

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 305**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03720833 .7**  
96 Fecha de presentación: **09.05.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1572080**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

54 Título: **Variantes de FGF y métodos para usar las mismas**

30 Prioridad:  
**09.05.2002 IL 14956202**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.04.2012**

73 Titular/es:  
**PROCHON BIOTECH LTD.  
P.O. BOX 1482  
76114 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:  
**BOGIN, Oren y  
YAYON, Avner**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 378 305 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Variantes de FGF y métodos para usar las mismas

### CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a mutantes y variantes de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) con propiedades mejoradas y proporciona polipéptidos FGF, composiciones farmacéuticas que comprenden estas variantes y métodos para usar las mismas.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

#### Factores de Crecimiento de Fibroblastos y sus Receptores

10 Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) comprenden una gran familia de polipéptidos conservados evolutivamente implicados en una variedad de procesos biológicos incluyendo morfogénesis, angiogénesis y remodelado de tejidos así como en la patogénesis de numerosas enfermedades (revisado en Omitz, Bioessays 22, 108, 2000). Los diferentes miembros de esta familia estimulan la proliferación de un amplio espectro de células, que varía de origen mesenquimal a epitelial y neuroectodérmico *in vitro* e *in vivo*. Los FGF se expresan en un patrón estricto temporal y espacial durante el desarrollo y tienen papeles importantes en la generación de patrones y en la formación de las extremidades (revisado en Omitz, Bioessays 22, 108, 2000).

15 Los FGF son mitógenos potentes y son críticos en la regulación de muchos procesos biológicos incluyendo la angiogénesis, vasculogénesis, cicatrización de heridas, formación de extremidades, tumorigénesis y supervivencia celular. La respuesta biológica de las células a los FGF está mediada por receptores de la superficie celular específicos con una alta afinidad (Kd 20-500 pM) que poseen una actividad tirosina quinasa intrínseca y que se fosforilan después de la unión de FGF (Coughlin et al. J Biol. Chem. 263, 988, 1988). Se han identificado cinco Receptores del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGFR) distintos, FGFR1-4 son proteínas quinasas transmembrana mientras que FGFR5 parece ser un receptor soluble. El dominio extracelular de los FGFR consiste en tres dominios semejantes a inmunoglobulina (semejantes a Ig) (D1, D2 y D3), un dominio de unión a heparina y una caja ácida. El corte y empalme alternativo de los ARNm de los FGFR genera diferentes variantes de los receptores, incluyendo las formas FGFR3IIIb y FGFR3IIIc, cada una de las cuales tiene una especificidad de ligando única.

20 Otro componente funcional crítico en la activación del receptor es la unión a proteoglicanos tales como heparán sulfato. Los FGF no se unen ni activan los receptores de FGF en células que carecen de heparán sulfato endógeno. Se han propuesto diferentes modelos para explicar el papel de los proteoglicanos heparán sulfato (HSPG) en la señalización de los FGF, incluyendo la formación de un complejo terciario funcional entre FGF, FGFR y un HSPG (Yayon et al., Cell 64, 841, 1991; Faham et al, Curr. Opin. Struct. Biol. 8: 578, 1998).

#### Desarrollo Óseo

35 El proceso de la formación del hueso se inicia por la osificación endocondral y la osificación intramembranosa. La osificación endocondral es el mecanismo fundamental para la formación longitudinal del hueso mediante la cual el cartílago se reemplaza por hueso. Requiere la formación y degradación secuencial de las estructuras cartilaginosas en las placas de crecimiento que sirven como moldes para los huesos en desarrollo. Durante la osificación intramembranosa el hueso se forma directamente en los tejidos conectivos. Ambos procesos requieren la infiltración de osteoblastos y la deposición posterior de la matriz.

40 Se ha mostrado que la ruta de señalización estimulada por activación de los FGFR está implicada en varias etapas del desarrollo de las extremidades y de los huesos. Otros reguladores principales del crecimiento óseo incluyen péptidos natriuréticos (NP), proteínas morfogenéticas óseas (BMP), hormona del crecimiento (GH), factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF), glucocorticoides (GC), hormona tiroidea (TH), hormona paratiroidea (PTH), péptido relacionado con PTH (PTHrP) y Vitamina D.

#### FGFR y Enfermedad

45 Varios defectos de nacimiento que afectan al esqueleto están asociados con mutaciones en los genes que codifican los receptores de FGF, específicamente los síndromes de Crouzon, Pfeiffer, Jackson-Weiss, Apert y Beare-Stevenson (Kan, et. al., Am J Hum Genet 70, 472, 2002). Las mutaciones en FGFR3 son responsables de la acondroplasia, la forma más común del enanismo genético humano (revisado en Vajo et al., Endocr. Rev. 21, 23, 2000). Específicamente, el resultado de la mutación de la acondroplasia es un FGFR3 estabilizado, activado constitutivamente que da lugar a la maduración de los condrocitos restringida en la placa de crecimiento de los huesos largos y a huesos anormalmente acortados.

Los FGFR se han implicado en determinadas malignidades y enfermedades proliferativas. FGFR3 es el oncogén más frecuentemente mutado en el carcinoma de células transicionales (TCC) de la vejiga en el que está mutado en más del 30% de los casos (Cappellen et al., Nature Genet. 23 18, 1999). Dvorakova et al. (Br. J. Haematol: 113, 832, 2001) han mostrado que la isoforma FGFR3IIIc está sobreexpresada en la células blancas de la sangre de los pacientes con leucemia mieloide crónica (CML). Yee et al. (J. Natl. Cancer 92, 1848, 2000) identificaron una mutación en FGFR3 ligada al carcinoma cervical. Recientemente, se ha mostrado que FGFR4 está asociado con los tumores de la pituitaria (Ezzat, et al, J. Clin. Invest. 109, 69, 2002) y la progresión del cáncer de mama (Bange, et al., Cancer Res. 62, 840, 2002).

Por el contrario, se ha mostrado que los FGF y sus análogos son útiles para tratar indicaciones que incluyen heridas (Patentes EEUU Nos. 4.950.483, 5.859.208 y 6.294.359), infarto de miocardio (Patentes EEUU Nos. 4.296.100 y 4.378.347), trastornos esqueléticos (Patentes EEUU Nos. 5.614.496 y 5.656.598) y para remodelar tejido cardiaco (Patente EEUU No. 6.352.971).

Especificidad de Receptor

Teniendo en cuenta el gran número de variantes de FGF y de receptor de FGF, una cuestión importante respecto a la función de los FGF es su especificidad de receptor. Todos los FGF ensayados hasta el momento se unen a FGF-1 (FGF ácido, aFGF) con moderada a alta afinidad, lo que demuestra una redundancia aparente en el sistema de FGF. A diferencia de FGFR1 y FGFR2, se ha encontrado que el tercer subtipo de receptor, FGF3, se une a FGF-8, FGF-17 y FGF-18 con alta afinidad y a FGF-9 con selectividad mejorada. La especificidad también puede conseguirse por proteoglicanos específicos expresados en diferentes tejidos (Ornitz, Bioessays, 22 108, 2000). Se usaron mutagénesis dirigida a sitio y cristalografía de rayos X para estudiar la base de la especificidad de los FGF a sus receptores (Plotnikov et al., Cell 98 641, 1999; Plotnikov et al., Cell 101, 413, 2000; Stauber et al., PNAS 97 49, 2000; Pellegrini et al., Nature, 407. 1029, 2000; Schlessinger et al., Mol Cell, 6 43, 2000).

Variantes de FGF

Todos los miembros de la familia de los FGF comparten un dominio de núcleo de homología de aproximadamente 120 aminoácidos, 28 residuos de aa están altamente conservados y seis son idénticos. Los estudios estructurales de varios FGF identificaron 12 cadenas β antiparalelas cada una adyacente a bucles β que comprenden la región de núcleo, conservada en la familia. El dominio de núcleo comprende los sitios de unión primarios a FGFR y a heparina. Las regiones de unión al receptor son distintas de las regiones de unión a heparina (revisado en Ornitz e Itoh, Gen. Biol. 2, 3005.1, 2001).

Se han hecho intentos para conseguir una especificidad alterada para el receptor de FGF por deleciones o truncamientos de sus ligandos, mediante mutaciones introducidas en determinadas localizaciones en el gen que codifica las proteínas. La solicitud PCT en tramitación con la presente WO 02/36732 describe variantes de FGF que tienen al menos una mutación en el bucle β8-β9, que tienen una especificidad para el receptor incrementada para un subtipo de receptor comparada con el FGF de tipo salvaje correspondiente.

Varios investigadores han demostrado mutantes y variantes de FGF que afectan a la unión al receptor y a la heparina. Kuroda et al., (Bone, 25, 431, 1999) demostraron que un polipéptido FGF-4 de longitud completa y una versión acortada que contiene 134 residuos de aminoácidos presentan una proliferación celular y un efecto en el incremento de la densidad ósea comparables. La forma más corta de FGF-4 ensayada, que contiene sólo 111 residuos de aminoácidos, presentó una actividad limitada en la estimulación del crecimiento.

La Patente EEUU No. 5.998.170 describe una molécula FGF-16 biológicamente activa que tiene de uno a treinta y cuatro aminoácidos delecionados del extremo N terminal o de uno a dieciocho aminoácidos delecionados del extremo C terminal.

La Patente EEUU No. 5.512.460 describe una molécula FGF-9 (factor de activación glial, GAF) que comprende truncamientos en el extremo N terminal y C terminal de 53 aa y 13 aa, respectivamente. La patente EEUU No. 5.571.895 describe una deleción de 54 aa del extremo N terminal de la proteína que da lugar a una proteína de 154 aa que retiene su actividad biológica.

El FGF básico, también conocido como FGF-2, bFGF, prostatina y factor de crecimiento de unión a heparina 2, está altamente conservado entre especies y se ha mostrado que estimula la proliferación de una amplia variedad de tipos de células. La secuencia de FGF-2 se ha descrito en las Patentes EEUU Nos. 4.994.559; 5.155.214; 5.439.818 y 5.604.293. El FGF-2 humano se expresa en varias formas, un precursor de 210 aa, una forma de 155 aa, una forma truncada en el extremo N terminal de 146 aa y varias otras (revisado en Okada-Ban et al., Int J Biochem Cell Biol, 32, 263, 2000).

FGF-2 se ha modificado para alterar las propiedades biológicas y la especificidad de unión. La Patente EEUU No. 5.491.220 describe análogos estructurales que comprenden la sustitución del bucle β9-β10 que tienen propiedades

biológicas y especificidad de unión alteradas. Seno et al. (Eur. J. Biochem. 188, 239, 1990) han demostrado que la eliminación del extremo C terminal, pero no el N terminal, afecta la afinidad de FGF-2 para la heparina.

Bailly et al. (FASEB J, 14, 333, 2000) muestran que las actividades mitogénicas y de diferenciación de FGF-2 pueden disociarse por una mutación puntual en Ser117 (S117A).

5 Se han diseñado superagonistas de FGF-2 humano con sustituciones en uno o más de los aminoácidos siguientes: glutamato 89, aspartato 101 y/o leucina 137 (Patente EEUU No. 6.274.712; obsérvese que la numeración de los aa es según la forma de 146 aa de FGF-2 descrita en Zhang et al, PNAS 88:, 3446, 1991). La patente EEUU No. 6.294.359 describe análogos agonistas y antagonistas de FGF-2 que comprenden sustituciones de aminoácidos en determinados dominios de unión a heparina y receptor pero no enseña cambios en la especificidad del receptor.

10 Las Patentes EEUU Nos. 5.302.702 y 5.310.883 describen una variante recombinante de FGF-2, que tiene la alanina en la posición 3 y la serina en la posición 5 reemplazadas por ácido glutámico, que presenta rendimientos incrementados.

El uso de los FGF y fragmentos de FGF para dirigir agentes citotóxicos se ha descrito en WO 01/39788 y en las Patentes EEUU Nos. 5.191.067; 5.576.288; 5.679.637. Una molécula de FGF mitogénicamente activa proporciona una vía para introducir los agentes seleccionados en la célula.

15 WO 01/46416 describe mutantes de bFGF humano (la forma variante de FGF-2 con 157 aa) con sustituciones en las posiciones 89, 101 ó 137, estando todas estas posiciones fuera del bucle  $\beta$ 8- $\beta$ 9. Se describe que los mutantes presentan una unión/especificidad mejor y una actividad mitogénica incrementada.

20 Springer et al.; Journal of Biological Chemistry, 269:43 (1994) p. 26879-26884 informa sobre las propiedades de varios mutantes de bFGF, que presentan sustituciones en 16 posiciones diferentes. De estos sitios de mutación, 15 están localizados fuera del bucle  $\beta$ 8- $\beta$ 9. Se encontró que todas las variantes investigadas presentaban una afinidad de unión a FGFR disminuida.

25 Zhu et al.; Journal of Biological Chemistry, 270:37 (1991) p. 3441-3445 estudiaron los efectos de las variantes mutadas de bFGF en la afinidad de unión al receptor. Los residuos en las posiciones 96, 106-114 de un FGF-2 de 146 aa se alteraron con el descubrimiento de que una mutación en la posición 96 da lugar a una afinidad de unión reducida mientras que las mutaciones en otras posiciones no alteran la unión de ninguna forma.

30 Los esfuerzos extensos realizados para producir variantes de truncamiento, delección y mutación puntual en FGF han resultado en cambios en la afinidad para los receptores pero no en alteraciones significativas en la especificidad del receptor. Así, existe una necesidad insatisfecha de ligandos altamente activos y selectivos para los diferentes tipos de receptores de FGF, útiles en la estimulación o inhibición selectiva de estos receptores, afrontando de esta manera las manifestaciones clínicas asociadas con las mutaciones mencionadas anteriormente y modulando varias funciones biológicas.

Debe entenderse explícitamente que las variantes conocidas de los FGF están excluidas de la presente invención.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

35 Es un objeto de la presente invención proporcionar variantes de miembros de la familia FGF de factores de crecimiento con una especificidad y/o afinidad de receptor y actividad biológica mejoradas que tienen una mutación en un dominio proteico variable importante.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar variantes de FGF que tienen una selectividad mejorada para la activación del receptor.

40 Es otro objeto más de la presente invención proporcionar variantes de miembros de la familia FGF en las que determinados truncamientos específicos del extremo carboxi y/o amino las hacen ventajosas respecto a que son más estables, con especificidad mejorada para el receptor y/o agentes de direccionamiento mejores.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que comprende variantes útiles para realizar la formación y regeneración de los huesos y cartílagos, cicatrización de heridas, neovascularización y tratamiento de trastornos esqueléticos y proliferativos relacionados con FGFR.

45 Es otro objeto más proporcionar métodos para el uso de las variantes de FGF para preparar medicamentos útiles en la formación y regeneración de los huesos y cartílagos, cicatrización de heridas, neovascularización y tratamiento de trastornos esqueléticos y proliferativos relacionados con FGFR.

Es otro objeto más de la invención proporcionar métodos para el uso de las variantes de FGF para preparar medicamentos útiles para direccionamiento a un tejido particular.

Las nuevas variantes de FGF proporcionadas por esta invención cumplen éstos y otros objetivos.

5 La presente invención está basada en el descubrimiento de que determinadas modificaciones de miembros de la familia FGF de polipéptidos los hacen ventajosos respecto a que tienen una especificidad y/o afinidad incrementada para el receptor y una actividad biológica alterada.

10 Inesperadamente, se encontró que determinadas variantes de FGF de la presente invención presentaban una actividad biológica aumentada además de selectividad de receptor. Los ligandos FGF que tienen una actividad biológica aumentada y una selectividad de receptor incrementada son deseables para el tratamiento de varias afecciones patológicas. La generación de ligandos altamente activos, específicos de receptor sería útil para el propósito de desarrollar medicamentos para usarse en la reparación y regeneración de tejidos, cicatrización de heridas y úlceras, cicatrización de fracturas óseas, osteoporosis y otros trastornos esqueléticos. Además, los ligandos altamente activos específicos de receptor son útiles para el crecimiento, selección, proliferación y diferenciación de determinados tipos celulares incluyendo condrocitos, osteoblastos, células progenitoras y células madre, *in vitro* e *in vivo*.

15 Como se describe en la solicitud de patente internacional en tramitación con la presente WO 02/36732 determinadas modificaciones en la secuencia de polipéptido proporcionan variantes de FGF con especificidad de receptor aumentada que retienen la actividad biológica. Específicamente, las variantes de FGF-9 que comprenden mutaciones en el bucle entre las cadenas  $\beta 8$  y  $\beta 9$  del polipéptido, previamente identificadas como un sitio de unión al receptor conservado y bucles análogos en los demás miembros de la familia FGF, proporcionan inesperadamente una especificidad aumentada de subtipo de receptor.

20 La presente invención se refiere a una variante de FGF que tiene al menos una sustitución de aminoácido en el bucle beta 8-beta 9, caracterizándose dicha variante de FGF en al menos uno de los atributos siguientes comparada con el FGF de tipo salvaje correspondiente: especificidad aumentada para un subtipo de receptor; actividad biológica incrementada mediada por al menos un subtipo de receptor con actividad equivalente o reducida mediada a través de otro subtipo de receptor; afinidad aumentada para al menos un subtipo de receptor; proliferación celular incrementada mediada a través de un subtipo de receptor.

25 La presente invención está dirigida a nuevas variantes de FGF, y en particular a variantes de FGF-2. Ahora se describe inesperadamente que las variantes de FGF-2 que comprenden al menos una mutación en el bucle entre las cadenas  $\beta 8$  y  $\beta 9$ , definido en la presente memoria como el bucle  $\beta 8$ - $\beta 9$ , proporcionan propiedades superagonistas además de especificidad de subtipo de receptor aumentada. Las variantes presentan especificidad de subtipo de receptor aumentada para un subtipo de receptor comparadas con el FGF de tipo salvaje correspondiente, por el incremento de la actividad biológica mediada por al menos un subtipo de receptor mientras retienen o reducen la actividad mediada a través de otro subtipo de receptor. Según una realización preferida de la presente invención, la variante de FGF-2 comprende una sustitución de aminoácido (aa) en la que la asparagina 111 (Asn111, N111) se reemplaza por otro residuo de aminoácido proporcionando de esta manera especificidad de receptor. Estas variantes se indican en la presente memoria como FGF2-N111X, que tienen la SEQ ID NO:1, en la que X es un aminoácido distinto de asparagina. Según una realización preferida actualmente, X es arginina (Arg, R) o Glicina (Gly, G).

30 Las abreviaturas usadas en la presente memoria corresponden al código de aminoácidos de una letra seguido del número que designa la posición del aminoácido en la forma de 155 aa de FGF-2 y el código de aminoácidos de una letra para el aminoácido sustituido. La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

35 Una realización preferida actualmente de la presente invención proporciona una variante de FGF-2, indicada en la presente memoria como FGF2-N111R, que tiene la SEQ ID NO:2, en la que la sustitución de la asparagina 111 por Arginina (Arg, R) muestra una actividad esencialmente igual frente a FGFR3 y FGFR2 con una actividad incrementada para FGFR1.

40 Una realización más preferida actualmente de la presente invención proporciona una variante de FGF-2, indicada en la presente memoria como FGF2N111G, que tiene la SEQ ID NO:3, en la que la sustitución de la asparagina 111 por Glicina (Gly, G) muestra una actividad esencialmente igual frente a FGFR3 con una actividad incrementada para FGR1 y en menor grado frente a FGFR2.

45 Otra realización más preferida actualmente de la presente invención proporciona una variante de FGF-2, indicada en la presente memoria como FGF2(3,SQ)-N111X, que tiene la SEQ ID NO:4, en la que la alanina 3 y la serina 5 se reemplazan por glutamina y la asparagina 11 es otra asparagina. Según una realización preferida actualmente X es arginina (Arg, R) o Glicina (Gly, G). Una realización los más preferida actualmente de la presente invención proporciona una variante de FGF-2, FGF2(3,5Q)-N111G, que tiene la SEQ ID NO:5, en la que la alanina 3 y la serina 5 se

reemplazan por glutamina, y la asparagina 111 se sustituye por Glicina (Gly, G) mostrando una actividad esencialmente igual frente a FGFR3IIIb y FGFR2 con actividad incrementada para FGFR1 y FGFR3IIIc.

Se muestra que las variantes de FGF-2 estimulan la proliferación de condrocitos e inducen la diferenciación de células neuronales y pueden usarse para inducir específicamente la proliferación o diferenciación de células progenitoras y células madre embrionarias o adultas de las que se excluyen las células madre embrionarias humanas.

Se describe una sustitución de aminoácido comparable para FGF-4. FGF-4, también conocido como HST y K-FGF, se expresa como una proteína precursora de 206 aa que tiene una secuencia señal de 27 aa. Una molécula FGF-4, que tiene 179 aa, que comprende al menos una mutación en el bucle  $\beta$ 8- $\beta$ 9 proporciona una variante con actividades biológicas mejoradas. Según una realización preferida actualmente de la presente invención, la variante de FGF-4 comprende una sustitución de aminoácido en la que la asparagina 165 (Asn165, N165) se reemplaza por otro residuo de aminoácido proporcionando de esta manera una actividad biológica aumentada. Estas variantes se indican en la presente memoria como FGF4-N165X, que tienen la SEQ ID NO:6, en la que X es un aminoácido distinto de N (asparagina), preferiblemente R (arginina). Se describe una forma de 152 aa de la proteína que comprende un truncamiento N terminal de 54 aminoácidos además de la sustitución N165X. Estas variantes se indican en la presente memoria como L55M-FGF4-N165X, que tienen la SEQ ID NO:7. La numeración de los aminoácidos de las variantes de FGF-4 es según la forma de 206 aa.

La variante L55M-FGF4-N165X muestra un incremento sustancial en la actividad frente a FGFR3 con una actividad igual frente a FGFR1 y una ligera reducción de la actividad frente a FGFR2.

Preferiblemente, las variantes tienen al menos 2 veces la actividad del FGF-2 nativo en términos de proliferación de células que presentan FGFR inducida por la variante.

La utilidad terapéutica de estas nuevas variantes de FGF-2 y FGF-4 se describe tanto para receptores de FGF normales como anormales, incluyendo pero sin limitarse a regeneración ósea y cicatrización de fracturas óseas, reparación de condrocitos articulares, osteoporosis, cicatrización de heridas, reparación de tejido isquémico, supervivencia de tejido neural y neovascularización.

Según los principios de la presente invención, ahora se describe que mediante la introducción de una única sustitución de aminoácido en el bucle  $\beta$ 8- $\beta$ 9, un polipéptido FGF puede experimentar la interconversión de un mitógeno a un factor de diferenciación, o de un factor de diferenciación a un mitógeno. Esta propiedad inesperada de las nuevas variantes justifica su uso ventajoso en la inducción selectiva de la proliferación y diferenciación de varios tipos celulares. Las variantes de la presente invención pueden usarse *in vitro* o *in vivo*, solas o en combinación para conseguir un efecto deseado de proliferación y/o diferenciación. Además, la introducción de una sustitución de aminoácido en el bucle  $\beta$ 8- $\beta$ 9 de los demás miembros de la familia de polipéptidos FGF puede usarse de manera similar para conseguir la interconversión de un factor de proliferación en un factor de diferenciación y un factor de diferenciación en un factor de proliferación.

Como ejemplos no limitativos, las variantes FGF2-N111X, incluyendo FGF2(3,5Q)-N111X, son mitógenos más potentes que el FGF2 nativo. Alternativamente, ahora se ha mostrado inesperadamente que determinadas variantes de FGF9 que se describieron en la solicitud PCT WO 02/36732 inducen la diferenciación de condrocitos articulares mientras que la proteína FGF-9 de tipo salvaje es tanto un mitógeno débil como un factor de diferenciación débil. Estas variantes se indican en la presente memoria como FGF9-W 144G, que tiene la SEQ ID NO:8 y L37-FGF9-W 144X que tiene la SEQ ID NO:9. En las células neuronales, se muestra que la variante de FGF-2 de la presente invención, FGF2-N111R, es un factor de diferenciación más potente que FGF-2, como se determina por el crecimiento de las neuritas.

Las realizaciones preferidas actualmente según la invención, que comprenden formas variantes de FGF-2, se indican en la presente memoria como sigue:

1) FGF2-N111X (SEQ ID NO:1) que tiene 155 aa en la que Asn (N) en la posición 111 se reemplaza por X, en la que X es un aminoácido distinto de Asn. La sustitución de aminoácido preferida actualmente se selecciona de X= Gly (G) o Arg (R).

2) FGF2 N111G (SEQ ID NO:2) que tiene 155 aa en la que Asn (N) en la posición 111 se reemplaza por Gly (G) o Arg (R).

3) FGF2-N111R (SEQ ID NO:3) que tiene 155 aa en la que Asn (N) en la posición 111 se reemplaza por Arg (R).

4) FGF2(3,5Q)-N111X (SEQ ID NO:4) que tiene 155 aa en la que Ala3 y Ser5 se reemplazan por Gln (Q) y Asn (N) en la posición 111 se reemplaza por X, en la que X es un aminoácido distinto de Asn. La sustitución de aminoácido preferida actualmente se selecciona de X=Gly (G) o Arg (R).

5) FGF2(3,SQ)-N111G (SEQ ID NO:5) que tiene 155 aa en la que Ala3 y Ser5 se reemplazan por Gln (Q) y Asn (N) en la posición 111 se reemplaza por Gly (G). Las formas variantes de FGF-4 se indican como sigue.

6) FGF4-N111X (SEQ ID NO:11) que tiene 179 aa y la Asn (N) en la posición 165 se reemplaza por X. La sustitución de aminoácido preferida actualmente es X=Gly (G).

5 7) LSSM-FGF4-N111X (SEQ ID NO:12) que tiene 152 aa en la que 54 aminoácidos están truncados del extremo N terminal, la Leu (L) en la posición 55 se reemplaza por una Met (M) y Asn (N) en la posición 165 se reemplaza por X. La sustitución de aminoácido preferida actualmente es X=Gly (G).

Además, ahora se muestra que determinadas variantes descritas en la solicitud PCT WO 02/36732 son eficaces en la inducción selectiva de la proliferación y diferenciación de las células. Las secuencias de aminoácidos de las variantes se indican en la presente memoria como sigue:

8) W144X-FGF9 (SEQ ID NO:8)

9) L37M-W144X-FGF9 (SEQ ID NO:9)

15 El foco de los receptores de FGF como receptores implicados en determinados cánceres ha planteado la necesidad insatisfecha de ligandos específicos para estos receptores; preferiblemente un ligando que se une a un FGFR con alta especificidad y que no se une sustancialmente a los demás FGFR. El ligando con alta especificidad es capaz de dirigirse a un receptor en la superficie de un tejido u órgano específico. Los polipéptidos de direccionamiento son proteínas de fusión, quimeras, proteínas híbridas o conjugados.

20 Inesperadamente, se ha encontrado que determinadas variantes de FGF de la presente invención retienen la afinidad de unión a receptores específicos de FGF a la vez que presentan una actividad biológica mediada por receptor reducida, proporcionando variantes útiles para el direccionamiento de agentes bioactivos incluyendo polipéptidos, péptidos y análogos y fármacos a un tejido específico. Efectivamente, los polipéptidos variantes son útiles como vehículos que pueden usarse para la administración y concentración específica de sitio del agente bioactivo a células, tejidos u órganos en los que se desea efectuar un efecto terapéutico.

25 Determinadas modificaciones en los FGF generan polipéptidos con propiedades mejoradas incluyendo alta afinidad de unión, actividad biológica modificada tal como estimulación reducida de la proliferación y especificidad de receptor aumentada.

30 Según los principios de la presente invención, ahora se describe que las mutaciones en el bucle entre las cadenas  $\beta 8$  y  $\beta 9$  de los FGF, definidas en la presente memoria como  $\beta 8$ - $\beta 9$ , que se había determinado previamente que comprendía un sitio de unión principal conservado que se había demostrado que interactuaba con los receptores de FGF, y bucles análogos en los demás miembros de la familia FGF, proporcionan especificidad y o afinidad de subtipo de receptor aumentada. Según los principios de la presente invención, ahora se describe que las variantes truncadas de FGF presentan una actividad reducida en la estimulación del crecimiento de células que presentan receptor respecto a su factor de crecimiento parental de tipo salvaje de longitud completa correspondiente y son particularmente útiles para el direccionamiento de agentes bioactivos a células, tejidos u órganos. Las variantes truncadas de la invención que más se prefieren pueden comprender además al menos una mutación en al menos un sitio de unión al receptor y son más selectivas de receptor que el factor de crecimiento parental de tipo salvaje de longitud completa correspondiente. En determinadas indicaciones, incluyendo algunas enfermedades esqueléticas y proliferativas, es ventajoso usar ligandos inactivos para el direccionamiento con el fin de evitar la activación de los receptores cuando la activación de dichos receptores puede hacer avanzar el estado patológico. Según un aspecto de la presente invención, dichas variantes de FGF en las que el extremo N terminal y/o C terminal está truncado de manera que el truncamiento se extiende cerca de o en el dominio de núcleo proporcionan moléculas con actividad biológica reducida útiles como un antagonista de FGFR o para el direccionamiento de agentes bioactivos a células o tejidos u órganos específicos. Una variante de FGF-9 que tiene un truncamiento en el N terminal de 63 aminoácidos, se indica en la presente memoria como R64M-FGF9, que tiene la SEQ ID NO: 10. La variante R64M-FGF9 se describió en la solicitud de patente PCT en tramitación con la presente WO 02/36732 como la variante más corta de FGF-9 que tiene actividad biológica y una especificidad de unión mejorada frente a FGFR3. La presente invención se refiere a propiedades beneficiosas adicionales de la variante R64M-FGF9, específicamente para usarse como una molécula de direccionamiento específica para FGFR3.

50 Una variante que tiene un truncamiento de 63 aminoácidos y un truncamiento de 18 aminoácidos en el extremo C terminal se indica en la presente memoria como FGF9-2, que tiene la SEQ ID NO:11. La variante de FGF9-2 se describió en la solicitud de patente PCT en tramitación con la presente WO 02/36732 como una variante de FGF-9 que tiene actividad biológica reducida. La presente invención describe propiedades beneficiosas adicionales inesperadas de la variante FGF9-2, específicamente para usarse como una molécula de direccionamiento específica para FGFR3.

Se proporciona un FGF que comprende una sustitución de al menos un residuo en un sitio de unión principal de la molécula al receptor conjuntamente con un truncamiento del extremo N y/o C terminal. Una sustitución de aminoácido según la invención afecta la unión de la variante a un receptor pero no a otro proporcionando de esta manera una base para mutantes de FGF específicos de receptor.

5 La variante de FGF preferida tienen especificidad aumentada para un subtipo de receptor comparada con el FGF parental de tipo salvaje correspondiente, disminuyendo la actividad biológica mediada por al menos un subtipo de receptor mientras retiene la actividad mediada a través de otro subtipo de receptor. La molécula truncada presenta una actividad biológica reducida mientras que mantiene alta afinidad por el receptor.

10 En un ejemplo no limitativo es posible disminuir la actividad biológica que resulta de la unión de FGF-9 a FGFR1 mientras se retiene la unión a FGFR3. Preferiblemente, la unión a FGFR3 es una unión de alta afinidad con actividad biológica reducida. Más preferiblemente, la unión a FGFR3 es una unión de alta afinidad sin actividad biológica.

15 Preferiblemente, la mutación resulta en una sustitución del triptófano 144 (W144) del bucle  $\beta 8$ - $\beta 9$  como se numera según el FGF-9 parental de tipo salvaje o un aminoácido en la posición correspondiente del bucle  $\beta 8$ - $\beta 9$  de un FGF. Más preferiblemente, la mutación es en el bucle  $\beta 8$ - $\beta 9$  de FGF-2, FGF o FGF-9. Aquí describimos una especificidad de receptor incrementada por una mutación puntual en FGF-9 que resulta en una sustitución de aminoácido en el bucle entre las cadenas  $\beta 8$  y  $\beta 9$ . Las variantes se truncan además en el extremo N o C terminal o ambos extremos en el que la actividad biológica se reduce pero la afinidad por el receptor no se ve afectada sustancialmente.

20 FGF-9 comprende una sustitución de aminoácido en la que Trp144 (W144) se reemplaza por otros residuos de aminoácidos proporcionando especificidad de receptor y truncamiento o truncamientos N terminales y/o C terminales que reducen la actividad biológica y retienen la afinidad para el receptor. La introducción de glicina en la posición 144 de FGF-9 suprime su unión a FGFR1, mientras retiene una afinidad significativa frente a FGFR3 y en menor grado, FGFR2. La variante R64M-FGF9 comprende además una sustitución W144. Esta variante se indica en la presente memoria como R64M-FGF9-W 144X, que tiene la SEQ ID NO:10, en la que Trp144 se sustituye con residuos de aminoácidos incluyendo, pero no limitados a glicina (G), arginina (R), valina (V) o glutamato (E) que suprimen la unión a FGFR1  
25 mientras retienen la unión de alta afinidad a FGFR3 y una menor afinidad para FGFR2. Estas variantes, que tienen una actividad biológica reducida y alta afinidad para el receptor se indican en la presente memoria como R64M-FGF9-W144G, R64M-FGF9-W144R, R64M-FGF9-W144V y R64M-FGF9-W144E.

30 La variante FGF9-2 comprende además una sustitución W144. Esta variante se indica en la presente memoria como FGF9-2-W144X, que tiene la SEQ ID NO:12. La variante FGF9-2 comprende además una sustitución de aminoácido en la que Trp144, o la posición equivalente en otros FGF, se sustituye con residuos de aminoácidos que incluyen, pero no están limitados a, glicina (G), arginina (R), valina (V) o glutamato (E) que suprime la unión a FGFR1 mientras retiene la unión de alta afinidad a FGFR3 y una menor afinidad para FGFR2. Estas variantes, que tienen actividad biológica reducida y alta afinidad de receptor se indican en la presente memoria como FGF9-2-W144G, FGF9-2-W144R, FGF9-2-W144V y FGF9-2-W144E.

35 Otro aspecto proporciona una sustitución de otro residuo en el bucle  $\beta 8$ - $\beta 9$ , concretamente el aminoácido adyacente a Trp144, asparagina 143 (Asn143 o N143) de FGF-9, o la posición equivalente en otros FGF, por otro residuo de aminoácido incluyendo, pero no limitado a serina, para disminuir la unión a FGFR1 mientras retiene la unión de alta afinidad a FGFR3 y una menor afinidad para FGFR2. Además, los truncamientos reducen la actividad biológica y retienen la capacidad de unión del FGF. Estas variantes se indican en la presente memoria como R64M-FGF9-N143X y F9-2-N143X, que tienen las SEQ ID NOS:14 y 15, respectivamente, en las que X es distinto de asparagina (N) y más preferiblemente serina (S).  
40

Las variantes adicionales comprenden polipéptidos análogos de FGF-2, en particular variantes que comprenden el dominio de núcleo de 120 aa y truncamientos tanto en el extremo N terminal como C terminal.

45 Una realización preferida actualmente de la presente invención proporciona una composición útil para el direccionamiento de agentes bioactivos a células, tejidos u órganos particulares. Una realización más preferida actualmente comprende un conjugado covalente o recombinante quimérico (proteína de fusión) que comprende una variante de FGF unida a un agente bioactivo. Esta unión puede ser a través de un enlace directo, incluyendo un enlace peptídico, y el agente bioactivo puede ser un marcaje detectable, fármaco citotóxico, un compuesto farmacéuticamente activo o compuesto de diagnóstico. Éstos incluyen, pero no están limitados a, péptidos y análogos de péptidos, peptidomiméticos, oligopéptidos, proteínas, apoproteínas, glicoproteínas, antígenos y anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, receptores y otras proteínas de membrana, aptámeros, enzimas, coenzimas, inhibidores de enzimas incluyendo inhibidores de tirosina quinasa, aminoácidos y sus derivados, hormonas, lípidos, fosfolípidos, toxinas y fármacos anticancerosos.  
50

La composición comprende quimeras o conjugados de R64M-FGF9-W144G o FGF9-2-W144G unidos a un péptido o un análogo de péptido.

5 Una realización preferida actualmente de la presente invención es una composición útil para incrementar el tamaño de una placa de crecimiento óseo en hueso anormal. Una realización más preferida actualmente de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende como un ingrediente activo un conjugado covalente o recombinante quimérico que comprende una variante de FGF unida a un agente bioactivo. Esta unión puede ser a través de un enlace directo, incluyendo un enlace peptídico, y el agente bioactivo puede ser un marcaje detectable, fármaco citotóxico, un compuesto farmacéuticamente activo o compuesto de diagnóstico. Éstos incluyen, pero no están limitados a, los agentes bioactivos listados anteriormente. El hueso anormal es un hueso displásico, la variante de FGF se selecciona de R64M-FGF9 o FGF9-2 y el agente bioactivo es un péptido natriurético. En otra realización lo más preferida actualmente, la variante de FGF se selecciona de R64M-FGF9-W144G o FGF9-2-W144G y el agente bioactivo se selecciona de péptido natriurético de tipo C (CNP) o un análogo de éste.

15 Se proporcionan variantes útiles para regular la actividad de un receptor de FGF mutado. Una realización preferida actualmente de la presente invención es el uso de una variante de la invención que actúa como un antagonista para reducir la actividad de un receptor mutado en enfermedades y trastornos relacionados con FGFR. Una realización más preferida actualmente de la presente invención es el uso de una variante de la invención que actúa como un antagonista para reducir la actividad de un FGFR3 mutado en enfermedades y trastornos relacionados con FGFR3, incluyendo acondroplasia, displasia tanatofórica y enfermedades proliferativas incluyendo carcinoma de células transicionales (TCC) de la vejiga, cáncer de mama y mieloma múltiple.

20 Las formas variantes de FGF se indican en la presente memoria como sigue:

10) R64M-FGF9 (SEQ ID NO:10). La secuencia de esta variante se ha descrito en la solicitud PCT WO 02/36732.

25 11) R64M-FGF9-W144X (SEQ ID NO:11) que tiene 145aa con un truncamiento de 63 aminoácidos del N terminal, la Arg (R) en la posición 64 de FGF-9 parental de tipo salvaje reemplazada por Met (M) y en la que X en la posición 144 del FGF-9 parental de tipo salvaje es distinto de Trp (W) y más preferiblemente se selecciona de Glicina (G), Arg (R), Val (V) o Glu (E).

12) FGF9-2 (SEQ ID NO:12). La secuencia de esta variante se ha descrito en la solicitud PCT en tramitación con la presente WO 02/36732.

30 13) FGF9-2-W 144X (SEQ ID NO:13) que tiene 127aa con un truncamiento de 63 aminoácidos del N terminal, la Arg (R) en la posición 64 de FGF-9 parental de tipo salvaje reemplazada por Met (M) y un truncamiento de 18 aminoácidos del C terminal, la Pro (P) en la posición 191 del FGF-9 parental de tipo salvaje reemplazada por una señal de terminación y en la que X en la posición 144 de FGF-9 es distinta de Trp (W), en la que la sustitución de aminoácido preferida actualmente se selecciona de Gly (G), Arg (R), Val (V) o Glu (E).

35 14) R64M-FGF9-N143X (SEQ ID NO:14) que tiene 145aa con un truncamiento de 63 aminoácidos del N terminal, la Arg (R) en la posición 64 de FGF-9 parental de tipo salvaje reemplazada por Met (M) y en la que X en la posición 143 del FGF-9 parental de tipo salvaje es distinta de Asn (N) y más preferiblemente Ser (S).

15) FGF9-2-N143X (SEQ ID NO:15) que tiene 127aa con un truncamiento de 63 aminoácidos del N terminal, la Arg (R) en la posición 64 de FGF-9 parental de tipo salvaje reemplazada por Met (M) y un truncamiento de 18 aminoácidos del C terminal, la Pro (P) en la posición 191 del FGF-9 parental de tipo salvaje reemplazada por una señal de terminación y en la que X en la posición 143 de FGF-9 es distinta de Asn (N), y más preferiblemente Ser (S).

40 Una realización preferida actualmente de la presente invención es un uso para el direccionamiento de agentes bioactivos a células, tejidos u órganos particulares. En una realización más preferida actualmente una composición que comprende una molécula de FGF en complejo que comprende un conjugado covalente o recombinante quimérico que comprende una variante de FGF unida a un agente bioactivo se administra a un paciente que la necesita. La composición comprende un R64M-FGF9-W144G o FGF9-2-W144G y quimeras o conjugados de péptidos o análogos de péptidos.

45 Una realización preferida actualmente de la presente invención es un uso para incrementar el tamaño de una placa de crecimiento óseo en hueso anormal por tratamiento del hueso con una composición que comprende una molécula de FGF en complejo con un conjugado covalente o recombinante quimérico que comprende una variante de FGF unida a un agente bioactivo, que comprende además un diluyente, vehículo y/o estabilizador aceptable farmacéuticamente. El hueso anormal es un hueso displásico, la variante de FGF es R64M-FGF9-W144G o FGF9-2-W144G y el agente bioactivo es un péptido natriurético de tipo C (CNP) o un análogo de éste. La variante de FGF está en 5' respecto a CNP, en otro aspecto la variante de FGF está en 3' respecto a CNP. Debe entenderse que los análogos de CNP incluyen el péptido CNP(1-22) de 22 aa, un péptido activo CNP(5-22) de 17 aa o una variante activa de éstos.

Las secuencias de aminoácidos de las moléculas de FGF en complejo preferidas, seguidas de las secuencias de polinucleótido, se presentan en la presente memoria como sigue:

16) FGF9-2-W144X-CNP(1-22) (SEQ ID NO:16) que tiene 152 aa que comprende SEQ ID NO:16, unida a una molécula de CNP de 22 aa o un derivado estable de éste a través de un conector polipeptídico.

- 5 17) CNP(1-22)-FGF9-2-W144X (SEQ ID NO:17) que tiene al menos 157 aa que comprende una molécula de CNP(1-22) o un derivado estable de éste, unido a SEQ ID NO:16 a través de un conector polipeptídico.

10 Debe entenderse que una molécula en complejo comprende una variante de FGF que tiene las SEQ ID NOS:12-15 unida a un agente bioactivo como el componente N terminal o el componente C terminal del conjugado covalente o recombinante quimérico. Debe entenderse además que un conector puede ser un conector polipeptídico tal como los conocidos en la técnica. Una realización preferida actualmente comprende una variante de FGF que tiene las SEQ ID NOS:12-15 unida a un agente bioactivo como el componente N terminal o el componente C terminal a través de un conector de poliglicina de 2-20 aminoácidos.

Las secuencias de polinucleótido correspondientes a las nuevas variantes se describen en la presente memoria como sigue:

- 15 18) FGF2-N111X ADN (SEQ ID NO: 18)

19) FGF2-N-111G ADN (SEQ ID NO:19)

20) FGF2-N111R ADN (SEQ ID NO:20)

21) FGF2(3,5Q)-N111X ADN (SEQ IDNO:21).

22) FGF2(3,SQ)-N111G ADN (SEQ ID NO:22).

- 20 23) FGF4-N111X ADN (SEQ ID NO:23)

24) L55M-FGF4-N165X ADN (SEQ ID NO:24).

25) R64M-FGF9 ADN (SEQ ID NO:25) descrita en la solicitud PCT WO 02/36732.

26) R64M-FGF9-W144X ADN (SEQ ID NO:26)

27) FGF9-2 ADN (SEQ ID NO:27) descrita en la solicitud PCT WO 02/36732.

- 25 28) FGF9-2-W 144X ADN (SEQ ID NO:28).

29) R64M-FGF9-N143X ADN (SEQ ID NO:29).

30) FGF9-2-N143X ADN (SEQ ID NO:30).

31) FGF9-2-W144X-CNP(1-22) ADN (SEQ ID NO:31)

32) CNP(1-22)-FGF9-2-W144X ADN (SEQ ID NO:32)

- 30 Se proporciona una composición farmacéutica que comprende como un ingrediente activo al menos una variante que tiene las SEQ ID NOS:1-17 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 Las variantes que tienen las SEQ ID NOS:1-7 se formulan para proporcionar composiciones farmacéuticas útiles para estimular o acelerar la reparación o regeneración de hueso endocondral, hueso intramembranoso, cartílago articular, defectos espinales y otros trastornos esqueléticos y para estimular o acelerar la neovascularización en indicaciones que incluyen quemaduras, cortes, laceraciones, úlceras por presión, úlceras tales como las observadas en pacientes diabéticos, reparación y regeneración de tejidos, incluyendo tejido esquelético, nervioso y vascular. Según un aspecto más adicional de la presente invención es un método para estimular o acelerar el crecimiento óseo o la reparación del cartílago que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica en combinación con un dispositivo de matriz. La matriz puede ser sintética o natural. En un ejemplo no limitativo, la matriz es una matriz de proteína plasmática o una matriz de fosfato de calcio. Así, el presente método puede usarse para estimular la regeneración y reparación de tejidos incluyendo cartílago, hueso y cicatrización de heridas.

40 Se describe que las composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una variante de FGF de la presente invención que tiene las SEQ ID NOS:10-17 tienen utilidad terapéutica mejorada en enfermedades y trastornos asociados

con los receptores de FGF. La utilidad terapéutica de estas nuevas variantes se describe en enfermedades que implican receptores de FGF tanto normales como anormales, incluyendo pero sin limitarse a trastornos esqueléticos incluyendo pero sin limitarse a Acondroplasia, Hipocondroplasia y osteoporosis y enfermedades y trastornos proliferativos.

5 Las variantes que tienen las SEQ ID NOS:1-9 tienen una utilidad mejorada en la inducción selectiva de la proliferación y diferenciación de las células. El uso de estas variantes se describe para el tratamiento *in vitro* o *in vivo* de las células.

10 Un aspecto adicional es un método para estimular o acelerar la neovascularización que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una variante de la presente invención y opcionalmente un dispositivo sin matriz o con matriz. La matriz puede ser sintética o natural. En un ejemplo no limitativo, la matriz es una matriz de proteína plasmática o una matriz de fosfato de calcio. Así, el presente método puede usarse para estimular la regeneración y reparación de tejidos incluyendo cartílago, hueso y cicatrización de heridas.

#### DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La Figura 1 representa el alineamiento de los genes de FGF.

Las Figuras 2A y 2B muestran la actividad proliferativa de FGF2-N111R.

15 Las Figuras 3A y 3B muestran la actividad mitogénica inducida por la variante de FGF-2, FGF2(3,5Q)-N111G en células FDCP transfectadas con FGFR.

La Figura 4 representa la actividad mitogénica de la variante de FGF-2, FGF2(3,SQ)-N111G en células FDCP transfectadas con FGFR como una función de la concentración de heparina.

20 La Figura 5 muestra la actividad mitogénica inducida por la variante de FGF-4, FGF4-L55M-N165R en células FDCP transfectadas con FGFR.

La Figura 6 representa el patrón de electroforesis de variantes de FGF-9 en SDS-PAGE, la figura 5B muestra la actividad mitogénica reducida de las variantes truncadas de FGF-9.

La Figura 7 muestra los resultados de un ensayo de unión competitiva de variantes de FGF-9.

25 Las Figuras 8A y 8B muestran dos exposiciones de la distribución de la variante <sup>125</sup>I-FGF9-2-W144G en la placa de crecimiento de ratón después de administración IP. La Figura 8A muestra la distribución de la señal mientras que la Figura 8B muestra el contorno de las células.

La Figura 9 representa una curva de proliferación de condrocitos articulares humanos crecidos en presencia de las variantes de la presente invención.

30 Las Figuras 10A-10E muestran el fenotipo de condrocitos articulares humanos crecidos en presencia de las variantes de la presente invención.

Las Figuras 11A-11C muestran el fenotipo de condrocitos articulares porcinos crecidos en presencia de las variantes de la presente invención.

Las Figuras 12A-12C muestran el fenotipo de condrocitos articulares porcinos crecidos en presencia de las variantes de la presente invención, por tinción con faloidina.

35 Las Figuras 13A-13C muestran la expresión de la proteína colágeno de tipo II en un cultivo de sedimento de condrocitos porcinos.

Las Figuras 14A-14D muestran la expresión de proteoglicano en cultivo de sedimento de condrocitos articulares porcinos, según se determina por tinción con azul de toluidina.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

40 Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) constituyen una gran familia de polipéptidos estructuralmente relacionados que unen heparina, que se expresan en una amplia variedad de células y tejidos. Globalmente, los FGF comparten entre 17-72% de homología en la secuencia de aminoácidos y un alto nivel de similitud estructural. Un núcleo de homología de aproximadamente 120 aminoácidos está altamente conservado y se ha identificado en todos los miembros de la familia. Los residuos del dominio del núcleo interaccionan tanto con FGFR como con heparina. Se han  
45 identificado doce cadenas β antiparalelas en la estructura del núcleo, denominadas β1 a β12, unidas entre sí por bucles de longitudes variables, organizadas en una simetría de trébol interna. El alineamiento de las secuencias y la localización

y longitud de las cadenas  $\beta$  para FGF-1 a FGF-19 se representa en la Figura 6 de Plotnikov et al. (Cell 101, 413, 2000). La secuencia de aminoácidos de la estructura del núcleo de los FGF conocidos se representa en la presente memoria en la Figura 1.

5 Según los principios de la presente invención, ahora se describe que las variantes de FGF de la presente invención que comprenden sustituciones de aminoácidos en el bucle entre las cadenas  $\beta 8$  y  $\beta 9$  de la estructura del núcleo rinden variantes con propiedades mejoradas, además de especificidad alterada frente a los FGFR. En determinadas realizaciones, la sustitución de aminoácidos rinde variantes activas con propiedades superagonistas. Las variantes así obtenidas tendrán propiedades mejoradas en términos de especificidad de receptor, estabilidad o afinidad además de actividad mitogénica o potencial de diferenciación aumentados. Además, las variantes así obtenidas pueden comprender 10 además modificaciones adicionales en o fuera del bucle  $\beta 8$ - $\beta 9$  proporcionando variantes con estabilidad, solubilidad o rendimiento mejorados.

Los ligandos FGF con actividad biológica aumentada y selectividad de receptor incrementada son muy necesarios para el tratamiento de varias afecciones patológicas. Las variantes serán útiles para el propósito de investigación así como para el propósito de desarrollar posibles medicamentos para usarse en la reparación y regeneración de tejidos, cicatrización de heridas y úlceras, trastornos óseos y del cartilago, cicatrización de fracturas óseas, osteoporosis y otros 15 trastornos esqueléticos.

Además, se describen variantes de FGF que retienen la afinidad de unión para receptores de FGF específicos sin estimular la actividad biológica mediada por el receptor, proporcionando variantes de FGF útiles como antagonistas del receptor o para dirigir agentes bioactivos incluyendo polipéptidos, péptidos y análogos y fármacos a tejidos específicos. Las variantes con actividad reducida son útiles como antagonistas de un receptor específico en indicaciones relacionadas con la activación anormal de FGFR. Además, los polipéptidos variantes son útiles como vehículos que pueden usarse para la administración y concentración específica de sitio del agente bioactivo a células, tejidos u órganos en los que se desea que se produzca el efecto terapéutico. Determinadas modificaciones rinden polipéptidos con propiedades mejoradas incluyendo alta afinidad de unión, actividad biológica reducida y especificidad de receptor 20 aumentada, proporcionando así moléculas terapéuticamente beneficiosas para tratar trastornos esqueléticos, incluyendo pero sin limitarse a, acondroplasia, y enfermedades proliferativas incluyendo, pero sin limitarse a, mieloma múltiple, carcinoma de células transicionales (TCC) de la vejiga, cáncer de mama y carcinoma cervical. Los polipéptidos de direccionamiento son proteínas de fusión, recombinantes quiméricos, proteínas híbridas o conjugados. Por conveniencia, determinados términos empleados en la especificación, ejemplos y reivindicaciones se describen aquí.

30 Tal y como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones, el término "FGFR" indica un receptor específico para FGF que es necesario para transducir la señal ejercida por FGF al interior de la célula, que comprende típicamente un dominio extracelular de unión al ligando, una única hélice transmembrana y un dominio citoplásmico que contiene actividad tirosina quinasa. El término "FGFR" incluye las versiones solubles que comprenden el dominio extracelular y carecen de los dominios transmembrana y quinasa y otras variantes de éstos.

35 Tal y como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones, el término "FGF inactivo" indica una molécula o variante de FGF que después de unirse a un receptor de FGF induce la estimulación de la mitogénesis como mucho la mitad de la de las mismas células expuestas a la molécula de FGF parental de tipo salvaje, según se mide en ensayos basados en células conocidos en la técnica. Más preferiblemente, la variante induce la estimulación de la mitogénesis como mucho un cuarto de la de las mismas células expuestas a la molécula de FGF parental de tipo salvaje.

40 Tal y como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones, el término "especificidad de receptor de FGF" indica el hecho de que una determinada molécula de FGF se une a un receptor particular de FGF e induce una respuesta biológica mediada por el receptor a una concentración al menos el doble de alta que su actividad después de unirse a otro FGFR. Las respuestas biológicas se miden por métodos conocidos en la técnica.

45 El término "afinidad" tal y como se usa en la presente memoria, indica la capacidad de un ligando o variante de dicho ligando para unirse a un receptor específico. Las modificaciones de un ligando que estabilizan la conformación favorable o aumentan las interacciones de las cadenas laterales de los aminoácidos resultarán en una afinidad para el receptor incrementada mientras que las que desestabilizan la conformación favorable o disminuyen las interacciones de las cadenas laterales de los aminoácidos resultarán en una afinidad para el receptor disminuida. Se estableció un ensayo de unión competitiva para determinar la afinidad relativa de las variantes de FGF comparada con la del FGF parental de tipo salvaje frente a un receptor de FGF. Las variantes que tienen una alta afinidad para un receptor de FGF y actividad mitogénica reducida se designan como antagonistas potenciales de FGF. 50

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "factor de diferenciación" se refiere a una sustancia, en particular un polipéptido, que determina el destino que va a seguir una célula después de la exposición a esa sustancia, sola o en combinación con otras sustancias. En un ejemplo no limitativo, la diferenciación se determina por cambios morfológicos y 55 fenotípicos o por cambios bioquímicos o moleculares.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "mitógeno" o "factor de proliferación" se refiere a una sustancia que induce un incremento del número de células.

5 Tal y como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones, el término "núcleo", "dominio del núcleo" o "estructura del núcleo" indica una región de homología de aproximadamente 120 aminoácidos que se encuentra en todos los FGF nativos. Veintiocho residuos de aminoácidos están altamente conservados y seis son idénticos. Se han identificado doce cadenas  $\beta$  antiparalelas estructuralmente conservadas en todos los FGF. El dominio del núcleo comprende los sitios de unión a FGFR y heparina.

10 Tal y como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones, el término "beta8-beta9" o "bucle  $\beta$ 8- $\beta$ 9" se refiere al bucle de 2 a 5 residuos de aminoácidos que se encuentra entre la octava y la novena cadenas  $\beta$  plegadas de la estructura del núcleo como se describe en la presente memoria.

Tal y como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones, los términos "extremo amino" y "extremo N" de un polipéptido pueden usarse indistintamente. De manera similar, los términos "extremo carboxi" y "extremo C" pueden usarse indistintamente.

15 "Secuencia de ácido nucleico" o "polinucleótido" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a un oligonucleótido o nucleótido y fragmentos o partes de éstos, y a ADN o ARN de origen genómico o sintético que pueden ser mono o bicatenarios y representan la cadena con sentido o antisentido. De manera similar, "secuencia de aminoácidos" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a una secuencia de oligopéptido, péptido, polipéptido o proteína, y fragmentos o partes de éstos, y a moléculas naturales, sintéticas o recombinantes. No se pretende que los términos listados en la presente memoria limiten la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos completa, de tipo salvaje asociada con la molécula de proteína citada. El término "variante" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a una secuencia de polipéptido que posee alguna propiedad estructural modificada respecto a la proteína de tipo salvaje o parental. Por ejemplo, la variante puede estar truncada en el extremo amino o carboxi o en ambos extremos o puede tener aminoácidos delecionados, insertados o sustituidos. Puede ser antagonista o agonista respecto a las propiedades normales de la proteína nativa. Un antagonista se define como una sustancia que se une a pero no activa una respuesta mediada por receptor. Un agonista se define como una sustancia que induce una respuesta mediada por receptor similar a la inducida por el ligando de tipo salvaje. Un superagonista se define como una sustancia que induce una respuesta celular o fisiológica a una concentración al menos la mitad que la observada con la proteína de tipo salvaje. Más preferiblemente, se induce una respuesta celular o fisiológica a una concentración al menos cuatro veces menor que la observada con la proteína de tipo salvaje. Una respuesta biológica puede ser, por ejemplo, la estimulación de la división celular, diferenciación, angiogénesis o reparación de heridas. Una respuesta biológica puede englobar otras propiedades funcionales de la proteína parental de tipo salvaje y será muy conocida para los expertos en la técnica.

25 Se contempla en esta invención que una variante puede tener la unión a un receptor alterada comparada con la de la proteína parental de tipo salvaje. Esta unión puede aumentar o disminuir una respuesta biológica. De acuerdo con esto, la variante puede tener una especificidad alterada para uno o más receptores.

30 La variante puede generarse mediante tecnologías de ADN recombinante, muy conocidas para los expertos en la técnica. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "reacción en cadena de la polimerasa" ("PCR") se refiere a los métodos descritos en las Patentes EEUU Nos. 4.683.195; 4.683.202 y 4.965.188.

35 El término "vector de expresión" y "vector de expresión recombinante" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula de ADN recombinante que contiene una secuencia codificadora deseada y secuencias de ácido nucleico apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia codificadora unida de manera operativa en un organismo huésped particular. El vector de expresión puede comprender secuencias que codifican dominios heterólogos incluyendo pero sin limitarse a secuencias de detección de proteínas, purificación o escisión que pueden fusionarse en el extremo N o C de la secuencia codificadora deseada, para rendir una proteína de fusión. Se contempla que la presente invención engloba vectores de expresión que están integrados en los genomas de las células huésped, así como vectores que permanecen sin integrar en el genoma del huésped.

40 Tal y como se usa en la presente memoria, los "aminoácidos" usados en la invención son aquellos que están disponibles comercialmente o están disponibles por métodos sintéticos rutinarios. Determinados residuos de aminoácidos pueden requerir métodos especiales para la incorporación en el péptido y las estrategias sintéticas secuenciales, divergentes o convergentes con la secuencia del péptido son útiles en esta invención. Los aminoácidos codificados naturales y sus derivados se representan por el código de una letra o los códigos de tres letras según las normas IUPAC. Cuando no hay indicación, se usó el isómero L. Otros aminoácidos farmacéuticamente activos, incluyendo aminoácidos sintéticos, se conocen en la técnica y se pretende que estén incluidos en la invención.

Tal y como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones, un "agente bioactivo" es cualquier agente que se desea administrar a las células, tejidos u órganos para modular o modificar la función celular, incluyendo para efectos terapéuticos. Según la presente invención, los agentes bioactivos incluyen, pero no están limitados a, compuestos farmacéuticamente activos o compuestos de diagnóstico. Éstos incluyen, pero no están limitados a, péptidos y análogos de péptidos, peptidomiméticos, oligopéptidos, proteínas, apoproteínas, glicoproteínas, antígenos y anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, receptores y otras proteínas de membrana, aptámeros, enzimas, coenzimas, inhibidores de enzimas, aminoácidos y sus derivados, hormonas, lípidos, fosfolípidos, liposomas; toxinas tales como ricina o fragmentos de ricina, aflatoxina, digoxina, xantotoxina, rubratoxina, proteínas que inactivan el ribosoma; inhibidores de tirosina quinasa, agentes fotorreactivos, antibióticos tales como cefalosporinas, penicilina y eritromicina; sustancias analgésicas y antiinflamatorias; agentes antimicrobianos; agentes antihipertensores; agentes antivirales; antihistaminas; fármacos anticancerosos incluyendo agentes quimioterapéuticos, tales como clorambucilo, carboplatino, derivados de busulfán, doxorubicina, etopósido, genesteína, topotecán (TPT); tranquilizantes; agentes neuroprotectores; antiespasmódicos; agentes anti-Parkinson; vitaminas. Otros agentes bioactivos incluyen nucleótidos; oligonucleótidos; polinucleótidos; y sus análogos y derivados biológicamente funcionales y reconocidos en la técnica; plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales, otros vectores de ácido nucleico; polinucleótidos antisentido incluyendo los sustancialmente complementarios al a menos un ácido nucleico endógeno o los que tienen secuencias con un sentido opuesto al a menos partes de los genomas virales o retrovirales seleccionados; promotores; amplificadores; inhibidores; otros ligandos para regular la transcripción y traducción de genes.

En la presente memoria, los términos "defecto óseo" o "trastorno óseo" quieren decir un desequilibrio en la proporción de la formación ósea respecto a la resorción ósea, de manera que, si no se modifica, el sujeto presentará menos hueso del deseado, o los huesos del sujeto serán menos intactos de lo deseado. El déficit óseo también puede resultar de mutación, fractura, de intervenciones quirúrgicas o de enfermedades dentales o periodontales. Por "defecto en el cartílago" o "trastorno del cartílago" se quiere decir cartílago dañado, menos cartílago del deseado o cartílago que está menos intacto y coherente de lo deseado. Se contemplan las indicaciones que incluyen artritis reumatoide, osteoartritis y lesiones de rodilla.

Los usos representativos de los compuestos de la presente invención incluyen: reparación de defectos y deficiencias óseas, tales como las que ocurren en fracturas cerradas, abiertas y sin unión; uso profiláctico en la reducción de fracturas cerradas y abiertas; estimulación de la cicatrización ósea en cirugía plástica; estimulación del crecimiento óseo interno en articulaciones prostéticas no cementadas y en implantes dentales; elevación del pico de la masa ósea en mujeres pre-menopáusicas; tratamiento de deficiencias del crecimiento; tratamiento de enfermedades y defectos periodontales y otros procesos de reparación de los dientes; incremento de la formación ósea durante osteogénesis de distracción; tratamiento de condrocitos articulares antes del trasplante heterólogo o autólogo y tratamiento de otros trastornos esqueléticos, tales como osteoporosis relacionada con la edad, osteoporosis postmenopáusica, osteoporosis inducida por glucocorticoides u osteoporosis por desuso y artritis. Los compuestos de la presente invención son útiles en la reparación de resección de los huesos congénita, inducida por traumatismo o quirúrgica (por ejemplo, para el tratamiento del cáncer) y en cirugía cosmética. Además, los compuestos de la presente invención pueden usarse para limitar o tratar defectos o trastornos del cartílago. El tratamiento incluye la aplicación directa de las variantes al área traumatizada o terapia sistémica así como tratamiento de las células *ex vivo* e *in vitro* para la ingeniería de tejidos y la regeneración de tejidos.

Tal y como se usan en la presente memoria, los términos "proteína de fusión" o "quimera", "recombinante quimérico" o "híbrido" se refieren a un único polipéptido producido usando células huésped que expresan un único polinucleótido que codifica una variante de FGF de la invención y un agente bioactivo incluyendo un polipéptido, péptido o análogo de péptido contiguo y en marco de lectura abierto. Determinados conectores peptídicos pueden incorporarse para separar el FGF del polipéptido, péptido o análogo de péptido bioactivo. Usando los métodos actuales de manipulación genética, una variedad de péptidos u hormonas peptídicas, incluyendo péptidos natriuréticos tales como CNP o la hormona del crecimiento, pueden traducirse como proteínas de fusión con variantes de FGF que a su vez pueden dirigir específicamente a células y facilitar la internalización. La presente invención proporciona un sistema altamente eficaz para administrar un resto que induce actividad a un tipo o clase particular de células. Las proteínas de fusión generadas pueden cribarse para la especificidad y actividad deseadas utilizando los métodos mostrados en los ejemplos y por varios procedimientos rutinarios. Las proteínas de fusión con variante de FGF codificadas por los ácidos nucleicos de la presente invención deben ser capaces de unirse específicamente a la célula diana seleccionada e internalizar la fusión de FGF.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "conjugado" se refiere a un agente bioactivo unido covalentemente a un vehículo o resto de direccionamiento. Determinadas variantes de la invención proporcionan vehículos o agentes de direccionamiento para agentes bioactivos.

Una "molécula de direccionamiento" o "molécula en complejo" FGF se refiere a una variante de FGF de la invención unida a un agente bioactivo como una quimera recombinante o conjugado covalente.

En la presente invención se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una variante de FGF y un agente bioactivo como una proteína de fusión o alternativamente un conjugado de una variante de FGF que comprende una variante de FGF y un agente bioactivo que están unidos covalentemente útiles para el direccionamiento de FGF. La presente invención proporciona además métodos para inhibir la proliferación de células que expresan FGFR que comprende administrar una composición de direccionamiento de una variante de FGF a las células. Por ejemplo, la composición se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz a un sujeto que tiene un tumor, en el que las células tumorales expresan FGFR específicos.

La actividad de FGF se determina convenientemente usando ensayos biológicos realizados *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Los ensayos se usan para demostrar la actividad inducida después de la unión de una molécula de FGF a sus receptores. Los ensayos biológicos usados rutinariamente para ensayar actividades de los FGF variantes incluyen, pero no están limitados a, los siguientes:

- i. unión de los FGF variantes a receptores de FGF clonados expresados en líneas celulares inmortalizadas, induciendo de esta manera una respuesta biológica incluyendo la proliferación celular o la inhibición de la proliferación celular;
- ii. sistemas de cultivo celular;
- iii. estimulación del crecimiento óseo en modelos animales de crecimiento óseo y cultivos celulares;
- iv. aumento de la reparación de cartílagos en modelos animales de enfermedad y trauma de cartílagos.

Diseño de las Variantes

Una realización preferida actualmente de la invención es una molécula de FGF en la que se incorpora una sustitución de aminoácido en el bucle β8-β9. Los datos estructurales han identificado recientemente este dominio como un sitio de unión principal que se ha demostrado que interacciona con la unión que conecta los dominios semejantes a Ig 2 (D2) y semejantes a Ig 3 (D3) del receptor (Plotnikov et al., Cell 98 641 1999). Plotnikov et al., (Cell 101, 413, 2000) han mostrado que determinados dominios en FGFR tales como βC'-βE (conector D2-D3) y βF-βG (D3) regulan la especificidad de unión de FGF-2 interaccionando con el bucle β4-5 y el extremo amino de FGF. Además, FGFR2 realiza contactos hidrofóbicos con Asn102 de FGF-2 (la numeración de aa es según FGF-2 que carece del péptido señal de 9 aa; equivalente a N111 como se indica en la presente memoria) y forma enlaces de hidrógeno con Asn104 (equivalente a N113). Una sustitución Asn104 (N113) dio lugar a una reducción de 400 veces en la afinidad de unión de FGF2 para FGFR1.

Sorprendentemente, los inventores describen en la presente memoria un incremento en la actividad de FGFR1 para una variante que tiene una sustitución vecina N111 en FGF-2.

La Tabla 1 muestra el alineamiento de aminoácidos de los residuos en el bucle β8-β9 de los FGF conocidos y 1-3 residuos adyacentes de la cadena β a cada lado. La Asn111 de FGF-2 y FGF-4 y el Trp144 de FGF-9 están resaltados en negrita y subrayados.

**Tabla 1. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de β8-β9 y residuos adyacentes**

FGF-1	LEENHYNTY	Residuos:104-112 (SEQ ID NO:33)
FGF-2	LESN <b>N</b> YNTY	Residuos:107-115 (SEQ ID NO:34)
FGF-3	IHELGYNTY	Residuos:121-129 (SEQ ID NO:35)
FGF-4	LLPN <b>N</b> YNAY	Residuos:161-169 (SEQ ID NO:36)
FGF-5	FQENSYNTY	Residuos:166-174 (SEQ ID NO:37)
FGF-6	LLPN <b>N</b> YNTY	Residuos:163-171 (SEQ ID NO:38)
FGF-7	ILENHYNTY	Residuos:143-151 (SEQ ID NO:39)
FGF-8	VLENNYTAL	Residuos-151-159 (SEQ ID NO:40)

FGF-9	FEENWYNTY	Residuos:140-148 (SEQ ID NO:41)
FGF-10	IEENGYNTY	Residuos:156-164 (SEQ ID NO:42)
FGF-11	VFENYYVLY	Residuos:149-157 (SEQ ID NO:43)
FGF-12	VFENYYVIY	Residuos:151-159 (SEQ ID NO:44)
FGF-13	VFENYYVTY	Residuos:147-155 (SEQ ID NO:45)
FGF-14	VFENYYVIY	Residuos:149-157 (SEQ ID NO:46)
FGF-15	MDCLGYNQY	Residuos:133-141 (SEQ ID NO:47)
FGF-16	FEENWYNTY	Residuos:139-147 (SEQ ID NO:48)
FGF-17	VLENNYTAF	Residuos:133-141 (SEQ ID NO:49)
FGF-18	VLENNYTAL	Residuos:133-141 (SEQ ID NO:50)
FGF-19	IRPDGYNVY	Residuos:126-134 (SEQ ID NO:51)
FGF-20	FEENWYNTY	Residuos:143-151 (SEQ ID NO:52)
FGF-21	LLEDGYNVY	Residuos:127-135 (SEQ ID NO:53)
FGF-22	IEENGHNTY	Residuos-119-127 (SEQ ID NO:54)
FGF-23	TLENGYDVY	Residuos:119-127 (SEQ ID NO:55)
FGF-CX	FEENWYNTY	Residuos:143-151 (SEQ ID NO:56)
Jaffa	LLEDGYNVY	Residuos:127-135 (SEQ ID NO:57)

Nota: La numeración de los aa de FGF-2 es según la isoforma de 155 aa; el aminoácido 107 sería 98 en la isoforma de 146 aa. El alineamiento de secuencia para FGF-1-FGF-19 es según Plotnikov et al. (Cell 101, 413, 2000). Las secuencias de FGF-20-23 se identificaron en Kirikoshi et al. (BBRC 274, 337, 2000), Nishimura et al. (BBA 1492, 203, 2000), Nakatake et al. (BBA 1517, 460, 2001) y Yamashita et al. (BBRC 277, 494, 2000), respectivamente. La secuencia de FGF-CX se describe en WO 01/07595. FGF-18 también se conoce como zFGF-5, La secuencia de FGF Jaffa humana se describe en WO 01/38357.

#### Realizaciones Preferidas

Como se describe en la solicitud de patente PCT en tramitación con la presente WO 02/36732, determinadas modificaciones en la secuencia del polipéptido proporcionan variantes con una especificidad de receptor aumentada que retienen la actividad biológica. Específicamente, las variantes de FGF que comprenden mutaciones en el bucle entre las cadenas  $\beta 8$  y  $\beta 9$ , definidas en la presente memoria como  $\beta 8$ - $\beta 9$ , que se ha determinado anteriormente que comprende un sitio de unión principal que se ha demostrado que interacciona con el receptor, y bucles análogos en otros miembros de la familia FGF, proporcionan una especificidad para subtipo de receptor aumentada. Aquí, describimos una especificidad y/o afinidad de receptor incrementada y actividad biológica aumentada de los ligandos FGF por sustituciones de aminoácidos en el bucle  $\beta 8$ - $\beta 9$ , específicamente en la posición 111 del FGF-2 de tipo salvaje.

Se ha indicado que la sustitución de los residuos alineados en FGF-2, ejemplificada por el reemplazo de Asn102 (N111 de la isoforma de 155 aa) por Ala (N102A) (Zhu et al., Protein Eng, 10, 417,1997) no presenta alteraciones en la especificidad de receptor. En la presente memoria se describen variantes de FGF-2 en las que la asparagina idéntica en la posición 111 (N111) se sustituye por otro residuo presentando inesperadamente tanto un incremento en la actividad biológica como una especificidad de receptor incrementada.

Una realización preferida actualmente de la invención se indica como FGF2-N111X en la que X es distinta de asparagina y más preferiblemente se selecciona de glicina (Gly, G) o arginina (Arg, R). Esta secuencia de esta variante se indica en la presente memoria como SEQ ID NO:1. Una realización preferida actualmente de la presente invención proporciona una variante de FGF-2, indicada en la presente memoria como FGF2-N111R que tiene la SEQ ID NO:2, en la que la sustitución de la asparagina 111 por arginina (Arg, R) muestra una actividad esencialmente igual frente a FGFR3 y FGFR2 con una actividad incrementada para FGFR1.

Una realización más preferida actualmente de la presente invención proporciona una variante de FGF-2, indicada en la presente memoria como FGF2-N111G que tiene la SEQ ID NO:3, en la que la sustitución de la asparagina 111 por glicina (Gly, G) muestra una actividad esencialmente igual frente a FGFR3 con una actividad incrementada para FGR1 y en menor medida frente a FGFR2.

El número de designaciones corresponde a los códigos de aminoácidos de tres letras o una letra seguidos de la posición del aminoácido en la forma de 155 aminoácidos de FGF-2.

Las variantes de la invención que son las más preferidas pueden comprender además modificaciones adicionales en, o fuera de, el bucle  $\beta 8$ - $\beta 9$ . Los ejemplos de modificaciones incluyen truncamientos del extremo N o C terminal o de ambos extremos y/o sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en las que las variantes retienen una actividad mitogénica superior mediada a través de los FGFR con afinidades no modificadas o mejoradas comparado con el FGF-2 parental de tipo salvaje, del que se han obtenido. Las modificaciones adicionales funcionan para mejorar determinadas propiedades de las variantes incluyendo estabilidad aumentada, rendimiento incrementado de recombinantes, solubilidad y otras propiedades conocidas en la técnica. Por ejemplo, FGF-2 puede comprender sustituciones de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 3 y 5 en las que alanina (Ala, A) y serina (Ser, S) se reemplazan por Glutamina (Gln, Q) (A3Q y S5Q) proporcionando variantes con rendimientos y estabilidad mejoradas. Una realización preferida actualmente de la presente invención se indica en al presente memoria como FGF2(3,5Q)-N111X, SEQ ID NO:4. La Tabla 2 presenta un resumen de la especificidad de receptor de las variantes de FGF2 de la presente invención.

**Tabla 2. Especificidad de las variantes FGF2(3,5Q)-N111X frente a células FDCP que expresan FGFR.**

Mutante	FGFR1	FGFR2	FGFR3IIIb	FGFR3IIIc
FGF-2	+	+	-	+
FGF2(3,5Q)-N111G	++	+	-	+++
FGF2-N111R	+++	+	-	+

La posición correspondiente de N111 en FGF-4 es N165 (numeración según la forma de 206 aa). Se mostró que FGF-4 tenía una alta afinidad para los HSPG que aumenta la unión y activación de FGFR. Se muestra que FGF-4 de tipo salvaje induce un alto nivel de proliferación a través de FGFR1 y un menor nivel a través de FGFR2, con actividad insignificante a través de FGFR3. La actividad a través de FGFR3, según se mide en un ensayo proliferativo, aumenta por la sustitución de un aminoácido en la posición N165 y el truncamiento de aminoácidos N terminales. Una realización preferida actualmente de la presente invención es una variante de FGF-4 indicada en la presente memoria como FGF4-N165X, que tiene la SEQ ID NO:6, en la que X es distinto de asparagina. Una realización más preferida actualmente de la presente invención se indica en la presente memoria como L55M-FGF4-N165X, SEQ ID NO:7, en la que X es distinto de asparagina. Esta variante induce la proliferación a través de FGFR3 mientras mantiene el mismo nivel de actividad a través de FGFR1 y FGFR2.

La utilidad terapéutica de estas nuevas variantes de FGF-2 y FGF-4 se describe tanto para receptores de FGF normales como anormales, incluyendo pero sin limitarse a regeneración de cartílago y hueso y cicatrización de fractura ósea, proliferación de condrocitos articulares, osteoporosis, cicatrización de heridas, reparación de tejido isquémico, supervivencia de tejido neural y reparación y neovascularización. Además, la alta especificidad de receptor de estas

nuevas variantes justifica su uso en el direccionamiento de agentes bioactivos, en particular material citotóxico a las células que sobreexpresan los receptores FGFR, para el tratamiento de enfermedades proliferativas.

5 Las variantes que tienen las SEQ ID NOS:1-9 se formulan para proporcionar composiciones farmacéuticas útiles para estimular o acelerar la reparación o regeneración de hueso endocondral, hueso intramembranoso, cartílago, incluyendo cartílago articular, defectos espinales y otros trastornos esqueléticos y para estimular o acelerar la neovascularización en indicaciones que incluyen quemaduras, cortes, laceraciones, úlceras por presión, úlceras tales como las observadas en pacientes diabéticos, reparación y regeneración de tejidos, incluyendo tejido esquelético, cutáneo y vascular. Las composiciones comprenden la variante y comprenden además un HSPG como vehículo o estabilizador y un dispositivo sin matriz o con matriz.

10 Inesperadamente, se ha encontrado que determinadas variantes de FGF de la presente invención retienen la afinidad de unión a receptores específicos de FGF a la vez que presentan una actividad biológica mediada por receptor reducida, proporcionando variantes útiles para el direccionamiento de agentes bioactivos incluyendo polipéptidos, péptidos y análogos y fármacos a un tejido específico. Efectivamente, los polipéptidos variantes son útiles como vehículos que pueden usarse para la administración y concentración específica de sitio del agente bioactivo a células, tejidos u órganos en los que se desea conseguir un efecto terapéutico.

20 La posición equivalente de N111 en FGF-9 es W144 (triptófano en la posición 144 de la proteína de tipo salvaje). Hemos generado sustituciones en el sitio W144 y las hemos ensayado para especificidad de receptor. El triptófano se reemplazó por Gly (G), Ala (A), Val (V), Asn (N), Glu (E) o Arg (R). Las variantes W144G, W144V, W144E y W144R mostraron una especificidad disminuida frente a FGFR1 y una retención de la especificidad frente al receptor FGFR3. Las variantes W144A o W144N se comportaron como un FGF-9 nativo. Además, una sustitución de la Asn (asparagina) adyacente en la posición 143 por una Ser (serina), N143S, resultó en la activación de FGFR3 y no de FGFR1.

La Tabla 3 resume la especificidad de las variantes de FGF-9 en células FDCP transfectadas con los distintos FGFR según se determina en un ensayo de proliferación celular.

**Tabla 3. Especificidad de las variantes de FGF9 frente a células FDCP que expresan FGFR.**

Mutante	FGFR-1	FGFR-3
WT-FGF-9	+	+
FGF-9 W144G	-	+
FGF-9 W144A	+	+
FGF-9 W144V	-	+
FGF-9 W144N	+	+
FGF-9 W144E	-	+
FGF-9 W 144R	-	+
FGF-9 N143S	-	+

25

El FGF comprende la sustitución de Trp 144 (W144) de FGF-9 por Gly (G), Val (V), Glu (E) o Arg (R).

30 En una realización preferida de la presente invención, la variante comprende una o más sustituciones de aminoácidos en el bucle  $\beta$ 8- $\beta$ 9 y un truncamiento en el extremo N o C terminal o en ambos. Estas variantes serían ventajosas en términos de su estabilidad y/o solubilidad y afinidad y especificidad de receptor, y actividad biológica reducida concomitante. La Figura 6B muestra el nivel reducido de actividad mitogénica de determinadas variantes de FGF-9 preferidas en un ensayo de proliferación en células FDCP transfectadas con FGFR1 o FGFR3. El eje de las X es la concentración de la variante de FGF9 medida en ng/ml, mientras que el eje de las Y representa la absorción a 490 nm y refleja la mitogenicidad. Una variante inactiva inducirá una respuesta mitogénica a través de un receptor específico a un

nivel que no debe ser menor que al menos la mitad de dos veces el del FGF nativo correspondiente a una concentración no mayor de 50 veces la del FGF nativo, más preferiblemente no mayor de 20 veces y lo más preferiblemente no mayor de 10 veces la del ligando FGF nativo del receptor.

- 5 Después de la eliminación de los residuos de aminoácidos cerca de y en la estructura de núcleo, la proteína FGF pierde afinidad para el receptor. FGF9-2, de 127aa representada como SEQ ID NO:12, tiene una capacidad mitogénica reducida respecto a FGF-9 de tipo salvaje. La variante R64M-FGF9 de 145 aa, representada como SEQ ID NO:10, proporciona el polipéptido FGF-9 más corto que retiene la especificidad de unión frente a FGFR3 y ha perdido la capacidad de unión frente a FGFR1, según se determina en un ensayo mitogénico. La Figura 6B muestra que aunque la actividad mitogénica de R64M-FGF9 se reduce en comparación con la del FGF-9 de tipo salvaje, la variante retiene una alta especificidad frente a FGFR3 aunque muestra una actividad reducida y no induce una respuesta a través de FGFR1. Una realización más preferida actualmente de la invención es una variante R64M-FGF9 que comprende además una sustitución de aminoácido en el bucle  $\beta$ 8- $\beta$ 9. Estas variantes se indican en la presente memoria como R64M-FGF9-W144X y R64M-FGF9-N143X, SEQ ID NO:11 y 14, respectivamente. Las secuencias de polinucleótido correspondientes están representadas como SEQ ID NOS:26 y 29, respectivamente.
- 10
- 15 Las variantes inactivas de FGF-9 indicadas en la presente memoria como FGF9-2-W144X, cuya secuencia de aminoácidos está representada como SEQ ID NO:12, en la que X es distinto de triptófano y la sustitución de aminoácidos más preferida actualmente se selecciona de Glicina (G), Arg (R), Val (V) o Glu (E). La secuencia de polinucleótido correspondiente se presenta como SEQ ID NO:28. Las realizaciones más preferidas actualmente de la variante inactiva de FGF-9 se indican en la presente memoria como FGF9-2-W144G, FGF9-2-W144V y FGF9-2-W144E.
- 20 La introducción de glicina en la posición 144 de FGF-9 suprimió su unión frente a FGFR1 mientras retiene una afinidad significativa frente a FGFR3 y en menor medida, FGFR2. Además, la variante FGF9-2-W144G dirige específicamente a la placa de crecimiento, como se muestra en las Figuras 8A y 8B.

#### Métodos para Producir y Usar las Variantes

- 25 El método más preferido para producir las variantes es mediante tecnologías de ADN recombinante, muy conocidas para los expertos en la técnica. Por ejemplo, las variantes pueden prepararse por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando cebadores específicos para cada una de las formas truncadas o las sustituciones de aminoácidos como se describe en la presente memoria más adelante. Los fragmentos de PCR pueden purificarse en un gel de agarosa y el fragmento de ADN purificado puede clonarse en un vector de expresión y transfectarse en células huésped. Las células huésped pueden cultivarse y la proteína puede recogerse según métodos conocidos en la técnica. Según otro aspecto de la presente invención, se describe que los FGF variantes preferidos tienen una utilidad terapéutica mejorada en enfermedades y trastornos que implican los receptores de FGF.
- 30

- 35 La utilidad terapéutica de estas nuevas variantes se describe tanto para receptores de FGF normales como anormales, incluyendo pero sin limitarse a regeneración ósea y cicatrización de fracturas óseas, osteoporosis, cicatrización de heridas, células malignas que sobreexpresan receptores FGFR, Acondroplasia e Hipocondroplasia (una afección asociada con un acortamiento de las extremidades desproporcionado moderado pero variable). Según las realizaciones más preferidas actualmente, es posible dirigir fármacos y otras moléculas bioactivas, incluyendo pero sin limitarse a fármacos citotóxicos, péptidos y análogos y polipéptidos a células que presentan FGFR3 sin afectar apreciablemente a las células que presentan FGFR1. Esto se consigue conjugando el fármaco elegido con un FGF variante de la invención. Según las realizaciones aún más preferidas de la presente invención, ahora es posible dirigir fármacos y otras moléculas bioactivas, incluyendo pero sin limitarse a péptidos y fármacos citotóxicos a uno o más subtipos específicos de FGFR2 y/o FGFR3. Las realizaciones más preferidas de la invención son particularmente útiles en conjugados con fármacos para inhibir la proliferación celular y facilitar o aumentar el tratamiento de defectos o tumores que presentan un subtipo específico de receptor, sin interferir con el crecimiento de las células o tejidos normales que presentan otros subtipos de receptor. En un ejemplo no limitativo, las composiciones de direccionamiento de FGF9-2-W144G pueden comprender un componente FGF9-2-W144G y una citotoxina que están unidos covalentemente entre sí. Otro ejemplo es un conjugado con un inhibidor de tirosina tal como, pero no limitado a, genisteína. Alternativamente, las composiciones de direccionamiento de FGF9-2-W144G pueden comprender una proteína de fusión de direccionamiento FGF9-2-W144G. En una realización más preferida actualmente, se usa una proteína de fusión de una variante inactiva de la presente invención y un péptido o análogo de péptido para dirigir dicho péptido o análogo a una célula, tejido u órgano específico.
- 40
- 45

- 50 Una "molécula de direccionamiento" se define en la presente memoria como una molécula que se une a un receptor y se transporta a una célula por un proceso mediado por receptor. Los ejemplos de moléculas de direccionamiento adecuadas incluyen, pero no están limitados a, glucosa, galactosa, manosa, insulina, un factor de crecimiento peptídico, cobalamina, ácido fólico o derivados, biotina o derivados, albúmina, texafirina, metalotexafirina, porfirina, cualquier vitamina, cualquier coenzima, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, Fab) y una región variable de un anticuerpo de cadena única (scFv). Un experto en la técnica reconocerá fácilmente otras moléculas de direccionamiento
- 55

incluyendo ligandos que se unen a receptores celulares y que se transportan al interior de una célula por un proceso mediado por receptor. Se pretende que la presente invención incluya todas estas moléculas de direccionamiento.

5 En otra realización preferida actualmente, los agentes bioactivos se dirigen a un tejido deseado, específicamente la placa de crecimiento de los huesos. Esto puede conseguirse por métodos conocidos para un experto en la técnica e incluyen, de una manera no limitativa, una proteína quimérica que comprende una variante de FGF de la presente invención como vehículo fusionada con un agente bioactivo incluyendo péptidos y análogos de péptidos. Según una realización más preferida actualmente, se fusiona un péptido natriurético o un derivado funcional de éste con una variante de FGF de la invención, preferiblemente FGF9-2-W144G, indicada en la presente memoria como FGF9-2-W144G-CNP que tiene la SEQ ID NO:16, en la que FGF9-2-W144G se fusiona con CNP mediante un conector Glicina. Alternativamente, el resto  
10 CNP se une a una variante de FGF, de manera que el resto CNP esté en 5' respecto al FGF, indicada en la presente memoria como CNP(1-22)- FGF9-2-W144G, que tiene la SEQ ID NO:17.

Según los principios de la presente invención, ahora se describe que mediante la introducción de una única sustitución de aminoácido en el bucle  $\beta 8$ - $\beta 9$ , un FGF puede experimentar interconversión de un mitógeno a un factor de diferenciación o de un factor de diferenciación a un mitógeno. Esta propiedad de las nuevas variantes justifica su uso en  
15 la inducción selectiva de la proliferación y diferenciación de varios tipos celulares. Además, son inductores más potentes de la proliferación que el FGF2 nativo. Alternativamente, las variantes de FGF9, W144G-FGF9 y L37M-W144G-FGF9, que tienen las SEQ ID NO:8 y 9, respectivamente, inducen la diferenciación de condrocitos articulares mientras que la proteína FGF-9 de tipo salvaje es tanto un mitógeno débil como un factor de diferenciación débil. Las variantes de la presente invención pueden usarse *in vitro* o *in vivo*, solas o en combinación para conseguir un efecto deseado de proliferación y/o diferenciación. En un ejemplo no limitativo de implante autólogo de condrocitos (ACI), la variante FGF2-N111X se añade a un cultivo de condrocitos humanos preparado a partir de una biopsia para inducir la rápida proliferación de las células. Esto va seguido de la adición de la variante FGF9-2-W144G para inducir la diferenciación de las células cultivadas. Las células diferenciadas pueden reintroducirse en un sujeto que necesita el tratamiento para la reparación del tejido cartilaginoso enfermo o traumatizado. Las variantes pueden usarse para cultivar una variedad de tipos celulares incluyendo osteoblastos, neuronas, células hematopoyéticas, células progenitoras y células madre.  
25 Además, las variantes pueden usarse para la inducción de la proliferación y/o diferenciación *in vivo*.

#### Farmacología

La presente invención también contempla formulaciones farmacéuticas, tanto para uso veterinario como en medicina humana, que comprenden como el agente activo uno o más polipéptidos de la invención, así como el uso de un polipéptido de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de las distintas afecciones descritas en la presente memoria.  
30

En dichas formulaciones farmacéuticas y de medicamento, el agente activo se utiliza preferentemente junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables por lo tanto y opcionalmente cualesquiera otros ingredientes terapéuticos. El o los vehículos deben ser farmacéuticamente aceptables en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la formulación y que no sean demasiado perjudiciales para el receptor de los mismos. El agente activo se proporciona en una cantidad eficaz para conseguir el efecto farmacológico deseado, como se ha descrito anteriormente, y en una cantidad apropiada para conseguir la dosis diaria deseada.  
35

Otro componente funcional crítico en la señalización de FGF es los proteoglicanos tales como heparán sulfato. Los FGF no se unen ni activan los receptores de FGF en células que carecen de heparán sulfato endógeno. Proteoglicano se refiere a proteoglicanos heparán sulfato (HSPG) u otros tipos incluyendo los proteoglicanos condroitín sulfato, queratín sulfato y dermatán sulfato.  
40

La dosis de la composición farmacéutica de la presente invención puede variar con la clase de enfermedad, la edad del paciente, peso corporal, la gravedad de la enfermedad, la vía de administración, etc.

Aparte de otras consideraciones, el hecho de que los nuevos ingredientes activos de la invención sean polipéptidos, variantes de polipéptido o proteínas de fusión dicta que la formulación sea la adecuada para la administración de estos tipos de compuestos. Claramente, los péptidos son menos adecuados para administración oral debido a la susceptibilidad a la digestión por los ácidos gástricos o enzimas intestinales. Aparte de otras consideraciones, el hecho de que los nuevos ingredientes activos de la invención sean polipéptidos dicta que la formulación sea la adecuada para la administración de este tipo de compuestos. Claramente, los péptidos son menos adecuados para administración oral debido a la susceptibilidad a la digestión por los ácidos gástricos o enzimas intestinales. Pueden diseñarse formulaciones específicas para evitar estos problemas, incluyendo recubrimiento entérico, cápsulas de gelatina, emulsiones y semejantes. Sin embargo, la biodisponibilidad se perjudica por una pobre absorción gastrointestinal y las vías de administración son preferiblemente parenterales. Las vías preferidas de administración son intra-articular (IA), intravenosa (IV), intramuscular (IM), subcutánea (SC), intradérmica (ID) o intratecal (IT). Una vía más preferida es por inyección directa en o cerca del sitio del trastorno o enfermedad.  
45  
50  
55

- 5 Tal y como se usa en la presente memoria una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de una o más de las variantes activas seleccionadas de las secuencias, SEQ ID NO:1-17 descritas en la presente memoria, o sales o profármacos fisiológicamente aceptables de éstas, con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.
- El término "profármaco" se refiere a un agente que se convierte en un fármaco parental activo *in vivo*. Los profármacos son útiles frecuentemente porque en algunos casos pueden administrarse más fácilmente que el fármaco parental. Pueden, por ejemplo, estar biodisponibles por administración oral mientras que el fármaco parental no. El profármaco también puede tener una solubilidad mejorada comparada con el fármaco parental en composiciones farmacéuticas.
- 10 En la presente memoria el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar más la administración de un compuesto. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilen glicoles. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más ingredientes activos adicionales.
- 15 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden fabricarse por procesos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante procesos convencionales de mezclado, disolución, granulación, molido, pulverización, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulado, atrapamiento o liofilización.
- Las composiciones farmacéuticas para usarse según la presente invención pueden formularse así de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.
- 20 Para inyección, los compuestos de la invención pueden formularse en disoluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank, disolución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para administración transmucosal, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera que se quiere permear. Dichos penetrantes por ejemplo DMSO o polietilen glicol son conocidos en la técnica.
- 25 Los núcleos de gragea se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este propósito, pueden usarse disoluciones concentradas de azúcar que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinil pirrolidona, gel carbopol, polietilen glicol, dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Pueden añadirse agentes de tinción o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de las dosis de compuesto activo.
- 30 Las composiciones farmacéuticas que pueden usarse oralmente incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina así como cápsulas blandas, selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los ingredientes activos mezclados con un agente de relleno tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilen glicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizadores. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para la vía de administración elegida. Para administración bucal, las composiciones pueden tener la forma de comprimidos o pastillas formulados de manera convencional. Para administración por inhalación, las variantes para usarse según la presente invención se administran en la forma de una presentación de pulverizador de aerosol de un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado conocido en la técnica. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos, por ejemplo, de gelatina para usarse en un inhalador o insuflador pueden formularse para contener una mezcla en polvo del péptido y una base de polvo adecuada.
- 40 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de los ingredientes activos en forma soluble en agua. Además, pueden prepararse suspensiones de los compuestos activos como suspensiones de inyección oleosas apropiadas. Los disolventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión, incluyendo pero no limitado a sustancias y polímeros naturales tales como colágeno, sorbitol, dextrano o ácido hialurónico (HA) y derivados, polímeros sintéticos, derivados de celulosa incluyendo carboximetil celulosa de sodio (CMC) y derivados de dichas sustancias o cualquier vehículo natural o sintético conocido en la técnica (Pillai y Panchagnula, Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 447, 2001). Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que incrementen la solubilidad o estabilidad de los compuestos, para permitir la preparación de disoluciones muy concentradas. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril sin pirógenos, antes del uso.
- 45
- 50
- 55

Los compuestos de la presente invención también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención usando, por ejemplo, bases de supositorio convencionales.

5 Las formulaciones de las variantes activas pueden administrarse tópicamente como un gel, pomada, crema, emulsión o formulación de liberación sostenida incluyendo un parche transdérmico. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria también pueden comprender vehículos o excipientes sólidos de fase gel adecuados. Los ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen, pero no están limitados a, carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilen glicoles.

10 Para tratar el hueso u otro tejido, por ejemplo fracturas óseas, defectos en el cartílago o reparación de tejidos, se puede preferir la administración local mediante una inyección directa en o cerca del sitio de la diana o mediante un implante subcutáneo, grapas o formulación de liberación lenta implantado en o cerca de la diana. Los dispositivos adecuados para la inyección directa o implante son biocompatibles y pueden carecer de matriz o comprender una matriz. Los dispositivos sin matriz incluyen de manera no limitativa, materiales amorfos formulados como una pasta, masilla, líquido viscoso o gel. En una realización de la presente invención, las formulaciones de la variante comprenden dispositivos sin matriz incluyendo poloxámeros Plurónicos o carboximetilcelulosa (Patente EEUU 6.281.195), polisacáridos o polisacáridos entrecruzados (Patente EEUU 6.303.585) y ácido hialurónico (Patente EEUU 6.221.854).

20 Una matriz proporciona un determinado componente estructural que proporciona un andamio permanente o temporal para infiltrar las células. Puede proporcionar alternativamente un andamio para la administración de una variante de la invención al tejido que lo necesita. La liberación de la variante puede estar controlada. Las matrices incluyen, de manera no limitativa, composiciones de colágeno (WO 00/47114; Patentes EEUU 4.394.370 y 5.425.769), composiciones poliméricas y copoliméricas (Patente EEUU 5.650.180), partículas de fosfato de calcio y composiciones cerámicas (Patente EEUU 6.231.607), incluyendo composiciones de hidroxiapatito (WO 90/01342 y Patentes EEUU 5.338.772 y 4.795.467), coral, gelatinas y hueso desmineralizado. Además, una matriz puede estar en la forma de un implante, una composición de una única capa o múltiples capas, lámina o en forma de partículas.

25 Una composición farmacéutica que comprende como un ingrediente activo una variante de la invención en un dispositivo con matriz o sin matriz puede comprender además estabilizadores incluyendo heparin sulfato u otros HSPG o vehículos como los listados anteriormente.

Puede proporcionarse un método para administrar una variante de FGF de la presente invención, que tiene la SEQ ID Nos:1-7, en combinación con una matriz basada en fosfato de calcio a un paciente que lo necesite.

30 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para usarse en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir el propósito pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de un compuesto eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de una enfermedad del sujeto que se está tratando. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria.

35 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los péptidos descritos en la presente memoria pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando la  $CI_{50}$  (la concentración que proporciona un 50% de inhibición) y la  $DL_{50}$  (dosis letal que causa la muerte al 50% de los animales ensayados) para un compuesto sujeto. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para usarse en los seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, vía de administración y dosificación puede elegir las el médico teniendo en cuenta la afección del paciente. Dependiendo de la gravedad y capacidad de respuesta de la afección que se va a tratar, la dosificación también puede ser una única administración de una composición de liberación lenta, con curso de tratamiento que dura de varios días a varias semanas o hasta que se produzca la curación o se consiga la disminución del estado patológico. La cantidad de una composición a administrar dependerá del sujeto que se va a tratar, la gravedad de la afección, la manera de administración, el juicio del médico que la prescribe y de otros factores.

El ejemplo siguiente es sólo una ilustración de un método para tratar a un sujeto con una variante según la invención, con el fin de tratar una afección patológica asociada con trauma tisular o una afección relacionada, y no se pretende que sea limitativo.

50 El método incluye la etapa de administrar la variante o quimera o proteína de fusión, en un vehículo farmacéuticamente aceptable como se ha descrito anteriormente, a un sujeto que se va a tratar. El medicamento se administra según una metodología de dosificación eficaz, preferiblemente hasta que se consigue un punto final predefinido, tal como una reducción o mejora de la afección patológica en el sujeto.

La presente invención también se refiere a métodos de tratamiento de las diferentes afecciones patológicas descritas anteriormente, por administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones de la presente invención. El término administración tal y como se usa en la presente memoria engloba administración oral, parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, intratecal, rectal e intranasal.

- 5 La presente invención se refiere además a un método para el uso de las variantes de FGF activas para preparar medicamentos útiles para inducir la formación ósea y la cicatrización de fracturas así como en la detección y tratamiento de varios trastornos relacionados con FGFR incluyendo trastornos esqueléticos tales como acondroplasia y displasia tanatofórica y determinados tipos de cáncer incluyendo pero no limitados a carcinoma de células transicionales (TCC) de la vejiga, mieloma múltiple, leucemia mieloide crónica (CML) y carcinoma cervical.
- 10 Aunque la invención se ha descrito conjuntamente con realizaciones específicas de ésta, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. De acuerdo con esto, se pretende que englobe todas dichas alternativas, modificaciones y variaciones que entran en el alcance amplio de las reivindicaciones adjuntas. Además, la citación o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no debe considerarse como una admisión de que dicha referencia esté disponible como técnica anterior a la presente invención.
- 15 Las secuencias listadas son según la isoforma humana de FGF-2 de 155 aminoácidos. Los expertos en la técnica reconocerán que las secuencias de polinucleótido descritas en las SEQ ID NOs:18-32 representan el único alelo de los genes y polipéptidos FGF-2, FGF-4 y FGF-9 humanos y que se espera que ocurran variaciones alélicas. Las variantes alélicas pueden clonarse sondeando bibliotecas de ADNc o genómicas o pueden generarse por PCR a partir de ARN total, ADNc o ADN genómico de diferentes individuos según los procedimientos estándar. Las variantes alélicas de la
- 20 secuencia de polinucleótido, incluyendo aquellas que contienen mutaciones silenciosas y aquellas en las que las mutaciones resultan en cambios en la secuencia de aminoácidos, están en el alcance de la presente invención.

La molécula de FGF-2 de 18 kDa tiene una longitud de 155 aa cuando se traduce a partir de un codón de inicio AUG (metionina) (Abraham et al EMBO J. 5, 2523,1986). Además, hay al menos cuatro codones alternativos de inicio (CUK, Leu) que proporcionan extensiones N terminales de 41, 46, 55 ó 133 aa, lo que resulta en proteínas de 22 kDa (196 aa), 22,5 kDa (201 aa), 24 kDa (210 aa) y 34 kDa (288 aa), respectivamente, que tienen el potencial de llevar a cabo la misma función (revisado en Okada-Ban et al., Int J Biochem Cell Biol, 32, 263, 2000).

- 25 Se ha mostrado que el núcleo de aproximadamente 120 aminoácidos de FGF (aminoácidos 66-190 de FGF-9, aminoácidos 30-152 de la isoforma de 155 aa de FGF-2) es crucial para la función de FGF. Los truncamientos que se extienden unos pocos aminoácidos cerca de o en el núcleo resultan en actividad biológica reducida, según se determina por ensayos de proliferación. Ahora se describe que las variantes de FGF con actividad biológica reducida son útiles para dirigir agentes bioactivos a tejidos específicos.
- 30

#### Secuencias

Las secuencias de aminoácidos se describen como sigue:

Secuencia de Aminoácidos de FGF2-N111X (SEQ ID NO:1)

35 **MAAGSITTLP ALPEDGGSGA FPPGHFKDPK RLYCKNGGFF LRIHPDGRVD  
GVREKSDPHI KLQLQAEERG VVSIKGVCAN RYLAMKEDGR LLASKCVTDE  
CFFFERLESN XYNTYRSRKY TSWYVALKRT GQYKLGSKTG PGQKAILFLP  
MSAKS**

en la que X es distinto de N y más preferiblemente se selecciona de R o G

Secuencia de Aminoácidos de FGF2-N111R (SEQ ID NO:2)

**MAAGSITTLP ALPEDGGSGA FPPGHFKDPK RLYCKNGGFF LRIHPDGRVD  
GVREKSDPHI KLQLQAEERG VVSIKGVCAN RYLAMKEDGR LLASKCVTDE  
CFFFERLESN RYNTYRSRKY TSWYVALKRT GQYKLGSKTG PGQKAILFLP  
MSAKS**

Secuencia de Aminoácidos de FGF2-N111G (SEQ ID NO:3)

40 **MAAGSITTLP ALPEDGGSGA FPPGHFKDPK RLYCKNGGFF LRIHPDGRVD  
GVREKSDPHI KLQLQAEERG VVSIKGVCAN RYLAMKEDGR LLASKCVTDE  
CFFFERLESN GYNTYRSRKY TSWYVALKRT GQYKLGSKTG PGQKAILFLP  
MSAKS**

Secuencia de Aminoácidos de FGF2(3,5Q)-N111X (SEQ ID NO:4)

MAQGGQITTLP ALPEDGGSGA FPPGHFKDPK RLYCKNGGFF LRIHPDGRVD  
GVREKSDPHI KLQLQAEERG VVSIKGVCAN RYLAMKEDGR LLASKCVTDE  
CFFFERLESN XYNTYRSRKY TSWYVALKRT GQYKLGSKTG PGQKAILFLP  
MSAKS

en la que X es distinto de N y más preferiblemente se selecciona de G o R

Secuencia de Aminoácidos de FGF2(3,SQ)-N111G (SEQ ID NO:5)

MAQGGQITTLP ALPEDGGSGA FPPGHFKDPK RLYCKNGGFF LRIHPDGRVD  
GVREKSDPHI KLQLQAEERG VVSIKGVCAN RYLAMKEDGR LLASKCVTDE  
CFFFERLESN GYNTYRSRKY TSWYVALKRT GQYKLGSKTG PGQKAILFLP  
MSAKS

5

Secuencia de Aminoácidos de FGF4-N165X 206 aa (SEQ ID NO:6)

MSGPGTAAVA LLPAVLLALL APWAGRGGAA APTAPNGTLE AELERRWESL  
VALSLARLPV AAQPKEAAVQ SGAGDYLLGI KRLRRLYCNV GIGFHLQALP  
DGRIGGAHAD TRDSLLELSP VERGVVSIFG VASRFFVAMS SKGKLYGSPF  
FTDECTFKEI LLPNXYNAYE SYKYPGMFIA LSKNGKTKKG NRVSPMTKVT  
HFLPRL

en la que X es distinto de N y más preferiblemente G

Secuencia de Aminoácidos de L55M-FGF4-N165X 152 AA humano (SEQ ID NO:7)

MARLPV AAQPKEAAVQ SGAGDYLLGI KRLRRLYCNV GIGFHLQALP  
DGRIGGAHAD TRDSLLELSP VERGVVSIFG VASRFFVAMS SKGKLYGSPF  
FTDECTFKEI LLPNXYNAYE SYKYPGMFIA LSKNGKTKKG NRVSPMTKVT  
HFLPRL

10

en la que X es distinto de N y más preferiblemente G

Secuencia de aminoácidos de W144X-FGF9 208 AA humano (SEQ ID NO:8) descrita en la solicitud de patente PCT WO 02/36732:

MAPLGEVGNV FGVQDAVPPG NVPVLPVDSP VLLSDHLGQS EAGGLPRGPA  
VTDL DHLKGI LRRRQLYCRT GFHLEIFPNG TIQGTRKDHS RFGILEFISI

AVGLVSIRGV DSGLYLGMNE KGELYGSEKL TQECVFREQF EENXYNTYSS  
NLYKHVDTGR RYYVALNKDG TPREGTRTKR HQKFTHFLPR PVD<sup>2</sup>PKVPEL  
YKDILSQS

15 en la que X es distinto de W y más preferiblemente se selecciona de G, R, E o V.

Secuencia de aminoácidos de L37M-W144X-FGF9 172aa (SEQ ID NO:9) descrita en la solicitud de patente PCT WO 02/36732:

MGQSEAGGLP RGPVTDLDH LKGILRRRQL YCRTGFHLEI FPNGTIQGTR  
KDHSRFGILE FISIAVGLVS IRGVDSGLYL GMNEKGELYG SEKLTQECVF  
REQFEENXYN TYSSNLYKHV DTGRRYYVAL NKDGTREGT RTKRHQKFTH  
FLPRPVD<sup>2</sup>PK VPELYKDILS QS

en la que X es distinto de W y más preferiblemente se selecciona de G, R, E o V

20 Secuencia de aminoácidos de R64M-FGF9 145 aa (SEQ ID NO:10) descrita en la solicitud de patente PCT WO 02/36732:

**MQLYCRTGFH LEIFPNGTIQ GTRKDHSRFG ILEFISIAVG LVSIRGVDSG  
LYLGMNEKGE LYGSEKLTQE CVFREQFEEN WYNTYSSNLY KHVDTGRRYY  
VALNKDGTTPR EGTRTKRHQK FTHFLPRPVD PDKVPELYKD ILSQS**

Secuencia de aminoácidos de R64M-FGF9-W144X 145 aa (SEQ ID NO:11)

**MQLYCRTGFH LEIFPNGTIQ GTRKDHSRFG ILEFISIAVG LVSIRGVDSG  
LYLGMNEKGE LYGSEKLTQE CVFREQFEEN XYNTYSSNLY KHVDTGRRYY  
VALNKDGTTPR EGTRTKRHQK FTHFLPRPVD PDKVPELYKD ILSQS**

en la que X es distinto de W y más preferiblemente se selecciona de G, R, E o V.

5 Secuencia de aminoácidos de FGF9-2 127 aa (SEQ ID NO:12) descrita en la solicitud de patente PCT WO 02/36732:

**MQLYCRTGFH LEIFPNGTIQ GTRKDHSRFG ILEFISIAVG LVSIRGVDSG  
LYLGMNEKGE LYGSEKLTQE CVFREQFEEN WYNTYSSNLY KHVDTGRRYY  
VALNKDGTTPR EGTRTKRHQK FTHFLPR**

Secuencia de aminoácidos de FGF9-2-W144X 127 aa (SEQ ID NO:13)

**MQLYCRTGFH LEIFPNGTIQ GTRKDHSRFG ILEFISIAVG LVSIRGVDSG  
LYLGMNEKGE LYGSEKLTQE CVFREQFEEN XYNTYSSNLY KHVDTGRRYY  
VALNKDGTTPR EGTRTKRHQK FTHFLPR**

en la que X es distinto de W y más preferiblemente se selecciona de G, R, E o V

10 Secuencia de aminoácidos de R64M-FGF9-N143X 145 aa (SEQ ID NO:14)

**MQLYCRTGFH LEIFPNGTIQ GTRKDHSRFG ILEFISIAVG LVSIRGVDSG  
LYLGMNEKGE LYGSEKLTQE CVFREQFEEX WYNTYSSNLY KHVDTGRRYY  
VALNKDGTTPR EGTRTKRHQK FTHFLPRPVD PDKVPELYKD ILSQS**

en la que X es distinto de N y más preferiblemente S.

Secuencia de aminoácidos de FGF9-2-N143X 127 aa (SEQ ID NO:15)

**MQLYCRTGFH LEIFPNGTIQ GTRKDHSRFG ILEFISIAVG LVSIRGVDSG  
LYLGMNEKGE LYGSEKLTQE CVFREQFEEX WYNTYSSNLY KHVDTGRRYY  
VALNKDGTTPR EGTRTKRHQK FTHFLPR**

15 en la que X es distinto de N y más preferiblemente S.

Secuencia de aminoácidos de FGF9-2-W144X-CNP(1-22) (SEQ ID NO:16)

**MQLYCRTGFH LEIFPNGTIQ GTRKDHSRFG ILEFISIAVG LVSIRGVDSG  
LYLGMNEKGE LYGSEKLTQE CVFREQFEEN XYNTYSSNLY KHVDTGRRYY  
VALNKDGTTPR EGTRTKRHQK FTHFLPRGGG GLSKGCFGLK LDRIGSMSGL  
GC**

en la que X es distinto de W y más preferiblemente se selecciona de G, R, E o V.

Secuencia de aminoácidos de CNP(1-22)-FGF9-2-W144X (SEQ ID NO:17)

**MGLSKGCFGL KLDRI SMSG LGC GGGGGG GQLYCRTGFH LEIFPNGTIQ  
GTRKDHSRFG ILEFISIAVG LVSIRGVDSG LYLGMNEKGE LYGSEKLTQE  
CVFREQFEEN XYNTYSSNLY KHVDTGRRYY VALNKDGTTPR EGTRTKRHQK  
FTHFLPR**

20

Las secuencias de polinucleótidos correspondientes son como sigue:

Secuencia del ADN de FGF2-N111X (SEQ ID NO:18)

ATGGCTGCCG	GGAGCATCAC	CACGCTGCCC	GCCCTTCCGG	AGGATGGCGG
CAGCGGCGCC	TTCCCGCCCG	GGCACTTCAA	GGACCCCAAG	CGGCTGTACT
GCAAAAACGG	GGGCTTCTTC	CTGCGCATCC	ACCCCGACGG	CCGAGTTGAC
GGGGTCCGGG	AGAAGAGCGA	CCCTCACATC	AAGCTACAAC	TTC AAGCAGA
AGAGAGAGGA	GTTGTGTCTA	TCAAAGGAGT	GTGTGCTAAC	CGGTACCTGG
CTATGAAGGA	AGATGGAAGA	T TACTGGCTT	CTAAATGTGT	TACGGATGAG
TGTTTCTTTT	TTGAACGATT	GGAATCTAAT	<u>NNNTACAATA</u>	CTTACCGGTC
TAGAAAATAC	ACCAGTTGGT	ATGTGGCATT	GAAACGAACT	GGGCAGTATA
AACTTGGTTC	CAAAACAGGA	CCTGGGCAGA	AAGCTATACT	TTTTCTTCCA
ATGTCTGCTA	AGAGCTGA			

en la que NNN es distinto de un codón que codifica Asn (AAT o AAC) o un codón de parada y es más preferiblemente un codón que codifica el aminoácido Gly o Arg.

Secuencia del ADN de FGF2-N111G (SEQ ID NO:19)

ATGGCTGCCG	GGAGCATCAC	CACGCTGCCC	GCCCTTCCGG	AGGATGGCGG
CAGCGGCGCC	TTCCCGCCCG	GGCACTTCAA	GGACCCCAAG	CGGCTGTACT
GCAAAAACGG	GGGCTTCTTC	CTGCGCATCC	ACCCCGACGG	CCGAGTTGAC
GGGGTCCGGG	AGAAGAGCGA	CCCTCACATC	AAGCTACAAC	TTC AAGCAGA
AGAGAGAGGA	GTTGTGTCTA	TCAAAGGAGT	GTGTGCTAAC	CGGTACCTGG
CTATGAAGGA	AGATGGAAGA	T TACTGGCTT	CTAAATGTGT	TACGGATGAG
TGTTTCTTTT	TTGAACGATT	GGAATCTAAT	<u>NNNTACAATA</u>	CTTACCGGTC
TAGAAAATAC	ACCAGTTGGT	ATGTGGCATT	GAAACGAACT	GGGCAGTATA
AACTTGGTTC	CAAAACAGGA	CCTGGGCAGA	AAGCTATACT	TTTTCTTCCA
ATGTCTGCTA	AGAGCTGA			

5

en la que NNN es un codón que codifica el aminoácido Gly (GGT, GGC, GGA, GGG).

Secuencia del ADN de FGF2-N111R (SEQ ID NO:20)

ATGGCTGCCG	GGAGCATCAC	CACGCTGCCC	GCCCTTCCGG	AGGATGGCGG
CAGCGGCGCC	TTCCCGCCCG	GGCACTTCAA	GGACCCCAAG	CGGCTGTACT
GCAAAAACGG	GGGCTTCTTC	CTGCGCATCC	ACCCCGACGG	CCGAGTTGAC
GGGGTCCGGG	AGAAGAGCGA	CCCTCACATC	AAGCTACAAC	TTC AAGCAGA
AGAGAGAGGA	GTTGTGTCTA	TCAAAGGAGT	GTGTGCTAAC	CGGTACCTGG
CTATGAAGGA	AGATGGAAGA	T TACTGGCTT	CTAAATGTGT	TACGGATGAG
TGTTTCTTTT	TTGAACGATT	GGAATCTAAT	<u>CGNTACAATA</u>	CTTACCGGTC
TAGAAAATAC	ACCAGTTGGT	ATGTGGCATT	GAAACGAACT	GGGCAGTATA
AACTTGGTTC	CAAAACAGGA	CCTGGGCAGA	AAGCTATACT	TTTTCTTCCA
ATGTCTGCTA	AGAGCTGA			

en la que N se selecciona de A, C, G o T

10 Secuencia del ADN de FGF2(3Q5Q)-N111X (SEQ ID NO:21)

ATGGCTCAXG	GGCA <del>X</del> ATCAC	CACGCTGCCC	GCCCTTCCGG	AGGATGGCGG
CAGCGGCGCC	TTCCCGCCCG	GGCACTTCAA	GGACCCCAAG	CGGCTGTACT
GCAAAAACGG	GGGCTTCTTC	CTGCGCATCC	ACCCCGACGG	CCGAGTTGAC
GGGGTCCGGG	AGAAGAGCGA	CCCTCACATC	AAGCTACAAC	TTC AAGCAGA
AGAGAGAGGA	GTTGTGTCTA	TCAAAGGAGT	GTGTGCTAAC	CGGTACCTGG
CTATGAAGGA	AGATGGAAGA	T TACTGGCTT	CTAAATGTGT	TACGGATGAG
TGTTTCTTTT	TTGAACGATT	GGAATCTAAT	<u>NNNTACAATA</u>	CTTACCGGTC
TAGAAAATAC	ACCAGTTGGT	ATGTGGCATT	GAAACGAACT	GGGCAGTATA
AACTTGGTTC	CAAAACAGGA	CCTGGGCAGA	AAGCTATACT	TTTTCTTCCA
ATGTCTGCTA	AGAGCTGA			

en la que los nucleótidos 9 y 15 se eligen independientemente de A o G y el codón codificado por NNN EN LA POSICIÓN 331-333 es distinto de un codón que codifica Asn (AAT o AAC) o un codón de parada y más preferiblemente codifica el aminoácido Gly o Arg.

Secuencia del ADN de FGF2(3Q5Q)-N111G (SEQ ID NO:22)

```

ATGGCTCAXG  GGCAXATCAC  CACGCTGCCC  GCCCTTCCGG  AGGATGGCGG
CAGCGGCGCC  TTCCCGCCCG  GGCAC TTCAA  GGACCCCAAG  CGGCTGTACT

GCAAAAACGG  GGGCTTCTTC  CTGCGCATCC  ACCCCGACGG  CCGAGTTGAC
GGGGTCCGGG  AGAAGAGCGA  CCCTCACATC  AAGCTACAAC  TTCAAGCAGA
AGAGAGAGGA  GTTGTGTCTA  TCAAAGGAGT  GTGTGCTAAC  CGGTACCTGG
CTATGAAGGA  AGATGGAAGA  T TACTGGCTT  C TAAATGTGT  TACGGATGAG
TGTTTCTTTT  TTGAACGATT  GGAATCTAAT  GGNTACAATA  CTTACCGGTC
TAGAAAATAC  ACCAGTTGGT  ATGTGGCATT  GAAACGAACT  GGGCAGTATA
AACTTGGTTC  CAAAACAGGA  CCTGGGCAGA  AAGCTATACT  TTTTCTTCCA
ATGTCTGCTA  AGAGCTGA
    
```

en la que los nucleótidos 9 y 15 se eligen independientemente de A o G y el N en la posición 333 se selecciona de A, C, G o T.

5 Secuencia del ADN de FGF4-N165X (SEQ ID NO:23)

```

ATGTCGGGGC  CCGGGACGGC  CGCGGTAGCG  CTGCTCCCGG  CGGTCTGCT
GGCCTTGCTG  GCGCCCTGGG  CGGGCCGAGG  GGGCGCCGCC  GCACCCACTG
CACCCAACGG  CACGCTGGAG  GCCGAGCTGG  AGCGCCGCTG  GGAGAGCCTG
GTGGCGCTCT  CGTTGGCGCG  CCTGCCGGTG  GCAGCGCAGC  CCAAGGAGGC
GGCCGTCCAG  AGCGGGCGCC  GCGACTACCT  GCTGGGCATC  AAGCGGCTGC
GGCGGCTCTA  CTGCAACGTG  GGCATCGGCT  TCCACCTCCA  GGCGTCCCC
GACGGCCGCA  TCGGCGGCGC  GCACGCGGAC  ACCCGGACA  GCCTGCTGGA
GCTCTCGCCC  GTGGAGCGGG  GCGTGGTGAG  CATCTTCGGC  GTGGCCAGCC
GGTTCTTCGT  GGCCATGAGC  AGCAAGGGCA  AGCTCTATGG  CTCGCCCTTC
TTCACCGATG  AGTGCACGTT  CAAGGAGATT  CTCCTTCCCA  ACXXXTACAA
CGCCTACGAG  TCCTACAAGT  ACCCCGGCAT  GTTCATCGCC  CTGAGCAAGA
ATGGGAAGAC  CAAGAAGGGG  AACCGAGTGT  CGCCCACCAT  GAAGGTCACC
CACTTCCTCC  CCAGGCTG
    
```

en la que XXX es distinto de un codón que codifica Asn (AAT o AAC) o un codón de parada y más preferiblemente codifica el aminoácido Gly (GGA, GGC, GGG, GGT).

Secuencia del ADN de L55M-FGF4-N165X (SEQ ID NO:24)

```

ATGGCGCGCC  TGCCGGTGCC  AGCGCAGCCC  AAGGAGGCGG  CCGTCCAGAG
CGGCGCCGGC  GACTACCTGC  TGGGCATCAA  GCGGCTGCGG  CGGCTCTACT
GCAACGTGGG  CATCGGCTTC  CACCTCCAGG  CGCTCCCCGA  CGGCCGCATC
GGCGGCGCGC  ACGCGGACAC  CCGCGACAGC  CTGCTGGAGC  TCTCGCCCGT
GGAGCGGGGC  GTGGTGAGCA  TCTTCGGCGT  GGCCAGCCGG  TTCTTCGTGG
CCATGAGCAG  CAAGGGCAAG  CTCTATGGCT  CGCCCTTCTT  CACCGATGAG
TGCACGTTCA  AGGAGATTCT  CCTTCCCAAC  GGNTACAACG  CCTACGAGTC
CTACAAGTAC  CCCGGCATGT  TCATCGCCCT  GAGCAAGAAT  GGGAAAGACCA
AGAAGGGGAA  CCGAGTGTGC  CCCACCATGA  AGGTCACCCA  CTTCTTCCCC
AGGCTG
    
```

10

en la que N se selecciona de A, C, G o T.

Secuencia del ADN de R64M-FGF9 (SEQ ID NO:25) descrita en la solicitud PCT WO 02/36732

**A**

```
TGCAGCTATA CTGCAGGACT GGATTTCACT TAGAAATCTT CCCCAATGGT
ACTATCCAGG GAACCAGGAA AGACCACAGC CGATTTGGCA TTCTGGAATT
TATCAGTATA GCAGTGGGCC TGGTCAGCAT TCGAGGCGTG GACAGTGGAC
TCTACCTCGG GATGAATGAG AAGGGGGAGC TGTATGGATC AGAAAAACTA
ACCCAAGAGT GTGTATTGAG AGAACAGTTC GAAGAAAACT GGTATAATAC
GTACTCGTCA AACCTATATA AGCACGTGGA CACTGGAAGG CGATACTATG
TTGCATTAAA TAAAGATGGG ACCCCGAGAG AAGGGACTAG GACTAAACGG
CACCAGAAAT TCACACATTT TTTACCTAGA CCAGTGGACC CCGACAAAGT
ACCTGAACTG TATAAGGATA TTCTAAGCCA AAGTTGA
```

Secuencia del ADN de R64M-FGF9-W144X (SEQ ID NO:26)

```
ATGTCGGGGC CCGGGACGGC CGCGGTAGCG CTGCTCCCGG CGGTCCTGCT
GGCCTTGCTG GCGCCCTGGG CGGGCCGAGG GGGCGCCGCC GCACCCACTG
CACCCAACGG CACGCTGGAG GCCGAGCTGG AGCGCCGCTG GGAGAGCCTG
GTGGCGCTCT CGTTGGCGCG CCTGCCGGTG GCAGCGCAGC CCAAGGAGGC
GGCCGTCCAG AGCGGCGCCG GCGACTACCT GCTGGGCATC AAGCGGCTGC
GGCGGCTCTA CTGCAACGTG GGCATCGGCT TCCACCTCCA GGCGCTCCCC
GACGGCCGCA TCGGCGGCGC GCACGCGGAC ACCCGCGACA GCCTGCTGGA
GCTCTCGCCC GTGGAGCGGG GCGTGGTGAG CATCTTCGGC GTGGCCAGCC
GGTTCTTCGT GGCCATGAGC AGCAAGGGCA AGCTCTATGG CTCGCCCTTC
TTCACCGATG AGTGCACGTT CAAGGAGATT CTCCTTCCCA ACXXXTACAA
```

5 en la que NNN es distinto de un codón que codifica Trp (TGG) o un codón de parada (TAA, TAG o TGA) y es más preferiblemente un codón que codifica el aminoácido Gly, Arg, Val o Glu.

Secuencia del ADN de FGF9-2 (SEQ ID NO:27) descrita en la solicitud PCT WO 02/36732

**A**

```
TGCAGCTATA CTGCAGGACT GGATTTCACT TAGAAATCTT CCCCAATGGT
ACTATCCAGG GAACCAGGAA AGACCACAGC CGATTTGGCA TTCTGGAATT
TATCAGTATA GCAGTGGGCC TGGTCAGCAT TCGAGGCGTG GACAGTGGAC
TCTACCTCGG GATGAATGAG AAGGGGGAGC TGTATGGATC AGAAAAACTA
ACCCAAGAGT GTGTATTGAG AGAACAGTTC GAAGAAAACT GGTATAATAC
GTACTCGTCA AACCTATATA AGCACGTGGA CACTGGAAGG CGATACTATG
TTGCATTAAA TAAAGATGGG ACCCCGAGAG AAGGGACTAG GACTAAACGG
CACCAGAAAT TCACACATTT TTTACCTAGA TGA
```

Secuencia del ADN de FGF9-2-W144X (SEQ ID NO:28)

**A**

```
TGCAGCTATA CTGCAGGACT GGATTTCACT TAGAAATCTT CCCCAATGGT
ACTATCCAGG GAACCAGGAA AGACCACAGC CGATTTGGCA TTCTGGAATT
TATCAGTATA GCAGTGGGCC TGGTCAGCAT TCGAGGCGTG GACAGTGGAC
TCTACCTCGG GATGAATGAG AAGGGGGAGC TGTATGGATC AGAAAAACTA
ACCCAAGAGT GTGTATTGAG AGAACAGTTC GAAGAAAACT NTTATAATAC
GTACTCGTCA AACCTATATA AGCACGTGGA CACTGGAAGG CGATACTATG
TTGCATTAAA TAAAGATGGG ACCCCGAGAG AAGGGACTAG GACTAAACGG
CACCAGAAAT TCACACATTT TTTACCTAGA TGA
```

10 en la que NNN es distinto de un codón que codifica Trp (TGG) o un codón de parada (TAA, TAG o TGA) y es más preferiblemente un codón que codifica el aminoácido Gly, Arg, Val o Glu.

Secuencia del ADN de R64M-FGF9-N143X (SEQ ID NO:29)

**A**

TGCAGCTATA	CTGCAGGACT	GGATTTCACT	TAGAAATCTT	CCCCAATGGT
ACTATCCAGG	GAACCAGGAA	AGACCACAGC	CGATTTGGCA	TTCTGGAATT
TATCAGTATA	GCAGTGGGCC	TGGTCAGCAT	TCGAGGCGTG	GACAGTGGAC
TCTACCTCGG	GATGAATGAG	AAGGGGGAGC	TGTATGGATC	AGAAAACTA
ACCCAAGAGT	GTGTATTGAG	AGAACAGTTC	GAAGAA <u>NNNT</u>	GGTATAATAC
GTACTCGTCA	AACCTATATA	AGCACGTGGA	CACTGGAAGG	CGATACTATG
TTGCATTAAA	TAAAGATGGG	ACCCCGAGAG	AAGGGACTAG	GACTAAACGG
CACCAGAAAT	TCACACATTT	TTTACCTAGA	CCAGTGGACC	CCGACAAAGT
ACCTGAACTG	TATAAGGATA	TTCTAAGCCA	AAGTTGA	

en la que NNN es distinto de un codón que codifica Asn (AAT, AAC) o un codón de parada (TAA, TAG o TGA) y es más preferiblemente un codón que codifica el aminoácido Ser.

Secuencia del ADN de FGF9-2-N143X (SEQ ID NO:30)

**A**

TGCAGCTATA	CTGCAGGACT	GGATTTCACT	TAGAAATCTT	CCCCAATGGT
ACTATCCAGG	GAACCAGGAA	AGACCACAGC	CGATTTGGCA	TTCTGGAATT
TATCAGTATA	GCAGTGGGCC	TGGTCAGCAT	TCGAGGCGTG	GACAGTGGAC
TCTACCTCGG	GATGAATGAG	AAGGGGGAGC	TGTATGGATC	AGAAAACTA
ACCCAAGAGT	GTGTATTGAG	AGAACAGTTC	GAAGAA <u>NNNT</u>	GGTATAATAC
GTACTCGTCA	AACCTATATA	AGCACGTGGA	CACTGGAAGG	CGATACTATG
TTGCATTAAA	TAAAGATGGG	ACCCCGAGAG	AAGGGACTAG	GACTAAACGG
CACCAGAAAT	TCACACATTT	TTTACCTAGA	<b>TGA</b>	

5

en la que NNN es distinto de un codón que codifica Asn (AAT, AAC) o un codón de parada (TAA, TAG o TGA) y es más preferiblemente un codón que codifica el aminoácido Ser.

Secuencia del ADN de FGF9-2-W144X-CNP(1-22) (SEQ ID NO:31)

**A**

TGCAGCTATA	CTGCAGGACT	GGATTTCACT	TAGAAATCTT	CCCCAATGGT
ACTATCCAGG	GAACCAGGAA	AGACCACAGC	CGATTTGGCA	TTCTGGAATT
TATCAGTATA	GCAGTGGGCC	TGGTCAGCAT	TCGAGGCGTG	GACAGTGGAC
TCTACCTCGG	GATGAATGAG	AAGGGGGAGC	TGTATGGATC	AGAAAACTA
ACCCAAGAGT	GTGTATTGAG	AGAACAGTTC	GAAGAA <u>AAACN</u>	<u>NNT</u> TATAATAC
GTACTCGTCA	AACCTATATA	AGCACGTGGA	CACTGGAAGG	CGATACTATG
TTGCATTAAA	TAAAGATGGG	ACCCCGAGAG	AAGGGACTAG	GACTAAACGG
CACCAGAAAT	TCACACATTT	TTTACCTAGA	GGAGGGGGAG	GTCTGTCCAA
AGGTTGCTTC	GGCCTCAAGC	TGGACCGAAT	CGGCTCCATG	AGCGGCCTGG GATGT

10 en la que NNN es distinto de un codón que codifica Trp (TGG) o un codón de parada (TAA, TAG o TGA) y es más preferiblemente un codón que codifica el aminoácido Gly, Arg, Val o Glu.

Secuencia del ADN de CNP(1-22-FGF9-2-W144X) (SEQ ID NO:32)

ATGGGTCTGT CCAAAGGTTG CTTGGCCCTC AAGCTGGACC GAATCGGCTC  
 CATGAGCGGC CTGGGATGCG GAGGGGGAGG GGGAGGGGGA GGGCAGCTAT  
 ACTGCAGGAC TGGATTTAC TTAGAAATCT TCCCCAATGG TACTATCCAG  
 GGAACCAGGA AAGACCACAG CCGATTTGGC ATTCTGGAAT TTATCAGTAT  
 AGCAGTGGGC CTGGTCAGCA TTCGAGGCGT GGACAGTGGG CTCTACCTCG  
 GGATGAATGA GAAGGGGGAG CTGTATGGAT CAGAAAACT AACCCAAGAG  
 TGTGTATTCA GAGAACAGTT CGAAGAAAAC NNNTTATAATA CGTACTCGTC  
 AAACCTATAT AAGCACGTGG ACACTGGAAG GCGATACTAT GTTGCAATTA  
 ATAAAGATGG GACCCCGAGA GAAGGGACTA GGACTAAACG GCACCAGAAA  
 TTCACACATT TTTTACCTAG A

15 en la que NNN es distinto de un codón que codifica Trp (TGG) o un codón de parada (TAA, TAG o TGA) y es más preferiblemente un codón que codifica el aminoácido Gly, Arg, Val o Glu.

Las secuencias de aminoácidos para todos los FGF humanos conocidos (HFGF1-HFGF23) se presentan en la Figura 1. La secuencia de la proteína FGF-9 de ratón (MFGF9) se muestra sólo para propósitos comparativos.

Los principios de la invención se demuestran mediante los ejemplos no limitativos siguientes.

EJEMPLO 1 Expresión de las variantes de FGF usando un sistema de alta expresión

Construcción de la Construcción p89Bluescript (p89BS)

- 5 La construcción de p89BS se realizó como se describe en WO 02/022779 en tramitación con la presente. Los genes que codifican las proteínas de la presente invención se ligaron en la digestión NdeI-BamHI de la construcción p89BS y se transformaron en células de *E. coli*, tales como JM109, TG1, TG2, DH $\alpha$  y XL1 azul.

Construcción de las variantes de FGF

- 10 La construcción de las variantes de FGF-2, FGF-4 y FGF-9 se realizó usando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se realizaron tres reacciones de PCR constitutivas, en las que la variación o variaciones se introdujeron en el gen amplificando los fragmentos de ADN de ambos extremos del sitio o sitios de la mutación.

Los cebadores y el protocolo usados para las variantes de FGF-2 humano fueron los siguientes:

HF2-dir (SEQ ID NO:58)	5' GGAATTCATATGGCTGAAGGGGAAATC
HF2-inv (SEQ ID NO:59)	5' CGGGATCCTCAGCTCTTAGCAG
N111G-dir (SEQ ID NO:60)	5' GATTGGAATCTAATGGCTACAATACTTAC
N111G-inv (SEQ ID NO:61)	5' GTAAGTATTGTAGCCATTAGATTCCAATC
N111R-dir (SEQ ID NO:62)	5' GATTGGAATCTAATGGCTACAATACTTAC
N111R-inv (SEQ ID NO:63)	5' GTAAGTATTGTAGCGATTAGATTCCAATC
3,5Q-dir (SEQ ID NO:64)	5' GGAATTCATATGGCTCAAGGGCAAATCACCACGCTG

(CATATG-NdeI, GGATCC-BamHI, GAA17C-EcORI, sitios de restricción para la clonación)

1. PCR para el dominio 5': Se usaron los cebadores siguientes: HF2-dir ó 3Q5Q-dir y N111G/R-inv
- 15 PCR para el dominio 3': Se usaron los cebadores siguientes: N111G/R-dir y HF2-inv en el molde de FGF-2 humano (hFGF2) clonado en el vector p80Bs.
2. Para el gen completo se usaron los cebadores siguientes: HF2-dir ó 3,5Q-dir y HF2-inv en el ADN de los dominios 5' y 3', anteriores.
- 20 Los cebadores y protocolo, según se describe en la solicitud de patente PCT WO 02/36732, usados para preparar las variantes de FGF-9 humano fueron los siguientes:

W144G-dir (SEQ ID NO:65)	5'- CGAAGAAAACGGGTATAATACGTAC
W 144G-inv (SEQ ID NO:66)	5' - GTACGTATTATACCCGTTTTCTTCG
W144R-dir (SEQ ID NO:67)	5'- CGAAGAAAACCGGTATAATACG
W144R-inv (SEQ ID NO:68)	5' - CGTATTATACCCGTTTTCTTCG
W144V-dir (SEQ ID NO:69)	5' - CGAAGAAAACGTGTATAATACG

## ES 2 378 305 T3

W144V-inv (SEQ ID NO:70)	5' - CGTATTATACACGTTTTCTTCG
W144E-dir (SEQ ID NO:71)	5' - CGAAGAAAACGAGTATAATACG
W144E-inv (SEQ ID NO:72)	5'- CGTATTATACTCGTTTTCTTCG
W144A-dir (SEQ ID NO:73)	5' - CGAAGAAAACGCGTATAATACG
W 144A-inv (SEQ ID NO:74)	5' - CGTATTATACGCGTTTTCTTCG
W144N-dir (SEQ ID NO:75)	5'- CGAAGAAAACAATTATAATACG
W144N-inv (SEQ ID NO:76)	5' - CGTATTATAATTGTTTTCTTCG
FGF9-Paradainv (SEQ ID NO:77)	5' AGCTGGATCCTCAACTTTGGCTTAGAATATCC
R64M-FGF9-dir (SEQ ID NO:78)	5'GGGAATTCCATATGCAGCTATACTGCAGGACTG
N143S-dir (SEQ ID NO:79)	5' -GTTCGAAGAAAGCTGGTATAATATACG
N143S-inv (SEQ ID NO:80)	5' -CGTATTATACCAGCTTTCTTCGAAC

Por ejemplo:

W144G-dir codifica la secuencia 5' a 3' de la mutación Trp144 a Gly en FGF-9.

W 144G-inv codifica la secuencia 3' a 5' de la mutación Trp144 a Gly en FGF-9.

5 W144R-dir codifica la secuencia 5' a 3' de la mutación Trp144 a Arg en FGF-9.

W144R-inv codifica la secuencia 3' a 5' de la mutación Trp144 a Arg en FGF-9.

N143S-dir codifica la secuencia 5' a 3' de la mutación Asn143 a Ser en FGF-9.

N143S-dir codifica la secuencia 3' a 5' de la mutación Asn143 a Ser en FGF-9.

10 Las condiciones de PCR fueron como sigue: la temperatura de hibridación fue 54°C seguido de elongación a 72°C durante 30 ciclos. El fragmento de PCR purificado se digirió con NdeI y BamHI y se ligó en el vector p89BS.

### Variante de FGF-4

Para sintetizar las variantes de FGF-4 humano, FGF4-N165G y L55M-FGF4-N165G, se usaron las combinaciones de los cebadores de PCR siguientes:

L55M-hF4-dir (SEQ ID NO:81)	5' ACGTCATATGTTGGCGCGCCTGCCGGTG
hF4-inv (SEQ ID NO:82)	5' ACGTGGATCCTCACAGCCTGGGGAGGAAG
N165R-dir (SEQ ID NO:83)	5' GATTCTCCTTCCCAAC <b>AGG</b> TACAACGCCTACGAG
N165R-inv (SEQ ID NO:84)	5' CTCGTAGGCGTTGTACCTGTTGGGAAGGAGAATC

5 L55M-hF4-dir y N165G-inv se usaron para amplificar el dominio 5' de FGF-4 humano e incorporar una Met en la posición 55 y una Gly en la posición 165. Los cebadores hF4-inv y N165G-dir se usaron para amplificar el dominio 3' de FGF-4 e incorporar la Gly en la posición 165. Los fragmentos amplificados se combinaron y sirvieron como molde para una reacción de PCR adicional usando L55M-F4-dir y hF4-inv. Las condiciones de PCR fueron como sigue 8 ciclos con hibridación a 50°C, elongación a 72°C seguido de 17 ciclos con hibridación a 60°C, elongación a 72°C. El fragmento de PCR se digirió con NdeI y BamHI, se purificó en gel y se ligó en el vector p80BS. Las bases en negrita, subrayadas en la SEQ ID NO:81 codifican el aminoácido sustituido.

Purificación de proteínas

10 Los plásmidos de expresión recién construidos se transfectaron en bacterias JM109 competentes, se sembraron en placas de agar 2YT suplementadas con 200ug/ml de ampicilina y se dejaron crecer ON (toda la noche) a 37°C. Una única colonia se creció ON a 37°C en un matraz de dos litros que contenía 330ml de medio TB125 (Tryptona 5 gr/L, Extracto de levadura 30 gr/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,31 gr/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12,5 gr/L, Glicerol 5 gr/L) suplementado con 200ug/ml de ampicilina. La suspensión bacteriana se centrifugó a 4.000 rpm (4°C) durante 15 minutos y el medio de desechó. El sedimento bacteriano se suspendió en 25 ml de tampón 1x PBS que contenía inhibidores de proteasas, se sonicó en hielo y se centrifugó a 10.000 rpm (4°C) durante 15 minutos. El sobrenadante de proteínas se recogió y se añadieron 3 ml de suspensión de lechos de heparina-Sefarosa® y se agitó suavemente durante 6 horas a 4°C. Los lechos se cargaron en una columna, se lavó extensivamente con tampón PBS que contenía 0,3M NaCl, y se eluyó en 7 ml PBS que contenía 2-2,5M NaCl. Las proteínas variantes de FGF se dializaron frente a 1x PBS y se volvieron a purificar en FPLC usando una columna heparina Sefarosa® (HiTrap®Heparin, Amersham Pharmacia biotech) con un gradiente lineal de 0-2,5M NaCl (en PBS-0,05% CHAPS) en el mismo tampón de diálisis. Las proteínas purificadas se almacenaron posteriormente a -70°C. Obsérvese que las variantes de FGF-9 se eluyeron con 2,5 M NaCl, mientras que las variantes de FGF-2 se eluyeron con 2 M NaCl.

EJEMPLO 2. Preparación de variantes de FGF truncadas

25 Los mutantes truncados se prepararon por PCR, en la que los cebadores ejemplares usados se listan en la presente memoria a continuación:

35421(SEQ ID NO:85)	5' -GGCCCTAGGTCATCTAGGTAATAAATGTGTG
35422(SEQ ID NO:86)	5' -GGGAATTCCATATGCAGCTATACTGCAGGACTG
29522(SEQ ID NO:87)	5' -AGCTGGATCCTCAACTTTGGCTTAGAATATCC
40869(SEQ ID NO:88)	5' -CGATACGTACATATGCACTTAGAAATCTTC

En la que:

- 35421 se usó para introducir un codón de parada (Pro191Parada) y un sitio de la enzima de restricción BamHI para la construcción de las variantes FGF9-2 y FGF9-L72M;
- 30 35422 se usó para introducir un codón de inicio y un sitio de la enzima de restricción NdeI para la construcción de las variantes R64M-FGF9 y FGF9-2;
- 29522 se usó para introducir el codón de inicio (R64M) y un sitio de restricción Bam HI para la construcción de la variante R64M-FGF9;
- 35 40869 se usó para introducir un codón de inicio (L72M) y un sito de la enzima de restricción BamHI para la construcción de la variante FGF9-L72M.

Los fragmentos de PCR de los nuevos mutantes sintetizados en métodos conocidos en la técnica, se digirieron con las enzimas de restricción Nde I y BamHI y se clonaron en p89BS, formando construcciones de ADN que se introdujeron en células *E. coli* TG-1 electrocompetentes.

40 La Figura 5A representa el patrón de electroforesis de varias de las variantes preferidas en SDS-PAGE. El carril 1 contiene los marcadores de peso molecular [Lisozima (20,7kDa), Inhibidor de tripsina de soja (28,8kDa), Anhidrasa carbónica (34,3kDa), Ovoalbúmina (50kDa)]; El carril 2 contiene FGF-9 nativo; El carril 3 contiene una variante de 172

aa; El carril 4 contiene una variante de 164 aa; El carril 5 contiene la variante R64M-FGF9 (145 aa); El carril 6 contiene la variante FGF9-2.

### Ejemplo 3. Unión de las variantes de FGF a líneas celulares FDCP transfectadas con FGFR

5 La línea celular FDCP es una línea celular murina inmortalizada dependiente de interleuquina 3 (IL-3) con origen en la médula ósea, mielocítica que no expresa Receptores de FGF (FGFR) endógenos. Después de la transfección con ADNc de FGFR, la línea celular FDCP presenta una respuesta proliferativa dependiente de la dosis a FGF que puede reemplazar la dependencia de IL-3. Las células FDCP transfectadas con FGFR pueden usarse por lo tanto para cribar FGF variantes para inhibidores específicos, activadores o para señalización de FGFR. La respuesta de las células FDCP a varios ligandos se cuantifica por un ensayo de proliferación celular con reactivo XTT (Kit de Proliferación Celular, Biological Industries Co.). El método se basa en la capacidad de las enzimas mitocondriales para reducir las sales de tetrazolio en un compuesto colorogénico, que puede cuantificarse y es indicativo de la viabilidad celular.

10 Específicamente, las células FDCP que expresan de manera estable FGFR3-IIIc, isoformas de FGFR3-IIIb, FGFR2IIIc o FGFR1 se crecieron en "medio completo" (Medio Iscove que contiene 2ml glutamina, 10% FCS, 100ug/ml penicilina, 100ug/ml estreptomycin) suplementado con 5ug/ml de heparina y 10ng/ml de FGF. Las células se dividieron cada 3 días y se mantuvieron en cultivo durante hasta un mes. Un día antes del experimento, las células se dividieron. Antes del experimento, las células se lavaron 3 veces (1.000rpm, 6 min) con medio completo. Las células se resuspendieron y se contaron con Azul de Tripán. Veinte mil ( $2 \times 10^4$ ) células se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos en 50ul de medio completo que contiene heparina. El medio condicionado que contiene FGF parental de tipo salvaje o las variantes a distintas concentraciones con heparina se añadieron en un volumen adicional de 50ul de medio completo para llevar el volumen final a 100ul. La placa se incubó durante 48 horas a 37°C. Para ensayar la proliferación celular, se añadieron 100ul de reactivo PMS a 5 ml de reactivo XTT y se mezcló bien (según el protocolo del fabricante). Se alicuotaron 50ul de la última disolución en cada pocillo y las placas se incubaron a 37°C durante 4 horas y el color desarrollado se leyó con un espectro-lector de ELISA a  $A_{490nm}$ .

20 En estos experimentos las células FDCP que expresan las isoformas de FGFR3 FGFR#IIIb y FGFR3IIIc, FGFR2 o FGFR1 se crecieron en presencia de distintas concentraciones de las variantes de FGF-2 y FGF-4.

#### Resultados

Las Figuras 2A, 2B, 3A y 4 representan el nivel de mitogenicidad y la especificidad de receptor de una muestra de las variantes de la invención. FGF-2 o FGF-4 de tipo salvaje (nativo, parental) están presentes como control en los ensayos.

30 Las Figuras 2A y 2B muestran el incremento en la mitogenicidad que rinde la variante FGF2-N111R en células que expresan FGFR1 y FGFR3IIIc.

La Figura 3A muestra el incremento en la mitogenicidad que rinde la variante FGF2(3,5Q)-N111G (formas cerradas) en células que expresan FGFR1 y FGFR3IIIc. El FGF-2 de tipo salvaje se representa por formas abiertas. La Figura 3B muestra la actividad de la misma variante en un experimento diferente en células que expresan FGFR1, FGFR2, FGFR3IIIb o FGFR3IIIc. A partir de estos ensayos se calculó la CE50 (concentración eficaz) de la variante FGF2(3,5Q)-N111G. En células que expresan FGFR1 la CE50 varía de aproximadamente 0,35 ng/ml a 1,0 ng/ml y en células que expresan FGFR3IIIc la CE50 varía de aproximadamente 0,3 ng/ml a 0,65 ng/ml. La CE50 de la proteína FGF-2 de tipo salvaje es aproximadamente 2,65 ng/ml en células FGFR1 y 4,2 ng/ml en células FGFR3IIIc.

40 La Figura 4 muestra la dependencia de la variante FGF2(3,5Q)-N111G de heparina para los diferentes tipos de receptores. El eje de las x representa una concentración creciente de heparina, la concentración de FGF2v fue constante a 10 ng/ml.

La Figura 5 muestra la inducción de mitogénesis que rinde la variante L55M-FGF4-N165G en células FDCP que expresan FGFR1, FGFR2 y FGFR3IIIc. El FGF4 de tipo salvaje es un inductor débil de la proliferación en células FGFR3 mientras que la variante L55M-FGF4-N165G se ha convertido en un mitógeno potente.

45 La Figura 6B muestra el nivel reducido de proliferación inducido por R64M-FGF9 tanto en células FGFR3IIIc como FGFR1 comparado con FGF-9 parental. La especificidad de receptor aumentada para FGFR3 permite el uso de esta variante para dirigir a este receptor específico.

La Figura 7 muestra los resultados de las variantes R64M-FGF9 y FGF9-2 en un ensayo de unión como se describe en el Ejemplo 4. R64M-FGF9 y FGF9-2 parece que funcionan como antagonistas de FGF-9.

50

Ejemplo 4. Ensayo de Unión de las Variantes de FGF Truncadas a Dímero de Receptor de FGF Soluble

La unión de proteínas FGF a diferentes receptores de FGF se determina midiendo el grado de competición para la unión a diferentes tipos de proteínas FGFR entre una proteína FGF radioyodada y varias proteínas no marcadas, o por la unión directa de FGF radioyodados a varias proteínas receptoras. Los estudios de unión se confirmaron por entrecruzamiento químico del FGF radioyodado a receptores solubles en presencia y ausencia de FGF no marcado en exceso.

La heparina de sodio de mucosa intestinal porcina (PM-heparina) se obtuvo de Hepar Industries (Franklin, Ohio). KGF se obtiene de UBI (Lake Placid, N.Y.). <sup>125</sup>I se adquirió en Amersham (Buckinghamshire, Inglaterra). Los FGF se yodaron usando cloramina T. La disolución salina contiene 0,05% tripsina, 0,01 M fosfato de sodio y 0,02% EDTA (STV). Las placas de cultivo tisular fueron de Falcon Labware Division, Becton Dickinson (EEUU), las placas de cultivo tisular de cuatro pocillos de Nunc (Roskilde, Dinamarca).

Las proteínas receptoras de FGF solubles se construyeron clonando la región extracelular del receptor 1 de FGF murino (FGFR-1; flg), receptor 2 de FGF (FGFR-2, bek) o el receptor de KGF (FGFR3(IIIb) o FGFR3mc; K-sam) en el vector de expresión fosfatasa alcalina-etiqueta, que codifica una forma secretada de la fosfatasa alcalina de placenta (AP). Los plásmidos receptor de FGF fosfatasa alcalina (FRAP) se cotransfectaron en células NIH 3T3 por electroporación con un gen de resistencia a la neomicina seleccionable. Las colonias se seleccionaron en G418 (600 µg/ml) y se cribaron para actividad de la enzima AP secretada en el medio condicionado. Las colonias que produjeron un alto nivel de actividad AP (2 a 4 unidades A<sub>405</sub>/min/ml) se usaron para producir medio condicionado para los ensayos de unión.

Los componentes de la mezcla de reacción de unión al receptor soluble incluyeron medio condicionado FRAP (0,24 unidades DO/min), 2 ng/ml <sup>125</sup>I-FGF y 200 ng/ml heparina. El complejo ternario FGF:heparina:FRAP se inmunoprecipita con 20 µl de una suspensión de sólidos 1:1 de anticuerpos monoclonales anti-AP acoplados con proteína A Sefarosa®. Todos los componentes se mezclaron temperatura ambiente. El volumen total se ajustó a 200 µl por adición de DMEM que contiene 0,1% albúmina de suero bovino. Se dejó que se produjera la unión durante 1 a 2 horas a 24°C, después de lo cual el complejo de receptor unido o el ligando se recuperó por centrifugación a 4°C. (10 s a 2.000x g). El material sedimentado se lavó dos veces con 500 µl de un tampón enfriado en hielo que contiene HEPES (20 mM), NaCl (150 mM), glicerol (10%) y Tritón®X-100 (1%). La unión de <sup>125</sup>I-FGF se cuantificó contando las muestras en un contador gamma. Alternativamente, se determina la actividad de la enzima AP de la proteína FRAP transfiriendo el receptor FRAP unido a heparina-Sefarosa® a una placa de microtitulación de fondo plano en un volumen de 50 µl de PBS. La reacción se inicia por adición de sustrato (50 µl de disolución 2x de tampón de ensayo de AP que contiene 2M dietanolamina, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM homoarginina y 12 mM fosfato de p-nitrofenilo). La reacción se sigue a temperatura ambiente a 405 nm en un lector de microplacas de cinética.

La unión al receptor se determinó cuantificando la liberación de FGF marcado de los receptores. Brevemente, el FGF unido a los sitios de baja afinidad del heparán sulfato se libera de la superficie celular por una incubación de 5 minutos con una disolución enfriada en hielo que contiene 1,6M NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,4 y la cantidad de radiactividad liberada se determina en un contador gamma. El FGF unido a los receptores de alta afinidad se disoció por una extracción con 2M NaCl (20 mM tampón acetato, pH 4,0) y se cuantifica el FGF marcado liberado.

Se realizaron experimentos de entrecruzamiento químico a temperatura ambiente en un volumen de 20 µl en tubos de microcentrífuga de 0,5 ml siliconizados. Las mezclas de reacción que contienen el receptor de FGF inmovilizado por anticuerpos monoclonales anti-AP acoplados a proteína A Sefarosa® se añadieron para proporcionar una concentración final de 0,15 mM y la mezcla se incubó durante 30 minutos adicionales. La reacción se paró por adición de 1 ml de 200 mM etanolamina-HCl (pH 8,0) durante 30 min. Las mezclas de reacción se diluyeron 1:1 con 2x tampón de carga de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y se sometieron a electroforesis en un gel SDS-12% poliácridamida. Los FGF entrecruzados con el receptor de FGF se detectaron por autorradiografía en película Kodak XAR.

Ejemplo 5. Efectos de las variantes de FGF en el crecimiento femoral

Se realizan cultivos de hueso femoral extirpando las extremidades posteriores de ratones de tipo salvaje. Las extremidades se limpian cuidadosamente del tejido circundante (piel y músculos) y se exponen los fémures. Los fémures se toman y se limpian adicionalmente de restos de tejido y ligamentos. Los fémures se miden para su longitud inicial, usando un binocular con una regla micrométrica ocular. Los huesos se crecen en 1 ml de medio con FGF-9, variantes de FGF-9, proteínas de fusión o conjugados de direccionamiento FGF-9, FGF-2 o variantes de FGF-2 en una placa de cultivo tisular de 24 pocillos. El medio de crecimiento es α-MEM suplementado con penicilina (100 unidades/ml), estreptomina (0,1 mg/ml) y Nistatina (12,5 unidades/ml). Además, el medio contiene BSA (0,2%), β-glicerofosfato (1 mM) y ácido ascórbico recién preparado (50 µg/ml). Los huesos se cultivan durante 15 días. Las medidas de la longitud del hueso y el reemplazo del medio se realizan cada tres días.

Al final de los experimentos, la velocidad de crecimiento de los huesos se determina a partir de la pendiente de un ajuste de regresión lineal de las medidas de la longitud obtenidas desde el día 3 al 12. Las unidades proporcionadas pueden convertirse en longitud, 40 unidades = 1 mm.

Ejemplo 6. Efecto de las variantes de FGF-2 en la cicatrización de fractura ósea

5 Se usan modelos animales adecuados para crear osteotomías bilaterales para demostrar la eficacia de las nuevas variantes de la presente invención. En un modelo de conejo se crea una osteotomía de 6 mm en Conejos de Nueva Zelanda según el Comité de Cuidado Animal de la Universidad Hebrea. Se eligió el cúbito porque sólo soporta un peso ligero y permite la creación de un defecto óseo sin requerir una escayola u otro tratamiento de inmovilización. Además, este hueco constituye un defecto que se cicatriza espontáneamente que permite la evaluación del agente ensayado. Los  
10 índices principales de cicatrización de fractura son la duración acelerada de la cicatrización y la formación de callo. Los compuestos de ensayo consisten en variantes de FGF-2 en un andamio polimérico que facilita el crecimiento óseo.

Procedimiento quirúrgico:

15 Los animales se anestesiaron según el protocolo estándar. La formación de huecos se realiza en el hueso Cúbito medio. Un volumen estándar de 0,2 ml de formulación de tratamiento se pone en el área del hueco en cada extremidad y la fractura se cierra. Los animales se tratan con analgésicos durante 3 días después de la operación. La duración del experimento es 6 semanas.

Tiempo de cicatrización y evaluación de la calidad

20 Evaluación del tiempo de cicatrización: la calificación de rayos X proporciona una evaluación del estado de la cicatrización de la fractura. Los conejos se irradiaron con rayos X una semana sí y otra no durante 5 semanas después de la cirugía. Dos cirujanos ortopédicos puntuaron los rayos X de manera ciega según el protocolo de escala de calificación estándar.

25 Evaluación de la calidad: al final del experimento los conejos se sacrifican y el área de la fractura se envía para evaluación histológica y de fuerza mecánica. La histología se puntúa por el patólogo para evaluación de los cambios histológicos durante el proceso de cicatrización usando métodos de tinción estándar, usando hematoxilina y eosina para el citoplasma y el núcleo. También se aplica tinción con Índigo-Carmín para la detección de callo recién generado. La evaluación de la fuerza mecánica se realiza usando el método de "flexión en 4 puntos".

Los grupos de tratamiento son: Osteotomía sin tratamiento, Osteotomía tratada con andamio polimérico solo, Osteotomía tratada con andamio que contiene FGF-2 y una osteotomía tratada con andamio que contiene la variante de FGF-2, FGF2(3,5Q)-NIIIG.

30 Puntuación de rayos X

- 0 - Sin callo
- 1 - Respuesta de callo primario en un extremo del hueso
- 2 - Respuesta de callo primario en ambos extremos del hueso
- 3 - Unión de callo externa parcial
- 35 4 - Unión de callo externa completa
- 5 - <30% de cierre de hueco
- 6 - >30% de cierre de hueco
- 7 - Cierre de hueco completo
- 8 - Remodelado de callo parcial
- 40 9 - Remodelado de callo completo

**Cálculo del Relleno del Hueco:**

$(A/A+B) \times 100 = \% \text{ relleno del hueco}$



Ejemplo 7. Eficacia de las Variantes de FGF en Osteogénesis por Distracción

5 La osteogénesis por distracción es un método útil para el alargamiento óseo de las extremidades en estatura corta y para el tratamiento de defectos óseos extensos. Se han desarrollado varios procedimientos para el alargamiento óseo para usarse en clínica. Los problemas encontrados con el uso de esta técnica incluyen un tiempo de cicatrización prolongado y complicaciones tales como no unión o calidad baja del hueso regenerado.

10 La velocidad máxima de elongación usada en el procedimiento actual de elongación de extremidades, mientras se mantiene una cicatrización y reconstitución apropiadas del hueso, es 1 mm/día. Las velocidades de elongación más rápidas han resultado en ausencia de fusión o en la formación de hueso débil que se rompe fácilmente o que no puede soportar el peso corporal. En este proceso, se realizarán condiciones extremas de elongación (1,5 mm/día) con el fin de observar un efecto más significativo de los compuestos añadidos sobre el basal de la cicatrización natural.

Los objetivos del experimento son evaluar la calidad de la formación ósea, tiempo de la formación ósea y seguridad después de la elongación usando un andamio de fosfato de calcio (CaP) en el que está incluida la variante de FGF2.

Brazos de Tratamiento:

Control: 5 corderos (5 extremidades), sin tratamiento

15 Tratamiento 2: 5 corderos (5 extremidades): CaP solo

Tratamiento 3: 5 corderos (5 extremidades): CaP con variante de FGF-2

Materiales y métodos:

Los corderos se asignan aleatoriamente en uno de los cinco brazos de tratamiento.

El alargamiento quirúrgico del fémur ligero se realiza en 25 corderos con una edad de 3 a 4 meses.

20 Anestesia y pre-medicación:

Se proporcionó anestesia general sin intubación endotraqueal. Se proporciona atropina intramuscular como premedicación (0,5 mg/kg) y se administra por vía intravenosa tiopentona de sodio-2,5% (10-15 mg/kg), Fentanil® (0,0015 mg/kg) y Diazepam® (0,2 mg/kg).

Fijación:

25 Se pone un fijador externo monolateral (Monotube-Triax®, Stryker Trauna, Génova, Suiza) con cuatro pernos, dos proximales y dos distales en cada una de sus abrazaderas de pernos, de manera que los pernos se mantienen lejos de las placas de crecimiento y la superficie de la articulación. La osteotomía se realiza usando una sierra neumática.

Alargamiento:

El alargamiento empieza siete días después de la cirugía para todos los grupos de tratamiento:

30 El alargamiento continúa hasta que la extremidad se ha alargado 4,5 cm. El periodo total de elongación dura 30 días a una velocidad de 1,5 mm/día empezando el 8º día después de la cirugía.

Tratamiento

Los corderos se asignan aleatoriamente en uno de los cuatro brazos de tratamiento. Todos los tratamientos tienen lugar durante el periodo de consolidación, en el día 44.

35 *Tratamiento 1* - Control - Para evaluar el efecto durante el periodo de consolidación, los animales permanecen sin tratamiento hasta el final del periodo del ensayo.

*Tratamiento 2* - Para evaluar el efecto de CaP solo durante el periodo de consolidación, se administrará una vez, una semana después de haber completado la elongación.

40 *Tratamiento 3* - Para evaluar el efecto de la proteína variante durante el periodo de consolidación, CaP con la variante de FGF-2, FGF2-N111G o FGF2(3,5Q)-N111G se administra una vez, una semana después de haber completado la elongación.

Seguimiento:

Los animales están en un área restringida durante la duración de todo el experimento y se les permite alimentarse y pasear ad libitum en su jaula. Los animales se pesan a intervalos fijados y se monitoriza su estado general.

5 Para estudiar la formación ósea en el hueso huésped, se usan cuatro fluorocromos diferentes como marcadores óseos, administrados IM, según el programa siguiente: una semana después de la cirugía: calceína (verde) (Sigma®); dos semanas después de la cirugía: alizarina (rojo) (Sigma®); tres semanas después de la cirugía: xilenol (naranja) (Fluka®) y tres días antes del sacrificio se proporcionará oxitetraciclina (Duhaciclina®). Se realiza la técnica Spalteholz después de la inyección intra-arterial de azul Berlín estudiado a lo largo de la arteria femoral antes del sacrificio para analizar la vascularización del callo alargado en cada grupo.

10 Finalización:

Los animales se sacrifican tres meses después de la cirugía inicial por inyección IV de 5 meq de KCl, después de anestesia con pentobarbital de sodio (1,5 mg/kg de peso).

Evaluación de la eficacia:

15 El éxito se determina en términos de tiempo de cicatrización y calidad del hueso obtenidos después de la elongación y tratamiento con FGF2 o la variante de FGF2 y si no se han observado efectos adversos importantes.

Rayos X

El progreso de la cicatrización ósea se sigue por rayos X en las semanas 1, 2 y 4 después del comienzo de la elongación.

Los parámetros que se evalúan a partir de los rayos X son:

- 20
1. Grado de formación de callo,
  2. Cierre de hueso
  3. Remodelado conseguido durante el tratamiento.

La puntuación de rayos X se realiza por un cirujano ortopédico, según un sistema de calificación de cicatrización ósea establecido.

25 Histología

El callo se divide en dos partes, una para incluirse en parafina y la otra descalcificada, para incluirse en metilmetacrilato. Para el estudio histológico, las muestras se fijarán en Bouin durante 24 horas y se descalcifican en una disolución PVP-EDTA, a 4°C. Una vez que las muestras se han descalcificado, se deshidratan usando concentraciones crecientes de alcoholes (70%, 80%, 96% y 100%) y después de 4 horas en xileno, se incluyen en parafina a una temperatura de 60°C.

30 Las muestras se seccionan en 4 µm y se tiñen con tricromo de Masson, hematoxilina y eosina (H&E), safranina O y von Kossa.

Para analizar la mineralización por fluorocromos, las muestras se fijan en formol durante una semana, se deshidratan usando alcoholes de grado creciente. Después de una semana en PMMA-alcohol y tres semanas en PMMA (Technovit 7200 VLC®), las muestras se seccionarán con una sierra de diamante (Exakt®) y se recortarán hasta un grosor de 14 µm. Después de medir las secciones con luz ultravioleta, se mide la distancia de los marcadores óseos y se calcula el índice de formación ósea (distancia mm/días).

40 Las partes proximales de ambas tibias, alargada y control, se extraen y se cortan en partes laterales y medias. La parte lateral se pone en 4% formaldehído tamponado. Después de descalcificar todas las muestras en EDTA se incluyen en parafina y se cortan en secciones de 4 µm. Se aplican las tinciones de H&E, Tricromo de Masson, Safranina O y azul de Alcian-PAS.

Inmunohistoquímica

45 Se aplican anticuerpos específicos que reconocen colágeno I, colágeno II, FGFa (ahora conocido como FGF-1) y S-100 a las secciones de callo alargado por un método indirecto de dos etapas. Las secciones de parafina de 4 µm se desparafinan en xileno y se pasan por etanol 100%. Después de tripsinizar, después de la desparafinización, la peroxidasa endógena se bloquea poniendo las secciones en disolución de peroxidasa de hidrógeno durante 30 min. Se

5 incuban en los reactivos siguientes con lavados apropiados con disolución salina tamponada con Tris (TBS: 0,55 M, pH 7,36): suero de cerdo normal durante 30 min, anticuerpos primarios mencionados anteriormente durante 1 hora, un anticuerpo secundario biotinilado durante 30 min y complejo avidina-biotina (Dako K0355) durante 30 min. La reacción se visualiza con disolución de sustrato cromogénico (diaminobencidina, peroxidasa de hidrógeno, TB) y las secciones se contratiñen con hematoxilina de Harris, se deshidratan y se montan. Como control negativo, se usa TBS en el procedimiento en lugar de los anticuerpos primarios. Todas las secciones teñidas se examinan y fotografían usando un microscopio (Nikon Optiphot-2®, Japón).

#### Análisis morfométrico

10 Con un sistema de análisis de imágenes (Leica Q 500 MC ®) se determinan los parámetros histomorfométricos. Con la tinción del tricromo de Masson se determinan los parámetros siguientes:

1. Anchura trabecular;
2. Área trabecular;
3. Superficie de erosión trabecular;
4. Índice de erosión trabecular;
- 15 5. Número de osteoblastos;
6. Número de osteoclastos por campo;
7. Número de núcleos de osteoclastos;
8. Índice de reabsorción ósea o número de núcleos de osteoclastos/osteoclastos.

Con la tinción de von Kossa se obtienen los parámetros siguientes:

- 20 1. Anchura osteoide;
2. El índice osteoide-trabecular y la fluorescencia se usarán para medir;
3. Índice de formación ósea.

#### Ejemplo 8. Direccionamiento de las variantes de FGF

25 Las variantes de FGF-9 que tienen la capacidad de unirse a FGFR3 aún teniendo una capacidad reducida de producir una respuesta biológica pueden usarse como vectores de direccionamiento para los diferentes agentes bioactivos. Se sabe que CNP incrementa la longitud ósea (véase el Ejemplo 9). Los derivados de CNP incluyen CNP(1-22), CNP(1-17) y derivados de éstos en los que la estabilidad o vida media está incrementada. En particular, se ha mostrado que FGF9-2-W144G, una variante de 127 aminoácidos que comprende truncamientos tanto N como C terminales y una sustitución de aminoácido en el triptófano 144 (W144), dirige eficazmente a la placa de crecimiento de los huesos largos.

30 Se inyectó IP a crías de ratón de un día de edad FGF9-2-W144G yodado. Los animales se sacrificaron 2 y 8 horas después y se realizaron secciones de embrión completo. En estas crías, se observó que el FGF marcado se localizaba en la placa de crecimiento de la extremidad posterior, cerca del sitio de la inyección. Las Figuras 8A y B muestran dos exposiciones de la distribución de  $^{125}\text{I}$ FGF9-2-W144G en la placa de crecimiento del ratón después de la administración IP. P, M, H y T definen las regiones proliferativas, de maduración, hipertróficas y trabeculares, respectivamente, de la placa de crecimiento. La Figura 8B muestra el contorno de las células. La Figura 8A muestra una tinción fuerte en la zona hipertrófica y algo de señal en las regiones proliferativas y trabeculares. No se marcó con esta variante de FGF9 ningún otro sitio específico. Este experimento muestra la administración de un compuesto administrado exógenamente a la placa de crecimiento *in vivo* y proporciona una herramienta para la administración dirigida de factores tales como péptidos natriuréticos (NP) o análogos de NP. La producción de las construcciones de fusión se ilustra en el Ejemplo 9.

40 Durante la vida fetal y hasta el final de la pubertad, el crecimiento longitudinal de los huesos tiene lugar mediante la osificación endocondral de la placa de crecimiento localizada en la epífisis (extremos) de los huesos largos. La placa de crecimiento se divide en varias zonas de células formadoras de cartílago, o condrocitos, con diferentes patrones de expresión génica. En la Zona Reserva, las células son pequeñas y relativamente inactivas. En la Zona Proliferativa adyacente, los condrocitos proliferan, se disponen ellos mismos en columnas y eventualmente experimentan hipertrofia. 45 En la Región Hipertrófica Inferior hacia la unión cartílago-hueso, las células son grandes y muy activas pero no presentan más división celular. La matriz que rodea a las células hipertróficas se calcifica y las células más inferiores

experimentan muerte celular programada. La muerte celular está acompañada de la eliminación de la matriz cartilaginosa y de su reemplazo por hueso a través de la acción concertada de células óseas reclutadas, concretamente osteoclastos y osteoblastos.

Ejemplo 9: Construcciones de Fusión de Variantes de FGF

- 5 Además de los miembros de la familia FGF, se ha mostrado que los péptidos Natriuréticos (NP) y el péptido natriurético de tipo C (CNP) en particular, regulan el crecimiento óseo. Se ha mostrado que los ratones que no expresan CNP presentan fenotipos esqueléticos histológicamente similares a los observados en ratones con acondroplasia (Chusho et al., PNAS 98, 4016, 2001). También revelan el rescate de los defectos esqueléticos por ausencia de expresión de CNP por la expresión de CNP ectópica específica de tejido en la placa de crecimiento. Además, experimentos ex vivo (cultivo de órgano óseo fetal) de animales de tipo salvaje han mostrado que CNP, más que BNP y ANP, puede inducir la elongación ósea (Yasoda et al., 1998; Mericq et al., 2000). En una realización preferida actualmente de la presente invención, se proporciona un método para incrementar el tamaño de una placa de crecimiento ósea tratando el hueso con una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión variante de FGF-NP. En una realización más preferida actualmente, la variante de FGF es FGF9-2 y el NP es CNP o un análogo de éste.
- 10
- 15 Se prepararon dos construcciones de fusión FGF9-2-CNP, usando cada una cuatro cebadores oligonucleotídicos y tres reacciones de PCR. La primera, FGF9-2-W144G-CNP(1-22), en la que FGF9-2 está en una orientación 5' respecto a CNP, se construyó como sigue:

<u>FGF9-2 -dir</u> (SEQ ID NO:89)	5' -GGGAATTCCATATGCAGCTATACTGCAGGACTG
<u>CNP-inv</u> (SEQ ID NO:90)	5' -AGCTGGATCCTCAGCAACCCAGACCGGACATG
<u>F9-2 -CNP-dir</u> (SEQ ID NO:91)	5' -CACACATTTTTTACCTAGAGGAGGGGGAGGTCTGTCCAAAGGTTGC
<u>F9-2-CNP-inv</u> (SEQ ID NO:92)	5'-GCAACCTTTGGACAGACCTCCCCCTCCTCTAGGTAATAAATGTGTG

- 20 La primera reacción de PCR (20 ciclos) se realizó usando FGF9-2-dir y CNP-inv en un molde FGF9-2. La segunda (20 ciclos) se realizó usando F9-2-CNP-dir y F9-2-CNP-inv en un molde mCNP (ratón). La tercera reacción de PCR (20 ciclos) se realizó usando los productos de las dos reacciones de PCR previas como molde y amplificando usando FGF9-2-dir y F922-CNP-inv.

La segunda construcción de fusión, CNP-FGF9-2-W144G, comprende el CNP N terminal respecto a FGF9-2. Se usaron los cebadores siguientes:

<u>CNP-dir</u> (SEQ ID NO:93)	5' -ACGTGACCATATGGGTCTGTCCAAAGGTTG
<u>CNP-F9-2-inv</u> (SEQ ID NO:94)	5'CAGTCCTGCAGTATAGCTGCCCTCCCCCTCCCCCTCCCCCTCCGCAACCCAGACCGGACATG
<u>CNP-F9-2-dir</u> (SEQ ID NO:95)	5'-ATGTCCGGTCTGGGTTGCGGAGGGGGAGGGGGAGGGGGAGGGGCAGCTATACTGCAGGACTG
<u>P191Parada</u> (SEQ ID NO:96)	5' -GGCCCTAGGTCATCTAGGTAATAAATGTGTG

- 25 La primera reacción de PCR (20 ciclos) se realizó usando CNP-dir y CNP-9-2-inv en un molde CNP. La segunda (20 ciclos) se realizó usando CNP-F9-2-dir y P191Parada en un molde mCNP. La tercera reacción de PCR (20 ciclos) se realizó usando los productos de las dos reacciones de PCR previas como molde y amplificando usando los cebadores CNP-dir y P191Parada.

5 Los productos de PCR se clonaron en un vector de expresión, p80 Bluescript, se secuenciaron y se analizaron para exactitud y se usaron para transfectar células huésped. La proteína de fusión se produjo por métodos conocidos en la técnica. Las proteínas de fusión se analizan para actividad CNP usando el inmunoensayo enzimático Biotrak (EIA, Amersham) que mide la cantidad de segundo mensajero, GMP cíclico (GMPc), inducido después de la activación del receptor del péptido natriurético por el péptido en células C3H10T1/2.

El experto en la técnica apreciará que la construcción de fusión puede comprender una variante de FGF de la presente invención fusionada con un agente bioactivo incluyendo un péptido o análogo de péptido u hormona, incluyendo la hormona del crecimiento (G), IGF-1, TH o PTHrP que es terapéuticamente beneficioso si se dirige a la placa de crecimiento.

10 Ejemplo 10: Cultivo de Condrocitos Articulares

Los condrocitos se aislaron de biopsias de cerdo o humanas y se cultivaron en presencia de las variantes de la presente invención para identificar el efecto de las variantes en la proliferación y la diferenciación. El procedimiento empleado para el aislamiento y la propagación de los condrocitos articulares se presenta a continuación.

Reactivos:

15 MEM de Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL, no. de cat. 41965)

MEM Aminoácidos No Esenciales (Gibco BRL, no. de cat. 11140)

Piruvato de Sodio (Gibco BRL, no. de cat 11360)

Suero Fetal Bovino (FBS) (Gibco BRL, no. de cat. 10270)

Disolución de Estreptomina, Penicilina, Nistatina (Biological Indus. Ltd., no. de cat. 03 0321)

20 Tripsina-EDTA (Gibco BRL, no. de cat. T8154) o Verseno-Tripsina (Bio LAB Ltd., no. de cat. 13.012)

Colagenasa Tipo 2 (Worthington Biochem. Corp. No. de Cat 4147). Se preparó una disolución madre de 1.700 unidades/ml de Colagenasa en DMEM y se filtró (0,2 µm).

Preparación de medio FBS-DMEM:

25 Se añadieron FBS (50 ml), 5 ml de disolución de antibiótico, 5 ml de Piruvato de Sodio, 5 ml de MEM aminoácidos no esenciales a una botella de 500 ml de DMEM. Cuando se especifica, se añadieron FGF-2, FGF-9 o variantes de FGF a una concentración final de 10 ng/ ml.

Aislamiento de las células de biopsia de cartílago:

30 Un trozo de tejido de cartílago se cortó en 2 a 4 trozos de 4 mm con un escalpelo estéril. La disolución de colagenasa se diluyó 1:4 en FBS-DMEM, se añadió a la muestra de tejido y se dejó incubar en un agitador a 37°C toda la noche (ON). Las células se centrifugaron (1.200 rpm 5-10 min). El medio se aspiró, las células se lavaron en 5 ml de medio y se volvieron a centrifugar. Las células se resuspendieron en medio de cultivo y se sembraron en matraces de 25 cm<sup>2</sup> ó 75 cm<sup>2</sup> a una concentración de aproximadamente 1x10<sup>6</sup> células por matraz. Las células se incubaron en un incubador con 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. El medio celular se reemplazó cada 2-3 días.

Procedimiento para pasar las células (tripsinización):

35 Cuando el cultivo celular alcanzó la confluencia deseada, el medio se quitó y las células se tripsinizaron según el procedimiento estándar. Las células se dividieron en 2-3 matraces nuevos y se añadieron 20 ml de medio fresco precalentado. La expansión de las células y la tripsinización se realizaron según fue necesario.

40 Además, la población celular crecida en las matrices anteriores expresa varios de los marcadores de diferenciación de los condrocitos. Uno de los varios fenotipos expresados durante la diferenciación de los condrocitos es la producción de glucosaminoglicano (GAG). La producción de GAG se identificó en tinción histológica usando azul de Alcian o azul de toluidina y se cuantificó usando el método de tinción con DMB (dihidroclouro de 3,3'-dimetoxibencidina).

Ejemplo 11: Ensayo de Proliferación/Diferenciación Celular

Los condrocitos articulares que se habían aislado por digestión enzimática y mantenido en cultivo en monocapa experimentaron desdiferenciación en el tiempo y cambiaron a un fenotipo semejante a fibroblasto. Esto se refleja en

parte por su morfología y pérdida de expresión del colágeno II. Las células son capaces de experimentar proliferación y diferenciación en condrocitos articulares bajo determinadas condiciones de crecimiento.

5 La proliferación de las células de cartílago en presencia de las diferentes variantes se cuantificó por uno de dos métodos, CyQUANT® (Molecular Probes) o reactivo XTT (Biological Industries, Co.). Los condrocitos articulares humanos o porcinos ( $10^4$ - $10^5$  células/100 ul) se crecieron en presencia de las variantes de la invención (10 ng/ml) en placas de micropocillos. Las células se crecieron durante varios días en DMEM con y sin FGF y variantes y las células se procesaron según las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron en un lector ELISA a 490 nm. Los resultados para los condrocitos articulares humanos se muestran en la Figura 10A-10E.

10 Se aislaron condrocitos articulares de fragmentos de tejido de cartílago, Las células se crecieron usando medio de cultivo suplementado con Suero Fetal de Ternera (FCS). Se añadieron al medio diferentes concentraciones de FGF-2 o FGF-9 o las variantes de FGF FGF2-N111G, FGF2-N111R o FGF9-W144G y a continuación a las células. El medio con variante se cambió cada 2-3 días. La proliferación de las células se determinó usando el Kit de Ensayo de Proliferación Celular CyQUANT™ (Molecular Probes).

#### Morfología de las células cultivadas

15 Los condrocitos articulares humanos o porcinos se crecieron en cultivo con o sin FGF de tipo salvaje y variantes durante dos semanas. Las células se observaron con un microscopio invertido y se tiñeron con faloidina conjugada fluorescente.

20 Los datos de los condrocitos articulares humanos se muestran en las Figuras 9 y 10. La Figura 9 muestra la curva de proliferación de las células que se habían cultivado en medio con y sin ligando FGF añadido. Los ligandos FGF-2, FGF2-N111G (FGFv) y FGF9 tienen un efecto proliferativo en los condrocitos articulares, mientras que FGF9-W144G (FGFv) no aumenta la proliferación.

25 Las Figuras 10A-10E muestran condrocitos articulares humanos después de 2 semanas en cultivo según se ven en un microscopio invertido. Las células crecidas sin ligando (panel A) presentan una morfología fibroblástica con bordes no definidos, mientras que las células crecidas en los diferentes ligandos tienen formas poligonales variables. Sin pretender estar sujeto a ninguna teoría, estos resultados sugieren que las células que retienen el fenotipo condrocítico son capaces de experimentar diferenciación una vez que las células han sido inducidas para proliferar. Además, el volumen celular se ve influido y las células crecidas en FGF-9-W144G (panel E) son las más grandes. Las células de los paneles B y C se crecieron en FGF-2 o FGF2(3,SQ)-N111R, respectivamente.

30 La Figura 11A muestra la morfología de condrocitos articulares porcinos crecidos sin ligando añadido. Las células son semejantes a fibroblastos y tienen bordes no definidos. Las células crecidas con la variante humana FGF2-N111G (Figura 12B) son redondeadas con bordes muy definidos, mientras que las células crecidas en la variante humana FGF9-W114 son cuboidales y se parecen a los condrocitos articulares. Las células se tiñeron con faloidina marcada con fluorescencia para marcar el citoesqueleto de actina de las células. Los datos se presentan en las Figuras 12A-12C. Las diferencias en el citoesqueleto de actina entre los tratamientos son muy claras. La actina de las células crecidas en medio sin ligando (Fig 12A) es alargada y típica de las células semejantes a fibroblastos. La actina de las células crecidas en el ligando FGF2-N111R es redondeada y definida mientras que la actina de las células crecidas en FGF9-W144G es poligonal.

35 Así, es posible alterar el fenotipo celular de determinados tipos de células exponiéndolas a variantes de FGF que tienen al menos una sustitución de aminoácido en el bucle beta8-beta9.

#### Ejemplo 12: Cultivo de Sedimento de Condrocitos

40 La diferenciación y la morfogénesis celulares se estudiaron en cultivos de sedimento y se analizaron usando marcadores específicos de tipo celular.  $2,5 \times 10^5$  condrocitos articulares porcinos que se habían expandido en cultivo con y sin variantes de FGF se sedimentaron en 0,5 ml de medio de diferenciación (DMEM-alta glucosa que contiene lo siguiente: 1  $\mu$ M dexametasona, 1 mM Piruvato de sodio, 50-100  $\mu$ g/ml ácido ascórbico, 0,35 mM prolina, 10 ng/ml IGF-1, 10 ng/ml TGF $\beta$ , Disolución de Insulina - Transferrina- Selenio (6,25 $\mu$ g/ml cada uno)) y se incubó en medio de diferenciación en tubos de centrífuga de polipropileno de 15 ml con las tapas laxas. El medio se cambió cada 2-3 días. Los sedimentos se seccionaron usando métodos estándar conocidos en la técnica y se tiñeron con azul de toluidina para marcar los proteoglicanos sulfatados y se tiñeron inmunohistoquímicamente con anticuerpos anti-colágeno II.

50 El cultivo de sedimento crecido en medio sin ligandos o con FGF2-N111G mostró una baja expresión de colágeno II. Los cultivos crecidos en medio con FGF9-W144G muestran la aparición de colágeno II en el tiempo. La Figura 13A muestra una pequeña cantidad de tinción de colágeno después de una semana, mientras que las figuras 13B y 13C muestran una alta cantidad de expresión de la proteína colágeno II después de 2 y 6 semanas, respectivamente. Las Figuras 14A y 14B muestran el alto nivel de tinción de proteoglicano en el tejido que resulta de las células cultivadas en medio que

comprende la variante FGF9-W144G, mientras que las Figuras 14D y 14C no muestran tinción con azul de toluidina para los cultivos crecidos en medio solo o con la variante de FGF-2, respectivamente.

Este resultado muestra que la variante FGF9-W144G es eficaz en la diferenciación de células de condrocito articular cultivadas.

- 5 El mismo experimento se realiza en condrocitos aislados de fuentes humanas y de otros mamíferos.

Ejemplo 13: Modelo de Reparación de Cartílago Articular de Cabra

10 Se realiza un estudio comparativo para evaluar la eficacia de las variantes de FGF en el tratamiento de defectos del cartílago en un modelo de lesión de rodilla en cabras. Se usó un total de 6 cabras hembras adultas. Todos los animales experimentaron un procedimiento de recogida de condrocitos antes del implante. El tejido recogido se usará para la preparación de condrocitos primarios autólogos. Tres semanas después de la operación, se perforó un agujero de 4,5 mm de diámetro y 1,5 mm de profundidad y matrices de matriz natural presembradas, con o sin variantes de FGF, con diferentes concentraciones de células alogénicas se implantan en la cabra individual correspondiente para un experimento a largo plazo (12 semanas). Después de 12 semanas, todos los animales se sacrifican humanamente. Las articulaciones se evalúan a grandes rasgos para cambios específicos del cóndilo femoral y las superficies de contacto. El análisis histológico se realiza para determinar la respuesta estructural y celular a los materiales del implante.

Materiales y Métodos:

Se usan seis cabras hembras adultas (11-12 meses de edad). En un sistema experimental particular, los diferentes ensayos incluyen:

Cabra	Tratamiento Proximal	Tratamiento Medio	Tratamiento Distal
1-3	Matriz	Matriz + 0,4x10 <sup>5</sup> células	Matriz + 2x10 <sup>5</sup> células
4-6	Matriz + FGFv	Matriz + FGFv + 0,4x10 <sup>5</sup> células	Matriz + FGFv + 2x10 <sup>5</sup> células

- 20 La variante ensayada es FGF2(3,5Q)-N111G.

Antibióticos: se inyectan IM 2 ml amoxicilina inmediatamente antes del procedimiento y una vez al día durante 4 días después del procedimiento.

Anestesia: Premedicación: se administran IM 0,05 mg/kg xilazina seguido de ketamina-diazepam (4 mg/kg y 2 mg/kg IV).

Cirugía e Implante:

- 25 El procedimiento quirúrgico básico es idéntico para todos los sujetos. Todas las cirugías se realizan bajo asepsia estricta. Los antibióticos perioperatorios, se dosifican IM a 2,4 millones de unidades de Penicilina procaína (40.000 unidades/kg SID) al comienzo del procedimiento. La anestesia se induce con xilazina 0,05 mg/kg IM seguido de ketamina-diazepam (4 mg/kg y 2 mg/kg IV). El sujeto se intuba en posición ventral y se pone hacia decúbito izquierdo. La anestesia se mantiene con una mezcla gaseosa de isoflurano y oxígeno. Analgesia, carprofeno 2-4 mg/kg SQ, SID.

- 30 Procedimiento de Recogida:

La estrategia quirúrgica consiste en una incisión en la piel curva, lateral hecha desde el tercio distal del fémur izquierdo hasta el nivel del plato tibial y a través del lado medial de la espina tibial. Usando este método, la piel se disecciona bruscamente y se retrae para permitir una estrategia pararotular lateral en la articulación de la babilla. Se hace una incisión paralela al borde lateral de la rótula y ligamento de la rótula. Esto se extiende desde el lado lateral de la fascia lata a lo largo del borde craneal del bíceps femoral y en la fascia lateral de la articulación de la babilla. El bíceps femoral y la fascia lateral unida se retraen permitiendo una incisión en la cápsula de la articulación. La articulación se extiende y la rótula se luxa medialmente exponiendo la articulación de la babilla.

- 40 El sitio de recogida es el mismo que la localización del defecto troclear planeado que se crea en el cóndilo femoral derecho. Los defectos tienen un diámetro de aproximadamente 5 mm y una profundidad de aproximadamente 2,5 mm y pasarán al hueso subcondral. Los defectos se hacen en la pared lateral o medial del surco troclear distal dependiendo de la anatomía individual. La capa de cartílago recogida tiene un diámetro de aproximadamente 5 mm y una profundidad de

aproximadamente 0,5 mm. Las células recogidas se transfieren a medio de cultivo celular inmediatamente después de la recogida para expansión y sembrado de matriz. La incisión se cierra en capas usando la sutura y patrones apropiados.

Procedimiento de Implante:

5 El defecto troclear se crea en el cóndilo femoral derecho. Los defectos tienen un diámetro de aproximadamente 5 mm y una profundidad de aproximadamente 2,5 mm y pasan al hueso subcondral. Los defectos se hacen en la pared lateral o medial del surco troclear distal dependiendo de la anatomía individual. Cada defecto se rellena con el artículo de ensayo apropiado.

10 La estrategia quirúrgica consiste en una incisión en la piel curva, lateral hecha desde el tercio distal del fémur izquierdo hasta el nivel del plato tibial y a través del lado medial de la espina tibial. Usando este método, la piel se disecciona bruscamente y se retrae para permitir una estrategia pararotular lateral en la articulación de la babilla. Se hace una incisión paralela al borde lateral de la rótula y ligamento de la rótula. Esto se extiende desde el lado lateral de la fascia lata a lo largo del borde craneal del bíceps femoral y en la fascia lateral de la articulación de la babilla. El bíceps femoral y la fascia lateral unida se retraen permitiendo la exposición de la cápsula de la articulación. La articulación se extiende y la rótula se luxa medialmente y exponiendo la articulación de la babilla.

15 Con la articulación de la rodilla totalmente flexionada, se identifica la localización apropiada de los puntos de perforación del defecto en el surco troclear y se marcan con un marcador quirúrgico. Un cortador de cartílago especialmente designado se usa para seccionar a través de la capa exterior del cartílago y evitar el desgarro del cartílago. El cortador con un núcleo que tiene un diámetro de aproximadamente 5 mm se usa con electricidad para crear una profundidad fijada de aproximadamente 2,5 mm, manteniendo un plano perpendicular a la tangente del surco. El núcleo del hueso y cartílago subcondral se quita cuidadosamente. El cortador se quita cuidadosamente y cualquier borde de cartílago suelto  
20 se disecciona cuidadosamente con una cuchilla de escalpelo. Si se necesita, se usa un taladro eléctrico manual con una broca especialmente designada para biselar el borde del defecto creado. Este colgajo puede ayudar para proporcionar un cierre mecánico con la matriz.

25 Los defectos en el cartílago se lavan copiosamente con disolución salina estéril antes de la inserción del artículo de ensayo. El material de ensayo apropiado se pone en el defecto de manera que está en línea con el cartílago circundante y cubierto con pegamento biológico para mantenerlo en su sitio. Se hace cuidadosamente un lavado final de la articulación con disolución salina. La rótula se reduce y la articulación se mueve a través de un rango de movimiento completo para asegurar que no hay compresión debida a los implantes. Esto se sigue del cierre rutinario de la articulación en tres o cuatro capas usando el material de sutura apropiado.

30 Después de la operación, se aplica en la pata una férula de Thomas modificada. Esta permanece puesta durante 2 semanas para limitar la flexión de la rodilla operada. Se hacen chequeos post operatorios para cualquier animal que presenta signos de malestar post operatorio. Se proporcionan analgésico post operatorios durante 5 días si los animales presentan cualquier signo de distrés o malestar. Todos los tratamientos se registran en la documentación de estudio apropiada.

35 Necropsia

Los animales se sacrifican humanamente a las 12 semanas después de la operación. Los pesos corporales se registran inmediatamente antes del sacrificio. Se induce una anestesia profunda con una mezcla de ketamina-xilazina y el sujeto se exsanguina según las directrices mostradas por el Panel sobre Eutanasia AVMA (JAVMA, marzo 2000).

40 Se realiza una evaluación a grandes rasgos y la recogida de muestras como se describe en la Tabla 4. Se examinan los ganglios linfáticos que están muy cerca de la articulación. Las superficies articulares opuestas a los sitios del defecto se examinan para cualquier superficie articular anormal. Además, se hacen evaluaciones a grandes rasgos de las articulaciones de la rodilla para determinar la reparación del cartílago tomando como base los criterios de puntuación previos listados en la Tabla 4. Se recogen los fémures, rótulas, sinovio y ganglios linfáticos popliteales y se ponen en contenedores marcados apropiadamente. Inmediatamente después de la recogida de tejidos, se hace un examen  
45 morfológico a grandes rasgos de la superficie del cartílago como se ha descrito anteriormente y se hacen registros fotográficos de cada muestra.

50

**Tabla 4. Evaluación a Grandes Rasgos y Recogida de Muestras**

Muestra	Evaluación a Grandes Rasgos	Recogida de muestras	Fotografía y Puntuación
Corazón			
Pulmones			
Riñones			
Bazo			
Ganglios linfáticos popliteales	X	X	
Articulación de la rodilla (incluye el sitio del defecto articular)	X	X	X

Observaciones Morfológicas a Grandes Rasgos

5 Después de la recogida de las articulaciones de la rodilla, las articulaciones se abren, se fotografían y la superficie del sitio del defecto se puntúa como se indica en la Tabla 5. La membrana sinovial se examina para cualquier inflamación. El fluido de la articulación se recoge y se analiza.

**Tabla 5: Criterios de Puntuación para las Evaluaciones Morfológicas a Grandes Rasgos**

<b>Característica</b>	<b>Calificación</b>	<b>Puntuación</b>
Integración del Borde (tejido nuevo respecto al cartílago nativo)	Completo	2
	Parcial	1
	Ninguno	0
Suavidad de la superficie del cartílago	Suave	2
	Intermedio	1
	Rugoso	0
Superficie del cartílago, grado de relleno	Nivelado	2
	Ligera depresión	1
	Deprimido/sobresaliente	0
Color del cartílago, opacidad o translucidez del neocartílago	Transparente	2
	Translúcido	1
	Opaco	0

Histología y Evaluación Histológica

5 Inmediatamente después de la disección y después de las observaciones a grandes rasgos de la superficie de la articulación, las articulaciones se ponen en formalina tamponada con fosfato 10% (al menos un volumen de diez veces) durante al menos 48 horas y se envían para procesamiento histológico. Después de fijación en formalina tamponada con fosfato 10%, las muestras se recortan a grandes rasgos para eliminar el tejido extra. Los bloques de tejido se cortan aproximadamente a 1/3 de la distancia desde el punto de contacto exterior del implante/tejido con el fin de examinarlos a grandes rasgos. Se hacen radiografías de contacto antes del inicio de la descalcificación.

10 Los tejidos se descalcifican en 10% EDTA hasta que las radiografías de las secciones descalcificadas aseguran una descalcificación completa. Una vez que se determina una descalcificación completa, las muestras se deshidratan a través de una serie de etanol y se incluyen en parafina. Las muestras se seccionan a 5-10  $\mu\text{m}$ . Una sección se tiñe con H&E y la otra sección secuencial con Safranina O y contrateñido con Fast Green. Para los análisis histológicos de las secciones, se usa la escala de puntuación según Frenkel.

La evaluación histológica se realiza para medir los parámetros siguientes: Características del tejido recién formado, regularidad de la superficie de la articulación del tejido regenerado, integridad estructural y grosor del tejido regenerado, osificación endocondral y estado de las células en el cartilago remanente.

15 Ejemplo 14: Farmacocinética

20 Los métodos para detectar los compuestos administrados en la sangre o tejidos de mamíferos tratados son conocidos en la técnica. Las propiedades farmacocinéticas de los compuestos administrados se determinan usando dichos métodos. En modelos animales, pueden administrarse oligonucleótidos o péptidos radiomarcados y evaluarse su distribución en los fluidos y tejidos corporales por extracción de los oligonucleótidos o péptidos seguido de autorradiografía (Agrawal et al PNAS 88.:7595,1991). Otros métodos incluyen el marcaje de un péptido con un resto informador, incluyendo marcajes fluorescentes o enzimáticos, administración a un animal, extracción del péptido de los fluidos y órganos corporales seguido de análisis por HPLC. Alternativamente, se usan métodos inmunohistoquímicos para la detección del péptido administrado en el tejido. La presente invención contempla polipéptidos FGF y quimeras, proteínas de fusión, híbridos y conjugados informadores marcados usando lo mismo.

25 Ejemplo 15: Efecto de las Variantes en Células PC12

Para investigar si las células neuronales PC12 responden de manera diferente a los FGF y a las variantes de FGF, las células se expusieron a FGF-2, FGF2-N111R, FGF-9 y FGF9-W144G.

30 La línea celular PC12 se clonó originariamente a partir de un feocromocitoma medular adrenal de rata trasplantable. Las células se crecieron en DMEM con alta glucosa suplementado con 10% suero de caballo, 5% suero fetal de ternera, 130-unidades/ml penicilina y 0,1 mg/ml estreptomina y 0,25-40 ng/ml de FGF o la variante en un incubador humidificado a 37°C. Para recoger las células, la capa celular se lavó con PBS-EDTA. Las células se recogieron y se centrifugaron durante 5 min, 2.000 rpm. Las células se resuspendieron en 5 ml DMEM y se sembraron en placas.

35 Después de 3 días de cultivo, tanto FGF-2 como FGF-9 indujeron diferenciación neuronal a un nivel similar, según se determina por la observación de las extensiones de neuritas. Una observación cercana de los cultivos demostró que la longitud del crecimiento de las neuritas inducido por FGF-2 era típicamente mayor que el inducido por FGF-9. De manera importante, las variantes indujeron un efecto inverso cuando se comparan con su equivalente de tipo salvaje. Mientras que FGF2-N111R era más potente, según se determina por el número y longitud de las extensiones de neuritas, que FGF-2, FGF9-W144G tenía la actividad más débil de todos los ligandos ensayados ejerciendo una diferenciación mínima incluso a la concentración más alta empleada (40 ng/ml).

40 La introducción de una mutación en el bucle  $\beta 8$ - $\beta 9$  de los ligandos FGF-2 y FGF-9 resultó en polipéptidos que tienen un efecto selectivo en las células en cultivo.

45 Aunque la presente invención se ha descrito particularmente, los expertos en la técnica apreciarán que pueden hacerse muchas variaciones y modificaciones. Por lo tanto, no debe considerarse que la invención está restringida a las realizaciones descritas particularmente, sino que el alcance y concepto de la invención se entenderán más fácilmente por referencia a las reivindicaciones siguientes.

Organización Solicitante

Calle: POBOX 1482

Ciudad: REHOVOT

Estado:

5 País: ISRAEL

Código Postal: 76114

Número de Teléfono: 972-8-931-0900

Número de Fax: 972-8-931-8848

Dirección de Correo Electrónico:

10 <110> Nombre de la Organización: PROCHON BIOTECH LTD.

Solicitante Individual

Calle: SITRIA 104

Ciudad: MOSHAV SITRIA

Estado:

15 País: ISRAEL

Código Postal: 76834

Número de Teléfono:

Número de Fax:

Dirección de Correo Electrónico:

20 <110> Apellido: YAYON

<110> Nombre: AVNER

<110> Inicial:

<110> Sufijo:

Solicitante Individual

25 Calle: GANEI YOHANAN 160

Ciudad: MOSHAV GANEI YOHANAN

Estado:

País: ISRAEL

Código Postal: 76922

30 Número de Teléfono:

Número de Fax:

Dirección de Correo Electrónico:

<110> Apellido: BOGIN

<110> Nombre: OREN

35 <110> Inicial:

<110> Sufijo:

Proyecto de la Solicitud

<120> Título: VARIANTES DE FGF Y MÉTODOS PARA USAR LAS MISMAS  
 <130> Referencia del Archivo de la Solicitud: PRO-018-PCT  
 <140> Número de la Solicitud Actual: PCT/IL03/XXXXX  
 5 <141> Fecha de Presentación Actual: 2003-05-09

Solicitudes Anteriores

<150> Número de la Solicitud Anterior: IL149562  
 <151> Fecha de Presentación Anterior: 2002-05-09

Secuencia

10 <213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

```

    MAAGSITTLP  ĀLPEDGGSGA  FPPGHFKDPK  RLYCKNGGFF  LRIHPDGRVD  GVREKSDPHI
                60
    .KLQLQAEERG  VVSIKGVCAN  RYLAMKEDGR  LLASKCVTDE  CFFFERLESN  XYNTYRSRKY
                120
    .TSWYVALKRT  GQYKLGSKTG  PGQKAILFLP  MSAKS
                155
    
```

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 155

15 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:1

Descripción de la Secuencia:

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:1:

20 <221> Clave de la Característica: MISC\_CARACTERÍSTICA

<222> Localización Desde: 111

<222> Localización Hasta: 111

Otra Información: X es distinto de N y más preferiblemente seleccionado de R o G.

Unión de CDS: No

Característica

25 Secuencia: SEQ ID NO:1:

<221> Clave de la Característica: MISC\_CARACTERÍSTICA

<222> Localización Desde: 111

<222> Localización Hasta: 111

Otra Información: X es distinto de N y más preferiblemente seleccionado de R o G.

30 Unión de CDS: No

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

```

    MAAGSITTLP  ALPEDGGSGA  FPPGHFKDPK  RLYCKNGGFF  LRIHPDGRVD  GVREKSDPHI
                60
    KLQLQAEERG  VVSIKGVCAN  RYLAMKEDGR  LLASKCVTDE  CFFFERLESN  RYNTYRSRKY
                120
    TSWYVALKRT  GQYKLGSKTG  PGQKAILFLP  MSAKS
                155
    
```

<212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 155  
 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:2  
 Descripción de la Secuencia:

5 Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
 <400> Cadena de la PreSecuencia:

```

MAAGSITTLP ALPEDGGSGA FPPGHFKDPK RLYCKNGGFF LRIHPDGRVD GVREKSDPHI
 60
KLQLQAEERG VVSIKGVCAN RYLAMKEDGR LLASKCVTDE CFFFERLESN GYNTYRSRKY
 120
TSWYVALKRT GQYKLGSKTG PGQKAILFLP MSAKS
 155
    
```

10 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 155  
 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:3  
 Descripción de la Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

15 <400> Cadena de la PreSecuencia:

```

MAQQQITTLP ALPEDGGSGA FPPGHFKDPK RLYCKNGGFF LRIHPDGRVD GVREKSDPHI
 60
KLQLQAEERG VVSIKGVCAN RYLAMKEDGR LLASKCVTDE CFFFERLESN XYNTYRSRKY
 120
TSWYVALKRT GQYKLGSKTG PGQKAILFLP MSAKS
 155
    
```

20 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 155  
 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:4  
 Descripción de la Secuencia:

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:4:

25 <221> Clave de la Característica: MISC\_CARACTERÍSTICA  
 <222> Localización Desde: 111  
 <222> Localización Hasta: 111  
 Otra Información: X es distinto de N y más preferiblemente seleccionado de R o G.  
 Unión de CDS: No

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

30 <400> Cadena de la PreSecuencia:

```

MAQQQITTLP ALPEDGGSGA FPPGHFKDPK RLYCKNGGFF LRIHPDGRVD GVREKSDPHI
 60
KLQLQAEERG VVSIKGVCAN RYLAMKEDGR LLASKCVTDE CFFFERLESN GYNTYRSRKY
 120
TSWYVALKRT GQYKLGSKTG PGQKAILFLP MSAKS
 155
    
```

<212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 155  
 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:5  
 Descripción de la Secuencia:

5 Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
 <400> Cadena de la PreSecuencia:

```

MSGPGTAAVA LLPAVLLALL APWAGRGGAA APTAPNGTLE AELERRWESL VALSLARLPV
 60
AAQPKEAAVQ SGAGDYLLGI KRLRRLYCNV GIGFHLQALP DGRIGGAHAD TRDSLLELSP
 120
VERGVVSIFG VASRFFVAMS SKGKLYGSPF FTDECTFKEI LLPNXYNAYE SYKYPGMFIA
 180
LSKNGKTKKG NRVSPMTKVT HFLPRL
 206
  
```

10 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 206  
 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:6  
 Descripción de la Secuencia:

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:6:

15 <221> Clave de la Característica: MISC\_CARACTERÍSTICA  
 <222> Localización Desde: 165  
 <222> Localización Hasta: 165  
 Otra Información: X es distinto de N y más preferiblemente G  
 Unión de CDS: No

20 Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
 <400> Cadena de la PreSecuencia:

```

MARLPVAAQP KEAAVQSGAG DYLLGIKRLR RLYCNVGIGF HLQALPDGRI GGAHADTRDS
 60
LLELSPVERG VVSIFGVASR FFFVAMSSKGK LYGSPFFTDE CTFKEILLPN XYNAYESYKY
 120
PGMFIALSKN GKTKKGNRVS PTMKVTHFLP RL
 152
  
```

25 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 152  
 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:7  
 Descripción de la Secuencia:

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:7:

30 <221> Clave de la Característica: MISC\_CARACTERÍSTICA  
 <222> Localización Desde: 111  
 <222> Localización Hasta: 111  
 Otra Información: X es distinto de N y más preferiblemente G (N165G)  
 Unión de CDS: No

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

```

MAPLGEVGN Y FGVQDAV PFG NVPVLPVDSP VLLSDHLGQS EAGGLPRGPA VTDLDHLKGI
    60
LRRRQLYCRT GFHLEIFPNG TIQGTRKDHS RFGILEFISI AVGLVSIRGV DSGLYLGMNE
    120
KGELYGSEKL TQECVFREQF EENXYNTYSS NLYKHVD TGR RYYVALNKDG TPREGTRTKR
    180
HQKFTHFLPR PVD PDKVPEL YKDILSQS
    208
    
```

5 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 208  
 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:8  
 Descripción de la Secuencia:

Característica

10 Secuencia: SEQ ID NO:8  
 <221> Clave de la Característica: MISC\_CARACTERÍSTICA  
 <222> Localización Desde: 144  
 <222> Localización Hasta: 144  
 Otra Información: X es distinto de W y más preferiblemente seleccionado de G, R, E o V (W144X)  
 15 Unión de CDS: No

Patente

Secuencia: SEQ ID NO:8  
 <302> Título: VARIANTES ACTIVAS DE FGF CON ESPECIFICIDAD MEJORADA  
 <308> Número de Registro DB:  
 20 <309> Fecha de Entrada DB:  
 <310> Número de Documento: WO 02.36732  
 <311> Fecha de Presentación de la Patente: 2001-10-18  
 <312> Fecha de Publicación: 2002-05-10  
 <313> Desde: 1  
 25 <313> Hasta: 208

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

```

MGQSEAGGLP RGPVAVTDLH LKGI LRRRQL YCRTGFHLEI FPNGTIQGTR KDHSRFGILE
    60
FISIAVGLVS IRGVDSGLYL GMNEKGELYG SEKLTQECVF REQFEENXYN TYSSNLYKHV
    120
DTGRRYYVAL NKDGT PREGT RTKRHQKFTH FLPRVDPDK VPELYKDILS QS
    172
    
```

30 <212> Tipo: PRT  
 <211> Longitud: 172  
 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:9  
 Descripción de la Secuencia:

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:9:

- <221> Clave de la Característica: MISC\_CARACTERÍSTICA
- <222> Localización Desde: 108
- 5 <222> Localización Hasta: 108
- Otra Información: X es distinto de W y más preferiblemente seleccionado de G, R, E o V (W144X)
- Unión de CDS: No

Patente

Secuencia: SEQ ID NO:9:

- 10 <302> Título: VARIANTES ACTIVAS DE FGF CON ESPECIFICIDAD MEJORADA <308> Número de Registro DB:
- <309> Fecha de Entrada DB:
- <310> Número de Documento: WO 02/36732
- <311> Fecha de Presentación de la Patente: 2001-10-18
- <312> Fecha de Publicación: 2002-05-10
- 15 <313> Desde: 1
- <313> Hasta: 172

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

```

MQLYCRTGFH LEIFPNGTIQ GTRKDHSRFG ILEFISIAVG LVSIRGVDSG LYLG MNEKGE
      60
LYGSEKLTQE CVFREQFEEN WYNTYSSNLY KHVDTGRRYY VALNKDGTPR EGTRTKRHQK
      120
FTHFLPRPVD PDKVPELYKD ILSQS
20      145
    
```

- <212> Tipo: PRT
- <211> Longitud: 145
- Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:10
- Descripción de la Secuencia:

25 Patente

Secuencia: SEQ ID NO:10:

- <302> Título: VARIANTES ACTIVAS DE FGF CON ESPECIFICIDAD MEJORADA
- <308> Número de Registro DB:
- <309> Fecha de Entrada DB:
- 30 <310> Número de Documento: WO 02/36732
- <311> Fecha de Presentación de la Patente: 2001-10-18 <312> Fecha de Publicación: 2002-05-10
- <313> Desde: 1
- <313> Hasta: 145

Secuencia

35 <213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

```

MQLYCRTGFH LEIFPNGTIQ GTRKDHSRFG ILEFISIAVG LVSIRGVDSG LYLG MNEKGE
      60
LYGSEKLTQE CVFREQFEEN XYNTYSSNLY KHVDTGRRYY VALNKDGTPR EGTRTKRHQK
      120
FTHFLPRPVD PDKVPELYKD ILSQS
      145
    
```

<212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 145  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:11  
Descripción de la Secuencia:

5 Característica

Secuencia: SEQ ID NO:11:

<221> Clave de la Característica: MISC\_CARACTERÍSTICA  
<222> Localización Desde: 81  
<222> Localización Hasta: 81

10 Otra Información: X es distinto de W y más preferiblemente seleccionado de G, R, E o V (W144X)  
Unión de CDS: No

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

```
        MQLYCRTGFH LEIFPNGTIQ GTRKDHSRFG ILEFISIAVG LVSIRGVDSG LYLGMNEKGE
           60
        LYGSEKLTQE CVFREQFEEN WYNTYSSNLY KHVDTGRRYY VALNKDGTPR EGTRTKRHQK
           120
        FTHFLPR
           127
```

15

<212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 127  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:12  
Descripción de la Secuencia:

20 Patente

Secuencia: SEQ ID NO:12:

<302> Título: VARIANTES ACTIVAS DE FGF CON ESPECIFICIDAD MEJORADA  
<308> Número de Registro DB:  
<309> Fecha de Entrada DB:  
25 <310> Número de Documento: WO 02/36732  
<311> Fecha de Presentación de la Patente: 2001-10-18  
<312> Fecha de Publicación: 2002-05-10  
<313> Desde: 1  
<313> Hasta: 127

30 Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

```
        MQLYCRTGFH LEIFPNGTIQ GTRKDHSRFG ILEFISIAVG LVSIRGVDSG LYLGMNEKGE
           60
        LYGSEKLTQE CVFREQFEEN XYNTYSSNLY KHVDTGRRYY VALNKDGTPR EGTRTKRHQK
           120
        FTHFLPR
           127
```

35 <212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 127  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:13  
Descripción de la Secuencia:

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:13:

- <221> Clave de la Característica: MISC\_CARACTERÍSTICA
- <222> Localización Desde: 81
- 5 <222> Localización Hasta: 81
- Otra Información: X es distinto de W y más preferiblemente seleccionado de G, R, E o V (W144X)
- Unión de CDS: No

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

10 <400> Cadena de la PreSecuencia:

MQLYCRITGFH LEIFPNGTIQ GTRKDHSRFG ILEFISIAVG LVSIRGVDSG LYLGMNEKGE  
60  
LYGSEKLTQE CVFREQFEEX WYNTYSSNLY KHVDTGRRYY VALNKDGTTPR EGTRTKRHQK  
120  
FTHFLPREVD PDKVPELYKD ILSQS  
145

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 145

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:14

15 Descripción de la Secuencia:

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:14:

- <221> Clave de la Característica: MISC\_CARACTERÍSTICA
- <222> Localización Desde: 80
- 20 <222> Localización Hasta: 80
- Otra Información: en la que X es distinto de N y más preferiblemente S (N143X)
- Unión de CDS: No

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

25 <400> Cadena de la PreSecuencia:

MQLYCRITGFH LEIFPNGTIQ GTRKDHSRFG ILEFISIAVG LVSIRGVDSG LYLGMNEKGE  
60  
LYGSEKLTQE CVFREQFEEX WYNTYSSNLY KHVDTGRRYY VALNKDGTTPR EGTRTKRHQK  
120  
FTHFLPR  
127

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 127

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:15

30 Descripción de la Secuencia:

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:15:

- <221> Clave de la Característica: MISC\_CARACTERÍSTICA
- <222> Localización Desde: 80
- 35 <222> Localización Hasta: 80

Otra Información: en la que X es distinto de N y más preferiblemente S (N143X).  
Unión de CDS: No

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

5 <400> Cadena de la PreSecuencia:

MQLYCRTGFH LEIFPNGTIQ GTRKDHSRFG ILEFISIAVG LVSIRGVDSG LYLGMNEKGE  
60  
LYGSEKLTQE CVFREQFEEN XYNTYSSNLY KHVDTGRRYY VALNKDGTPR EGTRTKRHQK  
120  
FTHFLPRGGG GLSKGCFGLK LDRIGSMSGL GC  
152

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 152

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:16

10 Descripción de la Secuencia:

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:16:

<221> Clave de la Característica: MISC\_CARACTERÍSTICA

<222> Localización Desde: 81

15 <222> Localización Hasta: 81

Otra Información: X es distinto de W y más preferiblemente seleccionado de G, R, E o V (W144X)

Unión de CDS: No

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

20 <400> Cadena de la PreSecuencia:

MGLSKGCFGL KLDRIGMSG LGCGGGGGGG GQLYCRTGFH LEIFPNGTIQ GTRKDHSRFG  
60  
ILEFISIAVG LVSIRGVDSG LYLGMNEKGE LYGSEKLTQE CVFREQFEEN XYNTYSSNLY  
120  
KHVDTGRRYY VALNKDGTPR EGTRTKRHQK FTHFLPR  
157

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 157

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:17

25 Descripción de la Secuencia:

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:17:

<221> Clave de la Característica: MISC\_CARACTERÍSTICA

<222> Localización Desde: 111

30 <222> Localización Hasta: 111

Otra Información: X es distinto de W y más preferiblemente seleccionado de G, R, E o V (W144X)

Unión de CDS: No

Secuencia

<213> Nombre del Organismo HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

```

atggctgccg ggagcatcac cacgctgccc gcccttccgg aggatggcgg cagcggcgcc
60
ttcccgcccg ggcaattcaa ggaccccaag cggctgtact gcaaaaacgg gggcttcttc
120
ctgcgcatcc accccgacgg ccgagttgac ggggtccggg .agaagagcga ccctcacatc
180
aagctacaac ttcaagcaga agagagagga gttgtgtcta tcaaaggagt gtgtgctaac
240
cggtacctgg ctatgaagga agatggaaga ttactggctt ctaaagtgtg tacggatgag
300
tgtttctttt ttgaacgatt ggaatctaata nnntacaata cttaccggtc tagaaaatac
360
accagttggt atgtggcatt gaaacgaact gggcagtata aacttggttc caaacagga
420
cctgggcaga aagctatact ttttcttcca atgtctgcta agagctga
468
    
```

- 5 <212> Tipo: ADN
- <211> Longitud: 468
- Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:18
- Descripción de la Secuencia:

Característica

- 10 Secuencia: SEQ ID NO:18:
- <221> Clave de la Característica: misc\_característica
- <222> Localización Desde: 331 <222> Localización Hasta: 333

Otra Información: NNN es distinto de un codón que codifica Asn (AAT o AAC).o un codón de parada y es más preferiblemente un codón que codifica el aminoácido Gly o Arg.

- 15 Unión de CDS: No

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:18

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

- 20 <400> Cadena de la PreSecuencia:

```

atggctgccg ggagcatcac cacgctgccc gcccttccgg aggatggcgg cagcggcgcc
 60
ttcccgcccg ggcacttcaa ggacccaag cggctgtact gcaaaaacgg gggcttcttc
 120
ctgcgcatcc accccgacgg ccgagttgac ggggtccggg agaagagcga ccctcacatc
 180
aagctacaac ttcaagcaga agagagagga gttgtgtcta tcaaaggagt gtgtgctaac
 240
cggtacctgg ctatgaagga agatggaaga ttactggctt ctaaagtgtg tacggatgag
 300
tgtttctttt ttgaacgatt ggaatctaata cgtacaata cttaccggtc tagaaaatac
 360
accagttggt atgtggcatt gaaacgaact gggcagtata aacttggttc caaaacagga
 420
cctgggcaga aagctatact ttttcttcca atgtctgcta agagctga
 468

```

<212> Tipo: ADN  
 <211> Longitud: 468  
 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:19  
 Descripción de la Secuencia:

5

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:19:

<221> Clave de la Característica: misc\_característica  
 <222> Localización Desde: 333  
 <222> Localización Hasta: 333  
 Otra Información: N SE SELECCIONA DE A, C, G, T.  
 Unión de CDS: No

10

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:19

15

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
 <400> Cadena de la PreSecuencia:

```

atggctgccg ggagcatcac cacgctgccc gcccttccgg aggatggcgg cagcggcgcc
 60
ttcccgcccg ggcacttcaa ggacccaag cggctgtact gcaaaaacgg gggcttcttc
 120
ctgcgcatcc accccgacgg ccgagttgac ggggtccggg agaagagcga ccctcacatc
 180
aagctacaac ttcaagcaga agagagagga gttgtgtcta tcaaaggagt gtgtgctaac
 240
cggtacctgg ctatgaagga agatggaaga ttactggctt ctaaagtgtg tacggatgag
 300
tgtttctttt ttgaacgatt ggaatctaata nnntacaata cttaccggtc tagaaaatac
 360
accagttggt atgtggcatt gaaacgaact gggcagtata aacttggttc caaaacagga
 420
cctgggcaga aagctatact ttttcttcca atgtctgcta agagctga
 468

```

20

<212> Tipo: ADN  
 <211> Longitud: 468

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:20  
 Descripción de la Secuencia:

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:20:

- 5 <221> Clave de la Característica: misc\_característica
- <222> Localización Desde: 331
- <222> Localización Hasta: 333
- Otra Información: NNN es un codón que codifica el aminoácido A rg.
- Unión de CDS: No

10 Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:20

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

```

    atggctcang ggcanaatcac cacgctgccc gcccttccgg aggatggcgg cagcggcgcc
    60
    ttcccgcccg ggcacttcaa ggaccccaag cggctgtact gcaaaaacgg gggcttcttc
    120
    ctgcgcatcc accccgacgg ccgagttgac ggggtccggg agaagagcga ccctcacatc
    180
    aagctacaac ttcaagcaga agagagagga gttgtgtcta tcaaaggagt gtgtgctaac
    240
    cggtacctgg ctatgaagga agatggaaga ttactggctt ctaaattgtgt tacggatgag
    300
    tgtttctttt ttgaacgatt ggaatctaata nnntacaata cttaccggtc tagaaaatac
    15 360

    accagttggt atgtggcatt gaaacgaact gggcagtata aacttgggtc caaaacagga
    420
    cctgggcaga aagctatact ttttcttcca atgtctgcta agagctga
    468
    
```

<212> Tipo: ADN  
 <211> Longitud: 468  
 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:21  
 Descripción de la Secuencia:

20 Característica

Secuencia: SEQ ID NO:21:

- 25 <221> Clave de la Característica: misc\_característica
- <222> Localización Desde: 9
- <222> Localización Hasta: 9
- Otra Información: N ES BIEN A O G
- Unión de CDS: No

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:21:

- 30 <221> Clave de la Característica: misc\_característica
- <222> Localización Desde: 15
- <222> Localización Hasta: 15

Otra Información: N ES BIEN A O G  
 Unión de CDS: No

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:21:

- 5 <221> Clave de la Característica: misc\_característica
- <222> Localización Desde: 331
- <222> Localización Hasta: 333
- Otra Información: NNN es distinto de un codón que codifica Asn (AAT o AAC) o un codón de parada y es más preferiblemente un codón que codifica el aminoácido Gly o Arg.
- 10 Unión de CDS: No

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:21

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

- 15 <400> Cadena de la PreSecuencia:

```

    atggctcang ggcanatcac cacgctgccc gcccttccgg aggatggcgg cagcggcgcc
        60
    ttcccgcccg ggcacttcaa ggaccccaag cggctgtact gcaaaaacgg gggcttcttc
        120
    ctgcgcatcc accccgacgg ccgagttgac ggggtccggg agaagagcga ccctcacatc
        180

    aagctacaac ttcaagcaga agagagagga gttgtgtcta tcaaaggagt gtgtgctaac
        240
    cggtaactgg ctatgaagga agatggaaga ttactggctt ctaaagtgtg tacggatgag
        300
    tgtttctttt ttgaacgatt ggaatctaata ggntacaata cttaccggtc tagaaaatac
        360
    accagttggt atgtggcatt gaaacgaact gggcagtata aacttggttc caaacagga
        420
    cctgggcaga aagctatact ttttcttcca atgtctgcta agagctga
        468
    
```

- <212> Tipo: ADN
- <211> Longitud: 468
- 20 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:22
- Descripción de la Secuencia:

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:22:

- 25 <221> Clave de la Característica: misc\_característica
- <222> Localización Desde: 9
- <222> Localización Hasta: 9
- Otra Información: N ES BIEN A O G
- Unión de CDS: No

Característica

- 30 Secuencia: SEQ ID NO:22:

<221> Clave de la Característica misc\_característica  
 <222> Localización Desde: 15

<222> Localización Hasta: 15  
 Otra Información: N ES BIEN A O G  
 Unión de CDS: No

Característica

5 Secuencia: SEQ ID NO:22:

<221> Clave de la Característica: misc\_característica  
 <222> Localización Desde: 333  
 <222> Localización Hasta: 333  
 Otra Información: N ES BIEN A, C, G, O T  
 10 Unión de CDS: No

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:22

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

15 <400> Cadena de la PreSecuencia:

```

atgtcggggc cggggacggc cgcggtagcg ctgctcccgg cggtcctgct ggccttgctg
 60
gcgccctggg cgggcccagg gggcgccgcc gcacccaactg cacccaacgg cacgctggag
 120
gccgagctgg agcgcgcgctg ggagagcctg gtggcgctct cgttggcgcg cctgccggtg
 180
gcagcgcagc ccaaggaggc ggccgtccag agcggcgccg gcgactacct gctgggcatc
 240
aagcggctgc ggcggctcta ctgcaacgtg ggcacggtt tccacctcca ggcgtcccc
 300
gacggccgca tcggcggcgc gcacgcggac acccgcgaca gcctgctgga gctctcgccc
 360
gtggagcggg gcgtggtgag catcttcggc gtggccagcc ggttcttcgt ggccatgagc
 420
agcaagggca agctctatgg ctcgcccttc ttcaccgatg agtgcacgtt caaggagatt
 480
ctccttccca acnntacaa cgcctacgag tcctacaagt accccggcat gttcatcgcc
 540
ctgagcaaga atgggaagac caagaagggg aaccgagtgt cgcccacat gaaggtcacc
 600
cacttcctcc ccaggctg
 618
    
```

<212> Tipo: ADN  
 <211> Longitud: 618

20 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:23  
 Descripción de la Secuencia:

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:23:

25 <221> Clave de la Característica: misc\_característica  
 <222> Localización Desde: 493  
 <222> Localización Hasta: 495  
 Otra Información: NNN es distinto de un codón que codifica Asn (AAT o AAC) o un codón de parada y es más preferiblemente un codón que codifica el aminoácido Gly o Arg.  
 Unión de CDS: No

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:23

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

5 <400> Cadena de la PreSecuencia:

```

atggcgcgcc tgccggtggc agcgcagccc aaggaggcgg ccgccagag cggcgccggc
 60
gactacctgc tgggcatcaa gcggctgcgg cggctctact gcaacgtggg catcggcttc
120
cacctccagg cgctccccga cggccgcac ggccggcgc acgcggacac ccgcgacagc
180
ctgctggagc tctcgcccgt ggagcggggc gtggtgagca tcttcggcgt ggccagccgg
240

ttcttcgtgg ccatgagcag caagggcaag ctctatggct cgcccttctt caccgatgag
300
tgcacgttca aggagattct cttcccaac nntacaacg cctacgagtc ctacaagtac
360
cccggcatgt tcatcgccct gagcaagaat ggaagacca agaaggggaa ccgagtgtcg
420
cccaccatga aggtcaccca ctctctcccc aggctg
456
    
```

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 456

10 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:24

Descripción de la Secuencia:

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:24:

<221> Clave de la Característica: misc\_característica

15 <222> Localización Desde: 331

<222> Localización Hasta: 333

Otra Información: NNN es distinto de un codón que codifica Asn (AAT o AAC) o un codón de parada y es más preferiblemente un codón que codifica el aminoácido Gly o Arg.

Unión de CDS: No

20 Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:24

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

```

atgcagctat actgcaggac tggatttcac ttagaaatct tcccgaatgg tactatccag
60
ggaaccagga aagaccacag ccgatttggc attctggaat ttatcagtat agcagtgggc
120
ctggtcagca ttcgagggcgt ggacagtgga ctctacctcg ggaatgaatga gaagggggag
180
ctgtatggat cagaaaaact aaccaagag tgtgtattca gagaacagtt cgaagaaaac
240
tggataata cgtactcgtc aaacctatat aagcacgtgg aactggaag gcgatactat
300
gttgcatata ataaagatgg gaccccgaga gaagggacta ggactaaacg gcaccagaaa
360
ttcacacatt ttttacctag accagtggac cccgacaaag tacctgaact gtataaggat
420
attctaagcc aaagttga
438

```

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 438

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:25

5 Descripción de la Secuencia:

Patente

Secuencia: SEQ ID NO:25:

<302> Título: VARIANTES ACTIVAS DE FGF CON ESPECIFICIDAD MEJORADA

<308> Número de Registro DB:

10 <309> Fecha de Entrada DB:

<310> Número de Documento: WO 02/36732

<311> Fecha de Presentación de la Patente: 2001-10-18

<312> Fecha de Publicación: 2002-05-10

<313> Desde: 1

15 <313> Hasta: 438

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:25

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

20 <400> Cadena de la PreSecuencia:

```

atgcagctat actgcaggac tggatttcac ttagaaatct tcccgaatgg tactatccag
60
ggaaccagga aagaccacag ccgatttggc attctggaat ttatcagtat agcagtgggc
120
ctggtcagca ttcgagggcgt ggacagtgga ctctacctcg ggaatgaatga gaagggggag
180
ctgtatggat cagaaaaact aaccaagag tgtgtattca gagaacagtt cgaagaaaac
240
nntataata cgtactcgtc aaacctatat aagcacgtgg aactggaag gcgatactat
300
gttgcatata ataaagatgg gaccccgaga gaagggacta ggactaaacg gcaccagaaa
360
ttcacacatt ttttacctag accagtggac cccgacaaag tacctgaact gtataaggat
420
attctaagcc aaagttga
438

```

<212> Tipo: ADN  
 <211> Longitud: 438  
 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:26  
 Descripción de la Secuencia:

5 Característica

Secuencia: SEQ ID NO:26:

<221> Clave de la Característica: misc\_característica  
 <222> Localización Desde: 241  
 <222> Localización Hasta: 243

10 Otra Información: NNN es distinto de un codón que codifica Trp (TGG) o un codón de parada (TAA, TAG o TGA) y es más preferiblemente un codón que codifica el aminoácido Gly, Arg, Val or Glu.  
 Unión de CDS: No

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:26

15 Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

```

    atgcagctat actgcaggac tggatttcac ttagaaatct tccccaatgg tactatccag
        60
    ggaaccagga aagaccacag ccgatttggc attctggaat ttatcagtat agcagtgggc
        120
    ctggtcagca ttcgaggcgt ggacagtgga ctctacctcg ggatgaatga gaagggggag
        180
    ctgtatggat cagaaaaact aaccaagag tgtgtattca gagaacagtt cgaagaaaac
        240
    tggтатаata cgtactcgtc aaacctatat aagcacgtgg acactggaag gcgatactat
        300
    gttgcattaa ataaagatgg gaccccgaga gaagggacta ggactaaacg gcaccagaaa
        360
    ttcacacatt ttttacctag atga
        384
    
```

20 <212> Tipo: ADN .  
 <211> Longitud: 384  
 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:27  
 Descripción de la Secuencia:

Patente

Secuencia: SEQ ID NO:27:

25 <302> Título: VARIANTES ACTIVAS DE FGF CON ESPECIFICIDAD MEJORADA  
 <308> Número de Registro DB:  
 <309> Fecha de Entrada DB:  
 <310> Número de Documento: WO 02/36732  
 <311> Fecha de Presentación de la Patente: 2001-10-18  
 30 <312> Fecha de Publicación: 2002-05-10  
 <313> Desde: 1  
 <313> Hasta: 384

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:27

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

```

atgcagctat actgcaggac tggatttcac ttagaaatct tccccaatgg tactatccag
 60
ggaaccagga aagaccacag ccgatttggc attctggaat ttatcagtat agcagtgggc
120

ctggtcagca ttcgaggcgt ggacagtgga ctctacctcg ggatgaatga gaagggggag
180
ctgtatggat cagaaaaact aacccaagag tgtgtattca gagaacagtt cgaagaaaac
240
nntataata cgtactcgtc aaacctatat aagcacgtgg aactggaag gcgatactat
300
gttgcattaa ataaagatgg gaccccgaga gaagggacta ggactaaacg gcaccagaaa
360
ttcacacatt ttttacctag atga
384
    
```

5

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 384

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:28

Descripción de la Secuencia:

10 Característica

Secuencia: SEQ ID NO:28:

<221> Clave de la Característica: misc\_característica

<222> Localización Desde: 241

<222> Localización Hasta: 243

15 Otra Información: NNN es distinto de un codón que codifica Trp.(TGG) o un codón de parada (TAA, TAG o TGA) y es más preferiblemente un codón que codifica el aminoácido Gly, Arg, Val o Glu.

Unión de CDS: No

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:28

20 Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

```

atgcagctat actgcaggac tggatttcac ttagaaatct tccccaatgg tactatccag
 60
ggaaccagga aagaccacag ccgatttggc attctggaat ttatcagtat agcagtgggc
120
ctggtcagca ttcgaggcgt ggacagtgga ctctacctcg ggatgaatga gaagggggag
180
ctgtatggat cagaaaaact aaccaagag tgtgtattca gagaacagtt cgaagaann
240
tggтатаata cgtactcgtc aaacctatat aagcacgtgg aactggaag gcgatactat
300
gttgcatata ataaagatgg gaccccgaga gaagggacta ggactaaacg gcaccagaaa
360
ttcacacatt ttttaccaga ccagtggacc ccgacaaagt acctgaactg tataagata
420
ttctaagcca aagttga
437

```

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 437

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:29

5 Descripción de la Secuencia:

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:29:

<221> Clave de la Característica: misc\_característica

<222> Localización Desde: 238

10 <222> Localización Hasta: 240

Otra Información: en la que NNN es distinto de un codón que codifica Asn (AAT, AAC) o un codón de parada (TAA, TAG o TGA) y es más preferiblemente un codón que codifica el aminoácido Ser.

Unión de CDS: No

Codón Sintético

15 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:29

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

```

atgcagctat actgcaggac tggatttcac ttagaaatct tccccaatgg tactatccag
 60
ggaaccagga aagaccacag ccgatttggc attctggaat ttatcagtat agcagtgggc
120
ctggtcagca ttcgaggcgt ggacagtgga ctctacctcg ggatgaatga gaagggggag
180
ctgtatggat cagaaaaact aaccaagag tgtgtattca gagaacagtt cgaagaann
240
tggтатаata cgtactcgtc aaacctatat aagcacgtgg aactggaag gcgatactat
300
gttgcatata ataaagatgg gaccccgaga gaagggacta ggactaaacg gcaccagaaa
360
ttcacacatt ttttacctag atga
384

```

20 <212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 384

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:30

Descripción de la Secuencia:

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:30:

- <221> Clave de la Característica: misc\_característica
- <222> Localización Desde: 238
- 5 <222> Localización Hasta: 240
- Otra Información: NNN es distinto de un codón que codifica Asn (AAT, AAC) o un codón de parada (TAA, TAG o TGA) y es más preferiblemente un codón que codifica el aminoácido Ser.
- Unión de CDS: No

Característica

10 Secuencia: SEQ ID NO:30:

- <221> Clave de la Característica: misc\_característica
- <222> Localización Desde: 238
- <222> Localización Hasta: 240
- 15 Otra Información: NNN es distinto de un codón que codifica Asn (AAT, AAC) o un codón de parada (TAA, TAG o TGA) y es más preferiblemente un codón que codifica el aminoácido Ser.
- Unión de CDS: No

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:30

Secuencia

20 <213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

```

atgcagctat actgcaggac tggatttcac ttagaaatct tccccaatgg tactatccag
 60
ggaaccagga aagaccacag ccgatttggc attctggaat ttatcagtat agcagtgggc
120
ctggtcagca ttcgaggcgt ggacagtgga ctctacctcg ggatgaatga gaagggggag
180
ctgtatggat cagaaaaact aaccaagag tgtgtattca gagaacagtt cgaagaaaac
240
nntataata cgtactcgtc aaacctatat aagcacgtgg aactggaag gcgatactat
300
gttgcattaa ataaagatgg gaccccgaga gaagggacta ggactaaacg gcaccagaaa
360
ttcacacatt ttttacctag aggaggggga ggtctgtcca aaggttgctt cggcctcaag
420
ctggaccgaa tcggctccat gagcggcctg ggatgt
456
    
```

- <212> Tipo: ADN
- <211> Longitud: 456
- 25 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:31
- Descripción de la Secuencia:

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:31:

- <221> Clave de la Característica: misc\_característica
- 30 <222> Localización Desde: 241
- <222> Localización Hasta: 243
- Otra Información: NNN es distinto de un codón que codifica Trp (TGG) o un codón de parada (TAA, TAG o TGA) y es más preferiblemente un codón que codifica el aminoácido Gly, Arg, Val or Glu.
- Unión de CDS: No

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:31

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

5 <400> Cadena de la PreSecuencia:

```

atgggtctgt ccaaagggtg cttcggcctc aagctggacc gaatcggctc catgagcggc
 60
ctgggatgcg gagggggagg gggaggggga gggcagctat actgcaggac tggatttcac
120
ttagaaatct tcccgaatgg tactatccag ggaaccagga aagaccacag ccgatttggc
180
attctggaat ttatcagtat agcagtgggc ctggtcagca ttcgaggcgt ggacagtgga
240
ctctacctcg ggatgaatga gaagggggag ctgtatggat cagaaaaact aaccaagag
300
tgtgtattca gagaacagtt cgaagaaaac nnntataata cgtactcgtc aaacctatat
360
aagcacgtgg aactggaag gcgatactat gttgcattaa ataaagatgg gaccccgaga
420
gaagggacta ggactaaacg gcaccagaaa ttcacacatt ttttacctag a
471
    
```

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 471

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:32

10 Descripción de la Secuencia:

Característica

Secuencia: SEQ ID NO:32:

<221> Clave de la Característica: misc\_característica <222> Localización Desde: 331

<222> Localización Hasta: 333

15 Otra Información: NNN es distinto de un codón que codifica Trp (TGG) o un codón de parada (TAA, TAG o TGA) y es más preferiblemente un codón que codifica el aminoácido Gly, Arg, Val o Glu.

Unión de CDS: No

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:32

20 Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

**LEENHYNTY**  
9

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 9

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:33

25 Descripción de la Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

**LESNNYNTY**  
9

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 9

5 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:34

Descripción de la Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

10 IHELGYNTY 9

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 9

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:35

Descripción de la Secuencia:

15 Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

LLPNYNAY 9

<212> Tipo: PRT

20 <211> Longitud: 9

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:36

Descripción de la Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

FQENSYNTY 9

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 9

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:37

30 Descripción de la Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

LLPNYNTY 9

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 9

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:38

Descripción de la Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS

<400> Cadena de la PreSecuencia:

ILENHYNTY 9

<212> Tipo: PRT

<211> Longitud: 9

45 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:39

Descripción de la Secuencia:

Secuencia

5 <213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
VLENNYTAL 9  
<212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 9  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:40  
Descripción de la Secuencia:

Secuencia

10 <213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
FEENWYNTY 9  
<212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 9  
15 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:41  
Descripción de la Secuencia:

Secuencia

20 <213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
IEENGYNTY 9  
<212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 9  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:42  
Descripción de la Secuencia:

25 Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
VFENYYVLY 9  
<212> Tipo: PRT  
30 <211> Longitud: 9  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:43  
Descripción de la Secuencia:

Secuencia

35 <213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
VFENYYVIY 9  
<212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 9  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:44  
40 Descripción de la Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
VFENYYVTY 9  
45 <212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 9  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:45  
Descripción de la Secuencia:

50

Secuencia

5 <213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
VFENYYVIY 9  
<212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 9  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:46  
Descripción de la Secuencia:

Secuencia

10 <213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
MDCLGYNQY 9  
<212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 9  
15 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:47  
Descripción de la Secuencia:

Secuencia

20 <213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
FEENWYNTY 9  
<212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 9  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:48  
Descripción de la Secuencia:

25 Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
VLENNYTAF 9  
<212> Tipo: PRT  
30 <211> Longitud: 9  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:49  
Descripción de la Secuencia:

Secuencia

35 <213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
VLENNYTAL 9  
<212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 9  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:50  
40 Descripción de la Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
IRPDGYNVY 9  
45 <212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 9  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:51  
Descripción de la Secuencia:

50

Secuencia

5 <213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
FEENWYNTY 9  
<212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 9  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:52  
Descripción de la Secuencia:

Secuencia

10 <213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
LLEDGYNVY 9  
<212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 9  
15 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:53  
Descripción de la Secuencia:

Secuencia

20 <213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
IEENGHNTY 9  
<212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 9  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:54  
Descripción de la Secuencia:

25 Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
TLENGYDVY 9  
<212> Tipo: PRT  
30 <211> Longitud: 9  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:55  
Descripción de la Secuencia:

Secuencia

35 <213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
FEENWYNTY 9  
<212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 9  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:56  
40 Descripción de la Secuencia:

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: HOMO SAPIENS  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
LLEDGYNVY 9  
45 <212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 9  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:57  
Descripción de la Secuencia:

50

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial

<400> Cadena de la PreSecuencia:

**ggaattccat atggctgaag gggaaatc**  
**28**

- 5 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 28  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:58  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

- 10 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:58

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial

<400> Cadena de la PreSecuencia:

**cgggatcctc agctcttagc ag**  
**22**

- 15 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 22  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:59  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

- 20 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:59

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial

<400> Cadena de la PreSecuencia:

**gattggaatc taatggctac aatacttac**  
**29**

- 25 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 29  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:60  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

- 30 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:60

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial

<400> Cadena de la PreSecuencia:

**gtaagtattg tagccattag attccaatc**  
**29**

- 35 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 29

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:61  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:61

5 Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

gattggaatc taatcgctac aatacttac  
29

10 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 29  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:62  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:62

15 Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

gtaagtattg tagcgattag attccaatc  
29

20 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 29  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:63  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:63

25 Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

ggaattccat atggctcaag ggcaaatcac cacgctg  
37

30 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 37  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:64  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:64

35 Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

cgaagaaaac gggataata cgtac  
25

5 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 25  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:65  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:65

Secuencia

10 <213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

gtacgtatta taccgtttt cttcg  
25

15 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 25  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:66  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:66

Secuencia

20 <213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

cgaagaaaac cggataata cg  
22

25 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 22  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:67  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:67

Secuencia

30 <213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

cgtattatac cggttttctt cg  
22

35 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 22  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:68  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:68

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
5 cgaagaaaac ggtataata cg 22  
<212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 22  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:69  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

10 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:69

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
  
cgtattatac ācgttttctt cg  
22  
15 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 22  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:70  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

20 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:70

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
  
cgaagaaaac gagtataata cg  
22  
25 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 22  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:71  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

30 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:71

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:  
  
cgtattatac tōcgttttctt cg  
22  
35 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 22  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:72  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:72

Secuencia

5 <213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

cgaagaaaac gcgtataata cg  
22

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 22

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:73

10 Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:73

Secuencia

15 <213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

cgtattatac gcgttttctt cg  
22

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 22

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:74

20 Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:74

Secuencia

25 <213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

cgaagaaaac aattataata cg  
22

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 22

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:75

30 Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:75

Secuencia

35 <213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

cgtattataa ttgttttctt cg  
22

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 22

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:76  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:76

5 Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

agctggatcc tcaactttgg cttagaatat cc  
32

10 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 32  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:77  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia SEQ ID NO:77

15 Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

ggaattcca tatgcagcta tactgcagga ctg  
33

20 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 33  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:78  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

25 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:78

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

gttcgaagaa agctggtata atatagc  
27

30 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 27  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:79  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

35 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:79

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

cgtattatac cagctttctt cgaac  
25

<212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 25  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:80  
Descripción de la Secuencia:

5

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:80

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

10

acgtcatatg ttggcgcgcc tgccgggtg  
28

<212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 28  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:81  
Descripción de la Secuencia:

15

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:81

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

20

acgtggatcc tcacagcctg gggaggaag  
29

<212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 29  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:82  
Descripción de la Secuencia:

25

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:82

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

30

gattctcctt cccaacaggt acaacgccta cgag  
34

<212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 34  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:83  
Descripción de la Secuencia:

35

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:83

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial

<400> Cadena de la PreSecuencia:

ctcgtaggcg ttgtacctgt tgggaaggag aatc  
34

- 5 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 34  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:84  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

- 10 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:84

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial

<400> Cadena de la PreSecuencia:

ggccctagggt catctaggta aaaaatgtgt g  
31

- 15 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 31  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:85  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

- 20 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:85

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial

<400> Cadena de la PreSecuencia:

gggaattcca tatgcagcta tactgcagga ctg  
33

- 25 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 33  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:86  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

- 30 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:86

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial

<400> Cadena de la PreSecuencia:

agctggatcc tcaacttgg cttagaatat cc  
32

- 35 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 32  
Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:87  
Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:87

Secuencia

5 <213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

cgatacgtac atatgcactt agaaatcttc  
30

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 30

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:88

10 Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:88

Secuencia

15 <213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

gggaattcca tatgcagcta tactgcagga ctg  
33

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 33

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:89

20 Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:89

Secuencia

25 <213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

agctggatcc tcagcaaccc agaccggaca tg  
32

<212> Tipo: ADN

<211> Longitud: 32

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:90

30 Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:90

Secuencia

35 <213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
<400> Cadena de la PreSecuencia:

cacacatttt ttacctagag gagggggagg tctgtccaaa ggttgc  
46

<212> Tipo: ADN  
 <211> Longitud: 46  
 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:91  
 Descripción de la Secuencia:

5 Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:91

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
 <400> Cadena de la PreSecuencia:

10 **gcaacctttg gacagacctc cccctcctct aggtaaaaa tgtgtg**  
**46**

<212> Tipo: ADN  
 <211> Longitud: 46  
 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:92  
 Descripción de la Secuencia:

15 Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:92

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
 <400> Cadena de la PreSecuencia:

20 **acgtgaccat atgggtctgt ccaaggttg**  
**30**

<212> Tipo: ADN  
 <211> Longitud: 30  
 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:93  
 Descripción de la Secuencia:

25 Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:93

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial  
 <400> Cadena de la PreSecuencia:

30 **cagtcttgca gtatagctgc cctccccctc ccctcccc tccgcaacc agaccggaca**  
**60**  
**tg 62**

<212> Tipo: ADN  
 <211> Longitud: 62  
 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:94  
 Descripción de la Secuencia:

35 Codón Sintético

Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:94

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial

<400> Cadena de la PreSecuencia:

```
atgtccggtc tgggttgccg ägggggagg ggagggggag ggcagctata ctgcaggact
60
g
61
```

- 5 <212> Tipo: ADN
- <211> Longitud: 61
- Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:95
- Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

- 10 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:95

Secuencia

<213> Nombre del Organismo: Secuencia Artificial

<400> Cadena de la PreSecuencia:

```
ggccctaggt catctaggta aaaaatgtgt g
31
```

- 15 <212> Tipo: ADN
- <211> Longitud: 31
- Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:96
- Descripción de la Secuencia:

Codón Sintético

- 20 Nombre de la Secuencia: SEQ ID NO:96

**REIVINDICACIONES**

1. Una variante de FGF-2 que tiene al menos una sustitución de aminoácido en el bucle beta8-beta9,  
en la que la variante se identifica por la SEQ ID NO:1, y  
5 en la que la al menos una sustitución es el reemplazo de asparagina en la posición 111 por un aminoácido seleccionado de glicina o arginina,  
caracterizándose además dicha variante de FGF-2 por al menos uno de los atributos siguientes comparada con el FGF-2 de tipo salvaje correspondiente:  
especificidad aumentada para un subtipo de receptor;  
10 actividad biológica incrementada mediada por al menos un subtipo de receptor con actividad equivalente o reducida mediada a través de otro subtipo de receptor;  
afinidad aumentada para al menos un subtipo de receptor;  
proliferación celular incrementada mediada a través de un subtipo de receptor.
2. La variante según la reivindicación 1, en la que la variante comprende además al menos una mutación adicional que proporciona rendimiento o estabilidad aumentada de la variante,  
15 en la que  
la variante tiene una sustitución por glutamina en las posiciones de aminoácidos 3 y 5 como se identifica por la SEQ ID NO:4, o  
la variante tiene una sustitución por glutamina en las posiciones de aminoácidos 3 y 5 y una sustitución por glicina en la posición 111 como se identifica por la SEQ ID NO:5.
- 20 3. La variante según la reivindicación 1 que tiene una actividad de al menos 2 veces la actividad del FGF nativo en términos de proliferación inducida por la variante en células que presentan FGFR.
4. Un polinucleótido como se identifica por la SEQ ID NO:18, en el que el codón que codifica asparagina en la posición de nucleótido 331-333 se reemplaza por un codón que codifica glicina o arginina de manera que el polinucleótido resultante codifica una variante de FGF-2 que tiene al menos una sustitución de aminoácido en el bucle beta8-beta9,  
25 caracterizándose además dicha variante de FGF-2 por al menos uno de los atributos siguientes comparada con el FGF-2 de tipo salvaje correspondiente:  
especificidad aumentada para un subtipo de receptor;  
actividad biológica incrementada mediada por al menos un subtipo de receptor con actividad equivalente o reducida mediada a través de otro subtipo de receptor;  
30 afinidad aumentada para al menos un subtipo de receptor;  
proliferación celular incrementada mediada a través de un subtipo de receptor.
5. El polinucleótido según la reivindicación 4, en el que al menos otro codón está modificado de manera que el polipéptido resultante proporciona un rendimiento o estabilidad aumentada de la variante,  
en el que  
35 los codones en las posiciones de nucleótidos 7-9 y 13-15 codifican cada uno glutamina como se identifica por la SEQ ID NO:21; o  
los codones en las posiciones de nucleótidos 7-9 y 13-15 codifican cada uno glutamina y el codón en las posiciones de nucleótidos 331-333 codifica glicina como se identifica por la SEQ ID NO:22.
- 40 6. El polinucleótido según la reivindicación 4, en el que el polipéptido resultante tiene una actividad de al menos 2 veces la actividad del FGF nativo en términos de proliferación inducida por la variante en células que presentan FGFR.

7. Una composición farmacéutica que comprende como un ingrediente activo al menos una variante de FGF-2 según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
8. La composición farmacéutica según la reivindicación 7,  
5 formulada para administración por las vías intra-articular, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica o intratecal; o  
formulada para administración en el sitio del trauma óseo o del cartílago, comprendiendo además preferiblemente una matriz.
9. Uso de una variante de FGF-2 según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado de trastornos esqueléticos relacionados con FGFR y trastornos proliferativos relacionados con FGFR.  
10
10. El uso según la reivindicación 9,  
en el que el trastorno es trastorno esquelético, preferiblemente para estimular o aumentar la cicatrización de fracturas óseas, procesos de crecimiento óseo, crecimiento o reparación de cartílago; o  
para mejorar los procesos de cicatrización de heridas.
11. Uso de una variante de FGF-2 según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para la selección, proliferación o diferenciación de células madre, en el que se excluyen las células madre embrionarias humanas.  
15
12. Un método para interconvertir selectivamente un polipéptido FGF de un mitógeno a un factor de diferenciación o de un factor de diferenciación a un mitógeno, que comprende la etapa de generar una variante según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

Figura 1

LYCSN-----GGHFLRILPDGTVDRDRSDQHIOQLSAESVG-EVYIKSTETGQYLAMDTDGLLYGSQTPNEE-|HFGF1  
 LYCKN-----GGFFLRIHDPGRVDGVREKSDPHIKLQQAEEERG-VVSIKGVCANRYLAMKEDGRLLASKCVTDE-|HFGF2  
 LGGAPRRRKLKLYC--ATKYHLQLHPSGRVNGSLEN-SAYSILEITAVEVG-GVAIRGLFSGRYLAMNKRGRLYASEHYSAE-|HFGF3  
 LLGIKRLRLLYCNVIGIGFHLQALPDGRIGGAHAD-TRDSLLELSPVERG-VVSI FGVARFFVAMSSKGKLYGSPFFTDE-|HFGF4  
 SPSSRRRTGSLYCRVIGIGFHLQIYPDGKVNGSHEA-NMLSVLEIFAVSQG-IVGIRGVFSNKFVAMSKKGLHASAKFTDD-|HFGF5  
 LYCNVG-----IGFHLQVLPDGRISGTHEE-NPYSLLEISTVERG-VVSLFGVRSALFVAMNSKGRLYATPSFQEE-|HFGF6  
 EGGDIRVRLFC--RTQWYLRIDKRGKVKGTQEMKNNYNIMEIRTVAVG-IVAIGVSESEFYLAMNKEGKLYAKKECNED-|HFGF7  
 RRLIRTYQLYSR--TSGKHVQVLANKRINAMAEDGDPFAKLI VETDTFGRVVRVGAETGLYICMNNKGGKLI AKSNGKGD|HFGF8  
 LKGI LRRRQLKLYC---RTGFHLEIFPNGTIQGRKDHRSRFGILEFISIAVG-LVSI RGVDSGLYLGMNEKGE LYGSEKLTQE-|HFGF9  
 GKITRL-QYLYSAGPYGFHLEIFPNGTIQGRKDHRSRFGILEFISIAVG-LVSI RGVDSGLYLGMNEKGE LYGSEKLTQE-|MFGF9  
 LQGDVWRKLF S---FTKYFLKIEKNGKVSGTKKENCYPSILEITSVEIG-VVAVKAINSYYLAMNKKGKLYGSKEFNND-|HFGF10  
 LKGIVT--KLF C--RQGFY LQANPDGSIQGTPEDTSSFTHFNLIPVGLR-VVTIQSAKLGHYMAMNAEGLLYSSPHFTAE-|HFGF11  
 LKGIVT--RLFS---QQGYFLQMHDPDGTIDGTDKDESDYTLFNLIPVGLR-VVAIQGVKASLYVAMNGEGYLYSSDVFTPE-|HFGF12  
 LKGIVT--KLYS---RQYHLQLOAQDGTIDGTDKDESDYTLFNLIPVGLR-VVAIQGVQTKLYLAMNSEGYLYTSELFTPE-|HFGF13  
 LKGIVT--RLFC---RQGYLQMHDPDGDALDGTDDSTNSTL FNLIPVGLR-VVAIQGVKTKGLYIAMNGEGYLYPSELFTPE-|HFGF14  
 LQYLYSAGPY----VSNCFLRIRSDGSDVEEDQ-NERNLLEFRAVALK-TIAIKDVSSVRYLCMSADGKIYGLIRYSEED|HFGF15  
 LKGI LRRRQLKLYC---RTGFHLEIFPNGTVHGTTRHDHRSRFGILEFISLAVG-LISIRGVDSGLYLGMNERGELYGSKKLTRE-|HFGF16  
 RRQIREYQLYSR--TSGKHVQVVG-RRISATAEDGNKFAKLI VETDTFGRVVRVRIKGAESEKEYICMNNKRGKLI GKPSGKSKD|HFGF17  
 RKQLRLYQLYSR--TSGKHIQVLG-RRISARGEDGKYAQLLVEITDTFGSQVRIKGETEFYLCMNRKGLV GKPDGTSKE|HFGF18  
 LRHL YTS GPHG---LSSCF LRIRADGVVDCARGQ-SAHSLLEIKAVALR-TVAIKGVHSVRYLCMGADGKMQLLQYSEED|HFGF19  
 LHGI LRRRQLKLYC---RTGFHLOILPDG SVQGRQDHS LFGILEFISVAVG-LVSI RGVDSGLYLGMNDKGE LYGSEKLTSE-|HFGF20  
 RQRYLYTDDAQ---QTEAHLEIREDTGVGGAAD-QSPESLLQLKALKPG-VIQILGVKTSRFLCQRPD GALYGLS LHFDP EA|HFGF21  
 LEGDVWRRLFS---STHFFLRVDPGGRVQGRWRRHGQDSILEIRSVHVG-VVVIKAVSSGFFVAMNRRRRLYGSRLYTV D-|HFGF22  
 LYTATAR-----NSYHLQIHKNGHVDGAPHQ-TIYSALMIRSEDAG-FVVI TGVMSRRRYLCMDFRGNI FGS HY FDPEN|HFGF23

Figura 1 cont.

\* CLFLERLEENHYNTYISKKH-----A----EKN-----WVGLKKNKSGCKR--GPRTHYGQKAILFLPLP | HFGF1  
 CFFFERLESNNYNTYRSRK-----YTS-----WYVALKRTGQYKL--GSKTGPQKAILFLPLMS | HFGF2  
 CEFVERIHELGYNTYASRLYRTVSSTPGARRQPSAERL-----G-----WVSVNGKGRPRR--GFKTRRTQKSSFLPRV | HFGF3  
 CTFKEILLPNNYNAYESYKYP-----TEKTGRE-----MFIALSKNGKTKK--GNRVSPIMKVTHFLPRL | HFGF4  
 CKFRERFOENSYNTYASAIHR-----THNG-GE-----WYVALNKRKAKRGCSPRVKPOHISTHFLPRF | HFGF5  
 CKFRETLPLNNYNAYESDLYQ-----EG-----GTYIALSKYGRVR--GSKVSPIMTVTHFLPRI | HFGF6  
 CNFKELILENHNTYASAKW-----KHVDTGRR-----MVALNQKGIPIVR--GKTKKEQKTAHFLPMA | HFGF7  
 CVFTEIVLENNYALQNAKY-----KHVDTGRR-----WYMAFTRKGRPRK--GSKTRQHQREVFHFMKRL | HFGF8  
 CVFREQFEENWYNTYSSNLY-----KHVDTGRR-----YYVALNKDGTPRE--GTRTKRHQKFTHFLPRP | HFGF9  
 CVFREQFEENWYNTYSSNLY-----KHVDTGRR-----YYVALNKDGTPRE--GTRTKRHQKFTHFLPRP | MFGF9  
 CKLKERIEENGXNTYASFNW-----QHNG-RQ-----MYVALNGKAPRR--GQKTRRKNNTSAHFLPMV | HFGF10  
 CRFKECVFENYVLYASALY-----RQRRSGRA-----WYGLDKEGQVMK--GNRVKTKKAAAHAFLPKL | HFGF11  
 CKFKESVFENYVLYSSNLY-----RQESGRA-----WFLGLNKEGQIMK--GNRVEKTKPSSHVFVPKP | HFGF12  
 CKFKESVFENYVLYSSMIY-----RQQSGRG-----WYGLNKEGEIMK--GNHVKNKPAHAFLPKP | HFGF13  
 CKFKESVFENYVLYSSMLY-----RQESGRA-----WFLGLNKEGQAMK--GNRVKTKKPAHAFLPKP | HFGF14  
 CTFREEMDCLGYNQYRSMK-----HH-----LHIIIFIQAKP-RE--QLQDQ---KPSNFIPVF | HFGF15  
 CVFREQFEENWYNTYASTLY-----KHSDSERQ-----YYVALNKDGSPPRE--GYRTKRHOKFTHFLPRP | HFGF16  
 CVFTEIVLENNYAFQNAKH-----EG-----WMAFTRQGRPRQ--ASRSRQNRQREAHFIKRL | HFGF17  
 CVFIEKVLLENNYALMSAKY-----SG-----WYVGFTKKGRPRK--GPKTRENQDVFHFMKRY | HFGF18  
 CAFEEEIRPDGYNVYRSEK-----HR-----LPVLSLSSAKQ-RQ--LYKNRGEFLPLSHFLPML | HFGF19  
 CTFREQFEENWYNTYSSNIY-----KHGDTGRR-----YFVALNKDGTPRD--GARSKRHOKFTHFLPRP | HFGF20  
 CSFRELLELDGYNVYQSEAH-----GL-----PLHLPGNKSPHRD--PAPRG----PARFLPLP | HFGF21  
 CRFRERIEENGHTYASQRW-----RRRG-QP-----MFLALDRRGGPRP--GGTRTRYHLSAHFLPVL | HFGF22  
 CRFOHQTLLENGYDVYHSPQYHFLVSLGRAKRAFLPGMNPYPYSQFLSRRNEIPLIHFNTPIPRRHTRSAEDDSERDPL | HFGF23  
 \*

Figura 2A

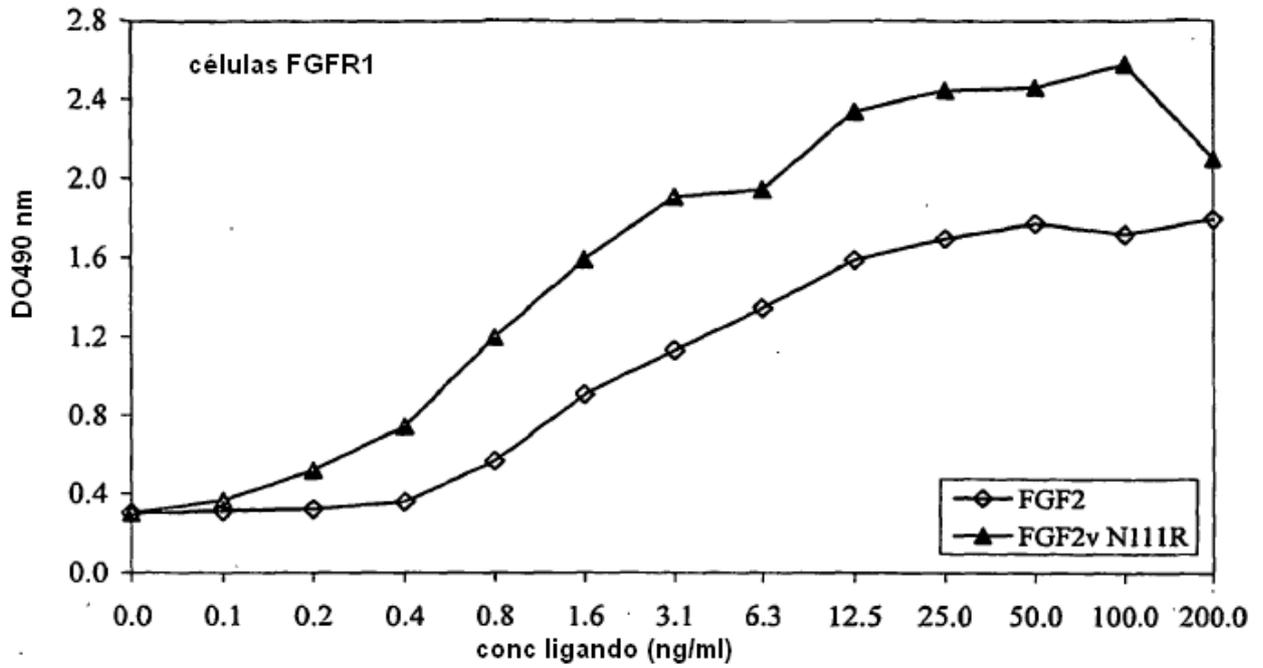


Figura 2B

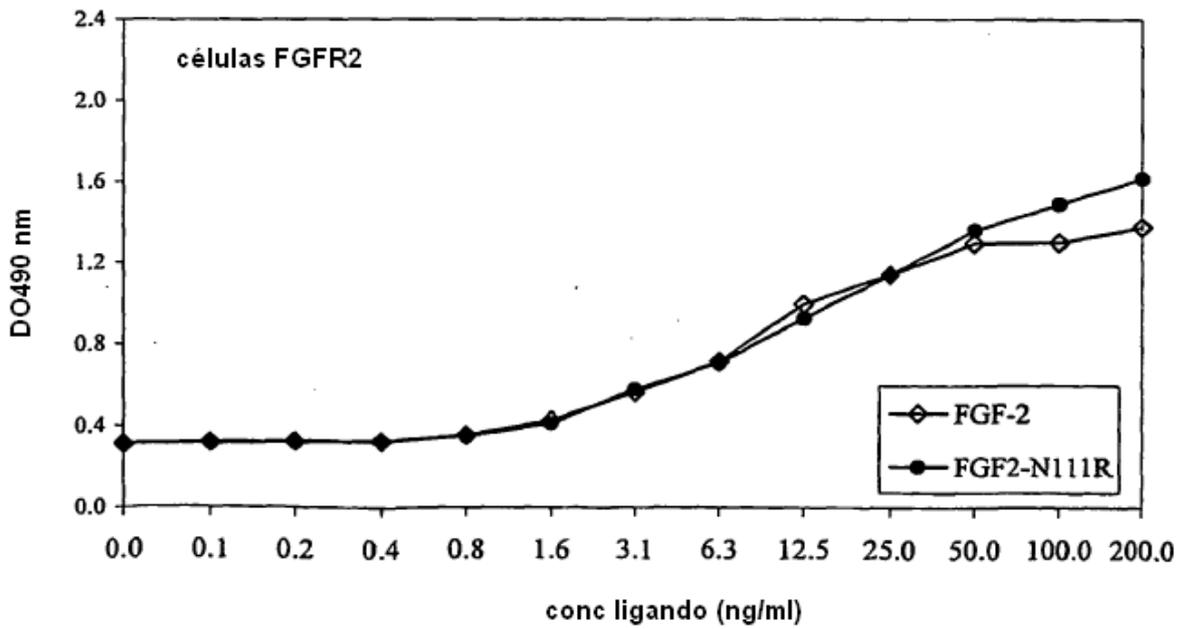


Figura 3A

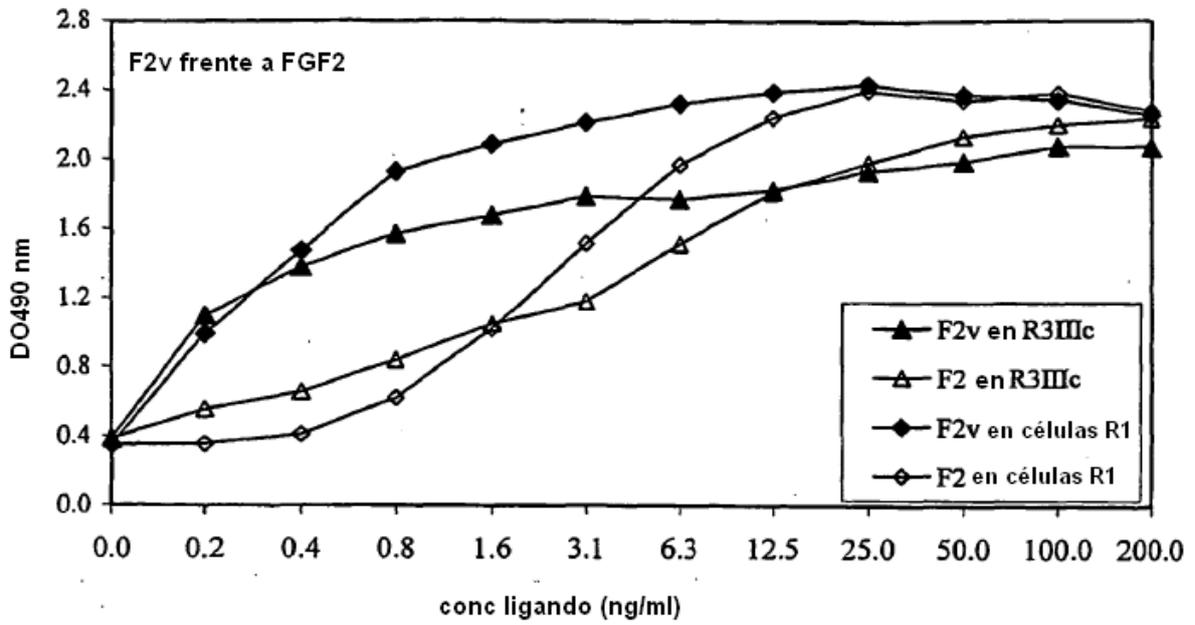


Figura 3B

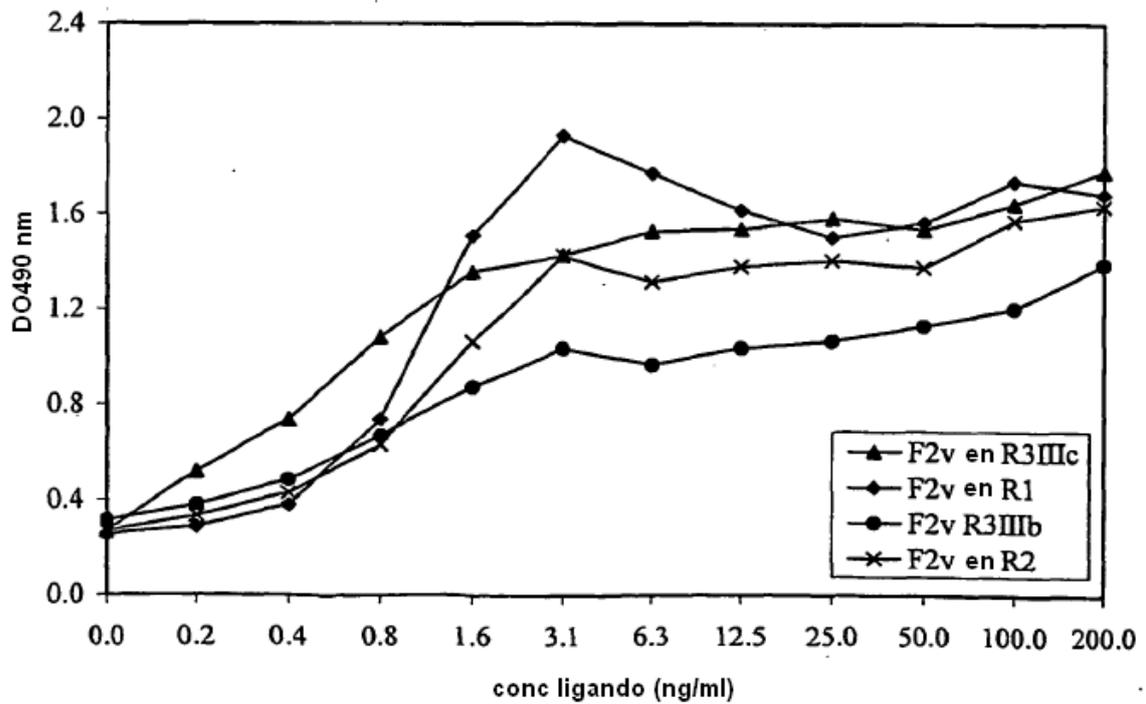


Figura 4

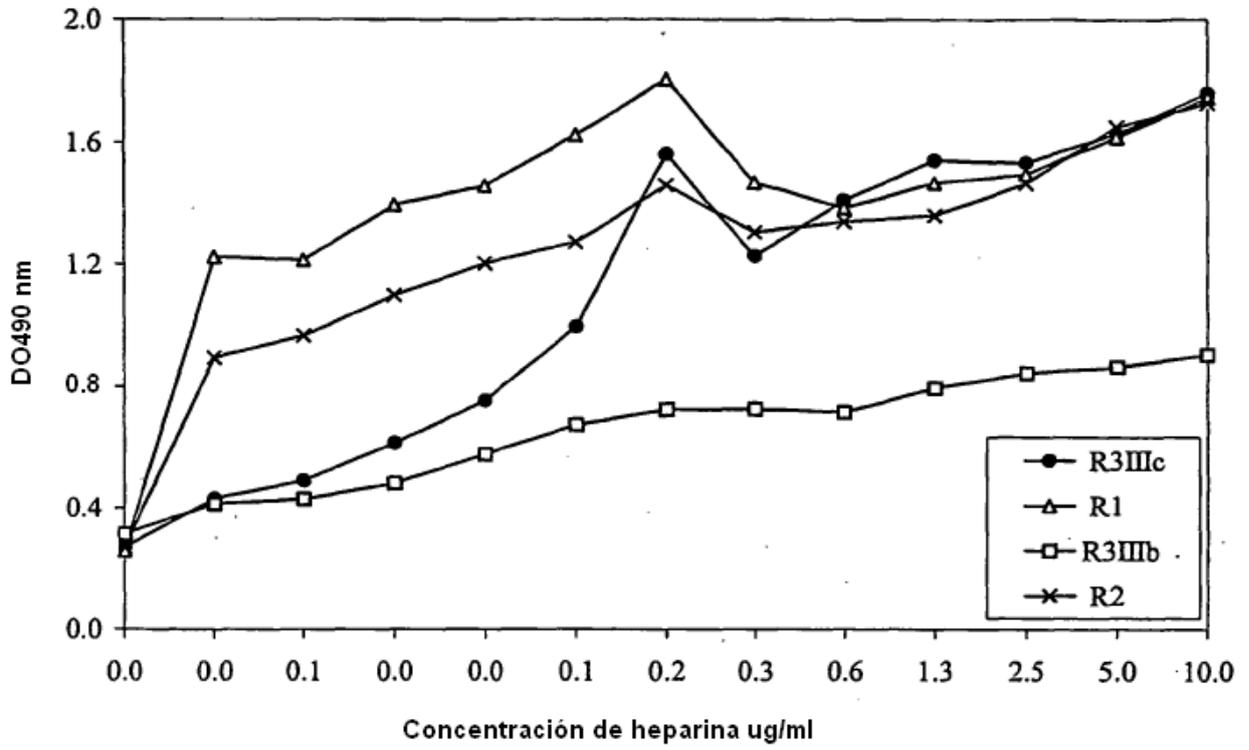


Figura 5

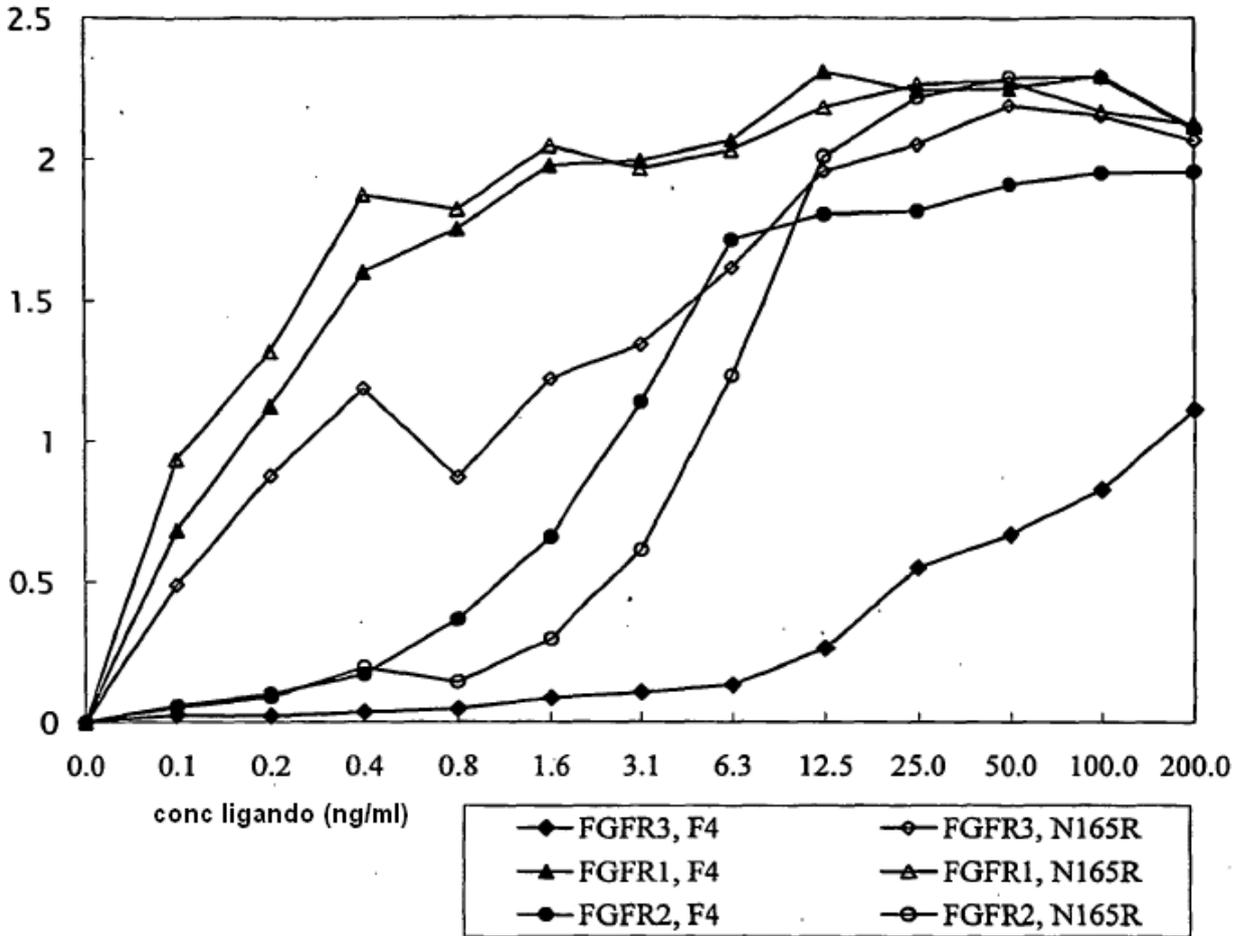


Figura 6A

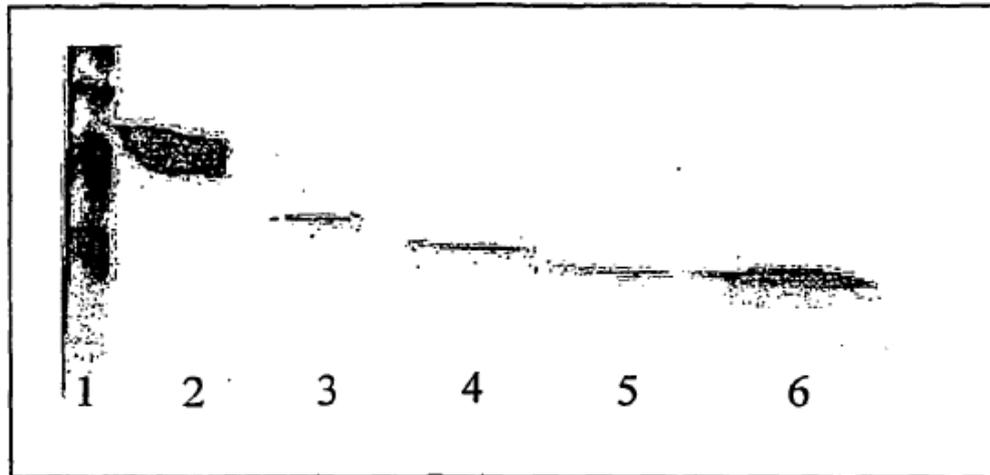


Figura 6B

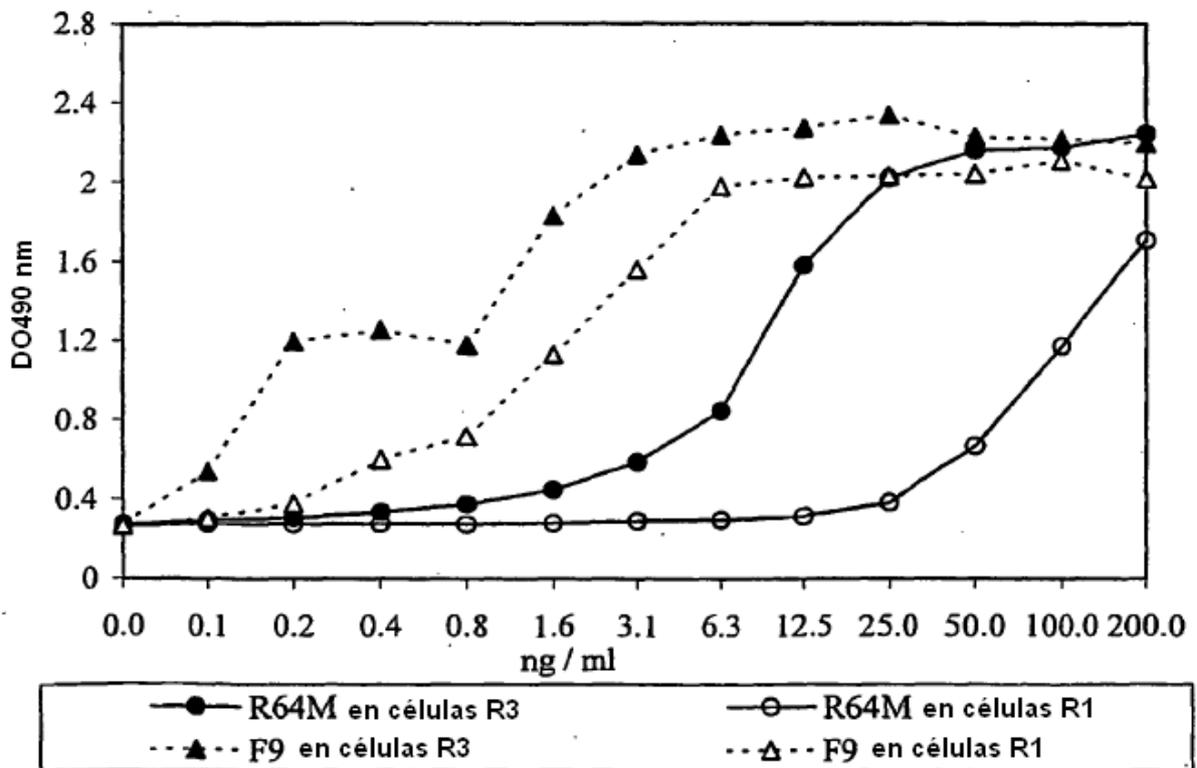


Figura 7

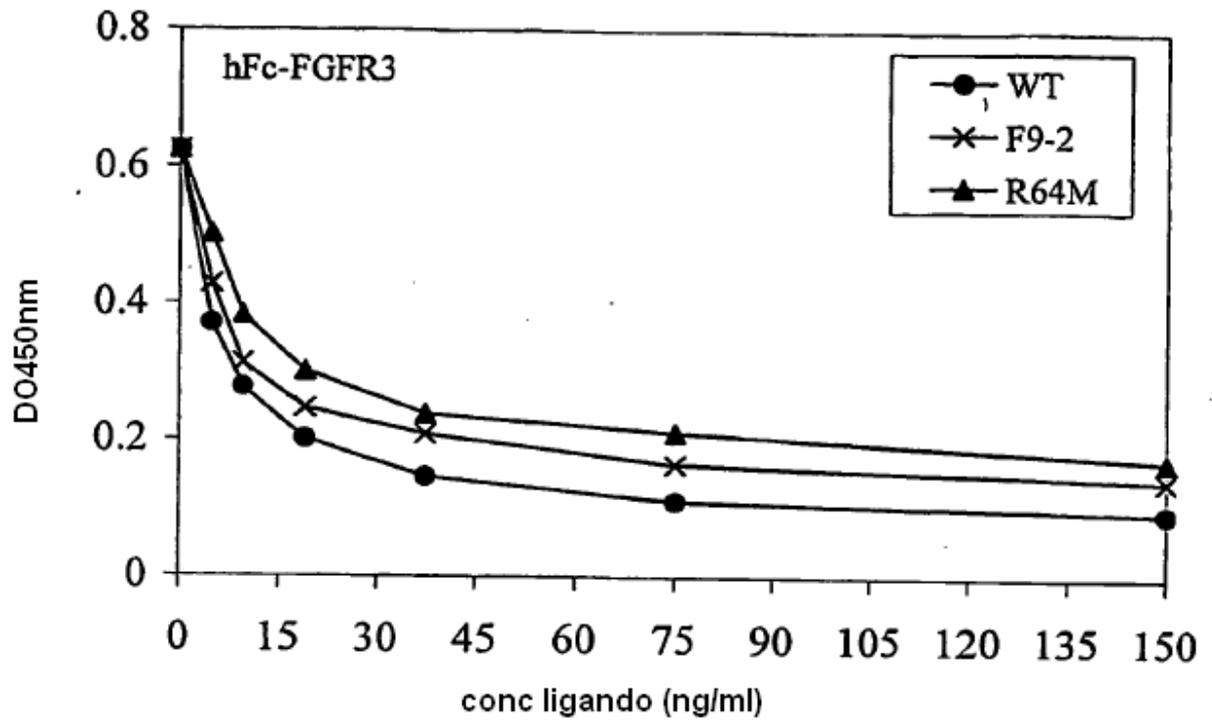


Figura 8A

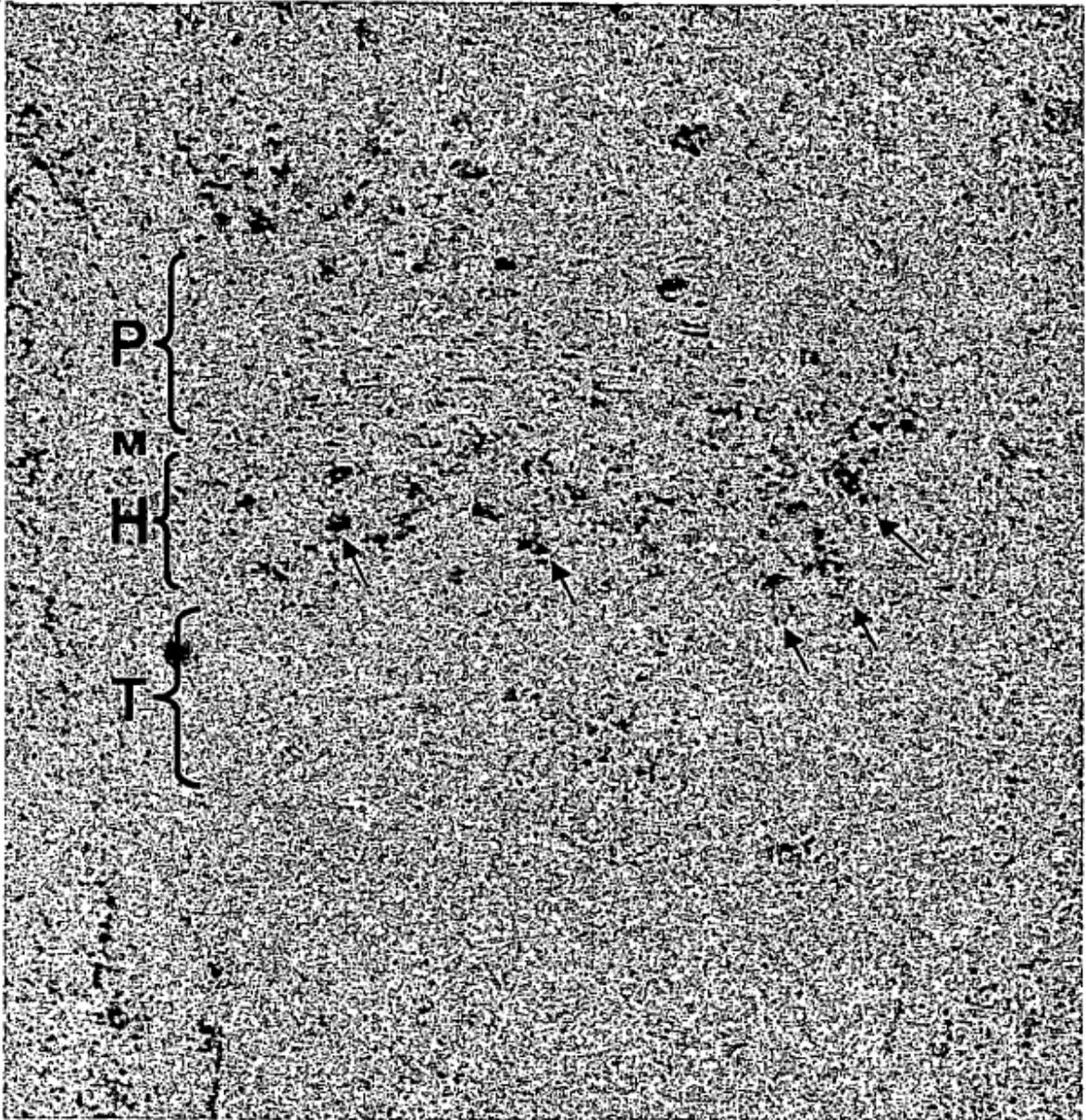


Figura 8B

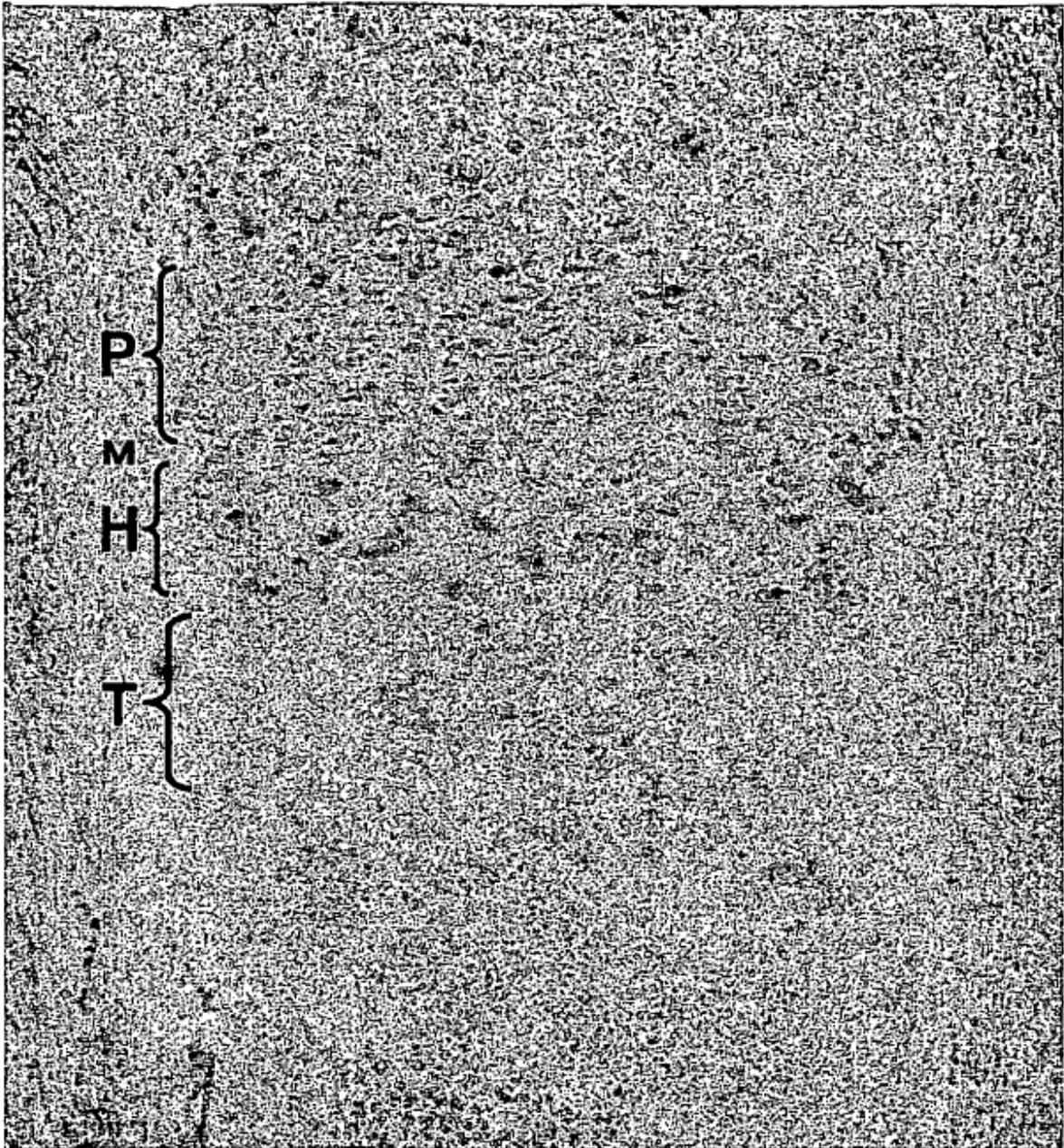


Figura 9

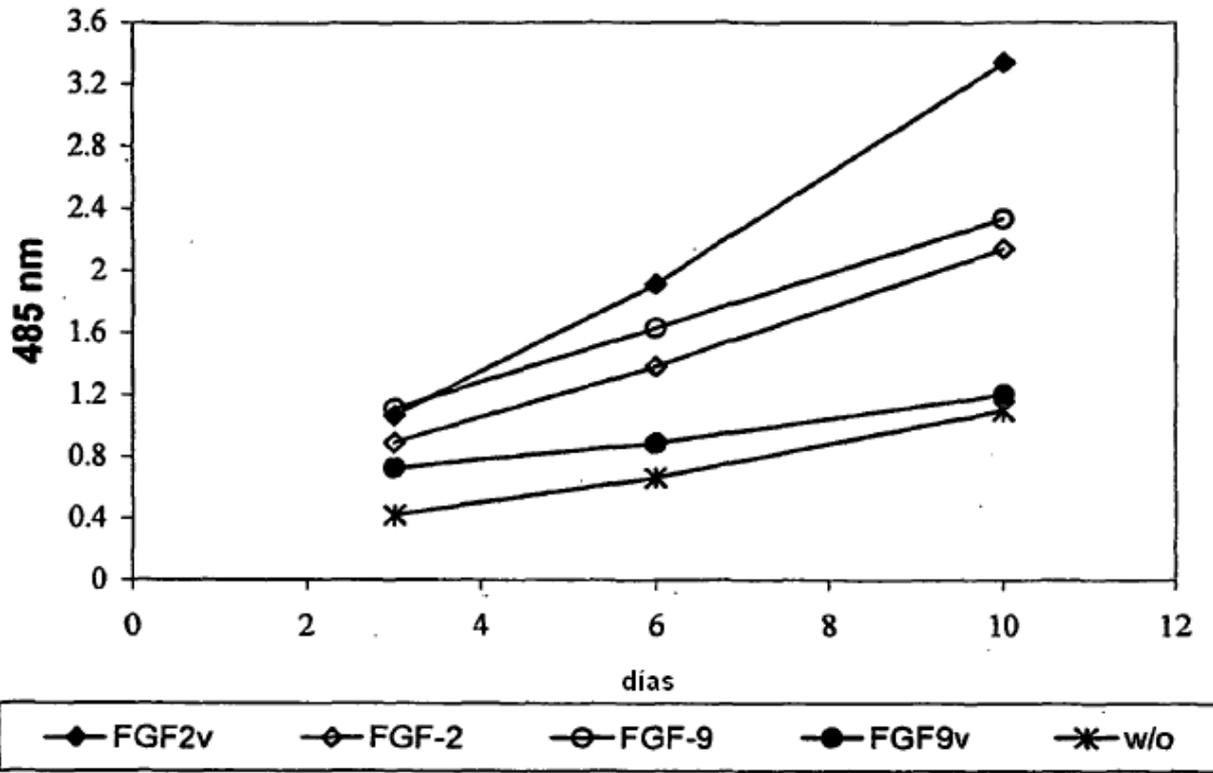


Figura 10A

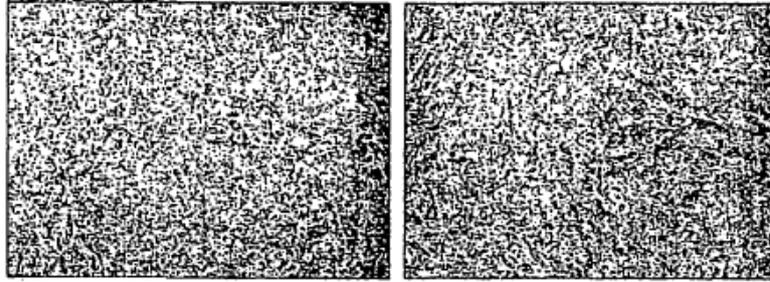
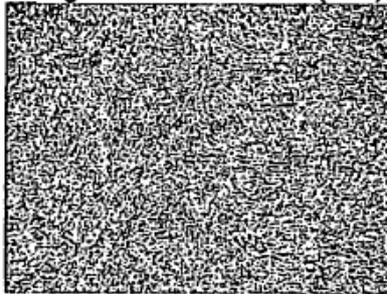


Figura 10B (x100)



(x200)

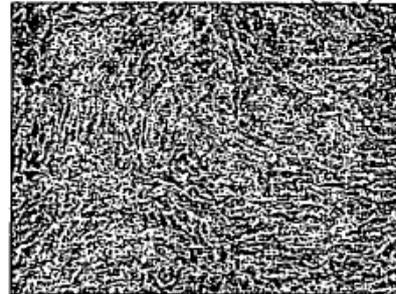


Figura 10C

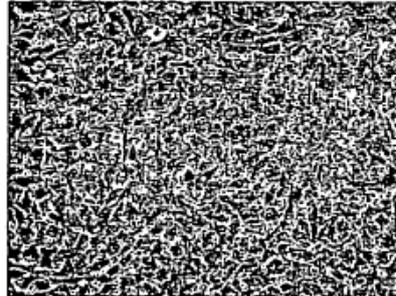
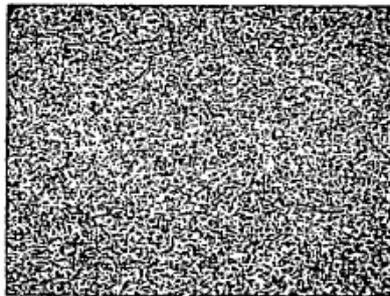


Figura 10D

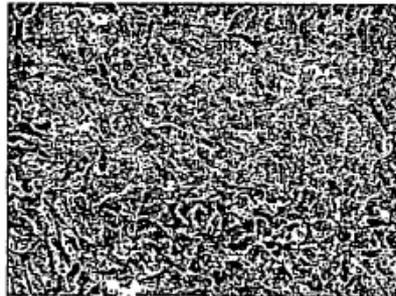
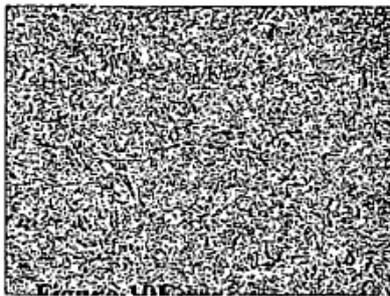


Figura 10E

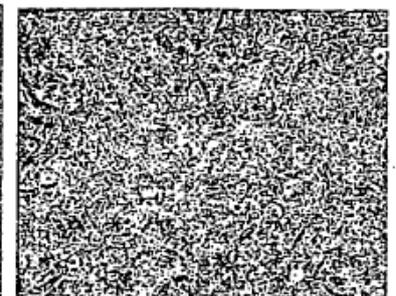
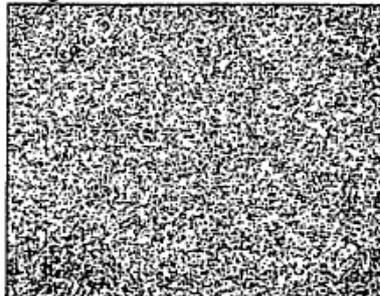


Figura 11A



Figura 11B

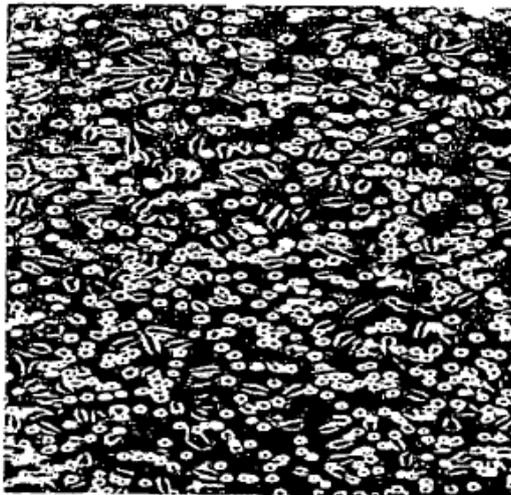


Figura 11C

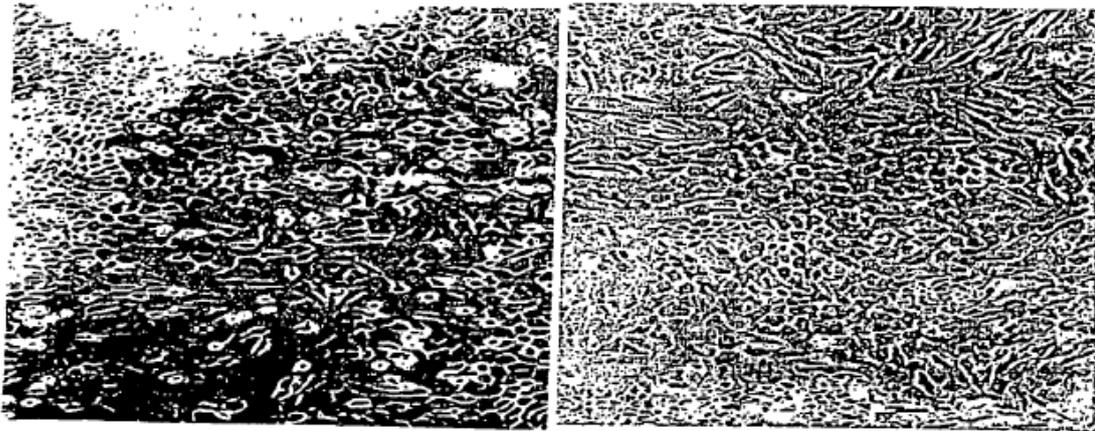


Figura 12A

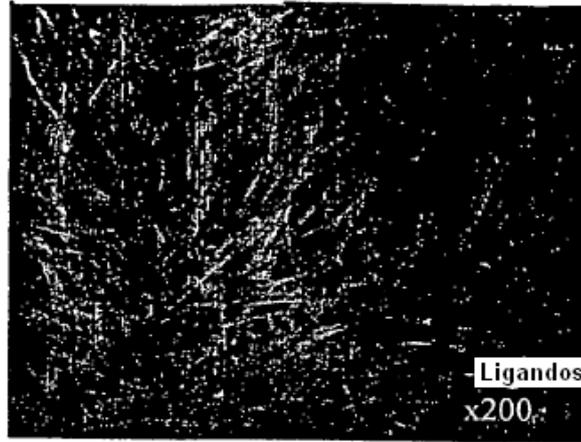


Figura 12B

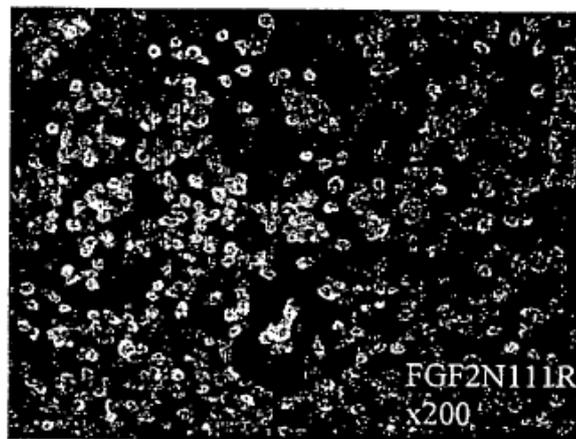


Figura 12C

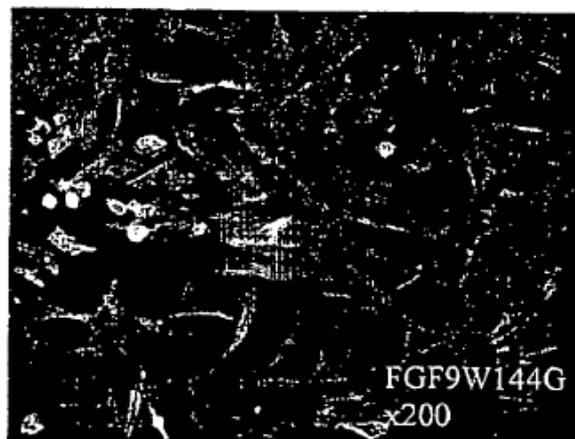


Figura 13A

1 semana



Figura 13B

2 semanas

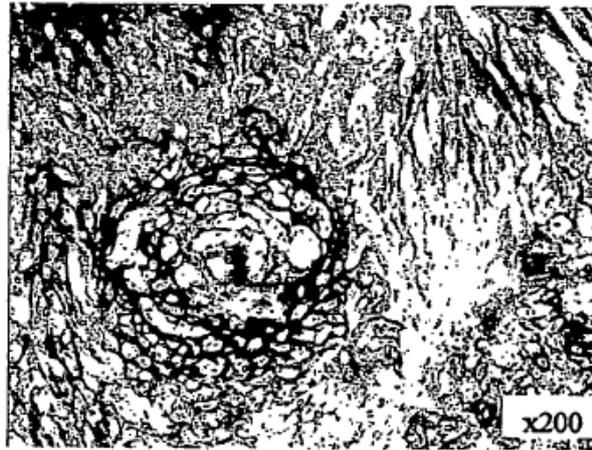


Figura 13C

6 semanas

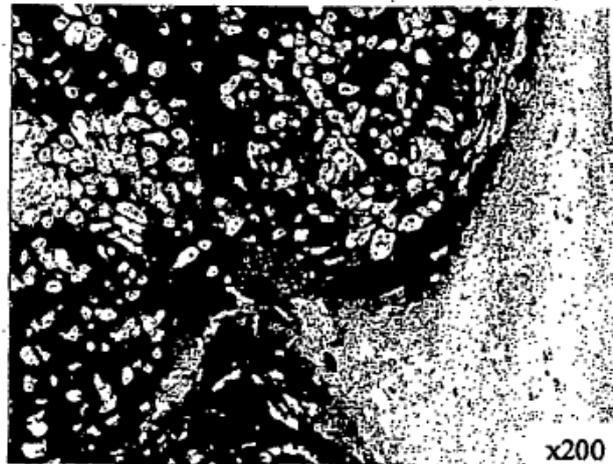


Figura 14A

W144G



Figura 14B

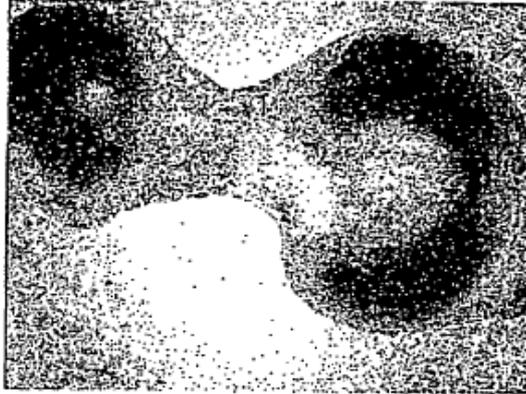


Figura 14C

N111R



Figura 14D

-ligandos

