

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ
ЗА
ИЗОБРЕТЕНИЕ

(19) BG

(11) 107888 A
7(51) C 12 N 15/18
C 07 K 14/50
A 61 K 38/18, 31/7088

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 107888
(22) Заявено на 06.06.2003
(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(31) 251837 (32) 08.12.2000 (33) US
005646 07.12.2001 US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 8 на 31.08.2004
(45) Отпечатано на
(46) Публикувано в бюлетин №
на
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):
SCHERING AKTIENGESSELLSCHAFT,
BERLIN (DE)

(72) Изобретател(и):
Peter W. Bringmann, Concord, CA
Daryl Faulds, Mill Valley, CA
Branislava Mitrovic, Walnut Creek, CA
Subha Srinivasan, Greenbrae, CA
James Onuffer, Alameda, CA (US)

(74) Представител по индустриална
собственост:
Фани Владимирова Божинова, 1000 София,
п.к. 728

(86) № и дата на PCT заявка:
PCT/US2001/047350, 10.12.2001

(87) № и дата на PCT публикация:
WO2002/046424, 13.06.2002

(54) НОВИ ФИБРОБЛАСТНИ РАСТЕЖНИ ФАКТОРИ

(57) Съгласно изобретението се идентифицират нови нуклеинови киселини, полипептидни последователности и техни регулатори от нуклеинови киселини, които кодират за фибробластен растежен фактор (FGF), за предпочитане FGF-20 или FGF-23, клас полипептиди, включени в развитието, диференциацията и морфогенезата, например в клетка-клетка предаването на сигнали и клетъчната пролиферация. FGF от изобретението, негови фрагменти и производни имат една или повече от следните биологични активности, например спомагане зарастването на рани, промотиране на невралното преживяване, стимулиране на клетъчната пролиферация, например пролиферация на стволови клетки, фибробласти, неврони, глия, олигодедрити, клетки на Schwann или на техни родителски клетки, модулиране на клетъчната диференциация, индуциране на ембрионалното развитие, стимулиране на невритния продукт, засилване на възстановяването от нервно или неврално нараняване, стимулиране на миелинизиранието, стимулиране на ангиогенезата, рецептор свързваща активност, модулиране на тумorigенезата и други.

70 претенции

BG 107888 A

НОВИ ФИБРОБЛАСТНИ РАСТЕЖНИ ФАКТОРИ

Настоящата заявка претендира за приоритет от временна заявка 60/251837, подадена на 08.12.2000 г., която е включено в своята цялост в настоящото, като литературна справка.

ОБЛАСТ НА ТЕХНИКАТА

Фибробластните растежни фактори играят важна роля при голям брой биологични действия, включително, например, клетъчната пролиферация и диференциация, и развитието.

ОПИСАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Идентифицират се нови нуклеинови киселини, полипептидни последователности и тяхни регулатори от нуклеинови киселини, които кодират за фибробластен растежен фактор (FGF), за предпочитане FGF-20 (наричан FGF-21 във временната заявка, съответстваща на настоящата

FGF-21 във временната заявка, съответстваща на настоящата заявка) или FGF-23 (който е същия, като публикувания FGF-22), един клас полипептиди, включени в развитието, диференциацията, и морфогенезата, например, в клетка-клетка предаването на сигнали и клетъчната пролиферация. FGF от настоящото изобретение, негови фрагменти и негови производни, имат една или повече от следните биологични активности, включително, но без да се ограничават до: FGF активност; и FGF-специфична имуногенна активност. В съответствие с настоящото изобретение са били идентифицирани най-малко два нови класа, например, FGF-20 и FGF-23.

“FGF активност” означава например, спомагане на зарастването на рани; промотиране на невралното преживявяне; стимулиране на клетъчната пролиферация, например, пролиферация на стволови клетки, фибробласти, неврони, глия, олигодедрити, клетки на Schwann, или на тяхни родителски клетки; модулиране на клетъчната диференциация; индуциране на ембрионалното развитие; стимулиране на невритния продукт; засилване на възстановяването от нервно или неврално нараняване; стимулиране на миелинизирването; стимулиране на ангиогенезата; рецептор свързваща активност; модулиране на туморигенезата, и др.

“FGF-специфична имуногенна активност” означава например, че един FGF полипептид предизвиква имунологичен отговор, който е селективен за FGF, например, имунологичен отговор, който е селективен за FGF-20 на бозайници. Следователно, стимулирането на антитела,

Т-клетки, макрофаги, В-клетки, дендритни клетки, и други, от аминокиселинна последователност, избрана от FGF на бозайници, например, FGF от фигури 1 и 2, е специфична имуногенна активност. Този отговор може да се измери рутинно.

FGF, като FGF-20 или -23 е полипептид на бозайник в пълната си дължина, който притежава аминокиселинна последователност, която се получава от природен източник, и която притежава една или повече от горе-посочените активности. Той може да притежава последователности, както посочените на фигури 1 и 2, като притежава отворена рамка на разчитане, която започва с кодон за инициране и завършва със стоп кодон. Той включва една естествено срещана в природата нормална, една естествено срещана в природата мутантна и естествено срещана в природата полиморфна, включително единичен нуклеотиден полиморфизъм (SNP), и т.н., последователност. Естественият източник включва, например, жими клетки, например, получени от тъкани или цели организми, културални клетъчни линии, включително първични и имортализирани клетъчни линии, тъкани от биопсии и т.н.

Насатоящото изобретение се отнася, също така, до фрагменти на FGF от бозайници. Фрагментите са, за предпочитане, "биологичноактивни". Под "биологичноактивни" се има предвид, че полипептидният фрагмент притежава активност в жива система или с компоненти на жива система. Биологичните активности включват тези, вече споменати, например FGF-активност, като FGF-рецептор свързваща активност, и FGF-имуногенна активност. Фрагменти могат да

се получат съгласно който и да е желан метод, включително химичен синтез, генно инженерство, продукти на разпадане и др. Биологичен фрагмент на FGF включва полипептиди, които притежават аминокиселинни последователности, отстранени или модифицирани или карбокси- или в аминокиселинния терминал на протеина.

Който и да е, известен на обществеността, фрагмент нуклеинова киселина и фрагмент на полипептид на FGF-20 и на FGF-23, или на тяхни хомоложни фрагменти, се изключват от настоящото изобретение, например, g5762262, което е подобна последователност, идентифицирана от *Xenopus laevis*. Нуклеотидните и аминокиселинните последователности на достъпните, публикувани аминокиселинни последователности могат да се идентифицират чрез търсене в достъпни за обществото бази данни.

Настоящото изобретение се отнася, също така до FGF-20, който притежава изведена последователност на аминокиселини 1 до 211, както е посочено на фигура 1, и FGF-23, който притежава изведена последователност на аминокиселини 1 до 169, както е посочено на фигура 2. FGF-20 има предполагаемо молекулно тегло от приблизително 23,5 kDa и предполагаемо pI от приблизително 9,25. FGF-23 има предполагаемо молекулно тегло от приблизително 19,6 kDa и предполагаемо pI от приблизително 12,32.

За протеините, степен на идентичност означава известен брой идентични аминокиселини/общия брой аминокиселинни остатъци в протеина. Степен на идентичност означава (известен брой идентични аминокиселинни остатъци плюс известен брой консервативно заместен аминокиселини (като V

за L, и т.н.) /общия брой аминокиселинни остатъци. За идентичността на ДНК е същото, както подобността и означава брой идентични нуклеотиди /общата дължина.

FGF полипептид от изобретението, например, който притежава имуногенна активност, както посочената на фигури 1 и 2, може да бъде анализиран чрез който и да е подходящ метод за идентифициране на други структурни и/или функционални домени в полипептида, включително, области, разпростиращи се на повърхността на мембраната, хидрофобни области. Например, FGF полипептид може да се анализира чрез методи, описани в, например, Kyte and Doolittle, Mol. Bio., 157:105, 1982; EMBL Protein Predict; Rost and Sander, Proteins, 19:55-72, 1994.

Други хомолози на FGF-и от настоящото изобретение могат да се получат от източници бозайници и не-бозайници, съгласно многобройни методи. Например, хибридизиране с олигонуклеотиди, произлезли от фигури 1 и 2, могат да се използват за избор на хомолози, например, както е описано в Sambrook et al., Molecular Cloning, Chapter 11, 1989. такива хомолози могат да притежават варираща степен на идентичност и подобност на нуклеотидна и аминокиселинна последователности към GENE. Организмите бозайници включват, например, гризачи, мишки, хамстери, маймуни, прасета, крави и т.н. Организмите не-бозайници включват, например, гръбначни, безгръбначни, риба зебра, пилета, *Drosophila*, *C. elegans*, *Xenopus*, дрожди, като *S. pombe*, *S. cerevisiae*, кръгли червеи, прокариоти, растения, вируси *Arabidopsis*, *artemia* и т.н.

Изобретението се отнася, също така, до FGF-специфични аминокиселинни последователности, например, дефинирана аминокиселинна последователност, която се открива в определената последователност от фигури 1 и 2, консервативни аминокиселинни мотиви, открити в FGF-и от настоящото изобретение. Сравнения между свързаните протеини, като други свързани FGF-и (виж например, Venkataraman et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 96:3658-3663, 1999), могаат да се използват за избор на специфични за FGF-и последователности.

Например, протеиновите последователности на FGF-20 и FGF23 са линейаризирани, и се генерират аминокиселинните мотиви на основата на консервативни области на хомоложност, както е посочено на фигури 1 и 2. Настоящото изобретение се отнася до която и да е последователност на нуклеинова киселина или на полипептид, например, полипептиди, които включват три или повече консервативни или хомоложни остатъци, като например, LYGS, HFLP, VQGTR, RIEENGHNTY, QFEENWYNTY, AGTPSA, AAERSA, и т.н. други специфични и/или консервативни аминокиселинни последователности могат рутинно да се открият, например, чрез търсене на ген/протеин база данни, при използване на BLAST комплект за компютърна програма. Една FGF-специфична аминокиселинна последователност или мотив може да е полезен за продуциране на пептиди, като антигени за генериране на имунен отговор, специфичен към него. Антителата, получени чрез такова имунизирание могат да се използват, като специфична проба за FGF протеин от базайник за диагностични или изследователски цели.

Както е споменато, полипептидите от настоящото изобретение могат да включват различни аминокиселинни последователности за FGF (например, последователност в пълна дължина, т.е., притежаваща стартовкодон и стоп кодон, както е показано на фигури 1 и 2, зряла аминокиселинна последователност (т.е., където FGF полипептидът се продубира като предшественик, който се преработва в зрял полипептид, или негов фрагмент). Полезните фрагменти включват, например, фрагменти, съдържащи или състоящи се по същество от, който и да е от горе-посочените домени и специфични и консервативни аминокиселинни последователности.

Фрагмент на FGF полипептид от настоящото изобретение може да се избира да притежава специфична биологична активност, например, FGF рецептор-свързваща активност или имуногенна активност.

Измерването на тези активности е описано по-долу и в примерите за изпълнение на изобретението. Тези пептиди могат, също така, да се идентифицират и да се получат, както е описано в EP 496 162. един полезен фрагмент може да съдържа, или да се състои по същество от, например, приблизително девет съседни аминокиселини, за предпочтание приблизително 10, 15, 20, 30, 40, и т.н., съседни аминокиселини от фигури 1 и 2.

Полипептидът от настоящото изобретение може, също така, да има 100% или по-малко аминокиселинна идентичност за аминокиселинните последователности посочени на фигури 1 и 2. за целите на следващото разглеждане: Идентичност на последователности означава, че същата нуклеотидна или

аминокиселинна последователността, която се открива в последователността, установена на фигури 1 и 2, си жткршво но съответната позиция в последователността, с коя(и)то се сравнява(т). Полипептид, който притежава по-малко от 100% идентичност на последователностите спрямо аминокиселинните последователности, посочени на фигури 1 и 2 може да съдържа различни замествания от естествено съществуващата в природата последователност, включително хомоложни и не-хомоложни аминокиселинни замествания. Виж по-долу за примери на хомоложни аминокиселинни замествания. Сумата от идентичните и хомоложните остатъци, разделена на общия брой остатъци в последователността спрямо която се сравнява FGF полипептида е равна на процента на подобност на последователностите. С цел да се изчисли идентичността и подобността на последователности, сравняваните последователности могат да се линеаризират и да се изчисли съгласно който и да е желан метод, алгоритъм, компютърна програма и т.н., включително, например, FASTA, BLAST. Полипептид, който притежава по-малко от 100% идентичност на последователностите спрямо аминокиселинните последователности от фигури 1 и 2 може да притежава приблизително 99%, 98%, 97%, 95%, 90,5%, 90%, 85%, 70% или толкова ниско, до 60% идентичност на последователностите.

Настоящото изобретение се отнася, също така, до мутеини на FGF полипептида на FGF-21 и FGF-23, т.е., полипептид, който има аминокиселинна последователност, която се отличава по аминокиселинна последователност от аминокиселинна последователността, която може да се получи

природен източник (фрагмент на FGF от бозайник не се различава по аминокиселинна последователност от естествено съществуващия в природата FGF, въпреки че се различава по брой на аминокиселини). Следователно, мутеини на FGF полипептида включват аминокиселинни замествания, инсерции, и делеции, включително не срещани естествено в природата аминокиселини.

Мутеини на FGF аминокиселинна последователност от изобретението могат, също така, да се получат на основата на търсене на хомоложност от база данни на генна банка, наапример, Genbank, EMBL. Търсенето на хомоложност на последователности може да се извърши при използване на различни методи, включително алгоритми, описани в BLAST семейството от компютърни програми, Smith-Waterman алгоритъм, и др. Мутеинът(ите) може да се въведе в последователност чрез идентифициране и линеаризиране на аминокиселините в домен, които са идентични и/или хомоложни между полипептиди и след това да се модифицира една аминокиселина, основана на такова линеаризиране. В действителност, FGF от настоящото изобретение споделя идентичност на последователности с различни известни FGFи, например, Venkataraman et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 96:3658-3663, 1999. Линеаризирането между тези полипептиди, по-специално при консервативните аминокисерлинни остатъци, идентифицирани в таблица 1 на Venkataraman et al., аминокиселинни замествания, могат да идентифицират остатъци, чиято модификация би се очаквало да редуцира, да намалява, или да елиминира биологичната активност на FGF, като рецептор-свързваща активност, и т.н.

В действителност, когато линеаризирането разкрива идентични аминокиселини запазени (консервирани) между два или повече домена, може да се очаква елиминиране или заместване на аминокиселината(ите), за да се въздейства противоположно на неговата биологична активност.

Аминокиселинното заместване може да се проведе чрез заместване на една хомоложна аминокиселина с друга. хомоложните аминокиселини могат да се идентифицират на основата на размера на страничната верига и степента на поларизация, включително, малки неполярни: цистеин, пролин, аланин, треонин; малки полярни: серин, глицин, аспартат, аспарагин; големи полярни: глутамат, глутамин, лизин, аргинин; междинна полярност: тирозин, хистидин, триптофан; големи неполярни: фенилаланин, метионин, левцин, изолевцин, валин. Хомоложните киселини могат, също така, да се групират както следва: незаредени полярни R групи, глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глутамин; кисели аминокиселини (негативно заредени), аспартатна киселина и глутаматна киселина; базични аминокиселини (положително заредени), лизин, аргинин, хистидин. Хомоложни аминокиселини включват, също така, тези описани от Dayhoff в Atlas of Protein Sequences and Structure 5, 1978 и от Argos в ЕПФД Тлр 8, 779-785, 1989.

Изобретението се отнася до мутеен на полипептиди и мутеин на нуклеинови киселини, кодиращи за такива полипептиди. Следователно, настоящото изобретение се отнася до нуклеотидни последователности от фигури 1 и 2, където посочените нуклеинови киселини кодират за

полипептид и една или повече аминокиселининни позиции са заместени или делетирани, или и двете, и кодиращият полипептид от нуклеиновите киселини притежава биологична активност, като усилване възстановяването от нерво или неврално нарушение. Мутеин на полипептид и съответстващите му нуклеотидни кодиращи последователности, може да притежава аминокиселинна последователност, както е показано на фигури 1 и 2, с изключение на това, че една или две позиции са заместени от хомоложни аминокиселини, например, където те са 1, 5, 10, 15 или 20 замествания. По какъв начин модификациите влияят върху посочените активности, се измерва съгласно горе-описаните методи, по-долу, и каквито познават специалистите в областа. Например, многобройни методи за изпитване на FGF активност са известни от предшестващото състояние на техниката, например, опити, които измерват преживяемостта на неврона и други невропатични активности, като описаните в примерите и от Kanda et al., *Int. J. Devl. Neuroscience*, 12(3): 191-200, 1999, и FGF рецептор-свързваща активност.

Както е споменато, аминокиселинните замествания могат, също така, да се осъществят на основата на аналогия със свързани други FGF-и. Други мутации могат да се подберат рутинно чрез модифициране или мутиране на нуклеотидна последователност от фигури 1 и 2, и селектиране на тези мутации, които засягат една или повече от неговите активности, например, чрез измерване на активността съгласно методите и примерите, описани по-долу.

FGF от бозайник от настоящото изобретение, негови фрагменти или заместен полипептид могат да включват, също

така, многобройни модификации, като такива модификации включват модификация на липиди, метилиране, фосфорилиране, гликозилиране, ковалентни модификации (например, на R-група на аминокиселина), замествания на аминокиселини, делетиране на аминокиселини или прибавяне на аминокиселини. Модификации на полипептида могат да се осъществят съгласно многобройни методи, включително рекомбинантни, синтетични, химични, и т.н.

Полипептиди от настоящото изобретение (например, в пълна дължина, тяхни фрагменти, тяхни мутации и др.) могат да се използват по многобройни начини, например, при изследвания, като имуногени за антитела, както е описано по-долу, като биологичноактивни средства (например, които притежават една или повече активности асоциирани с FGF от настоящото изобретение).

Полипептид, който кодира за FGF от настоящото изобретение, негово производно или негов фрагмент, може да се комбинира с един или повече структурни домени, функционални домени, откриваеми домени, антигенни домени, и/или желан полипептид представляващ интерес, при едно подреждане, което не се среща в природата, т.е., не е естествено срещано. Полипептид, включващ такива характеристики е химерен или слят полипептид. Един такъв химерен полипептид може да се получи съгласно многобройни методи, включително, химични, синтетични, полусинтетични и/или рекомбинантни методи. Химерна нуклеинова киселина, кодираща за химерен полипептид може да съдържа различните домени или желани полипептид в непрекаската (например, с множество N-терминални домени за

стабилизиране или засилване на активността) или прекъсната отворена рамка на разчитане, например, която да съдържа интрони, сайтове на снаждане, енхансери и др. химерната нуклеинова киселина може да се получи съгласно многобройни методи. Виж, например, патент на САЩ № 5,439,819. Домен или желан полипептид може да притежава която и да е желана способност, включително, биологична функция, като подаване на сигнал, спомагане на растежа, клетъчно насочване (например, сигнална последователност, насочваща последователност, като насочване към ендоплазматичния ретикулум или ядрото), и т.н., структурна функция, като хидрофобност, хидрофилност, мембрана-разпростиране, и др., комбинирано с ензим, флуоресцентен полипептид, зелен флуоресцентен протеин, (Chalifie et al., Science, 263:802, 1994; Cheng et al., Nature Biotechnology, 14:606, 1996; Levy et al., Nature Biotechnology, 14:610, 1996), и т.н. В допълнение, полипептид или негова част, може да се използва като селекционен маркер, когато се въведе в клетка-гостоприемник. Например, нуклеинова киселина, кодираща за една аминокиселинна последователност съгласно настоящото изобретение може да се слее в рамка към желана кодираща последователност и да действа като tag за целите на пречистване, селекция, маркиране. Областта на сбиване може да кодира сайт на разцепване, за улесняване експресията, изолирането, пречистването и т.н.

Полипептид, съгласно настоящото изобретение може да се получи в експресионна система, например, *in vitro*, *in vivo*, безклетъчно, рекомбинантно, клетъчно сливане, и др., съгласно настоящото изобретение. Модификации на

полипептида, придадени от такива системи включват гликозилиране, аминокиселинно заместване (например, чрез разннобразяване на използването на кодони), преработване на полипептида, като смилане, разцепване или екзопептидазна активност, прикрепяне на химични части, включително липиди и фосфати, и др.

Полипептид съгласно настоящото изобретение може да се извлече от естествени източници, трансформирани клетки гостопримници (културална среда и клетки) съгласно обичайните методи, включително, екстрахиране с детергент (например, не-йонен детергент, Triton X-100, CHAPS, октилглюкозид, Igepal CA-630), преципитация с амониев сулфат или с етанолн, киселинна екстракция, анионно или катионно обменна хроматография, фосфоцелулозна хроматография, хроматография на хидрофобно взаимодействие, хидроксипатитна хроматография, лектинова хроматография, гел електрофореза. етапите на пренагъване на протеина могат да се използват, при необходимост, при завършване на зрелия протеин. Накрая, високоефективна течна хроматография (BETX) може да се използва за етапа на пречистване. FGF полепептид може, също така, да се изолира, както е описано за други FGF протеини, както е известно на специалистите в областта, например, както е описано в следното, в което се описва изолирането на различни FGF-и, патент на САЩ № 5,604,923; 5,395,765; 5,155,214; 4,902,782 и Santos-Ocampo et al., J. Biol. Chem., 271:1726-1731, 1996 (пречистване на FGF от гостоприемник бактерия, като E. coli). Друг подход е да се експресира FGF рекомбинантно с афинитентна tag (Flag епитоп, -HA епитоп,

тус епитоп, 6xHis, малтоза-свързващ протеин, хитиназа, и т.н.), с последващо пречистване чрез анти-tag антительо-конюгирана афинитетна хроматография.

Настоящото изобретение се отнася, също така, до нуклеинови киселини, като ДНК и РНК, кодиращи за FGF полипептиди, и тяхни фрагменти, от настоящото изобретение. FGF нуклеинова киселина (като FGF-20 или -23), или нейни фрагменти е нуклеинова киселина, която притежава нуклеотидна последователност, която може да се получи от естествен източник. Тя включва, следователно, естествено срещани в природата, нормални, естествено срещани в природата мутантни, и естествено срещани в природата полиморфни алели (например, SNPs) и др. Естествените източници включват, например, живи клетки, получени от тъкани и цели организми, тумори, култивирани клетъчни линии, включително първични и имортализирани клетъчни линии.

Последователност на нуклеинови киселини от изобретението може да включва пълната кодираща последователност, както е показано на фигури 1 и 2, тяхната последователност в разпад и нейни фрагмент. Нуклеинова киселина, съгласно настоящото изобретение може да включва, също така, нуклеинова последователност, която е 100% комплементарна, например, анти-сенс, спрямо който и да е нуклеотид споменат по-горе или по-долу.

Нуклеинова киселина, съгласно настоящото изобретение, може да се получи от голям брой различни източници. Тя може да се получи от ДНК или РНК, като полиаденилирана иРНК, например, изолирана от тъкани,

клетки или цял организъм. Нуклеиновата киселина може да се получи директно от ДНК или РНК, или от сДНК библиотека. Нуклеиновата киселина може да се получи от клетка или тъкан (например, клетки от сърце на ембрион или на възрастен или скелетни клетки или тъканни) в определен етап на развитие, притежаващи желан генотип, фенотип и т.н.

Както е описано по-горе за FGF полипептида, нуклеинова киселина, съдържаща нуклеотидна последователност, кодираща за полипептид съгласно настоящото изобретение може да включва единствено кодираща последователност; кодираща последователност и допълнителна кодираща последователност (например, кодираща за лидерен, секреторен, насочващ, ензимен, флуоресцентен или други диагностични пептиди), кодиращи последователности и не кодиращи последователности, например, нетранслирани последователност или в 3' или в 5' края, или разпръснати в кодиращата последователност, например, интрони. Нуклеинова киселина, съдържаща нуклеотидна последователност, кодираща без прекъсване за полипептид означава, че нуклеотидната последователност съдържа аминокиселинна кодираща последователност за FGF, с не кодиращи нуклеотиди прекъсващи или взимащи участие в кодиращата последователност, например, липсващ(и) интрон(и). Такава нуклеотидна последователност може да се опише, също така, като съседна. Геномна ДНК, кодираща за FGF ген на човек, мишка или друг бозайник и т.н., може да се получи рутинно. нуклеинова киселина съгласно настоящото изобретение може да съдържа контролираща експресията последователност, операционно свързана към нуклеинова

киселина, както е описано по-горе. Изразът "последователност контролираща експресията" означава последователност на нуклеинова киселина, която регулира експресията на полипептида, кодиран от нуклеинова киселина, към която е операционно свързан. Експресията може да се регулира на нивото на иРНК или на пептида. Следователно, последователността контролираща експресията включва иРНК-свързани елементи и протеин-свързани елементи- такива елементи включват промотори, енхансери (вирусни или клетъчни), последователност за свързване на рибозомата, терминатори на транскрипцията и др. Последователност контролираща експресията е операционно свързана към последователност нуклеотидна кодираща последователност, когато последователността контролираща експресията е позиционирана така, че да влияе върху или да осъществява експресия на кодиращата последователност. Например, когато промотор е операционно свързан в 5' към кодираща последователност, експресията на кодиращата последователност се насочва от промотора. Последователността контролираща експресията може да е хетероложна или ендогенна за нормалния ген.

Нуклеинова киселина, съгласно настоящото изобретение може да се избере на основата на хибридизацията на нуклеиновите киселини. Способността на препарати на две еденоверижни нуклеинови киселини да хибридизират една с друга е измерение на комплементарността на тяхните последователности, например, сдвояване на бази (образуване на базови двойки) между нуклеотиди, както А-Т, G-C и т.н. Следователно, изобретението се отнася, също така, до

нуклеинови киселини и до тяхните комплементи, които хибридизират към нуклеинови киселини, включващи нуклеотидна последователност, както е посочено на фигури 1 и 2. Нуклеотидна последователност, която хибридизира с последната последователност има комплементарна верига на нуклеинова киселина, или действа, като матрица за някой в присъствие на полимераза (т.е., подходящ ензим за синтез на нуклеинова киселина). Настоящото изобретение включва и двете вериги на нуклеинова киселина, например, сенсверигата и анти-сенс веригата.

Условията на хибридизацията могат да се подберат за избор на нуклеинови киселини, които да имат желано количество на комплементарност на нуклеотиди с нуклеотидна последователност, както е посочено на фигури 1 и 2. Нуклеинова киселина, способна да хибридизира към такава последователност, за предпочитане има, например, приблизително 85%, по-предпочитано 90%, и най-предпочитано 95%, 97% или 100% комплементарност между последователностите. Настоящото изобретение се отнася по-специално до последователности на нуклеинови киселини, които хибридизират към нуклеотидни последователности, както е посочено на фигури 1 и 2. при слаби или високи условия на строгост.

Нуклеиновите киселини, които хибридизират към FGF последователности могат да се изберат по различни начини. Например, блот (т.е., матрица, съдържаща нуклеинова киселина), chip пространства, и други матрици, съдържащи нуклеинови киселини, представляващи интерес, могат да се инкубират в разтвор за хибридизиране (6 x SSC, 0,5% SDS,

100 $\mu\text{g/ml}$ денатурирана ДНК от сперма на съомга , 5 х разтвор на Denhart и 50% формаамид) при 30°C през цялата нощ, с последващо хибридизиране с проба на откриваеми олигонуклеотиди, (виж по-долу) в разтвор за хибридизиране (6 х SSC, 0,5% SDS, 100 $\mu\text{g/ml}$ денатурирана ДНК от сперма на съомга , 5 х разтвор на Denhart и 50% формаамид) при 42°C през цялата нощ, съгласно известни процедури. Блотовете (петната) могат да се промият при условия на висока строгост, които позволяват, например, по-малко от 5% бр грешка (наапример, промиване двукратно с 0,1% SSC и 0,1% SDS за 30 минути при 65°C), т.е., избиране на последователности, които притежават 95% или повече на идентичност на последователности. Друг, неограничаващ пример за условия на висока строгост включва крайно промиване при 65°C във воден буфар, съдържащ 10 mM NaCl и 0,5% SDS. Друг пример за условия на висока строгост е хибридизиране в 7% SDS, 0,5 M NaPO_4 , pH 7,1 mM EDTA при 50°C, например, цяла нощ, следвано от едно или повече промивания с 1% SDS при 42°C.

Докато промиванията при висока строгост позволяват по-малко от 5% грешка, условия на по-мека строгост или на ниска строгост (например, двукратно промиване в 0,2%SSC и 0,5% SDS за 30 минути при 37°C) може да позволи до 20% грешка. Друг неограничаващ пример на условия на ниска строгост включва крайно промиване при 42°C във бюфер, съдържащ 30 mM NaCl и 0,5% SDS. Промиването и хибридизирането могат да се осъществят, също така, както е описано в Sambrook et al., Molecular Cloning, 1989, Chapter 9.

Хибридизирането може да се базира, също така, върху изчисляването на температурата на топене (T_m) на образувания хибрид между пробата и нейната мишена, както е описано в Sambrook et al. Обикновено, T_m температурата, при която къс олигонуклеотид (съдържащ 18 нуклеотида или по-малко) ще се разтопи от неговата последователност-цел се дава чрез следното уравнение: $T_m = (\text{брой на А-та и Т-та}) \times 2^\circ\text{C} + (\text{брой на С-та и G-та}) \times 4^\circ\text{C}$. За по-дълги молекули, $T_m = 81,5 + 16,61 \log_{10} [\text{Na}^+] + 0,41(\%GC) - 600/N$, където $[\text{Na}^+]$ е моларната концентрация на натриеви йони, $\%GC$ е процента на GC базови двойки в проба, а N е дължината. Хибридизацията може да се осъществи на няколко градуса под тази температура, за да се осигури пробата и целта да могат да хибридизират. Грешките биха могли да се позволят чрез намаляване на температурата даже повече.

Могат да се изберат условия на строгост за изолиране на последователности и тяхните комплументи, които имат, например, на-малко 95%, за предпочитане 97% комплементарност на нуклеотиди между пробата (например, един олигонуклеотид на FGF и нуклеинова киселина мишена).

Съгласно настоящото изобретение, нуклеинова киселина или полипептид може да съдържа един или повече различни нуклеотидни или аминокиселинни последователности, показани на фигури 1 и 2. Промяната или модифицирането на нуклеотидна и/или аминокиселинна последователност може да се осъществи чрез който и да е възможен метод, включително насочен или случаен мутагенез.

Нуклеинова киселина, която кодира за FGF на бозайник, като FGF-20 или -23, съгласно изобретението, може да

включва нуклеотиди, които се срещат в естествено срещани в природата гени, например, естествено срещани в природата полиморфизми, нормални или мутантни алели (нуклеотид или аминокиселина), мутации, които се откриват в естествено срещани в природата популации на бозайници, като хора, маймуни, прасета, мишки, плъхове или зайци. Например, човешка нуклеинова киселина или полипептид включва нуклеотиди или аминокиселини, които се срещат в естествено срещана в природата човешка популация. Под термина естествено срещан в природата се разбира, че нуклеиновата киселина се получава от природен източник, например, животински тъкани и клетки, телесни течности, тъканни клетъчни култури, съдебно-медицински проби. Естествено срещани в природата мутации могат да включват делеции (например, съкратен amino- или карбокси край), замествания, инверсии или прибавяне на нуклеотидна последователност. Тези гени могат да се открият и да се изолират чрез хибридизиране на нуклеинови киселини, съгласно методи, които са извесни на специалистите в областта. Нуклеинова последователност, която кодира за FGF на бозайник може да съдържа кодони, открити в естествено срещан в природата ген, транскрипт или сДНК, например, както е посочено на фигури 1 и 2, или може да съдържа кодони от разпада на генетичния код, които кодират за същите аминокиселинни последователности. В действителност, може да се окаже желателно да се променят кодоните в последователността, за да се оптимизира последователността за експресиране в желания гостоприемник.

Нуклеинова киселина, съгласно настоящото изобретение, може да включва например, ДНК, РНК, синтетична нуклеинова киселина, пептид нуклеинова киселина, модифицирани нуклеотиди или смеси. ДНК-а може да е двuverижна или еднoverижна. Нуклеотиди, които включват нуклеинова киселина могат да се присъединят чрез различни известни начини за прикрепяне), например, естер, сулфамид, фосфоротиоат, фосфорамидат,, метилфосфонат, карбамат, и др. според желаната цел за постигане, например, резистентност на нуклеази, като РНаза H, подобрена *in vivo* стабилност, и т.н. Виж например, патент на САЩ № 5,378,825.

Многобройни модификации могат да се осъществят върху нуклеиновите киселини, като прикрепяне на откриваеми маркери (авидин, биотин, радиоактивни елементи), частици, които подобряват хибридизацията, откриването или стабилността. Нуклеиновите киселини могат да бъдат, също така, прикрепени към твърди подложки, например, нитроцелулоза, магнитни или парамагнитни микросфери (например, както е описано в патент на САЩ № 5,411,863; САЩ № 5,543,289, съдържащи феромагнитни, супермагнитни, поромагнитни, суперпарамагнитни, железен оксид и пализахарид), найлон, агароза, диазотизирана целулоза, твърди латексови микросфери, пориакриламиди, и др., съгласно един желан четод. Виж например, патенти на САЩ № 5,470,967; 5,476,925; 5,478,893.

Един друг аспект на настоящото изобретение се отнася до олигонуклеотиди или проби на нуклеинови киселини. Такива олигонуклеотиди или проби нуклеинови киселини могат да се използват, например, за откриване, или

изолиране на FGF нуклеинова киселина от бозайници в тестова проба, или за идентифициране на FGF хомолози. При един предпочитан вариант за изпълнение на изобретението, нуклеиновите киселини могат да се използват, като олигонуклеотидни проби, например при PCR, диференцирано изображение, генни chips (например, Affymetrix GeneChips; U.S. Pat. No 5,143,854; U.S. Pat. No 5,424,186; U.S. Pat. No 5,874,219; PCT WO 92/10092; PCT WO 90/15070;), и други достъпни методи. Откриването може да е желателно по многобройни различни причини, включително за изследвания, диагностициране и съдебна медицина. За диагностични цели може да е желателно да се идентифицира наличието или количеството на последователност на нуклеинова киселина в проба, когато пробата се получава от тъкан, клетки, телесни течности и др. При един предпочитан метод, настоящото изобретение се отнася до метод за откриване на нуклеинова киселина, като включва привеждането в контакт на нуклеинова киселина мишена в тест-проба с олигонуклеотид, при условия, ефективни за постигане на хибридизация между мишената и олигонуклеотида; и до откриване на хибридизация.

Един олигонуклеотид, в съответствие с изобретението може, също така, да се използва при синтетичното амплифициране на нуклеинова киселина, като PCR (например Saiki et al., Science, 241:53, 1988; U.S. Pat. No 4,683,202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al., eds., Academic Press, New York, 1990); диференциално изображение (виж например, Liang et al., Nucl. Acad. Res., 21:3269-3275; U.S. Pat. No 5,599,672; WO 97/18454).

Откриването може да се проведе в комбинация с олигонуклеотиди за други гени, например, гени включени в трансдукцията на сигнали, растежа, рак, апоптоза, или който и да е от гените, цитирани по-горе, или по-долу. Олигонуклеотидите могат, също така, да се използват за тестване на мутации, например, при използване на технология за поправане на ДНК грешки, както е описано в U.S. Pat. No 5,683,877; U.S. Pat. No 5,656,430; Wu et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 89:8779-8783, 1992.

Олигонуклеотидите от настоящото изобретение могат да включват която и да е непрекъсната нуклеотидна последователност от фигури 1 и 2 или нейн комплемент, или който от последователностите или неините комплементи. Тези олигонуклеотиди (нуклеинови киселини), съгласно настоящото изобретение, могат да са с какъвто и да е желан размер, например, приблизително 10-200 нуклеотида, 12-100, за предпочитане 12-50, 12-25, 14-16, най-малко приблизително 15, най-малко приблизително 20, най-малко приблизително 25, и т.н. олигонуклеотидите могат да притежават нуклеотиди, не срещани естествено в природата, например, инозин, AZT, 3TC, и др. Олигонуклеотидите могат да притежават 100% идентичност или комплементарност с последователностите от фигури 1 и 2, или да има грешки или замествания на нуклеотиди, например, 1, 2, 3, 4, или 5 замествания. например, олигонуклеотидите могат да притежават 70-99% идентичност, например 90, 95 или 97% идентичност с последователностите от фигури 1 и 2. съгласно настоящото изобретение, олигонуклеотидът може да включва набор, при което наборът съдържа желан буфер (например,

фосфатен, tris и др.), състави за откриване, и др. Олигонуклеотидът може да е маркиран или да не е маркиран, с радиоактивни или нерадиоактивни маркери, както е известно от предшестващото състояние на техниката.

Друг аспект на настоящото изобретение е нуклеотидна последователност, която е уникална за FGF на бозайници. Под уникална последователност се има предвид определено подреждане на нуклеотиди, който се срещат в FGF, например, нуклеотидни последователности от фигури 1 и 2, но рядко или не често, при други нуклеинови киселини, по-специално не в животинска нуклеинова киселина, за предпочитане бозайник, като човек, плъх, мишка и др. уникална нуклеинова последователност включва последователностите, или тяхните комплементи, кодиращи за аминокиселини, както са посочени на 1 и 2 и на фигури 1 и 2. Такива последователности могат да се използват като проби в който и да е от методите, описани в настоящото, или да се инкорпорират като справка. Включват се и двете, сенс и антисенс нуклеотидните последователности. Уникална нуклеинова киселина съгласно настоящото изобретение може да се определи рутинно. Нуклеинова киселина, която притежава такава уникална последователност може да се използва като проба за хибриздизиране за идентифициране наличието на, например, FGF от човек или от мишка, в проба, съдържаща смес от нуклеинови киселини, например, Northern blot. Хибридизирането може да се осъществи при много стори условия (виж по-горе), за да се изберат нуклеинови киселини (и тяхните комплементи, които могат да съдържат кодиращата последователност), които притежават най-малко 95%

идентичност (т.е., комплементарност) към пробата, но по-меки условия могат да се използват, също така. Уникална FGF нуклеотидна последователност също може да е слята в рамка, или в нейния 5' или 3' край, към различни нуклеотидни последователности, както е споменато в патента, включително кодиращи последователности за други участъци на FGF, ензими, GFP, и др., последователности за контрол на експресията и др.

Както вече бе обсъждано, хибридизирането може да се проведе при различни условия, сдпоред желаната селективност, например, както е описано в Sambrook et al., Molecular Cloning, 1989. например, за специалното откриване на FGF от настоящото изобретение, един олигонуклеотид може да се хибридизира към нуклеинова киселина мишена, при условия, при които олигонуклеотидът единствено се хибридизира с него, например, когато олигонуклеотидът е 100% комплементарен на мишената. Могат да се използват различни условия, ако това е желателно за избора на нуклеинова киселина мишена, която да има най-малко 100% комплементарност на нуклеотидите, най-малко приблизително, например, 99%, 97%, 95%, 90%, 86,4%, 85%, 70%, 67%.

Нуклеиновата киселина, съгласно настоящото изобретение, може да се маркира в съответствие с който и да е желан метод. Нуклеиновата киселина може да се маркира при използване на радиоактивни маркери, като ^{32}P , ^{33}S , ^{125}I , ^3H или ^{14}C , за да се споменат някои често използвани маркери. Радиоактивното белязване може да се проведе съгласно който и да е метод, като например, терминално

белязване на 3' или 5' края, при използване на радиобелязан нуклеотид, полинуклеотид киназа (със или без дефосфорилиране с фосфатаза) или лигаза (според края, който трябва да се маркира). Може да се използва, също така, и не-радиоактивно белязване, като се комбинира нуклеинова киселина от настоящото изобретение с остатъци, притежаващи имунологични свойства (антигени, хептени), специфичен афинитет към някои реагенти (лиганди), свойства, позволяващи откриваемите ензимни реакции да се завършат (ензими или коензими, ензимни субстрати, или други вещества, въвлечени в една ензимна реакция), или характерни физични свойства, като флуоресценция или емисия (излъчване) или абсорбция на светлина с желана дължина на вълната, и др.

Нуклеинова киселина, съгласно настоящото изобретение, включително олигонуклеотиди, антисенс нуклеинови киселини, и др., могат да се използват за откриване на експресия на FGF в цели органи, тъкани, клетки, др., чрез различни техники, включително Northern blot, PCR, *in situ* хибридизиране, диференциално изображение, области на нуклеинови киселини, дот-блот (точкова напаване), и др. Такива нуклеинови киселини могат да бъдат изключително полезни за откриване на нарушена експресия, например, клетъчно специфични и/или субклетъчни изменения, на FGF. Нивата на FGF могат да се определят самостоятелно или в комбинация с други генни продукти, по-специално други генни продукти, включени в невралната физиология.

Нуклеинова киселина, съгласно настоящото изобретение може да се експресира в голямо разнообразие от различни

системи, *in vitro* и *in vivo*, съгласно желаното предназначение. Например, нуклеинова киселина може да се инсерири в експресионен вектор, въведен в желания гостоприемник, и да се култивира при условия, ефективни за постигането на експресия на полипептид, кодиран от нуклеиновата киселина. Ефективните условия включват което и да е културално условие, което е подходящо за постигане на продукция на полипептида от клетката гостоприемник, включително ефективни температури, рН, среда, добавки към средата, в която се култивира клетката гостоприемник (например, добавки, които ампибифицират или индуцират експресията, като бутират, или метотрексат, ако кодиращата нуклеинова киселина е съседна на *dhfr* гена), иклохексимид, клетъчни плътности, културални съдове, и др. Нуклеинова киселина може да се въведе в клеткътъ чрез който и да е ефективен метод, например, оголена ДНК, калциево фосфатно утаяване, електропорация, инжектиране, DEAD-Dextran медирано трансфекция, сливане с липозоми, асоцииране със средства, които усилват неговото приемане от клетките, вирусна трансфекция. Клетка, в която е въведена нуклеинова киселина, съгласно настоящото изобретение, е трансформирана клетка гостоприемник. Нуклеиновата киселина може да е екстрахромозомална или интегрирана в хромозома(и) на клетката гостоприемник. Може да е стабилен или преходен експресионен вектор се избира за неговата съвместимост с клетката гостоприемник. Клетките гостоприемник включват клетки на бозайници, например, COS, CV1, ВНК, CHO, HeLa, LTK, NIH 3T3, 293, PAE, човешки, мовешки фибробласти, човешки първични туморни клетки,

тестиси, глия,, неврони, олигодендрити, глия, невробластома, глиома, и др. клетки от насекоми, като Sf9 (*S. frugipeda*) и *Drosophila*, бактерии, като *E. coli*, *Streptococcus*, *bacillus*, дрожди, като *Sachaeomyces*, *S. cerevisiae*, клетки от гъби, растителни клетки, стволони клетки на ембриони (например, от бозайници, като мишка или човек), невронни стволони клетки, фибробласти, мускулни клетки, и Т-клетки.

Последователностите за контрол на експресията се избират подобно за съвместимост с гостоприемника и за желаната цел, например, голям брой копия, големи количества, индукция, амплифициране, контролирана експресия. Други последователности, които могат да се използват включват енхансери, като от SV40, CMV, RSV, индуцируеми промотори, елементи специфични за типа клетки, или последователности, които позволяват селективна или специфична клетъчна експресия. Промотори, които могат да се използват за насочване на неговата експресия включват, например, ендеогенни промотори, промотори от други гени в клетъчния биосинтетичен път за трансдукция на сигнали, MMTV, SV40, *trp*, *lac*, *tac*, или T7 промотори за бактериални гостоприемници; или алфа фактор, алкохол оксидаза, или PGH промотори за дрожди. РНК промотори могат да се използват за продуциране на РНК транскрипти, като T7 или SP6. Виж например, Melton et al., *Nucleic Acid Res.*, 12(18):7035-7056, 1984; Dunn and Studier, *J. Mol. Bio.*, 166:477-435p 1984; U.S. Pat. No. 5,891,636; Studier et al., *Gene Expression Technology, Methods in Enzymology*, 85:60-89, 1987.

Нуклеинова киселина или полипептид от настоящото изобретение може да се използва като маркер за размер при

електрофореза, хроматография и др. на нуклеинови киселини или протеини. Дефинираните рестрикционни фрагменти могат да се определят чрез сканиране на последователността за рестрикционни сайтове, изчисление на размера, и получаване на съответния продукт на рестрикционно смилане.

FGF полипептидът и нуклеиновата киселина от настоящото изобретение могат да се "изолират". Под термина "изолиран" се има предвид, че са под форма, която не се открива в нейната естествена заобикаляща среда или в природата, например, по-концентрирана, по-пречистена, отделена от други компоненти, присъстваща в лизат на клетка, в която се експресира хетероложен FGF ген. Когато FGF се експресира като хетероложен ген в трансфектирана клетъчна линия, ген, в съответстви с настоящото изобретение, се въвежда в клетка, както е описано по-горе, при условия, при които генът се експресира.терминът "хетероложен" означава, че генът е бил въведен в клетъчната линия чрез "човешка ръка".въвеждането на ген в клетъчна линия е разгледано по-горе. Трансфектираната (или трансформирана) клетка, експресираща FGF ген, може да се лизира, както е описано в примерите за изпълнение на изобретението и да се използва в метода, като лизат (т.е., "изолат") или клетъчната линия може да се използва интактна.

Обикновено, терминът "ефективни условия" означава например, среда, в която се постига желания ефект.такава среда включва, например, буфери, окисляващи средства, редуциращи средства, рН, со-фактори, температури, концентрация на йони, подходяща възраст и/или състояние на клетките (като, определен етап от клетъчния цикъл, или

определен етоп, когато се експресират определени ген), когато се използват клетки, културални условия (включително, субстрат, кислород, въглероден диоксид, и др.).

За да се усили стабилността, приложената нуклеинова киселина може да се модифицира, например, за да се направи резистентна на клетъчните ензими, на окисление, на редукция, на нуклеази и др., или за да усили нейното приемане в клетките. Може да се използва която и да е подходяща модификация, включително например, фосфоротиоати, метилфосфонати, фосфодиестерен олигонуклеотид прикрепен към акридин интеркалиращо средство и/или хидрофобна опашка, производно на псорален, 2'-робозни модификации, производни на пентозни захари, производни на азотни бази, и др. Виж например, U.S. Pat. No. 5,576,208 и U.S. Pat. No. 5,744,362. Виж по-горе други производни, модификации и др., които могат да са полезни за изобретението. Най-общо, една антисенс нуклеинова киселина, съгласно настоящото изобретение, може да включва мономери на естествено съществуващи в природата нуклеотиди, не-естествено съществуващи в природата нуклеотиди, и тяхни комбинации за усиление на клетъчното приемане и/или стабилност.

Антисенс може да се приложи като оголена нуклеинова киселина, в комплекс със или инкапсулирана със и от други средства, които улесняват нейното приемане в клетката, при инжектиране в клетки, или който и да е подходящ начин за доставяне.

Настоящото изобретение се отнася, също така, до методи за използване на FGF от настоящото изобретение,

като FGF-20 или FGF23. Такива методи включват прилагане на ефективно количества FGF или нуклеинова киселина, кодираща FGF съгласно настоящото изобретение, върху гостоприемник, за една или повече от следните цели: спомагане преживяването и/или пролиферацията, например, на неврони, олигодентдрити, клетки на Schwann, стволни клетки, по-специално неврални стволни клетки, ендотелни клетки, кератиноцити, и който и да е клетъчен тип, който е способен да отговаря на FGF-20 или FGF23, например, клетки, които експресират познатия рецептор (като FGFR 1-4) върху тяхните клетъчни повърхности, или техни родителски клетки; спомагане заздравяването на рани; модолиране диференциацията на клетките; индуциране на ембрионалното развитие; стимулиране на невритния продукт; усиление на възстановяването на нервни или неврални нарушения; стимулиране на процеса на миелинизация; стимулиране на ангиогенезата; рецептор-свързваща активност.

Настоящото изобретение се отнася, също така, до индикациите и методите за използване на FGF, съгласно настоящото изобретение, като FGF-20 и FGF-23, или нуклеинова киселина, кодираща FGF. Такива методи включват прилагане на ефективно количество FGF, съгласно настоящото изобретение, върху гостоприемника, поради една или повече от следните причини: усиление на възстановяването от нервно и аксонно нараняване; стимулиране на процеса на миелинизация, ангиогенеза, заздравяване на рани, заздравяване на язви, индуциране възстановяването на дефекти по костите, спомагане на преживяването на присадък и индуциране на ембрионалното

развити. Гореспоменатите приложения се явяват като резултат от потенциална FGF активност, спомагане на клетъчното преживяване и/или пролиферация, инхибиране и/или стимулиране на диференциацията на някои типове клетки. FGF може да индуцира клетъчното преживяване/пролиферация на стволовите клетки, родителски, предшественици и зряли клетки от следния произход: неврони, олигодендрити, клетки на Schwann, ендотелни клетки, кератиноцити и други типове клетки, които експресират който и да е от FGF рецепторите. Освен това, FGF-ите могат да индуцират диференциацията на новронните родителски клетки чрез индуциране на невритен продукт/разпространение.

Следващите *in vivo* и *in vitro* изследвания могат да се осъществят с цел да се измери активността на FGF-ите спрямо горе-описаните клетъчни функции:

In vitro ИЗСЛЕДВАНИЯ:

- Индуциране на олигодендроцитна пролиферация *in vitro*: Олигодендроцити, използвани за измерване на ефектите на GF върху клетъчната пролиферация са или установени клетъчни линии, като N 20.1 или първични олигодендроцити от гризачи. Първични олигодендроцит от гризачи (плъхове) и родителски олигодендроцити могат да се изолират и да се пречистят чрез една от следните техники: диференциална адхезионна техника (Mitrovic et al., 1994); центрофугиране в градиент на Percol (Mattera et al., Neurochem. Int. 1984, 6(1) 41-50 и Kim et al., J. Neurol Sci 1983 Dec:62(1-3):295-301) и имуносепарация. Без значение от източника на

олигодендроцитните клетки (първични клетки или клетъчна линия) или от методите на тяхното изолиране и пречистване, опитите за олигодендроцитната пролиферация могат да се проведат за период от време от 3, 5 и 7 дни. позитивните контроли са други членове на FGF семейството, като FGF-20 или FGF-23. клетъчната пролиферация се измерва като MTT изследване и изследване за ^3H -тимидин инкорпориране. Виж, също така, изследванията за олигодендроцитна пролиферация в Danilenko, et al., Arch Biochem Biophys. 1999 Jan 1; 361(1):34-46.

- Индуциране на невритен растеж продукт: PC 12 изследвания: Нови членове на FGF семейството могат да се тестват за индуциране на диференциация и невритния продукт в PC-12 клетъчна линия (произлизаща от плъши феохромоцитомен тумор) (Rydel, 1987 Greene, 1976). Допълнително, тъй като е показано за участък от NGF индуциран отговор, че се дължи на автокринното NGF-индуцирано производство на FGF-2, могат да се разгледат ефектите от нови FGF-и върху горното регулиране на NGF производството чрез PC 12 клетки (Chevet et al., J. Biol. Chem. 1999 Jul 23; 274(3): 20901-8).

Невритен продукт в ганглий на гръбно коренче (DRG): DRG се изолират чрез дисекция на DRG от фетус на плъх и се култивират в невробазална среда; разпространение на продукта на неврита в DRGs се изследва визуално и количествено чрез определяне на броя и дължината на невритите, като се сравняват с нетретирани контроли.

Изследванията могат да се осъществят върху клетки с фибробластен и ендотилен произход. За фибробластите може да се използва модификация на NIH 3T3 изследване на

пролиферация. За определяне ефектите на FGFs върху индукцията на ендотелна клетъчна пролиферация могат да се използват следните клетки: HUVEC клетки, микроваскуларни ендотелни клетки и аортни ендотелни клетки. Едно *in vitro* изследване, релевантно за определяне на терапевтичния потенциал на FGFs, като потенциално терапевтично средство за лечение на рани, язви или костни нарушения може да се проведе, както е описано в литературата.

Други изследвания, които са в корелация с регенерирането на ЦНС включват активиране на генната експресия (Meiners et al., Dev Biol. 1993 Dec:160(2): 480-93) свързана с растежа или с преживяването, на модолирането на други растежни фактори (Yoshida, 1992), на модулирането на невронна електрофизиология (Terlau, 1990), на активността на митогени върху диференциращите фактори за олигодендроцити, клетки на Schwann или астроцити (Genburger, 1987; Stemple, 1988; Kalcheim, Dev Biol. 1989 Jul:134(1):1-10; Murphy, 1990), на спомагането на *in vitro* преживяемост на кортикални, хипокампадни, моторни, сензорни, симпатикови, или парасимпатикови неврони (Eckstein, 1994; Unsicker, et al., Ann N.Y. Acad Sci. 1991:638:300-5; Groth, et al. Int J Dev Biol. 1996 Feb:40(1):403-10), на спомагането на преживяването на моторен неврон *in vitro*, или други подобни.

In vivo ИЗСЛЕДВАНИЯ:

- Потенциал на ремиелинизирание на нови FGFs може да се разгледа, например, при следващия модел: а) животински модели с дефицит на миелин, като трансплантация на SVZ

клетки от животно донор, третирано с FGF в мишки с дефицит на миелин и измерване на разпространението на олигодендроцити *in vivo*; b) животински модели с демиелинизация, като PLT индуцирани CR-EAE и MBP основен трансфер, индуцирани CR-EAE. Виж, също така изследванията, описани в Gumpel, 1992 и Hinks, et al., *Mol Cell Neurosci.* 1999 Aug;14(2):153-68.

- FGFs могат да се тестват за тяхната способност да индуцират неврорегенерация невропротекция при следните *in vivo* модели: механични нарушения/наранявания (напречен разрез на fimbria fornix биосинтетичен път, седалищния нерв, гръбначен мозък, оптичен невр и напречен разрез на DRG); модели на невронно нараняване, дължащи се на цереброваскуларен инсулт, като запушване на каротидната артерия, временно MCAO запушване и хипокси-исхемичен церебрален инсулт; и при химически индуцирана невродегенерация, дължаща се на MPTP индуцирани лезии или KA индуцирани атаки.

Типични *in vivo* изследвания включват, например, измерване на редуцирането на невронна загуба след хипокампадна исхемия (Sasaki, 1992; MacMillan, et al., *Can J Neuro Sci* Feb;20(1): 37-40, спомагане на преживяването на кортикалните неврони, следващо perforant path лезии (Gomez-Pinilla, 1992; Peterson, et al., *J. Neurosci.* 1996 Feb 1;16(3): 886-98), предпазване на базалните предните холинергични неврони от наранявания, индуцирани от дегенерация и редукция на MPTP-индуцирани или лезия-индуцирани на субстанция нигра неврони (Anderson, et al., *Nature* 1998 Mar 24;332(6162):360-1; Otto, 1989; Gomez-Pinilla, 1992; Otto, 1990);

и дълговременен растеж на нервни родителски клетки *in vitro* като "невросфери" (преглед в Svendsen, et al., Trends Neurosci. 1999 Aug;22(8):357-64. виж, също така, използването на модели за травматичен инсулт, като напречен разрез на оптичния нерв (Silvers, 1987); напречен разрез на седалищен нерв (Cordeiro, et al., Plast Reconstr. 1989 June;83(6): 1013-9; Khouri, et al., Microsurgery 1989;10(3): 206-9), напречен разрез на DRG (Aebischer, et al., J. Neurosci. Res. 1989 Jul. 23 (3):282-9), напречен разрез на гръбначен мозък (Cheng, et al., Science 1996 Jul 26;273 (5274):510-3 1996) и смазване на фациален нерв (Kuzis 1990); използването на модели за цереброваскуларен инсулт, като хипоксимичен-исхемичен церебрален инсулт (MacMillan, 1993) и MCA запушване (Kawamata, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997 Jul 22;94(15): 8179-84; Schabitz, 1999); и други невродегенеративни модели, като лечение с кианова киселина (KA) (Liu, et al/. Brain Res 1993 Oct 29;6261(1-2):355-8) или MND в треперища мишка (Ikeda, et al., Neurol Res. 1995 Dec;17(6): 445-8).

Под термина "прилагане" се разбира, че FGF, кодираща FGF нуклеинова киселина, или друго активно средство се предоставя на мишената, например, наранената, увредената тъкан, и др. FGF може да се прилага на която и да е мишена (например, *in vivo*, *in vitro*, или *in situ*), включително и клетки в култура и гостоприемници, които имат увреждания, състояние, или заболяване, което трябва да се лекува по ефективен начин, подходящ за постигане на ефект, както е описан по-горе, например, лекарствена форма на FGF може да се приложи чрез енжектиране директно във или близо до сайта

мишена. може, също така, да се приложи топологично (на определено място), изцуло, парентерално, интравенозно, интрамускулно, подкожно, орално, назално, интрацеребрално, интравентрикулярно, интрацистернално, интракраниално, да се имплантира на желано място, например, под формата на гелообразна пана, водач на нерв от колагенови нишки, и др, според локализирането на сайта мишена, който трябва да се лекува. FGF може, също така, да се прилага непрекъснато, при използване на осмотична помпа. Един FGF може да се прилага също, като нуклеинова киселина за примане от клетки. методи за прилагане на нуклеинова киселина включват тези, описани по-горе, и други конвенционни от нивото на техниката техники.

Ефективно количество FGF се прилага върху мишената. Ефективни количества са такива количества, които се използват за постигане на желания ефект, за предпочитане благоприятен или терапевтичен ефект. Таково количество може да се определи рутинно, например, чрез провеждане на доза-отговор експеримент, при който са прилагат вариращи дози върху клетки мишени, за определяне ефективното количество за постигане на желаната цел, например, стимулиране на невритния растеж или спомагане на невралното преживяване. Количествата се избират на основата на различни фактори, включително средата, към която се прилага FGF (например, пациент с нараняване на мозака, животински модел, тъканни клетъчни култури, и др.), сайта на клетките, които трябва да се третират, възраста, пола, и теглото на пациента или животното, което трябва да се лекува, и др.

При един аспект, настоящото изобретение се отнася до методи за лечение на неврални увреждания, като увреждане на нерв и травми, увреждане на гръбначен мозък и травми, увреждане на нервна тъкан, получено чрез, например исхемична атака, инфаркт, хеморагия, и аневризма; лечение на нервни заболявания, например, заболявания на дегенерация на нерви, като болест на Alzheimer, болест на Parkinson, болест на Huntington, мултиплена склероза, миелопатия, миелитис, и сирингомиелия, и др., включващо прилагане на ефективно количество FGF от настоящото изобретение.

FGFs от настоящото изобретение могат да се използват за лечение на нервна дегенеративни и демиелинизиращи заболявания на ЦНС и ПНС, характеризирани се с разрушаване на неврони и олигодендроцити. FGF може да се използва, като ремиелинизиращ терапевтик за Мултиплена Склероза и други първични и/или вторични демиелинизиращи заболявания на ЦНС или ПНС. Първични демиелинизиращи заболявания на ЦНС включват адренолевкодистрофия, левкоенцефалопатии (като, прогресивна мултифокусна левкоенцефалопатия), енцефаломиелит (като остър десиминиран перивенозен енкафаломиелит). Вторична демиелинизация на ЦНС се представя, като образуване на демиелинизиращи лезии на ЦНС травми, токсичност (цианид, хексахлорфан) или исхемия (удар). Демиелинизиращи заболявания на ПНС включват първични нарушения, като Синдром на Guillain-Barre (GBS), парапротеинемии, Хронична Заразна Демиелинизираща Полиневропатия (CIDP). Допълнително, FGF се използва и за лечение на

невродегенеративни заболявания на ЦНС и ПНС, където невронното увреждане се дължи на нараняване/травма (механично, химично, цереброваскуларен инсулт и дължащ се на заразна инфекция и автоимунен отговор) и за лечение на други невродегенеративни заболявания.

FGFs от настоящото изобретение може, също така, да се използва за спомагане на преживяване на присадък. Например, FGF може да се използва за спомагане на преживяването на присадки (например, алогенни, изогенни или автогенни) на голямо разнообразие от клетки, тъкани или органи, като кожа, фасции, сухожилия, кости, бъбреци, корния, или други подобни. Трансплантите на клетки върху ЦНС или ПНС на клетки с невронен, глиен или стволков произход също се обхващат от изобретението. Присаденият материал може да се получи от естествени източници или чрез *in vitro* разпространение на клетки или тъкан, които да се присадат или чрез използване на диференцирани или недиференцирани столови клетки. Под терминът "спомагане" се разбира да са засили преживяемостта и/или пролиферацията на присадените клетки, тъкани или органи, които са лекувани с FGF, в сравнение с клетки, тъкани или органи, които не са лекувани по този начин. Методите за изпитване за преживяемост на присадъци са конвенционни.

Изследванията за измерване на преживяемостта на присадките са рутинни и са добре известни на специалистите в областта. Конвенционално *in vitro* изследване включва, например, MTT, MTS, Thy инкорпориране, жива/мъртва клетка изследване (например, двойно оцветяване с калцеин АМ и етидиев хомодимер.EthD-1), измерване на общ брой на

клетки, например, чрез използване на микроскопско отчитане или чрез физични методи на преброяване на клетки, като използване на броячи на кръвни клетки. Конвенционни *in vivo* методи включват, например, за индикации на ЦНС, откриване подобрена неврологична функция, или техники на изобрезяване, като MTR, MRS, CT или MRI, със или без Gd усилване.

Други състояния, които могат да се лекуват, в съответствие с настоящото изобретение включват предпазване от увреждания на миокарда, дължащи се на MI, индикация за ангиогенеза, зарастване на рани, зарастване на язви, предпазване от разрушаване на кости и индикация за новообразуване на кости, спомагане преживуемост на присъдки и индуциране на ембрионално развитие.

Действията на FGF, които са полезни при лечението на горе-посочените заболявания/състояния включват: спомагане на клетъчното преживяване и/или пролиферация, инхибиране и/или стимулиране на диференциацията на следващите типове клетки: индукция на клетъчното преживяване/пролиферация на стволови клетки, родителски, предшественици и зряли клетки от следния произход: неврони, олигодендрити, клетки на Schwann, ендотелни клетки, кератиноцити, остеобласти и други типове клетки, експресиращи който и да е от FGF рецепторите. В допълнение, действията на FGF върху индуцирането на диференциацията на невронни родителски клетки чрез индуциране на невритен продукт/разпространение се считат полезни при лечението на какъвто и да е вид невронно нараняване/увреждане.

Под терминът "лечение" се разбира, че резултатите при подорението на увреждането или заболяването, като спомагане на преживяването на невроните, на глията, на олигодендритите, астроцитите, клетките на Schwann, и др., стимулират невритния продукт, като стимулират миелинизацията, стимулират пролиферацията на клетки, и др., както е посочено по-горе. За лечението на такива увреждания и заболявания, FGF може да се приведе в лекарствена форма, като състав, или нуклеинова киселина, и да се приложи върху увредения или болен участък, например, при използване на хирургични техники.

FGFs от изобретението могат, също така, да се прилагат за който и да е метод на лечение¹ описани в настоящото, чрез прилагане на нуклеинова киселина, например, при методите на генна терапия. Носителят за доставяне на гени може да е от вирусен произход (виж най-общо Jollyq Cancer Gene Therapy 1:51-64 (1994) Kimura, Human Gene Therapy 5:845-852 (1994); Connelly, Human Gene Therapy 1:185-193 (1995); и Kaplit, Nature Genetics 6:148-153 (1994). Носителите, при генна терапия, за доставяне на структури включващи кодираща последователност на терапевтичното средство от изобретението могат да се прилагат или локално или систематично. Тези структури могат да използват вирусни или невирусни векторни подходи. Експресията на такива кодиращи последователности може да е или конструктивна или регулирана.

Настоящото изобретение може да използва рекомбинантни ретровируси, които се конструират, така че да пренасят избрани молекули на нуклеинови киселини,

представляващи интерес. Ретровирусни вектори, които могат да се използват включват, тези описани в EP 0 415 731; WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25234; U.S. Patent No. 5,219,740; WO 93/11230; WO 93/10218; Vile and Hart, Cancer Res. 53:3860-3864 (1993); Vile and Hart, Cancer Res. 53:962-967 (1993); Ram, et al., Cancer Res. 53:83-88 (1993); Takamiya et al., J. Neurosci. Res. 33:493-503 (1992); Baba et al., J. Neurosurg. 79:729-735 (1993); U.S. Patent No. 4,777,127; GB Patent No. 2,200,651; и EP 0 345 242. предпочитани рекомбинантни ретровируси включват, тези които са описани в WO 91/02805.

Пакетирането на клетъчни линии, подходящи за използване с горе-описаните ретровирусни векторни структури могат лесно да се приготвят (виж PCT публикации WO 95/30765 и WO 92/05266, и да се използват за създаване на продуциращи клетъчни линии (наричат се също векторни клетъчни линии) за пролучаването на частици на рекомбинантни вектори. Измежду най-предпочитаните варианти за изпълнение на изобретението, пакетиращите клетъчни линии са получени от човешки (като, HT1080 клетки) или от родителски клетъчни линии на норка, като по този начин се позволява продуцирането на лесомбинантни ретровируси, които могат преживяват инактивирането в човешки серум.

Настоящото изобретение използва, също така, вектори, базирани на алфавирус, които могат да действат като носители за доставяне на гени. Такива вектори могат да се конструират от див тип алфавируси, включително, например, вектори от Sindbis вирус, Sdemliki горски вирус (ATCC VR-1247), Ross River вирус (ATCC VR-373); ATCC VR-1246 и Venezuelan вирус на конския енцефалит (ATCC VR-923; ATCC

VR-1250; ATCC VR-532). Представителни примери за такива векторни системи включват тези, описани в U.S. Patent No. 5,091,309; 5,217,879; и 5,185,440; и PCT публикация № WO 92/10578; WO 94/21792; WO 95/27069 и WO 95/07994.

Носителите за доставяне на гени от настоящото изобретение могат да използват, също така, парвовируси, като адено-асоциирани вирусни (AAV) вектори. Представителни примери включват AAV вектори, описани от Srivastava в WO 93/09239, Samulski et al., J. Vir. 63:3822-3828 (1989); Mendelson et al., Virol. 166:154-165 (1988); и Flotte et al., P.N.A.S. 90:10613-10617 (1993).

Представителни примери за аденовирусни вектори включват тези, описани от Berkner, Biotechniques 6:616-627 (1988); Rosenfeld et al., Science 252:431-434 (1991); WO 93/19191; Kolls et al., P.N.A.S. 215-219 (1994); Kaas-Eisler et al., P.N.A.S. 90:11498-11502 (1993); Guzman et al., Circulation 88:2838-2848 (1993); Guzman et al., Cir. Res. 73:1202-1207 (1993); Zabner et al., Cell 75:207-216 (1993); Li et al., Hum. Gene Ther. 4:403-409 (1993); Cailaud et al., Eur. J. Neurosci. 5:1287-1291 (1993); Vincent et al., Nat. Genet. 5:130-134 (1993); Jaffe et al., Nat. Genet. 1:372-378 (1992); и Levero et al., Gene 101:195-202 (1992). Примерни аденовирусни вектори за генна терапия, които се използват в настоящото изобретение включват, също така, тези описани в WO 94/12549; WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 и WO 95/00655. Може да се използва прилагане на ДНК свързана към убити аденовируси, както е описано в Curiel, Hum. Gene. Ther. 3:147-154 (1992).

Могат да се използват и други носители за доставяне на гени и методи, включително поликатионна кондензирана ДНК свързана или несвързана към убити аденовируси само, например, Curiel, Hum. Gene. Ther. 3:147-154 (1992); прикрепена към лиганда ДНК, например, виж Wu, J. Biol. Chem., 264:16985-16987 (1989); еукариотни клетки носители за клетъчно доставяне, например, виж U.S. патентован номер No. 08/404,796; отлагане на фотополимеризирани хидрогелни материали; пистолет за ръчен трансфер на генни частици, както е описано в U.S. Patent No. 5,149,655; йонизираща радиация, както е описано в U.S. Patent No. 5,206,152 и в WO 92/11033; неутрализиране на ядрения заряд или сливане с клетъчни мембрани. Допълнителни подходи са описани в Mol. Cell. Biol. 14:2411-2418 (1994) и Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci., 91:1581-1585, (1994).

Може да се използва също и оголена ДНК. Примери за въвеждане на оголена ДНК са описани в WO 90/11092 и U.S. Patent No. 5,580,859. Ефикасността на приема може да се подобри чрез използване на биоразлагащи се латексови перли. Покрити с ДНК латексови перли се транспортират ефикасно в клетките след инициране на ендоцитоза от перлите. Методът може още да се подобри чрез третиране на перлите, за увеличаване хидрофобността и по този начин да се улесни разкъсването на ендозома и освобождаване на ДНК-ата в цитоплазмата. Липозоми, които могат да действат като носители за доставяне на гени са описани в U.S. Patent No. 5,422,120, PCT публикация № WO 95/13796, WO 94/23697 и WO 91/14445, и EP № 0 524 968.

Други подходящи за използване невирусни системи за доставяне включват механични системи за доставяне, като подхода, описан в Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(24):1581-1585, (1994). Освен това, кодиращата последователност и продукта на експресията като такъв могат да се доставят чрез отлагане на фотополимеризирани хидрогелни материали. Други конвенционални методи за доставяне на гени, които могат да се използват за доставяне на кодиращи последователности включват, например, използване на пистолет за ръчен трансфер на генни частици, както е описано в U.S. Patent No. 5,149,655; използване на йонизираща радиация за активиране на трансферируания ген, както е описано в U.S. Patent No. 5,206,152 и в WO 92/11033.

Настоящото изобретение се отнася, също така, до метод за стимулиране на клетъчна пролиферация, който се състои от прилагане на ефективно количество FGF-5 (например, Kanda et al., по-горе) FGF-20 или FGF-23, или на техни биологично активни фрагменти. Под израза "стимулиране на клетъчна пролиферация" се разбира, че приложения FGF води до клетъчно делене или митоза. FGF може да се приложи под каквато и да е ефективна форма (нуклеинова киселина или полипептид) върху който и да е подходящ гостоприемник.

В действителност, при един вариант за изпълнение на изобретението, методът се използва за идентифициране на агонисти и антагонисти на FGF. При такива случаи може да е полезно да се приложи FGF върху клетъчни линии, включително установени и първични клетки, като мотоневрони от гръбначен мозък. Установените линии включват, например, която и да е от линиите, съхранени в American Tissue Culture

Collection (atcc.org) включително, например, DBTRG-05MG, PFSK-1, MSTO-21H, NCI-H378, NCI-N417, NCI-H526, HCN-1A, HCN-2, CATH.a, NG108-15, NCI-H209, NCJ-H146, HCI-H82, NCI-H345, NCI-H510A, D283 Med, D341 Med, C6, IMR-32, Neuro-2a, NB41a3, BCH1, A172, Mpf, T98g[T98-G], SCP, CCF-STTG1, DI TNC1, CTX TNA2, PG-4 (S+L-), G355-5, SW 598 [SQ-598; SW598], C6/LacZ, 9L/lacZ, N1E-115, SH-SY5Y, BE(2)-M17, BE(2)-C, MC-IXC, SK-N-BE(2), CHP-212, C6/lacZ7, MO59K, MO59J, F98, RG2[D74]; NCI-H250, NCI-H1915, QA1, TE615QT, SVG p12, TE671 подлиния № 2, MBr Cl 1Q SK-N-MC, SW 1088 [SW-1088; SW1088], SW 1783 [SW-1783; SW1783], U-87 MG, U-118 MG, U-138 MG, MDA-MB-361, DU 145, Hs 683, H4, 293, PC-12, P19, NTERA-2 cl.D1[NT2/D1], BCE C/D-1b, SK-N-AS, SK-N-FI, SK-N-DZ, SK-NSH, Daoy, за предпочитане, N20.1 клетки.

Предполагаеми агонисти и антагонисти на FGF могат да се прилагат *in vitro* върху клетки, на които е бил прилаган FGF, както клетъчните линии, описани по-горе, или предполагаемите средства могат да се прилагат *in vitro* или *in vivo*, върху клетки, които естествено продуцират FGF. Агонистичните или антагонистичните действия на такива средства могат да се измерят по който и да е от признатите от състоянието на техниката изследвания, като тези, описани навсякаде в настоящото.

Неврални стволони клетки могат да се стимулират, също така, да пролифират чрез FGF от настоящото изобретение. Получените клетки могат да се използват като източник на нервни клетки за обратано трансплантиране в същия пациент, от когото произлизат (т.е., автоложно), като се отстраняват класическите проблеми асоциирани с алогенното

трансплантиране, като отхвърлянето.следователно, методът на настоящото изобретение се отнася до прилагане на такова количество FGF, ефективно за стимулиране на пролиферация и диференциация на неврни стволови клетки, и обратно трансплантиране на посочените клетки.

Настоящото изобретение се отнася, също така, до аантитела, които специфично разпознават FGF от настоящото изобретение. Антитяло, специфично за FGF означава, че антитялото разпознава дефинирана последователност аминокиселини, във или включващи FGF, например, последователност от фигури 1 и 2. Следователно, специфичното антитяло най-често ще се свържи с по-голям афинитет към авинокиселинна последователност, т.е., епитоп, открита на фигури 1 и 2, отколкото към различен(и) епитоп(и), наапример, открит и/или измерен чрез изследване с имуноблотинг или друго конвенционално имуноизследване. По този начин, антитялото, което е специфично за един епитоп на човешки FGF-21 е полузно за откриване присъствието на епитоп в проба, например, тъканна проба, съдържаща човешки FGF-21 генен продукт, като го отличава от проби, в които епитопът липсва.такива антитела са полезни, както е описано от Santa Cruz Biotechnolohy, Inc., Research Product Catalig, и може да се приведе в лекарствена форма в съответствие.

Антитела, например, поликлонални, моноклонални, рекомбинантни, химерни, хуманизирани, могат да се получат съгласно който и да е желан метод. Виж, също така, скрининг библиотеките на рекомбинантни имуноглобулини (например, Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 86:3833-3837, 1989; Huse

et al., Science, 256:1275-1281, 1989); in vitro стимулиране на лимфоцитни популации; Winter and Milstein, Nature, 349:293-299, 1991. например, за получаването на моноклонални антитела, един полипептид, съгласно фигури 1 и 2, може да се приложи върху мишки, кози, или зайци подкожно и/или интраперитонеално, със или без помощно средство, в количество достатъчно да предизвика имунен отговор. Антителата могат, също така, да са с единична верига или FAB фрагменти. Антителата могат да са IgM, IgG, подтипове IgG2a, IgG1, и др. антителата и имунните отговори могат също да се генерират чрез прилагане на оголена ДНК, виж например, U.S. Patent No. 5,703,055; U.S. Patent No. 5,589,466; U.S. Patent No. 5,580,859.

FGF или негов фрагмент, за използване при индуцирането на антитела, не се нуждае от това да притежава биологична активност; въпреки това, те трябва да притежават имуногенна активност, било то самостоятелно или в комбинация с носител. Пептиди за използване при индуцирането на FGF-специфични антитела могат да притежават една аминокиселинна последователност, състояща се от най-малко пет аминокиселини, за предпочитане най-малко 10 аминокиселини. Къси разтеглени форми на FGF аминокиселини, например, пет аминокиселини, могат да се слоят с тези, на друг протеин, като хемоцианин от keyhole limpet, или друг полезен носител, и химерната молекула, използвана за получаване на антитела. Области на FGF, полезни за получаване на антитела, могат да се избират емпирично, или например, аминокиселинна последователност от GENE, както е изведено от сДНК-та,

може да се анализира, за да се определят областите на висока имуногенност. Анализът за избор на подходящи епитопи е описан, например, от Aubel FM et al., (1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol 2, John Wiley & Sons).

Полезни последователности за генериране на антитела включват линеаризираните последователности, показани на фигури 1 и 2. Антителата за такива последователности могат да се използват за да се отличават различните транскрипти на FGF. Виж по-горе.

Определени FGF антитела са полезни за диагностицирането на предпатологични състояния, и хронични или остри заболявания, които се характеризират чрез различия в количеството или разпределението на FGF. Диагностичните тестове за FGF включват методи, които използват антитялото и маркер за откриване на FGF в човешки (или миши, и др., ако се използва мишка) телесни течности, тъкани или екстракти от такива тъкани.

Полипептидът и антителата от настоящото изобретение могат да се използват със или без модификации. Често, полипептидите и антителата се маркират, като се присъединяват било то ковалентно или нековалентно, към вещество, което предоставя откриваем сигнал. Голямо разнообразие от маркери и техники на присъединяване са известни и са предадени подробно и в двете, научната, както и патентната литература. Подходящи маркери включват радионуклеотиди, ензими, субстрати, кофактори, инхибитори, флуоресцентни средства, магнитни частици и други подобни. Патентни, които обясняват използването на такива маркери включват: U.S. Patent No. 3,817,837; U.S. Patent No. 3,850,752;

U.S. Patent No. 3,939,350; U.S. Patent No. 3,996,345; U.S. Patent No. 4,277,437; U.S. Patent No. 4,275,149; и U.S. Patent No. 4,366,241.

Антитела и други лиганди, които свързват FGF могат да се използват по нй-разнообразни начини, включително като терапевтични средства, диагностични средства, и инструменти за търговски изследвания, например, за количествено определяне на нивата на FGFполипептид при животни, тъкани, клетки, и др., за идентифициране на клетъчната локализация и/или разпределението му, за пречистването му, или полепептид, който съдържа част от него, за модулиране функциите му, при Western blots, ELISA, имуноутаяване, RIA, и др. Настоящото изобретение се отнася, също така, до такива изследвания, състави и комплекти, за провеждането им, и др. При използване на тези и на други методи, едно антитяло, съгласно настоящото изобретение, може да се използва за откриване на FGF полипептид или негов фрагмент в различни проби, включително тъкани, клетки, телесни течности, кръв, урина, цереброспинална течност.

В допълнение, лиганди, които се свързват към FGF полипептид, съгласно изобретението, или негови производни, също могат да се получат, например, при използване на пептидни библиотеки или аптамери (например, Pitrun et al., U.S. Patent No. 5,143,854; Geysen et al., J. Immunol. Methods, 102:259-274, 1987; Scott et al., Science, 249:386, 1990; Blackwell et al., Science, 250:1104, 1990; Tuerk et al., 1990, Science, 249:505.).

Настоящото изобретение се отнася също до един FGF полипептид, получен съгласно желан метод, например, както е

описано в U.S. Patent No. 5,434,050. маркиран полипептид може да се използва, например, при изследвания за свързване, за да се идентифицират веществата, които се свързват или се прикрепят към FGF, за да се проследи движението на FGF в клетките, при *in vitro*, *in vivo* или *in situ* система, и др.

Нуклеинова киселина, полипептид, антитяло, лиганда и др., съгласно настоящото изобретение, също могат да се изолират. Терминът "изолират" означава, че материалът е под форма, в която не се открива в неговата естествена среда или естество, например, по-концентриран, по-пречистен, отделен от други компоненти, и др. една изолирана нуклеинова киселина включва, например, нуклеинова киселина, която притежава последователността на FGF, отделена от хромозомалната ДНК, открита при живи животни, например, като пълния ген, транскрипт, или сДНК. Нуклеиновата киселина може да е част от вектор или да се инсерира в хромозома (чрез специфично генно-насочване или случайно интегриране в позиция, различна от нейната нормална позиция) и все пак да се изолира, въпреки че не е във форма, в която се намира в естесвената ѝ среда. Нуклеинова киселина или полипептид, съгласно настоящото изобретение, може да бъде пречистена по същество, също така. Под пречистена по същество се има предвид, че нуклеиновата киселина или полипептида се отделя и е свободен по същество от други нуклеинови киселини или полипептиди, т.е., нуклеиновата киселина или полипептидът е първична и активна съставка.

Настоящото изобретение се отнася, също така, до трансгенно животно, например, животно не-човек, като мишка, което съдържа FGF. Трансгенни животни могат да се получат съгласно известни методи, включително например, проядрено инжектиране на рекомбинантни гени в пронуклеите на 1-клетъчен ембрион, включващ изкуствен дрождев хромозом в ембрионални стволови клетки, методи на генно насочване, методология на ембрионални стволови клетки. Виж, например, U.S. Patent No. 4,736,866; U.S. Patent No. 4,873,316; U.S. Patent No. 5,082,779; U.S. Patent No. 5,304,489; U.S. Patent No. 5,175,385; U.S. Patent No. 5,221,778; Gordon et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 77:7380-7384, 1980; Palmiter et al., Cell, 41:343-345, 1985; Palmiter et al., Ann. Rev. Genet., 20:465-499, 1986; Askew et al., Mol. Cell. Biol., 13:4115-4124, 1993; Games et al., Nature, 373:523-527, 1995; Valancius and Smithies, Mol. Cell. Biol., 11:1402-1408, 1991; Stacy et al., Mol. Cell. Biol., 14:1009-1016, 1994; Hasty et al., Nature, 350:243-246, 1995; Rubinstein et al., Nucl. Acid Res., 21:2613-2617, 1993. нуклеинова киселина, съгласно настоящото изобретение, може да се въведе в което и да е животно бозайник не-човек, включително в мишка (Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1986), прасе (Hmmer et al., Nature, 315:343-345, 1985), овца (Hmmer et al., Nature, 315:343-345, 1985), добитък, плъх, или примат. Виж, също така, Churech, 1987, Trends in Biotech. 5:13-19; Clark et al., Trends in Biotech. 5:20-24; and DePamphilis et al., Biotechniques, 6:662-680, 1988). В допълнение, например, обикновено производство на трансгенен плъх е достъпно. Тези трансгенни животни могат

да са полезни животински модели за тестване на GENE функцията, като храна за змии, като генетичен маркер за откриване на щам за произход (т.е., когато един FGF-21, -23 или техни фрагменти са били инсерирани) и др. такива трансгенни животни включват, освен това, други трансгени. Трансгенните животни могат да се получат и да се използват съгласно който и да е подходящ метод.

За други аспекти на нуклеиновите киселини се прави литературна справка със стандартни наръчници за молекулярна биология. Виж, например, Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Sciences Publishing, Inc., New York, 1986; Hames et al., Nucleic Acid Hybridization, IL Press, 1985; Sambrook et al., Molecular Cloning, CHS Press, 1989; Howe, Gene Cloning and Manipulation, Cambridge University Press, 1995.

КРАТКО ОПИСАНИЕ НА ФИГУРИТЕ

Фигура 1 показва нуклеотидна и аминокиселинна последователност на FGF-20 (SEQ ID NOS. 1 и 2)

Фигура 2 показва нуклеотидна и аминокиселинна последователност на FGF-23 (SEQ ID NOS. 3 и 4)

Фигура 3 показва линейаризирана последователност на FGF-20 протеин с членове на известно FGF-семејство *xfgf-20* от *Xenopus laevis*.

Фигура 4 показва олигодендрокитна пролиферация. Фигура 1А показва пролиферацията на олигодендрокити. Фигура 1В показва, че активността е премахната чрез кипване на протеините.

Фигура 5 показва действието на FGF-20 върху N20.1 олигодендроцитна пролиферация.

Фигура 6 показва действието на FGFs върху пролиферацията на първични олигодендроцити от плъх (PRO). Фигура 6А показва клетки, третирани с FGF-2л фигура 6В показва клетки, третирани с FGF-20.

Фигура 7 показва действието на FGFs върху преживяемостта/пролиферацията на клетъчна линия от невронен произход. Фигура 7А показва действието на FGF-20. Фигура 7В показва действието на FGF-2, FGF-9 и FGF-20.

Фигура 8 показва невритния продукт. Култивирани PC12 клетки се третират в продължение на 6 дни с рекомбинантен FGF-20 плюс хепарин (ляв панел) или хепарин единствено (десен панел). Клетките се фиксират и се оцветяват за β III-тубулен, ядрата се изобразяват с 7-AAD. Невритният продукт се наблюдава в клетки единствено с хепарин.

Фигура 9 показва, че FGF-20 е силен фактор на преживяемост за кортикални неврони.

ПРИМЕРИ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

ПРИМЕР 1

Пролиферация и преживяемост на олигодендроцити:

Олигодендроцити, използвани за измерване на ефектите на растежни фактори (GF) върху клетъчната пролиферация са или установени клетъчни линии, като N20 или първични олигодендроцити на гризачи. Първични олигодендроцити на гризачи (плъх) и родителски олигодендроцити се изолират и пречистват чрез различнин техники на адхезия (Mitrovic, 1994) и градиент на Percol

(Mattera et al., Neurochem. Int. 1984, 6(1) 41-50 и Kim et al., J. Neurol Sci 1983 Dec;62(1-3):295-301). Изследванията за пролиферация на олигодендроцити се провеждат чрез посяване $2,5 \times 10^4$ клетки/ml в 96-ямкови блюда. Клетките се стимулират с растежни фактори за период от 3, 5 и 7 дни. Позитивни контроли са други членове на FGF семейството, като FGF-2 или FGF-9. Клетъчната пролиферация се измерва чрез МТТ изследване и изследване за включване на ^3H -тимидин.

Фигури 4, 5 и 6 показват, че FGF-20 стимулира пролиферацията на олигодендроцити на N20.1 олигодендроцитна клетъчна линия по начин отговарящ на времето и дозата. N20.1 клетките се третират с частично пречистени проби на хепарин на агарозна хроматография на FGF-20. пролиферацията се определя чрез МТТ оцветяване. FGF-20 индуцира пролиферацията на олигодендроцити (фигура 4A) и активността се премахва чрез кипване на протеина (фигура 4B).

Горните наблюдения се потвърждават чрез препарати на частично пречистен материал от хепарин и S колони (фигура 5). N20.1 клетки се третират с FGF-20 от хепарин или S колони. Клетките се инкубират с FGF-20 в продължение на 5 дни и увеличението в пролиферацията над нетретираната контрола се определя чрез МТТ оцветуване. FGF-9 се използва като положителна контрола, а като негативна контрола се използва подходящ съответстващ буфер (H и S). активността на частично пречистен материал е сравним с FGF-9.

Освен това, FGF-20 индуцира пролиферацията на първични олигодендроцити на плъх (фигура 6B). Олигодендроцитите се третират с FGF-2 (фигура 6A), и FGF-20 (фигура 6B). Клетките се инкубират с GFs в продължение на 3 дни и увеличаването на пролиферацията над нетретираната контрола се определя чрез МТТ оцветяване. Активността на частично пречистен материал е сравнима с FGF-2. FGF-20 е силен индуктор на пролиферация на олигодендроцити и неговата активност е сравнима с други членове на FGF семейството, като FGF-2 и FGF-9.

ПРИМЕР 2

Индуциране на нервната преживяемост:

Изследвания за нервната преживяемост се провеждат чрез посяване на $2,5 \times 10^4$ клетки/ml в 96-ямкови блюда в ниско серумна среда. При тези условия нервните клетки претърпяват апоптозис, дължащ се на оттеглянето на растежния фактор. Клетките се стимулират с растежни фактори за различен период от време в граници от 3 дни до 12 дни. Позитивни контроли са други членове на FGF семейството, като FGF-2 или FGF-9. Невната преживяемост се измерва чрез МТТ.

Фигури 7 и 9 показват, че FGF-20 е мощен фактор, който може да стимулира преживяемостта на клетките с неврален произход.

PC 12 клетки се посяват в 96-ямкови блюда в присъствие на среда с ниско съдържание на серум (1% Nu серум). Различни фактори, включително FGF-20 се добавят при концентрации в граници от 0,0025-2500 ngs/ml. 7 и 10 дни по-

късно се измерва относителна преживяемост чрез МТТ изследване, при сравнение с нетретирана контрола. Данни за FGF-20 са показани на фигура 7А, а за FGF-2, FGF-9 и FGF-20 на фигура 7В.

ПРИМЕР 3

Индуциране на невритния продукт

FGF-20 проявява активност върху продукта на PC 12 клетки. Тази активност не е зависима от NGF предварително третиране (виж таблици 1 и 2 и фигура 9).

Поведението на частично пречистен FGF-21 при това изследване е подобно на това, наблюдавано за FGF-9, с който е много подобен по последователност. В допълнение се сравняват активностите на различни членове на FGF семейството при индуцирането на продукта на PC 12 клетки (FGF-1, FGF-2, FGF-4, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9, FGF-10, FGF-16, FGF-17, FGF-18 – (виж таблица 2). Най-мощните FGFs при индуцирането на невритния продукт в тази система са FGF-2 и FGF-9 и FGF-20/21. За два FGFs, FGF-7 и FGF-10 е открито, че са неактивни при това изследване, без значение от присъствието или отсъствието на хепарин.

Първични кортикални неврони от ембрион на плъх се изолират от мозъци на ембриони на плъх (E16). Кортексът се дисектира под микроскоп и се промива 6-кратно с разтвор на Hanks и се разделя механично без ензиматично третиране. Нервите се култивират в среда, състояща се от следното: DMEM с прибавка на 10% конски серум, 15% FCS, 2 mM L-глутамин, HEPES буфер. След 14 часа, се прибавя коктейл от инхибитори, състоящ се от 10uM FdU и 1 uM цитозин

арабинозид за 3 дни, с цел де се инхибира пролиферацията на всички други типове клетки, с изключение на неврони. След 8 дни култивиране, невроните се събират и се посяват в 96-ямкови блюда в присъствие на ниско серумна среда (2% Nu серум). Прибавят се различни растежни фактори, включително FGF-20, в концентрация в граници от 0,0025-2500 ngs/ml. След 5 дн се измерва относителната преживяемост с MTT изследване и се сравнява с нетретирана контрола.

ТАБЛИЦА 1:

FGF-20 е мощно индуциращо средство на нервното разпространение в PC 12 клетки

PC 12 клетки се посяват и се третират, както в експериментите, показани на фигура 7. FGF-9 и FGF-20 се добавят в концентрация в граници от 0,0025-2500 ngs/ml. Седем и 12 дни след третирането, невритното разпространението се определя чрез оцветяване на клетките с Wriht багрило и последващ микроскопски оглед. Процентът на продукта представлява очаквания брой клетки с преработка.

Обобщението на наблюденията за индукцията на невритния продукт, в следствие на FGF-9 и FGF-20/21 третиране е показано по-долу. най-високата концентрация на частично пречистен материал е токсична за клетките, което действа както върху данните за преживяемостта (виж фигура 7B), така и върху невритния продукт (виж по-долу).

Невритен продукт в РС 12 клетки

GF	концентрация	% продукт	
	ngs/ml	7 дни	12 дни
FGF-9	0	0	0
	0,025	<5	5
	0,25	5	10-20
	2,5	5-10	20-30
	25	60	60
	250	90	100
	<u>2500</u>	<u>90-100</u>	<u>100</u>
FGF-21	0	0	0
	0,025	<5	5
	0,25	10	10
	2,5	20-30	30
	25	50	60
	250	90	80
	<u>2500</u>	<u>0</u>	<u>0</u>

ТАБЛИЦА 3

Невритен продукт – сравнение с различни членове на FGF семейството:

Култивирани PC 12 клетки се третират с FGFs и невритния продукт се брои визуално. FGF-20 е един от най-мощните тествани невротрофни членове на FGF семейството.

FGF прибавен:	отговор
FGF-1 (кисел FGF)	++
FGF-2 (основен FGF)	++++
FGF-4	+
FGF-6	+
FGF-7	-
FGF-8	++
FGF-9	+++
FGF-10	-
FGF-16	+
FGF-17	++
FGF-18	++
FGF-21	+++

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Използуване на FGF-20 за лечение на нараняване на гръбначен мозък; травма на гръбначен мозък; нараняване на нервна тъкан в следствие на исхемична атака, инфаркт, кръвоизлив или аневризма; болест на Huntington; миелопатия; миелитис; или сирингомиелия, чрез прилагане върху пациент с необходимост от това на ефективно количество FGF-20 полипептид или негов биологичноактивен фрагмент.

2. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 1, при което посоченият FGF-20 полипептид е човешки.

3. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 2, при което посоченият полипептид притежава FGF-20 специфична имуногенна активност.

4. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 1, при което посоченият полипептид включва аминокиселина 1 до аминокиселина 211, както е посочено на фигура 1.

5. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 1, при което посоченият полипептид притежава 95% идентичност на последователностите с аминокиселина 1 до аминокиселина 211 на човешки FGF-20, както е посочен на фигура 1, и където посоченият FGF-20 има FGF активност.

6. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 2, при което посоченият полипептид притежава 95% идентичност на последователностите с аминокиселина 1 до аминокиселина 211 на човешки FGF-20, както е посочен на фигура 1, и където посоченият FGF-20 има FGF активност.

7. Използуване на FGF-20 за лечение на нараняване на гръбначен мозък; травма на гръбначен мозък; нараняване на

нервна тъкан в следствие на исхемична атака, инфаркт, кръвоизлив или аневризма; болест на Huntington; миелопатия; миелитис; или сирингомиелия, чрез прилагане върху пациент с необходимост от това на ефективно количество нуклеинова киселина, имаща нуклеотидна последователност, кодираща за FGF-20 полипептид или за негов биологичноактивен фрагмент.

8. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 7, при което посочената нуклеотидна последователност е човешка.

9. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 8, при което посочената нуклеотидна последователност кодира без прекъсване за FGF-20.

10. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 7, при което посочената нуклеотидна последователност притежава 95% идентичност на последователностите с нуклеотидната последователност посочена на фигура 1.

11. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 8, при което посочената нуклеотидна последователност притежава 95% идентичност на последователностите с нуклеотидната последователност посочена на фигура 1.

12. Използуване на FGF-20 за лечение на надбъбречна левкодистрофия, прогресивна мултифокална левкоенцефалопатия, енцефаломиелит, синдром на Guillain-Barre, парапротеинемия или хронична заразна демиелинезираща полиневропатия, чрез прилагане върху пациент с необходимост от това на ефективно количество нуклеинова киселина, имаща нуклеотидна последователност, кодираща за FGF-20 полипептид или за негов биологичноактивен фрагмент.

13. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 12, при което посоченият FGF-20 полипептид е човешки.

14. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 13, при което посоченият полипептид притежава FGF-20 специфична имуногенна активност.

15. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 12, при което посоченият полипептид включва аминокиселина 1 до аминокиселина 211, както е посочено на фигура 1.

16. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 12, при което посоченият полипептид притежава 95% идентичност на последователностите с аминокиселина 1 до аминокиселина 211 на човешки FGF-20, както е посочен на фигура 1, и където посоченият FGF-20 има FGF активност.

17. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 13, при което посоченият полипептид притежава 95% идентичност на последователностите с аминокиселина 1 до аминокиселина 211 на човешки FGF-20, както е посочен на фигура 1, и където посоченият FGF-20 има FGF активност.

18. Използуване на FGF-20 за лечение на надбъбречна левкодистрофия, прогресивна мултифокална левкоенцефалопатия, енцефаломиелит, синдром на Guillian-Barre, парапротеинемия или хронична заразна демиелинезираща полиневропатия, чрез прилагане върху пациент с необходимост от това на ефективно количество нуклеинова киселина, имаща нуклеотидна последователност, кодираща за FGF-20 полипептид или за негов биологичноактивен фрагмент.

19. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 18, характеризиращ се с това, че посоченият FGF-20 полипептид е човешки.

20. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 19, при което посочената нуклеотидна последователност кодира без прекъсване за FGF-20.

21. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 18, при което нуклеотидната последователност притежава 95% идентичност на последователностите с нуклеотидната последователност, посочен на фигура 1.

22. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 19, при което нуклеотидната последователност притежава 95% идентичност на последователностите с нуклеотидната последователност, посочен на фигура 1.

23. Използуване на FGF-20 за спомагане на преживяемост на присадък, характеризиращ се с това, че се прилага върху пациент с необходимост, ефективно количество FGF-20 полипептид или негов биологичноактивен фрагмент.

24. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 23, при което посоченият FGF-20 полипептид е човешки.

25. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 24, при което посоченият полипептид притежава FGF-20 специфична имуногенна активност.

26. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 23, при което посоченият полипептид включва аминокиселина 1 до аминокиселина 211, както е посочено на фигура 1.

27. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 23, при което посоченият полипептид притежава 95% идентичност на последователностите с аминокиселина 1 до аминокиселина

211 на човешки FGF-20, както е посочен на фигура 1, и където посоченият FGF-20 има FGF активност.

28. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 24, при което посоченият полипептид притежава 95% идентичност на последователностите с аминокиселина 1 до аминокиселина 211 на човешки FGF-20, както е посочен на фигура 1, и където посоченият FGF-20 има FGF активност.

29. Използуване на FGF-20 за спомагане на преживяемост на присадък, при което се прилага върху пациент с необходимост, ефективно количество FGF-20 полипептид или негов биологичноактивен фрагмент.

30. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 29, при което посочят FGF-20 полипептид е човешки.

31. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 30, при което посочената нуклеотидна последователност кодира без прекъсване за FGF-20.

32. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 29, при което нуклеотидната последователност притежава 95% идентичност на последователностите с нуклеотидната последователност, посочен на фигура 1.

33. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 30, при което нуклеотидната последователност притежава 95% идентичност на последователностите с нуклеотидната последователност, посочен на фигура 1.

34. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 1, за лечение на мултиплена склероза.

35. Използуване на FGF-20, съгласно претенция 7, за лечение на мултиплена склероза.

36. Използване на FGF-9 за лечение на увреждане на гръбначния мозък; травми на гръбначния мозък; нараняване на нервна тъкан, причинени от исхемична атака, инфаркт, хеморагия или аневризма; болест на Hunington; мултиплена склероза, миелопатия; миелитис; или сирингомиелия, чрез прилагане върху пациент с необходимост от това на ефективно количество FGF-9 полипептид или на негов биологичноактивен фрагмент.

37. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 36, при което посоченият FGF-9 полипептид е човешки.

38. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 37, при което посоченият полипептид притежава FGF-9 специфична имуногенна активност.

39. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 36, при което посоченият полипептид включва аминокиселина 1 до аминокиселина 208, както е посочено на фигура 3.

40. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 36, при което посоченият полипептид притежава 95% идентичност на последователностите с аминокиселина 1 до аминокиселина 208 на човешки FGF-9, както е посочен на фигура 3, и където посоченият полипептид има FGF активност.

41. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 37, при което посоченият полипептид притежава 95% идентичност на последователностите с аминокиселина 1 до аминокиселина 208 на човешки FGF-9, както е посочен на фигура 3, и където посоченият полипептид има FGF активност.

42. Използуване на FGF-9 за лечение на нараняване на гръбначен мозък; травми на гръбначен мозък; нараняване на нервна тъкан в следствие на исхемична атака, инфаркт,

кръвоизлив или аневризма; болест на Hunigton; миелопатия; миелитис; или сирингомиелия, чрез прилагане върху пациент с необходимост от това на ефективно количество нуклеинова киселина, имаща нуклеотидна последователност, кодираща за FGF-9 полипептид или за негов биологичноактивен фрагмент.

43. Използване на FGF-20, съгласно претенция 7, при което посочената нуклеотидна последователност е човешка.

44. Използване на FGF-9, съгласно претенция 43, при което посочената нуклеотидна последователност кодира без прекъсване за FGF-9.

45. Използване на FGF-9, съгласно претенция 42, при което посочената нуклеотидна последователност притежава 95% идентичност на последователностите с нуклеотидната последователност посочена на фигура 3.

46. Използване на FGF-9, съгласно претенция 43, при което посочената нуклеотидна последователност притежава 95% идентичност на последователностите с нуклеотидната последователност посочена на фигура 3.

47. Използване на FGF-9 за лечение на надбъбречна левкодистрофия, прогресивна мултифокална левкоенцефалопатия, енцефаломиелит, синдром на Guillian-Barre, парапротеинемия или хронична заразна демиелинизираща полиневропатия, чрез прилагане върху пациент с необходимост от това на ефективно количество нуклеинова киселина, имаща нуклеотидна последователност, кодираща за FGF-9 полипептид или за негов биологичноактивен фрагмент.

48. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 47, при което посоченият FGF-9 полипептид е човешки.

49. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 48, при което посоченият полипептид притежава FGF-9 специфична имуногенна активност.

50. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 47, при което посоченият полипептид включва аминокиселина 1 до аминокиселина 208, както е посочено на фигура 3.

51. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 47, при което посоченият полипептид притежава 95% идентичност на последователностите с аминокиселина 1 до аминокиселина 208 на човешки FGF-9, както е посочен на фигура 3, и където посоченият полипептид има FGF активност.

52. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 48, при което посоченият полипептид притежава 95% идентичност на последователностите с аминокиселина 1 до аминокиселина 208 на човешки FGF-9, както е посочен на фигура 3, и където посоченият полипептид има FGF активност.

53. Използуване на FGF-9 за лечение на надбъбречна левкодистрофия, прогресивна мултифокална левкоенцефалопатия, енцефаломиелит, синдром на Guillian-Barre, парапротеинемия или хронична заразна демиелинезираща полиневропатия, чрез прилагане върху пациент с необходимост от това на ефективно количество нуклеинова киселина, имаща нуклеотидна последователност, кодираща за FGF-9 полипептид или за негов биологичноактивен фрагмент.

54. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 53, характеризиращ се с това, че посоченият FGF-9 полипептид е човешки.

55. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 54, при което посочената нуклеотидна последователност кодира без прекъсване за FGF-9.

56. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 53, при което нуклеотидната последователност притежава 95% идентичност на последователностите с нуклеотидната последователност, посочен на фигура 3.

57. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 54, при което нуклеотидната последователност притежава 95% идентичност на последователностите с нуклеотидната последователност, посочен на фигура 3.

58. Използуване на FGF-9 за спомагане на преживяемост на присадък, характеризиращ се с това, че се прилага върху пациент с необходимост, ефективно количество FGF-9 полипептид или негов биологичноактивен фрагмент.

59. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 58, при което посоченият FGF-9 полипептид е човешки.

60. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 59, при което посоченият полипептид притежава FGF-9 специфична имуногенна активност.

61. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 58, при което посоченият полипептид включва аминокиселина 1 до аминокиселина 208, както е посочено на фигура 3.

62. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 58, при което посоченият полипептид притежава 95% идентичност на последователностите с аминокиселина 1 до аминокиселина

211 на човешки FGF-9, както е посочен на фигура 3, и където посоченият пептид има FGF активност.

63. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 59, при което посоченият полипептид притежава 95% идентичност на последователностите с аминокиселина 1 до аминокиселина 208 на човешки FGF-9, както е посочен на фигура 3, и където посоченият полипептид има FGF активност.

64. Използуване на FGF-9 за спомагане на преживяемост на присадък, при което се прилага върху пациент с необходимост, ефективно количество FGF-9 полипептид или негов биологичноактивен фрагмент.

65. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 64, при което посочят FGF-9 полипептид е човешки.

66. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 65, при което посочената нуклеотидна последователност кодира без прекъсване за FGF-9.

67. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 64, при което нуклеотидната последователност притежава 95% идентичност на последователностите с нуклеотидната последователност, посочен на фигура 3.

68. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 65, при което нуклеотидната последователност притежава 95% идентичност на последователностите с нуклеотидната последователност, посочен на фигура 3.

69. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 36, за лечение на мултиплена склероза.

70. Използуване на FGF-9, съгласно претенция 42, за лечение на мултиплена склероза.

СПИСЪК НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИТЕ

<110> BRINGMANN, PETER W.
 FAULDS, DARYL
 MITROVIC, BRANISLAVA
 SRINIVASAN, SUBHA

<120> НОВИ ФИБРОБЛАСТНИ РАСТЕЖНИ ФАКТОРИ

<130> BERLX 87

<140> PCT/US01/47350

<141> 2001-12-10

<150> 60/251,837

<151> 2000-12-08

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 636

<212> ДНК

<213> Неизвестен Организъм

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(633)

<220>

<223> Описание на Неизвестен Организъм: FGF-21

нуклеотидна последователност

<400> 1

atg gct ccc tta gcc gaa gtc ggg ggc ttt ctg ggc ggc ctg gag ggc 48
 Met Ala Pro Leu Ala Glu Val Gly Gly Phe Leu Gly Gly Leu Glu Gly
 1 5 10 15

ttg ggc cag cag gtg ggt tgc cat ttc ctg ttg cct cct gcc ggg gag 96
 Leu Gly Gln Gln Val Gly Ser His Phe Leu Leu Pro Pro Ala Gly Glu
 20 25 30

cgg ccg ccg ctg ctg ggc gag cgc agg agc gcg gcg gag cgg agc gcg 144
 Arg Pro Pro Leu Leu Gly Glu Arg Arg Ser Ala Ala Glu Arg Ser Ala
 35 40 45

cgc ggc ggg ccg ggg gct gcg cag ctg gcg cac ctg cac ggc atc ctg 192
 Arg Gly Gly Pro Gly Ala Ala Gln Leu Ala His Leu His Gly Ile Leu
 50 55 60

cgc cgc ccg cag ctc tat tgc cgc acc ggc ttc cac ctg cag atc ctg 240
 Arg Arg Arg Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Gln Ile Leu
 65 70 75 80

ccc gac ggc agc gtg cag ggc acc cgg cag gac cac agc ctc ttc ggt 288
 Pro Asp Gly Ser Val Gln Gly Thr Arg Gln Asp His Ser Leu Phe Gly

85	90	95	
atc ttg gaa ttc atc agt gtg gca gtg gga ctg gtc agt att aga ggt Ile Leu Glu Phe Ile Ser Val Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly 100 105 110			336
gtg gac agt ggt ctc tat ctt gga atg aat gac aaa gga gaa ctc tat Val Asp Ser Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Asp Lys Gly Glu Leu Tyr 115 120 125			384
gga tca gag aaa ctt act tcc gaa tgc atc ttt agg gag cag ttt gaa Gly Ser Glu Lys Leu Thr Ser Glu Cys Ile Phe Arg Glu Gln Phe Glu 130 135 140			432
gag aac tgg tat aac acc tat tca tct aac ata tat aaa cat gga gac Glu Asn Trp Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Ile Tyr Lys His Gly Asp 145 150 155 160			480
act ggc cgc agg tat ttt gtg gca ctt aac aaa gac gga act cca aga Thr Gly Arg Arg Tyr Phe Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg 165 170 175			528
gat ggc gcc agg tcc aag agg cat cag aaa ttt aca cat ttc tta cct Asp Gly Ala Arg Ser Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro 180 185 190			576
aga cca gtg gat cca gaa aga gtt cca gaa ttg tac aag gac cta ctg Arg Pro Val Asp Pro Glu Arg Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Leu Leu 195 200 205			624
atg tac act tga Met Tyr Thr 210			636

<210> 2
 <211> 211
 <212> PRT

<213> Неизвестен Организм

<220>

<223> Описание на Неизвестен Организъм: FGF-21

аминокиселинна последователност

<400> 2

Met Ala Pro Leu Ala Glu Val Gly Gly Phe Leu Gly Gly Leu Glu Gly 1 5 10 15	
Leu Gly Gln Gln Val Gly Ser His Phe Leu Leu Pro Pro Ala Gly Glu 20 25 30	
Arg Pro Pro Leu Leu Gly Glu Arg Arg Ser Ala Ala Glu Arg Ser Ala 35 40 45	
Arg Gly Gly Pro Gly Ala Ala Gln Leu Ala His Leu His Gly Ile Leu 50 55 60	

Arg Arg Arg Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Gln Ile Leu
65 70 75 80

Pro Asp Gly Ser Val Gln Gly Thr Arg Gln Asp His Ser Leu Phe Gly
85 90 95

Ile Leu Glu Phe Ile Ser Val Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly
100 105 110

Val Asp Ser Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Asp Lys Gly Glu Leu Tyr
115 120 125

Gly Ser Glu Lys Leu Thr Ser Glu Cys Ile Phe Arg Glu Gln Phe Glu
130 135 140

Glu Asn Trp Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Ile Tyr Lys His Gly Asp
145 150 155 160

Thr Gly Arg Arg Tyr Phe Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg
165 170 175

Asp Gly Ala Arg Ser Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro
180 185 190

Arg Pro Val Asp Pro Glu Arg Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Leu Leu
195 200 205

Met Tyr Thr
210

<210> 3

<211> 513

<212> ДНК

<213> Неизвестен Организъм

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(510)

<220>

<223> Описание на Неизвестен Организъм: FGF-23_a

нуклеотидна последователност

<400> 3

atg cgc cgc cgc ctg tgg ctg ggc ctg gcc tgg ctg ctg ctg gcg cgg 48
Met Arg Arg Arg Leu Trp Leu Gly Leu Ala Trp Leu Leu Leu Ala Arg
1 5 10 15

gcg ccg gac gcc gcg gga acc ccg agc gcg tcg cgg gga ccg cgc agc 96
Ala Pro Asp Ala Ala Gly Thr Pro Ser Ala Ser Arg Gly Pro Arg Ser
20 25 30

tac ccg cac ctg gag ggc gac gtg cgc tgg cgg cgc ctc ttc tcc tcc 144
Tyr Pro His Leu Glu Gly Asp Val Arg Trp Arg Arg Leu Phe Ser Ser
35 40 45

act cac ttc ttc ctg cgc gtg gat ccc ggc ggc cgc gtg cag ggc acc 192
 Thr His Phe Phe Leu Arg Val Asp Pro Gly Gly Arg Val Gln Gly Thr
 50 55 60

cgc tgg cgc cac ggc cag gac agc atc ctg gag atc cgc tct gta cac 240
 Arg Trp Arg His Gly Gln Asp Ser Ile Leu Glu Ile Arg Ser Val His
 65 70 75 80

gtg ggc gtc gtg gtc atc aaa gca gtg tcc tca ggc ttc tac gtg gcc 288
 Val Gly Val Val Val Ile Lys Ala Val Ser Ser Gly Phe Tyr Val Ala
 85 90 95

atg aac cgc cgg ggc cgc ctc tac ggg tgc cga ctc tac acc gtg gac 336
 Met Asn Arg Arg Gly Arg Leu Tyr Gly Ser Arg Leu Tyr Thr Val Asp
 100 105 110

tgc agg ttc cgg gag cgc atc gaa gag aac ggc cac aac acc tac gcc 384
 Cys Arg Phe Arg Glu Arg Ile Glu Glu Asn Gly His Asn Thr Tyr Ala
 115 120 125

tca cag cgc tgg cgc cgc cgc ggc cag ccc atg ttc ctg gcg ctg gac 432
 Ser Gln Arg Trp Arg Arg Arg Gly Gln Pro Met Phe Leu Ala Leu Asp
 130 135 140

agg agg ggg ggg ccc cgg cca ggc ggc cgg acg cgg cgg tac cac ctg 480
 Arg Arg Gly Gly Pro Arg Pro Gly Gly Arg Thr Arg Arg Tyr His Leu
 145 150 155 160

tcc gcc cac ttc ctg ccc gtc ctg gtc tcc tga 513
 Ser Ala His Phe Leu Pro Val Leu Val Ser
 165 170

<210> 4
 <211> 170
 <212> PRT

<213> Неизвестен Организъм

<220>

<223> Описание на Неизвестен Организъм: FGF-9

аминокиселинна последователност

<400> 4
 Met Arg Arg Arg Leu Trp Leu Gly Leu Ala Trp Leu Leu Leu Ala Arg
 1 5 10 15

Ala Pro Asp Ala Ala Gly Thr Pro Ser Ala Ser Arg Gly Pro Arg Ser
 20 25 30

Tyr Pro His Leu Glu Gly Asp Val Arg Trp Arg Arg Leu Phe Ser Ser
 35 40 45

Thr His Phe Phe Leu Arg Val Asp Pro Gly Gly Arg Val Gln Gly Thr
 50 55 60

Arg Trp Arg His Gly Gln Asp Ser Ile Leu Glu Ile Arg Ser Val His

```
<210> 5
<211> 208
<212> PRT
```

 $\langle 220 \rangle$

аминокиселинна последователност

<400> 5
 Met Ala Pro Leu Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala
 1 5 10 15
 Val Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser Pro Val Leu
 20 25 30
 Leu Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly
 35 40 45
 Pro Ala Val Thr Asp Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg
 50 55 60
 Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly
 65 70 75 80
 Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu
 85 90 95
 Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser
 100 105 110
 Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu
 115 120 125
 Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp

130	135	140
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg		
145	150	155 160
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr		
	165	170 175
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val		
	180	185 190
Asp Pro Asp Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser		
	195	200 205

<210> 6

<211> 207

<212> PRT

<213> Неизвестен Организъм

<223> Описание на Неизвестен Организъм: FGF-16

аминокиселинна последователност

<400> 6

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

Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val Asp
 180 185 190

Pro Ser Lys Leu Pro Ser Met Ser Arg Asp Leu Phe His Tyr Arg
 195 200 205

<210> 7
 <211> 117
 <212> PRT

<213> Неизвестен Организъм

<220>

<223> Описание на Неизвестен Организъм: FGF-22

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)

<223> Която и да е аминокиселина

<400> 7
 Xaa Gly Met Leu Ala Ser Tyr Ser Val Ala Val Ala Met Val Thr Thr
 1 5 10 15
 Arg Gly Val Ala Ser Arg Leu Tyr Leu Asp Ser Asn His Lys Gly Asp
 20 25 30
 Leu Tyr Ala Ser Val Arg Leu Ala Gln Glu Ser Val Phe Trp Gly Gln
 35 40 45
 Ser Glu Glu Asn Trp Ser Tyr Thr His Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His
 50 55 60
 Val Asp Thr Arg Arg Arg Tyr Tyr Val Pro Leu Asn Gln Gly Ala Thr
 65 70 75 80
 Pro Ser Ala Gly Thr Arg Ser Leu Arg Arg Gln Asn Tyr Thr His Val
 85 90 95
 Leu Pro Arg Pro Val Asp Pro Asp Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp
 100 105 110
 Ile Leu Ser Gln Ser
 115

<210> 8
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Xenopus laevis

<400> 8
 Met Ala Pro Leu Ala Asp Val Gly Thr Phe Leu Gly Gly Tyr Asp Ala
 1 5 10 15

Leu Gly Gln Val Gly Ser His Phe Leu Leu Pro Pro Ala Lys Asp Ser

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

<210> 9
 <211> 4
 <212> PRT

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Описание на Изкуствена Последователност:

илюстративен пептид

<400> 9
 Leu Tyr Gly Ser
 1

<210> 10
 <211> 4
 <212> PRT

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Описание на Изкуствена Последователност:

илюстративен пептид

<400> 10
His Phe Leu Pro
1

<210> 11
<211> 5
<212> PRT

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Описание на Изкуствена Последователност:

илюстративен пептид

<400> 11
Val Gln Gly Thr Arg
1 5

<210> 12
<211> 10
<212> PRT

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Описание на Изкуствена Последователност:

илюстративен пептид

<400> 12
Arg Ile Glu Glu Asn Gly His Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 13
<211> 10
<212> PRT

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Описание на Изкуствена Последователност:

илюстративен пептид

<400> 13
Gln Phe Glu Glu Asn Trp Tyr Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 14
<211> 6
<212> PRT

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Описание на Изкуствена Последователност:

илюстративен пептид

<400> 14
Ala Gly Thr Pro Ser Ala
1 5

<210> 15
<211> 6
<212> PRT

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Описание на Изкуствена Последователност:

илюстративен пептид

<400> 15
Ala Ala Glu Arg Ser Ala
1 5

<210> 16
<211> 6
<212> PRT

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Описание на Изкуствена Последователност: 6X His tag

<400> 16
His His His His His His
1 5

```

+1 M A P L A E V G G F L G G L E G L G Q Q
   ATGGCTCCCTTAGCCGAAGTCGGGGGCTTTCTGGGCGGCCTGGAGGGCTTGGGCCAGCAG
   TACCGAGGGAATCGGCTTCAGCCCCCGAAAGACCCGCGGACCTCCCGAACCCGGTCGTC
       10         20         30         40         50         60

+1 V G S H F L L P P A G E R P P L L G E R
   GTGGGTTCGCATTTCTGTTCCTCCTGCCGGGGAGCGGCCGCCGCTGCTGGGCGAGCGC
   CACCCAAGCGTAAAGGACAACGGAGGACGGCCCCCTCGCCGGCGGCGACGACCCGCTCGCG
       70         80         90        100        110        120

+1 R S A A E R S A R G G P G A A Q L A H L
   AGGAGCGCGGCGGAGCGGAGCGCCCCGCGGGCGGGGGCTGCGCAGCTGGCGCACCTG
   TCCTCGCGCCGCTCGCCTCGCGGGCGCGCCCGGCGCCGACGCGTCGACCGCGTGGAC
       130        140        150        160        170        180

+1 H G I L R R R Q L Y C R T G F H L Q I L
   CACGGCATCCTGCGCCGCCGGCAGCTCTATTGCCGCACCGGCTTCCACCTGCAGATCCTG
   GTGCCGTAGGACGCGGGCGGCGTTCGAGATAACGGCGTGGCCGAAGGTGGACGTCTAGGAC
       190        200        210        220        230        240

+1 P D G S V Q G T R Q D H S L F G I L E F
   CCCGACGGCAGCGTGCAGGGCACCCGGCAGGACCACAGCCTCTTCGGTATCTTGGAATTC
   GGGCTGCCGTGCGCACGTCCCGTGGGCCGTCTGTTGTCGGAGAAGCCATAGAACCTTAAG
       250        260        270        280        290        300

+1 I S V A V G L V S I R G V D S G L Y L G
   ATCAGTGTGGCAGTGGGACTGGTCAGTATTAGAGGTGTGGACAGTGGTCTCTATCTTGGA
   TAGTCACACCGTCACCCTGACCAGTCATAATCTCCACACCTGTCACCAGAGATAGAACCT
       310        320        330        340        350        360

+1 M N D K G E L Y G S E K L T S E C I F R
   ATGAATGACAAAGGAGAACTCTATGGATCAGAGAACTTACTTCCGAATGCATCTTTAGG
   TACTTACTGTTTCTCTTGAGATACCTAGTCTCTTTGAATGAAGGCTTACGTAGAAATCC
       370        380        390        400        410        420

+1 E Q F E E N W Y N T Y S S N I Y K H G D
   GAGCAGTTTGAAGAGAACTGGTATAACACCTATTTCATCTAACATATATAACATGGAGAC
   CTCGTCAAACCTTCTCTTGACCATATTGTGGATAAGTAGATTGTATATATTTGTACCTCTG
       430        440        450        460        470        480

+1 T G R R Y F V A L N K D G T P R D G A R
   ACTGGCCGCAGGTATTTTGTGGCACTTAACAAAGACGGAACCTCCAAGAGATGGCGCCAGG
   TGACCGGCGTCCATAAAACACCGTGAATTGTTTCTGCCTTGAGGTTCTCTACCGCGGTCC
       490        500        510        520        530        540

+1 S K R H Q K F T H F L P R P V D P E R V
   TCCAAGAGGCATCAGAAATTTACACATTTCTTACCTAGACCAGTGGATCCAGAAAGAGTT
   AGGTTCCTCCGTAGTCTTTAAATGTGTAAAGAATGGATCTGGTCACCTAGGTCTTTCTCAA
       550        560        570        580        590        600

+1 P E L Y K D L L M Y T *
   CCAGAAATTGTACAAGGACCTACTGATGTACACTTGA (SEQ ID NO: 1)
   GGTCTTAACATGTTCTCGGATGACTACATGTGAACT (SEQ ID NO: 2)
       610        620        630        640        650        660

```

2/11

1 ATGCGCCGCGCCTGTGGCTGGGCCTGGCCTGGCTGCTGCTGGCGCGGGCGCCGGACGCC 60
1 M R R R L W L G L A W L L L A R A P D A 20

61 GCGGGAACCCCGAGCGCGTCGCGGGGACCGCGCAGCTACCCGCACCTGGAGGGCGACGTG 120
21 A G T P S A S R G P R S Y P H L E G D V 40

121 CGCTGGCGGGCGCCTCTTCTCCTCCACTCACTTCTTCTGCGCGTGGATCCCGGCGGCCGC 180
41 R W R R L F S S T H F F L R V D P G G R 60

181 GTGCAGGGCACCCGCTGGCGCCACGGCCAGGACAGCATCCTGGAGATCCGCTCTGTACAC 240
61 V Q G T R W R H G Q D S I L E I R S V H 80

241 GTGGGCGTCGTGGTCATCAAAGCAGTGTCTCAGGCTTCTACGTGGCCATGAACCGCCGG 300
81 V G V V V I K A V S S G F Y V A M N R R 100

301 GGCCGCTCTACGGGTCGCGACTCTACACCGTGGACTGCAGGTTCCGGGAGCGCATCGAA 360
101 G R L Y G S R L Y T V D C R F R E R I E 120

361 GAGAACGGCCACAACACCTACGCTCACAGCGCTGGCGCCGCGCGGCCAGCCCATGTTC 420
121 E N G H N T Y A S Q R W R R R G Q P M F 140

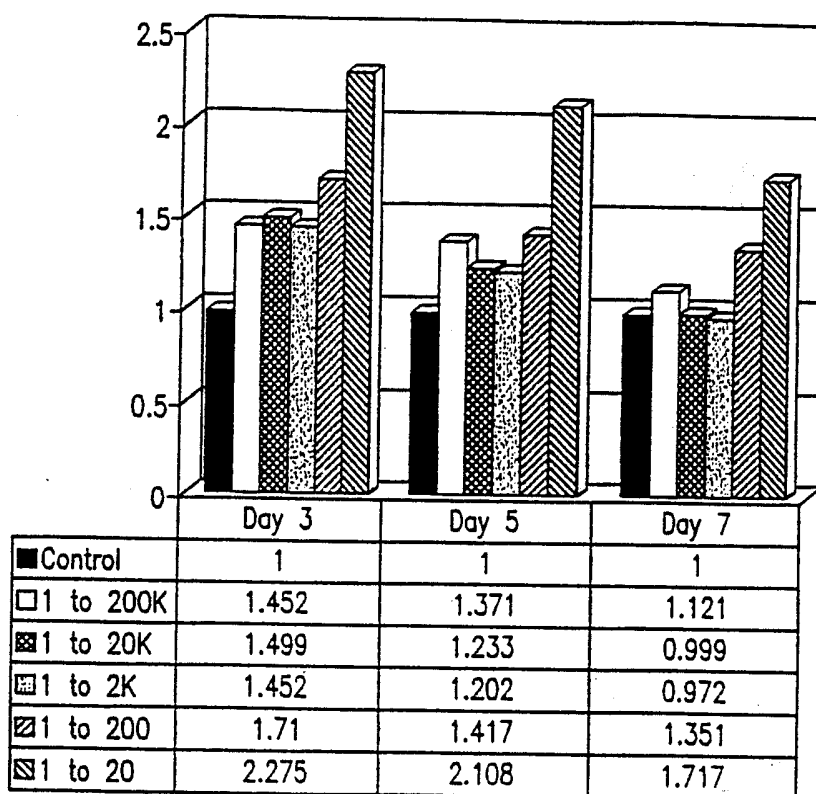
421 CTGGCGCTGGACAGGAGGGGGGGCCCCGGCCAGGCGGCGGACGCGGCGGTACCACCTG 480
141 L A L D R R G G P R P G G R T R R Y H L 160

481 TCCGCCCCTCTGCGCGCTGCTGGTCTCTGA 513 (SEQ ID NO: 3)
161 S A H F L P V L V S * 171 (SEQ ID NO: 4)

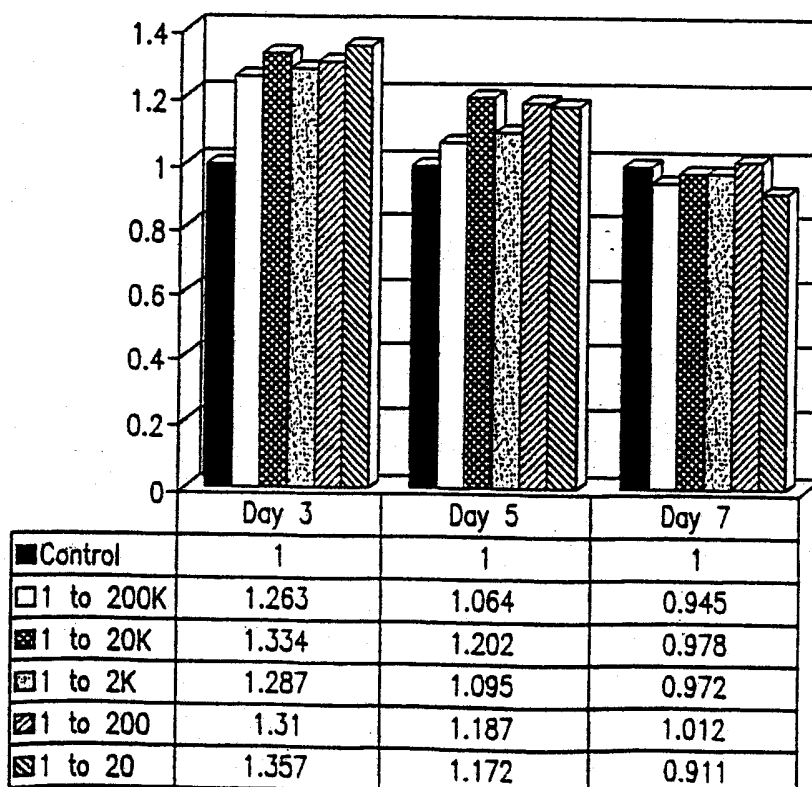
ФИГ. 2

Fgf-21	MAPLAEVGGF	LGGLEGLGQQ	VGSHFLLPPA	GERPPLLGER	RSAAERSA.R
fgf-9	MAPLGEVGNV	FGVQDAV..P	FGNVPVLPV.	.DSPVLLSDH	LGQSEAGGLP
fgf-16	---MAEVGGV	FASLDWDLHG	FSSSLGNVPL	ADSPGFLNER	LGQIEGKLQR
fgf-22	-----	-----	-----	-----	-----
xfgf-20	MPALADVGTG	LGGYDALG.Q	VGSHFLLPPA	KDSPLLFNDF	LAQSERLS.R
fgf-21	GGPGAAQLAH	LHGILRRRQL	YCRTGFHLQI	LPDGSVQGTR	QDHSLFGILE
fgf-9	RGPAVTDLDH	LKGILRRRQL	YCRTGFHLEI	FPNGTIQGTR	KDHSRFGILE
fgf-16	GSP..TDFAH	LKGILRRRQL	YCRTFGHLEI	FPNGTVHGTR	HDHSRFGILE
fgf-22	-----	-----	-----	-----	-----XGMLA
xfgf-20	SAP..SDLSH	LQGILRRRQL	YCRTGFHLQI	LPDGNVQGTR	QDHSRFGILE
fgf-21	FISVAVGLVS	IRGVDSGLYL	GMNDKGELYG	SEKLTSECIF	REQFEENWYN
fgf-9	FISIAVGLVS	IRGVDSGLYL	GMNEKGELYG	SEKLTQECVF	REQFEENWYN
fgf-16	FISLAVGLIS	IRGVDSGLYL	GMNERGELYG	SKKLTRECVF	REQFEENWYN
fgf-22	SYSVAVAMVT	TRGVASRLYL	DSNHKGDLYA	SVRLAQESVF	WGQSEENWSY
xfgf-20	FISVAIGLVS	IRGVDTGLYL	GMNDKGELFG	SEKLTSECIF	REQFEENWYN
fgf-21	TYSSNIYKHG	DTGRRYFVAL	NKDGTPRDGA	RSKRHQKFTH	FLPRPVDPER
fgf-9	TYSSNLYKHV	DTGRRYYVAL	NKDGTREGT	RTKRHQKFTH	FLPRPVDPAK
fgf-16	TYASTLYKHS	DSERQYYVAL	NKDGSREGY	RTKRHQKFTH	FLPRPVDPAK
fgf-22	THSSNLYKHV	DTRRRYYVPL	NQGATPSAGT	RSLRRQNYTH	VLPRPVDPAK
xfgf-20	TYSSNLYKHG	DSGRRYFVAL	NKDGTREGT	RAKRHQKFTH	FLPRPVDPEK
fgf-21	VPELYKDLLM	YT*	(SEQ ID NO: 2)		
fgf-9	VPELYKDILS	QS*	(SEQ ID NO: 5)		
fgf-16	LPSMSRDLFH	YR*	(SEQ ID NO: 6)		
fgf-22	VPELYKDILS	QS*	(SEQ ID NO: 7)		
xfgf-20	VPELYKDLMG	YS*	(SEQ ID NO: 8)		

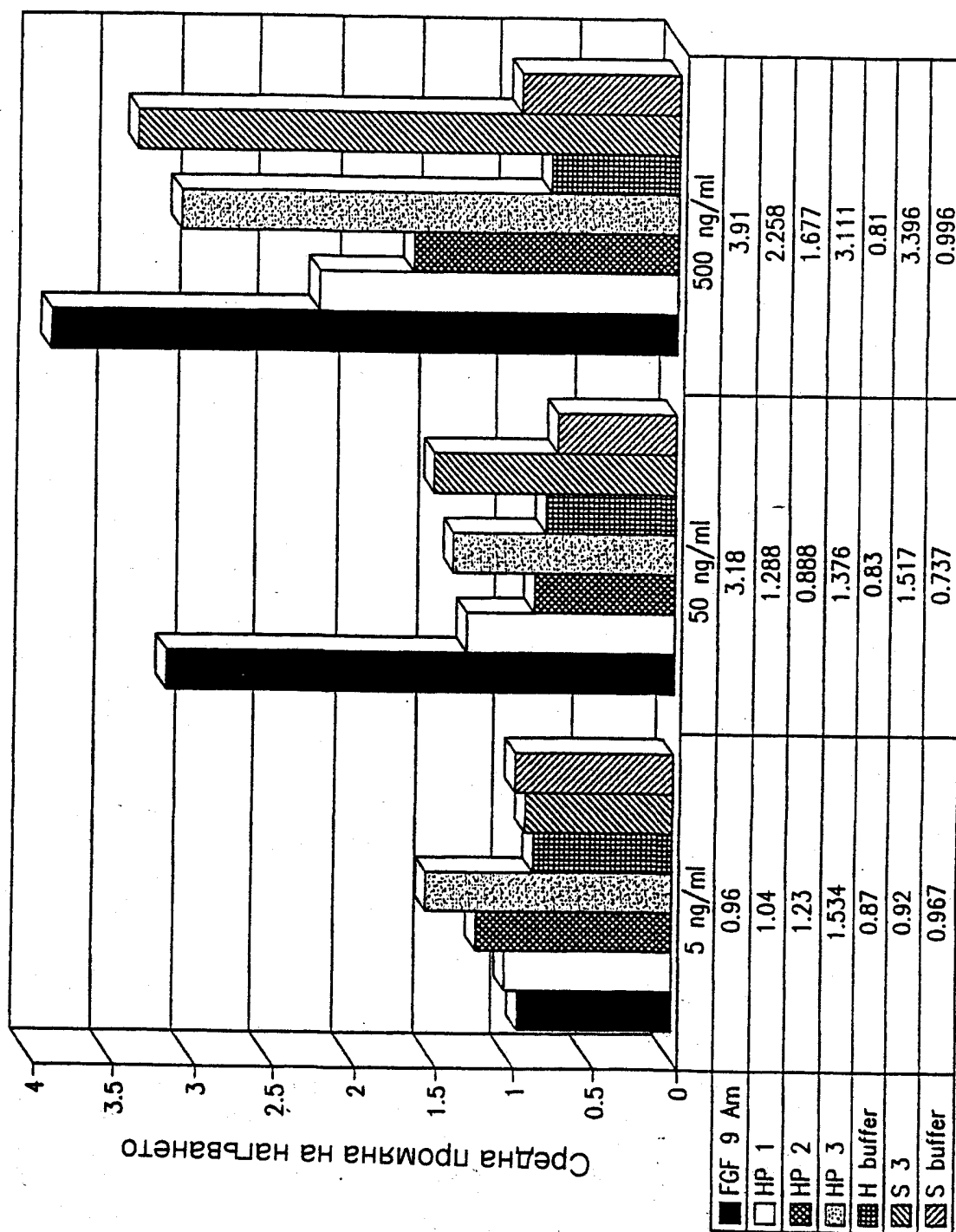
FIG. 3



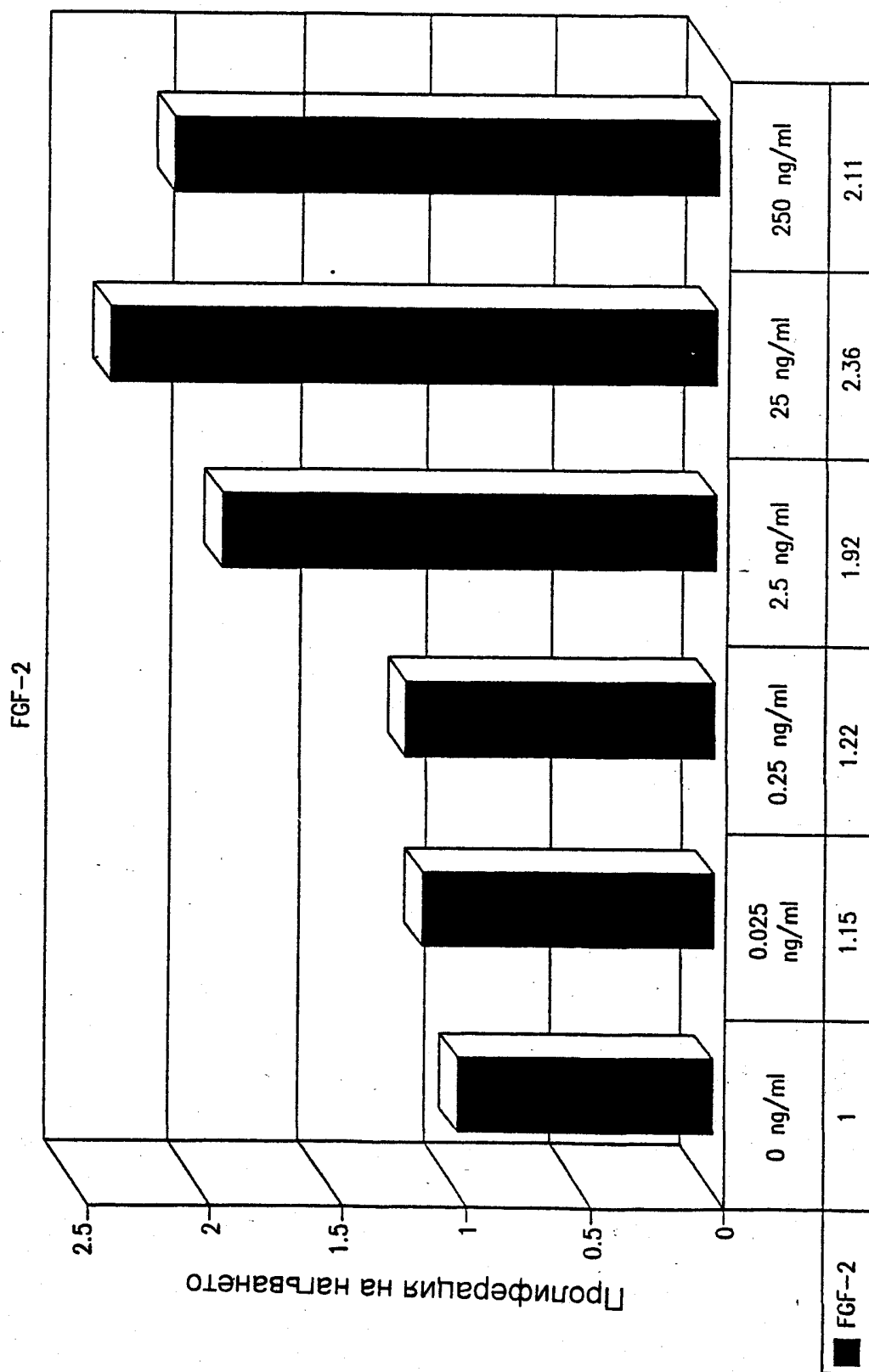
ФИГ. 4А



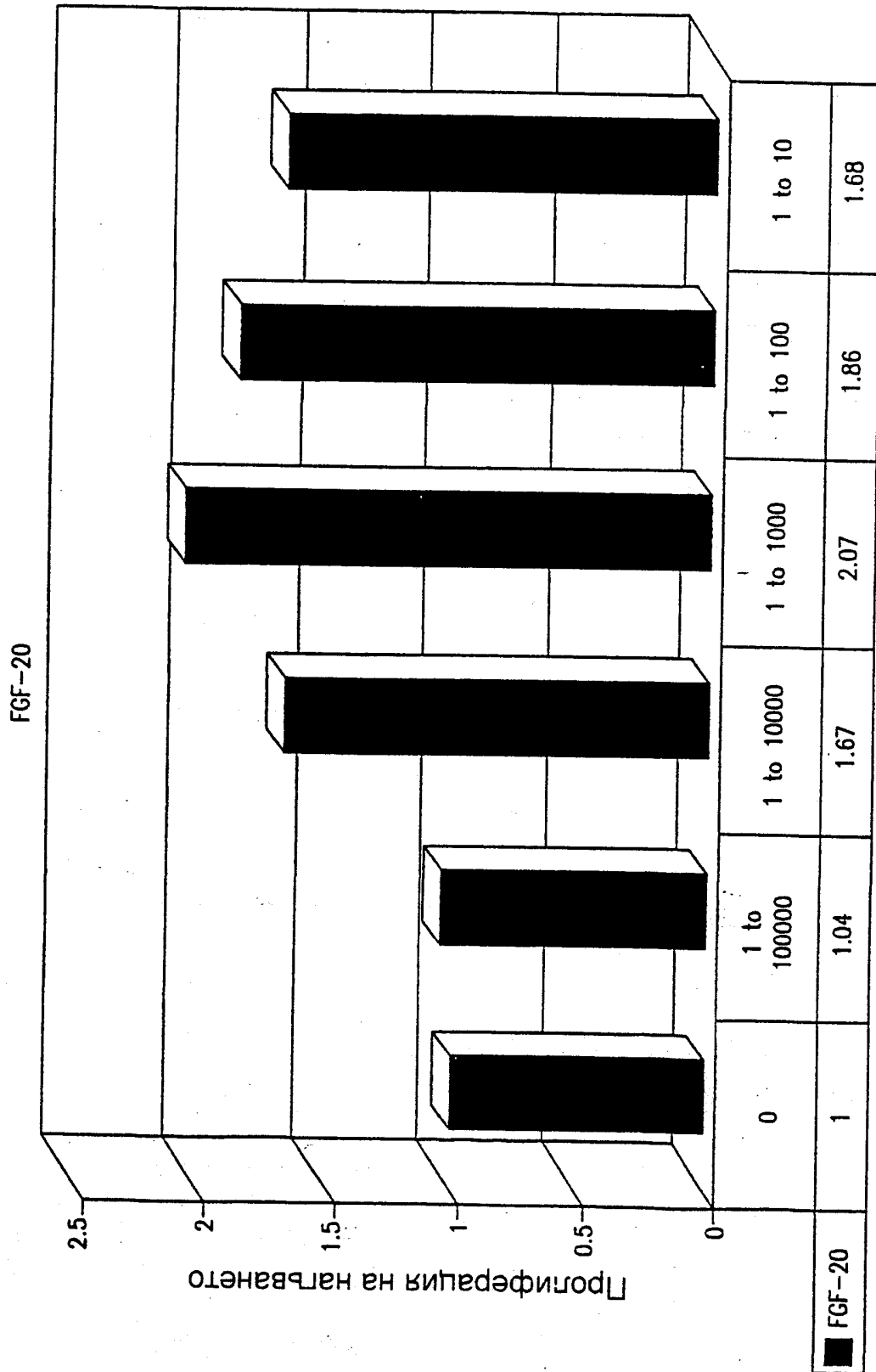
ФИГ. 4В



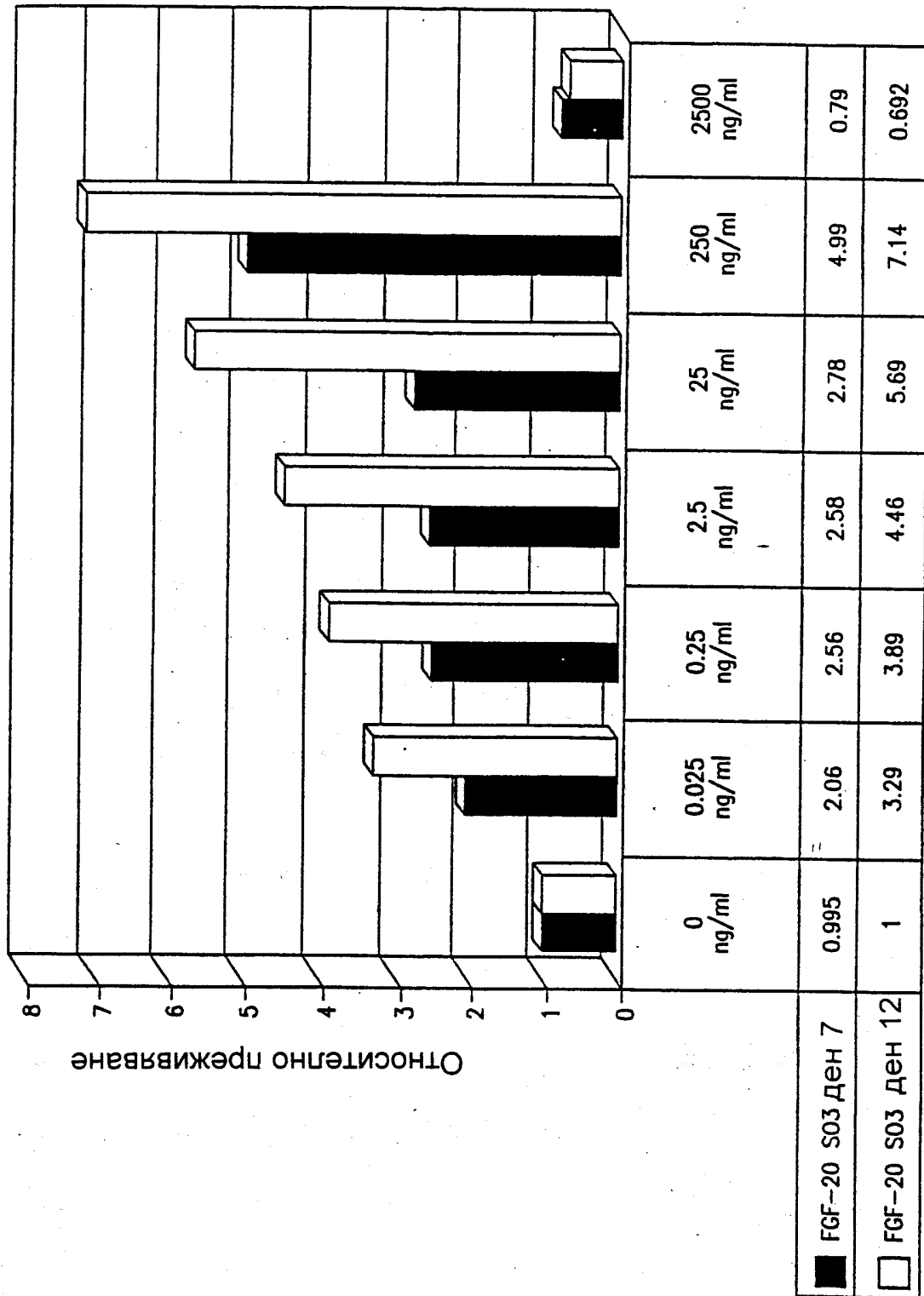
ФИГ. 5



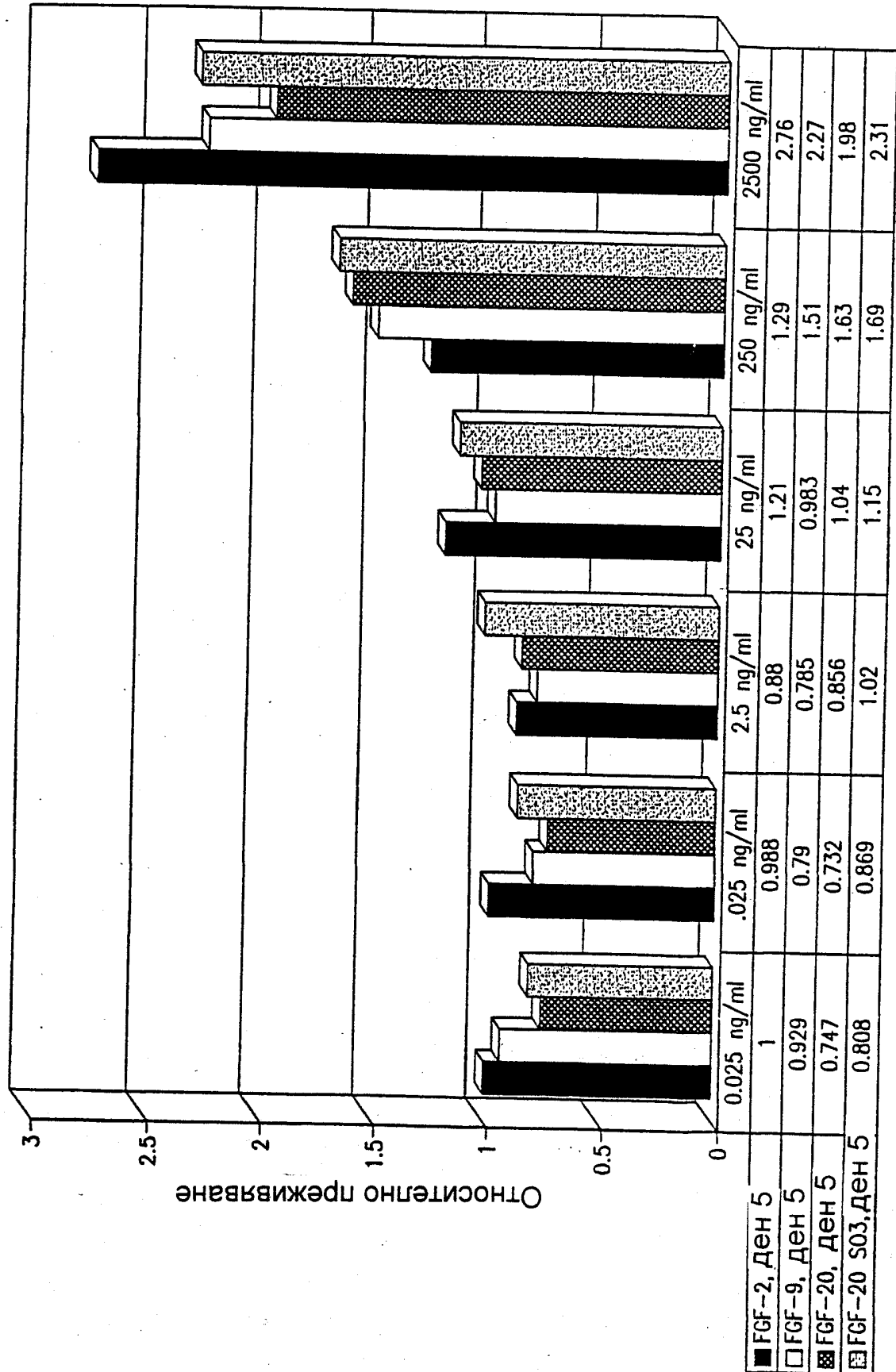
ФИГ. 6А



ФИГ. 6В

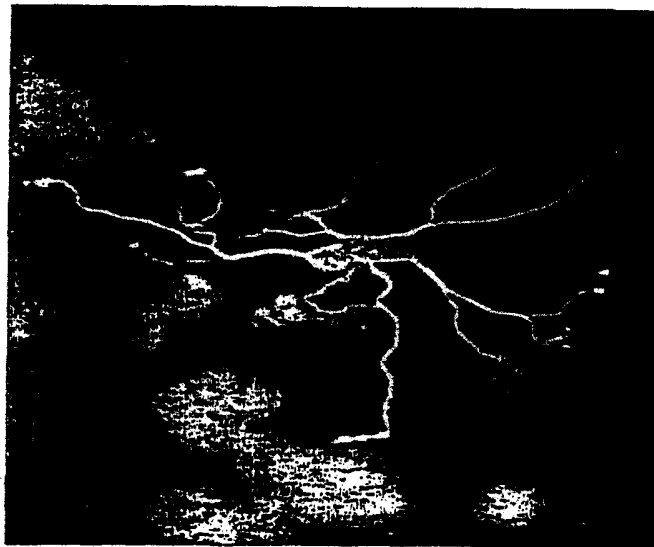
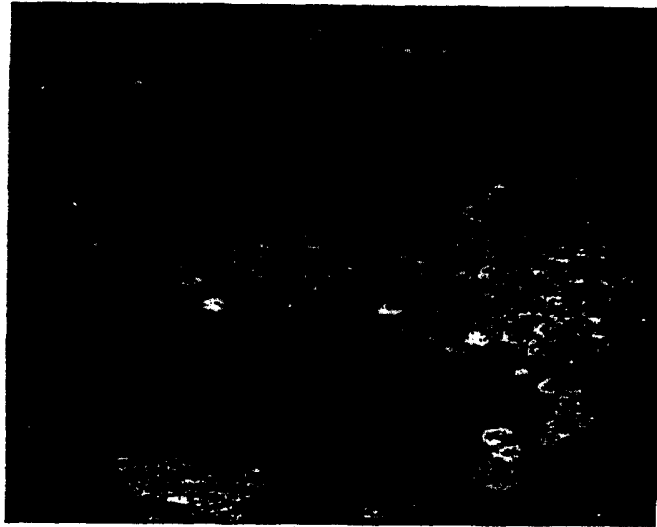


ФИГ. 7А

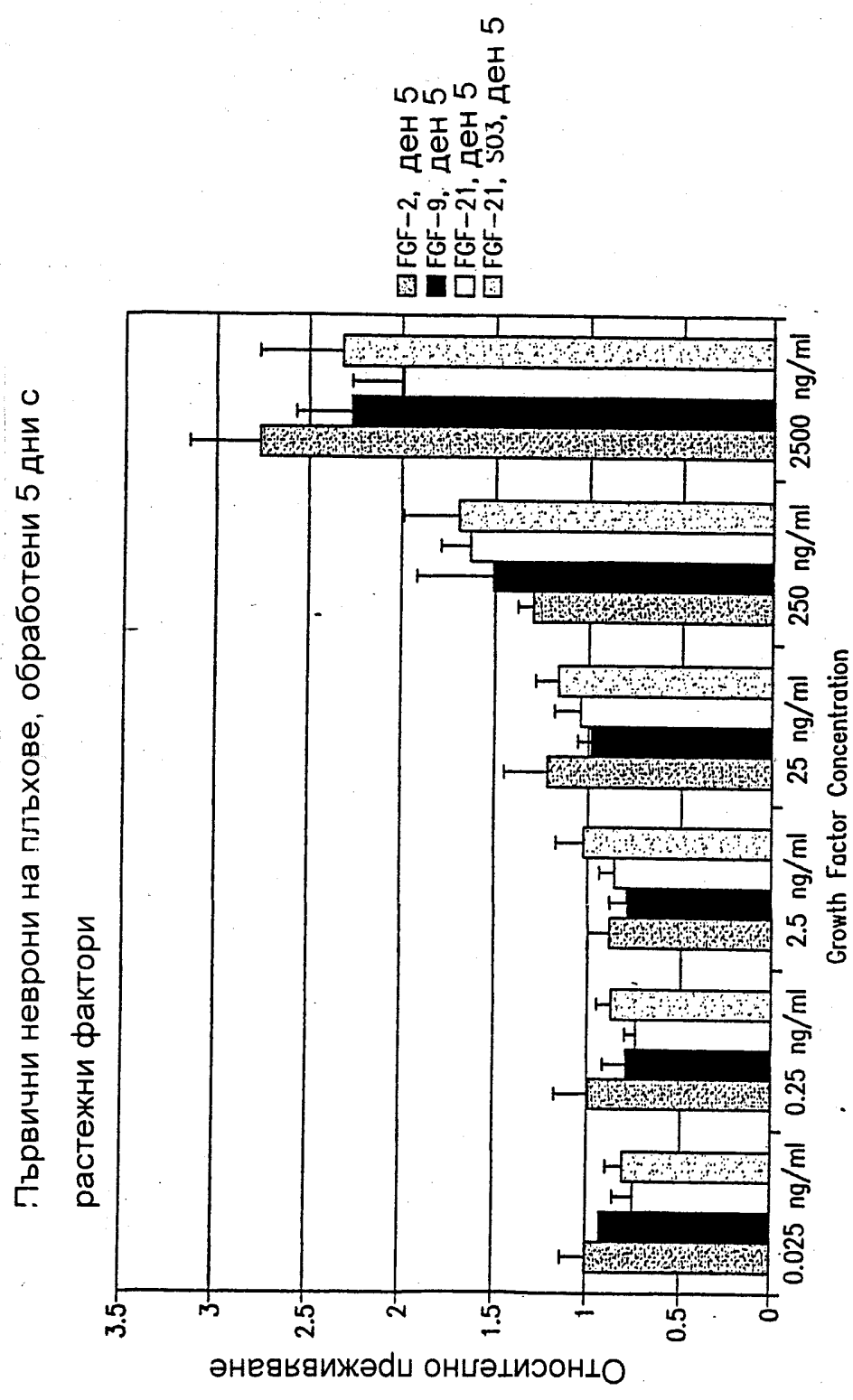


ФИГ. 7В

10/11



ФИГ. 8



ФИГ. 9