

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 880**

51 Int. Cl.:

C12N 15/18 (2006.01)
C07K 14/50 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.1997 E 10176653 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 2264175**

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

30 Prioridad:

16.10.1996 US 28646 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.05.2013

73 Titular/es:

**ZYMOGENETICS, INC. (100.0%)
1201 Eastlake Avenue East
Seattle, WA 98102, US**

72 Inventor/es:

**DEISHER, THERESA A.;
CONKLIN, DARRELL C.;
RAYMOND, FENELLA C.;
BUKOWSKI, THOMAS R.;
JULIEN, SUSAN D.;
HANSEN, BRIGIT y
SHEPPARD, PAUL O.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 403 880 T3

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

DESCRIPCIÓN

Homólogos de factor de crecimiento de fibroblastos.

Antecedentes de la invención

5 La familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) consiste en al menos nueve miembros distintos (Basilico et al., Adv. Cancer Res. 59:115-165, 1992 y Fernig et al., Prog. Growth Factor Res. 5 (4):353-377, 1994) que actúan generalmente como mitógenos para un amplio espectro de tipos de células. Por ejemplo, el FGF básico (conocido también como FGF-2) es mitogénico *in vitro* para células endoteliales, células musculares lisas vasculares, fibroblastos y, generalmente, para células de origen mesodérmico o neuroectodérmico, incluyendo miocitos cardiacos y esqueléticos (Gospodarowicz et al., J. Cell. Biol. 70:395-405, 1976; Gospodarowicz et al., J. Cell. Biol. 89:558-578, 1981 y Kardami, J. Mol. Cell. Biochem. 92:124-134, 1990). *In vivo*, se ha demostrado que el bFGF desempeña un papel en el desarrollo cardiaco aviar (Sugi et al., Dev. Biol. 168:567-574, 1.995 y Mima et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 92:467-471, 1995), y que induce el desarrollo coronario colateral en perros (Lazarous et al., Circulation, 94:1074-1082, 1996). Además, se han demostrado actividades no mitogénicas para diversos miembros de la familia FGF. Las actividades no proliferativas asociadas con FGF ácido y/o básico incluyen: aumento de liberación endotelial de activador tisular del plasminógeno, estimulación de síntesis de matriz extracelular, quimiotaxis de células endoteliales, expresión inducida de genes contráctiles fetales en cardiomiocitos (Parker et al., J. Clin. Invest. 85:507-514, 1990), y una mayor capacidad de respuesta hormonal pituitaria (Baird et al., J. Cellular Physiol. 5:101-106, 1987).

20 Varios miembros de la familia FGF no tienen una secuencia señal (aFGF, bFGF y posiblemente FGF-9) y, de esta manera, no se espera que sean secretadas. Además, varios de los miembros de la familia FGF tienen la capacidad de migrar al núcleo celular (Friesel et al., FASEB 9:919-925, 1995). Todos los miembros de la familia FGF se unen a heparina basándose en similitudes estructurales. La homología estructural cruza especies, lo que sugiere una conservación de su relación estructura/función (Ornitz et al., J. Biol. Chem. 271 (25):15292-15297, 1996)

25 Hay cuatro receptores FGF extracelulares conocidos (FGFRs), y todos son tirosina quinasas. En general, los miembros de la familia FGF se unen a todos los FGFR conocidos, sin embargo, FGF específicos se unen a receptores específicos con mayor grado de afinidad. Otro medio para la especificidad dentro de la familia FGF es la expresión espacial y temporal de los ligandos y sus receptores durante la embriogénesis. La evidencia sugiere que, muy probablemente, los FGF actúan sólo de una manera autocrina y/o paracrina, debido a su afinidad de unión a heparina, lo que limita su difusión desde el sitio de liberación (Flaumenhaft et al., J. Cell. Biol. 111 (4):1651-1659, 1990) El FGF básico carece de una secuencia señal y, por lo tanto, está limitada a los modos de acción paracrina o autocrina. Se ha postulado que el FGF básico se almacena intracelularmente y se libera tras un daño tisular. Se ha demostrado que el FGF básico tiene dos regiones de unión a receptor que son distintas del sitio de unión a heparina (Abraham et al., EMBO J. 5 (10): 2523-2528, 1986).

35 Se ha demostrado que el FGFR-3 desempeña un papel en el crecimiento óseo. Ratones convertidos en homocigóticos con receptor nulo para el FGFR-3 (-/-) dieron como resultado anomalías esqueléticas posnatales (Colvin et al, Nature Genet. 12:309-397, 1996 y Deng et al, Cell 84:911-921, 1995). El fenotipo mutante sugiere que en ratones normales, el FGFR-3 desempeña un papel en la regulación de la división de células condrocito en la región de la placa de crecimiento del hueso (Goldfarb, Cytokine Growth Factor Rev. 7 (4):311-325, 1996). El ligando para el FGFR-3 en la placa de crecimiento de hueso no ha sido identificado.

40 Aunque se han identificado cuatro FGFRs, todos los cuales han demostrado tener variantes alternativas de corte y empalme funcionales, la posibilidad de que existan nuevos receptores de FGF es bastante probable. Por ejemplo, no se ha identificado un receptor para la isoforma FGF-8a (MacArthur et al., J. Virol. 69 (4): 2501-2507, 1995).

45 El FGF-8 es un miembro de la familia FGF que se aisló originalmente a partir de células de carcinoma mamario como un mitógeno inducible por andrógenos. Ha sido mapeado al cromosoma humano 10q25-q26 (White et al., Genómica 30:109-11, 1995). El FGF-8 está implicado en el desarrollo embrionario de las extremidades (Vogel et al, Development 122: 1737-1750, 1996 y Tanaka et al, Current Biology 5 (6): 594-597, 1995). La expresión de FGF-8 durante la embriogénesis en tejido cardiaco, genitourinario y neural indica que puede desempeñar un papel en el desarrollo de estos tejidos (Crossley et al., Development 121:439-451, 1995). Hay algunas evidencias de que la acrocefalosindactilia, una afección congénita caracterizada por la cabeza puntiaguda y dedos palmeados, está asociada con mutaciones puntuales de FGF-8 (White et al., 1995, *ibid*).

50 El FGF-8 tiene cinco exones, a diferencia de otros FGF conocidos, que sólo tienen tres exones. Los primeros tres exones del FGF-8 corresponden al primer exón de los otros FGFs (MacArthur et al., Development 121:3603-3613, 1995). El gen humano para el FGF-8 codifica para cuatro isoformas que difieren en sus regiones N-terminales: isoformas a, b, e, y f del FGF; en contraste con el gen murino que da lugar a ocho isoformas de FGF-8 (Crossley et al., 1995, *ibid*). El FGF-8a y el 8b-FGF humanos tienen un 100 % de homología con las proteínas murinas, y las proteínas FGF-8e y FGF-8f tienen una homología del 98 % entre humanos y ratones (Gemel et al., Genómica 35:253-257, 1996).

- 5 La enfermedad cardíaca es la principal causa de muerte en los Estados Unidos, representando hasta el 30 % de todas las muertes. El infarto de miocardio (IM) representa 750.000 hospitalizaciones por año en los EE.UU., con más de 5 millones de personas diagnosticadas con enfermedad coronaria. Los factores de riesgo de IM son la diabetes mellitus, la hipertensión, la obesidad troncular, el tabaquismo, los niveles altos de lipoproteína de baja densidad en plasma o la predisposición genética.
- 10 La hiperplasia cardíaca es un aumento en la proliferación de miocitos cardíacos, y se ha demostrado que se produce con el envejecimiento normal en el ser humano y en ratas (Olivetti et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 24 (1):140-9, 1994 y Anversa et al., *Circ. Res.* 67:871-885, 1990), y en la cardiomiopatía inducida por catecolamina en ratas (Deisher et al., *Am. J. Cardiovasc. Pathol.* 5 (1):79-88, 1994). Si el aumento en los miocitos se origina con algún progenitor, o si es resultado de la proliferación de un tipo de célula más diferenciada terminalmente, sigue siendo controvertido.
- Sin embargo, debido a que el infarto y otras causas de necrosis miocárdica parecen ser irreparables, parece que los mecanismos normales de hiperplasia cardíaca no pueden compensar una muerte miocítica extensa y sigue existiendo una necesidad de factores exógenos que promuevan la hiperplasia y, en última instancia, resulten en la renovación de la capacidad del corazón para funcionar.
- 15 La remodelación ósea es el proceso dinámico mediante el cual se mantienen la masa tisular y la arquitectura esquelética. El proceso es un equilibrio entre resorción ósea y formación ósea, en el que se cree que dos tipos de células son los principales actores. Estas células son el osteoblasto y el osteoclasto. Los osteoblastos sintetizan y depositan una matriz que se convierte en hueso nuevo. Las actividades de los osteoblastos y los osteoclastos son reguladas por muchos factores, sistémicos y locales, incluyendo factores de crecimiento.
- 20 Aunque la interacción entre los factores locales y sistémicos no se ha aclarado por completo, no parece haber consenso en que los factores de crecimiento desempeñan un papel clave en la regulación tanto de la remodelación normal del esqueleto como en la reparación de fracturas. Algunos de los factores de crecimiento que se han identificado en el hueso incluyen: IGF-I, IGF-II, TGF- β_1 , TGF- β_2 , bFGF, aFGF, PDGF y la familia de proteínas óseas morfogénicas (Baylink et al., *J. Bone Mineral Res.* 8 (supp. 2): S56S-5572, 1993).
- 25 Cuando la resorción ósea excede la formación ósea, resulta una pérdida ósea neta, y se aumenta la propensión a fracturas. Una menor formación ósea está asociada con el envejecimiento y ciertos estados patológicos. Sólo en los EE.UU., hay aproximadamente 1,5 millones de fracturas al año que se atribuyen a la osteoporosis. El impacto de estas fracturas sobre la calidad de vida del paciente es inmenso. Los costos asociados al sistema de atención de salud en los EE.UU. se estiman en 5 - 10 mil millones de dólares anuales, excluyendo los costos de atención a largo plazo.
- 30 Otras aplicaciones terapéuticas para los factores de crecimiento que influyen en la remodelación ósea incluyen, por ejemplo, el tratamiento de lesiones que requieren la proliferación de osteoblastos para curar, tales como fracturas, así como la estimulación de la proliferación de células mesenquimatosas y la síntesis de hueso intramembranoso que han sido indicadas como aspectos de la reparación de fracturas (Joyce et al. 36th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, 5-8 de Febrero 1990. Nueva Orleans, LA).
- 35 Goldfarb, M., *Cell Growth Differ.*, Vol. 1(9), Septiembre 1990, páginas 439-445, describe la familia de factores de crecimiento de fibroblastos. Crossley, P.H. et al., *Cell*, Vol. 84(1), 12 de Enero 1996, páginas 127-136, describe los papeles del FGF8 en la inducción, iniciación y mantenimiento del desarrollo de las extremidades del polluelo.
- 40 La presente invención proporciona dichos polipéptidos para estos y otros usos que deberían ser evidentes para las personas con conocimientos en la materia a partir de las enseñanzas de la presente memoria.
- En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula polinucleótida aislada que codifica un polipéptido homólogo al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) que comprende una secuencia de nucleótidos tal como la mostrada en SEQ ID NO: 1 desde el nucleótido 82 hasta el nucleótido 621.
- 45 En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula polinucleótida aislada que codifica un polipéptido homólogo al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) que comprende una secuencia de nucleótidos tal como la mostrada en SEQ ID NO: 6 desde el nucleótido 82 hasta el nucleótido 621.
- En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula polinucleótida aislada que codifica un polipéptido homólogo al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 2 desde el residuo de aminoácido 28 al residuo 196.
- 50 En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula polinucleótida aislada que codifica un polipéptido homólogo al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 2 desde el residuo de aminoácido 28 hasta el residuo 207.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende los siguientes elementos enlazados operativamente: un promotor de transcripción, un segmento de ADN, tal como se define en las reivindicaciones; y un terminador de transcripción.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula cultivada en la que se ha introducido un vector de expresión que comprende los siguientes elementos enlazados operativamente: un promotor de transcripción, un segmento de ADN, tal como se define en las reivindicaciones, y un terminador de transcripción, en el que dicha célula expresa un polipéptido codificado por el segmento de ADN.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de un polipéptido homólogo de FGF que comprende: cultivar una célula en la que se ha introducido un vector de expresión, tal como se define en las reivindicaciones, de manera que dicha célula expresa un polipéptido homólogo de FGF codificado por el segmento de ADN, y recuperar el polipéptido homólogo de FGF.

15 La especificación describe un polipéptido homólogo de FGF aislado seleccionado de entre el grupo que consiste en: a) moléculas polipeptídicas que comprenden una secuencia de aminoácidos, tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2 desde el residuo 28 (Glu) hasta el residuo 175 (Met); b) variantes alélicas de (a), y c) moléculas polipeptídicas que son idénticas, en al menos un 60 %, a la SEQ ID NO: 2 desde el residuo de aminoácido 28 (Glu) al residuo de aminoácido 175 (Met).

La presente invención proporciona un polipéptido homólogo de FGF aislado que comprenden una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2 desde el residuo 28 (Glu) al residuo 196 (Lys).

20 En otra realización, la presente invención proporciona un polipéptido homólogo de FGF aislado que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2 desde el residuo 28 (Glu) hasta el residuo 207 (Ala).

En una realización adicional, la presente invención proporciona un polipéptido homólogo de FGF que comprende además una secuencia señal.

25 En otra realización, la presente invención proporciona un polipéptido homólogo de FGF (tal como se define en las reivindicaciones) que comprende además una secuencia señal tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2 desde el residuo de aminoácido 1 (Met) hasta el residuo de aminoácido 27 (Ala).

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende polipéptidos homólogos de FGF purificados, tal como se define en las reivindicaciones, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 La presente especificación describe un anticuerpo que se une a un epítipo de una molécula polipeptídica que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2 desde el residuo 1 (Met) hasta el residuo 207 (Ala).

35 La presente especificación describe también un anticuerpo que se une a una molécula polipeptídica que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2 desde el residuo 28 (Glu) hasta el residuo 196 (Lys).

La presente especificación describe un procedimiento para estimular la proliferación de miocitos o progenitores de miocitos, que comprende administrar a un mamífero en necesidad del mismo una cantidad de un polipéptido homólogo de FGF suficiente para producir un aumento clínicamente significativo en el número de miocitos o progenitores de miocitos en dicho mamífero.

40 La presente especificación describe un procedimiento para estimular la proliferación de miocitos o progenitores de miocitos, en el que los miocitos o progenitores de miocitos son miocitos cardíacos o progenitores de miocitos cardíacos.

45 La presente describe un procedimiento para la estimulación ex vivo de células progenitoras de miocitos o miocitos que comprende cultivar células de tejido cardíaco con una cantidad de un polipéptido homólogo de FGF suficiente para producir un aumento en el número de células progenitoras de miocitos o miocitos en las células de tejido cardíaco cultivadas en presencia de un polipéptido homólogo de FGF, en comparación con las células progenitoras de miocitos de tejido cardíaco o miocitos cultivados en ausencia de un polipéptido homólogo de FGF.

50 La presente especificación describe un procedimiento para la estimulación ex vivo de células progenitoras de miocitos o miocitos, en el que los miocitos o progenitores de miocitos son miocitos cardíacos o progenitores de miocitos cardíacos.

La presente especificación describe un procedimiento para suministrar un agente o fármaco, de manera selectiva, a los tejidos cardíacos, que comprende: unir una primera molécula que comprende un polipéptido homólogo de FGF con una segunda molécula que comprende un agente o fármaco para formar una quimera, y administrar la quimera al tejido cardíaco.

5 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 y la Figura 2 ilustran una alineación múltiple de un factor 1 homólogo al factor de crecimiento de fibroblastos humano (FHF-1), factor activador de miocitos humano (FGF-10), factor 4 homólogo al factor de crecimiento de fibroblastos humano (FHF-4), factor 2 homólogo al factor de crecimiento de fibroblastos humano (FHF-2), factor 3 homólogo al factor de crecimiento de fibroblastos humano (FHF-3), FGF-4 humano, FGF-6 humano, FGF-2 (básico), FGF-1 (ácido), factor de crecimiento de queratinocitos humano 2 (KGF-2), precursor del factor de crecimiento de queratinocitos humano (FGF-7), zFGF-5 humano, FGF-8 humano, FGF-5 humano, FGF-9 humano, y FGF-3 humano. "*" indica aminoácidos conservados; ":" indica sustituciones de aminoácidos conservados, y "." designa sustituciones de aminoácidos conservados menos rigurosamente.

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

Descripción detallada de la invención

El término "ortólogo" (u "homólogo de especie") indica un polipéptido o proteína obtenido de una especie que tiene homología con un polipéptido o proteína análogos de una especie diferente.

El término "parólogo" indica un polipéptido o proteína obtenidos de una especie determinada que tiene homología con un polipéptido o proteína distinta de esa misma especie.

La expresión "variante alélica" indica cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de mutación, y puede dar como resultado un polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos alterada. La expresión variante alélica se usa también en la presente memoria para indicar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

La expresión "vector de expresión" indica una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés unido operativamente a segmentos adicionales que permiten su transcripción. Dichos segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras y, opcionalmente, pueden incluir uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación y similares. Los vectores de expresión se derivan generalmente de ADN plasmídico o vírico, o puede contener elementos de ambos.

El término "aislado", cuando se aplica a una molécula polinucleótida, indica que el polinucleótido ha sido extraído de su entorno genético natural y, de esta manera, está libre de otras secuencias de codificación extrañas o indeseadas, y está en una forma adecuada para uso en sistemas de producción de proteínas modificadas genéticamente. Dichas moléculas aisladas son aquellas que están separadas de su ambiente natural e incluyen ADNc y clones genómicos. Las moléculas aisladas de ADN de la presente invención están libres de otros genes con los que están asociadas normalmente, pero pueden incluir regiones 5' y 3' no traducidas, de origen natural, tales como promotores y terminadores. La identificación de las regiones asociadas será evidente para una persona con conocimientos ordinarios en la materia (véase, por ejemplo, Dynan y Tijan, Nature 316:774-78, 1985). Cuando se aplica a una proteína, el término "aislado" indica que la proteína se encuentra en una condición diferente a su entorno nativo, tal como separado de sangre y tejido animal. En una forma preferente, la proteína aislada está sustancialmente libre de otras proteínas, particularmente otras proteínas de origen animal. Es preferente proporcionar la proteína en una forma altamente purificada, es decir, una pureza superior al 95 %, más preferentemente, una pureza superior al 99 %.

La expresión "unido operativamente", cuando se refiere a segmentos de ADN, indica que los segmentos están dispuestos de manera que funcionan en concierto para sus objetivos previstos, por ejemplo, inicia la transcripción en el promotor y continúa a través del segmento de codificación hasta el terminador

El término "polinucleótido" indica un polímero de cadena simple o de doble cadena de bases desoxirribonucleótidas o ribonucleótidas, leídas desde el extremo 5' al extremo 3'. Los polinucleótidos incluyen ARN y ADN, y pueden aislarse de fuentes naturales, pueden ser sintetizados in vitro, o pueden ser preparados a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas.

La expresión "complementos de moléculas polinucleótidas" indica moléculas polinucleótidas que tienen una secuencia de bases complementaria y una orientación inversa en comparación con una secuencia de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' es complementaria a 5' CCCGTGCAT 3'.

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

10 El término "promotor" se refiere a una parte de un gen que contiene secuencias de ADN que permiten la unión de la ARN polimerasa y la iniciación de la transcripción. Las secuencias promotoras se encuentran comúnmente, pero no siempre, en las regiones 5' no codificadoras de los genes.

La expresión "secuencia de señal secretora" indica una secuencia de ADN que codifica un polipéptido (un "péptido secretor") que, como un componente de un polipéptido mayor, dirige el polipéptido más grande a través de una ruta secretora de una célula en la que es sintetizada. Normalmente, el péptido más grande es escindido para eliminar el péptido secretor durante el tránsito a través de la ruta secretora.

15 El término "receptor" indica una proteína asociada a la célula que se une a una molécula bioactiva (es decir, un ligando) y media en el efecto del ligando sobre la célula. Los receptores unidos a membrana se caracterizan por una estructura de múltiples dominios que comprende un dominio de unión a ligando extracelular y un dominio efector intracelular que está implicado, normalmente, en la transducción de señales. La unión del ligando al receptor resulta en un cambio conformacional en el receptor que provoca una interacción entre el dominio efector y otra molécula o moléculas en la célula. Esta interacción, a su vez, conduce a una alteración en el metabolismo de la célula. Los eventos metabólicos que están unidos a interacciones receptor-ligando incluyen transcripción génica, fosforilación, desfosforilación, aumentos en la producción de AMP cíclico, movilización de calcio celular, movilización de lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos. La mayoría de los receptores exhiben también una estructura de múltiples dominios, incluyendo un terminal amino, un dominio de transactivación, un dominio de unión a ADN y un dominio de unión a ligando. En general, los receptores pueden ser de unión a la membrana, citosólicos o nucleares; monoméricos (por ejemplo, receptor de hormona estimuladora de tiroides, receptor beta-adrenérgico) o multiméricos (por ejemplo, receptor de PDGF, receptor de la hormona del crecimiento, receptor de IL-3, receptor de GM-CSF, receptor de G-CSF, receptor de eritropoyetina y receptor de IL-6).

20 La expresión "par complemento/anti-complemento" indica fracciones no idénticas que forman un par no asociado covalentemente, estable, en condiciones apropiadas. Por ejemplo, biotina y avidina (o estreptavidina) son miembros prototípicos de un par complemento/anti-complemento. Otros ejemplos de pares complemento/anti-complemento incluyen pares receptor/ligando, pares anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítipo), pares de polinucleótidos sentido/antisentido y similares. Cuando se desea la disociación del par complemento/anti-complemento, el par complemento/anti-complemento tiene, preferentemente, una afinidad de unión de $<10^9 \text{ M}^{-1}$.

35 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de una nueva secuencia de ADN que codifica un polipéptido homólogo de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) que tiene homología con FGF-8. Un análisis de la distribución tisular del ARNm correspondiente a este nuevo ADN demostró que la expresión era mayor en el tejido cardiaco fetal y en el tejido cardiaco adulto, seguido de niveles de expresión evidentes, pero menores, en pulmón fetal, músculo esquelético, tejidos de músculo liso, tales como intestino delgado, colon y tráquea. El polipéptido con homología con FGF se ha denominado zFGF-5.

40 Los nuevos polipéptidos zFGF-5 de la presente invención se identificaron inicialmente mediante una consulta de una base de datos EST para factores de crecimiento. Se descubrió una única secuencia EST y se constató que estaba relacionada con la familia FGF. El nuevo polipéptido homólogo de FGF codificado por el ADNc de longitud completa contenía un motivo de la fórmula: CFXEX{6}Y, en la que X es cualquier aminoácido y X {} es el número de aminoácidos X, mayor que uno. Este motivo ocurre en todos los miembros conocidos de la familia FGF y es único para estas proteínas.

45 La secuencia de nucleótidos del ADNc de zFGF-5 se describe en la SEQ ID NO. 1, y su secuencia de aminoácidos deducida se describe en SEQ ID NO. 2. Cuando los residuos desde el residuo de aminoácido 28 (Glu) al residuo de aminoácido 181 (Gln) de la SEQ ID NO: 2 se comparan con la región correspondiente del FGF-8 (véanse las Figuras 1 y 2) la secuencia de aminoácidos alineada y deducida tiene una identidad de aproximadamente el 56 %.

50 El nuevo polipéptido codificado por el polinucleótido descrito en la presente memoria contiene el motivo CFXE{6}Y presente en todos los miembros de la familia FGF. Los motivos CFXE{6}Y están altamente conservados. Una secuencia de aminoácidos de consenso del dominio CFXEX{6}Y incluye el factor homólogo al factor de crecimiento de fibroblastos humano 1 (FHF-1; Smallwood et al, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93:9850-9857, 1996), el factor activador de miocitos humano (FGF-10; HSU76381, identificador GENBANK, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), factor

- homólogo al factor de crecimiento de fibroblastos humano 4 (FHF -4; Smallwood et al, 1996, *ibid.*), factor homólogo al factor de crecimiento de fibroblastos humano 2 (FHF-2; Smallwood et al, 1996, *ibid.*), factor homólogo al factor de crecimiento de fibroblastos humano 3 (FHF-3; Smallwood et al., 1996, *ibid.*), FGF-4 humano (Basilico et al., Adv. Cancer Res. 59:115-165,1992), FGF-6 humano (Basilico et al, 1992, *ibid.*); FGF-2 humano (base; Basilico et al, 1992, *ibid.*), FGF-1 humano (ácido; Basilico et al, 1992, *ibid.*), factor de crecimiento de queratinocitos humano 2 (KGF-2; HSU67918 identificador GENBANK, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), precursor del factor de crecimiento de queratinocitos humano (FGF-7; Basilico et al, 1992, *ibid.*), zFGF-5 humano, FGF-8 humano (Gemel et al, Genomics 35:253-257, 1996), FGF-5 humano (Basilico et al, 1992, *ibid.*), FGF-9 humano (Miyamoto et al., Mol. Cell. Biol. 13:4251-4259, 1993) y FGF-3 humano (Basilico et al., 1992, *ibid.*).
- 10 Un análisis del ADNc que codifica un polipéptido zFGF-5 (SEQ ID NO: 1) reveló un marco de lectura abierto que codifica 207 aminoácidos (SEQ ID NO: 2) que comprende un polipéptido maduro de 180 aminoácidos (residuo 28 a residuo 207 de la SEQ ID NO: 2). El alineamiento múltiple de zFGF-5 con otros FGF conocidos reveló un bloque de elevada identidad porcentual correspondiente al residuo de aminoácido 127 (Cys) al residuo de aminoácido 138 (Tyr), de la SEQ ID NO: 2 y se muestra en la Figura. Varios de los miembros de la familia FGF no tienen secuencias señal.
- 15 Los miembros de la familia FGF se caracterizan por dominios de unión a heparina. Se ha identificado un dominio putativo de unión a heparina para zFGF-5 en la región del residuo de aminoácido 148 (Gly) al residuo de aminoácido 169 (Gln) de la SEQ ID NO: 2. Se postula que la señalización mediada por receptor se inicia tras la unión del ligando de FGF complejo con proteoglicanos de sulfato de heparina de la superficie celular. Muchos miembros de la familia FGF se pueden colocar en una de dos familias relacionadas basándose en sus estructuras y funciones. aFGF y bFGF
- 20 consisten en tres exones separados por dos intrones de longitud variable. FGF-8 consiste en cinco exones, los tres primeros de los cuales corresponden al primer exón de aFGF y bFGF. Todos los miembros conocidos de la familia FGF se cortan y empalman para formar polipéptidos individuales.
- La secuencia SEQ ID NO: 6 es una secuencia de polinucleótidos degenerada que abarca todos los polinucleótidos que podrían codificar el polipéptido zFGF-5 de la SEQ ID NO: 2 (aminoácidos 1 ó 28 a 207). De esta manera, los polinucleótidos que codifican el polipéptido zFGF-5 desde el nucleótido 82 al nucleótido 621 de la SEQ ID NO: 6 están contemplados en la presente invención. También se contemplan en la presente invención fragmentos, tal como se ha descrito anteriormente con respecto a la SEQ ID NO: 1, que se forman a partir de regiones análogas de la SEQ ID NO: 6, en la que los nucleótidos 82 a 621 de la SEQ ID NO: 6 corresponden a los nucleótidos 82 a 621 de la SEQ ID NO: 1, para la codificación de una molécula zFGF-5 madura.
- 25
- 30 Los símbolos en la SEQ ID NO: 6 se resumen en la Tabla 1 dada a continuación.

TABLA 1

Nucleótido	Resoluciones	Complemento	Resoluciones
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A G	Y	C T
Y	C T	R	A G
M	A C	K	G T
K	G T	M	A C
S	C G	S	C G
C G	A T	W	A T
H	A C T	D	A G T
B	C G T	V	A C G
V	A C G	B	C G T
D	A G T	H	A C T
N	A C G T	N	A C G T

Los codones degenerados usados en la SEQ ID NO: 6, que abarcan todos los posibles codones para un aminoácido determinado, se exponen en la Tabla 2 dada a continuación.

TABLA 2

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

5 Una persona con conocimientos ordinarios en la materia apreciará que se introduce cierta ambigüedad en la determinación de un codón degenerado, representativo de todos los posibles codones que codifican cada aminoácido. Por ejemplo, el codón degenerado para serina (WSN) puede codificar, en algunas circunstancias, arginina (AGR), y el codón degenerado para arginina (MGN) puede codificar, en algunas circunstancias, serina (AGY). Existe una relación similar entre los codones que codifican fenilalanina y leucina. De esta manera, algunos polinucleótidos abarcados por la secuencia degenerada pueden tener algunos aminoácidos incorrectos, pero una persona con conocimientos ordinarios en la materia puede identificar fácilmente dichas secuencias erróneas con referencia a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Los aminoácidos altamente conservados en zFGF-5 se pueden usar como una herramienta para identificar nuevos miembros de la familia. Para identificar nuevos miembros de la familia en bases de datos EST, puede usarse el motivo CXXEX{6}Y conservado. En otro procedimiento que usa sondas de polinucleótidos y procedimientos de hibridación,

5 puede usarse el ARN obtenido a partir de una diversidad de fuentes de tejido para generar bibliotecas de ADNc y buscar en estas bibliotecas nuevos miembros de la familia. En particular, la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) se puede usar para amplificar secuencias que codifican cebadores de ADN muy degenerados diseñados a partir de secuencias correspondientes al residuo de aminoácido 127 (Cys) al residuo de aminoácido 138 (Tyr) de la SEQ ID NO : 2.

10 Los polinucleótidos aislados pueden servir como una sonda y se hibridan a regiones de tamaño similar a la SEQ ID NO: 1 o una secuencia complementaria de la misma, bajo condiciones rigurosas. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50 % de la secuencia diana se hibrida a una sonda perfectamente emparejada. Las condiciones rigurosas típicas son aquellas en las que la concentración de sal es al menos aproximadamente 0,02 M a pH 7 y la temperatura es al menos aproximadamente 60 °C.

15 Tal como se ha indicado anteriormente, los polinucleótidos aislados de la presente invención incluyen ADN y ARN. Los procedimientos para aislar ADN y ARN son bien conocidos en la técnica. Generalmente, es preferente aislar ARN de tejido cardíaco, aunque el ADN puede ser preparado también usando ARN de otros tejidos o puede ser aislado como ADN genómico. El ARN total puede prepararse usando extracción con HCl de guanidina seguida por aislamiento mediante centrifugación en un gradiente de CsCl (Chirgwin et al., *Biochemistry*, 18:52-94, 1979). Se prepara ARN Poli (A)⁺ a partir de ARN total usando el procedimiento de Aviv y Leder (*Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 69:1408-1412; 1972). El ADN complementario (ADNc) se prepara a partir de ARN poli (A)⁺ usando procedimientos conocidos. A continuación, los polinucleótidos que codifican polipéptidos zFGF-5 son identificados y aislados, por ejemplo, mediante hibridación o PCR.

25 La presente especificación describe polipéptidos y polinucleótidos equivalentes de otras especies (ortólogos o parálogos), son de particular interés los polipéptidos zFGF-5 de otras especies de mamíferos, incluyendo proteínas murinas, de rata, porcinas, ovinas, bovinas, caninas, felinas, equinas y de otros primates. La identificación de parálogos de la secuencia humana es particularmente interesante ya que aunque se han identificado 8 parálogos murinos de FGF-8, sólo se conocen 4 parálogos humanos. Los parálogos humanos u homólogos de especie de las proteínas humanas pueden ser clonados usando información y composiciones proporcionadas por la presente invención en combinación con técnicas de clonación convencionales. Por ejemplo, un ADNc puede ser clonado usando ARNm obtenido de un tejido o tipo de célula que expresa la proteína. Las fuentes de ARNm adecuadas pueden ser identificadas por sondeo de transferencias Northern con sondas diseñadas a partir de las secuencias descritas en la presente memoria. A continuación, se prepara una biblioteca a partir de ARNm de un tejido o línea celular positiva. A continuación, un ADNc que codifica zFGF-5 entonces puede ser aislado mediante una diversidad de procedimientos, tales como sondeando con un ADNc humano, completo o parcial, o con uno o más conjuntos de sondas degeneradas basadas en las secuencias divulgadas. Un ADNc puede ser clonado también usando la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR (Mullis, patente US 4.683.202), usando cebadores diseñados a partir de las secuencias divulgadas en la presente memoria. En un procedimiento adicional, la biblioteca de ADNc puede ser usada para transformar o transfectar células huésped, y la expresión del ADNc de interés puede ser detectada con un anticuerpo contra zFGF-5. Pueden aplicarse también técnicas similares al aislamiento de clones genómicos.

40 Las personas con conocimientos en la materia reconocerán que las secuencias divulgadas en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 representan un único alelo del gen zFGF-5 humano y polipéptido, y que se espera que se produzca la variación alélica y un corte y empalme alternativo. Las variantes alélicas pueden ser clonadas sondeando bibliotecas de ADNc o genómicas de diferentes individuos según procedimientos estándar. Las variantes alélicas de la secuencia de ADN mostrada en la SEC ID NO: 1, incluyendo aquellas que contienen mutaciones silenciosas y aquellas en las que las mutaciones resultan en cambios en la secuencia de aminoácidos, se describen en la presente memoria, así como las proteínas que son variantes alélicas de la SEQ ID NO: 2.

50 La presente especificación describe polipéptidos zFGF-5 aislados que son sustancialmente homólogos a los polipéptidos de la SEQ ID NO: 2 y sus homólogos de especie/ortólogos. La expresión "sustancialmente homólogo" se usa en la presente memoria para indicar polipéptidos que tienen una identidad de secuencia del 50 %, preferentemente del 60 %, más preferentemente de al menos el 80 % con las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 2 o sus ortólogos o parálogos. Más preferentemente, dichos polipéptidos mostrarán al menos una identidad del 90 % y, más preferentemente, del 95 % o superior a la SEQ ID NO: 2 o sus ortólogos o parálogos. El porcentaje de identidad de secuencia se determina mediante procedimientos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul et al., *Bull. Math. Bio.* 48: 603-616, 1986 y Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89:10915-10919, 1992. Brevemente, dos secuencias de aminoácidos se alinean para optimizar las puntuaciones de alineamiento usando una penalización por apertura de hueco de 10, una penalización por extensión de hueco de 1, y la matriz de puntuación "BLOSUM 62" de Henikoff y Henikoff (*ibid.*) tal como se muestra en la Tabla 3 (los aminoácidos se indican por los códigos estándar de una letra). A continuación, el porcentaje de identidad se calcula como:

TABLA 3

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

Número total de coincidencias idénticas

$$\frac{\text{[longitud de la secuencia más larga más el número de huecos introducidos en la secuencia más larga para alinear las dos secuencias]}}{\text{---}} \times 100$$

5 La identidad de secuencia de las moléculas polinucleotídicas se determina mediante procedimientos similares usando una relación como la divulgada anteriormente.

Las proteínas y polipéptidos sustancialmente homólogos se caracterizan por tener una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos. Preferentemente, estos cambios son de naturaleza menor, es decir sustituciones conservadoras de aminoácidos (véase la Tabla 4) y otras sustituciones que no afectan significativamente al plegamiento o a la actividad de la proteína o polipéptido; pequeñas deleciones, normalmente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y pequeñas extensiones amino- o carboxilo-terminales, tales como un residuo de metionina amino-terminal, un pequeño péptido de unión de hasta aproximadamente 20-25 residuos, o una pequeña extensión que facilita la purificación (una etiqueta de afinidad), tal como un tracto polihistidina, proteína A (Nilsson et al, EMBO J. 4:1075, 1985; Nilsson y otros, Methods Enzymol 198:3, 1991), glutatión S transferasa (Smith y Johnson, Gene 67:31, 1988), proteína de unión a maltosa (Kellerman y Ferenci, Methods Enzymol. 90:459-463, 1982; Guan et al, Gene 67:21-30, 1987), u otro epítipo antigénico o dominio de unión. Véase, en general Ford et al, Protein Expression and

Purification 2: 95-107, 1991. Los ADN que codifican etiquetas de afinidad están disponibles en proveedores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; New England Biolabs, Beverly, MA).

TABLA 4

Sustituciones conservadoras de aminoácidos

Básica:	arginina
	lisina
	histidina
Ácida:	ácido glutámico
	ácido aspártico
Polar:	glutamina
	asparagina
Hidrófoba:	leucina
	isoleucina
	valina
Aromática:	fenilalanina
	triptófano
	tirosina
Pequeña:	glicina
	alanina
	serina
	treonina
	metionina

- 5 Las proteínas descritas en la presente invención pueden comprender también, además de los 20 ácidos aminados estándar, residuos de aminoácidos de origen no natural. Los residuos de aminoácidos de origen no natural incluyen, sin limitación, trans-3-metilprolina, 2,4-metanoprolina, cis-4-hidroxioprolina, trans-4-hidroxioprolina, N-metil-glicina, alo-treonina, metiltreonina, hidroxietil-cisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido pipercolico, tert-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenil-alanina, 4-fluorofenilalanina, 4-hidroxioprolina, 6-N-
- 10 metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y α -metil serina. Se conocen diversos procedimientos en la técnica para la incorporación de residuos de aminoácidos de origen no natural en las proteínas. Por ejemplo, se puede emplear un sistema *in vitro* en el que las mutaciones sin sentido son suprimidas usando ARNt supresores aminoacilados químicamente. Los procedimientos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar ARNt son conocidos en la técnica. La transcripción y traducción de plásmidos que contienen mutaciones sin sentido se llevan a cabo en un sistema libre de
- 15 células que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas y otros reactivos disponibles comercialmente. Las proteínas se purifican mediante cromatografía. Véase, por ejemplo, Robertson et al., J. Am. Chem. Soc. 113:2722, 1991; Ellman et al, Meth. Enzymol. 202:301, 1991; Chung et al, Science 259:606-09, 1993; y Chung et al, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90:10145-49, 1993). En un segundo procedimiento, la traducción se lleva a cabo en ovocitos de *Xenopus* mediante microinyección de ARNm mutado y ARNt supresores aminoacilados químicamente (Turcatti et al., J.
- 20 Biol. Chem. 271:19991-98, 1996). En un tercer procedimiento, células de *E. coli* son cultivadas en ausencia de un aminoácido natural que va a ser reemplazado (por ejemplo, fenilalanina) y en presencia del aminoácido o aminoácidos deseados de origen no natural (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido de origen no natural es incorporado a la proteína en lugar de su equivalente natural. Véase, Koide et al., Biochem. 33:7470-75, 1994. Los residuos de aminoácidos de origen natural se pueden convertir en
- 25 especies de origen no natural mediante modificación química *in vitro*. La modificación química puede combinarse con mutagénesis dirigida a sitio para expandir adicionalmente la gama de sustituciones (Wynn y Richards, Protein Sci. 2:395-403, 1993).

Los aminoácidos esenciales en los polipéptidos zFGF-5 de la presente invención pueden ser identificados según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de barrido de alanina (Cunningham y Wells, *Science* 244: 1081-1085, 1989). En la última técnica, se introducen mutaciones únicas de alanina en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se ensayan para actividad biológica (por ejemplo, proliferación de miocitos o fibroblastos cardiacos, o estimulación de la formación ósea) para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton et al., *J. Biol. Chem.* 271:4699-4708, 1996. Los sitios de interacción ligando-receptor pueden ser determinados también mediante un análisis físico de la estructura, tal como se determina mediante técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o etiquetado de fotoafinidad, en conjunto con mutación ácidos aminados de sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, de Vos y otros, *Science* 255:306-312, 1992; Smith et al. *J. Mol. Biol.* 224:899-904, 1992; Wlodaver et al, *FEBS Lett*, 309:59-64, 1992. Las identidades de los aminoácidos esenciales pueden inferirse también a partir de un análisis de las homologías con los FGF relacionados y se muestran en las Figuras 1 y 2.

Un análisis de la secuencia de aminoácidos de zFGF-5 reveló un sitio dibásico en el terminal C del polipéptido (residuo de aminoácido 196-197 (Lys-Arg)). Se ha demostrado que un polipéptido truncado en el terminal C, que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2, desde el residuo de aminoácido 28 (Glu) al residuo de aminoácido 196 (Lys), tiene actividad biológica. Los aminoácidos dibásicos, tales como Arg-X-X-Arg (en los que X es cualquier residuo de aminoácido), Arg-Arg o Lys-Arg; son sometidos a corte y empalme por varias enzimas, incluyendo, pero sin limitarse a, trombina y carboxipeptidasas. Por lo tanto, en la presente memoria se describen cambios conservativos en residuos de aminoácidos dibásicos, en particular los residuos dibásicos en los residuos de aminoácidos 196 y 197 (Lys y Arg, respectivamente) de la SEQ ID NO: 2.

Basándose en un análisis de la familia FGF, una molécula truncada en el terminal C, que comprende el residuo de aminoácido 28 (Glu) hasta el residuo 175 (Met) de la SEQ ID NO: 2, puede ser biológicamente activo. Se prevé que se produzca un enlace disulfuro intramolecular entre el residuo de aminoácido 109 (Cys) y el residuo 129 (Cys) de la SEQ ID NO: 2.

Basándose en las alineaciones de homología con estructuras cristalinas de FGF-1 y FGF-2 (Eriksson et al., *Prot. Sci.* 2:1274, 1993), las predicciones de la estructura secundaria para la estructura de cadena beta de zFGF-5 se corresponden con los residuos de aminoácidos 56-59, 64-69, 73-76, 85-92, 96-102, 106-111, 115-119, 128-134, 138-144, 149-155 y 173-177 de la SEC ID NO: 2. Los aminoácidos críticos para la unión de zFGF-5 a los receptores pueden ser identificados mediante mutagénesis dirigida al sitio del polipéptido zFGF-5 completo. Más específicamente, pueden ser identificados usando mutagénesis dirigida al sitio de los aminoácidos en el polipéptido zFGF-5 que corresponden a los residuos de aminoácidos en el FGF ácido (FGF1) y el FGF básico (FGF2) identificados como críticos para la unión de estos FGF a sus receptores (Blaber et al., *Biochem.* 35:2086-2094, 1996). Estos aminoácidos incluyen Tyr33, Arg53, Asn110, Tyr112, Lys119, Trp123, Leu149 y Met151 en el FGF2 humano, y Tyr30, Arg50, Asn107, Tyr109, Lys116, Trp122, Leu148 y Leu150 en FGF1 humano, tal como se muestra en la Fig.1 y la Fig. 2. Los aminoácidos correspondientes en zFGF-5, tal como se muestra en la Fig. 1 y la Fig. 2, serían Tyr58, Gly77, Asn136, Tyr138, Lys145, Trp149, Met175 y Arg177. La persona con conocimientos en la materia reconocerá que otros miembros, en su totalidad o en parte, de la familia FGF pueden tener similitudes estructurales o bioquímicas con zFGF-5, y pueden ser sustituidos llevando a cabo dichos análisis. Dichas regiones serían importantes para las funciones biológicas de la molécula.

Pueden realizarse y ensayarse múltiples sustituciones de aminoácidos usando procedimientos conocidos de mutagénesis y cribado, tales como los divulgados por Reidhaar-Olson y Sauer (*Science* 241:53-57, 1988) o Bowie y Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86:2152-2155, 1989). Brevemente, estos autores divulgan procedimientos para aleatorizar simultáneamente dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionar para un polipéptido funcional y, a continuación, secuenciar los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones permisibles en cada posición. Otros procedimientos que pueden usarse incluyen presentación en fagos (por ejemplo, Lowman et al., *Biochem.* 30:10832-10837, 1991; Ladner et al, patente US N° 5.223.409; Huse, Publicación WIPO WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a región (Derbyshire et al, *Gene* 46:145, 1986; Ner et al., *DNA* 7:127, 1988).

Los procedimientos de mutagénesis, tal como se ha divulgado anteriormente, se pueden combinar con procedimientos de cribado automatizados, de alto rendimiento, para detectar actividad de polipéptidos mutagenizados clonados en células huésped. Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos (por ejemplo, proliferación celular) pueden ser recuperados de las células huésped y pueden ser secuenciadas rápidamente usando un equipo moderno. Estos procedimientos permiten la determinación rápida de la importancia de los residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés, y pueden ser aplicados a polipéptidos de estructura desconocida.

Usando los procedimientos descritos anteriormente, una persona con conocimientos ordinarios en la materia puede identificar y/o preparar una diversidad de polipéptidos que son sustancialmente homólogos a los residuos 28 (Glu) a 196 (Lys) o los residuos 28 (Glu) a 207 (Ala) de la SEQ ID NO: 2, sus variantes alélicas o fragmentos

biológicamente activos de los mismos, y retienen las propiedades proliferativas de la proteína de tipo salvaje. Dichos polipéptidos pueden incluir también segmentos polipeptídicos, tal como se ha divulgado, en general, anteriormente.

5 Los polipéptidos de la presente invención pueden ser producidos en células huésped genéticamente manipuladas según técnicas convencionales. Las células huésped adecuadas son aquellos tipos celulares que pueden ser transformadas o transfectadas con ADN exógeno y pueden crecer en cultivo, e incluyen bacterias, células fúngicas, y células eucariotas superiores cultivadas. Las células eucariotas, particularmente células cultivadas de organismos multicelulares, son preferentes. Las técnicas de manipulación de moléculas de ADN clonadas y de introducción de ADN exógeno en una diversidad de células huésped son divulgadas por Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, y Ausubel et al. (Eds), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley y Sons, Inc., Nueva York, 1987.

10 En general, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido zFGF-5 de la presente invención está unida operativamente a otros elementos genéticos requeridos para su expresión, que incluyen generalmente un promotor de transcripción y un terminador dentro de un vector de expresión. El vector contendrá también, comúnmente, uno o más marcadores seleccionables y uno o más orígenes de replicación, aunque las personas con conocimientos en la materia reconocerán que en ciertos sistemas pueden proporcionarse marcadores seleccionables en vectores separados, y la replicación del ADN exógeno puede proporcionarse mediante la integración en el genoma de la célula huésped. La selección de promotores, terminadores, marcadores seleccionables, vectores y otros elementos es una cuestión de diseño rutinario dentro del nivel de la experiencia de la persona con conocimientos ordinarios en la materia. Muchos de dichos elementos se describen en la literatura y están disponibles en proveedores comerciales.

15 Para dirigir un polipéptido zFGF-5 a la ruta secretora de una célula huésped, se proporciona una secuencia señal secretora (conocida también como una secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre) en el vector de expresión. La secuencia señal secretora puede ser la secuencia nativa, o una quimera que comprende una secuencia señal derivada de otra proteína secretada (por ejemplo, t-PA y líder secretor α -pre-pro) o puede ser sintetizada *de novo*. La secuencia señal secretora es unida a la secuencia de ADN zFGF-5 en el marco de lectura correcto. Las secuencias señal secretora están posicionadas comúnmente en 5' a la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, aunque ciertas secuencias señal pueden ser posicionadas en otra parte de la secuencia de ADN de interés (véase, por ejemplo, Welch et al, patente US N° 5.037.743; Holland et. al., patente US N° 5.143.830).

20 Se divulga un plásmido aceptor universal, que puede ser usado para clonar un ADN que codifica cualquier polipéptido de interés, incluyendo fusiones de polipéptidos. El plásmido aceptor es útil en un procedimiento de preparación de una molécula de ADN circular de doble cadena. El procedimiento comprende las etapas de (a) proporcionar un fragmento de ADN donante de doble cadena que codifica un polipéptido de interés, (b) proporcionar un plásmido aceptor lineal de doble cadena que tiene extremos primero y segundo romos y que comprende un marcador seleccionable y una secuencia de replicación que son funcionales en *Saccharomyces cerevisiae*, en el que el plásmido aceptor está esencialmente libre de ADN que codifica el polipéptido de interés, (c) proporcionar un primer enlazador de ADN que comprende un primer segmento con una secuencia idéntica a una primera región del plásmido aceptor y un segundo segmento con una secuencia idéntica a una primera región del fragmento de ADN donante, en el que cada uno de los segmentos primero y segundo del primer enlazador es de al menos 10 pb de longitud; (d) proporcionar un segundo enlazador de ADN de doble cadena que comprende un primer segmento con una secuencia idéntica a una segunda región del plásmido aceptor y un segundo segmento con una secuencia idéntica a una segunda región del fragmento de ADN donante, en el que cada uno de los segmentos primero y segundo del segundo enlazador es al menos de 10 pb de longitud, y (e) combinar el fragmento de ADN donante, plásmido aceptor, primer enlazador de ADN, y segundo enlazador de ADN en una célula huésped *Saccharomyces cerevisiae* de manera que el fragmento de ADN donante es unido al plásmido aceptor mediante recombinación homóloga del ADN donante, el plásmido aceptor y los enlazadores para formar un plásmido circular cerrado. El plásmido aceptor comprende además un promotor de transcripción proximal al primer extremo, y el fragmento de ADN donante está unido operativamente al promotor de transcripción dentro del plásmido circular cerrado. El plásmido aceptor comprende además un segmento de ADN que codifica un péptido líder y/o uno o más segmentos de ADN que codifican una etiqueta de péptido, posicionados de manera que estos segmentos de ADN están unidos operativamente al fragmento de ADN donante en el plásmido circular cerrado. En una realización preferente, el plásmido aceptor comprende además (a) un promotor, un segmento de ADN que codifica un péptido líder, y un segmento de ADN que codifica una primera etiqueta de péptido, en el que el segmento de ADN que codifica un péptido líder está posicionado entre el promotor y el segmento de ADN que codifica una primera etiqueta de péptido proximal al primer extremo del plásmido aceptor, en el que el promotor, el segmento de ADN que codifica un péptido líder, y el segmento de ADN que codifica una primera etiqueta de péptido se unen operativamente, y (b) un segmento de ADN que codifica una segunda etiqueta de péptido proximal al segundo extremo del plásmido aceptor.

55 Se divulga un procedimiento de preparación de una molécula de ADN circular de doble cadena que comprende las etapas de (a) proporcionar una pluralidad de fragmentos de ADN donante, de doble cadena, superpuestos, que

colectivamente codifican un polipéptido de interés, (b) proporcionar un plásmido aceptor lineal, de doble cadena, que tiene extremos primero y segundo romos y que comprende un marcador seleccionable y una secuencia de replicación que son funcionales en *Saccharomyces cerevisiae*, en el que el plásmido aceptor está esencialmente libre de ADN que codifica el polipéptido de interés, (c) proporcionar un primer enlazador de ADN, de cadena doble, que comprende un primer segmento con una secuencia idéntica a una primera región del plásmido aceptor y un segundo segmento con una secuencia idéntica a una primera región de uno de los fragmentos de ADN donante, en el que cada uno de los segmentos primero y segundo del primer enlazador es de al menos 10 pb de longitud; (d) proporcionar un segundo enlazador de ADN de doble cadena que comprende un primer segmento con una secuencia idéntica a una segunda región del plásmido aceptor y un segundo segmento con una secuencia idéntica a una región de otro de los fragmentos de ADN donante, en el que cada uno de los segmentos primero y segundo del segundo enlazador es de al menos 10 pb de longitud, y (e) combinar los fragmentos de ADN donante, plásmido aceptor, primer enlazador de ADN y segundo enlazador de ADN en una célula huésped de *Saccharomyces cerevisiae* de manera que los fragmentos de ADN donante son unidos al plásmido aceptor mediante recombinación homóloga para formar un plásmido circular cerrado que comprende una región que codifica el polipéptido de interés. El plásmido aceptor comprende además uno o más de entre un promotor de transcripción, un segmento de ADN que codifica un péptido líder, y uno o más segmentos de ADN que codifican una etiqueta de péptido tal como se ha divulgado anteriormente.

Las células fúngicas, incluyendo células de levadura y particularmente células de los géneros *Saccharomyces* o *Pichia*, son células particularmente preferentes como huéspedes para la producción de fragmentos zFGF-5 o fusiones de polipéptidos.

Otros procedimientos para transformar las células de levadura con ADN exógeno y producir polipéptidos recombinantes a partir de las mismas son divulgados, por ejemplo, por Kawasaki, patente US N° 4.599.311; Kawasaki et al, patente US N° 4.931.373; Brake, patente US N° 4.870.008; Welch et al, patente US N° 5.037.743; y Murray et al, patente US N° 4.845.075. Las células transformadas se seleccionan por el fenotipo determinado por el marcador seleccionable, comúnmente resistencia a fármacos o la capacidad de crecer en ausencia de un nutriente particular (por ejemplo, leucina). Un sistema vector preferente alternativo para su uso en levadura es el sistema vector POT1 divulgado por Kawasaki et al. (patente US N° 4.931.373), que permite que las células transformadas sean seleccionadas por crecimiento en medios que contienen glucosa. Los promotores y terminadores adecuados para su uso en levadura incluyen los de genes de enzimas glicolíticas (véase, por ejemplo, Kawasaki, patente US N° 4.599.311; Kingsman y otros, patente US N° 4.615.974; y Bitter, patente US N° 4.977.092 y genes de alcohol deshidrogenasa. Véanse también las patentes US Nos. 4.990.446; 5.063.154; 5.139.936 y 4.661.454. Los sistemas de transformación para otras levaduras, incluyendo *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyvexomyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia guilliermondii* y *Candida maltosa* son conocidos en la técnica. Un sistema particularmente preferente usa *Pichia methanolica* (véase, la solicitud PCT WO 9717450). Para sistemas de transformación alternativos, véanse, por ejemplo, Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132:3459-3465, 1986 y Cregg, Patente US N° 4.882.279. Células de *Aspergillus* pueden usarse según los procedimientos de McKnight et al., patente US N° 4.935.349. Los procedimientos para transformar *Acremonium chrysogenum* son divulgados por Sumino et al., patente US N° 5.162.228. Los procedimientos para transformar *Neurospora* son divulgados por Lambowitz, patente US N° 4.486.533.

Las células de mamífero cultivadas son también huéspedes preferentes. Los procedimientos para introducir ADN exógeno en células huésped de mamífero incluyen transfección mediada por fosfato de calcio (Wigler et al, Cell 14:725, 1978; Corsaro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603, 1981; Graham y Van der Eb, Virology 52: 456, 1973), electroporación (Neumann et al., EMBO J. 1:841-845, 1982), transfección mediada por DEAE-dextrano (Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, 1987), y transfección mediada por liposomas (Hawley-Nelson et al, Focus 15:73, 1993; Ciccarone et al, Focus 15:80, 1993). La producción de polipéptidos recombinantes en células de mamífero cultivadas se divulga, por ejemplo, por Levinson et al, patente US N° 4.713.339; Hagen et al, patente US N° 4.784.950; Palmiter et al, patente US N° 4.579.821; y Ringold, patente US N° 4.656.134. Las células de mamífero cultivadas preferentes incluyen la COS-1 (ATCC N° CRL 1650), COS-7 (ATCC N° CRL 1651), BHK 570 (ATCC N° CRL 10314), 293 (ATCC N° CRL 1573; Graham et al. J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977) y líneas celulares de ovario de hámster chino (por ejemplo, CHO-K1, ATCC N° CCL 61). Líneas celulares adecuadas adicionales son conocidas en la técnica y están disponibles en entidades de depósito público, tales como la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. En general, los promotores de transcripción fuertes son preferentes, tales como promotores de SV-40 o citomegalovirus. Véase, por ejemplo, la patente US N° 4.956.288. Otros promotores adecuados incluyen los de genes de metalotionina (patentes US Nos. 4.579.821 y 4.601.978) y el promotor tardío principal de adenovirus.

La selección de fármacos se usa, generalmente, para seleccionar células de mamífero cultivadas en las que se ha insertado ADN extraño. Dichas células se denominan, comúnmente, "transfectantes". Las células que han sido cultivadas en presencia del agente selectivo y son capaces de pasar el gen de interés a su progenie se denominan "transfectantes estables". Un marcador seleccionable preferente es un gen que codifica resistencia al antibiótico neomicina. La selección se lleva a cabo en presencia de un fármaco de tipo neomicina, tal como G-418 o similar.

Pueden usarse también sistemas de selección para aumentar el nivel de expresión del gen de interés, un procedimiento denominado "amplificación". La amplificación se lleva a cabo cultivando transfectantes en presencia de un bajo nivel del agente selectivo y, a continuación, aumentando la cantidad de agente selectivo para seleccionar para células que producen niveles elevados de los productos de los genes introducidos. Un marcador seleccionable amplificable preferente es la dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia al metotrexato. Pueden usarse también otros genes de resistencia a fármacos (por ejemplo, resistencia a higromicina, resistencia a múltiples fármacos, puromicina acetiltransferasa).

Otras células eucariotas superiores pueden usarse también como huéspedes, incluyendo células de insecto, células vegetales y células aviares. La transformación de células de insecto y la producción de polipéptidos extraños en las mismas han sido descritas por Guarino et al, patente US Nº 5.162.222; Bang et al, patente US Nº 4.775.624; y la publicación WIPO WO 94/06463. El uso de *Agrobacterium rhizogenes* como un vector para expresar genes en células vegetales ha sido revisado por Sinkar et al., J. Biosci. (Bangalore) 11:47-58, 1987.

Las células huésped transformadas o transfectadas se cultivan según procedimientos convencionales en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el crecimiento de las células huésped elegidas. Una diversidad de medios adecuados, incluyendo medios definidos y medios complejos, se conocen en la técnica y, generalmente, incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Los medios pueden contener también componentes tales como factores de crecimiento o suero, según se requiera. El medio de crecimiento seleccionará generalmente las células que contienen el DNA exógenamente añadido mediante, por ejemplo, selección por fármacos o deficiencia en un nutriente esencial que es complementado por el marcador seleccionable portado en el vector de expresión o cotransfectado en la célula huésped.

Los polipéptidos zFGF-5 recombinantes expresados (o polipéptidos zFGF-5 quiméricos) se pueden purificar usando fraccionamiento y/o procedimientos de purificación y medios convencionales. Puede usarse precipitación con sulfato amónico y ácido o extracción con caotropo para el fraccionamiento de las muestras. Las etapas de purificación ejemplares pueden incluir hidroxapatita, exclusión por tamaño, FPLC y cromatografía líquida de fase inversa de alto rendimiento. Los medios de intercambio aniónico adecuados incluyen dextranos derivados, agarosa, celulosa, poliácridamida, sílices especiales y similares. Los derivados de PEI, DEAE, QAE y Q son preferentes, siendo DEAE Fast-Flow sefarosa (Pharmacia, Piscataway, NJ) particularmente preferente. Los medios cromatográficos ejemplares incluyen los medios derivados con grupos fenilo, butilo u octilo, tales como fenil-sefarosa FF (Pharmacia), Toyopearl butilo 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), octil-sefarosa (Pharmacia) y similares; o resinas poliácridicas, tales como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Los soportes sólidos adecuados incluyen perlas de vidrio, resinas basadas en sílice, resinas celulósicas, perlas de agarosa, perlas de agarosa reticuladas, perlas de poliestireno, resinas de poliácridamida reticuladas y similares, que son insolubles bajo las condiciones que se usarán. Estos soportes pueden ser modificados con grupos reactivos que permiten la fijación de proteínas mediante grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o fracciones de carbohidrato. Los ejemplos de químicas de acoplamiento incluyen activación con bromuro de cianógeno, activación con N-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfhidrilo, activación con hidrazida, y derivados de carboxilo y amino para químicas de acoplamiento de carbodiimida. Estos y otros medios sólidos son bien conocidos y ampliamente usados en la técnica, y están disponibles a partir de proveedores comerciales. Los procedimientos para unir los polipéptidos receptores a medios de soporte son bien conocidos en la técnica. La selección de un procedimiento particular es un asunto de diseño rutinario y viene determinada, en parte, por las propiedades del soporte elegido. Affinity Chromatography: Principles & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suiza, 1988.

Los polipéptidos de la presente invención pueden ser aislados también aprovechando sus propiedades de unión a heparina. Para una revisión, véase, Burgess et al., Ann. Rev. of Biochem. 58:575-606, 1989. Los miembros de la familia FGF pueden ser purificados hasta la homogeneidad aparente mediante cromatografía de afinidad heparina-sefarosa (Gospodarowicz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6963-6967, 1984) y eluidos usando gradientes de etapas lineales de NaCl (Ron et al., J. Biol. Chem. 268 (4):2964-2988, 1993; Chromatography: Principles & Methods, pp. 77-80, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1993; en "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Hermanson et al., eds., pp. 165-167, Academic Press, San Diego, 1992; Kjellen et al., Ann. Rev. Biochem. Ann. Rev. Biochem. 60:443-474, 1991; y Ke et al., Protein Expr. Purif. 3(6):497-507, 1992).

Otros procedimientos de purificación incluyen el uso de cromatografía de adsorción de iones metálicos inmovilizados (IMAC) para purificar las proteínas ricas en histidina. Brevemente, en primer lugar, se carga un gel con iones metálicos divalentes para formar un quelato (E. Sulkowski, Trends in Biochem. 3:1-7, 1985). Las proteínas ricas en histidina se adsorberán en esta matriz con diferentes afinidades, dependiendo del ion metálico usado, y se eluirán mediante elución competitiva, disminuyendo el pH, o mediante el uso de agentes quelantes fuertes. Otros procedimientos de purificación incluyen la purificación de proteínas glicosiladas mediante cromatografía de afinidad de lectina y cromatografía de intercambio iónico (Methods in Enzymol., Vol. 182, Guide to Protein Purification", M. Deutscher, (ed.), Acad. Press, San Diego, 1990, pp.529-39). Como alternativa, puede construirse una fusión del polipéptido de interés y una etiqueta de

afinidad (por ejemplo, polihistidina, proteína de unión a maltosa, un dominio de inmunoglobulina) para facilitar la purificación.

Pueden usarse, de manera ventajosa, procedimientos de replegamiento de proteínas (y opcionalmente reoxidación). Es preferente purificar la proteína hasta una pureza > 80 %, más preferentemente, hasta una pureza > 90 %, incluso más preferentemente, > 95 % y, de manera particularmente preferente, es un estado farmacéuticamente puro, con una pureza mayor del 99,9 % con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos, y libre de agentes infecciosos y pirógenos. Preferentemente, una proteína purificada está sustancialmente libre de otras proteínas, particularmente otras proteínas de origen animal.

Los polipéptidos de zFGF-5 o sus fragmentos pueden prepararse también mediante síntesis química. Los polipéptidos de zFGF-5 pueden ser monómeros o multímeros; glicosilados o no glicosilados; pegilados o no pegilados, y pueden incluir o no un residuo inicial de aminoácido metionina.

La actividad de las moléculas de la presente invención puede medirse usando una diversidad de ensayos que, por ejemplo, miden la neogénesis o hiperplasia (es decir, proliferación) de células cardíacas basándose en la especificidad tisular en el corazón de adulto. Las actividades adicionales asociadas probablemente con los polipéptidos de la presente invención incluyen la proliferación de células endoteliales, cardiomiocitos, fibroblastos, miocitos esqueléticos, directa o indirectamente a través de otros factores de crecimiento, la acción como un factor quimiotáctico para células endoteliales, fibroblastos y/o células fagocíticas; factor osteogénico; y factor de expansión de células madre mesenquimales y poblaciones precursoras.

La proliferación puede medirse usando células cardíacas cultivadas o *in vivo*, administrando moléculas de la invención reivindicada al modelo animal apropiado. Generalmente, los efectos proliferativos se observan como un aumento en el número de células y, por lo tanto, pueden incluir la inhibición de la apoptosis, así como de la mitogénesis. Las células cultivadas incluyen fibroblastos cardíacos, miocitos cardíacos, miocitos esqueléticos, células endoteliales de vena umbilical de cultivos primarios. Las líneas celulares establecidas incluyen: fibroblasto NIH 3T3 (ATCC N° CRL-1658), células cardíacas humanas CHH-1 (ATCC N° CRL-1680), mioblastos cardíacos de rata H9c2 (ATCC N° CRL-1446), células de carcinoma mamario de Shionogi (Tanaka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89:8928-8932, 1992) y LNCaP. Las células de adenocarcinoma FGC (ATCC N° CRL-1740). Los ensayos que miden la proliferación celular se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, los ensayos que miden la proliferación incluyen ensayos tales como la quimiosensibilidad a colorante rojo neutro (Cavanaugh et al., Investigational New Drugs 8:347-354, 1990), la incorporación de nucleótidos marcados radiactivamente (Cook et al., Analytical Biochem. 179:1-7, 1989), la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) en el ADN de células proliferantes (Porstmann et al., J. Immunol Methods 82:169-179, 1985), y el uso de sales de tetrazolio (Mosmann, J. Immunol. Proceedings 65:55-63, 1983; Alley et al, Cancer Res. 48:589-601, 1988, Marshall et al., Growth Reg. 5:69-84, 1995, y Scudiero et al, Cancer Res. 48:4827-4633, 1988).

La diferenciación es un proceso progresivo y dinámico, que empieza con células madre pluripotentes y que termina con células diferenciadas terminalmente. Las células madre pluripotentes que pueden regenerarse sin compromiso de linaje expresan un conjunto de marcadores de diferenciación que se pierden cuando se toma el compromiso de linaje celular. Las células progenitoras expresan un conjunto de marcadores de diferenciación que pueden continuar o no siendo expresados conforme las células avanzan por la vía de linaje celular hacia la maduración. Los marcadores de diferenciación que son expresados exclusivamente por células maduras son normalmente propiedades funcionales, tales como productos celulares, enzimas para producir productos celulares y receptores. La etapa de diferenciación de una población celular se monitoriza mediante la identificación de los marcadores presentes en la población celular. Se cree que los miocitos, osteoblastos, adipocitos, condrocitos, fibroblastos y células reticulares se originan a partir de una célula madre mesenquimal común (Owen et al., Ciba Fdn. Symp. 136:42-46, 1988). Los marcadores para las células madre mesenquimales no han sido bien identificados (Owen et al., J. of Cell Sci. 87:731-738, 1987), de manera que la identificación se hace generalmente en el progenitor y en las etapas maduras de las células. Se ha especulado, pero no se ha demostrado, acerca de la existencia de células progenitoras de miocitos cardíacos en fase temprana (frecuentemente, denominadas células madre miocitos cardíacos), en tejido cardíaco adulto. Los nuevos polipéptidos de la presente invención son útiles para los estudios para aislar células madre mesenquimatosas y células progenitoras de miocito cardíaco, tanto *in vivo* como *ex vivo*.

Hay evidencia que sugiere que los factores que estimulan los tipos celulares específicos a lo largo de un camino hacia la diferenciación o desdiferenciación terminal, afectan a toda la población celular procedente de un precursor común o célula madre. De esta manera, la presente invención describe la estimulación de la inhibición de la proliferación de miocitos, células de músculo liso, osteoblastos, adipocitos, condrocitos y células endoteliales. Mientras estimulan la proliferación o diferenciación de los miocitos cardíacos, las moléculas de la presente invención pueden inhibir la proliferación o la diferenciación de adipocitos, en virtud del efecto sobre sus células precursoras/madre comunes. De esta manera, las moléculas de la presente invención tienen uso en la inhibición de condrosarcomas, aterosclerosis, reestenosis y obesidad.

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

- 5 Los ensayos *in vivo* para evaluar la neogénesis o hiperplasia cardíaca incluyen el tratamiento de ratas neonatales y maduras con las moléculas de la presente invención. La función cardíaca de los animales es medida como la frecuencia cardíaca, la presión arterial y el gasto cardíaco para determinar la función ventricular izquierda. Los procedimientos post-mortem para evaluar la mejora cardíaca incluyen: aumento de peso cardíaco, volumen nucleico/citoplasmático, tinción de secciones histológicas cardíacas para determinar el antígeno nuclear de célula proliferativa (PCNA) vs niveles de actina citoplasmática (Quaini et al, Circulation Res 75:1050. -1063, 1994 y Reiss et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8630-6635, 1996).

- 10 Los ensayos *in vivo* para medir los cambios en las tasas de formación ósea incluyen la realización de histología ósea (véase, Recker, R., eds. Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1983) y tomografía computarizada cuantitativa (QCT; Ferretti, J. Bone 17:353 S-364S, 1995; Orphanoludakis et al, Investig. Radiol. 14:122-130, 1979 y Durand et al., Medical Physics 19:569-573, 1992). Un ensayo *ex vivo* para medir los cambios en la formación ósea sería, por ejemplo, un ensayo calavariar (Gowen et al., J. Immunol. 136:2478-2482, 1986).

- 15 Con respecto a la modulación del balance energético, en particular en lo que se refiere al metabolismo, la proliferación y la diferenciación de adipocitos, los polipéptidos zFGF-5 modulan los efectos sobre las reacciones metabólicas. Dichas reacciones metabólicas incluyen adipogénesis, gluconeogénesis, glicogenolisis, lipogénesis, captación de glucosa, síntesis de proteínas, termogénesis, uso de oxígeno y similares. Entre otros procedimientos conocidos en la técnica o descritos en la presente memoria, el balance energético de los mamíferos puede evaluarse verificando una o más de las funciones metabólicas indicadas anteriormente. Estas funciones metabólicas se monitorizan mediante técnicas (ensayos o modelos animales) conocidos por una persona con conocimientos ordinarios en la materia, tal como se exponen con mayor detalle, más adelante. Por ejemplo, los efectos glucoreguladores de la insulina son ejercidos predominantemente en el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. En el músculo esquelético y el tejido adiposo, la insulina actúa para estimular la captación, el almacenamiento y el uso de glucosa.

- 20 Existen en la técnica procedimientos reconocidos para el seguimiento de todas las funciones metabólicas indicadas anteriormente. De esta manera, una persona con conocimientos ordinarios en la materia es capaz de evaluar los polipéptidos de zFGF-5, fragmentos, proteínas de fusión, anticuerpos, agonistas y antagonistas para funciones de modulación de metabolismo. Las técnicas ejemplares de modulación se exponen a continuación.

- 25 La lipogénesis estimulada por insulina, por ejemplo, puede ser supervisada midiendo la incorporación de acetato C^{14} en triglicéridos (Mackall et al. J. Biol. Chem. 251:6462-6464, 1976) o la acumulación de triglicéridos (Kletzien et al., Mol. Pharmacol. 41:393-398, 1992).

- 30 La captación estimulada por zFGF-5 puede ser evaluada, por ejemplo, en un ensayo para transporte de glucosa estimulado por insulina. Los adipocitos primarios o células NIH 3T3 L1 (ATCC Nº CCL-92.1) se colocan en DMEM que contiene 1 g/l de glucosa, 0,5 ó 1,0 % de BSA, 20 mM Hepes y 2 mM de glutamina. Después de entre dos y cinco horas de cultivo, el medio se sustituye con DMEM fresca, libre de glucosa, que contiene 0,5 ó 1,0 % de BSA, 20 mM de Hepes, 1 mM piruvato y 2 mM de glutamina. Las concentraciones apropiadas de zPGF-5, insulina o IGF-1, o una serie de diluciones de la sustancia de ensayo, se añaden, y las células se incuban durante 20-30 minutos. Se añade desoxiglucosa marcada con H^3 o C^{14} a ≈ 50 1M concentración final, y las células se incuban durante aproximadamente 10-30 minutos. A continuación, las células son enjuagadas rápidamente con tampón frío (por ejemplo, PBS), a continuación, se lisan con un agente de lisis adecuado (por ejemplo, 1 % de SDS o NaOH 1 N). A continuación, el lisado celular se evaluó mediante un recuento en un contador de centelleo. La radiactividad asociada a las células se toma como una medida del transporte de glucosa tras restar la unión no específica según se determina incubando las células en presencia de citocolasina b, un inhibidor del transporte de glucosa. Otros procedimientos incluyen los descritos, por ejemplo, por Manchester et al., Am. J. Physiol. 266 (Endocrinol. Metab. 29): E326-E333, 1994 (transporte de glucosa estimulado por insulina).

- 35 La síntesis de proteínas puede ser evaluada, por ejemplo, mediante la comparación de la precipitación de proteínas marcadas con S^{31} -metionina tras la incubación de las células de ensayo con S^{35} -metionina y S^{35} -metionina y un modulador putativo de la síntesis de proteínas.

- 40 La termogénesis puede ser evaluada según describe B. Stanley en The Biology of Neuropeptide Y and Related Peptides, W. Colmers y C. Wahlestedt (eds.), Humana Press, Ottawa, 1993, pp. 457-509; C. Billington et al., Am. J. Physiol. 260:R321, 1991; N. Zarjevski et al., Endocrinology 133:1753, 1993; C. Billington et al., Am. J. Physiol. 266: R1765, 1994; Heller et al., Am. J. Physiol. 252 (4 Pt 2): R661-7, 1987; y Heller et al., Am. J. Physiol. 245(3): R321-8,

1983. También, la tasa metabólica, que puede medirse mediante una diversidad de técnicas, es una medida indirecta de la termogénesis.

El uso de oxígeno puede evaluarse tal como se describe en Heller et al, Pflugers Arch 369 (1): 55-9; 1977. Este procedimiento implica también un análisis de la temperatura hipotalámica y la producción de calor metabólico. El uso de oxígeno y la termorregulación se han evaluado también en seres humanos, según se describe por Haskell et al., J. Appl. Physiol. 51 (4): 948-54, 1981.

Los polipéptidos de zFGF-5 se pueden usar también para preparar anticuerpos que se unen específicamente a epítomos, péptidos o polipéptidos de zFGF-5. Los procedimientos de preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, NY, 1989; y Hurrell, J. G. R., Ed., Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982). Tal como será evidente para una persona con conocimientos ordinarios en la materia, los anticuerpos policlonales pueden ser generados a partir de una diversidad de animales de sangre caliente, tales como caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, gallinas, conejos, ratones y ratas.

La inmunogenicidad de un polipéptido de zFGF-5 puede aumentarse mediante el uso de un adyuvante, tal como alumbre (hidróxido de aluminio) o un adyuvante completo o incompleto de Freund. Los polipéptidos útiles para la inmunización incluyen también polipéptidos de fusión, tales como fusiones de zFGF-5 o una parte del mismo con un polipéptido de inmunoglobulina o con proteína de unión a maltosa. El inmunógeno polipeptídico puede ser una molécula de longitud completa o una parte de la misma. Si la parte del polipéptido es de tipo "hapteno", dicha parte puede ser unida o enlazada ventajosamente a un portador macromolecular (tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero bovino (BSA) o toxoide tetánico) para la inmunización.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpos" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados por afinidad, anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno, tales como F(ab')₂ y fragmentos Fab proteolíticos. Los anticuerpos intactos o fragmentos modificados genéticamente, tales como anticuerpos quiméricos, fragmentos Fv, anticuerpos de cadena sencilla y similares, así como los péptidos y polipéptidos de unión a antígeno sintéticos, están también incluidos. Los anticuerpos no humanos pueden ser humanizados injertando sólo CDR no humanos en estructura humana y regiones constantes, o incorporando la totalidad de dominios variables no humanos (opcionalmente, "cubriendo" los mismos con una superficie similar a la humana mediante sustitución de los residuos expuestos, en el que el resultado es un anticuerpo "chapado"). En algunos casos, los anticuerpos humanizados pueden retener residuos no humanos dentro de los dominios de la estructura de región variable humana para mejorar las características de unión apropiadas. Mediante la humanización de anticuerpos, puede incrementarse la vida media biológica y se reduce el potencial de reacciones inmunes adversas tras la administración a seres humanos. Las técnicas alternativas para generar o seleccionar anticuerpos útiles en la presente memoria incluyen la exposición *in vitro* de linfocitos a proteína o péptido zFGF-5, y la selección de bibliotecas de presentación de anticuerpos en fagos o vectores similares (por ejemplo, mediante el uso de proteína o péptido zFGF-5 inmovilizado o marcado).

Los anticuerpos se definen para ser de unión específica si se unen a un polipéptido zFGF-5 con una afinidad de unión (K_a) de $10^6 M^{-1}$ o superior, preferentemente $10^7 M^{-1}$ o superior, más preferentemente, $10^8 M^{-1}$ o superior y, más preferentemente, $10^9 M^{-1}$ o superior. La afinidad de unión de un anticuerpo puede ser determinada fácilmente por una persona con conocimientos ordinarios en la materia (por ejemplo, mediante análisis Scatchard).

Una diversidad de ensayos conocidos por las personas con conocimientos en la materia pueden ser usados para detectar anticuerpos que se unen específicamente a proteínas o péptidos zFGF-5. Los ensayos ejemplares se describen en detalle en Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow y Lane (Eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Los ejemplos representativos de dichos ensayos incluyen: inmunoelectroforesis concurrente, radioinmunoensayo, radioinmuno-precipitación, ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISA), ensayo de dot blot o Western blot, ensayo de inhibición o competición y ensayo sándwich. Además, los anticuerpos pueden ser cribados para la unión a proteína o péptido zFGF-5 de tipo salvaje versus mutante.

Los anticuerpos contra zFGF-5 pueden ser usados para marcar células que expresan zFGF-5; para dirigir otra proteína, pequeña molécula o producto químico al tejido cardíaco; para aislar zFGF-5 mediante purificación por afinidad; para ensayos diagnósticos para determinar los niveles circulantes de polipéptidos zFGF-5; para detectar o cuantificar zFGF-5 soluble como marcador de una patología o enfermedad subyacente; en procedimientos analíticos que emplean FACS; para realizar cribados de bibliotecas de expresión; para generar anticuerpos antiidiotípicos, y como anticuerpos neutralizantes o como antagonistas para bloquear una proliferación mediada por zFGF-5 *in vitro* e *in vivo*. Los marcadores o etiquetas directas adecuadas incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares; los marcadores o etiquetas indirectos pueden exhibir el uso de biotina-avidina u otros pares complemento/anti-complemento como intermedios. Los anticuerpos en la presente memoria pueden estar

conjugados también directa o indirectamente con fármacos, toxinas, radionucleidos y similares, y estos conjugados se usan para aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas *in vivo*.

Las moléculas de la presente invención pueden usarse para identificar y aislar receptores implicados en la proliferación miocárdica cardiaca. Por ejemplo, las proteínas y péptidos de la presente invención pueden ser inmovilizados en una columna y se pueden realizar preparaciones de membrana sobre la columna (Immobilized Affinity Ligand Techniques, Hermanson et al., eds., Academic Press, San Diego, CA, 1992, pp.195-202). Las proteínas y péptidos también pueden ser radiomarcados (Methods in Enzymol., vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, ed., Acad. Press, San Diego, 1990, 721-737) o etiquetados para fotoafinidad (Brunner et al., Ann. Rev. Biochem. 62:483-514, 1993 y Fedan et al., Biochem. Pharmacol. 33:1167-1180, 1984) y pueden identificarse proteínas específicas de la superficie celular.

Los antagonistas serán útiles para inhibir las actividades proliferativas de las moléculas zFGF-5, en tipos de células tales como células cardiacas, incluyendo miocitos, fibroblastos y células endoteliales; osteoblastos y condrocitos. Los genes que codifican dominios de unión de polipéptido zFGF-5 pueden conseguirse mediante el cribado de bibliotecas de péptidos aleatorios presentados en fagos (presentación en fagos) o en bacterias, tales como *E. coli*. Las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos pueden conseguirse en una serie de maneras, tales como mediante mutagénesis aleatoria y síntesis aleatoria de polinucleótidos. Estas bibliotecas de presentación de péptidos aleatorios pueden ser usadas para realizar un cribado para péptidos que interactúan con una diana conocida que puede ser una proteína o un polipéptido, tal como un ligando o receptor, una macromolécula biológica o sintética o sustancias orgánicas o inorgánicas. Las técnicas para crear y cribar dichas bibliotecas de presentación de péptidos aleatorios son conocidas en la técnica (Ladner et al, patente US Nº. 5.223.409; Ladner et al, patente US Nº. 4.946.778; Ladner et al, patente US Nº. 5.403.484 y Ladner. et al, Patente US Nº. 5.571.698) y las bibliotecas de presentación de péptidos aleatorios y kits para el cribado de dichas bibliotecas están disponibles comercialmente, por ejemplo en Clontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Las bibliotecas de presentación de péptidos aleatorios pueden ser cribadas usando las secuencias zFGF-5 divulgadas en la presente memoria para identificar proteínas que se unen a zFGF-5. Estas "proteínas de unión", que interactúan con polipéptidos zFGF-5 pueden usarse para marcar células; para aislar polipéptidos homólogos mediante purificación por afinidad; pueden ser conjugados, directa o indirectamente, con fármacos, toxinas, radionucleidos y similares. Estas proteínas de unión pueden usarse también en procedimientos analíticos, tales como para el cribado de bibliotecas de expresión y actividad neutralizante. Las proteínas de unión pueden usarse también para ensayos diagnósticos para determinar niveles circulantes de polipéptidos; para detectar o cuantificar los polipéptidos solubles como un marcador de una patología o una enfermedad subyacente. Estas proteínas de unión pueden actuar también como "antagonistas" de zFGF-5 para bloquear la unión de zFGF-5 y la transducción de señales *in vitro* e *in vivo*. Estas proteínas de unión anti-zFGF-5 serían útiles para inhibir la expresión de genes que resultan en proliferación o diferenciación. Dichas proteínas de unión anti-zFGF-5 pueden usarse para el tratamiento, por ejemplo, en rhabdomyosarcoma, mixoma cardíaco, cánceres óseos de origen osteoblástico y enanismo, artritis, reparación de cartílago y ligamento, solas o en combinación con otras terapias.

Las moléculas de la presente invención serán útiles para la proliferación de células de tejido cardíaco, tales como miocitos o mioblastos cardíacos; miocitos o mioblastos esqueléticos y células musculares lisas; condrocitos, células endoteliales, adipocitos y osteoblastos *in vitro*. Por ejemplo, las moléculas de la presente invención son útiles como componentes de medios de cultivo celular definidos, y pueden usarse solos o en combinación con otras citoquinas y hormonas para reemplazar el suero que se usa comúnmente en el cultivo celular. Las moléculas de la presente invención son particularmente útiles para promover específicamente el crecimiento y/o el desarrollo de miocitos en cultivo, y pueden resultar útiles también en el estudio de la hiperplasia y regeneración de miocitos cardíacos.

Los polipéptidos, ácidos nucleicos y/o anticuerpos de la presente invención pueden usarse en el tratamiento de trastornos asociados con el infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca congestiva, cardiomiopatía hipertrófica y cardiomiopatía dilatada. Las moléculas de la presente invención pueden ser útiles también para limitar el tamaño del infarto tras un ataque al corazón, promover la angiogénesis y la cicatrización de heridas tras angioplastia o endarterectomía, para desarrollar la circulación coronaria colateral, para la revascularización en el ojo, para complicaciones relacionadas con la mala circulación, tales como úlceras de pie diabético, para derrame cerebral, después de la reperfusión coronaria mediante procedimientos farmacológicos y otras indicaciones en las que la angiogénesis es beneficiosa. Las moléculas de la presente invención pueden ser útiles para mejorar la función cardiaca, bien induciendo la neogénesis y/o hiperplasia de miocitos cardiacos, mediante la inducción de la formación colateral coronaria, o mediante la inducción de una remodelación de la zona miocárdica necrótica. Otros usos terapéuticos para la presente invención incluyen la inducción de neogénesis y/o hiperplasia de músculo esquelético, la regeneración renal y/o el tratamiento de la hipertensión sistémica y pulmonar.

El desarrollo colateral coronario inducido por zFGF-5 es medido en conejos, perros o cerdos usando modelos de oclusión coronaria crónica (Landau et al., Amer. Heart J. 29:924-931, 1995; Sellke et al, Surgery 120 (2):182-188, 1996 y Lazarous et al, 1996, *ibid*). Los beneficios de zFGF-5 para tratar el accidente cerebrovascular se ensayaron *in vivo* en ratas usando una oclusión bilateral de la arteria carótida y midiendo los cambios histológicos, así como el

comportamiento en laberinto (Gage et al., Neurobiol. Aging 9:645-655, 1988). La eficacia de zFGF-5 en la hipertensión se ensaya *in vivo* usando ratas espontáneamente hipertensas (SHR) para hipertensión sistémica (Marche et al., Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl. 1: S114-116, 1995).

5 Las moléculas de la presente invención pueden usarse para dirigir el suministro de agentes o fármacos al corazón. Por ejemplo, las moléculas de la presente invención serán útiles limitando la expresión al corazón, en virtud de la expresión específica de tejido dirigida por el promotor de zFGF-5. Por ejemplo, la expresión específica de corazón puede conseguirse usando un constructo discistrónico adenoviral zFGF-5 (Rothmann et al., Gene Therapy 3:919-926, 1996). Además, los polipéptidos zFGF-5 pueden usarse para restringir otros agentes o fármacos al tejido cardíaco uniendo polipéptidos zFGF-5 a otra proteína (Franz et al., Circ. Res. 73:629-638, 1993) enlazando una primera molécula que comprende un polipéptido homólogo de zFGF-5 con un segundo agente o fármaco para formar una quimera. Pueden usarse proteínas, por ejemplo anticuerpos, para formar quimeras con moléculas de zFGF-5 de la presente invención (Narula et al., J. Nucl. Cardiol. 2:26-34, 1995). Los ejemplos de agentes o fármacos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos bioactivos, genes, toxinas, radionúclidos, productos farmacéuticos de molécula pequeña y similares. La unión puede ser directa o indirecta (por ejemplo, liposomas), y puede ocurrir mediante medios recombinantes, enlace químico, interacción fuerte no covalente y similares.

15 Puede usarse una composición que comprende proteína zFGF-5 como agente terapéutico para mejorar la formación de hueso mediada por osteoblastos. Las composiciones y los procedimientos descritos en la presente memoria pueden aplicarse para promover la reparación de defectos y deficiencias óseas, tales como los que se producen en fracturas cerradas, abiertas y no unidas; para promover la curación ósea en cirugía plástica; para estimular el crecimiento del hueso en articulaciones de prótesis no cementadas e implantes dentales, en el tratamiento de la enfermedad periodontal y defectos; para aumentar la formación ósea durante la osteogénesis por distracción, y en el tratamiento de otros trastornos esqueléticos que pueden tratarse mediante la estimulación de la actividad osteoblástica, tales como osteoporosis y artritis. La formación ósea *de novo* proporcionada por los procedimientos de la presente invención tendrán uso en la reparación ósea congénita, inducida por trauma, cirugía oncológica o de curación ósea después de la osteonecrosis inducida por radiación (Hart et al, Cancer 37:2580-2585, 1976). Los procedimientos de la presente invención pueden encontrar uso también en la cirugía plástica.

20 Para uso farmacéutico, las proteínas de la presente invención se formulan para administración parenteral, particularmente intravenosa o subcutánea, según procedimientos convencionales. La administración intravenosa será por inyección de bolo o infusión durante un periodo típico de una a varias horas. En general, las formulaciones farmacéuticas incluirán una proteína zFGF-5 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada, dextrosa al 5 % en agua o similares. Las formulaciones pueden incluir además uno o más excipientes, conservantes, solubilizantes, agentes tampón, albúmina para prevenir la pérdida de proteínas sobre superficies de viales, etc. Los procedimientos de formulación son bien conocidos en la técnica y se divulgan, por ejemplo, en Remington Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton PA, 1990.

35 Las dosis terapéuticas estarán, generalmente, en el intervalo de 0,1 a 100 µg/kg de peso del paciente por día, preferentemente 0.5-20 µg/kg por día, con la dosis exacta determinada por el médico según los estándares aceptados, teniendo en cuenta la naturaleza y gravedad de la afección a tratar, las características del paciente, etc. La determinación de la dosis está dentro del nivel de experiencia ordinaria en la técnica. Las proteínas pueden ser administradas para un tratamiento agudo, durante una semana o menos, frecuentemente durante un periodo de uno a tres días o pueden ser usados en un tratamiento crónico, durante varios meses o años. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz de zFGF-5 es una cantidad suficiente para producir un cambio clínicamente significativo en la proliferación de miocitos, la función cardíaca, la formación ósea o aumentar los tipos de células específicos asociados con células madre mesenquimatosas y células de progenitores de miocitos, osteoblastos y condrocitos. En particular, un aumento clínico significativo en el número de miocitos o células progenitoras de miocitos puede determinarse mediante la medición de la fracción de eyección ventricular izquierda, antes de, y después de la administración de moléculas zFGF-5, y determinando al menos un aumento del 5 %, preferentemente del 10 % o superior, en la fracción de eyección total. Los ensayos para determinar la fracción de eyección, según se mide en sangre expulsada por latido, son bien conocidos para las personas con conocimientos ordinarios en la materia.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

50 Ejemplos

Ejemplo 1

Extensión de la secuencia EST

Un cribado de una base de datos de ADN traducido usando una consulta para factores de crecimiento dio como resultado la identificación de una secuencia etiqueta de secuencia expresada (EST) que resultó ser un nuevo miembro de la familia FGF, y se denominó zFGF-5.

Los cebadores oligonucleótidos ZC11,676 (SEQ ID NO: 3) y ZC11,677 (SEQ ID NO: 4) se diseñaron a partir de la secuencia de una etiqueta de secuencia expresada (EST). Los cebadores se usaron para el cebado interno dentro de la EST, y cuando se realizó la PCR usando ADNc Marathon Ready (Clontech, Palo Alto, CA) a partir de tejido cardíaco adulto como molde en la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

- 5 Las condiciones usadas para la PCR fueron 1 ciclo a 94 °C durante 90 segundos, 35 ciclos a 94 °C durante 15 segundos; 68 °C durante 1 minuto, seguido de 1 ciclo durante 10 minutos a 72 °C y período de incubación a 4 °C. La reacción de PCR recreó 160 pb de la secuencia EST, y confirmó que la secuencia de EST era correcta.

Otras bibliotecas que podrían amplificarse con los cebadores de oligonucleótidos incluyen músculo esquelético, pulmón, estómago, intestino delgado y tiroides.

10 **Ejemplo 2**

Distribución tisular

Se realizaron Northernblots usando Human Multiple Tissue Blots de Clontech (Palo Alto, CA). El fragmento de ADN de 160 pb descrito en el Ejemplo 1 se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, el fragmento se electroeluyó y, a continuación, se marcó radiactivamente usando un sistema de marcado de ADN MEGAPRIME de cebado aleatorio (Amersham, Arlington Heights, IL) según las especificaciones del fabricante. La sonda se purificó usando una columna de empuje NUCLTRAP (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA). Se usó una solución EXPRESSHYB (Clontech, Palo Alto, CA) para la prehibridación y como una solución de hidridación para las transferencias Northern. La hibridación se llevó a cabo durante la noche a 68 °C y, a continuación, las transferencias se lavaron en 2X SSC y 0,05 % de SDS a temperatura ambiente, seguido de un lavado en 0,1 X SSC y 0,1 % de SDS a 50 °C. Se observó una única banda en aproximadamente 2,0 kb. La intensidad de la señal fue la más alta para el corazón adulto con señales relativamente menos intensas en el músculo esquelético y del estómago.

Ejemplo 3

Ensayo para la actividad in vitro de zFGF-5

25 A.

La actividad mitógena de zFGF-5 se ensaya usando líneas celulares y células de un cultivo primario. El medio condicionado a partir de células que expresan la proteína recombinante y/o la proteína purificada se añade a los cultivos de las siguientes líneas celulares: fibroblasto NIH 3T3 (ATCC Nº CRL-1658), células cardíacas Chum CHH-1 (ATCC Nº CRL-1680), mioblastos H9c2 de corazón de rata (ATCC Nº CRL-1446), células de carcinoma mamario de Shionogi (Tanaka et al., 1992, *ibid*) y células de adenocarcinoma LNCaP.FGC. Las células recién aisladas útiles para ensayar la actividad proliferativa de zFGF-5 incluyen: fibroblastos cardíacos, miocitos cardíacos, miocitos esqueléticos humanos y células endoteliales de vena umbilical humana.

La actividad mitogénica se ensaya mediante la medición de la incorporación de H³-timidina basándose en el procedimiento de Raines y Ross (Meth. Enzymology 109:749-773, 1985). Brevemente, las células quiescentes son células cultivadas en placas a una densidad de 3 x 10⁴ células/ml en un medio apropiado. Un medio de crecimiento típico es el medio de crecimiento Dulbecco (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) que contiene 10 % de suero fetal de ternera (FCS). Las células se cultivan en placas de 96 pocillos y se dejan crecer durante 3-4 días. El medio de crecimiento se retira, y se añaden 180 µl de DFC (Tabla 5) que contiene 0,1 % de FCS por pocillo. A la mitad de los pozos se les añaden proteínas zFGF-5 y la otra mitad son un control negativo, sin zFGF-5. Las células se incuban durante hasta 3 días a 37 °C en CO₂ al 5 %, y el medio se retira. Cien microlitros de DFC que contienen 0,1 % de FCS y 2 µCi/ml de H³-timidina se añaden a cada pocillo, y las placas se incuban durante 1-24 horas adicionales a 37 °C. El medio se aspira, y se añaden 150 µl de tripsina a cada pocillo. Las placas se incuban a 37 °C hasta que las células se separan (al menos 10 minutos). Las células separadas se recogen en filtros usando un recolector de células LKB Wallac 1295-001 (LKB Wallac, Pharmacia, Gaithersburg, MD). Los filtros se secan mediante calentamiento en un horno de microondas durante 10 minutos y se cuentan en un contador de centelleo LKB Betaplate 1250 (LKB Wallac) tal como describe el proveedor.

TABLA 5

250 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco-BRL)
 250 ml de medio F12 de Ham (Gibco-BRL)
 0,29 mg/ml de L-glutamina (Sigma, St. Louis, MO)
 1 mM de piruvato de sodio (Sigma, St. Louis, MO)
 25 mM Hepes (Sigma, St. Louis, MO)
 10 µg/ml de fetuina (Aldrich, Milwaukee, WI)
 50 µg/ml de insulina (Gibco-BRL)

 3 ng/ml de selenio (Aldrich, Milwaukee, WI)
 20 µg/ml de transferrina (JRH, Lenexa, KS)

B.

5 Se aislaron corazones de ratones neonatos de 1 día de edad y, a continuación, se alteraron mediante digestiones repetidas de colagenasa, siguiendo el protocolo de Brand et al., (J. Biol. Chem. 268:11500-11503, 1993). Se aislaron miocitos individuales en un gradiente de Percoll, y se colocaron 2 ml en placas de 6 pocillos de cultivos tisulares a 0,5 X 10⁶ células/ml. Tres días más tarde, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS sin calcio ni magnesio, y se alimentaron de nuevo con 1 ml de medio libre de suero (Tabla 6). Los pocillos se inocularon con 10¹¹ partículas de AdCMV-zFGF5 por pocillo o AdCMV GFP-(proteína fluorescente verde) como control, y se incubaron a 37 °C durante 8 horas. A
 10 continuación, los pocillos se lavaron de nuevo 3 veces con PBS sin calcio ni magnesio y, a continuación, se alimentaron de nuevo con 2 mls de medio libre de suero.

15 Dentro de las 48 horas después de la inoculación con el AdCMV-zFGF5, los miocitos cultivados han dejado de latir y han sufrido una alteración morfológica, mientras que los pocillos inoculados con el AdCMV-GFP continuaron latiendo espontáneamente y no se ven afectados morfológicamente por la inoculación. Los pocillos inoculados con AdCMV-zFGF5 contenían también, después de 48, horas, una capa confluyente de células no adherentes, viables, sin ninguna pérdida de confluencia de las capas de miocitos adherentes, indicando la actividad proliferativa del AdCMV-zFGF5 sobre los miocitos murinos cultivados.

TABLA 6

DMEM

Mezcla de nutrientes de Ham (Gibco-BRL; mezcla 1:1 con DMEM)

17 mM de NaHCO₃ (Sigma)
 2 mM L-glutamina (Sigma)
 1 % de PSN (Sigma)
 1 µg/ml de insulina
 5 µg/ml de transferrina
 1 nM LiCl (Sigma)
 1 nM selenio
 25 µg/ml de ácido ascórbico (Sigma)
 1 nM tiroxina (Sigma)

C.

Se añadió zFGF-5 fusionado a una proteína de unión a maltosa (MBP), tal como se describe en el Ejemplo 9A y purificado tal como se describe en el Ejemplo 10, a miocitos (Ejemplo 3B) a una concentración de 0,1 ng/ml MBP-zFGF5, se demostró que estimula también la proliferación de miocitos.

5 Ejemplo 4

Ensayo para la actividad *ex vivo* de zFGF-5

La mitogénesis cardiaca es medida *ex vivo* mediante la extracción de corazones enteros de ratones o ratas recién nacidos, de 8 semanas de edad. El corazón extirpado se coloca en medio de Joklik (Sigma, St. Louis, MO) o medio de Dulbecco a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 4-24 horas. Durante el período de incubación se añade polipéptido zFGF-5 en un intervalo de concentración de 1 pg/ml a 100 µg/ml. Los controles negativos usan sólo tampón. Se añade H³-timidina y las muestras se incuban durante 1-4 horas, después de lo cual el corazón se secciona y se determina la mitogénesis mediante autorradiografía. Las secciones se usan para histomorfometría para determinar el volumen nucleico/citoplásmico (McLaughlin, Am. J. Physiol. 271: R122-R129, 1996).

Como alternativa, el corazón se liofilizó y resuspendió en 1 ml de NaOH 0,1 N. El ADN se precipitó usando 10 % de ácido tricloroacético (TCA) enfriado con hielo. El sobrenadante se añadió a 9 ml de fluido de centelleo para medir la incorporación no específica de H³-timidina. El sedimento resultante se resuspendió en 1 ml de solubilizador de tejido BTS-450 (Beckman, Fullerton, CA) y se añadió a 9 ml de fluido de centelleo para medir la incorporación específica de ADN de H³-timidina.

Los ventrículos izquierdo y derecho se aislaron a partir de aislados de ratones CD-1 de 1 día de edad (Jackson Labs, Bar Harbor, ME), y se incubaron durante 4 horas con 3 ng/ml de zFGF5Hep2 (n = 13; véase el Ejemplo 10) o control (n=10). Se añadió H³-timidina durante 1 hora. Los ventrículos se lavaron varias veces y, a continuación, se homogeneizaron en 1 ml de medio de Joklik. El homogeneizado resultante se añadió a 9 ml de cóctel de centelleo y se analizó para captación total de H³-timidina y la incorporación de ADN.

El zFGFS-Hep2 aumentó la captación de H³-timidina y la incorporación en ADN 2,068 ± 0,489 veces con respecto al control, lo que indica que el zFGF5 es mitogénico para una célula cardiaca.

Ejemplo 5

Ensayo de la actividad *in vivo* de zFGF-5

Los efectos proliferativos de zFGF-5 se ensayaron *in vivo* usando ratas neonatas de dos semanas de edad y/o ratas adultas de dos meses de edad. A las ratas se les inyectó intrapericardialmente, de manera aguda o crónica.

30 A.

Las ratas neonatas se tratan con zFGF-5 durante 1 a 14 días en un intervalo de dosis de 50 ng/día a 100 µg/día. Después del tratamiento, los efectos de zFGF-5 en comparación con los animales tratados con placebo se evalúan midiendo el aumento de peso cardiaco, la mejora *in vivo* y *ex vivo* de la función ventricular izquierda, y por el aumento de las fracciones de volumen nuclear cardiaco a citosólico, que se determinan histomorfométricamente.

35 B.

Se usan también ratas con cardiomiopatía inducida por infusión crónica de catecolaminas, por ligadura coronaria o para modelos de cardiomiopatía tales como el hámster sirio cardiomiopático (Sole et al., Amer. J. Cardiol. 62 (11): 20G-24G, 1988) para evaluar los efectos de zFGF-5 sobre la función cardiaca y el tejido.

Para inducir cardiomiopatía usando catecolamina, se infunden ratas de 7-8 semanas de edad, de manera continua, con epinefrina durante 2 semanas a través de minibombas osmóticas implantadas subcutáneamente entre sus omóplatos. La infusión de epinefrina resulta en un aumento en la puntuación de la lesión fibrótica ventricular izquierda desde 0,005 ± 0,005 a 2,11 ± 0,18, escala de 0-3), aumento de la anchura de las células de miocito del ventrículo izquierdo desde 17,36 ± 0,46 µm a 23,05 ± 0,62 µm, y respuestas contráctiles despreciables del músculo papilar ventricular izquierdo a isoproterenol (0,2 frente a 1,1 gramos tensión en comparación con ratas infundidas con solución salina. Después del período de tratamiento de dos semanas, a las ratas se les inyecta intrapericardialmente, de manera diaria, con cualquiera de entre vehículo, zFGF-5, bFGF, IGF-I o IGF-II, durante un máximo de 14 días. Las ratas se sacrifican y se realizan una histomorfometría y una histocitoquímica.

Las ratas, tratadas tal como se ha descrito anteriormente, se evalúan también al final del tratamiento de catecolaminas, y de nuevo después del tratamiento con factor de crecimiento, donde se mide la regeneración

cardiaca como puntuaciones reducidas de lesión fibrótica del ventrículo izquierdo, anchura reducida de la célula de miocito y aumento de las respuestas contráctiles papilares del ventrículo izquierdo a isoproterenol.

Ejemplo 6

Mapeo cromosómico de zFGF-5

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

Para el mapeo de zFGF-5 con el "GeneBridge 4 RH Panel", se establecieron reacciones de 25 µl en una placa de microtitulación de 96 pocillos (Stratagene, La Jolla, CA) y se usaron para PCR en un termociclador "RoboCycler Gradient 96" (Stratagene). Cada una de las 95 reacciones de PCR consistió en 2,5 µl de 50X "Advantage KlenTaq Polymerase Mix" (Clontech), 2 µl de mezcla de dNTP (2,5 mM cada uno; Perkin-Elmer, Foster City, CA), 1,25 µl
15 cebador sentido, ZC11, 677 (SEQ ID NO: 4) 1,25 µl cebador antisentido, ZC12,053 (SEQ ID NO: 5).

2,5 µl de "RediLoad" (Research Genetics, Inc), 0,5 µl de "Advantage KlenTaq Polymerase Mix" (Clontech Laboratories, Inc), 25 ng de ADN de un clon híbrido individual o control y ddH₂O para un volumen total de 25 µl. Las reacciones se cubrieron con una cantidad igual de aceite mineral y se sellaron. Las condiciones del ciclador de PCR fueron las
20 siguientes: un ciclo inicial 1 de 4 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1,5 minutos de alineamiento a 66 °C y 1,5 minutos de extensión a 72 °C, seguido de una extensión final de 1 ciclo de 7 minutos a 72 °C. Las reacciones se separaron mediante electroforesis en un 3 % NuSieve GTG en gel de agarosa (FMC Bioproducts, Rockland, ME).

Los resultados mostraron que zFGF-5 mapea 541.12 cR desde la parte superior del grupo de ligamiento del cromosoma 5 humano en el mapa híbrido de radiación WICGR. En relación al centrómero, su marcador proximal más cercano era WI-16922 y su marcador distal más cercano era WI-14692. El uso de los marcadores circundantes del mapa CHLC ayudó también a posicionar zFGF-5 en la región 5q34-q35 en el mapa de marcadores integrado v8c7 versión 5 del cromosoma CHLC (The Cooperative Human Linkage Center, WWW server-
25 <http://www.chlc.org/ChlcIntegratedMaps.html>).

Ejemplo 7

30 Efectos de zFGF-5 sobre el hueso

A.

Se construyó un vector de adenovirus que contenía el ADNc para zFGF-5 usando procedimientos descritos por Becker et al. (Methods in Cell Biology 43:161-189, 1994). Brevemente, el ADNc para zFGF-5 (tal como se muestra en la SEQ ID NO: 1) se clonó como un fragmento Xba I-Sal I en pACCMV (Gluzman et al, In Eucaryotic Viral Vectors, Gluzman (eds.) pp.187-192, Cold Spring Harbor Press, Cold Springs Harbor NY, 1982). El vector pACCMV contiene parte del
35 genoma del adenovirus 5, el promotor de CMV y una secuencia terminadora SV40. El plásmido que contenía el vector y el inserto de ADNc se cotransfectó con un plásmido que contenía el genoma del adenovirus 5, designado pJM17, (McGrory y otros, Virology 163:614-517, 1988) en células 293 (ATCC N° CRL-1573; American Type Culture Collection, Rockville, MD), conduciendo a un evento de recombinación y la producción de un adenovirus recombinante que contenía zFGF-5, designado AdCMV-zFGF5. La presencia del ADNc de zFGF-5 se confirmó mediante PCR.

El vector de adenovirus AdCMV-zFGF5 se usó para transferir genes *in vivo* mediante inyección intravenosa de entre 1×10^{11} y 5×10^{11} partículas/ratón. Se ha demostrado que después de la inyección intravenosa, la mayoría del virus se dirige al hígado y transduce, de manera muy eficiente, los hepatocitos (Herz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90:2812-2816, 1993). Se ha demostrado que las células producen la proteína codificada por el ADNc, y en el caso de
45 proteínas secretadas, las secretan en la circulación. Se han demostrado altos niveles de expresión y efectos fisiológicos (Ohwada et al, Blood 88:768-774, 1996;. Stevenson et al, Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, 15:479-484, 1995; Setoguchi et al, Blood 84:2946-2953, 1994;. y Sakamoto et al, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91:12368-12372, 1994).

Se trataron ratones CD-1, de seis semanas de edad, (Jackson Labs, Bar Harbor, ME) con adenovirus que no contenía inserto de ADNc (AdCMV-null) o AdCMV-zFGF5 ya sea intravenosamente (IV) a través de la vena de la cola o intrapericardialmente (IPC). Se administraron un total de 5×10^{11} partículas virales/100 µl/ratón. Los animales se sacrificaron 14 días después de la inyección, y las tibias y los fémures se retiraron sin ser separados para examinar cualquier posible respuesta inflamatoria. Los huesos se fijaron en 10 % formalina tamponada neutra y se procesaron.

Se descalcificaron en ácido fórmico al 5 % con citrato de sodio al 10 %, se lavaron en agua, se deshidrataron en una serie de etanol al 70 % -100 %, se aclararon en xileno y se incluyeron en parafina. Las muestras se cortaron longitudinalmente a través de ambas metafisis tibial y femoral y se tiñeron con hematoxilina y eosina para la identificación de las células óseas. Los osteoblastos se identificaron por área central negativa de Golgi y núcleo excéntrico, mientras que los osteoclastos se identificaron por multinucleación, forma no uniforme y las lagunas de Howship asociadas con estas células de resorción.

Para la histomorfometría ósea, se seleccionaron muestras de fémur. No se midió el volumen de hueso esponjoso debido a la variación en el sitio de toma de muestras (es decir, las muestras de fémur no se seccionaron exactamente en el mismo plano). Se evaluaron tres parámetros óseos para cambios histomorfométricos.

1. Número de osteoblastos endoóseos, medido a lo largo de la superficie endóstica del hueso esponjoso a un aumento de 180X en una zona de 1,22 mm proximal a la placa de crecimiento.
2. Número de osteoclastos endoóseos, medido a lo largo de la superficie endóstica del hueso esponjoso a un aumento de 180X en una zona de 1,22 mm proximal a la placa de crecimiento.
3. Anchura de la placa de crecimiento, medido cada 72 μm a un aumento de 90X a través de toda la placa de crecimiento, excepto en los extremos periféricos, para determinar la actividad de placa de crecimiento.

Los análisis de los datos (media \pm SD, n = 4-7/grupo) demostró lo siguiente:

1. No parecía haber ninguna respuesta inflamatoria detectable en la articulación entre la tibia y el fémur.
2. AdCMV-zFGF5 administrado por vía IV o IPC a ratones aumentó significativamente la actividad osteogénica en la metafisis femoral distal, cuando se examinó a las 2 semanas. Esta estimulación de la actividad osteogénica se indicó por:
 - a) aumentos significativos en el número de osteoblastos endoóseos en el hueso esponjoso de los fémures distales tras la infusión IV o la inyección IPC de AdCMV-zFGF5, 530 % y 263 %, respectivamente, en comparación con sus controles relativos con solo vector; y
 - b) la observación de tejidos osteogénicos aumentados sobre la superficie ósea, lo que sugiere una mayor diferenciación de las células estromales de médula ósea hacia el linaje de osteoblastos.
3. El número de osteoclastos endoóseos no se vio afectado significativamente por la administración IV o IPC de AdCMV-zFGF5, en comparación con sus controles relativos con solo vector.
4. La anchura de la placa de crecimiento se redujo significativamente por infusión IV, pero no por inyección IPC, de AdCMV-zFGF5, lo que sugiere una actividad deprimida de la placa de crecimiento después de la infusión IV. Los efectos diferenciales de las administraciones de AdCMV-zFGF5 no se han dilucidado:

Estos resultados sugieren que zFGF-5 es un mitógeno fuerte para la estimulación de la proliferación de osteoblastos y que zFGF-5 tiene la capacidad de inducir la formación de hueso nuevo.

B.

Usando esencialmente los mismos procedimientos descritos anteriormente en 7.A. se realizó una QCT sobre ratones CD-1 hembra (Jackson Labs) a los que se inyectaron 1×10^{11} partículas de AdCMV-zFGF5 por ratón. Los ratones se sacrificaron 30 días después de la inyección y las relaciones de longitud cardíaca/tibial aumentaron en comparación con los controles (inyectados con adenovirus vacío o solución salina). No hubo diferencias en las longitudes de tibia entre los grupos que justificaran el cambio, ni tampoco hubo diferencias en los pesos de ningún otro órgano entre los grupos. De esta manera, la indicación es que el adenovirus zFGF-5 aumenta selectivamente la densidad ósea total, la densidad ósea trabecular y el espesor cortical en el fémur, según se mide mediante QCT.

Ejemplo 8

Efectos de zFGF-5 sobre el corazón

Tal como se describe en 7.B., los ratones CD-1 recibieron una única inyección IV de AdCMV-zFGF5, se sacrificaron después de cuatro semanas, y se encontró que las relaciones de longitud cardíaca/tibial habían aumentado en comparación con los ratones tratados con adenovirus vacío o solución salina. Los resultados mostraron que no había diferencias en la longitud de la tibia que justificaran este cambio, tampoco hubo diferencias en los pesos de ningún otro órgano entre los grupos. Este resultado sugiere que AdCMV-zFGF5 aumentó selectivamente el crecimiento cardíaco, cuando se administró como una construcción adenoviral IV.

Ejemplo 9**Expresión de zFGF-5****A. Construcción de plásmidos que codifican zFGF5**

Se expresó zFGF5, un homólogo del factor de crecimiento de fibroblastos, en *E. coli* usando el sistema de fusión de la MBP (proteína de unión a la maltosa) de New England Biolabs (NEB; Beverly, MA). En este sistema, se acopló el ADNc de zFGF5 al extremo 3' del gen *malE* para formar una proteína de fusión MBP-zFGF5. El promotor *tac* dirigió la expresión de la proteína de fusión; la expresión está "suspendida" ("off") hasta que el promotor es inducido mediante la adición de 1 mmol de IPTG (isopropil-b-tiogalactosilpiranosido). Se prepararon tres variaciones de esta proteína de fusión, que diferían sólo en su sitio de escisión para liberar zFGF5 de la MBP. Un constructo tenía un sitio de escisión de trombina creado entre los dominios de MBP y zFGF5. El segundo constructo tenía un sitio de escisión de factor Xa, en lugar del sitio de escisión de trombina. El tercer constructo tenía un sitio de escisión de enterocinasa, en lugar del sitio de escisión de trombina.

Los constructos se prepararon como fusiones dentro del marco con MBP según el sitio de clonación múltiple ("Multiple Cloning Site" - MCS) del vector pMAL-c2 (NEB), y según las especificaciones del fabricante. El zFGF5 se amplificó mediante PCR usando cebadores que introdujeron sitios de clonación convenientes, así como sitios de escisión usando los siguientes cebadores de oligonucleótidos: 1) para el constructo de trombina: zc12,652 (SEQ ID NO: 7) y zc12,631 (SEQ ID NO: 8); 2) para el constructo de factor Xa: zc15,290 (SEQ ID NO: 9) y zc12,631 (SEQ ID NO: 8); y 3) para el constructo de enterocinasa: zc15,270 (SEQ ID NO: 10) y zc12,631 (SEQ ID NO: 8). En cada caso, la secuencia señal no se amplificó; el zFGF5, tal como se expresa, empieza en el residuo de aminoácido 26 de la SEQ ID NO: 2 (Val se cambió a Ala). El constructo de trombina se construyó insertando un fragmento zFGF5 Xba I-Sal I en los sitios Xba I - Sal I de pMAL-c2. El constructo de factor Xa se construyó insertando un fragmento Sal I romo en los sitios Xmn I - Sal I del MCS. El constructo de enterocinasa se construyó insertando un fragmento Xba I - Sal I en los sitios Xba I - Sal I de pMAL-c2. Una vez construidos los constructos, se transformaron en una variedad de cepas huésped de *E. coli* y se analizaron para determinar un alto nivel de expresión. El constructo de trombina (designado pSDH90.5) se transfectó en células DH10B (GIBCO-BRL), mientras que tanto el constructo de factor Xa (designado pSDH117.3) como el constructo de enterocinasa (designado pSDH116.3) se transfectaron en células TOP10 (Invitrogen, San Diego, CA). Las tres fusiones MBP son aproximadamente de 63 kD (43 kD en el dominio de MBP, y aproximadamente 20 kD en el dominio de zFGF5).

B. Recombinación homóloga / zFGF5

La expresión de zFGF5 en *Pichia methanolica* usa el sistema de expresión descrito en el documento PCT WO 9717450 concedido junto con el presente. Un plásmido de expresión que contiene la totalidad o parte de un polinucleótido que codifica zFGF5 es construido mediante recombinación homóloga. El vector de expresión se construye a partir de pCZR204, que contiene el promotor AUG1, seguido de la secuencia líder α Fpp, seguido de una etiqueta de péptido amino-terminal, un sitio de restricción SmaI de extremo romo, una etiqueta de péptido carboxi-terminal, un codón de terminación de traducción, seguido del terminador AUG1, el marcador seleccionable ADE2 y, finalmente, la región 3' no traducida de AUG1. También están incluidas en este vector las secuencias URA3 y CEN-ARS necesarias para la selección y replicación en *S. cerevisiae*, y las secuencias *ori* de Amp^R y *colE1* necesarias para la selección y replicación en *E. coli*. La secuencia zFGF5 insertada en este vector empieza en el residuo 27 (Ala) de la secuencia de aminoácidos de zFGF.

Para construir pSDH114, un plásmido para la expresión de zFGF5 en *P. methanolica*, se transformaron los siguientes fragmentos de ADN en *S. cerevisiae*: 100 ng del "vector aceptor" pCZR204 que ha sido digerido con SmaI; 1 μ g de un fragmento de restricción XbaI-SalI liberado de pSDH90.5 y que incluye una secuencia codificadora de zFGF5; se generó 1 μ g de un segmento enlazador de cadena doble, generado mediante PCR, sintético, que abarca 70 pares de bases de la secuencia codificadora α Fpp en un extremo y la una a las 70 pares de bases de la secuencia codificadora del extremo amino de la secuencia de zFGF5 madura en el otro a partir de los cuatro oligonucleótidos zc13,497 (SEQ ID NO: 11); zc15,131 (SEQ ID NO: 12); zc15,132 (SEQ ID NO: 18); zc15, 134 (SEQ ID NO: 13), cuya cadena sentido de una secuencia de cadena doble se muestra en SEQ ID NO: 19 (secuencia enlazadora en 5' (α Fpp \rightarrow extremo N-terminal de zFGF5)) y se generó 1 μ g de un segmento enlazador de cadena doble, generado mediante PCR, sintético, que abarca 70 pares de bases de la secuencia codificadora del extremo carboxilo desde zFGF5 en un extremo con 70 pares de bases de una secuencia terminadora AUG1 a partir de cuatro oligonucleótidos zc13,529 (SEQ ID NO: 14); zc13,525 (SEQ ID NO: 15), zc13,526 (SEQ ID NO: 16); zc13,528 (SEQ ID NO: 17), cuya cadena sentido de un sentido de cadena doble se muestra en la SEQ ID NO: 20 (secuencia enlazadora en 3' (extremo C-terminal de zFGF5 \rightarrow terminador AUG1)). Se seleccionaron colonias Ura+, y el ADN de las colonias de levaduras resultantes se extrajeron y se transformaron en *E. coli*. Los clones individuales que albergan el constructo de expresión correcta se identificaron mediante cribado mediante PCR con oligonucleótidos zc13,497 (SEQ ID NO: 11) y zc13,528 (SEQ ID NO: 12) seguido por digestión de restricción para verificar la presencia del inserto zFGF5 y secuenciación de ADN para confirmar que las secuencias de ADN

deseadas se habían unido entre sí. El ADN de plásmido a mayor escala se aísla para uno de los clones correctos, y el ADN se digiere con Sfi I para liberar el casete de expresión Pichia-zFGF5 de la columna vertebral del vector. A continuación, el ADN cortado con Sfi I se transforma en un huésped de expresión *Pichia methanolica*, designado PMAD16, y se cultivó en placa sobre placas ADE D para la selección. Se seleccionan y criban una diversidad de clones mediante transferencia Western para un alto nivel de expresión de zFGF5.

Más específicamente, para la producción de proteína a pequeña escala (por ejemplo, producción en placa o matraz con agitación), transformantes de *P. methanolica* que portan un casete de expresión que comprende un promotor regulado por metanol (tal como el promotor AUG1) se hacen crecer en presencia de metanol y ausencia de cantidades intererentes de otras fuentes de carbono (por ejemplo, glucosa). Para experimentos a pequeña escala, incluyendo un cribado preliminar de niveles de expresión, los transformantes pueden hacerse crecer a 30 °C en medios sólidos que contienen, por ejemplo, 20 g/l de Bacto-agar (Difco), 6,7 g/l de levadura con base de nitrógeno sin aminoácidos (Difco), 10 g/l de metanol, 0,4 mg/l de biotina y 0,56 g/l de polvo de -Ade -Thr -Trp. Debido a que el metanol es una fuente de carbono volátil, se pierde fácilmente en una incubación prolongada. Puede proporcionarse un suministro continuo de metanol colocando una solución de metanol al 50 % en agua en las tapas de las placas invertidas, de manera que el metanol se transfiere a las células en crecimiento mediante transferencia por evaporación. En general, no se usa más de 1 ml de metanol por placa de 100 mm. Pueden llevarse a cabo experimentos a una escala ligeramente mayor usando cultivos cultivados en matraces con agitación. En un procedimiento típico, las células se cultivan durante dos días en placas de metanol mínimo, tal como se ha divulgado anteriormente a 30 °C, a continuación, las colonias se usan para inocular un pequeño volumen de medio de metanol mínimo (6,7 g/l levadura con base de nitrógeno sin aminoácidos, 10 g/l de metanol, 0,4 mg/l de biotina) a una densidad celular de aproximadamente 1×10^6 células/ml. Las células se cultivan a 30 °C. Las células cultivadas en metanol tienen unos requerimientos de oxígeno elevados, necesitando una agitación intensa durante el cultivo. El metanol se repone diariamente (normalmente 1/100 en volumen de metanol al 50 % por día).

Para un cultivo a escala de producción, se preparan cultivos frescos de clones de alta producción en matraces con agitación. A continuación, los cultivos resultantes se usan para inocular un medio de cultivo en un fermentador. Normalmente, se usa un cultivo de 500 ml cultivado en YEPD a 30 °C durante 1-2 días con agitación intensa para inocular un fermentador de 5 litros. Las células se cultivan en un medio adecuado que contiene sales, glucosa, biotina, y elementos traza a 28 °C, pH 5,0, y >30 % de O₂ disuelto. Una vez consumida la carga inicial de glucosa (tal como se indica por una reducción en el consumo de oxígeno), una alimentación de glucosa/metanol es suministrada al recipiente para inducir la producción de la proteína de interés. Debido a que la fermentación a gran escala se lleva a cabo bajo condiciones de carbono limitado, la presencia de glucosa en la alimentación no reprime al promotor inducible por metanol.

Ejemplo 10

Purificación de zFGF-5

Se obtuvo un medio de fermentación de *E. coli* a partir de una cepa que expresaba zFGF5 como una fusión de proteína de unión a maltosa (pSDH90.5, tal como se ha descrito anteriormente). La fusión de MBPzFGF5 se solubilizó durante la sonicación o rotura por en prensa French, usando un tampón que contiene 20 mM Hepes, 0,4 M NaCl, 0,01 M EDTA, 10 mM DTT, a pH 7,4. El tampón de extracción incluía también 5 µg/ml de pepstatina, leupeptina, aprotinina, bestatina. También se incluyó fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) a una concentración final de 0,5 mM.

El extracto se centrifugó a 18.000 g durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante resultante se procesó sobre una resina de amilosa (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJ) que se une al dominio MBP de la fusión. Tras lavar la columna, la fusión de MBPzFGF5 unida se eluyó en el mismo tampón que el tampón de extracción sin DTT e inhibidores de proteasa pero que contenía 10 mM maltosa.

La acumulación eluída de MBPzFGF5 se trató con 1:100 (v/v) de trombina bovina con respecto a fusión de MBPzFGF5. Se dejó que la reacción de escisión avanzara durante de 6 a 8 horas a temperatura ambiente, tras lo cual la mezcla de reacción se pasó sobre un lecho de benzamidina sefarosa (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, NJ) para extraer la trombina, usando el mismo tampón de elución que el descrito anteriormente para la cromatografía de afinidad con amilosa.

La fracción pasada, que contenía el producto escindido zFGF5 y el dominio de MBP libre, se aplicó a una matriz de afinidad con heparina Toso Haas (Toso Haas, Montgomeryville, PA) equilibrada en 0,5 M NaCl, 20 mM Hepes, 0,01 M EDTA a pH 7,4. Tanto la MBP como el zFGF5 se unieron a la heparina bajo estas condiciones. Las proteínas unidas fueron eluidas con un gradiente de volumen de columna de 2 a 3 formado entre 0,5 M NaCl y 2,0 M NaCl en el tampón de columna.

La MBP eluyó pronto, a aproximadamente 0,7 M NaCl, y el zFGF5 escindido eluyó a aproximadamente 1,3 M NaCl. Las fracciones acumuladas de zFGF5 se pasaron una vez más a través de la etapa de amilosa para extraer cualquier

MBPzfgf5 residual que es un contaminante secundario. El material purificado se denominó zFGF5-Hep2, y muestra una única especie de alta pureza a ~20 kDa en un análisis SDS-PAGE.

5 La secuenciación del extremo N-terminal de los aminoácidos proporcionó la secuencia N-terminal nativa pero datos de espectrofotometría de masas revelaron masas moleculares que indicaban que el extremo C-terminal debe estar truncado en el residuo 196 (Lys) de la SEQ ID NO: 2, en el que hay presente un "sitio dibásico".

La proteína zFGF5 era muy estable en 1,3 M NaCl. Tras la diálisis en PBS, el zFGF5 se agregó y dejó la fase de solución. Por tanto, pueden usarse formulaciones que incluyen heparina y otros "polianiones" para prevenir la agregación de zFGF5 puro.

Ejemplo 11

10 Producción de anticuerpos

15 Se produjeron anticuerpos para zFGF5, usando técnicas estándar conocidas en la técnica y descritas anteriormente, mediante la inmunización de cobayas, conejos y ratones con péptidos QTRARDDVSRKQLRLYC (SEQ ID NO: 2 del residuo de aminoácido 40 al residuo 56), designado zFGF-1; YTTVTKRSRRIRPTHRAC (SEQ ID NO: 2 del residuo de aminoácido 191 al residuo 207, con una Cys adicional en el extremo C-terminal), designado zFGF-5 o el polipéptido zFGF5 de longitud completa tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2, más la proteína de fusión MBP, y designada MBP-FGF5. Se conjugaron péptidos a través de los residuos Cys usando KLH activado con maleimida (Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

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

Tabla 7

Péptido o proteína	animal	nivel inmun.	Ab producido
ZFGF5-1	Cobaya	inicial 50 µg/animal refuerzo 25 µg/animal	Purificado por afinidad y fraccionado por IgC
	Conejo	inicial 100 µg/animal refuerzo 50 µg/animal	Purificado por afinidad y fraccionado por IgC
ZFGF5-2	Cobaya	inicial 50 µg/animal refuerzo 25 µg/animal	Purificado por afinidad y fraccionado por IgC
	Conejo	inicial 100 µg/animal refuerzo 50 µg/animal	Purificado por afinidad y fraccionado por IgC
ZFGF5-MBP	Ratón	inicial 20 µg/animal refuerzo 10 µg/animal	
	Conejo	inicial 200 µg/animal refuerzo 100 µg/animal	Purificado por afinidad

20 Ejemplo 12

Efectos de zFGF-5 en ratones ob/ob

25 Se examinaron los efectos de zFGF-5 sobre los adipocitos y el metabolismo de las grasas usando ratones ob/ob hembras (C57B1/6J, Jackson Labs, Bar Harbor, ME). Los ratones son obesos, resistentes a la insulina y tienen "hueso graso" ("fatty bone"). Los ratones se pesaron y se encontró que todos tenían el mismo peso, y se recibieron una inyección por vía IV con 10^{11} partículas por ratón de AdCMVzFGF-5 o bien solución salina o bien Ad5CMV-GFP para los controles, tal como se describe en el ejemplo 7. A los 17 días después de la inyección, los ratones de control inyectados con Ad5CMVzFGF-5 habían ganado $5,342 \pm 0,5$ gramos de peso corporal en comparación con el día de la inyección, mientras que los ratones tratados con Ad5CMVzFGF-5 perdieron $3,183 \pm 0,743$ gramos de peso corporal.

Listado de secuencias

30 (1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: ZymoGenetics. Inc. 1201 Eastlake Avenue East Seattle, Washington 98102 Estados Unidos de América

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: HOMÓLOGOS DE FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLATOS

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 20

35 (vi) DATOS DE SOLICITUD ACTUAL:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: 05021714.0

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 16/10/1997

(vii) DATOS SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 60/028646

5 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 16/10/1996

(viii) INFORMACIÓN DE APODERADO/AGENTE:

(A) NOMBRE: GRIFFIN, PHILIPPA JANE

(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: P21390EP-D2-PCT-MRM/PJG

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 1:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 917 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(ix) CARACTERÍSTICA

(A) NOMBRE/CLAVE: Secuencia de codificación

(B) LOCALIZACIÓN: 1... 621

(D) OTRA INFORMACIÓN:

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

ATG TAT TCA GCG CCC TCC GCC TGC ACT TGC CTG TGT TTA CAC TTC CTG	48
Met Tyr Ser Ala Pro Ser Ala Cys Thr Cys Leu Cys Leu His Phe Leu	
1 5 10 15	

CTG CTG TGC TTC CAG GTA CAG GTG CTG GTT GCC GAG GAG AAC GTG GAC	96
Leu Leu Cys Phe Gln Val Gln Val Leu Val Ala Glu Glu Asn Val Asp	
20 25 30	

TTC CGC ATC CAC GTG GAG AAC CAG ACG CGG GCT CGG GAC GAT GTG AGC	144
Phe Arg Ile His Val Glu Asn Gln Thr Arg Ala Arg Asp Asp Val Ser	
35 40 45	

CGT AAG CAG CTG CGG CTG TAC CAG CTC TAC AGC CGG ACC AGT GGG AAA	192
Arg Lys Gln Leu Arg Leu Tyr Gln Leu Tyr Ser Arg Thr Ser Gly Lys	
50 55 60	

CAC ATC CAG GTC CTG GGC CGC AGG ATC AGT GCC CGC GGC GAG GAT GGG	240
His Ile Gln Val Leu Gly Arg Arg Ile Ser Ala Arg Gly Glu Asp Gly	
65 70 75 80	

GAC AAG TAT GCC CAG CTC CTA GTG GAG ACA GAC ACC TTC GGT AGT CAA	288
Asp Lys Tyr Ala Gln Leu Leu Val Glu Thr Asp Thr Phe Gly Ser Gln	
85 90 95	

35

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 207 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

25 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

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

ES 2 403 880 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 5 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(vii) FUENTE INMEDIATA:

- (B) CLON: ZC11676

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

10 GGACTTGACT ACCGAAGGTG TCTG 24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 15 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(vii) FUENTE INMEDIATA:

- (B) CLON: ZC11677

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

20 GTCGATGTGA GCCGTAAGCA GCT 23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

5 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC12053

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

10 GCATACTTGT CCCCATCCTC GCCGCG 26

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 621 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

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

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 47 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC12652

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

TATTTATCTA GACTGGTTCC GCGTGCCGCC GAGGAGAACG TGGACTT 47

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

5 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC12631

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

10 GTATTTGTCG ACTCAGGCAG GGTGTGTGGG CCG 33

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC15290

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

20 GCCGAGGAGA ACGTGGACTT CC 22

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 47 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

25 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC15270

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

30 TATTTATCTA GAGATGACGA TGACAAGGCC GAGGAGAACG TGGACTT 47

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 41 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

35 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC13497

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

5 AGCATTGCTA AAGAAGAAGG TGTAAGCTTG GACAAGAGAG A 41

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 63 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

10 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC15131

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12

15 GGTGTAAGCT TGGACAAGAG AGAGGAGAAC GTGGACTTCC GCATCCACGT GGAGAACCAG 60
ACG 63

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 39 pares de bases

20 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC15134

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 13

CCGGCTGTAG AGCTGGTACA GCCGCAGCTG CTTACGGCT 39

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

30 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC13529

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 14

CTTCAGAAGC CCTTCAAGTA CACGACGGTG ACCAAGAGGT CC 42

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

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 61 pares de bases

5 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC13525

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

ACGACGGTGA CCAAGAGGTC CCGTCGGATC CGGCCACAC ACCCTGCCTA GGGGGAATTC 60
G 61

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

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD: 61 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(vii) FUENTE INMEDIATA:

20 (B) CLON: ZC13526

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

CAAACAGGCA GCCCTAGAAT ACTAGTGTGCG ACTCGAGGAT CCGAATTCCC CCTAGGCAGG 60
G 61

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

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC13528

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

CTCAAAAATT ATAAAAATAT CCAAACAGGC AGCCCTAGAA TACT 44

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 18:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 62 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC13132

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

CAGCCGCAGC TGCTTAGCGC TCACATCGTC CCGAGCCCGC GTCTGGTTCT CCACGTGGAT GC
62

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 141 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

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

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

20 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 144 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

25 (D) TOPOLOGÍA: lineal

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

CTTCAGAAGC CCTTCAAGTA CACGACGGTG ACCAAGAGGT CCCGTCGGAT CCGGCCACA	60
CACCCCTGCCT AGGGGGAATT CGGATCCTCG AGTCGACACT AGTATTCTAG GGCTGCCTGT	120
TTGGATATTT TTATAATTTT TGAG	144

30

REIVINDICACIONES

1. Una molécula polinucleótida aislada que codifica un polipéptido homólogo al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 1 desde el nucleótido 82 hasta el nucleótido 621;
- 5 2. Una molécula polinucleótida aislada que codifica un polipéptido homólogo al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 6 desde el nucleótido 82 hasta el nucleótido 621;
3. Una molécula polinucleótida aislada que codifica un polipéptido homólogo al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 2 desde el residuo de aminoácido 28 hasta el residuo 196;
- 10 4. Una molécula polinucleótida aislada que codifica un polipéptido homólogo al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 2 desde el residuo de aminoácido 28 hasta el residuo 207;
5. Molécula polinucleótida aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el polinucleótido es ADN.
- 15 6. Un vector de expresión que comprende los siguientes elementos unidos operativamente:
 - un promotor de transcripción;
 - un segmento de ADN según la reivindicación 5; y
 - un terminador de transcripción,
7. El vector de expresión según la reivindicación 6, en el que el segmento de ADN es SEQ ID NO: 1 desde el nucleótido 82 al nucleótido 621; o en el que el segmento de ADN es SQ ID NO: 6 desde el nucleótido 82 al nucleótido 621.
- 20 8. El vector de expresión según la reivindicación 6, en el que el segmento de ADN es una secuencia que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 2 desde el residuo de aminoácido 28 al residuo 196; o en el que el segmento de ADN es una secuencia que codifica un polipéptido de SEQ ID NO: 2 desde el residuo de aminoácido 28 al residuo 207.
9. Célula cultivada en la que se ha introducido un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que dicha célula expresa un polipéptido codificado por el segmento de ADN.
- 25 10. Procedimiento de producción de un polipéptido homólogo al FGF, que comprende:
 - cultivar una célula en la que se ha introducido un vector de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en donde dicha célula expresa un polipéptido homólogo al FGF codificado por el segmento de ADN; y
 - recuperar el polipéptido homólogo al FGF.
- 30 11. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2 desde el residuo 28 hasta el residuo 196.
12. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2 desde el residuo 28 hasta el 207.
13. Polipéptido aislado según las reivindicaciones 11 ó 12, que comprende además una secuencia de señal secretora.
- 35 14. Polipéptido aislado según la reivindicación 13, en el que la secuencia de señal secretora comprende los residuos de aminoácidos 1-27 de la SEQ ID NO: 2.
15. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el polipéptido comprende:
 - (i) una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2, desde el residuo 28 al residuo 196; o
 - 40 (ii) una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2, desde el residuo 28 al residuo 207.
16. Una molécula polinucleótida aislada según la reivindicación 3 ó 4, en la que dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido con un residuo inicial Met.
17. Un polipéptido aislado según las reivindicaciones 11 ó 12, que comprende además un residuo inicial Met.

18. Vector de expresión según la reivindicación 8, en el que el segmento de ADN codifica un polipéptido con un residuo inicial Met.

FHF-1	-----MAAAIASSLIRQKROARESNS-DRVSASKRRSSPSKDG-R	38
FGF-10	-----	
FHF-4	-----MAAAIASGLIRQKROAREQHW-DRPSASRRRSPSKN--R	37
FHF-2	-----MAAAIASSLIRQKROARER---EKSNAACKCVSSPSKG--K	35
FHF-3	-----MAALASSLIRQKREVREPGG-SRPVSAQRRVCP-RGT-K	36
FGF4 HUMAN	-----MS-GPGTAAVALLPAVLLALL-APWAGRGGAAAPTAPN-G	37
FGF6 HUMAN	MALGQKLFITMSRGAGRLQGTLLWALVFLGIL-VGMVVP--SPAGTRAN-N	46
FGF2 HUMAN	-----	
FGF1 HUMAN	-----	
KGF-2	-----MWKWILTHCASAFPHLPGCCC-CCFLLLFLVSSVPVTC-Q	38
FGF7 HUMAN	-----MHKWILTWILPTLLYR-S-----CFHIICLVGTISLAC-N	33
ZGI RUZFGF	-----MY-SAPSACTCLCHFLLLCF-QVQ-----VLVAEE-N	30
FGF8 HUMAN	-----MG-SPRSALSCLLLHLLVLCL-QAQEGPGRGPALGREL-A	37
FGF5 HUMAN	-----MSLSFLLLLFFSHLILSAWAHGEKRLAPKGQPGPAATDRN	40
FGF9 HUMAN	-----MAPLGEVGNYPFGVQDAVPFGNVPVLP--VDSPVLLS-D	35
FGF3 HUMAN	-----MGLIWLILLSLEP-----G-----WPAAGPGA	23
FHF-1	SLCERHV---LGVFSKVRFCSGR-----KRPVRRRPEPQLKGIVT	75
FGF-10	-----MASKEPQLKGIVT	13
FHF-4	GLCNGNL---VDIFSKVRIFGLK-----KRRLRRO-DPQLKGIVT	73
FHF-2	TSCDKNK---LNVFSRVKLFSGK-----KRRRRRP-EPQLKGIVT	71
FHF-3	SLCQKQL---LILLSKVRLCGGRP-----ARPDGRP-EPQLKGIVT	73
FGF4 HUMAN	TLEAELERR-WESLVALSLARLPVAAQPK- AAVQSGAGDYLLG- IKRLR	84
FGF6 HUMAN	TLLDS--RG-WGTLLSRSRAGL---AG--E-IAGVNWESGYLVG- IKRQR	86
FGF2 HUMAN	-----MAAGSITTLPALPE-----DGGSGAFPPGHFKDPK	30
FGF1 HUMAN	-----MAEGEITTFALTE-----KFN---LPPGNYKKPK	27
KGF-2	ALGQDMVSP-EATNSSSSSFSSPSSAG-----RHVRSYNHLOG-DVRWR	80
FGF7 HUMAN	DMTPEQM---ATNVNCS---SPE-----RHTRSVDYMEGGDIRLY	67
ZGI RUZFGF	VDFRID-----VEK-----QTRARDDVSRKQLRLY	55
FGF8 HUMAN	SLFRAGR---EPOGVSQQHVRE-----QSLVTDQLSRRLIRTY	72
FGF5 HUMAN	PIGSSSRQSSSSAMSSSSASSSPAASLGSQSGLEQSSFWQSPS-GRRTG	89
FGF9 HUMAN	HLGQS---E--AGGLPRGP-----AVTDLHLKG-ILRRR	64
FGF3 HUMAN	RLRRD-----AGG-----RGGVYEHLGG-APRRR	46
FHF-1	RLFSQQ--GYFLQMHPDGTIDGTDKENS DYTLFNLIPVGLR-VVAIQGVK	122
FGF-10	RLFSQQ--GYFLQMHPDGTIDGTDKENS DYTLFNLIPVGLR-VVAIQGVK	60
FHF-4	RLYCRO--GYLQMHPDGDALDGTKDDSTNSTL FNLIPVGLR-VVAIQGVK	120
FHF-2	KLYSRQ--GYHLQLQADGTIDGTDKEDSTYTL FNLIPVGLR-VVAIQGVQ	118
FHF-3	KLFCRO--GFYLOANPDGSIQGTPEdTSSFT HNLIPVGLR-VVTIQSAK	120
FGF4 HUMAN	RLYCNVIGIGFHLQALPDGRIGGAHADT-RD SLELSPVERG-VVSIFGVA	132
FGF6 HUMAN	RLYCNVIGIGFHLQVLPDGRISGTHEEN-PYS LLEISTVERG-VVSLFGVR	134
FGF2 HUMAN	RLYCKNG-GFFLRIPHDPGRVDGVREKSDPH IKLQLQAEERG-VVSIKVC	78
FGF1 HUMAN	LLYCSNG-GHFLRILPDGTVDGTRDRSDQH IQLQLSAESVG-EVYIKSTE	75
KGF-2	KLFSFT--KYFLKIEKNGKVS GTKKENC PYSILEITSVEIG-VVAVKAIN	127
FGF7 HUMAN	RLFCRT--QWYLRIDKRKGKVGTOEMKN NYNIMEIRTVAVG-IVAIGVE	114
ZGI RUZFGF	QLYSRTS-GKHIOVLG-RRISARGEDGD KYAQLLVETDTFGSOVRIGKE	103
FGF8 HUMAN	QLYSRTS-GKHVQVLANKRINAMAEDGD PFAKLIVETDTFGSRVVRGAE	121
FGF5 HUMAN	SLYCRVIGIGFHLQIYPDGKVNGSHEAN-MLS VLEIFAVSQG-IVGIRGVF	137
FGF9 HUMAN	QLYCRT--GFHLEIFPNGTIOGTRKDH SRFGILEFISIAVG-LVSIKRGV	111
FGF3 HUMAN	KLYCAT--KYHLQLHPSGRVNGSLENS-AYS ILEITAVEVG-IVAIRGLF	92
	*:.. :. :. :. * :.	

Fig. 1

FHF-1	ASLYVAMNGEGYLYSSDV-FTPECKFKESVFENYYVIYSSSTLYRQOESG-	170
FGF-10	ASLYVAMNGEGYLYSSDV-FTPECKFKESVFENYYVIYSSSTLYRQOESG-	108
FHF-4	TGLYIAMNGEGYLYPSEL-FTPECKFKESVFENYYVIYSSMLYRQOESG-	168
FHF-2	TKLYLAMNSEGYLYTSEL-FTPECKFKESVFENYYVTYSSMIYRQQQSG-	166
FHF-3	LGHYAMNAEGLLYSSPH-FTAECRFKECVFENYYVLYASALYRQRRSG-	168
FGF4 HUMAN	SRFFVAMSSKGLYGSFP-FTDECTFKEILLPNNYNAYESYKYPG----	176
FGF6 HUMAN	SALFVAMNSKGRLYATPS-FQEECKFRETLLPNNYNAYESDLYQG----	178
FGF2 HUMAN	ANRYLAMKEDGRLLASKC-VTDECFERLESNNYNTYRSRKYTS-----	122
FGF1 HUMAN	TGOYLAMDTDGLLYGSQT-PNEECLFLERLEENHYNTYISKKHAEK--N-	121
KGF-2	SNYYLAMNKKGKLYGSKE-FNNDCKLKERIEENGYNTYASFNWQHN--G-	173
FGF7 HUMAN	SEFYLAMNKEGKLYAKKE-CNEDCNFKELILENHYNTYASAKWTHN--G-	160
ZGI HUZFGF	TEFYLCMNRKGLVGPDPGTSKECVFIEKVLNNYTALMSAKYSG----	148
FGF8 HUMAN	TGLYICMNNKGLIAKSNGKGDVCFTEIVLNNYTALQNAKYE-----	166
FGF5 HUMAN	SNKFLAMSKKGLHASAK-FTDDCKFRERFQENSYNTYASAIHRTEKTG-	185
FGF9 HUMAN	SGLYLGMEKGLYGSSEK-LTQECVFREQFEENWYNTYSSNLYKHVDTG-	159
FGF3 HUMAN	SGRYLAAMNKRGLYASEH-YSAECEFVERIHELGYNTYASRLYRTVSSTP	141
	:: * . * * . : * : * . *	
FHF-1	-----RAWFLGLNKEGQIMKG--NRVKKTKPSSHFPKPIEVCMYR	209
FGF-10	-----RAWFLGLNKEGQIMKG--NRVEKTKPSSHFPKPIEVCMYR	147
FHF-4	-----RAWFLGLNKEGQAMKG--NRVKKTKPAAHFLPKPLEVAMYR	207
FHF-2	-----RGWYLGLNKEGEIMKG--NHVKKNKPAAHFLPKPLKVAMYK	205
FHF-3	-----RAWYLGLDKEGQVMKG--NRVKKTKAAAHFLPKLLEVAMYQ	207
FGF4 HUMAN	-----MFIALSKNGKTKKG--NRVSPTMKVTHFLPRL-----	206
FGF6 HUMAN	-----TYIALSKYGRVKRG--SKVSPIMTVTHFLPRI-----	208
FGF2 HUMAN	-----WYVALKRTGQYKLG--SKTGPQKAILFLPMSAKS----	155
FGF1 HUMAN	-----WFVGLKKNKSGCKRG--PRTHYGQKAILFLPLPVSSD---	155
KGF-2	-----ROMYVALNGKGAPRRG--QKTRRKNTSAHFLPMVVHS----	208
FGF7 HUMAN	-----GEMFVALNQKGIPIVRG--KTKKKEQKTAHFLPMAIT----	194
ZGI HUZFGF	-----WYVGFTKKGRPRKG--PKTRENQDQVHFMKRYPKGQPEL	185
FGF8 HUMAN	-----WYMAFTRKGRPRKG--SKTROHQREVHFMKRLPRGHHTT	203
FGF5 HUMAN	-----REWYVALNKRKAKRGCSPRVKPQHISTHFLPRFKQSEQ-P	225
FGF9 HUMAN	-----RRYYVALNKDGTREG--TRTKRHQKFTHFLPRPVPDPKVP	198
FGF3 HUMAN	GARRQPSAERLWYVSVNGKGRPRG--FKTRRTQKSSLFLPRVLDHRDHE	189
	:::.. * * * : :	
FHF-1	EPSLHEIGEKQ----GRS--RKSSGTPTMNGGKVVNQDST-----	243
FGF-10	EPSLHEIGENK----GVQ--GKFWTPP-----	168
FHF-4	EPSLHDVGETVPKP-GVTPSKSTSASAIMNGGKPVNKSKT-----	247
FHF-2	EPSLHDLTEFSRSG-SGTPTKSRSVSGVLNNGGKSMHNEST-----	245
FHF-3	EPSLHSVPEAS-----P--SSPPAP-----	225
FGF4 HUMAN	-----	
FGF6 HUMAN	-----	
FGF2 HUMAN	-----	
FGF1 HUMAN	-----	
KGF-2	-----	
FGF7 HUMAN	-----	
ZGI HUZFGF	QKPFKYTTVTK-----RSRR--IRPHPA-----	207
FGF8 HUMAN	EQSLRFEFLNYPPF-TRSLRGSQRTWAPR-----	233
FGF5 HUMAN	ELSFTVTVPEKKNP-PSPIKSKIPLSAPRKNTNSVKYRLKFRFG-----	268
FGF9 HUMAN	ELYKDILSQS-----	208
FGF3 HUMAN	MVRQLQSGLPRPPGKGVQPRRRRQKQSPDNLEPSHVQASRLGSQLEASAH	239

Fig. 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	1.00	0.39	0.43	0.29	0.46	0.33	0.36	0.38	0.37	0.41	0.39	0.40	0.42	0.40	0.35	0.38
2		1.00	0.38	0.34	0.41	0.35	0.38	0.33	0.38	0.44	0.39	0.37	0.37	0.39	0.35	0.60
3			1.00	0.31	0.42	0.34	0.33	0.36	0.34	0.38	0.35	0.37	0.41	0.46	0.35	0.35
4				1.00	0.34	0.53	0.26	0.24	0.25	0.31	0.28	0.30	0.30	0.31	0.28	0.32
5					1.00	0.35	0.39	0.43	0.39	0.39	0.43	0.42	0.44	0.43	0.40	0.43
6						1.00	0.33	0.31	0.33	0.31	0.32	0.34	0.34	0.32	0.36	0.36
7							1.00	0.34	0.98	0.33	0.76	0.81	0.34	0.37	0.67	0.42
8								1.00	0.34	0.54	0.34	0.37	0.36	0.36	0.34	0.38
9									1.00	0.33	0.56	0.72	0.34	0.37	0.62	0.42
10										1.00	0.32	0.35	0.40	0.37	0.32	0.43
11											1.00	0.68	0.36	0.38	0.58	0.41
12												1.00	0.36	0.33	0.62	0.42
13													1.00	0.47	0.34	0.32
14														1.00	0.30	0.31
15															1.00	0.38
16																1.00

Fig. 3