

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 464**

51 Int. Cl.:

C07K 14/51 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06818642 .8**

96 Fecha de presentación: **17.11.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1948689**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2008**

54 Título: **Mutantes de factor del crecimiento de actividad elevada**

30 Prioridad:
18.11.2005 EP 05025261

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.06.2012

73 Titular/es:
**BIOPHARM GESELLSCHAFT ZUR
BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON
PHARMAKA MBH
CZERNYRING 22
69115 HEIDELBERG, DE**

72 Inventor/es:
**POHL, Jens;
PLÖGER, Frank y
KRUSE, Michael**

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

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

ES 2 382 464 T3

DESCRIPCIÓN

Mutantes de factor del crecimiento de actividad elevada

5 La invención se refiere a mutantes de factor del crecimiento biosintéticos recombinantes novedosos que muestran actividad biológica mejorada. Dicha actividad de proteína mejorada se consigue mediante la sustitución de aminoácidos específicos de las proteínas del factor de crecimiento originales que son proteínas de origen natural de la superfamilia de factor del crecimiento transformante beta de moléculas de señalización. Las proteínas recombinantes proporcionadas en el presente documento son particularmente adecuadas para inducir regeneración, estimulación del crecimiento y diferenciación de diferentes células, tejidos y órganos. La invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican dichos mutantes de proteínas recombinantes, vectores de expresión y células hospedadoras que contienen las moléculas de ácido nucleico, anticuerpos dirigidos frente a dichos mutantes de proteína, composiciones farmacéuticas y métodos para producir los mutantes del factor de crecimiento.

15 La superfamilia de proteínas de factor del crecimiento transformante beta (TGF-beta) comprende más de 35 miembros incluyendo TGF-betas, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), activinas, inhibinas y factores de crecimiento/diferenciación (GDF). Las proteínas de la superfamilia de TGF-beta promueven la proliferación y diferenciación celular así como la formación de tejido y son relevantes para una amplia diversidad de métodos y aplicaciones de tratamiento médico. Estas moléculas diméricas actúan a través de complejos de receptor específicos que están compuestos de serina/treonina quinasas receptoras de tipo I y tipo II. Las quinasas receptoras posteriormente activan proteínas Smad, que después propagan las señales en el núcleo para regular la expresión génica diana. Las rutas de señalización independientes de Smad también se inician por estos receptores y dan como resultado de la inducción de la ruta de MAP Quinasa. Las Smad son una familia única de moléculas de transducción de señal que pueden transmitir señales directamente desde los receptores de la superficie celular al núcleo, donde las mismas regulan la transcripción interaccionando con compañeros de unión a ADN así como coactivadores y coexpresores transcripcionales.

Los miembros de esta familia de proteínas se sintetizan inicialmente como proteínas precursoras grandes que posteriormente experimentan escisión proteolítica en un grupo de restos básicos de aproximadamente 110-140 aminoácidos desde el extremo C, liberando de este modo la parte de proteína madura del extremo C del prodominio N-terminal. Todos los polipéptidos maduros están relacionados estructuralmente y contienen un dominio bioactivo conservado que comprende seis o siete restos de cisteína canónicos que son responsables del motivo tridimensional característico de "nudo de cistina" de estas proteínas

35 Los diversos miembros de superfamilia se pueden clasificar adicionalmente en subfamilias y grupos diferentes, en base al alcance de la homología/identidad de su motivo de nudo de cistina. Las familias solapantes de proteínas morfogenéticas óseas y factores del crecimiento/diferenciación (GDF) se conoce que juegan un conjunto diverso de papeles en el sistema esquelético y otros tejidos (véase, es decir Ducky y Karsenty 2000, *Kidney Int.* 57, 2207-2214 para una revisión). Especialmente GDF-5 (la proteína se conoce también como MP52, CDMP-1 o algunas veces como BMP-14), GDF-6 (CDMP-2, BMP13) y GDF-7 (CDMP-3, BMP-12) humanas se han agrupado en conjunto por varios autores debido a sus propiedades biológicas comparables y el grado extraordinariamente elevado de identidad de secuencia de aminoácidos (véase, es decir Mikic 2004, *Annals of Biomedical Engineering* 32, 466-476; Wolfman *et al.* 1997, *J. Clin. Invest.* 100, 321-330).

45 Además de las funciones prominentes del subgrupo de GDF-5/-6/-7 en la formación *de novo* de hueso y cartílago (Cheng *et al.* 2003, *J. Bone & Joint Surg. Am.* 85-A, 1544-1552; Settle *et al.* 2003, *Developm. Biol.* 254, 116-130), se ha demostrado de forma repetida que los miembros de este subgrupo también son inductores y reguladores importantes de tendones y ligamentos (Wolfman *et al.* 1997, *J. Clin. Invest.* 100, 321-330), tejidos nerviosos (Farkas *et al.* 1997, *Neurosci Lett.* 236, 120-122; Watakabe *et al.* 2001, *J. Neurochem.* 76, 1455-1464), ligamento periodontal y dientes (Sena *et al.* 2003, *J. Dent. Res.* 82, 166-171; Morotome *et al.* 1998, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 85-90) y otros tejidos.

Las estructuras de genes y proteínas de diversos BMP/GDF de origen natural incluyendo GDF-5, GDF-6 y GDF-7 se han dilucidado previamente. Se podrían identificar varios mutantes de pérdida de función de GDF-5 los cuales, es decir, conducen al acortamiento de dedos de las manos y de los pies (braquidactilia de tipo C) y otras anomalías esqueléticas tales como braquipodismo en animales (Storm *et al.* 1994, *Nature* 368, 639-643) y displasias acromesoméricas en el hombre (Thomas *et al.* 1996, *Nature Gen.* 12, 315-317). Con respecto a estos mutantes se ha observado que las sustituciones de aminoácidos específicas en las posiciones 173, 204, 400, 438, 441 y 498 de GDF-5 humana reducen o abolen completamente la función de la proteína (Schwabe *et al.* 2004, *Amer. J. Med. Genet.* 124A, 356-363). Por el contrario, se conocen hasta la fecha únicamente algunos pocos mutantes de GDF con actividad biológica potenciada. Un ejemplo raro se divulga en el documento WO01/11041 y se refiere a GDF-5 monomérico activo que carece del resto de cisteína normalmente responsable de la dimerización.

La búsqueda de las moléculas responsables de la actividad inductora de hueso, cartílago y otros tejidos ha conducido al descubrimiento de un conjunto de moléculas denominadas factores de crecimiento/diferenciación. Debido a sus actividades inductoras de tejido únicas estas proteínas se han aplicado satisfactoriamente en

investigación terapéutica y cirugía regenerativa en las cuales las mismas promueven y ayudan al proceso de curación natural de tejidos dañados, bien sea solas o en combinación con materiales de vehículo y o de matriz específicos. Sin embargo existe una necesidad enorme de desarrollar formas mejoradas y más eficaces de estas proteínas para tales propósitos.

5 Este objeto se resuelve de acuerdo con la invención proporcionando proteínas recombinantes novedosas obtenidas a partir de proteínas relacionadas con GDF-5 que muestran actividad biológica mejorada como se describe en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas.

10 Con el fin de evitar malos entendidos y ambigüedades, algunos términos usados frecuentemente en el presente documento se definen y se ilustran de la manera siguiente:

El término “dominio de nudo de cistina” como se usa en el presente documento significa la región de aminoácidos con alto contenido en cisteína bien conocida y conservada que está presente en las partes maduras de las proteínas de la superfamilia de TGF-beta tales como GDF-5 humana y que forman una estructura de proteína tridimensional conocida como nudo de cisteína. En este dominio, el emplazamiento respectivo de los restos de cisteína con respecto los unos a los otros es importante y se permite que varíe únicamente ligeramente con el fin de no perder la actividad biológica. Las secuencias de consenso para dominios de nudo de cistina se conocen en el estado de la técnica. De acuerdo con la definición definida en el presente documento el dominio de nudo de cistina de una proteína comienza con el primer resto de cisteína que participa en el nudo de cistina de la proteína respectiva y finaliza con el resto que sigue a la última cisteína que participa en el nudo de cistina de la proteína respectiva. Por ejemplo, el dominio de nudo de cistina de la proteína precursora GDF-5 humana (SEC ID N° 1) comprende los aminoácidos 400-501 (véase también la Figura 1).

25 El término “proteína relacionada con GDF-5” como se usa en el presente documento significa cualquier proteína de origen natural o creada artificialmente que comprende un dominio de nudo de cistina con una identidad de aminoácidos de al menos el 60% con el dominio de nudo de cistina de 102 aa de GDF-5 humana (aminoácidos 400-501 de Figura 1/SEC ID N° 1) y que porta un resto de metionina en una posición equivalente al resto de metionina 453 (M453) de GDF-5 humana y un resto de metionina o leucina en una posición equivalente a metionina 456 (M456) de GDF-5 humana. Se incluyen las proteínas que pertenecen al grupo de las proteínas GDF-5, GDF-6 y GDF-7 de especies de vertebrados o mamíferos así como también variantes recombinantes de las mismas siempre y cuando estas proteínas cumplan con los requerimientos mencionados anteriormente.

Los ejemplos no limitantes de proteínas no limitantes relacionadas con GDF-5 de acuerdo con la definición anterior son GDF-5 humana (divulgada como MP52 en el documento WO95/04819 y en Hötten *et al.* 1994, Biochem. Biophys. Res. Commun. 204, 646-652), GDF-5/MP52 humana recombinante (documento WO96/33215), GDF-5 de ratón (documento US 5.801.014), CDMP-1 (documento WO96/14335), MP52 humana de HMW (documento WO97/04095), GDF-5 de conejo (Sanyal *et al.* 2000, Mol Biotechnol. 16, 203-210), GDF-6/BMP-13 humana (documento US 5.658.882), GDF-6 bovina (NCBI P55106), GDF-6 de ratón (N° de acceso de NCBI NP_038554), GDF-6/CDMP-2 (documento WO96/14335), GDF-7/BMP-12 humana (documento US 5.658.882), GDF-7 de ratón (N° de acceso de NCBI AAP97721), GDF-7/CDMP-3 (documento WO96/14335), GDF-5 de pollo (N° de acceso de NCBI NP_989669), GDF-5 de *Xenopus laevis* (N° de acceso de NCBI AAT99303), GDF-5, -6 y -7 monomérica (documentos WO 01/11041 y WO99/61611), como se muestra en las Figuras 3 y 4.

45 El término “mutante ML” como se usa en el presente documento significa una proteína recombinante obtenida a partir de una proteína relacionada con GDF-5 en la que, después del alineamiento con GDF-5 humana como se ha descrito en la presente solicitud, el aminoácido equivalente a la metionina 453 (M453) de GDF-5 humana no es metionina y/o el aminoácido equivalente a metionina 456 (M456) de GDF-5 humana (SEC ID N° 1) no es metionina (N) o leucina (L).

50 La expresión “actividad biológica mejorada” como se usa en el presente documento se refiere a una actividad biológica de un mutante de ML que asciende a al menos el 120% de la actividad de la proteína no mutada respectiva.

55 La expresión “actividad biológica” indica la actividad de una proteína relacionada con GDF-5 medida mediante uno o más de los siguientes ensayos:

- a) un ensayo de fosfatasa alcalina *in vitro* (ALP), por ejemplo, como se describe en Takuwa *et al.* (1989), Am.J. Physiol. 257, E797-E803;
- 60 b) medición de supervivencia aumentada de neuronas dopaminérgicas según se describe por ejemplo por Kriegstein *et al.* 1995 (J. Neuroscience Res. 42, 724-732) o Sullivan *et al.* 1997 (Neuroscience Letters 233, 73-76);
- c) la extensión de fibras nerviosas desde la retina embrionaria medida por ejemplo, como se describe es decir en el documento WO97/03188;
- 65 d) el potencial angiogénico de estas proteínas verificado por ejemplo en un modelo de microbolsa corneal *in vivo* como se describe en Yamashita *et al.* 1997 (Exp. Cell Research 235, 218-226);

- e) efectos de proteínas relacionadas con GDF-5 sobre la diferenciación terminal de mioblastos determinada según se describe, por ejemplo, por Inada *et al* 1996 (Biochem Biophys Res Commun. 222, 317-322);
 f) ensayos *in vivo* que miden el potencial inductor de tales proteínas con referencia a tendón y ligamento, por ejemplo, como se divulga en Wolfman *et al.* 1997, J. Clin. Invest. 100, 321-330;
 g) medición de la cascada de transducción de señal a través de la activación de Smad usando un ensayo de gen informador en base a los elementos de unión a Smad que preceden al gen de luciferasa de luciérnaga, por ejemplo, como se ha descrito previamente (Nohe *et al.*, 2002. J Biol Chem. 277, 5330-5338.)

El término “variante” significa cualquiera de los siguientes polipéptidos:

- a) fragmentos biológicamente activos de una proteína
 b) construcciones de proteína que contienen secuencias adicionales en exceso a la secuencia original de la proteína
 c) cualquier combinación de a) y b)

El grupo de GDF-5/-6/-7 de la superfamilia de proteínas TGF-beta, que comprende GDF-5 como su miembro mejor caracterizado, está altamente conservado entre especies de vertebrados/mamíferos (Ducy y Karsenty 2000, Kidney Int. 57, 2207-2214). Se ha observado actualmente de forma sorprendente por medio de estudios mutacionales y otros experimentos que los restos de aminoácidos que corresponden a la metionina 453 (M453) y metionina 456 (M456) de GDF-5 humana se pueden sustituir con algunos aminoácidos especificados sin efectos negativos sobre la función de la proteína. Además, estas sustituciones incluso aumentan la actividad biológica de las proteínas de forma significativa.

Esta realización de la invención se ilustra adicionalmente mediante las Figuras 1, 2 y 3. La Figura 1 muestra la proteína precursora GDF-5 humana (Hötten *et al.* 1994, Biochem. Biophys Res. Commun. 204, 646-652) que consiste en un predominio de 381 aa (aa 1-381 incluyendo péptido señal (aa 1-27), letras en negritas) y una parte madura de 120 aa (aa 382-501). La parte madura o especialmente el dominio de nudo de cistina (aa 400-501, subrayado) son suficientes para la función biológica de la proteína. Los restos M453 y M456 (recuadros grises) están localizados dentro de este dominio de nudo de cistina. Los restos correspondientes en los dominios de nudo de cistina y otras proteínas relacionadas con GDF-5 se muestran en la Figura 2 y Figura 3 (marcados por flechas). Los restos correspondientes en proteínas no mostrados en estas figuras se pueden determinar fácilmente mediante un alineamiento de secuencia con GDF-5 humana.

Se ha observado en proteínas relacionadas con GDF-5 que cuando el resto de metionina en una posición correspondiente a metionina 453 (M453) de GDF-5 de tipo silvestre humana (SEC ID N° 1) se reemplaza con un aminoácido elegido entre alanina (A), valina (V) o isoleucina (L), la proteína recombinante resultante tiene actividad biológica aumentada.

Una realización preferida, el aminoácido elegido es valina (V) para la posición M453.

También se ha observado que cuando el resto de metionina en la posición correspondiente a la metionina 456 (M456) de GDF-5 de tipo silvestre humana (SEC ID N° 1) se reemplaza con un aminoácido elegido entre alanina (A), valina (V) o isoleucina (L), de forma independiente o en combinación con un reemplazo de M453, la proteína recombinante resultante tiene actividad biológica aumentada.

En una realización preferida, el aminoácido elegido es valina (V) para la posición M456.

Estos mutantes ML de proteínas relacionadas con GDF-5 en los que los equivalentes de M453 y/o M456 se sustituyen con los aminoácidos especificados anteriormente muestran una actividad biológica que aventaja enormemente la actividad de las proteínas no mutadas respectivas.

Como un ejemplo, la Figura 5 muestra la capacidad potenciada del mutante de ML de hGDF-5 M453V/M456V de inducir fosfatasa alcalina *in vitro*. La proteína mutante muestra una actividad biológica del 585,5% (a 133 ng/ml), el 356,3% (a 400 ng/ml) y el 236,3% (a 1.200 ng/ml) de la actividad de la proteína de tipo silvestre (rh-GDF-5) en este ensayo (promedio de múltiples experimentos). Por tanto, la actividad promedio es $585,5 + 356,3 + 236,3 : 3 = 392,7\%$ de la actividad de la proteína de tipo silvestre (rh-GDF-5). La actividad mínima medida para el mutante a una concentración de proteína única y en un experimento único fue el 150% de la actividad de la proteína de tipo silvestre.

Por tanto, los mutantes ML que muestran una actividad biológica mejorada que asciende a al menos el 120% de la actividad de la proteína no mutada respectiva están incluidos en la invención. Son especialmente preferidos los mutantes ML relacionados con GDF-5 con actividades biológicas mejoradas de al menos el 150%, preferentemente el 160%, más preferentemente al menos el 170%, más preferentemente al menos el 180% y lo más preferente es que sea al menos el 200% de la actividad biológica de la proteína no mutada respectiva.

Las actividades biológicas de proteínas relacionadas con GDF-5 y mutantes ML de las mismas, es decir, en el

campo de inducción de hueso, cartílago y tejido conectivo tal como, es decir, ligamento periodontal se puede determinar fácilmente con la ayuda de sistemas de ensayo preestablecidos. El más útil y preferido es un ensayo *in vitro* común conocido como ensayo de fosfatasa alcalina (ALP) (Takuwa *et al.* 1989, Am. J. Physiol. 257, E797-E803), que también se demuestra en el ejemplo 2 / Figura 5. Se ha demostrado que las proteínas relacionadas con GDF-5 aumentan la actividad de fosfatasa alcalina, es decir, en células osteoprogenitoras ROB-C26 (Yamaguchi *et al.* 1991, Calcif. Tissue Int. 49, 221-225) como se describe en el documento W095/04819, en células ATDC5 embrionarias (Riken Gene Bank, ROB 0565), en células MCHT-1/26 estromales de ratón y en células de ligamento periodontal (HPDL) como se muestra en Nakamura *et al.* 2003, J. Periodontal Res. 38,597-605.

Las proteínas relacionadas con GDF-5 como se define en el presente documento comprenden un dominio de nudo de cistina con una identidad de aminoácidos de al menos el 60%, preferentemente al menos el 75%, más preferentemente al menos el 80%, más preferentemente al menos el 90% y lo más preferente es que sea al menos el 95%, con el dominio de nudo de cistina de 102 aa de GDF-5 humana. Un valor limitante del 60% es bien adecuado para separar los miembros del grupo GDF-5/-6/-7 de proteínas así como variantes del mismo de proteínas adicionales tales como otros GDF-5 y BMP. Una comparación de los dominios de nudo de cistina de 102 aa de GDF-5 humana, GDF-6 humana y GDF-7 humana (Figura 2) muestra el alto grado de identidad de aminoácidos entre estas proteínas. GDF-6 humana comparte 87 (el 85%) y GDF-7 humana 83 (el 81%) restos idénticos con el dominio de nudo de cistina de GDF-5 humana. Los dominios respectivos de moléculas de GDF-5/-6/-7 a partir de otras especies de vertebrados y mamíferos que se han identificado hasta ahora también muestran porcentajes de identidad muy elevados de al menos el 75% (entre el 79% y el 99%), cuando se comparan con GDF-5 humana (Figura 4). Por el contrario, los GDF y BMP que no pertenecen al subgrupo de GDF-5/-6/-7 presentan valores de identidad mucho más bajos por debajo del 60%.

La determinación de posiciones de aminoácido en secuencias de aminoácidos relacionadas así como el cálculo o porcentaje de identidad entre los mismos se puede realizar con la ayuda de algoritmos de alineamiento bien conocidos y opcionalmente programas informáticos que usan estos algoritmos. Las identidades de aminoácido en esta solicitud de patente se han calculado mediante el alineamiento de secuencias con el programa gratuito ClustalX (Versión 1.81) con parámetros por defecto y recuento posterior de restos idénticos manualmente. Los ajustes por defecto para alineamiento por pares (baja precisión) son: parámetro de apertura de hueco: 10,00; parámetro de extensión de hueco 0,10; matriz de peso de Proteína: Gonnet 250. El programa ClustalX se describe con detalle en:

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 24:4876-4882

ClustalX es una interfaz de Windows para el programa de alineamiento múltiple de secuencias ClustalW y está, es decir, disponible a partir de diversas fuentes, es decir mediante ftp anónimo de ftp-igbmc.u-strasbg.fr, ftp.embl-heidelberg.de, ftp.ebi.ac.uk o a través de la descarga a partir de la siguiente página web: <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/>. El programa ClustalW y el algoritmo también se describen en detalle en:

Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22:4673-4680.

Los mutantes ML de acuerdo con la invención que se obtienen a partir de proteínas relacionadas con GDF-5 generalmente son aplicables en cualquier indicación en la cual proteínas relacionadas con GDF-5 tales como GDF-5, GDF-6 y GDF-7 también son útiles. Se ha demostrado que proteínas relacionadas con GDF-5 son inductoras y reguladoras/diferenciadoras importantes de, es decir, hueso y cartílago (Cheng *et al.* 2003, J. Bone & Joint Surg. Am. 85-A, 1544-1552; Settle *et al.* 2003, Developm. Biol. 254, 116-130), tejido conectivo tal como tendón y ligamento (Wolfman *et al.* 1997, J. Clin. Invest. 100, 321-330), tejido nervioso (Farkas *et al.* 1997, Neurosci Lett. 236,120-122; Watakabe *et al.* 2001, J. Neurochem. 76, 1455-1464), células madre (Shimaoka *et al.* 2003, J. Biomed. Materials Res. Part A 68A, 168-176; Bal *et al.* 2004, Biochem. Biophys. Res. Commun. 325, 453-460) y ligamento periodontal y dientes (Sena *et al.* 2003, J. Dent. Res. 82, 166-171; Morotome *et al.*, 1998, Biochem. Biophys. Res. Commun. 244, 85-90).

Los mutantes ML de la presente invención comprenden una secuencia que coincide con una de las siguientes secuencias de aminoácidos genéricas

a)
CX₁X₂KX₃LHVX₄FX₅X₆X₇GWDDWX₈IAPLX₉YEAX₁₀HGX₁₁GX₁₂CX₁₃FPX₁₄RSHPLEPTNHAX₁₅
IQTLZTNSMX₁₆PX₁₇X₁₈X₁₉PX₂₀X₂₁CCVPX₂₂X₂₃LX₂₄PISILX₂₅X₂₆DX₂₇X₂₈NNVVY
X₂₉X₃₀YEX₃₁MVVEX₃₂CGCR o

b) CX₁X₂KX₃LHVX₄FX₅X₆X₇GWDDWX₈IAPLX₉YEAX₁₀HGX₁₁GX₁₂CX₁₃FPX₁₄RSH LEPTNHAX₁₅
IQTLMNSZ₁₆PX₁₇X₁₈X₁₉PX₂₀X₂₁CCVPX₂₂X₂₃LX₂₄PISILX₂₅X₂₆DX₂₈NNVVYX₂₉X₃₀YEX₃₁MVVEX₃₂CGCR o
c) CX₁X₂KX₃LHVX₄FX₅X₆X₇GWDDWX₈IAPLX₉YEAX₁₀HGX₁₁GX₁₂CX₁₃FPX₁₄RSH LEPTNHAX₁₅

IQTLZ₁NSZ₂X₁₆PX₁₇X₁₈X₁₉PX₂₀X₂₁CCVPX₂₂X₂₃LPISILX₂₅X₂₆DX₂₇X₂₈NNVV
YX₂₉X₃₀YEX₃₁MVEX₃₂CGCR

y en la que

- 5 cada X indica cualquier aminoácido,
- Z₁ indica alanina (A), isoleucina (I) o valina (V),
Z₂ indica alanina (A), isoleucina (I) o valina (V).
- 10 y en la que
- X₁ indica asparagina (N) o serina (S)
- 15 X₂ indica arginina (R) o lisina (K)
- X₃ indica alanina (A), glutamina (Q), prolina (P) o serina (S)
- X₄ indica asparagina (N) o ácido aspártico (D)
- 20 X₅ indica arginina (R) o lisina (K)
- X₆ indica ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E)
- 25 X₇ indica leucina (L) o metionina (M)
- X₈ indica isoleucina (I) o valina (V)
- X₉ indica ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E)
- 30 X₁₀ indica histidina (H), fenilalanina (F) o tirosina (Y)
- X₁₁ indica ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E)
- 35 X₁₂ indica leucina (L), metionina (M) o valina (V)
- X₁₃ indica ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E)
- X₁₄ indica isoleucina (I) o leucina (L)
- 40 X₁₅ indica isoleucina (I) o valina (V)
- X₁₆ indica alanina (A), asparagina (N) o ácido aspártico (D)
- 45 X₁₇ indica arginina (R), asparagina (N), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), glicina (G) o serina (S)
- X₁₈ indica alanina (A), asparagina (N), serina (S) o treonina (T)
- X₁₉ indica alanina (A), metionina (M) o treonina (T)
- 50 X₂₀ indica alanina (A) o prolina (P)
- X₂₁ indica serina (S) o treonina (T)
- 55 X₂₂ indica alanina (A), serina (S) o treonina (T)
- X₂₃ indica arginina (R) o lisina (K)
- X₂₄ indica serina (S) o treonina (T)
- 60 X₂₅ indica fenilalanina (F) o tirosina (Y)
- X₂₆ indica isoleucina (I) o treonina (T)
- 65 X₂₇ indica alanina (A) o serina (S)
X₂₈ indica alanina (A) o glicina (G)

	X ₂₉	indica asparagina (N) o lisina (K)
	X ₃₀	indica ácido glutámico (E) o glutamina (Q)
5	X ₃₁	indica ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E),
	X ₃₂	indica alanina (A), glutamina (Q), serina (S) o treonina (T)
	Z ₁	indica alanina (A), isoleucina (I) o valina (V),
10	Z ₂	indica alanina (A), isoleucina (I) o valina (V),

o una secuencia correspondiente en la que la cisteína responsable de la formación de dímeros se sustituye por un aminoácido diferente o se suprime.

Estas secuencias genéricas se han compilado a partir de una comparación de los dominios de nudo de cistina de secuencias de GDF-5, GDF-6 y GDF-7 de vertebrado de acuerdo con la Fig. 3. Las posiciones que no están conservadas en las proteínas alineadas se indican con una X en las secuencias genéricas. Las posiciones que están mutadas de acuerdo con la presente invención se indican con una Z.

En otra realización preferida, la proteína mutante de ML de acuerdo con la invención es un mutante de ML de una proteína GDF-5 de vertebrado o recombinante o una variante de la misma. Más preferidos son los mutantes ML de una proteína GDF-5 de mamífero o variantes de la misma. Los ejemplos de proteínas GDF-5 de vertebrados y mamíferos son: GDF-5 humana (divulgada como MP52 en el documento WO95/04819 y como GDF-5 humana en Hotten *et al.* 1994, Biochem. Biophys Res. Commun. 204, 646-652), GDF-5/MP52 humana recombinante (documento WO96/33215), MP52 humanas de HMW (documento WO97/04095), CDMP-1 (documento WO96/14335), GDF-5 de ratón (*Mus musculus*) (documento US. 5.801.014), GDF-5 de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) (Sanyal *et al* 2000, Mol Biotechnol. 16, 203-210), GDF-5 de pollo (*Gallus gallus*) (Nº de acceso de NCBI NP_989669), GDF-5 de rana africana de uñas (*Xenopus laevis*) (Nº de acceso de NCBI AAT99303).

Otra realización preferida de la invención incluye proteínas mutantes ML de proteínas relacionadas con GDF-5 monoméricas. En estas proteínas monoméricas, la cisteína que es responsable de la formación de dímero se sustituye por otro aminoácido o se suprime. Tales proteínas se describen, por ejemplo, en los documentos WO 01/11041 y WO 99/61611, que se incorporan en el presente documento por referencia. Una proteína monomérica especialmente preferida es GDF - 5 monomérica recombinante como se divulga en dicha referencia.

En estas realizaciones se incluyen también mutantes ML de versiones alélicas de los genes/proteínas mencionados anteriormente así como mutantes ML de las proteínas de vertebrado, de mamífero y recombinantes o variantes de las mismas que tienen mutaciones adicionales tales como sustituciones, adiciones y supresiones, siempre y cuando estas mutaciones adicionales no tengan un efecto básico sobre la actividad de la proteína y cumplan los requisitos de las reivindicaciones.

En general, el mutante de ML de la proteína GDF-5 de vertebrado o de mamífero o recombinante o variantes de la misma se espera que muestre todas las actividades descritas previamente de GDF-5 y se puede aplicar donde quiera que se usen de forma satisfactoria las formas de GDF-5 de tipo silvestre y recombinante mencionadas anteriormente. Por ejemplo, se considera que GDF-5 es un promotor muy eficaz de formación de hueso y de cartílago así como también de formación de tejido conectivo (véase por ejemplo el documento WO 95/04819, Hötten *et al.* 1996, Growth Factors 13, 65-74; Storm *et al.* 1994, Nature 368, 639-643; Chang *et al.* 1994, J. Biol. Chem. 269, 28227-28234) y la formación de unión de tejido conectivo (documento EP 0 831 884). En este contexto, GDF-5 es útil para aplicaciones que se refieren a articulaciones entre elementos esqueléticos (véase por ejemplo Storm & Kingsley 1996, Development 122, 3969-3979). Un ejemplo para tejido conectivo es tendón y ligamento (Wolfman *et al.* 1997, J. Clin. Invest. 100, 321-330; Aspenberg & Forslund 1999, Acta Orthop Scand 70, 51-54; documento WO 95/16035). La proteína es útil para reparación de menisco y de disco espinal/intervertebral (Walsh *et al.* 2004, Spine 29, 156-63) y aplicaciones de fusión espinal (Spiro *et al* 2000, Biochem Soc trans. 28, 362-368). GDF-5 se puede aplicar de forma beneficiosa en aplicaciones dentales (dental y periodontal) (véanse por ejemplo, los documentos WO 95/04819; WO 93/16099; Morotome *et al.* 1998, Biochem Biophys Res Comm 244, 85-90) tal como la regeneración de dentina o ligamento periodontal.

GDF-5 también es útil en la reparación de heridas de cualquier tipo. También es beneficioso para promover crecimiento de tejido en el sistema neuronal y en la supervivencia de, por ejemplo, neuronas dopaminérgicas. En este contexto, GDF-5 se puede usar para tratar trastornos neurodegenerativos como, por ejemplo, enfermedad de Parkinson y posiblemente también enfermedad de Alzheimer o tejidos de Corea Huntington (véase por ejemplo, el documento WO 97/03188; Krieglstein *et al.*, (1995) J. Neurosci Res 42, 724-732; Sullivan *et al.*, (1997) Neurosci Lett 233, 73-76; Sullivan *et al* (1998), Eur. J Neurosci 10, 3681-3688). GDF-5 permite mantener la función nerviosa o conservar la función nerviosa en tejidos ya dañados. Por lo tanto GDF-5 se considera que es un factor neurotrófico aplicable de forma general.

También es útil para enfermedades del ojo, en particular retina, córnea y nervio óptico (véase por ejemplo el documento WO 97/03188; You *et al* (1999), Invest Ophthalmol Vis Sci 40, 296-311), para el crecimiento del pelo y el tratamiento y diagnóstico de trastornos relacionados con la piel (documento WO 02/076494; Battaglia *et al* 2002, Trans. Orthop. Res Soc. 27, 584) y para inducción de angiogénesis (Yamashita *et al.* 1997, Exp. Cell, Res 235, 218-26).

Por otra parte, existe la prevención o la terapia de enfermedades asociadas con daño óseo y/o de cartílago o que influyen sobre enfermedad ósea y/o de cartílago o situaciones en general en las cuales se desea la formación de cartílago y/o de hueso o para fusión espinal y por otra parte, existe la prevención o terapia de tejido dañado o enfermo asociado con tejido conectivo incluyendo tendón y/o ligamento, tejido periodontal o dental incluyendo implantes dentales, tejido neuronal incluyendo tejido del SNC y situaciones neuropatológicas, tejido del sistema sensorial, hígado, páncreas, cardíaco, vasos sanguíneos, renal, uterino y tejido tiroideo, piel, membranas mucosas, endotelio, epitelio, para promoción o inducción de crecimiento nervioso, regeneración tisular, angiogénesis, curación de heridas incluyendo úlceras, quemaduras, lesiones o injertos de piel, inducción o proliferación de células progenitoras o células de médula ósea, para el mantenimiento de un estado de proliferación o diferenciación para el tratamiento o conservación de tejidos o células para trasplante de órgano o tejido, para la integridad del revestimiento gastrointestinal, para tratamiento de alteraciones en la fertilidad, anticoncepción o embarazo.

Las enfermedades relacionadas con órganos sensoriales como el ojo también se deben incluir en la indicación preferida de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención. Como enfermedades neuronales, nuevamente se pueden mencionar como ejemplos las enfermedades de Parkinson y Alzheimer.

El Ejemplo 3 y la FIG. 6 describen los resultados de un ensayo de fosfatasa alcalina con GDF-5 humana recombinante (documento WO96/33215) y el mutante de ML M453V/M456V de GDF-5 humana recombinante (rhGDF-5). GDF-5 humana recombinante se usó como patrón/control con actividad biológica del 100%. La proteína mutante muestra una actividad biológica del 585,5% (a 133 ng/ml), el 356,3% (a 400 ng/ml) y el 236,3% (a 1200 ng/ml) de la actividad de la proteína de tipo silvestre (rh-GDF-5) en este ensayo (promedio de múltiples experimentos). Por tanto, la actividad promedio es $585,5 + 356,3 + 236,3 : 3 = 392,7\%$ de la actividad de la proteína de tipo silvestre (rh-GDF-5). La actividad mínima medida para el mutante a una concentración de proteína única y en un experimento único fue el 150% de la actividad de la proteína de tipo silvestre.

Los mutantes ML de acuerdo con la invención se pueden producir fácilmente en diversos sistemas de expresión procariotas y eucariotas, en particular mediante expresión en procariotas y posterior renaturalización/replegamiento de acuerdo con métodos conocidos (véase, por ejemplo el documento WO96/33215).

Una materia objeto adicional de la presente invención es un ácido nucleico que codifica un mutante de ML de acuerdo con la invención. El ácido nucleico tiene una secuencia de forma que se consiga una sustitución de uno o ambos restos equivalentes a M453 y M456 de GDF-5 humana con uno de los aminoácidos especificados de la presente solicitud. Los tripletes de bases que codifican estos aminoácidos y la degeneración del código genético se conocen de forma general. El ácido nucleico puede ser una secuencia de ADN y/o una secuencia de ARN, siempre y cuando la proteína de acuerdo con la invención se pueda obtener a partir de este ácido nucleico tras la expresión en un sistema adecuado.

Los vectores de expresión son una materia objeto adicional de la presente invención, en los que el ácido nucleico se inserta en un sistema de vector adecuado, seleccionándose el sistema de vector de acuerdo con la expresión deseada de la proteína. El sistema de vector puede ser un sistema de vector eucariota, pero se prefiere un sistema de vector procariota, con lo cual las proteínas se pueden producir de una manera particularmente fácil y pura. Un vector de expresión adecuado se muestra, por ejemplo, en el documento WO96/33215. El vector de expresión también puede ser un vector viral que se puede usar, es decir, en enfoques de terapia génica.

Las células hospedadoras también son una materia objeto de la presente invención. Las células hospedadoras se caracterizan porque las mismas contienen un ácido nucleico o un vector de expresión de acuerdo con la invención y las mismas son capaces de usar la información presente en los ácidos nucleicos y en el vector de expresión, respectivamente, para la expresión de mutantes ML de acuerdo con la invención. Las células hospedadoras adecuadas son preferentemente células procariotas, en particular la mayoría de las cepas de *E. coli*. Las cepas hospedadoras particularmente útiles son descendientes de *E. coli* W3110 como se muestra, por ejemplo, en el documento WO96/33215. En una realización preferida, las células hospedadoras, preferentemente de origen humano, también pueden ser útiles para trasplante a pacientes que las necesitan.

Otra materia objeto de la presente invención son anticuerpos frente a mutantes ML. Estos anticuerpos de acuerdo con la presente invención son específicos para el mutante de ML recombinante reivindicado. Los mismos son específicos para las regiones de nudo de cistina de proteínas relacionadas con GDF-5 que contienen uno o más de los reemplazos de aminoácidos descritos en el presente documento. Los anticuerpos son específicos para una región de una proteína recombinante obtenida a partir de una proteína relacionada con GDF de acuerdo con la invención que abarca los aminoácidos 453-456. Estos anticuerpos de acuerdo con la presente invención se pueden generar usando aquellos fragmentos de la proteína de la invención como se ha descrito anteriormente como

inmunógenos para generar anticuerpos mediante métodos conocidos. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y los mismos pueden ser de cualquier isotipo. También están comprendidos fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos Fab o fragmentos Fab2. Los anticuerpos también pueden ser anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos etc.

Materias objeto adicionales de la presente solicitud son composiciones farmacéuticas y/o de diagnóstico que comprenden al menos un mutante de ML de una proteína relacionada con GDF-5 o un ácido nucleico o un vector o una célula hospedadora de acuerdo con la invención. En general son adecuadas todas las composiciones farmacéuticas que se han publicado en el contexto de proteínas relacionadas con GDF-5. Un vector de expresión o una célula hospedadora se puede considerar que es provechosa como sustancias activas en una composición farmacéutica y/o de diagnóstico. También las combinaciones de una proteína de acuerdo con la invención con otras proteínas se pueden usar en composiciones farmacéuticas preferidas. Especialmente preferidas para aplicaciones neuronales son las combinaciones con otras proteínas de la superfamilia de TGF-beta tales como, por ejemplo GDNF (véase el documento WO 97/03188). Para aplicaciones que se refieren a cartílago y/o hueso la combinación con BMP en general o con una proteína inductora del mantenimiento de cartílago tal como BMP-9 (véase por ejemplo, el documento WO 96/39170) es útil. Las combinaciones con otras proteínas tales como, por ejemplo, NGF, BDNF, EGF, PDGF, NT-3, -4, -5, cordina y/o proteínas hedgehog también son posibles (véase por ejemplo, el documento WO97/03188). Por supuesto la presente invención también comprende composiciones farmacéuticas que contienen sustancias adicionales como, por ejemplo, sustancias auxiliares y de vehículo farmacológicamente aceptables. La formulación puede incluir antioxidantes, conservantes, agentes colorantes, saporíferos y emulsificantes, agentes de suspensión, disolventes, cargas, agentes de volumen, tampones, vehículos de administración, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Por ejemplo, un medio de soporte o vehículo adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o una solución salina mezclada con una proteína transportadora adecuada tal como albúmina sérica. Un antioxidante preferido para la preparación de la composición de la presente invención es ácido ascórbico.

Las composiciones cosméticas conocidas en la técnica, preferentemente hipoalergénicas y de pH controlado son especialmente preferidas e incluyen aguas de tocador, empaques, lociones, leches para la piel o lociones lechosas. Dichas preparaciones contienen, además del compuesto activo, componentes usados habitualmente en tales preparaciones. Los ejemplos de tales componentes son aceites, grasas, ceras, tensioactivos, humectantes, agentes espesantes, antioxidantes, estabilizantes de viscosidad, agentes quelantes, tampones, conservantes, perfumes, colorantes, alcoholes inferiores y similares. Si se desea, se pueden incorporar ingredientes adicionales en las composiciones, por ejemplo, agentes antiinflamatorios, antibacterianos, antifúngicos, desinfectantes, vitaminas, protectores solares, antibióticos u otros agentes antiacné.

El disolvente o diluyente de la composición farmacéutica puede ser acuoso o no acuoso y puede contener otros excipientes farmacéuticamente aceptables que son capaces de modificar y/o mantener un pH, osmolaridad, viscosidad, transparencia, escala, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución u olor de la formulación. De forma similar otros componentes se pueden incluir en la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención con el fin de modificar y/o mantener la velocidad de liberación de la sustancia farmacéuticamente eficaz. Tales componentes modificadores son sustancias usadas habitualmente en la técnica con el fin de formular dosis para administración parenteral en forma unitaria o multidosis. La composición farmacéutica y/o de diagnóstico formulada finalmente preparada de acuerdo con la presente invención se puede almacenar en viales estériles en forma de una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o polvo deshidratado o liofilizado. Estas formulaciones se pueden almacenar en una forma lista para su uso o en una forma, por ejemplo, en el caso de un polvo liofilizado, que requiere la reconstitución antes de la administración. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas anteriores y adicionales se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, Gus Remington Pharmaceutical Sciences (18ª Ed., Mack Publishing Co., Eastern, Pa., 1990, 1435-1712). Tales formulaciones pueden influir sobre el estado fisiológico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y velocidad de eliminación *in vivo* del componente farmacéuticamente eficaz. Otras formas de administración eficaces comprenden formulaciones parenterales de liberación lenta, es decir, retardada, formulaciones, brumas para inhalación o formulaciones activas por vía oral. Por ejemplo, una formulación de liberación lenta puede comprender proteínas unidas o incluidas en preparaciones particuladas de compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc.) o liposomas. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención también se puede formular para administración parenteral, por ejemplo, mediante infusión o inyección y también puede incluir formulaciones de liberación lenta o de circulación sostenida. Tales composiciones terapéuticas administradas por vía parenteral típicamente están en forma de soluciones acuosas sin pirógenos parenteralmente aceptables que comprenden el componente o los componentes farmacéuticamente eficaces en un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica puede comprender un material de matriz, es decir, en casos en los que la regeneración de hueso o cartílago se pretende. Es provechoso para la proteína, el ácido nucleico, el vector de expresión o la célula hospedadora cuando los mismos se aplican en y/o sobre un material de matriz biocompatible. El material de matriz usado en el presente documento significa un vehículo o matriz que actúa como un almacén para el reclutamiento, la fijación, la proliferación y diferenciación celular y/o como un dispositivo de administración potencial y almacenamiento para mutantes ML de proteínas relacionadas con GDF-5. Por el contrario a las matrices sólidas, los vehículos consisten en materiales amorfos que no tienen superficies definidas y que carecen de una forma

específica, es decir, alquilcelulosa, plurónicos, gelatinas, polietilen glicoles, dextrinas, aceites vegetales, azúcares y otras sustancias líquidas y viscosas.

Los usos de las proteínas relacionadas con GDF-5 o morfógenos similares tales como BMP en combinación con materiales de matriz se han publicado y descrito de forma exhaustiva, tal como por ejemplo en el documento WO98/21972. Estos materiales de matriz son igualmente adecuados para mutantes ML de acuerdo con la invención. El material de matriz se puede trasplantar al paciente, por ejemplo, quirúrgicamente, donde la proteína o el ADN que codifica la proteína se puede liberar lentamente a partir del material de matriz y después ser eficaz durante un período de tiempo prolongado. Todos los tipos de materiales de matriz son útiles de acuerdo con la presente invención, siempre y cuando los mismos sean biocompatibles y se seleccionen para el área o indicación de uso pretendidos. El material de matriz puede ser un material natural, un material natural modificado, así como un material sintético. Todas las matrices conocidas para proteínas morfogenéticas están incluidas. Los ejemplos de materiales naturales son, por ejemplo, materiales óseos autólogos, heterólogos o xenólogos, colágeno, por ejemplo, colágeno de tipo I y III o metales como titanio. También se pueden usar otros componentes de la matriz extracelular. La matriz extracelular comprende por ejemplo los diversos colágenos, tales como por ejemplo los tipos I, II, V, IX, X, XI y XIII, proteoglicanos y glicosaminoglicanos adicionales, como por ejemplo condroitinsulfato, biglicano, decorina y/o ácido hialurónico o proteínas no colágenas tales como por ejemplo osteonectina, laminina, fibronectina, vitronectina, trombospondina, proteína de matriz de cartilago y fosfoproteína de dentina. Todos los materiales naturales mencionados también se pueden usar en formas modificadas artificialmente. Los ejemplos de materiales naturales modificados son hueso desmineralizado, mineral óseo incinerado, hueso sinterizado o ácido hialurónico químicamente reticulado (hidrogel) o aleaciones metálicas. Los ejemplos de materiales sintéticos son polímeros como ácido poliglicólico, poliláctido y derivados de poliláctido tales como, por ejemplo, ácido poliláctico, poli(láctido-co-glicólido), ácido poliláctido-polietilenglicol o copolímeros de glicólido L-láctido, polifosfatos adicionales, polietilenglicol, copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno o materiales que contienen fosfatos de calcio tales como fosfato beta tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), fosfato alfa-tricálcico y apatita de hidroxilo. Los ejemplos adicionales de otros materiales de matriz útiles que pertenecen a uno de los grupos mencionados anteriormente son $\text{Ca}(\text{OH})_2$, coral, mineral óseo natural, quitina, partículas óseas no desmineralizadas, partículas óseas cerámicas, dentina cerámica, trozos de hueso esponjoso irradiado, yeso de París, vidrio bioactivo, vitrocerámica que contiene apatita-wollastonita. También una combinación de los vehículos y/o matrices mencionados anteriormente puede formar el material de matriz como por ejemplo la combinación de hidroxiapatita y colágeno (por ejemplo, Healos, disponible previamente en Orquest, Inc., CA, USA, [ahora DePuy Acromed, MA, USA]), una combinación de ácido poliglicólico y ácido poliláctico o derivados de poliláctido o compuestos de coral-colágeno. Para una lista no limitante de vehículos y matrices útiles véase adicionalmente, por ejemplo, Kirker-Head 2000, Advanced Drug Delivery 43, 65-92.

Los siguientes ejemplos no limitantes junto con las figuras y protocolos de secuencia tienen por objeto ilustrar adicionalmente la invención.

Las SEC ID N° 1 y 2 muestran la secuencia de ADN y proteínas del precursor de GDF-5 humana. En los mutantes de proteína GDF-5 humana preferidos con actividad biológica mejorada, el resto de metionina en la posición 453 y/o el resto de metionina en la posición 456 se sustituyen con otros aminoácidos.

La FIG. 1 muestra características adicionales de la proteína precursora de GDF-5 humana de acuerdo con SEC ID N° 1:

aa 001-381	pre-prodominio (letras en negritas)
aa 382-501	parte de la proteína madura
aa 400 501	dominio de nudo de cistina (subrayado)
aa 453	Resto de metionina 453 (recuadro gris)
aa 456	Resto de metionina 456 (recuadro gris)

La FIG. 2 muestra una comparación de los dominios de nudo cistina de 102 aa de GDF-5 humana (SEC ID N° 1), GDF-6 humana (secuencia 2 de la patente de los Estados Unidos 5.658.882) y GDF-7 humana (secuencia 26 de la patente de Estados Unidos 5.658.882). Los restos de aminoácido que son idénticos en las tres moléculas se resaltan en negro. Los restos M453 y M456 de GDF-5 humana y los restos equivalentes de GDF-6 y GDF-7 humana se marcan mediante flechas.

La FIG. 3 muestra una comparación de los dominios de nudo de cistina de 102 aa de secuencias de GDF-5, -6 y -7 de vertebrado del género *Homo*, además *Cercopithecus*, *Macaca*, *Bos*, *Mus*, *Gallus Danio* y *Xenopus*, que están disponibles en la base de datos de proteínas de NCBI de "Entrez" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>) con los números de acceso mostrados en la figura. Los restos de M453 y M456 de GDF-5 humana y restos equivalentes de otras proteínas están marcados mediante flechas.

La FIG. 4 muestra una tabla con las identidades de secuencia de los dominios de nudo de cistina de BMP y GDF conocidos para el dominio de nudo de cistina de GDF-5 humana.

La FIG. 5 muestra los resultados de un ensayo de fosfatasa alcalina (ALP) con GDF-5 humana recombinante (rh-

GDF-5) y mutante de ML de hGDF-5 M453V/M456V (como se describe en el ejemplo 2).

La FIG. 6 muestra cortes histológicos (tinción de Rojo de Alizarina-S de calcio formado recientemente) y tomografías computarizadas μ CT de estructuras tratadas con factor del crecimiento 4 semanas después del implante en ratones SCID de acuerdo con el ejemplo 3.

La FIG. 7 muestra una estimación de la formación ósea nueva de las estructuras de acuerdo con el ejemplo 3. En cada grupo, se examinaron tres animales ($n = 3$) y se determinó un valor acumulado. Se usó la siguiente escala:

sin hueso	0
1-10% de hueso	1
10-50 % de hueso	2
50-100 % de hueso	3

10 **Ejemplo 1: Creación, expresión y purificación de mutantes ML**

Los ADN que codifican las partes maduras de proteínas GDF-5 humana, GDF-6 humana y GDF-7 humana se han aislado a partir de células osteoprogenitoras ROB-C26 humanas (Yamaguchi *et al.* 1991, *Calcif. Tissue Int.* 49, 221-225) a través de técnica de RT-PCR y posteriormente se han ligado en vectores plasmídicos procariotas. Con el fin de identificar restos de aminoácido funcionalmente importantes en las partes maduras de GDF-5, 6 y 7, se han introducido diversas mutaciones únicas en estas secuencias a través de mutagénesis dirigida. Todas las mutaciones individuales se crearon usando el kit de mutagénesis dirigida QuickChange™ con la ADN polimerasa PfuTurbo™ y la endonucleasa DPN I de Stratagene de acuerdo con el manual de instrucción del fabricante.

Usando la cepa bacteriana W3110BP transformada con los plásmidos e inducida con IPTG, las proteínas se expresaron en cuerpos de inclusión. Estos cuerpos de inclusión se aislaron usando un tampón de homogeneización (Tris HCl 25 mM pH 7,3, EDTA NaOH 10 mM, pH 8, urea 8 M) y tampón de lavado (urea 1 M, Tris HCl 20 mM, pH 8,3, EDTA NaOH 10 mM, pH 8,0) de acuerdo con procedimientos convencionales. La purificación adicional se llevó a cabo en una columna de fase inversa Aquapore octilo (Applied Biosys, (VC = 7,8 ml) 100 x 10, 20 μ , N° 186470) con un gradiente del 100% de eluyente A (TFA al 0,1%, HPLC H₂O) al 100% de eluyente B (TFA al 0,1%, CH₃N al 90%, HPLC H₂O) en 104 minutos (caudal: 3 ml/min). Después de un control con transferencia de western, las fracciones que contenían la proteína mutante se combinaron y se liofilizaron.

Las proteínas mutantes se disolvieron en tampón de disolución (guanidina HCl 6 M, Tris 50 mM, NaCl 150 mM, DTT 3 mM, pH = 8,0), la concentración de proteína se ajustó exactamente a 2,6 mg/ml y el pH se ajustó entre 8 y 9. Después de incubación de 2 h a temperatura ambiente, se añadió tampón de plegado (NaCl 1 M, Tris 50 mM, EDTA 5 mM, GSSG 1 mM, GSH 2 mM, Chaps 33 mM, pH = 9,5) con agitación suave para alcanzar una concentración final de 0,16 mg/ml.

La solución se incubó posteriormente durante 48 h a 22°C y el plegado se detuvo cambiando el pH a 3-4 mediante la adición de HCl al 18%. Después de centrifugación, el monómero no plegado se separó de la forma de dímero llevando a cabo una segunda RP-HPLC en las mismas condiciones. Las fracciones que contenían la proteína dimerizada se combinaron, liofilizaron y almacenaron a -70°C.

40 **Ejemplo 2: Medición de la actividad biológica de mutantes ML *in vitro* mediante ensayo de ALP**

1×10^4 células de la línea de células osteo/condroprogenitoras ATDC-5 se incubaron durante una noche en placas de 96 pocillos en medio de cultivo celular (alfa-MEM, penicilina/estreptomicina, L-glutamina 2 mM, FCS al 10%) a 37°C, CO₂ al 5%, saturado con agua. Al día siguiente, las células se estimularon con las proteínas relacionadas con GDF-5 y los mutantes de la misma durante 72 h con concentraciones de ligando indicadas. Las células se lavaron posteriormente con PBS (solución salina tamponada con fosfato). La lisis celular se realizó en 100 μ l de tampón de lisis alcalina 1 (glicina 0,1 M, pH 9,6, NP-40 al 1%, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 1 mM) durante 1 h a temperatura ambiente. Después se añadieron 100 μ l de tampón de lisis alcalina 2 (glicina 0,1 M, pH 9,6, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 1 mM + 2 mg/ml de PNPP). Las placas se incubaron a 37°C, CO₂ al 5%, saturado con agua. La reacción de ALP se detuvo después con 100 μ l de 30 g/l de NaOH y finalmente la densidad óptica se midió con un lector de microplaca automático a 405 nm bajo la consideración de resta del valor de blanco.

Como un ejemplo, los resultados (valores promedio de 2 experimentos independientes) con respecto a mutante de hGDF-5 M453V/M456V se muestran en la FIG. 5. La proteína mutante muestra una actividad biológica del 585,5% (a 133 ng/ml), 356,3% (a 400 ng/ml) y 236,3% (a 1200 ng/ml) de la actividad de la proteína de tipo silvestre (rh-GDF-5) en este ensayo (promedio de múltiples experimentos). La actividad mínima se midió para el mutante a una concentración de proteína única y en un experimento único fue el 150% de la actividad de la proteína de tipo silvestre.

Ejemplo 3:

Formación ósea ectópica *in vivo*: un modelo de ratón SCID para rhGDF 5, rhGDF-5 M453V/M456V y BMP-2

- Las capacidades de inducción ósea mejorada de los mutantes ML de proteínas relacionadas con GDF-5 también se verificaron *in vivo*. Se usaron cerámicas de fosfato beta-tricálcico (chronOS®, Synthes/RMS Foundation) como biomateriales biodegradables con un tamaño de 3x3x3,5 mm. Se disolvieron factores del crecimiento en acetato de sodio pH 4 de la forma siguiente: rhGDF-5 en una concentración de 10 µg en 7 µl; rhGDF-5 M453V/M456V en una concentración de 10 µg en 9 µl y BMP-2 (Induct OS Wyeth® Lot-Nº, 20603) se disolvió en primer lugar en agua estéril en una concentración de 3 mg/ml y después se disolvió en acetato de sodio en una concentración de 10 µg en 7 µl. Los controles se saturaron con 7 µl de acetato de sodio. Después de recubiertas las estructuras se secaron posteriormente durante 10 minutos y se almacenaron a -20° celsius. Antes del implante, los armazones se cargaron con 10 µl de fibronectina. En este estudio, se usaron ratones inmunodeficientes combinados severos (SCID), (30 +/- 2 g). Bajo anestesia general i.p., se creó una bolsa subcutánea de forma roma a través de una incisión de un centímetro en la espalda. Una estructura cargada se insertó en la bolsa. La herida se cerró con suturas interrumpidas únicas. Los animales se sacrificaron después de cuatro semanas y las estructuras se recogieron. Se realizó histología y tomografías computarizadas µCT (µCT 80 SCANCO MEDICAL). Para histología, las estructuras se incrustaron en cera de parafina y cortes de 5 µm de espesor se tiñeron con rojo de alizarina-S (al 0,5%) y verde rápido (al 0,04%) para demostrar el calcio nuevo construido dentro de las estructuras.
- Los resultados se presentan en las Figs. 6 y 7. Los controles no tenían signos de formación ósea ectópica nueva. Las estructuras que se cargaron con rhGDF-5 mostraron una cantidad media de hueso construido recientemente con alguna formación ósea en la estructura. RhGDF-5 M453V/M456V tenía el valor más alto de formación ósea nueva. Las estructuras cargadas con rhGDF-5 453V/M456V mostraron hueso prominente en la estructura. Las estructuras tratadas con BMP-2 mostraron hueso prominente en las estructuras pero sin ser homogéneas como en las estructuras cargadas con rhGDF-5 453V/M456V. En resumen, los resultados confirmaron que rhgdf-5 453V/M456V conduce a formación ósea potenciada de forma marcada en este modelo de ratón SCID.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biopharm Gesellschaft zur biotechnologischen Entwicklung von Pharmaka mbH

5 <120> Mutantes de Factor del Crecimiento de Actividad Elevada

<130> 36878PEP

<160> 2

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 2703

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

20 <222> (640)..(2142)

<400> 1

```

ccatggcctc gaaagggcag cggtgatttt ttccacataa atatatcgca cttaaatgag      60
tttagacagc atgacatcag agagtaatta aattggtttg ggttgggaatt ccgtttccaa      120
ttcctgagtt caggtttgta aaagattttt ctgagcacct gcaggcctgt gagtgtgtgt      180
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtga agtattttca ctggaaagga ttcaaaacta      240
gggggaaaaa aaaactggag cacacaggca gcattacgcc attcttcctt cttggaaaaa      300
tccctcagcc ttatacaagc ctcttcaag ccctcagtc gttgtgcagg agaaaggggg      360
cggttggttt tctcctttca agaacgagtt attttcagct gctgactgga gacgggtgcac      420
gtctggatac gagagcattt ccactatggg actggataca aacacacacc cggcagactt      480
caagagtctc agactgagga gaaagccttt cctctctctg ctactgctgc tgccgctgct      540
tttgaaagtc cactccttcc atggtttttc ctgccaaacc agaggcacct ttgctgctgc      600
cgctgttctc ttgtgtgtca ttcagcggct ggccagagg atg aga ctc ccc aaa      654
                               Met Arg Leu Pro Lys
                               1           5

ctc ctc act ttc ttg ctt tgg tac ctg gct tgg ctg gac ctg gaa ttc      702
Leu Leu Thr Phe Leu Leu Trp Tyr Leu Ala Trp Leu Asp Leu Glu Phe
                               10           15           20

atc tgc act gtg ttg ggt gcc cct gac ttg ggc cag aga ccc cag ggg      750
Ile Cys Thr Val Leu Gly Ala Pro Asp Leu Gly Gln Arg Pro Gln Gly
                               25           30           35

acc agg cca gga ttg gcc aaa gca gag gcc aag gag agg ccc ccc ctg      798
Thr Arg Pro Gly Leu Ala Lys Ala Glu Ala Lys Glu Arg Pro Pro Leu
                               40           45           50

gcc cgg aac gtc ttc agg cca ggg ggt cac agc tat ggt ggg ggg gcc      846
Ala Arg Asn Val Phe Arg Pro Gly Gly His Ser Tyr Gly Gly Gly Ala
                               55           60           65

acc aat gcc aat gcc agg gca aag gga ggc acc ggg cag aca gga ggc      894
Thr Asn Ala Asn Ala Arg Ala Lys Gly Gly Thr Gly Gln Thr Gly Gly
70           75           80           85

```

ctg aca cag ccc aag aag gat gaa ccc aaa aag ctg ccc ccc aga ccg Leu Thr Gln Pro Lys Lys Asp Glu Pro Lys Lys Leu Pro Pro Arg Pro 90 95 100	942
ggc ggc cct gaa ccc aag cca gga cac cct ccc caa aca agg cag gct Gly Gly Pro Glu Pro Lys Pro Gly His Pro Pro Gln Thr Arg Gln Ala 105 110 115	990
aca gcc cgg act gtg acc cca aaa gga cag ctt ccc gga ggc aag gca Thr Ala Arg Thr Val Thr Pro Lys Gly Gln Leu Pro Gly Gly Lys Ala 120 125 130	1038
ccc cca aaa gca gga tct gtc ccc agc tcc ttc ctg ctg aag aag gcc Pro Pro Lys Ala Gly Ser Val Pro Ser Ser Phe Leu Leu Lys Lys Ala 135 140 145	1086
agg gag ccc ggg ccc cca cga gag ccc aag gag ccg ttt cgc cca ccc Arg Glu Pro Gly Pro Pro Arg Glu Pro Lys Glu Pro Phe Arg Pro Pro 150 155 160 165	1134
ccc atc aca ccc cac gag tac atg ctc tgc ctg tac agg acg ctg tcc Pro Ile Thr Pro His Glu Tyr Met Leu Ser Leu Tyr Arg Thr Leu Ser 170 175 180	1182
gat gct gac aga aag gga ggc aac agc agc gtg aag ttg gag gct gcc Asp Ala Asp Arg Lys Gly Gly Asn Ser Ser Val Lys Leu Glu Ala Gly 185 190 195	1230
ctg gcc aac acc atc acc agc ttt att gac aaa ggg caa gat gac cga Leu Ala Asn Thr Ile Thr Ser Phe Ile Asp Lys Gly Gln Asp Asp Arg 200 205 210	1278
ggc ccc gtg gtc agg aag cag agg tac gtg ttt gac att agt gcc ctg Gly Pro Val Val Arg Lys Gln Arg Tyr Val Phe Asp Ile Ser Ala Leu 215 220 225	1326
gag aag gat ggg ctg ctg ggg gcc gag ctg cgg atc ttg cgg aag aag Glu Lys Asp Gly Leu Leu Gly Ala Glu Leu Arg Ile Leu Arg Lys Lys 230 235 240 245	1374
ccc tgc gac acg gcc aag cca gcg gcc ccc gga ggc ggg cgg gct gcc Pro Ser Asp Thr Ala Lys Pro Ala Ala Pro Gly Gly Gly Arg Ala Ala 250 255 260	1422
cag ctg aag ctg tcc agc tgc ccc agc ggc cgg cag ccg gcc tcc ttg Gln Leu Lys Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gly Arg Gln Pro Ala Ser Leu 265 270 275	1470
ctg gat gtg cgc tcc gtg cca ggc ctg gac gga tct ggc tgg gag gtg Leu Asp Val Arg Ser Val Pro Gly Leu Asp Gly Ser Gly Trp Glu Val 280 285 290	1518
ttc gac atc tgg aag ctc ttc cga aac ttt aag aac tgc gcc cag ctg Phe Asp Ile Trp Lys Leu Phe Arg Asn Phe Lys Asn Ser Ala Gln Leu 295 300 305	1566
tgc ctg gag ctg gag gcc tgg gaa cgg ggc agg gcc gtg gac ctc cgt Cys Leu Glu Leu Glu Ala Trp Glu Arg Gly Arg Ala Val Asp Leu Arg 310 315 320 325	1614
ggc ctg ggc ttc gac cgc gcc gcc cgg cag gtc cac gag aag gcc ctg Gly Leu Gly Phe Asp Arg Ala Ala Arg Gln Val His Glu Lys Ala Leu 330 335 340	1662
ttc ctg gtg ttt ggc cgc acc aag aaa cgg gac ctg ttc ttt aat gag Phe Leu Val Phe Gly Arg Thr Lys Lys Arg Asp Leu Phe Phe Asn Glu 345 350 355	1710

```

att aag gcc cgc tct ggc cag gac gat aag acc gtg tat gag tac ctg      1758
Ile Lys Ala Arg Ser Gly Gln Asp Asp Lys Thr Val Tyr Glu Tyr Leu
      360                      365                      370

ttc agc cag cgg cga aaa cgg cgg gcc cca ctg gcc act cgc cag ggc      1806
Phe Ser Gln Arg Arg Lys Arg Arg Ala Pro Leu Ala Thr Arg Gln Gly
      375                      380                      385

aag cga ccc agc aag aac ctt aag gct cgc tgc agt cgg aag gca ctg      1854
Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu
      390                      395                      400                      405

cat gtc aac ttc aag gac atg ggc tgg gac gac tgg atc atc gca ccc      1902
His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro
      410                      415                      420

ctt gag tac gag gct ttc cac tgc gag ggg ctg tgc gag ttc cca ttg      1950
Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu
      425                      430                      435

cgc tcc cac ctg gag ccc acg aat cat gca gtc atc cag acc ctg atg      1998
Arg Ser His Glu Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Val Ile Gln Thr Leu Met
      440                      445                      450

aac tcc atg gac ccc gag tcc aca cca ccc acc tgc tgt gtg ccc acg      2046
Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr
      455                      460                      465

cgg ctg agt ccc atc agc atc ctc ttc att gac tct gcc aac aac gtg      2094
Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val
      470                      475                      480                      485

gtg tat aag cag tat gag gac atg gtc gtg gag tgc tgt ggc tgc agg      2142
Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg
      490                      495                      500

tagcagcact ggccctctgt ctctctgggt ggcacatccc aagagcccct tcctgcactc      2202

ctggaatcac agaggggtca ggaagctgtg gcaggagcat ctacacagct tgggtgaaag      2262

gggattccaa taagcttgct cgctctctga gtgtgacttg ggctaaaggc ccccttttat      2322

ccacaagtgc ccttggtgta ggattgtgac ccgtctgctg atgtgaccag tggcaggcac      2382

aggtccaggg agacagactc tgaatgggac tgagtccag gaaacagtgc tttccgatga      2442

gactcagccc accattttct ctcacctggg ccttctcagc ctctggactc tcctaagcac      2502

ctctcaggag agccacaggt gccactgctt cctcaaatca catttgtgcc tggtgacttc      2562

ctgtccctgg gacagttgag aagctgactg ggcaagagtg ggagagaaga ggagagggct      2622

tggatagagt tgaggagtgt gaggctgtta gactgttaga tttaaatgta cattgatgag      2682

ataaaaaagca aaactgtgcc t                                          2703

```

<210> 2

<211> 501

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Arg Leu Pro Lys Leu Leu Thr Phe Leu Leu Trp Tyr Leu Ala Trp
1          5          10          15

```

Leu Asp Leu Glu Phe Ile Cys Thr Val Leu Gly Ala Pro Asp Leu Gly
 20 25 30
 Gln Arg Pro Gln Gly Thr Arg Pro Gly Leu Ala Lys Ala Glu Ala Lys
 35 40 45
 Glu Arg Pro Pro Leu Ala Arg Asn Val Phe Arg Pro Gly Gly His Ser
 50 55 60
 Tyr Gly Gly Gly Ala Thr Asn Ala Asn Ala Arg Ala Lys Gly Gly Thr
 65 70 75 80
 Gly Gln Thr Gly Gly Leu Thr Gln Pro Lys Lys Asp Glu Pro Lys Lys
 85 90 95
 Leu Pro Pro Arg Pro Gly Gly Pro Glu Pro Lys Pro Gly His Pro Pro
 100 105 110
 Gln Thr Arg Gln Ala Thr Ala Arg Thr Val Thr Pro Lys Gly Gln Leu
 115 120 125
 Pro Gly Gly Lys Ala Pro Pro Lys Ala Gly Ser Val Pro Ser Ser Phe
 130 135 140
 Leu Leu Lys Lys Ala Arg Glu Pro Gly Pro Pro Arg Glu Pro Lys Glu
 145 150 155 160
 Pro Phe Arg Pro Pro Pro Ile Thr Pro His Glu Tyr Met Leu Ser Leu
 165 170 175
 Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Ala Asp Arg Lys Gly Gly Asn Ser Ser Val
 180 185 190
 Lys Leu Glu Ala Gly Leu Ala Asn Thr Ile Thr Ser Phe Ile Asp Lys
 195 200 205
 Gly Gln Asp Asp Arg Gly Pro Val Val Arg Lys Gln Arg Tyr Val Phe
 210 215 220
 Asp Ile Ser Ala Leu Glu Lys Asp Gly Leu Leu Gly Ala Glu Leu Arg
 225 230 235 240
 Ile Leu Arg Lys Lys Pro Ser Asp Thr Ala Lys Pro Ala Ala Pro Gly
 245 250 255
 Gly Gly Arg Ala Ala Gln Leu Lys Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gly Arg
 260 265 270
 Gln Pro Ala Ser Leu Leu Asp Val Arg Ser Val Pro Gly Leu Asp Gly
 275 280 285

Ser Gly Trp Glu Val Phe Asp Ile Trp Lys Leu Phe Arg Asn Phe Lys
290 295 300

Asn Ser Ala Gln Leu Cys Leu Glu Leu Glu Ala Trp Glu Arg Gly Arg
305 310 315 320

Ala Val Asp Leu Arg Gly Leu Gly Phe Asp Arg Ala Ala Arg Gln Val
325 330 335

His Glu Lys Ala Leu Phe Leu Val Phe Gly Arg Thr Lys Lys Arg Asp
340 345 350

Leu Phe Phe Asn Glu Ile Lys Ala Arg Ser Gly Gln Asp Asp Lys Thr
355 360 365

Val Tyr Glu Tyr Leu Phe Ser Gln Arg Arg Lys Arg Arg Ala Pro Leu
370 375 380

Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala Arg Cys
385 390 395 400

Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp Asp Asp
405 410 415

Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu Gly Leu
420 425 430

Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Val
435 440 445

Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro Pro Thr
450 455 460

Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe Ile Asp
465 470 475 480

Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu
485 490 495

Ser Cys Gly Cys Arg
500

REIVINDICACIONES

1. Proteína relacionada con GDF-5 recombinante con actividad biológica mejorada

5 en la que

a) el aminoácido en la posición correspondiente a metionina 453 (M453) de GDF-5 de tipo silvestre humana (SEC ID N° 1) es alanina, valina o isoleucina, y/o

10 b) el aminoácido en la posición correspondiente a metionina 456 (M456) de GDF-5 de tipo silvestre humana (SEC ID N° 1) es alanina, valina o isoleucina, y en la que la misma comprende una secuencia que coincide con una o más de las fórmulas de aminoácidos genéricas siguientes:

15 a)
CX₁X₂KX₃LHVX₄FX₅X₆X₇GWDDWX₈IAPLX₉YEAX₁₀HGX₁₁GX₁₂CX₁₃FPX₁₄RSHLEPTNHAX₁₅
IQT LZTNSMX₁₆PX₁₇X₁₈X₁₉PX₂₀X₂₁CCVPX₂₂X₂₃LX₂₄PISILX₂₅X₂₆DX₂₇X₂₈NNVVY
X₂₉X₃₀YEX₃₁MVVEX₃₂CGCR o
20 b) CX₁X₂KX₃LHVX₄FX₅X₆X₇GWDDWX₈IAPLX₉YEAX₁₀HGX₁₁GX₁₂CX₁₃FPX₁₄RSH LEPTNHAX₁₅
IQTLMNSZ₂X₁₆PX₁₇X₁₈X₁₉PX₂₀X₂₁CCVPX₂₂X₂₃LX₂₄PISILX₂₅X₂₆DX₂₈NNVVYX₂₉X₃₀YEX₃₁MVVEX₃₂CGCR o
c) CX₁X₂KX₃LHVX₄FX₅X₆X₇GWDDWX₈IAPLX₉YEAX₁₀HGX₁₁GX₁₂CX₁₃FPX₁₄RSH LEPTNHAX₁₅
IQT LZ₁NSZ₂X₁₆PX₁₇X₁₈X₁₉PX₂₀X₂₁CCVPX₂₂X₂₃LX₂₄PISILX₂₅X₂₆DX₂₇X₂₈NNVV
YX₂₉X₃₀YEX₃₁MVVEX₃₂CGCR

25 en las que

X ₁	indica asparagina (N) o serina (S)
X ₂	indica arginina (R) o lisina (K)
X ₃	indica alanina (A), glutamina (Q), prolina (P) o serina (S)
30 X ₄	indica asparagina (N) o ácido aspártico (D)
X ₅	indica arginina (R) o lisina (K)
X ₆	indica ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E)
X ₇	indica leucina (L) o metionina (M)
X ₈	indica isoleucina (I) o valina (V)
35 X ₉	indica ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E)
X ₁₀	indica histidina (H), fenilalanina (F) o tirosina (Y)
X ₁₁	indica ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E)
X ₁₂	indica leucina (L), metionina (M) o valina (V)
X ₁₃	indica ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E)
40 X ₁₄	indica isoleucina (I) o leucina (L)
X ₁₅	indica isoleucina (I) o valina (V)
X ₁₆	indica alanina (A), asparagina (N) o ácido aspártico (D)
X ₁₇	indica arginina (R), asparagina (N), ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), glicina (G) o serina (S)
X ₁₈	indica alanina (A), asparagina (N), serina (S) o treonina (T)
45 X ₁₉	indica alanina (A), metionina (M) o treonina (T)
X ₂₀	indica alanina (A) o prolina (P)
X ₂₁	indica serina (S) o treonina (T)
X ₂₂	indica alanina (A), serina (S) o treonina (T)
X ₂₃	indica arginina (R) o lisina (K)
50 X ₂₄	indica serina (S) o treonina (T)
X ₂₅	indica fenilalanina (F) o tirosina (Y)
X ₂₆	indica isoleucina (I) o treonina (T)
X ₂₇	indica alanina (A) o serina (S)
X ₂₈	indica alanina (A) o glicina (G)
55 X ₂₉	indica asparagina (N) o lisina (K)
X ₃₀	indica ácido glutámico (E) o glutamina (Q)
X ₃₁	indica ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E),
X ₃₂	indica alanina (A), glutamina (Q), serina (S) o treonina (T)
Z ₁	indica alanina (A), isoleucina (I) o valina (V),
60 Z ₂	indica alanina (A), isoleucina (I) o valina (V),

o una secuencia correspondiente en la que la cisteína que es responsable de la formación de dímero se sustituye por un aminoácido diferente o se suprime.

65 2. Proteína de acuerdo con la reivindicación 1,

en la que la proteína relacionada con GDF-5 es una proteína de GDF-5 de vertebrado o un fragmento biológicamente activo o una versión alélica de la misma.

3. Proteína de acuerdo con la reivindicación 2,

en la que la proteína relacionada con GDF-5 es GDF-5 humana (SEC ID N° 1) o un fragmento biológicamente activo de la misma.

4. Ácido nucleico, que codifica una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 3.

5. Vector de expresión, que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4.

6. Célula hospedadora, que contiene un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4 o un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5.

7. Composición farmacéutica, que comprende una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y/o un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4 y/o un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5 y/o una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 6.

8. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende adicionalmente sustancias auxiliares y/o de vehículo farmacológicamente aceptables.

9. Composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, en la que la proteína y/o ácido nucleico y/o vector y/o célula hospedadora están contenidos en o sobre un material de matriz biocompatible.

10. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, para su uso en el diagnóstico, prevención y/o terapia de lesiones o enfermedades asociadas con hueso o cartílago dañado.

11. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, para uso para promover crecimiento de cartílago y/o de hueso y/o fusión espinal, para el diagnóstico, prevención y/o terapia de tejidos de vasos sanguíneos dañados o enfermos y para la inducción de angiogénesis.

12. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, en la que dicha enfermedad asociada con daño de hueso y/o cartílago es osteoporosis.

13. Un método para la producción de una proteína recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende preparar de forma recombinante una proteína obtenida a partir de una proteína relacionada con GDF-5 mediante

a) el reemplazo del aminoácido en la posición correspondiente a metionina 453 (M453) de GDF-5 de tipo silvestre humana (SEC ID N° 1) con alanina, valina o isoleucina; y/o

b) el reemplazo del aminoácido en la posición correspondiente a metionina 456 (M456) de GDF-5 de tipo silvestre humana (SEC ID N° 1) con alanina, valina o isoleucina.

14. Un anticuerpo que es específico para una proteína relacionada con GDF recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo es específico para una región que abarca los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 453-456 de GDF-5 de tipo silvestre humana (SEQ ID N° 1).

15. Uso de una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5 y/o una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 6, para la preparación de una composición terapéutica y/o de diagnóstico para el diagnóstico, prevención y/o terapia de enfermedades asociadas con daño óseo y/o de cartílago o que influye a una enfermedad ósea y/o de cartílago.

16. Uso de una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5 y/o una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 6, para la preparación de una composición terapéutica y/o de diagnóstico para promover formación de cartílago y/o hueso y/o fusión espinal.

17. Uso de una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5 y/o una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 6, para la preparación de una composición terapéutica y/o de diagnóstico para el diagnóstico, prevención y/o terapia de tejido de vasos sanguíneos dañado o enfermo.

18. Uso de una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4, un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 5 y/o una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 6, para la preparación de una composición terapéutica y/o de diagnóstico para la inducción de angiogénesis.

FIG. 1

1 MRLFKLLTFL LNYLAWLDLE FICTVLGAPD LGQRPGQTRP GLAKAEAKER PPLARNVFRP
61 GGHSYGGGAT NANARAKGGT GQTGGLTQPK KDEPKLPPR PGGPEPEPGH PPQTRQATAR
121 TVTFEGQLPG GKAPFKAGSV PSSFLLEKAR EPGPPREPKE PFRPPPITPH EYMLSLYRTL
181 SDADRKGGNS SVLEAGLAN TITSFIDRQQ DDRGPFVVRKQ RYVPDISALE KDGLLGAELE
241 ILRKPSDTA KPAAPGGGRA AQLKLSSCPG GRQPASLLDV RSVPGLDGSG WEVFDIWKLF
301 RNFKNSAQLC LELEAWEGR AVDLRGLGFD RAARQVHEKA LFLVFGRTKK RDLFFNEIEA
361 RSGQDDKTVY EYLPQRRER RAPLATRQK RPSKNLKARC SRKALHVNFK DMGWDDWIIA
421 PLEYEAFHCE GLCEFPLRSH LEPTNHAIVQ TLMNSMDPES TPPTCCVPTR LSPISILFID
481 SANNVYKQY EDMVESCSC R

FIG. 2

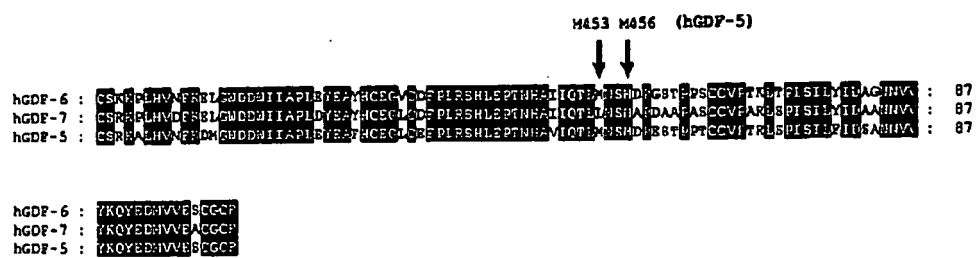


FIG. 3

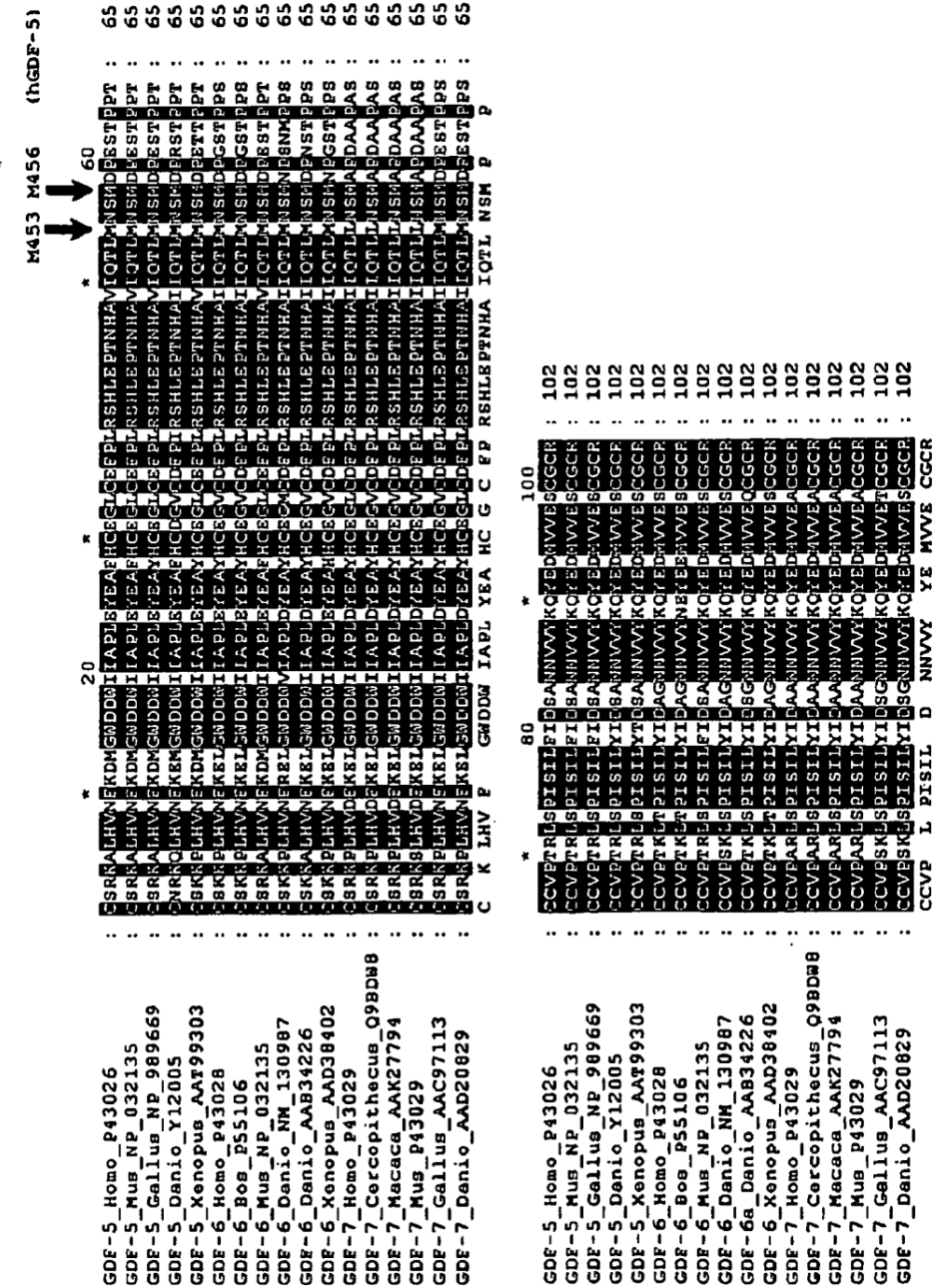
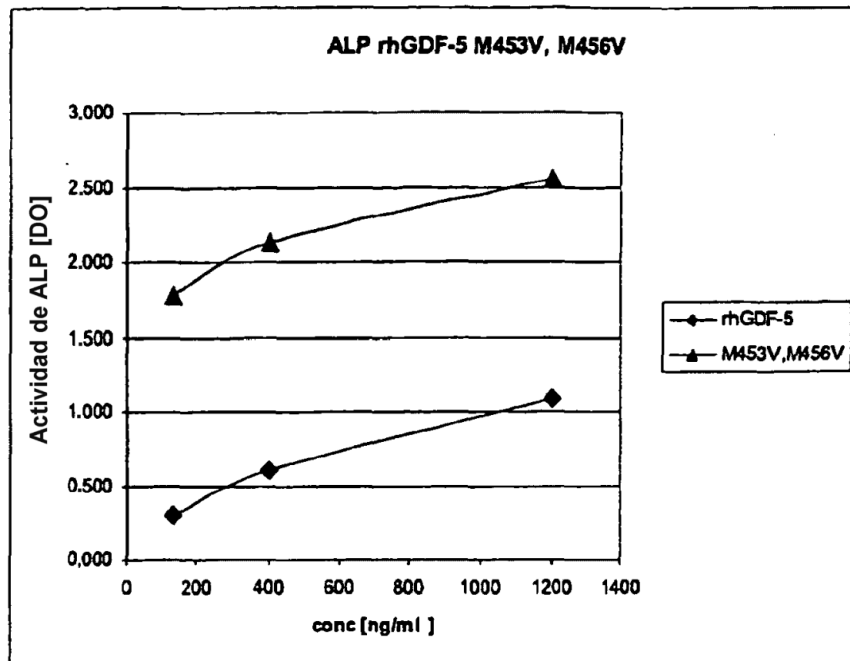


FIG. 4
% de identidad de secuencia con dominio
de nudo de cistina de GDF-5 humana

Secuencia	% de identidad	Restos idénticos
GDF-5 Homo	100	102/102
GDF-5 Mus	99	101/102
GDF-5 Gallus	99	101/102
GDF-5 Xenopus	94	96/102
GDF-5 Danio (Contad)	88	90/102
GDF-7 Danio	88	90/102
GDF-6 Mus	86	88/102
GDF-7 Gallus	86	88/102
GDF-6 Danio (Radar)	86	88/102
GDF-6 Homo	85	87/102
GDF-6 Xenopus	84	86/102
GDF-6 Bos	83	85/102
GDF-7 Homo	81	83/102
GDF-7 Cercopithecus	80	82/102
GDF-7 Macaca	80	82/102
GDF-7 Mus	80	82/102
GDF-6 Danio (Dynamo)	79	81/102
BMP-2A	57	58/102
BMP-2B	57	58/102
Vg-1	52	53/102
DPP	52	53/102
BMP-5	52	53/102
BMP-9	51	52/102
BMP-10	51	52/102
BMP-8A	51	51/102
BMP-6	51	52/102
BMP-7	51	52/102
GDF-3	49	50/102
60A	48	49/102
BMP-8B	48	49/102
BMP-3A	47	48/103
GDF-9B	45	46/102
BMP-3B	43	44/103
GDF-8	37	38/102
GDF-12	37	38/104
GDF-11	36	37/102
GDF-9	32	33/102

FIG. 5



ng/ml	0	133,2	400	1200
rhGDF-5	0,047	0,304	0,599	1,081
M453V,M456V	0,044	1,78	2,134	2,554

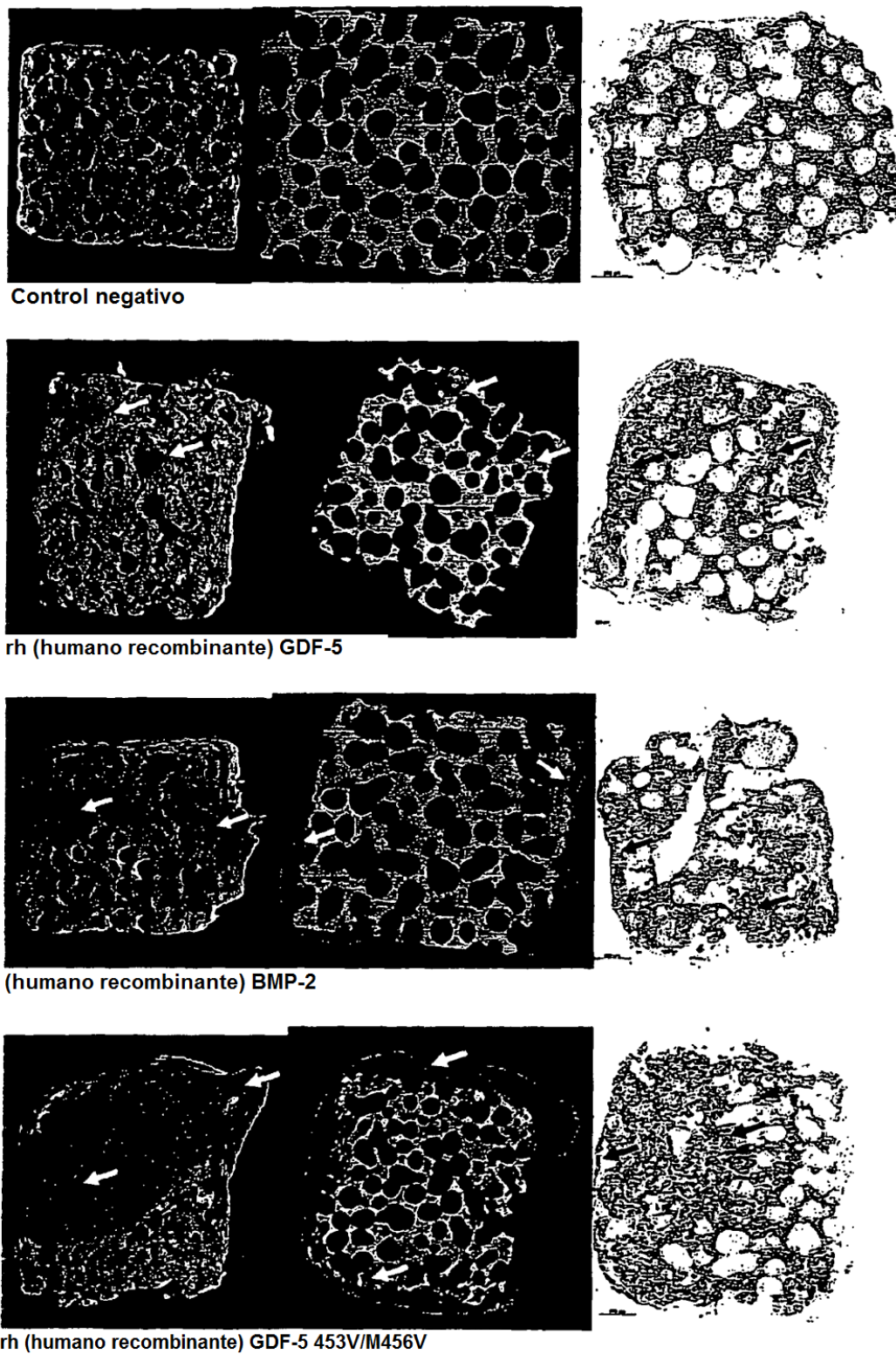
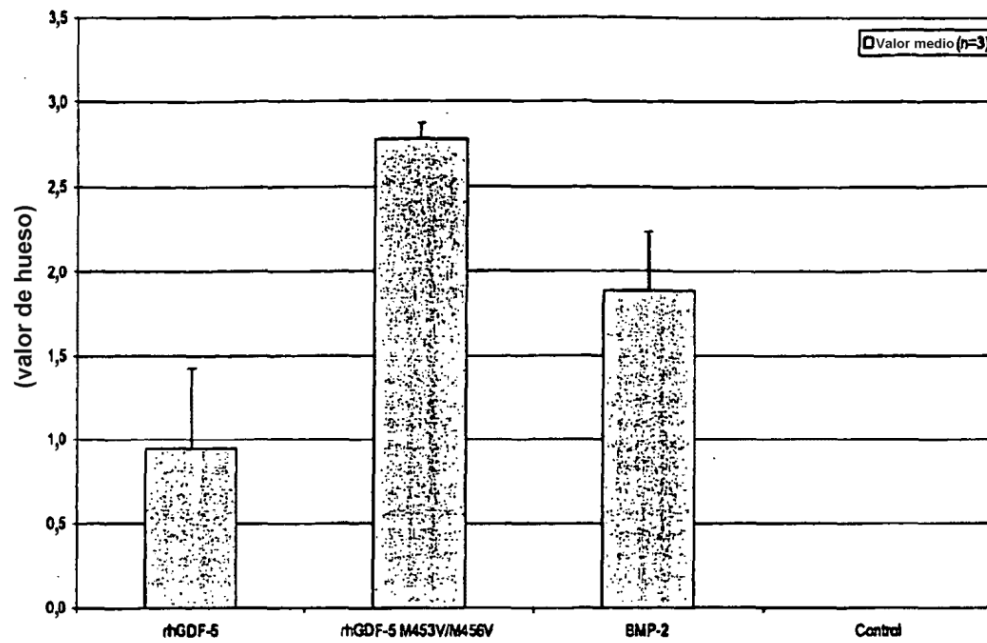


FIG. 6

Formación de hueso nuevo



Cantidad estimada de formación de hueso nuevo en las estructuras mediante el uso de las siguientes escalas:

sin hueso → 0
 1- 10 % hueso → 1
 10- 50 % hueso → 2
 50-100% hueso → 3

	rhGDF-5	rhGDF-5 M453V/M456V	BMP-2	Co ntrol
Valor medio (n=3)	0,94	2,78	1,89	0
DT	0,48	0,10	0,35	0

FIG. 7