustrativo

Los expertos en la materia reconocerán fácilmente que, en vista de la degeneración del código genético, es posible una variación de secuencia considerable entre estas moléculas polinucleotídicas. Como una ilustración, SEC ID Nº: 5 es una secuencia de nucleótidos degenerada que abarca todas las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido de FGF-18 humano de SEC ID Nº: 2. Los expertos en la materia reconocerán que las secuencias degeneradas de SEC ID Nº: 5 también proporcionan todas las secuencias de ARN que codifican SEC ID Nº: 2, sustituyendo U por T. Por tanto, la presente memoria descriptiva describe la producción de moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de FGF-18 que comprenden del nucleótido 82 al nucleótido 621 de SEC ID Nº: 1 ó 3 y sus equivalentes de ARN.

La Tabla 1 expone los códigos de una letra usados dentro de la SEC ID Nº: 5 para indicar posiciones de nucleótidos degenerados. Las “resoluciones” son los nucleótidos indicados por una letra de código. “Complemento” indica el código del nucleótido o nucleótidos complementarios. Por ejemplo el código Y indica C o T y su complemento R indica A o G, A siendo complementaria de T y G siendo complementaria de C.

Tabla 1

Nucleótido	Resolución	Complemento	Resolución
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A|G	Y	C|T
Y	C|T	R	A|G
M	A|C	K	G|T
K	G|T	M	A|C
S	C|G	S	C|G
W	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 usados en la SEC ID Nº: 5, que abarcan todos los codones posibles de un aminoácido determinado, se exponen en la Tabla 2.

Tabla 2

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

Un experto en la materia apreciará que se introduce alguna ambigüedad en la determinación de un codón degenerado, representativo de todos los codones posibles que codifican un aminoácido. Por ejemplo, el codón degenerado de serina (WSN) puede, en algunas circunstancias, codificar arginina (AGR) y el codón degenerado de arginina (MGN) puede, en algunas circunstancias, codificar serina (AGY). Existe una relación similar entre codones que codifican fenilalanina y leucina. Por tanto, algunos polinucleótidos incluidos en la secuencia degenerada pueden codificar secuencias de aminoácidos variantes, pero un experto en la materia puede identificar fácilmente tales secuencias variantes mediante referencia a la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 2 o SEC ID Nº: 4.

Diferentes especies pueden mostrar “uso de codón preferencial”. En general, véase, Grantham y col., Nucl. Acids Res. 8: 1893 (1980), Haas y col. Curr. Biol. 6: 315 (1996), Wain-Hobson y col., Gene 13: 355 (1981), Grosjean y Fiers, Gene 18: 199 (1982), Holm, Nuc. Acids Res. 14: 3075 (1986), Ikemura, J. Mol. Biol. 158: 573 (1982), Sharp y Matassi, Curr. Opin. Genet. Dev. 4: 851 (1994), Kane, Curr. Opin. Biotechnol. 6: 494 (1995) y Makrides, Microbiol. Rev. 60: 512 (1996). Como se usa en el presente documento, el término “uso de codón preferencial” o “codones preferenciales” es un término de la técnica que se refiere a codones de traducción de proteína que se usan con mayor frecuencia en células de una especie determinada, favoreciendo de ese modo a uno o a unos pocos representantes de los codones posibles que codifican cada aminoácido (véase Tabla 2). Por ejemplo, el aminoácido treonina (Thr) se puede codificar por ACA, ACC, ACG, o ACT, pero en células de mamífero ACC es el codón más

comúnmente usado; en otras especies, por ejemplo, células de insecto, levadura, virus o bacterias, diferentes codones de Thr pueden ser preferenciales. Los codones preferenciales de una especie particular se pueden introducir en los polinucleótidos de la presente invención mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica. La introducción de secuencias de codón preferencial en ADN recombinante puede, por ejemplo, potenciar la producción de la proteína haciendo que la traducción de la proteína sea más eficaz dentro de un tipo de célula o especie particular. Por lo tanto, las secuencias de codón degeneradas divulgadas en el presente documento sirven como un molde para optimizar la expresión de polinucleótidos en diversos tipos celulares y especies usadas comúnmente en la técnica y divulgadas en el presente documento. Las secuencias que contienen codones preferenciales se pueden ensayar y optimizar para expresión en diversas especies y ensayarse para funcionalidad como se divulga en el presente documento.

La presente memoria descriptiva describe polipéptidos y moléculas de ácido nucleico variante que representan homólogos de otras especies (ortólogos). Estas especies incluyen, pero sin limitación mamíferos, aves, anfibios, reptiles, peces, insectos y otras especies de vertebrados o invertebrados. De interés particular son los polipéptidos de FGF-18 de otras especies de mamífero, incluyendo polipéptidos de porcinos, ovinos, bovinos, caninos, felinos, equinos y otros primates. Los ortólogos de FGF-18 humano se pueden clonar usando informaciones y composiciones proporcionadas por la presente invención en combinación con técnicas de clonación convencionales. Esto se ilustra mediante la clonación del FGF-18 murino. Fuentes adecuadas de ARNm se pueden identificar sondeando transferencias de northern con sondas diseñadas a partir de las secuencias divulgadas en el presente documento. Después se prepara una biblioteca a partir del ARNm de un tejido o línea celular positivo.

Los expertos en la materia reconocerán que la secuencia divulgada en SEC ID Nº: 1 representa un alelo único de *FGF-18* humano y que se espera que ocurran la variación alélica y el corte y empalme alternativo. Las variantes alélicas de esta secuencia se pueden clonar sondeando ADNc o bibliotecas genómicas a partir de diferentes individuos de acuerdo con procedimientos convencionales. Las variantes alélicas de las secuencias de nucleótidos divulgadas en el presente documento, que incluyen aquellas que contienen mutaciones silentes y aquellas en las cuales la mutación da como resultado cambios de secuencia de aminoácidos, se describen en el presente documento, así como también proteínas que son variantes alélicas de las secuencias de aminoácidos divulgadas en el presente documento. Las moléculas de ADNc generadas a partir de ARNm de corte y empalme alternativo, que conservan las propiedades del polipéptido de FGF-18 se describen en el presente documento, al igual que polipéptidos codificados por tales ADNc y ARNm. Las variantes alélicas y variantes de corte y empalme de estas secuencias se pueden clonar sondeando ADNc o bibliotecas genómicas a partir de diferentes individuos o tejidos de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica.

Las moléculas de ácido nucleico aislado se pueden hibridar en condiciones rigurosas a moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos divulgadas en el presente documento. Por ejemplo, tales moléculas de ácido nucleico se pueden hibridar en condiciones rigurosas a moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia de nucleótidos de SEC ID Nº: 1, a moléculas de ácido nucleico que consisten en la secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 82 a 621 de SEC ID Nº: 1 o a moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos complementaria a SEC ID Nº: 1 o a los nucleótidos 82 a 621 de SEC ID Nº: 1. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser aproximadamente 5ºC más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (a fuerza iónica y pH definidos) a la cual el 50% de la secuencia diana se hibrida a una sonda perfectamente coincidente.

Un par de moléculas de ácido nucleico, tales como ADN-ADN, ARN-ARN y ADN-ARN, se pueden hibridar si las secuencias de nucleótidos tienen algún grado de complementariedad. Los híbridos pueden tolerar pares de bases desapareadas en la doble hélice, pero la estabilidad del híbrido está influenciada por el grado de desapareamiento. La T_m del híbrido desapareado disminuye en 1ºC para cada 1-1,5% de desapareamiento de par de base. Variar la rigurosidad de las condiciones de hibridación permite controlar el grado de desapareamiento que estará presente en el híbrido. El grado de rigurosidad aumenta a medida que la temperatura de hibridación aumenta y la fuerza iónica del tampón de hibridación disminuye. Las condiciones de hibridación rigurosas abarcan temperaturas de aproximadamente 5-25ºC por debajo de la T_m del híbrido y un tampón de hibridación que tiene Na^+ hasta 1 M. Grados más elevados de rigurosidad a temperaturas más bajas se pueden conseguir con la adición de formamida que reduce la T_m del híbrido aproximadamente 1ºC para cada 1% de formamida en la solución tampón. En general, tales condiciones rigurosas incluyen temperaturas de 20-70ºC y un tampón de hibridación que contiene SSC hasta 6x y del 0-50% de formamida. Un grado más elevado de rigurosidad puede conseguirse a temperaturas de 40-70ºC con un tampón de hibridación que tiene SSC hasta 4x y desde el 0-50% de formamida. Las condiciones altamente rigurosas típicamente incluyen temperaturas de 42-72ºC con un tampón de hibridación que tiene SCC hasta 1x y del 0-50% de formamida. Los grados diferentes de rigurosidad se pueden usar durante la hibridación y el lavado para conseguir una unión específica máxima a la secuencia diana. Típicamente, los lavados a continuación de la hibridación se llevan a cabo a grados crecientes de rigurosidad para eliminar las sondas polinucleotídicas no hibridadas de los complejos hibridados.

Las condiciones anteriores tienen por objeto servir como una guía y está dentro de las capacidades de un experto en la materia adaptar estas condiciones para su uso con un híbrido de polipéptido particular. La T_m de una secuencia diana específica es la temperatura (en condiciones definidas) a la que el 50% de la secuencia diana se hibridará a una secuencia de sonda perfectamente apareada. Aquellas condiciones que influyen sobre la T_m incluyen, el tamaño

y el contenido del pares de bases de la sonda polinucleotídica, la fuerza iónica de la solución de hibridación y la presencia de agentes desestabilizantes en la solución de hibridación. Se conocen numerosas ecuaciones para calcular la T_m en la técnica y son específicas para híbridos de ADN, ARN y ADN-ARN y secuencias de sondas polinucleotídicas de longitud variable (véase, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Cold Spring Harbor Press 1989); Ausubel y col., (eds.), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Inc. 1987); Berger y Kimmel (eds.), Guide to Molecular Cloning Techniques, (Academic Press, Inc. 1987); y Wetmur, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26: 227 (1990)). En el software de análisis de secuencias tal como OLIGO 6.0 (LSR; Long Lake, MN) y Primer Premier 4.0 (Premier Biosoft International; Palo Alto, CA), así como en sitios en Internet, están disponibles herramientas para analizar una secuencia dada y calcular la T_m en base a criterios definidos por el usuario. Tales programas también pueden analizar una secuencia dada en condiciones definidas e identificar secuencias de sondas adecuadas. Típicamente, la hibridación de secuencias polinucleotídicas más largas, >50 pares de bases, se realiza a temperaturas de aproximadamente 20-25ºC por debajo de la T_m calculada. Para sondas más pequeñas <50 pares de bases, la hibridación se lleva a cabo típicamente a la T_m o 5-10ºC por debajo. Esto permite el máximo índice de hibridación para híbridos de ADN-ADN y ADN-ARN.

La longitud de la secuencia polinucleotídica influye sobre la velocidad y la estabilidad de la formación de híbrido. Secuencias de sondas más pequeñas, menos de 50 pares de bases, alcanzan el equilibrio con secuencias complementarias rápidamente, pero pueden formar híbridos menos estables. Los tiempos de incubación de cualquiera desde minutos hasta horas se pueden usar para conseguir formación de híbridos. Las secuencias de sondas más largas alcanzan el equilibrio más lentamente, pero forman complejos más estables incluso a temperaturas más bajas. Se permite que las incubaciones procedan durante una noche o más. En general, las incubaciones se llevan a cabo durante un periodo igual a tres veces el tiempo Cot calculado. Tiempo Cot, el tiempo que toma a las secuencias polinucleotídicas reasociarse, se puede calcular para una secuencia particular mediante procedimientos conocidos en la técnica.

La composición de pares de bases de la secuencia polinucleotídica influirá sobre la estabilidad térmica del complejo híbrido, influyendo de ese modo sobre la elección de la temperatura de hibridación y la fuerza iónica del tampón de hibridación. Los pares A-T son menos estables que los pares G-C en soluciones acuosas que contienen cloruro de sodio. Por lo tanto, a mayor contenido de G-C, más estable será el híbrido. La distribución uniforme de los restos G y C dentro de la secuencia también contribuye positivamente a la estabilidad del híbrido. Adicionalmente, la composición de pares de bases se puede manipular para alterar la T_m de una secuencia determinada. Por ejemplo, 5-metildesoxicitidina se puede sustituir por desoxicitidina y 5-bromodesoxiuridina se puede sustituir por timidina para aumentar la T_m, mientras que 7-deazz-2'-desoxiguanosina se puede sustituir por guanosina para reducir la dependencia de la T_m.

La concentración iónica del tampón de hibridación también afecta la estabilidad del híbrido. Los tampones de hibridación generalmente contienen agentes bloqueantes tales como solución de Denhardt (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), ADN de esperma de salmón desnaturalizado, ARNt, polvos de la leche (BLOTTO), heparina o SDS y una fuente de Na^+, tal como SSC (1x SSC: cloruro de sodio 0,15 M, citrato de sodio 15 mM) o SSPE (1x SSPE: NaCl 1,8 M, Na_2PO_4 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,7). Típicamente los tampones de hibridación contienen Na^+ entre 10 mM - 1 M. La adición de agentes desestabilizantes o desnaturalizantes tales como formamida, sales de tetraalquilamonio, cationes de guanidinio o cationes de tiocianato a la solución de hibridación alterará la T_m de un híbrido. Típicamente, se usa formamida a una concentración de hasta el 50% para permitir que las incubaciones se lleven a cabo a temperaturas más convenientes y más bajas. La formamida también actúa para reducir el fondo inespecífico cuando se usan sondas de ARN.

Como una ilustración, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de FGF-18 variante se puede hibridar con una molécula de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEC ID Nº: 1 (o su complemento) a 42ºC durante una noche en una solución que comprende el 50% de formamida, SSC 5x, fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5x (solución de Denhardt 100x: Ficoll 400 al 2% (p/v), polivinilpirrolidona al 2% (p/v) y albúmina sérica bovina al 2% (p/v)), sulfato de dextrano al 10% y 20 μg/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado. Un experto en la materia puede diseñar variaciones de estas condiciones de hibridación. Por ejemplo, la mezcla de hibridación se puede incubar a temperatura más elevada, tal como aproximadamente 65ºC, en una solución que no contiene formamida. Además, las soluciones de hibridación premezcladas están disponibles (por ejemplo, Solución de Hibridación EXPRESSHYB de CLONTECH Laboratories, Inc.) y la hibridación se puede realizar de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

A continuación de la hibridación las moléculas de ácido nucleico se pueden lavar para eliminar las moléculas de ácido nucleico no hibridadas en condiciones rigurosas o en condiciones altamente rigurosas. Las condiciones de lavado rigurosas típicas incluyen lavar en una solución de SSC 0,5x - 2x con dodecil sulfato sódico al 0,1% (SDS) a 55 - 65ºC. Por ejemplo, determinadas moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de FGF-18 variante permanecen hibridadas con una molécula de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEC ID Nº: 1 (o su complemento) a continuación de condiciones de lavado rigurosas, en las cuales la rigurosidad de lavado es equivalente a SSC 0,5x - 2x con el 0,1% de SDS a 55 - 65ºC, incluyendo SSC 0, 5x con el 0,1% de SDS a 55ºC o SSC 2x con el 0,1% de SDS a 65ºC. Un experto en la materia puede diseñar fácilmente condiciones equivalentes, por ejemplo, sustituyendo SSPE por SSC en la solución de lavado.

Las condiciones de lavado altamente rigurosas típicas incluyen lavado en una solución de SSC 0,1x - 0,2x con el 0,1% de dodecil sulfato sódico (SDS) a 50 - 65ºC. Como una ilustración, las moléculas de ácido nucleico particulares que codifica un polipéptido de FGF-18 variante permanecen hibridadas con una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de nucleótidos de SEC ID Nº: 1 (o su complemento) a continuación de condiciones de lavado altamente rigurosas, en las cuales la rigurosidad de lavado es equivalente a SSC 0,1x - 0,2x con el 0,1% de SDS a 50 - 65ºC, incluyendo SSC 0,1x con el 0,1% de SDS a 50ºC o SSC 0,2x con el 0,1% de SDS a 65ºC.

La presente memoria descriptiva describe polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos de FGF-18 que tienen una identidad de secuencia sustancialmente similar con los polipéptidos de SEC ID Nº: 2 o sus ortólogos. La expresión “identidad de secuencia sustancialmente similar” se usa en el presente documento para indicar polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% o más del 95% con las secuencias mostradas en SEC ID Nº: 2 o sus ortólogos.

La presente memoria descriptiva describe moléculas de ácido nucleico variante de *FGF-18* que se pueden identificar usando dos criterios: una determinación de la similitud entre el polipéptido codificado con la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 2 y un ensayo de hibridación, como se ha descrito anteriormente. Tales variantes de *FGF-18* incluyen moléculas de ácido nucleico (1) que permanecen hibridadas con una molécula de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEC ID Nº: 1 (o su complemento) a continuación de condiciones de lavado rigurosas, en las cuales la rigurosidad de lavado es equivalente a SSC 0,5 - 2x con el 0,1% de SDS a 55 - 65ºC y (2) que codifican un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% o más del 95% con la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 2. Como alternativa, las variantes de *FGF-18* se pueden caracterizar como moléculas de ácido nucleico (1) que permanecen hibridadas con una molécula de ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos de SEC ID Nº: 1 (o su complemento) a continuación de condiciones de lavado altamente rigurosas, en las cuales la rigurosidad de lavado es equivalente SSC 0,1x - 0,2x con el 0,1% de SDS a 50 - 65ºC y (2) que codifican un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% o más del 95% con la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 2.

El porcentaje de identidad de secuencia se determina mediante procedimientos convencionales. Véanse, por ejemplo, Altschul y col., Bull. Math. Bio. 48: 603 (1986) y Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 89: 10915 (1992). En resumen, dos secuencias de aminoácidos se alinean para optimizar las puntuaciones de alineamiento usando una penalidad de abertura de hueco de 10, una penalidad de extensión de hueco de 1 y la matriz de puntuación "BLOSUM62" de Henikoff y Henikoff (*ibid.*) como se muestra en la Tabla 3 (los aminoácidos se indican mediante los códigos de una letra convencionales). Después el porcentaje de identidad se calcula como: ([Número total de coincidencias idénticas]/[longitud de la secuencia más larga más el número de huecos introducidos en la secuencia más larga con el fin de alinear las dos secuencias]).

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

Los expertos en la materia aprecian que existen muchos algoritmos establecidos disponibles para alinear dos secuencias de aminoácidos. El algoritmo de búsqueda de similitud “FASTA” de Pearson y Lipman es un procedimiento de alineamiento de proteína adecuado para examinar el nivel de identidad compartido por una secuencia de aminoácidos divulgada en el presente documento y la secuencia de aminoácidos de una variante de FGF-18 putativa. El algoritmo FASTA se describe por Pearson y Lipman Proc. Nat’l Acad. Sci. Estados Unidos 85: 2444 (1988) y por Pearson. Meth. Enzymol. 183: 63 (1990). En resumen, FASTA en primer lugar caracteriza la similitud de secuencia identificando regiones compartidas por la secuencia de consulta (por ejemplo, SEC ID Nº: 2) y una secuencia de ensayo que tiene la densidad de identidades más elevadas (si la variable ktup es 1) o pares de identidades (si ktup=2), sin considerar las sustituciones, inserciones o supresiones de aminoácidos conservativas. Las diez regiones con la densidad más elevada de identidades después se puntúan nuevamente comparando la similitud de todos los aminoácidos apareados usando una matriz de sustitución de aminoácidos y los extremos de las regiones se “recortan” para incluir únicamente aquellos restos que contribuyen a la puntuación más alta. Si existen varias regiones con puntuaciones mayores que el valor de “punto de corte” (calculado mediante una fórmula predeterminada en base a la longitud de la secuencia y el valor de ktup), entonces las regiones iniciales recortadas se examinan para determinar si las regiones se pueden unir para formar un alineamiento aproximado con huecos. Finalmente, las regiones de puntuación más elevada de las dos secuencias de aminoácidos se alinean usando una modificación del algoritmo de Needleman-Wunsch-Sellers (Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 444 (1970); Sellers. SIAM J. Appl. Math. 26: 787 (1974)), que permite inserciones y supresiones de aminoácidos. Los parámetros ilustrativos del análisis FASTA son: ktup=1, penalidad de abertura de hueco=10, penalidad de extensión de hueco=1 y matriz de sustitución=BLOSUM62. Estos parámetros se pueden introducir en un programa FASTA modificando el archivo de matriz de puntuación ("SMATRIX"), como se explica en el Apéndice 2 de Pearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990).

FASTA también se puede usar para determinar la identidad de secuencia de moléculas de ácido nucleico usando una proporción como se ha divulgado anteriormente. Para comparaciones de secuencia de nucleótidos, el valor de ktup puede variar entre uno y seis, preferentemente tres y seis, más preferentemente tres, con otros parámetros ajustados como se ha descrito anteriormente.

La presente memoria descriptiva describe moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que tiene un cambio de aminoácido conservativo, en comparación con una secuencia de aminoácidos divulgada en el presente documento. Por ejemplo, se pueden obtener variantes que contienen una o más sustituciones de aminoácido de SEC ID Nº: 2, en las cuales un aminoácido de alquilo se sustituye por un aminoácido de alquilo en una secuencia de aminoácidos de FGF-18, un aminoácido aromático se sustituye por un aminoácido aromático en una secuencia de aminoácidos de FGF-18, un aminoácido que contiene azufre se sustituye por un aminoácido que contiene azufre en una secuencia de aminoácidos de FGF-18, un aminoácido que contiene hidroxi se sustituye por un aminoácido que contiene hidroxi en una secuencia de aminoácidos de FGF-18, un aminoácido ácido se sustituye por un aminoácido ácido en una secuencia de aminoácidos de FGF-18, un aminoácido básico se sustituye por un aminoácido básico en una secuencia de aminoácidos de FGF-18 o un aminoácido dibásico monocarboxílico se sustituye por un aminoácido dibásico monocarboxílico en una secuencia de aminoácidos de FGF-18. Entre los aminoácidos comunes, por ejemplo, una “sustitución de aminoácidos conservativa” se ilustra mediante una sustitución entre aminoácidos dentro de cada uno de los siguientes grupos: (1) glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina, (2) fenilalanina, tirosina y triptófano, (3) serina y treonina, (4) aspartato y glutamato, (5) glutamina y asparagina y (6) lisina, arginina e histidina. Como una ilustración, una sustitución de aminoácidos conservativa de restos de aminoácidos dibásicos se puede introducir en los restos de aminoácidos 196 y 197 de SEC ID Nº: 2 o SEC ID Nº: 4.

La tabla BLOSUM62 es una matriz de sustitución de aminoácidos obtenida a partir de aproximadamente 2.000 alineamientos múltiples locales de segmentos de secuencia de proteína, que representan regiones altamente conservadas de más de 500 grupos de proteínas relacionadas (Henikoff and Henikoff, Proc. Nat’l Acad. Sci. USA 89:10915 (1992)). Por consiguiente, las frecuencias de sustitución de BLOSUM62 se pueden usar para definir sustituciones de aminoácidos conservativas que se pueden introducir en secuencias de aminoácidos. Aunque es posible diseñar sustituciones de aminoácidos en base únicamente a propiedades químicas (como se ha descrito anteriormente), la expresión “sustitución de aminoácido conservativa” preferentemente se refiere a una sustitución representada por un valor BLOSUM62 de más de -1. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos es conservativa si la sustitución se caracteriza por un valor BLOSUM62 de 0, 1, 2 ó 3. De acuerdo con este sistema, las sustituciones de aminoácidos conservativas se caracterizan por un valor BLOSUM62 de al menos 1 (por ejemplo, 1, 2 ó 3), mientras que las sustituciones de aminoácidos conservativas más preferidas se caracterizan por un valor BLOSUM62 de al menos 2 (por ejemplo, 2 ó 3).

Las variantes particulares de FGF-18 se caracterizan por tener una identidad de secuencia de al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% o más del 95% con la secuencia de aminoácidos correspondiente (por ejemplo, SEC ID Nº: 2), en la que la variación en la secuencia de aminoácidos se debe a una o más sustituciones de aminoácidos conservativas.

Los cambios de aminoácidos conservativos en un gen de FGF-19 se pueden introducir, por ejemplo, sustituyendo nucleótidos por los nucleótidos enumerados en SEC ID Nº: 1. Tales variantes de “aminoácidos conservativas” se pueden obtener mediante mutagénesis dirigida a oligonucleótido, mutagénesis mediante engarce, mutagénesis usando la reacción en cadena de la polimerasa y similares (véase Ausubel (1995) en las páginas 8-10 a 8-22; y

McPherson (ed.), Directed Mutagenesis: A Practical Approach (IRL Press 1991)). Un polipéptido de FGF-18 variante se puede identificar mediante la capacidad de unirse específicamente a anticuerpos anti-FGF-18.

Las proteínas pueden comprender restos de aminoácidos de origen no natural. Los aminoácidos de origen no natural incluyen, sin limitación, *trans*-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, *cis*-4-hidroxiprolina, *trans*-4-hidroxiprolina, N-metilglicina, *alo*-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido pipecólico, ácido carboxílico de tiazolidina, dehidroprolina, 3- y 4-metilprolina, 3,3-dimetilprolina, *terc*-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. Se conocen varios procedimientos en la técnica para incorporar restos de aminoácidos de origen no natural en las proteínas. Por ejemplo, se puede emplear un sistema *in vitro* en el que las mutaciones sin sentido se suprimen usando ARNt supresores aminoacetilados químicamente. Los procedimientos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar ARNt se conocen en la técnica. La transcripción y traducción de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido se lleva a cabo típicamente en un sistema sin células que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas disponibles en el mercado y otros reactivos. Las proteínas se purifican mediante cromatografía. Véanse, por ejemplo, Robertson y col., J. Am. Chem. Soc. 113: 2722 (1991), Ellman y col., Methods Enzymol. 202: 301 (1991), Chung y col., Science 259: 806 (1993) y Chung y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. Estados Unidos 90: 10145(1993).

En un segundo procedimiento, la traducción se lleva a cabo en oocitos de *Xenopus* mediante microinyección de ARNm mutado y ARNt supresor aminoacilados químicamente (Turcatti y col., J. Biol. Chem. 271: 19991 (1996)). Dentro de un tercer procedimiento, las células de *E. coli* se cultivan en ausencia de un aminoácido natural que se tiene que reemplazar (por ejemplo, fenilalanina) y en presencia del aminoácido o aminoácidos de origen no natural deseados (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido de origen no natural se incorpora en la proteína en el lugar de su homólogo natural. Véase, Koide y col., Biochem. 33: 7470 (1994). Los restos de aminoácidos de origen natural se pueden convertir en especies de origen no natural mediante modificación química *in vitro*. La modificación química se puede combinar con mutagénesis dirigida para expandir adicionalmente el intervalo de sustituciones (Wynn y Richards, Protein Sci. 2: 395 (1993)).

Un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no están codificados por el código genético, aminoácidos de origen no natural y aminoácidos no naturales se pueden sustituir por restos de aminoácidos de FGF-18. Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones de alanina en el polipéptido (véase, por ejemplo, Hilton y col., J. Biol. Chem. 271: 4699 (1996).

Las variantes de las secuencias de nucleótidos y polipéptidos de FGF-18 divulgadas también se pueden generar a través de barajado de ADN como se divulga en Stemmer, Nature 370: 389 (1994), Stemmer, Proc. Nat'l Acad. Sci. Estados Unidos 91: 10747 (1994), y publicación internacional Nº WO 97/20078. En resumen, moléculas de ADN variante se generan mediante recombinación homóloga *in vitro* mediante fragmentación aleatoria de un ADN parental seguido por re-ensamblaje usando PCR, dando como resultado mutaciones puntuales introducidas aleatoriamente. Esta técnica se puede modificar usando una familia de moléculas de ADN parental, tales como variantes alélicas o moléculas de ADN de diferentes especies, para introducir variabilidad adicional en el procedimiento. La selección o exploración de la actividad deseada, seguida por iteraciones adicionales de mutagénesis y ensayo proporciona la "evolución" rápida de secuencias seleccionando mutaciones deseables a la vez que se seleccionan simultáneamente frente a cambios perjudiciales.

Los procedimientos de mutagénesis como se divulgan en el presente documento se pueden combinar con procedimientos de exploración automatizados de alto rendimiento para detectar la actividad de polipéptidos mutagenizados y clonados en células huésped. Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos biológicamente activos o polipéptidos que se unen con anticuerpos anti-FGF-18, se pueden recuperar a partir de las células huésped y secuenciar rápidamente usando equipo moderno. Estos procedimientos permiten la determinación rápida de la importancia de restos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés y se puede aplicar a polipéptidos de estructura desconocida.

(2) Anticuerpos Anti-idiotipo de FGF-18

Los anticuerpos anti-idiotipo proporcionan otra forma de polipéptido variante de FGF-18. Ya que los dominios variables de anticuerpos anti-idiotipo de FGF-18 mimetizan FGF-18, estos dominios también pueden proporcionar actividad de uno o más receptores de FGF-18. Los expertos en la materia son conscientes de que los anticuerpos recombinantes que comprenden dominios variables anti-idiotipo son útiles como análogos (véase, por ejemplo, Monfardini y col., Proc. Assoc. Am. Physicians 108: 420 (1996)). Estos anticuerpos anti-idiotipo se producen a partir de anticuerpos anti-FGF-18, usando técnicas convencionales.

Los anticuerpos frente a FGF-18 se pueden obtener, por ejemplo, siguiendo procedimientos descritos por Deisher y col., publicación internacional Nº WO98/16644. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos policlonales frente a proteína FGF-18 recombinante o FGF-18 aislado a partir de fuentes naturales usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Green y col., "Production of Polyclonal Antisera," en Immunochemical Protocols (Manson, ed.), páginas 1-5 (Humana Press 1992) y Williams y col., "Expression of foreign proteins in E. coli using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies," en DNA Cloning 2: Expression Systems, 2ª Edición, Glover y col. (eds.), página 15 (Oxford University Press 1995). La inmunogenicidad

de un polipéptido de FGF-18 se puede aumentar a través del uso de un adyuvante, tal como alumbre (hidróxido de aluminio) o adyuvante completo o incompleto de Freund. Los polipéptidos útiles para inmunización también incluyen polipéptidos de fusión, tales como fusiones de FGF-18 o una parte del mismo con un polipéptido de inmunoglobulina o con proteína de unión a maltosa. El inmunógeno polipeptídico puede ser una molécula de longitud completa o una parte del mismo. Si la parte del polipéptido es “similar a hapteno”, tal parte se puede unir o enlazar de forma provechosa a un portador macromolecular (tal como hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica bovina o toxoide tetánico, etc.) para inmunización.

Aunque los anticuerpos policlonales se generan típicamente en animales tales como caballos, vacas, perros, gallinas, ratas, ratones, conejos, cobayas, cabras u ovejas, un anticuerpo anti-FGF-18 también se puede obtener a partir de un anticuerpo de primate subhumano. Las técnicas generales para generar anticuerpos de diagnóstico y terapéuticamente útiles en babuinos se pueden encontrar, por ejemplo, en Goldenberg y col., publicación de patente internacional Nº WO 91/11465 y en Losman y col., Int. J. Cancer 46: 310 (1990).

Como alternativa, se pueden generar anticuerpos anti-FGF-18 monoclonales. Los anticuerpos monoclonales de roedor frente a antígeno específico se pueden obtener mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Kohler y col., Nature 256: 495 (1975), Coligan y col. (eds.), Current Protocols in Immunology, Vol. 1, páginas 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991) ["Coligan"], Picksley y col., "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E. coli," en DNA Cloning 2: Expression Systems, 2ª edición, Glover y col. (eds.), página 93 (Oxford University Press 1995)). En resumen, se pueden obtener anticuerpos monoclonales inyectando una composición que comprende un producto génico de FGF-18 en ratones, verificando la presencia de producción de anticuerpo extrayendo una muestra de suero, retirando el bazo para obtener linfocitos B, fusionando los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonando los hibridomas, seleccionando clones positivos que producen anticuerpos frente al antígeno, cultivando los clones que producen anticuerpos frente al antígeno y aislando los anticuerpos de los cultivos de hibridoma.

Adicionalmente, un anticuerpo anti-FGF-18 se puede obtener a partir de un anticuerpo monoclonal humano. Los anticuerpos monoclonales humanos se obtienen a partir de ratones transgénicos que se han sometido a ingeniería genética para producir anticuerpos humanos específicos como respuesta a exposición antigénica. En esta técnica, los elementos de los locus de cadena pesada y ligera humana se introducen en cepas de ratones obtenidas a partir de líneas de células madre embrionarias que contienen alteraciones dirigidas de los loci de cadena pesada y cadena ligera endógenos. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos y los ratones se pueden usar para producir hibridomas de secreción de anticuerpo humano. Los procedimientos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos se describen, por ejemplo, por Green y col., Nature Genet. 7: 13 (1994), Lonberg y col., Nature 368: 856 (1994) y Taylor y col., Int. Immun. 6: 579 (1994).

Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar y purificar a partir de cultivos de hibridomas mediante una diversidad de técnicas bien establecidas. Tales técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con proteína-A Sefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de intercambio iónico (véanse, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y páginas 2.9.1-2.9.3; Baines y col., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," en Methods in Molecular Biology, Vol. 10, páginas 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992)).

Para usos particulares, puede ser deseable preparar fragmentos de anticuerpos anti-FGF-18. Tales fragmentos de anticuerpo se pueden obtener, por ejemplo, mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo se pueden obtener mediante digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos mediante procedimientos convencionales. Como una ilustración, los fragmentos de anticuerpo se pueden producir mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado $F(ab')_2$. Este fragmento se puede escindir después usando un agente reductor de tiol para producir fragmentos monovalentes 3,4S Fab’. Opcionalmente, la reacción de escisión se puede realizar usando un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo que se producen como resultado de la escisión de enlaces de disulfuro. Como una alternativa, una escisión enzimática que use pepsina produce directamente dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc. Estos procedimientos se describen, por ejemplo, por Goldenberg, Patente de los Estados Unidos Nº 4.331.647, Nisonoff y col., Arch Biochem. Biophys. 89: 230 (1960), Porter, Biochem. J. 73: 119 (1959), Edelman y col., en Methods in Enzymology Vol. 1, página 422 (Academic Press 1967) y por Coligan en las páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10.-2.10.4.

Otros procedimientos para escindir anticuerpos, tales como separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes, escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas también se pueden usar, siempre y cuando los fragmentos se unan al antígeno que se reconoce por el anticuerpo intacto.

Por ejemplo, los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas V_H y V_L. Esta asociación puede ser no covalente, como se describe por Inbar y col., Proc. Nat’l Acad. Sci. Estados Unidos 69: 2659 (1972). Como alternativa, las cadenas variables se pueden enlazar mediante un puente de disulfuro intermolecular o entrecruzar mediante químicos tales como glutaraldehído (véase, por ejemplo, Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12: 437 (1992)).

Los fragmentos Fv pueden comprender cadenas V_H y V_L, que están conectadas por un engarce peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno de cadena única (scFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios V_H y V_L que están conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula huésped, tal como *E. coli*. Las células huésped recombinantes sintetizan una cadena de polipéptido única con un engarce peptídico formando un puente entre los dos dominios V. Los procedimientos para producir scFv se describen, por ejemplo, por Whitlow y col., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2: 97 (1991) (véase también, Bird y col., Science 242: 423 (1988), Ladner y col., Patente de los Estados Unidos Nº 4.946.778, Pack y col., Bio/Technology 11: 1271 (1993) y Sandhu, mencionado anteriormente).

Como una ilustración, se puede obtener un scFV exponiendo linfocitos a polipéptido de FGF-18 *in vitro* y seleccionando bibliotecas de presentación de anticuerpo en fago o vectores similares (por ejemplo a través del uso de proteína o péptido de FGF-18 inmovilizado o marcado). Los genes que codifican polipéptidos que tienen dominios de unión a polipéptido FGF-18 potenciales se pueden obtener explorando bibliotecas peptídicas aleatorias presentadas en fago (presentación en fago) o en bacterias, tales como *E. coli*. Las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos se pueden obtener de muchas formas, tal como a través de mutagénesis aleatoria y síntesis de polinucleótidos aleatoria. Estas bibliotecas de presentación de péptido aleatorio se pueden usar para explorar péptidos, que interaccionan con una diana conocida que puede ser una proteína o polipéptido, tal como un ligando o un receptor, una macromolécula biológica o sintética o sustancias orgánicas o inorgánicas. Las técnicas para crear y explorar tales bibliotecas de presentación de péptido aleatorias se conocen en la técnica (Ladner y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.223.409, Ladner y col., Patente de los Estados Unidos Nº 4.946.778, Ladner y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.403.484, Ladner y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.571.698 y Kay y col., Phage Display of Peptides and Proteins (Academic Press, Inc. 1996)) y las bibliotecas de presentación de péptido aleatorias y los kits para explorar tales bibliotecas están disponibles en el mercado, por ejemplo en CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Las bibliotecas de presentación de péptido aleatorias se pueden explorar usando las secuencias de FGF-18 divulgadas en el presente documento para identificar proteínas que se unen a FGF-18.

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una región determinante de complementariedad única (CDR). Los péptidos de CDR (“unidades de reconocimiento mínimas”) se pueden obtener construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Tales genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir del ARN de células que producen anticuerpo (véase, por ejemplo, Larrick y col., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2: 106 (1991), Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," en Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter y col. (eds.), página 166 (Cambridge University Press 1995) y Ward y col., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," en Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch y col., (eds.), página 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995)).

Como alternativa, un anticuerpo anti-FGF-18 se puede obtener a partir de un anticuerpo monoclonal “humanizado”. Los anticuerpos monoclonales humanizados se producen transfiriendo regiones determinantes de complementariedad de ratón a partir de las cadenas variables pesada y ligera de la inmunoglobulina de ratón a un dominio variable humano. Los restos típicos de anticuerpos humanos después se sustituyen en las regiones flanqueantes de los homólogos murinos. El uso de componentes de anticuerpo obtenidos a partir de anticuerpos monoclonales humanizados obvia los problemas potenciales asociados con la inmunogenicidad de regiones constantes murinas. Las técnicas generales para clonar dominios variables de inmunoglobulina murinos se describen, por ejemplo, por Orlandi y col., Proc. Nat’l Acad. Sci. Estados Unidos 86: 3833 (1989). Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados se describen por ejemplo, por Jones y col., Nature 321: 522 (1986), Carter y col., Proc. Nat’l Acad. Sci. Estados Unidos 89: 4285 (1992), Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12: 437 (1992), Singer y col., J. Immun. 150: 2844 (1993), Sudhir (ed.), Antibody Engineering Protocols (Humana Press, Inc. 1995), Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies," en Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland y col. (eds.), páginas 399-434 (John Wiley & Sons, Inc. 1996) y por Queen y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.693.762 (1997).

Los anticuerpos anti-idiotipo policlonales se pueden preparar inmunizando animales con anticuerpos anti-FGF-18 o fragmentos de anticuerpo, usando técnicas convencionales. Véase, por ejemplo, Green y col., "Production of Polyclonal Antisera," en Methods In Molecular Biology: Immunochemical Protocols, Manson (ed.), páginas 1-12 (Humana Press 1992). Véase también Coligan en las páginas 24.1-2.4.7. Como alternativa, los anticuerpos anti-idiotipo monoclonales se pueden preparar usando anticuerpos anti-FGF-18 o fragmentos de anticuerpo como inmunógenos con las técnicas descritas anteriormente. Como otra alternativa, los anticuerpos anti-idiotipo humanizados o anticuerpos anti-idiotipo de primates subhumanos se pueden preparar usando las técnicas descritas anteriormente. Los procedimientos para producir anticuerpos anti-idiotipo se describen, por ejemplo, por Irie, Patente de los Estados Unidos Nº 5.208.146, Greene, y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.637.677 y Varthakavi y Minocha, J. Gen. Virol. 77: 1875 (1996).

C. Fragmentos Funcionales de FGF-18

La presente invención también incluye el uso de “fragmentos funcionales” de polipéptidos de FGF-18, como se define en las reivindicaciones. Las moléculas de ácido nucleico codifican tales fragmentos funcionales. Los análisis de supresión de rutina de moléculas de ácido nucleico se pueden realizar para obtener fragmentos funcionales de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de FGF-18. Como una ilustración, las moléculas de ADN que tienen la secuencia de nucleótidos de SEC ID Nº: 1 se pueden digerir con nucleasa *Bal*31 para obtener una serie de supresiones anidadas. Después los fragmentos se insertan en vectores de expresión en fase de lectura apropiada y los polipéptidos expresados se aíslan y ensayan para determinar la capacidad de unirse a anticuerpos anti-FGF-18. Una alternativa a la digestión con exonucleasa es el uso de mutagénesis dirigida a oligonucleótido para introducir supresiones o codones de parada para especificar la producción de un fragmento deseado. Como alternativa, los fragmentos particulares de un gen de FGF-18 se pueden sintetizar usando la reacción en cadena de la polimerasa.

Como una ilustración de este enfoque general, los estudios acerca del truncamiento en uno o ambos extremos de interferones se han resumido por Horisberger y Di Marco, Pharmac. Ther. 66: 507 (1995). Adicionalmente, las técnicas convencionales para análisis funcional de proteínas se describen por, por ejemplo, Treuter y col., Molec. Gen. Genet. 240: 113 (1993), Content y col., "Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by human interferon," en Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems, Cantell (ed.), páginas 65-72 (Nijhoff 1987), Herschman, "The EGF Receptor," en Control of Animal Cell Proliferation, Vol. 1, Boynton y col., (eds.) páginas 169-199 (Academic Press 1985), Coumailleau y col., J. Biol. Chem. 270: 29270 (1995); Fukunaga y col., J. Biol. Chem. 270: 25291 (1995); Yamaguchi y col., Biochem. Pharmacol. 50: 1295 (1995) y Meisel y col., Plant Molec. Biol. 30: 1 (1996).

Los análisis de secuencias de aminoácidos de FGF-18 humano y murino revelaron un sitio dibásico en el extremo C de los polipéptidos (restos de aminoácidos 196-197; Lys-Arg). Los sitios de aminoácidos dibásicos, tales como Lys-Arg, son susceptibles a escisión por varias enzimas, incluyendo, trombina y carboxipeptidasas. Un polipéptido truncado en el extremo C-terminal que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID Nº: 2, a partir de un resto de aminoácido Glu28 a un resto de aminoácido Lys196, se observó que tiene actividad biológica. Por consiguiente, un ejemplo de un fragmento funcional de FGF-18 es un polipéptido que consiste en restos de aminoácidos 1 a 196 ó 28 a 196 de SEC ID Nº: 2 ó 4. El análisis de secuencia de la familia de FGF indica que fragmentos funcionales de FGF-18 adicionales incluyen polipéptidos que consisten en restos de aminoácidos 1 a 175 ó 28 a 175 de SEC ID Nº: 2 ó 4. Otros fragmentos funcionales de FGF-18 se pueden determinar por los expertos en la materia usando procedimientos descritos anteriormente.

La presente memoria descriptiva describe fragmentos funcionales de un gen de FGF-18 que tienen cambios de aminoácidos, en comparación con una secuencia de aminoácidos divulgada en el presente documento. Un gen de *FGF-18* variante se puede identificar en base a la estructura determinando el nivel de identidad con secuencias de nucleótidos y aminoácidos divulgadas, como se ha descrito anteriormente. Un enfoque alternativo para identificar un gen variante en base a la estructura es determinar si una molécula de ácido nucleico que codifica un gen de *FGF-18* variante potencial puede hibridarse a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos, tal como SEC ID Nº: 1 o SEC ID Nº: 4.

4. Preparación de Composiciones de Dirección de FGF-18

A. Conjugados de FGF-18 y Proteínas de Fusión de Dirección de FGF-18

Una composición de dirección de FGF-18 comprende un componente de FGF-18 y una citotoxina. Un ejemplo de una citotoxina polipeptídica adecuada es una proteína de inactivación de ribosoma. Las proteínas inactivadoras de ribosomas de tipo I son proteínas de cadena única, mientras que las proteínas inactivadoras de ribosomas de tipo II consisten en dos subunidades no idénticas (cadenas A y B) unidas por un puente de disulfuro (para una revisión, véase Soria y col., Targeted Diagn. Ther. 7: 193 (1992)). Las proteínas inactivadoras de ribosomas de tipo I útiles incluyen polipéptidos de *Saponaria officinalis* (por ejemplo, saporina-1, saporina-2, saporina-3, saporina-6), *Momordica charantia* (por ejemplo, momordina), *Byronia dioica* (por ejemplo, briodina, briodina-2), *Trichosanthes kirilowii* (por ejemplo, trichosantina, trichokirina), *Gelonium multiflorum* (por ejemplo, gelonina), *Phytolacca americana* (por ejemplo, proteína antiviral de fitolaca, proteína antiviral II de fitolaca, proteína antiviral S de fitolaca), *Phytolacca dodecandra* (por ejemplo, dodecandrina, proteína antiviral de *Mirabilis*) y similares. Las proteínas inactivadoras de ribisomas se describen, por ejemplo, por Walsh y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.635.384.

Las proteínas inactivadoras de ribosomas de tipo II adecuadas incluyen polipéptidos de *Ricinus communis* (por ejemplo, ricina), *Abrus precatorius* (por ejemplo, abrina), *Adenia digitata* (por ejemplo, modeccina) y similares. Ya que las proteínas inactivadoras de ribosomas de tipo II incluyen una cadena B que se une a galactósidos y una cadena A tóxica que depurina adenosina, los conjugados de proteína inactivadora de ribosomas de tipo II deberían incluir la cadena A. Las proteínas inactivadoras de ribosomas útiles adicionales incluyen buganina, clavina, proteínas inactivadoras de ribosomas de maíz, proteínas inactivadoras de ribosomas de *Vaccaria pyramidata*, nigrina b, nigrina básica 1, ebulina, racemosina b, lufina-a, lufina-b, lufina-S y otras proteínas inactivadoras de ribosomas conocidas por los expertos en la materia. Véase por ejemplo, Bolognesi y Stirpe, publicación internacional Nº WO98/55623,

Colnaghi y col., publicación internacional Nº WO97/49726, Hey y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.635.384, Bolognesi y Stirpe, publicación internacional Nº WO95/07297, Arias y col., publicación internacional Nº WO94/20540, Watanabe y col., J. Biochem. 106: 6 977 (1989); Islam y col., Agric. Biol. Chem. 55: 229 (1991) y Gao y col., FEBS Lett. 347: 257 (1994).

Los análogos y variantes de proteínas inactivadoras de ribosomas de origen natural también son adecuados para la dirección de composiciones descritas en el presente documento y tales proteínas son conocidas por los expertos en la materia. Las proteínas inactivadoras de ribosomas se pueden producir usando secuencias de aminoácidos y nucleótidos disponibles al público. Como una ilustración, una secuencia de nucleótidos que codifica saporina-6 se divulga por Lorenzetti y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.529.932, mientras que Walsh y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.635.384, describen secuencias de nucleótidos y aminoácidos de proteínas inactivadoras de ribosomas de maíz y de cebada. Además, las proteínas inactivadoras de ribosomas también están disponibles en el mercado.

Otro grupo de citotoxinas polipeptídicas útiles incluyen inmunomoduladores. Las composiciones de dirección de FGF-18 que incluyen un inmunomodulador proporcionan un medio para administrar un inmunomodulador a una célula diana y son particularmente útiles frente a células tumorales. Los efectos citotóxicos de inmunomoduladores se conocen bien por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Klegerman y col., "Lymphokines and Monokines," en Biotechnology And Pharmacy, Pessuto y col. (eds.), páginas 53-70 (Chapman & Hall 1993). Como una ilustración, los interferones pueden inhibir la proliferación celular induciendo expresión aumentada de antígenos de histocompatibilidad de clase I en la superficie de diversas células y de este modo, potencian el índice de destrucción de células mediante linfocitos T citotóxicos. Adicionalmente, los factores de necrosis tumorales, tales como factor de necrosis tumoral α, se cree que producen efectos citotóxicos induciendo fragmentación de ADN.

Las citotoxinas polipeptídicas adicionales incluyen ribonucleasa, ADNasa I, enterotoxina A estafilocócica, toxina de difteria, exotoxina de *Pseudomonas* y endotoxina de *Pseudomonas*. Véanse, por ejemplo, Pastan y col., Cell 47: 641 (1986) y Goldenberg, CA - A Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994). Otras toxinas adecuadas se conocen por los expertos en la materia.

Los conjugados de polipéptidos citotóxicos y componentes de FGF-18 se pueden preparar usando técnicas convencionales para conjugar polipéptidos. Por ejemplo, los procedimientos para conjugar FGF con saporina se describen por Lappi y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 160: 917 (1989), Soria y col., Targeted Diagn. Ther. 7: 193 (1992), Buechler y col., Eur. J. Biochem. 234: 706 (1995), Behar-Cohen y col., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 36: 2434 (1995), Lappi y Baird, Patente de los Estados Unidos Nº 5.191.067, Calabresi y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.478.804 y Lappi y Baird, Patente de los Estados Unidos Nº 5.576.288. Enfoques adicionales para conjugar polipéptidos se conocen por los expertos en la materia. Por ejemplo, Lam y Kelleher, Patente de los Estados Unidos Nº 5.055.291, describen la producción de anticuerpos conjugados con fragmento A de toxina de difteria o toxina ricina.

Las proteínas de fusión de dirección de FGF-18 también se pueden producir usando técnicas convencionales. Como una ilustración, las proteínas recombinantes de saporina-FGF se describen por Lappi y col., J. Biol. Chem. 269: 12552 (1994), Behar-Cohen y col., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 36: 2434 (1995), McDonald y col., Protein Expr. Purif. 8: 97 (1996) y Lappi y col., Patente de los Estados Unidos 5.916.772. De una manera similar, Landgraf y col., Biochemistry 37: 3220 (1998), produjeron una proteína de fusión que comprende un resto de factor de crecimiento epidérmico y toxina de difteria. Los procedimientos para preparar proteínas de fusión que comprenden un resto de polipéptido citotóxico se conocen bien en la técnica de producción de proteínas de fusión anticuerpo-toxina. Por ejemplo, las proteínas de fusión de anticuerpo-exotoxina A de *Pseudomonas* se han descrito por Chaudhary y col., Nature 339: 394 (1989), Brinkmann y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. Estados Unidos 88: 8616 (1991), Batra y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. Estados Unidos 89: 5867 (1992), Friedman y col., J. Immunol. 150: 3054 (1993), Wels y col., Int. J. Can. 60: 137 (1995), Fominaya y col., J. Biol. Chem. 271: 10560 (1996), Kuan y col., Biochemistry 35: 2872 (1996) y Schmidt y col., Int. J. Can. 65: 538 (1996). Las proteínas de fusión anticuerpo-toxina que contienen un resto de toxina de difteria se han descrito por Kreitman y col., Leukemia 7: 553 (1993), Nicholls y col., J. Biol. Chem. 268: 5302 (1993), Thompson y col., J. Biol. Chem. 270: 28037 (1995) y Vallera y col., Blood 88: 2342 (1996). Deonarain y col., Tumor Targeting 1: 177 (1995), han descrito una proteína de fusión de anticuerpo-toxina que tiene un resto de ARNasa, mientras que Linardou y col., Cell Biophys. 24-25: 243 (1994), produjeron una proteína de fusión de anticuerpo-toxina que comprende un componente de ADNasa I. La gelonina se usó como el resto de toxina en la proteína de fusión de anticuerpo-toxina de Better y col., J. Biol. Chem. 270: 14951 (1995). Como un ejemplo adicional, Dohlsten y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. Estados Unidos 91: 8945 (1994), informaron de una proteína de fusión anticuerpo-toxina que comprende enterotoxina A estafilocócica. Adicionalmente, las proteínas de fusión de anticuerpo que comprenden un resto de interleuquina-2 se describen por Boleti y col., Ann. Oncol. 6: 945 (1995), Nicolet y col., Cancer Gene Ther. 2: 161 (1995), Becker y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. Estados Unidos 93: 7826 (1996), Hank y col., Clin. Cancer Res. 2: 1951 (1996) y Hu y col., Cancer Res. 56: 4998 (1996), mientras que Yang y col., Hum. Antibodies Hybridomas 6: 129 (1995), describen una proteína de fusión que incluye un fragmento $F(ab')_2$ y un resto de factor de necrosis tumoral. Estos enfoques se pueden usar para preparar las proteínas de fusión de dirección de FGF-18 descritas en el presente documento.

Como una alternativa a una citotoxina polipeptídica, las composiciones de dirección de FGF-18 pueden comprender un isótopo radiactivo como el resto de citotoxina. Por ejemplo, una composición de dirección de FGF-18 puede comprender un isótopo radiactivo emisor α, un isótopo radiactivo emisor β, un isótopo radiactivo emisor γ, un emisor de electrones Auger, un agente de captura de neutrones que emite partículas α o un isótopo radiactivo que se desintegra por captura de electrones. Los isótopos radiactivos adecuados incluyen ^{198}Au, ^{199}Au, ^{32}P, ^{33}P, ^{125}I, ^{131}I, ^{123}I, ^{90}Y, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{67}CU, ^{211}At, ^{47}Sc, ^{103}Pb, ^{109}Pd, ^{212}Pb, ^{71}Ge, ^{77}As, ^{105}Rh, ^{113}Ag, ^{119}Sb, ^{121}Sn, ^{131}Cs, ^{143}Pr, ^{161}Tb, ^{177}Lu, ^{191}OS, ^{193}MPt, ^{197}Hg y similares.

Un isótopo radiactivo se puede unir a un componente de FGF-18 directamente o indirectamente, a través de un agente quelante. Por ejemplo, ^{67}Cu, considerado uno de los isótopos radiactivos más prometedores para radioinmunoterapia debido a su semivida de 61,5 horas y suministro abundante de partículas β y rayos γ, se puede conjugar a un componente de FGF-18 usando el agente quelante, ácido p-bromoacetamido-bencil-tetrametilaminotetraacético. Chase y Shapiro, "Medical Applications of Radioisotopes," en Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª edición, páginas 843-865 (Mack Publishing Company 1995). Como una alternativa, ^{90}Y, que emite una partícula β energética, se puede acoplar a un componente de FGF-18 usando ácido dietilenotriaminopentaacético. Además, un procedimiento ilustrativo adecuado para la marcación radiactiva directa de un componente de FGF-18 con ^{131}I y se describe por Stein y col., Antibody Immunoconj. Radiopharm. 4: 703 (1991). Como alternativa, los adendos de boro tales como carboranos se pueden unir a componentes de FGF-18, usando técnicas convencionales.

Otro tipo de citotoxina adecuada para la preparación de conjugados de FGF-18 es un fármaco quimioterapéutico. Los fármacos quimioterapéuticos ilustrativos incluyen mostazas de nitrógeno, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas, triazenos, análogos de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina, antibióticos, epipodofilotoxinas, complejos de coordinación de platino y similares. Los ejemplos específicos de fármacos quimioterapéuticos incluyen metotrexato, doxorrubicina, daunorrubicina, citosinarabinósido, *cis*-platino, vindesina, mitomicina, bleomicina, melfalan, clorambucilo y similares. Los agentes quimioterapéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Ed. (Mack Publishing Co. 1995), y en Goodman And Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics, 7ª Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985). Otros agentes quimioterapéuticos adecuados se conocen por los expertos en la materia.

En otro enfoque, los conjugados de FGF-18 se preparan conjugando agentes fotoactivos o colorantes a un componente de FGF-18. Los fluorescentes y otros cromógenos o colorantes, tales como porfirinas sensibles a la luz visible, se han usado para detectar y para tratar lesiones dirigiendo la luz adecuada a la lesión. Este tipo de "fotorradiación", "fototerapia", o terapia "fotodinámica" se describe por ejemplo, por Mew y col., J. Immunol. 130: 1473 (1983), Jori y col. (eds.), Photodynamic Therapy Of Tumors And Other Diseases (Libreria Progetto 1985), Oseroff y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 83: 8744 (1986), van den Bergh, Chem. Britain 22: 430 (1986), Hasan y col., Prog. Clin. Biol. Res. 288: 471 (1989), Tatsuta y col., Lasers Surg. Med. 9: 422 (1989) y Pelegrin y col., Cancer 67: 2529 (1991).

Otro tipo general de citotoxina útil es un inhibidor de tirosina quinasa. Como se ha descrito anteriormente, determinadas patologías están asociadas con un receptor-3 de FGF mutante que es constitutivamente activo. Esta señalización aumentada puede provocar una proliferación excesiva y metástasis. Ya que la activación de proliferación por tirosina quinasas, tales como tirosina quinasa receptora de FGF, se ha sugerido que juega un papel en el desarrollo y progresión de tumores, esta activación se puede inhibir mediante componentes de FGF-18 que suministran inhibidores de tirosina quinasa. Los inhibidores de tirosina quinasa adecuados incluyen isoflavonas, tales como genisteína (5, 7, 4'-trihidroxiisoflavona), daidzeína (7,4'-dihidroxiisoflavona), y biochanina A (4-metoxigenisteína) y similares. Los procedimientos para conjugar inhibidores de tirosina a un factor de crecimiento se describen, por ejemplo, por Uckun, Patente de los Estados Unidos Nº 5.911.995.

En el presente documento se describen composiciones de dirección de FGF-18 que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica una citotoxina. Por ejemplo, Hoganson y col., Human Gene Ther. 9: 2565 (1998), describen la administración mediada por FGF-2 de un gen de saporina produciendo un conjugado de FGF-2-polilisina que se condensó con un vector de expresión que comprende un gen de saporina.

B. Liposomas de Dirección de FGF-18

Los liposomas proporcionan un medio para suministrar polipéptidos terapéuticos a un sujeto por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intratecal, por vía intramuscular, por vía subcutánea o a través de administración oral, inhalación o administración intranasal. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas lipídicas que rodean compartimentos acuosos (véase, en general, Bakker-Woudenberg y col., Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12 (Supl. 1):S61 (1993), Kim, Drugs 46: 618 (1993) y Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers," in Drug Delivery Systems, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 3-24 (CRC Press 1995)). Los liposomas son similares en composición a las membranas celulares y como resultado, los liposomas se pueden administrar de manera segura y son biodegradables. Dependiendo del procedimiento de preparación, los liposomas pueden ser unilamerales o multilamerales y los liposomas pueden variar de tamaño con diámetros que varían desde 0,02 μm a más de 10 μm. Una diversidad de agentes se pueden encapsular en liposomas: agentes hidrófobos se dividen en las bicapas y los agentes hidrófilos se dividen dentro de los espacios acuosos interiores

(véase, por ejemplo, Machy y col., Liposomes In Cell Biology And Pharmacology (John Libbey 1987) y Ostro y col., American J. Hosp. Pharm. 46: 1576 (1989)). Además, es posible controlar la disponibilidad terapéutica del agente encapsulado variando el tamaño del liposoma, el número de bicapas, la composición de lípidos, así como también la carga y características superficiales de los liposomas.

Los liposomas se pueden adsorber a prácticamente cualquier tipo de célula y después liberar lentamente el agente encapsulado. Como alternativa, un liposoma adsorbido se puede someter a endocitosis por las células que son fagocíticas. La endocitosis está seguida de degradación intralisosomal de lípidos liposómicos y la liberación de los agentes encapsulados (Scherphof y col., Ann. N.Y. Acad Sci. 446: 368 (1985)). Después de la administración intravenosa, los liposomas pequeños (0,1 a 1,0 μm) típicamente se captan por las células del sistema retículo endotelial, localizado principalmente en el hígado y el bazo, mientras que los liposomas mayores de 3,0 μm se depositan en el pulmón. Esta captación preferencial de liposomas más pequeños por las células del sistema retículo endotelial se ha usado para administrar agentes quimioterapéuticos a macrófagos y a tumores del hígado.

El sistema retículo endotelial se puede evadir mediante varios procedimientos que incluyen saturación con dosis grandes de partículas de liposomas o inactivación de macrófagos selectiva mediante medios farmacológicos (Claassen y col., Biochim. Biophys. Acta 802: 428 (1984)). Adicionalmente, la incorporación de fosfolípidos derivatizados con glicolípidos o polietilenglicol en membranas de liposomas ha demostrado dar como resultado una captación significativamente reducida por el sistema retículo endotelial (Allen y col., Biochim. Biophys. Acta 1068: 133 (1991); Allen y col., Biochim. Biophys. Acta 1150: 9 (1993)).

Los liposomas también se pueden preparar para dirigirse a células u órganos particulares variando la composición de fosfolípidos o insertando receptores o ligandos en los liposomas. Por ejemplo, los liposomas preparados con un contenido elevado de un tensioactivo no iónico, se han usado para dirigirse al hígado (Hayakawa y col., Patente Japonesa 04-244,018; Kato y col, Biol. Pharm. Bull. 16: 960 (1993)). Estas formulaciones se prepararon mezclando fosfatidil colina de semilla de soja, α-tocoferol y aceite de ricino etoxilado hidrogenado (HCO-60) en metanol, concentrando la mezcla en vacío y después reconstituyendo la mezcla con agua. Una formulación de liposoma de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) con una mezcla de glucósido estéril (SG) obtenido de semilla de soja y colesterol (Ch) también ha demostrado dirigirse al hígado (Shimizu y col., Biol. Pharm. Bull. 20: 881 (1997)).

Como alternativa, diversos ligandos de dirección se pueden unir a la superficie del liposoma, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, carbohidratos, vitaminas, y proteínas de transporte. Por ejemplo, los liposomas se pueden modificar con derivados de galactosil lípido de tipo ramificado para dirigirse a receptores de asialoglicoproteína (galactosa), que se expresan exclusivamente en la superficie de células hepáticas (Kato y Sugiyama, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 14: 287 (1997); Murahashi y col., Biol. Pharm. Bull.20: 259 (1997)).De forma similar, Wu y col., Hepatology 27: 772 (1998), han demostrado que los liposomas de marcación con asialofetuína conducen a una semivida en plasma de liposoma acortada y potencian enormemente la captación de liposomas marcados con asialofetuína por los hepatocitos. Por otra parte, la acumulación hepática de liposomas que comprenden derivados de galactosillípido de tipo ramificado se puede inhibir mediante reinyección de asialofetuína (Murahashi y col., Biol. Pharm. Bull.20: 259 (1997)). Los liposomas de albúmina sérica humana poliaconitilada proporcionan otro enfoque para dirigir liposomas a células hepáticas (Kamps y col., Proc. Nat'l Acad Sci. Estados Unidos 94: 11681 (1997)). Además, Geho, y col. Patente de los Estados Unidos 4.603.044, describen un sistema de suministro de vesicular de liposomas dirigido a hepatocito, que tiene especificidad por receptores hepatobiliares asociados con las células metabólicas especializadas del hígado.

Las composiciones de dirección de FGF-18 se pueden encapsular dentro de liposomas usando técnicas convencionales de microencapsulación de proteínas (véase, por ejemplo, Anderson y col., Infect. Immun. 31: 1099 (1981), Anderson y col., Cancer Res. 50: 1853 (1990) y Cohen y col., Biochim. Biophys. Acta 1063: 95 (1991). Alving y col. "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies," in Liposome Technology, 2ª edición, Vol. III, Gregoriadis (ed.), página 317 (CRC Press 1993), Wassef y col., Meth. Enzymol. 149: 124 (1987)). Los liposomas adecuados pueden contener una diversidad de restos, tales como derivados lipídicos de poli(etilenglicol) (Allen y col., Biochim. Biophys. Acta 1150: 9 (1993)).

Además de proporcionar un medio para administrar composiciones de dirección de FGF-18, los liposomas se pueden producir para dirigirse a células que expresan receptor-3 de FGF o receptor-2 de FGF. Como se ha indicado anteriormente, un ligando se puede unir a una superficie de liposoma de células diana que expresan un receptor afín. Por consiguiente, la presente invención incluye liposomas que comprende un componente de FGF-18 unido a la superficie para lograr la administración de citotoxinas encapsuladas, como se define en las reivindicaciones.

C. Ensayos

La capacidad de un polipéptido de FGF-18 o fragmento funcional de FGF-18 de unirse con su receptor afín se puede determinar usando un ensayo de actividad biológica. Por ejemplo, la proliferación se puede medir usando células cultivadas. En general, los efectos proliferativos se observan como un aumento del número de células, que se puede lograr mediante una inhibición de la apoptosis, así como mediante la estimulación de la mitogénesis. Las células cultivadas adecuadas para un ensayo de proliferación incluyen fibroblastos cardíacos, miocitos cardíacos, miocitos esqueléticos, células endoteliales de la vena umbilical humana a partir de cultivo primario. Las líneas celulares

establecidas ilustrativas incluyen células de fibroblastos NIH 3T3 (ATCC Nº CRL-1658), células cardíacas de chum CHH-1 (ATCC Nº CRL-1680), mioblastos de corazón de rata H9c2 (ATCC Nº CRL-1446), células de carcinoma mamario de Shionogi (Tanaka y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 8928 (1992)) y células de adenocarcinoma LNCap. FGC (ATCC Nº CRL-1740) Los ensayos de proliferación celular se conocen bien en la técnica. Los enfoques ilustrativos incluyen la medición de quimiosensibilidad a colorante rojo neutro (Cavanaugh y col., Investigational New Drugs 8: 347 (1990)), incorporación de nucleótidos marcados radioactivamente (Cook y col., Analytical Biochem. 179:1 (1989)), incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina en el ADN de células en proliferación (Porstmann y col., J. Immunol. Methods 82: 169 (1985)), y el uso de sales de tetrazolio, tal como en el ensayo de microcultivo con tetrazolio MTT (Mosmann, J. Immunol. Methods 65: 55 (1983); Alley y col., Cancer Res. 48: 589 (1988); Scudiero y col., Cancer Res. 48: 4827 (1988) Marshall y col., Growth Reg. 5: 69 (1995); Wang and Xu, Int. J. Cancer 75: 596 (1998)).

Por ejemplo, 120 líneas celulares, que representan diversos tejidos, se seleccionaron para sensibilidad a una composición de dirección de FGF-18, que se habían preparado conjugando FGF-18 a saporina. Las dos líneas celulares más sensibles, caracterizadas por una DL_{50}< 1 nM, fueron una línea de células de osteosarcoma humano (ATCC, CRL 1543) y una línea de células de osteosarcoma de rata, designada "UMR 106" (ATCC, CRL 1661). Un estudio de marcación de superficie celular indicó que las células humanas expresaban receptor-3c de FGF y se observó que las células contenían ARNm de receptor-3c de FGF.

Como un ligando de receptor, la actividad de un componente de FGF-18 o composición de dirección de FGF-18 se puede determinar usando un microfisiómetro de biosensor basado en silicio que mide el índice de acidificación extracelular o excreción de protones asociada con la unión a receptor y respuestas celulares posteriores. Un dispositivo ilustrativo es el microfisiómetro CYTOSENSOR fabricado por Molecular Devices Corp. (Sunnyvale, CA). Una diversidad de respuestas celulares, tales como proliferación celular, transporte de iones, producción de energía, respuesta inflamatoria, activación reguladora y de receptor y similares, se pueden medir mediante este procedimiento (véase, por ejemplo, McConnell y col., Science 257: 1906 (1992), Pitchford y col., Meth. Enzymol. 228: 84 (1997), Arimilli y col., J. Immunol. Meth. 212: 49 (1998) y Van Liefde y col., Eur. J. Pharmacol. 346: 87 (1998)). Además, el microfisiómetro se puede usar para ensayar c

Ya que el metabolismo de energía está acoplado con el uso de ATP celular, cualquier acontecimiento que altere los niveles de ATP celular, tales como la activación de receptor y el inicio de la traducción de seña, provocará un cambio en la sección ácida celular. Mediante la medición de los cambios de acidificación extracelular en el medio celular a lo largo del tiempo, por lo tanto, el microfisiómetro mide directamente las respuestas celulares a diversos estímulos, incluyendo FGF-18. El microfisiómetro se puede usar para medir respuestas de una célula eucariota sensible a FGF-18, en comparación con una célula eucariota de control que no responde al polipéptido fe FGF-18. Las células eucariotas sensibles a FGF-18 comprenden células en las cuales se ha transfectado un receptor para FGF-18 para crear una célula que sea sensible a FGF-18 o células que son sensibles naturalmente a FGF-18, tal como las diversas células descritas anteriormente. Las respuestas celulares moduladas de FGF-18 se miden mediante un cambio (por ejemplo, un aumento o reducción en la acidificación celular) en las respuestas de las células expuestas a FGF-18, en comparación con células de control que no se han expuesto a FGF-18.

Adicionalmente, un sistema de fase sólida se puede usar para caracterizar un componente de FGF-18 o una composición de dirección de FGF-18. Por ejemplo, un polipéptido que comprende un componente de FGF-18 se puede inmovilizar en la superficie de una microplaca receptora de un instrumento biosensor disponible en el mercado (BIACORE, Biacore AB; Uppsala, Suecia). El uso de este instrumento se divulga, por ejemplo, por Karlsson, Immunol. Methods 145: 229 (1991) y Cunningham y Wells, J. Mol. Biol. 234: 554 (1993).

Como una ilustración, un polipéptido que comprende un componente de FGF-18 se une covalentemente, usando química de amina o de sulfhidrilo, a fibras de dextrano que están unidas a película de oro dentro de una celda de flujo. Después una muestra de ensayo se pasa a través de la celda. Si el receptor-3 de FGF está presente en la muestra, el mismo se unirá al polipéptido inmovilizado, provocando un cambio en el índice refractario del medio, que se detecta como un cambio en la resonancia de plasmón superficial de la película de oro. Este sistema permite la determinación de índices de asociación y disociación, a partir de los cuales se puede calcular la afinidad de unión y la evaluación de la estequiometria de unión.

Adicionalmente, el efecto de los componentes de FGF-18 y las composiciones de dirección de FGF-18 se puede verificar *in vivo.* Como una ilustración, la actividad de composiciones de dirección de FGF-18 sobre la progresión tumoral y metástasis se puede medir *in vivo*. Se han desarrollado varios modelos de ratón singénico para estudiar la influencia de polipéptidos, compuestos u otros tratamientos sobre la progresión tumoral. En estos modelos, las células tumorales pasadas en cultivo se implantan en ratones de la misma cepa que el donante del tumor. Las células se desarrollarán en tumores que tienen características similares en el ratón receptor y también ocurrirá metástasis en algunos de los modelos. Como una ilustración, los modelos murinos se han desarrollado para numerosas afecciones, incluyendo mieloma múltiple, carcinogénesis de tiroides y carcinoma de vejiga (véase, por ejemplo, Kubota, J. Cell. Biochem. 56: 4 (1994), Capen y Sagartz, Lab. Anim. Sci. 48: 580 (1998) y Radl, Pathol. Biol. (Paris) 47: 109 (1999)).

Por ejemplo, los ratones se tratan con una composición de ensayo a través de inyección diaria de componentes de FGF-18 o de composiciones de dirección de FGF-18 o una inyección de una vez de adenovirus recombinante que expresa el componente de FGF-18 o la composición de dirección e FGF-18. Tres días a continuación de este tratamiento, 10^5 a 10^6 células tumorales se implantan bajo la piel dorsal. Como alternativa, las mismas células se pueden infectar con adenovirus recombinante, tal como una que expresa composiciones de dirección de FGF-18, antes del implante de forma que la proteína se sintetice en el sitio del tumor o intracelularmente en lugar de sistémicamente. Como otra alternativa, las células tumorales implantadas se pueden transfectar de forma transitoria con vectores de expresión que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican componente de FGF-18. Aunque los ratones normalmente desarrollan tumores visibles dentro de cinco días, se permite que los tumores crezcan durante un periodo de hasta tres semanas. El tamaño del tumor y el peso corporal se supervisan cuidadosamente a través de todo el experimento. Al momento del sacrificio, el tumor se retira y se pesa. Los tejidos resecados se preparan para examen histopatológico, inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, usando procedimientos conocidos en la técnica. La influencia del polipéptido expresado en cuestión, por ejemplo, composiciones de dirección de FGF-18, sobre la habilidad del tumor de reclutar vasculatura y experimentar crecimiento o metástasis se puede evaluar de este modo.

5. Usos Terapéuticos de las Composiciones de Dirección de FGF-18

La presente invención incluye el uso de composiciones de dirección de FGF-18 (como se define en las reivindicaciones) e incluye conjugados de FGF-18 y proteínas de fusión de dirección de FGF-18 para inhibir la proliferación de células que expresan receptor-3 de FGF o receptor-2 de FGF. Estas moléculas se pueden administrar a cualquier sujeto que necesite tratamiento y la memoria descriptiva describe usos terapéuticos tanto veterinarios como humanos. Los sujetos ilustrativos incluyen sujetos mamíferos, tales como animales de granja, animales domésticos y pacientes humanos.

Chesi y col., Nature Genet. 16: 260 (1997), han descrito una mutación en el dominio de proteína quinasa del receptor-3 de FGF asociado con células de mieloma múltiple. El gen de *receptor-3 de FGF* parece estar regulado positivamente debido a una translocación, que lleva al gen dentro de 50 a 100 kb de potenciadores de IgH marcados (Chesi y col., Nature Genet. 16: 260 (1997); Chesi y col., Blood 92: 3025 (1998)). Independientemente del papel del trastorno de la regulación del gen del *receptor-3 de FGF* en el desarrollo del mieloma múltiple, el polipéptido del receptor-3 de FGF expresado proporciona un marcador para tratamiento terapéutico. Por consiguiente, la presente invención incluye el tratamiento de mieloma múltiple con composiciones de dirección de FGF-18.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden ser para su uso en el tratamiento de afecciones adicionales. Por ejemplo, la acondroplasia, la forma más común de enanismo en el hombre, es un trastorno genético dominante causado por una mutación puntual en la región transmembrana del receptor-3 de FGF (véase, por ejemplo, Wang y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. Estados Unidos 96: 4455 (1999)). La mutación puntual parece provocar una expresión constitutiva del receptor-3 de FGF (Colvin y col., Nature Genet. 12: 390 (1996); Deng y col., Cell 84: 911 (1996)). La administración de hormona de crecimiento proporciona una forma de tratamiento para acondroplasia (Seino y col., Acta Paediatr. (Supl.) 88: 118 (1999)). Las composiciones de dirección de FGF-18 pueden proporcionar un enfoque terapéutico adicional, que se puede ensayar en ratones enanos acondroplásicos, un modelo murino para ensayar el tratamiento de la enfermedad humana (Wang y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. Estados Unidos 96: 44455 (1999)).

Existen afecciones adicionales que se beneficiarían de la administración de composiciones de dirección de FGF-18. Por ejemplo, Cappellen y col., Nature Genetics 23: 18 (1999), describen la expresión de receptor-3 de FGF activado constitutivamente en cánceres epiteliales comunes, tales como carcinomas de la vejiga y de cérvix humanos. El presente inventor observó que un conjugado de FGF-18-saporina destruye específicamente las células de osteosarcoma humano, mientras que reserva los fibroblastos. Además, los estudios por Onose y col., Eur. J. Endocrinol. 140: 169 (1999), indican que la sobre expresión del receptor-3 de FGF por células de carcinoma de tiroides humano puede contribuir a la extensión maligna de los carcinomas. Por lo tanto, las composiciones de dirección de FGF-18 pueden ser para su uso en el tratamiento de afecciones asociadas con receptor-3 de FGF, tales como acondroplasia, osteosarcoma y carcinoma.

Ya que FGF-18 también se une al receptor-2 de FGF, las composiciones descritas en el presente documento pueden ser para su uso en el tratamiento de afecciones asociadas con estos receptores. Por ejemplo, Hughes, Cardiovasc. Res. 32: 557 (1996), observaron la co-expresión generalizada de receptor-1 de FGF y receptor-2 de FGF en células de músculo liso de la íntima, células espumosas y la microvasculatura de placa de lesiones ateroescleróticas simples y avanzadas. Por consiguiente, la presente invención incluye el tratamiento para ateroesclerosis mediante el uso de la composición de dirección de FGF-18, como se describe en las composiciones.

En general, la dosis de composiciones de dirección de FGF-18 administrada variará dependiendo de factores tales como la edad del sujeto, el peso, la altura, el sexo, la condición médica general y la historia médica anterior. Típicamente, es deseable proporcionar al receptor una dosis de composición de dirección de FGF-18, que esté en el intervalo de desde aproximadamente 1 pg/kg hasta 10 mg/kg (cantidad de agente/peso corporal del sujeto), aunque también se puede administrar una dosis más baja o más alta según lo determine las circunstancias.

La administración de una composición de dirección de FGF-18 a un sujeto puede ser intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intrapreural, intratecal, mediante perfusión a través de un catéter regional o mediante infección intralesional directa. Cuando se administran proteínas terapéuticas mediante inyección, la administración puede ser mediante infusión continua o mediante bolos únicos o múltiples.

Las vías de administración adicionales incluyen oral, de membrana mucosa, pulmonar y transcutánea. La administración oral es adecuada para microesferas de poliéster, microesferas de zein, microesferas proteinoides, microesferas de policianoacrilato y sistemas basados en lípido (véase, por ejemplo, DiBase y Morrel, "Oral Delivery of Microencapsulated Proteins," en Protein Delivery: Physical Systems, Sanders y Hendren (eds.), páginas 255-288 (plenum Press 1997)). La viabilidad de una administración intranasal se ilustra mediante un modo de administración de insulina de este tipo (véase, por ejemplo, Hincheliffe y Illum, Adv. Drug Deliv. Rev. 35: 199 (1999)). Las partículas secas o líquidas que comprenden FGF-18 se pueden preparar e inhalar con la ayuda de dispersadores de polvo seco, generadores de aerosol líquido o nebulizadores (por ejemplo, Petit y Gombotz, TIBTECH 16: 343 (1998); Patton y col., Adv. Drug Deliv. Rev. 35: 235 (1999)). Este enfoque se ilustra mediante el sistema de tratamiento de diabetes AERX que es un inhalador electrónico manual que suministra insulina aerosolizada a los pulmones. Los estudios han demostrado que las proteínas tan grandes como 48.000 kDa se han administrado a través de la piel a concentraciones terapéuticas con la ayuda de ultrasonido de baja frecuencia, que ilustra la viabilidad de administración transcutánea (Mitragotri y col., Science 269: 850 (1995)). La administración transdérmica usando electroporación proporciona otro medio para administrar una molécula que tiene actividad de unión a FGF-18 (Potts y col., Pharm. Biotechnol. 10: 213 (1997)).

Una composición farmacéutica que comprende una composición de dirección de FGF-18 se puede formula de acuerdo con procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, mediante lo cual las proteínas terapéuticas se combinan en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un “vehículo farmacéuticamente aceptable” si la administración se puede tolerar por un paciente receptor. La solución salina tamponada con fosfato es un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos adecuados se conocen bien por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Gennaro (ed.), Remington’s Pharmaceutical Sciences, 19ª Edición (Mack Publishing Company 1995).

Con los fines de terapia, una composición de dirección de FGF-18 y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administran a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una combinación de una composición de dirección de FGF-18 y un vehículo farmacéuticamente aceptable se dice que se administra en una “cantidad terapéuticamente eficaz” si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia da como resultado un cambio detectable en la fisiología de un sujeto receptor. Por ejemplo, un agente usado para tratar mieloma múltiple es fisiológicamente significativo si la presencia del agente da como resultado la inhibición del crecimiento de las células tumorales. Una inhibición del progreso del mieloma múltiple o del osteosarcoma se puede indicar, por ejemplo, por una reducción en el número de células tumorales, metástasis disminuida, una reducción en el tamaño de un tumor sólido o apoptosis o necrosis de un tumor aumentada.

Una composición farmacéutica que comprende una composición de dirección de FGF-18 se puede preparar en forma líquida, en un aerosol o en forma sólida. Las formas líquidas se ilustran mediante soluciones inyectables y suspensiones orales. Las formas sólidas ilustrativas incluyen cápsulas, comprimidos y formas de liberación controlada. La última forma se ilustra mediante bombas miniosmóticas e implantes (Bremer y col., Pharm. Biotechnol. 10: 239 (1997); Ranade, "Implants in Drug Delivery," en Drug Delivery Systems, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 95-123 (CRC Press 1995); Bremer y col., "Protein Delivery with Infusion Pumps," en Protein Delivery: Physical Systems, Sanders y Hendren (eds.), páginas 239-254 (Plenum Press 1997); Yewey y col., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant," en Protein Delivery: Physical Systems, Sanders y Hendren (eds.), páginas 93-117 (Plenum Press 1997)).

Las microesferas de polímero degradable se han diseñado para mantener niveles sistémicos elevados de las proteínas terapéuticas. Las microesferas se preparan a partir de polímeros degradables tales como poli(láctico-co-glicólido) (PLG), polianhídridos, poli (orto ésteres), polímeros de acetato de etil vinilo no biodegradables, en los cuales las proteínas están atrapadas en el polímero (Gombotz y Pettit, Bioconjugate Chem. 6: 332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery," en Drug Delivery Systems, Ranade y Hollinger (eds.), páginas 51-93 (CRC Press 1995); Roskos y Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," en Protein Delivery: Physical Systems. Sanders y Hendren (eds.). páginas 45-92 (Plenum Press 1997); Bartus y col, Science 281: 1161 (1998); Putney y Burke, Nature Biotechnology 16: 153 (1998); Putney, Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 548 (1998)). Las nanoesferas revestidas con polietilenglicol (PEG) también pueden proporcionar vehículos para administración intravenosa de proteínas terapéuticas (véase, por ejemplo, Gref y col, Pharm. Biotechanol. 10: 167 (1997)).

La presente memoria descriptiva describe composiciones de FGF-18 modificadas químicamente, en las cuales un componente de FGF-18 está enlazado a un polímero. Los polipéptidos de FGF-18 preferidos son polipéptidos solubles. Típicamente, el polímero es soluble en agua de forma que el conjugado de FGF-18 no precipite en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. Un ejemplo de un polímero adecuado es uno que se ha modificado para tener un grupo reactivo único, tal como un éster activo para acilación o un aldehído para alquilación. De esta

manera, el grado de polimerización se pude controlar Un ejemplo de un aldehído reactivo es un propionaldehído de polietilenglicol o derivados mono- (C_1-C_{10}) alcoxi o ariloxi del mismo (véase, por ejemplo, Harris, y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.252.714). El polímero puede ser ramificado o no ramificado. Además, se puede usar una mezcla de polímero para producir conjugados de FGF-18.

Los conjugados de FGF-18 usados para terapia pueden comprender restos de polímeros solubles en agua farmacéuticamente aceptables. Los polímeros solubles en agua adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), monometoxi-PEG mono-(C_1-C_{10})alcoxi-PEG, ariloxi-PEG, poli-(*N*-vinil-pirrolidona)PEG, tresil monometoxi PEG, propionaldehído de PEG, *bis* succinimidil carbonato PEG, homopolímeros de propilenglicol, copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico, dextrano, celulosa u otros polímeros basados en carbohidratos. El PEG adecuado puede tener un peso molecular desde aproximadamente 600 hasta aproximadamente 60.000, incluyendo, por ejemplo, 5.000, 12.000, 20.000 y 25.000. Un conjugado de FGF-18 también puede comprender una mezcla de tales polímeros solubles en agua.

Un ejemplo de un conjugado de FGF-18 comprende un resto de FGF-18 y un resto de óxido de polialquilo unido al extremo N del resto de FGF-18. PEG es un óxido de polialquilo adecuado. Como una ilustración, FGF-18 se puede modificar con PEG, un procedimiento conocido como “PEGilación”. La PEGilación de FGF-18 se puede llevar a cabo mediante cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, el documento EP 0 154 316, Delgado y col., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9: 249 (1992), Duncan y Spreafico, Clin. Pharmacokinet. 27: 290 (1994) y Francis y col., Int J Hematol 68: 1 (1998)). Por ejemplo, la PEGilación se puede realizar mediante una reacción de acilación o mediante una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva. En un enfoque alternativo, los conjugados de FGF-18 se forman condensando PEG activo, en el cual un grupo hidroxi o amino terminal de PEG se ha remplazado por un engarce activado (véase, por ejemplo, Karasiewicz y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.382.657).

La PEGilación por acilación típicamente requiere someter a reacción un derivado de éster activo de PEG con un polipéptido de FGF-18. Un ejemplo de un éster de PEG activado es PEG esterificado a *N*-hidroxisuccinimida. Como se usa en el presente documento, el término “acilación” incluye los siguientes tipos de enlaces entre FGF-18 y un polímero soluble en agua: amida, carbamato, uretano y similares. Los procedimientos para preparar FGF-18 PEGilado mediante acilación típicamente comprenderán las etapas de (a) someter a reacción un polipéptido de FGF-18 con PEG (tal como un éster reactivo de un derivado de aldehído de PEG) en condiciones mediante las cuales uno o más grupos PEG se unen a FGF-18 y (b) obtener el producto o productos de reacción. En general, las condiciones de reacción óptimas para reacciones de acilación se determinarán basándose en parámetros conocidos y resultados deseados. Por ejemplo, a mayor proporción de PEG:FGF-18, mayor será el porcentaje de producto de FGF-18 poliPEGilado.

El producto de PEGilación por acilación típicamente es un producto de FGF-18 poliPEGilado, en el que los grupos ε-amino de lisina están PEGilados a través de un grupo de enlace acilo. Un ejemplo de enlace de conexión es una amida. Típicamente, el FGF-18 resultante estará mono-, di- o tri-pegilado a al menos el 95%, aunque algunas especies con grados mayores de PEGilación se pueden formar dependiendo de las condiciones de reacción. Las especies PEGiladas se pueden separar de polipéptidos de FGF-18 no conjugados usando procedimientos de purificación convencionales, tales como diálisis, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y similares.

La PEGilación por alquilación implica generalmente someter a reacción un derivado de aldehído terminal de PEG con FGF-18 en presencia de un agente reductor. Los grupos PEG se pueden unir al polipéptido a través de un grupo -CH_2-NH.

La derivatización a través de alquilación reductora para producir un producto monoPEGilado se aprovecha de la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios disponibles para derivatización. Típicamente, la reacción se realiza a un pH que permite aprovechar las diferencias de pKa entre los grupos ε-amino de los restos de lisina y el grupo α-amino del resto *N*-terminal. Mediante tal derivatización selectiva, se controla la unión de un polímero soluble en agua que contiene un grupo reactivo tal como un aldehído. La conjugación con el polímero ocurre principalmente en el extremo *N* de la proteína sin modificación significativa de otros grupos reactivos tales como los grupos amino de cadena lateral de lisina. La presente memoria descriptiva describe una preparación sustancialmente homogénea de conjugados monopoliméricos de FGF-18.

La alquilación reductora para producir una población sustancialmente homogénea de molécula conjugada de FGF-18 monopolimérica puede comprender las etapas de (a) someter a reacción un polipéptido de FGF-18 con un PEG reactivo en condiciones de alquilación reductora a un pH adecuado para permitir la modificación selectiva del grupo α-amino en el extremo amino del FGF-18, (b) obtener el producto o productos de reacción. El agente reductor usado para la alquilación reductora debe ser estable en solución acuosa y preferentemente ser capaz de reducir únicamente la base de Schiff formada en el procedimiento inicial de alquilación reductora. Los agentes reductores preferidos incluyen borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, dimetilamina borano, trimetilamina borano y piridina borano.

Para una población sustancialmente homogénea de conjugados de FGF-18 monopoliméricos, las condiciones de reacción de alquilación reductora son aquellas que permiten la unión selectiva del resto de polímero soluble en agua al extremo *N* de FGF-18. Tales condiciones de reacción generalmente proporcionan diferencias de pKa entre los grupos aminoácido de lisina y el grupo α-amino del extremo *N*. El pH también influye sobre la proporción de polímero a proteína que se tiene que usar. En general, si el pH es más bajo, se deseará un exceso mayor de polímero a proteína debido a que a menos reactivo el grupo α *N*-terminal, se necesita más polímero para conseguir condiciones óptimas. Si el pH es más elevado, el polímero:FGF-18 no necesita ser tan grande ya que están disponibles más grupos reactivos. Típicamente, el pH caerá dentro del intervalo de 3 a 9 ó 3 a 6.

Otro factor a tener en cuenta es el peso molecular del polímero soluble en agua. En general, a mayor peso molecular del polímero, menor número de moléculas de polímero que se pueden unir a las proteínas. Para reacciones de PEGilación, el peso molecular típico es aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa, aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa o aproximadamente 12 kDa a aproximadamente 25 kDa. La proporción molar de polímero soluble en agua a FGF-18 generalmente estará en el intervalo de 1:1 a 100:1. Típicamente, la proporción molar de polímero soluble en agua a FGF-18 será 1:1 a 20:1 para poliPEGilación y 1:1 a 5:1 para monoPEGilación.

Los procedimientos generales para producir conjugados que comprenden un polipéptido y restos de polímero soluble en agua se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Karasiewicz y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.382.657, Greenwald y col., Patente de los Estados Unidos Nº 5.738.846, Nieforth y col., Clin. Pharmacol. Ther. 59: 636 (1996), Monkarsh y col., Anal. Biochem. 247: 434 (1997)).

Las citotoxinas de polipéptido también se pueden conjugar con un polímero soluble usando los procedimientos anteriores antes o después de la conjugación a un componente de FGF-18. Los polímeros solubles también se pueden conjugar con proteínas de fusión de dirección de FGF-18.

La presente invención contempla composiciones como se definen en las reivindicaciones que comprenden un polipéptido de FGF-18 descrito en el presente documento. Tales composiciones pueden comprender además un vehículo. El vehículo puede ser un vehículo orgánico o inorgánico convencional. Los ejemplos de vehículos incluyen agua, solución tampón, alcohol, propilenglicol, macrogol, aceite de sésamo, aceite de maíz y similares.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> West. James W.

<120> PROCEDIMIENTOS PARA DIRIGIR CÉLULAS QUE EXPRESAN RECEPTOR-2 ó -3 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS

<130> 99-44PC

<160>5

<170> FastSEQ para Windows Versión 3.0

<210> 1

<211> 917

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(621)

<400> 1

```
atg tat tca gcg ccc tcc gcc tgc act tgc ctg tgt tta cac ttc ctg      48
Met Tyr Ser Ala Pro Ser Ala Cys Thr Cys Leu Cys Leu His Phe Leu
 1               5                  10                  15

ctg ctg tgc ttc cag gta cag gtg ctg gtt gcc gag gag aac gtg gac      96
Leu Leu Cys Phe Gln Val Gln Val Leu Val Ala Glu Glu Asn Val Asp
            20                  25                  30

ttc cgc atc cac gtg gag aac cag acg cgg gct cgg gac gat gtg agc     144
Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser
        35                  40                  45

cgt aag cag ctg cgg ctg tac cag ctc tac agc cgg acc agt ggg aaa     192
Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys
    50                  55                  60

cac atc cag gtc ctg ggc cgc agg atc agt gcc cgc ggc gag gat ggg     240
His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly
65                  70                  75                  80
```

```
gac aag tat gcc cag ctc cta gtg gag aca gac acc ttc ggt agt caa      288
Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln
                85                  90                  95

gtc cgg atc aag ggc aag gag acg gaa ttc tac ctg tgc atg aac cgc      336
Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg
            100                 105                 110

aaa ggc aag ctc gtg ggg aag ccc gat ggc acc agc aag gag tgt gtg      384
Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val
        115                 120                 125

ttc atc gag aag gtt ctg gag aac aac tac acg gcc ctg atg tcg gct      432
Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Met Ser Ala
    130                 135                 140

aag tac tcc ggc tgg tac gtg ggc ttc acc aag aag ggg cgg ccg cgg      480
Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg
145                 150                 155                 160

aag ggc ccc aag acc cgg gag aac cag cag gac gtg cat ttc atg aag      528
Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp Val His Phe Met Lys
                165                 170                 175

cgc tac ccc aag ggg cag ccg gag ctt cag aag ccc ttc aag tac acg      576
Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Pro Glu Leu Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr
            180                 185                 190

acg gtg acc aag agg tcc cgt cgg atc cgg ccc aca cac cct gcc          621
Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg Pro Thr His Pro Ala
        195                 200                 205

taggccaccc cgccgcggcc ctcaggtcgc cctggccaca ctcacactcc cagaaaactg    681
catcagagga atatttttac atgaaaaata aggattttat tgttgacttg aaaccccga     741
tgacaaaaga ctcacgcaaa gggactgtag tcaacccaca ggtgcttgtc tctctctagg    801
aacagacaac tctaaactcg tccccagagg aggacttgaa tgaggaaacc aacactttga    861
gaaaccaaag tccttttcc caaaggttct gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ctcgag         917
```

<210> 2

<211> 207

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

<210> 3

<211> 1023

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(624)

<400> 3

```
atg tat tca gcg ccc tcc gcc tgc act tgc ctg tgt tta cac ttt cta      48
Met Tyr Ser Ala Pro Ser Ala Cys Thr Cys Leu Cys Leu His Phe Leu
 1               5                  10                  15

ctg ctg tgc ttc cag gtt cag gtg ttg gca gcc gag gag aat gtg gac      96
Leu Leu Cys Phe Gln Val Gln Val Leu Ala Ala Glu Glu Asn Val Asp
            20                  25                  30

ttc cgc atc cac gtg gag aac cag acg cgg gct cga gat gat gtg agt     144
Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser
        35                  40                  45

cgg aag cag ctg cgc ttg tac cag ctc tat agc agg acc agt ggg aag     192
Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys
    50                  55                  60

cac att caa gtc ctg ggc cgt agg atc agt gcc cgt ggc gag gac ggg     240
His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly
65                  70                  75                  80

gac aag tat gcc cag ctc cta gtg gag aca gat acc ttc ggg agt caa     288
Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln
                85                  90                  95

gtc cgg atc aag ggc aag gag aca gaa ttc tac ctg tgt atg aac cga     336
Val Arg Ile Lys Gly Lys Glu Thr Glu Phe Tyr Leu Cys Met Asn Arg
            100                 105                 110

aaa ggc aag ctc gtg ggg aag cct gat ggt act agc aag gag tgc gtg     384
Lys Gly Lys Leu Val Gly Lys Pro Asp Gly Thr Ser Lys Glu Cys Val
        115                 120                 125

ttc att gag aag gtt ctg gaa aac aac tac acg gcc ctg atg tct gcc     432
Phe Ile Glu Lys Val Leu Glu Asn Asn Tyr Thr Ala Leu Met Ser Ala
    130                 135                 140

aag tac tct ggt tgg tat gtg ggc ttc acc aag aag ggg cgg cct cgc     480
Lys Tyr Ser Gly Trp Tyr Val Gly Phe Thr Lys Lys Gly Arg Pro Arg
145                 150                 155                 160

aag ggt ccc aag acc cgc gag aac cag caa gat gta cac ttc atg aag     528
Lys Gly Pro Lys Thr Arg Glu Asn Gln Gln Asp Val His Phe Met Lys
                165                 170                 175

cgt tac ccc aag gga cag gcc gag ctg cag aag ccc ttc aaa tac acc     576
Arg Tyr Pro Lys Gly Gln Ala Glu Leu Gln Lys Pro Phe Lys Tyr Thr
            180                 185                 190
```

```
aca gtc acc aag cga tcc cgg cgg atc cgc ccc act cac ccc ggc tag      624
Thr Val Thr Lys Arg Ser Arg Arg Ile Arg Pro Thr His Pro Gly  *
        195                 200                 205

gtccggccac actcaccccc ccagagaact acatcagagg aatattttta catgaaaaat    684
aaggaagaat ctctattttt gtacattgtg tttaaaagaa gacaaaaact gaacctaaag    744
tcttgggagg aggggcgata ggattccact gttgacctga accccatgac aaaggactca    804
cacaagggga ccgctgtcaa cccacaggtg cttgcctctc tctaggaggt gacaattcaa    864
aactcatccc cagaggagga cttgaacgag gaaactgcga gaaaccaaag tcctttcccc    924
ccaaaggttc tgaaagcaaa caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa    984
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gggcggccgc tctagagga                          1023
```

<210> 4

<211> 207

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 4

```
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 Ala 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 Ala 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 Gly
195 200 205

<210> 5

<211> 621

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Esta secuencia degenerada codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 2.

<221> variación

<222> (1)...(621)

<223> N es cualquier nucleótido.

<400> 5

```
atgtaywsng cnccnwsngc ntgyacntgy ytntgyytnc ayttyytnyt nytntgytty   60
cargtncarg tnytngtngc ngargaraay gtngayttym gnathcaygt ngaraaycar  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 nmgnccnmgn  480
aarggnccna aracnmgnga raaycarcar gaygtncayt tyatgaarmg ntayccnaar  540
ggncarccng arytncaraa rccnttyaar tayacnacng tnacnaarmg nwsnmgnmgn  600
athmgnccna cncayccngc n                                            621
```

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un polipéptido de FGF-18 o un fragmento funcional del mismo y una citotoxina, para su uso en la dirección de células tumorales que sobreexpresan Receptor-2 de FGF y/o Receptor-3 de FGF,
en la que el polipéptido de FGF-18 o fragmento funcional dirige la composición al Receptor-2 de FGF y/o el Receptor-3 de FGF;
y en la que el polipéptido de FGF-18 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

(i) restos de aminoácidos 28-207 de SEC ID Nº: 2; y
(ii) restos de aminoácidos 28-207 de SEC ID Nº: 4, y

en la que el fragmento funcional de FGF-18 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

(i) restos de aminoácidos 28-196 de SEC ID Nº: 2;
(ii) restos de aminoácidos 28-175 de SEC ID Nº: 2;
(iii) restos de aminoácidos 28-196 de SEC ID Nº: 4; y
(iv) restos de aminoácidos 28-175 de SEC ID Nº: 4; y

y en la que la citotoxina es capaz de causar la muerte de una célula o es capaz de inhibir el crecimiento de una célula.

2. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el polipéptido de FGF-18 comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID Nº: 2 o SEC ID Nº: 4.

3. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la citotoxina se selecciona entre proteínas inactivadoras de ribosomas, inmunomoduladores, fármacos quimioterapéuticos, inhibidores de tirosina quinasa, quelantes, compuestos de boro, compuestos fotoactivos, isótopos radiactivos, ribonucleasas, DNasa 1, enterotoxina-A estafilocócica, toxina de difteria, exotoxina de *Pseudomonas* y endotoxina de *Pseudomonas*.

4. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el polipéptido de FGF-18 es un fragmento funcional de FGF-18 que comprende los restos de aminoácidos 28 a 196 de SEC ID Nº: 2.

5. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el polipéptido de FGF-18 es un fragmento funcional de FGF-18 que comprende los restos de aminoácidos 28 a 175 de SEC ID Nº: 2.

6. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el polipéptido de FGF-18 comprende restos de aminoácidos 28 a 207 de SEC ID Nº: 4.

7. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el polipéptido de FGF-18 es un fragmento funcional de FGF-18 que comprende los restos de aminoácidos 28 a 196 de SEC ID Nº: 4.

8. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el polipéptido de FGF-18 es un fragmento funcional de FGF-18 que comprende los restos de aminoácidos 28 a 175 de SEC ID Nº: 4.

9. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el polipéptido de FGF-18 y la citotoxina están unidos covalentemente entre sí.

10. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la composición comprende un conjugado de FGF-18.

11. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el conjugado de FGF-18 es un conjugado de FGF-18-saporina.

12. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que la composición comprende una proteína de fusión de dirección de FGF-18.

13. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que la proteína de fusión de dirección de FGF-18 comprende una citotoxina seleccionada entre el grupo que consiste en proteína inactivadora de ribosomas de tipo I, proteína inactivadora de ribosomas de tipo II, inmunomodulador, ribonucleasa, DNasa 1, enterotoxina-A estafilocócica, toxina de difteria, exotoxina de *Pseudomonas* y endotoxina de *Pseudomonas*.

14. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que el polipéptido de FGF-18 está unido a la superficie de un liposoma y en la que la citotoxina está encapsulada en el liposoma.

15. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que la citotoxina se selecciona entre el grupo que consiste en proteína inactivadora de ribosomas, inmunomodulador, fármaco quimioterapéutico, inhibidor de tirosina quinasa, quelante, compuesto de boro, agente fotoactivo e isótopo radiactivo.

16. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, para su uso en el tratamiento de cánceres epiteliales.

17. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en la que dichos cánceres epiteliales se seleccionan entre carcinoma de vejiga o carcinoma de cérvix.

18. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, para su uso en el tratamiento de mieloma múltiple, osteosarcoma o carcinoma de tiroides.

19. Una composición que comprende un polipéptido de FGF-18 o un fragmento funcional del mismo y una citotoxina, para su uso en el tratamiento de acondroplasia relacionada con sobreexpresión de Receptor-3 de FGF,
en la que el polipéptido de FGF-18 o fragmento funcional dirige la composición al Receptor-3 de FGF;
y en la que la citotoxina es capaz de causar la muerte de una célula o es capaz de inhibir el crecimiento de una célula;
y en la que el polipéptido de FGF-18 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

(i) restos de aminoácidos 28-207 de SEC ID Nº: 2; y
(ii) restos de aminoácidos 28-207 de SEC ID Nº: 4, y

en la que el fragmento funcional de FGF-18 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

(i) restos de aminoácidos 28-196 de SEC ID Nº: 2;
(ii) restos de aminoácidos 28-175 de SEC ID Nº: 2;
(iii) restos de aminoácidos 28-196 de SEC ID Nº: 4; y
(iv) restos de aminoácidos 28-175 de SEC ID Nº: 4.

20. Una composición que comprende un polipéptido de FGF-18 o un fragmento funcional del mismo y una citotoxina para su uso en el tratamiento de ateroesclerosis relacionada con sobreexpresión de Receptor-2 de FGF y Receptor-3 de FGF,
en la que el polipéptido de FGF-18 o fragmento funcional dirige la composición al Receptor-3 de FGF;
y en la que la citotoxina es capaz de causar la muerte de una célula o es capaz de inhibir el crecimiento de una célula;
y en la que el polipéptido de FGF-18 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

(i) restos de aminoácidos 28-207 de SEC ID Nº: 2; y
(ii) restos de aminoácidos 28-207 de SEC ID Nº: 4, y

en la que el fragmento funcional de FGF-18 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

(i) restos de aminoácidos 28-196 de SEC ID Nº: 2;
(ii) restos de aminoácidos 28-175 de SEC ID Nº: 2;
(iii) restos de aminoácidos 28-196 de SEC ID Nº: 4; y
(iv) restos de aminoácidos 28-175 de SEC ID Nº: 4.

21. Uso de una composición que comprende un polipéptido de FGF-18 o un fragmento funcional del mismo y una citotoxina, para la preparación de un medicamento para dirigirse a células tumorales que sobreexpresan Receptor-2 de FGF y/o Receptor-3 de FGF,
en la que el polipéptido de FGF-18 o fragmento funcional dirige la composición al Receptor-2 de FGF y/o el Receptor-3 de FGF;
y en la que la citotoxina es capaz de causar la muerte de una célula o es capaz de inhibir el crecimiento de una célula;
y en la que el polipéptido de FGF-18 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

(i) restos de aminoácidos 28-207 de SEC ID Nº: 2; y
(ii) restos de aminoácidos 28-207 de SEC ID Nº: 4, y

en la que el fragmento funcional de FGF-18 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

(i) restos de aminoácidos 28-196 de SEC ID Nº: 2;
(ii) restos de aminoácidos 28-175 de SEC ID Nº: 2;
(iii) restos de aminoácidos 28-196 de SEC ID Nº: 4; y
(iv) restos de aminoácidos 28-175 de SEC ID Nº: 4.

22. Uso de una composición que comprende un polipéptido de FGF-18 o un fragmento funcional del mismo y una citotoxina, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de acondroplasia relacionada con sobreexpresión del Receptor-3 de FGF,
en la que el polipéptido de FGF-18 o fragmento funcional dirige la composición al Receptor-3 de FGF;
y en la que la citotoxina es capaz de causar la muerte de una célula o es capaz de inhibir el crecimiento de una célula;
y en la que el polipéptido de FGF-18 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

(i) restos de aminoácidos 28-207 de SEC ID Nº: 2; y
(ii) restos de aminoácidos 28-207 de SEC ID Nº: 4, y

en la que el fragmento funcional de FGF-18 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

(i) restos de aminoácidos 28-196 de SEC ID Nº: 2;
(ii) restos de aminoácidos 28-175 de SEC ID Nº: 2;
(iii) restos de aminoácidos 28-196 de SEC ID Nº: 4; y
(iv) restos de aminoácidos 28-175 de SEC ID Nº: 4.

23. Uso de una composición que comprende un polipéptido de FGF-18 o un fragmento funcional del mismo, y una citotoxina para la preparación de un medicamento para tratar ateroesclerosis relacionada con la sobreexpresión de Receptor-2 de FGF y Receptor-3 de FGF,
en la que el polipéptido de FGF-18 o fragmento funcional dirige la composición al Receptor-2 de FGF y el Receptor-3 de FGF;
y en la que la citotoxina es capaz de causar la muerte de una célula o es capaz de inhibir el crecimiento de una célula;
y en la que el polipéptido de FGF-18 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

(i) restos de aminoácidos 28-207 de SEC ID Nº: 2; y
(ii) restos de aminoácidos 28-207 de SEC ID Nº: 4, y

en la que el fragmento funcional de FGF-18 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

(i) restos de aminoácidos 28-196 de SEC ID Nº: 2;
(ii) restos de aminoácidos 28-175 de SEC ID Nº: 2;
(iii) restos de aminoácidos 28-196 de SEC ID Nº: 4; y
(iv) restos de aminoácidos 28-175 de SEC ID Nº: 4.