

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 992**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/51** (2006.01)  
**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61P 19/00** (2006.01)  
**A61P 21/00** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **99944750 .1**  
96 Fecha de presentación: **04.10.1999**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1117689**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.07.2001**

54 Título: **Antagonistas de la proteína morfogenética ósea basados en la proteína madura**

30 Prioridad:  
**09.10.1998 JP 28810398**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**15.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**15.06.2012**

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

72 Inventor/es:  
**KATSUURA, Mieko y  
KIMURA, Michio**

74 Agente/Representante:  
**Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 382 992 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Antagonistas de la proteína morfogenética ósea basados en la proteína madura

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

## (1) Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a una proteína morfogenética ósea madura de la que se han intercambiado algunos restos de aminoácidos hidrófobos por un resto de aminoácido hidrófilo o polar mediante modificación química o tecnología de ingeniería genética. Las proteínas maduras de esta invención muestran una actividad antagonista frente a proteínas morfogenéticas óseas, y son útiles para agentes médicos para suprimir síntomas de osteogénesis ectópica y calcificación ectópica u osteopatías metabólicas con calcificación, tales como osteosis neurótica, osificación  
10 ectópica provocada por estrés de operación, miositis osificante traumática, osificación por defecto de suministro de oxígeno, tumor osteogénico, osificación del ligamento longitudinal posterior, y esclerosis arterial.

## (2) Descripción de la técnica relacionada

15 Una proteína morfogenética ósea (en lo sucesivo denominada BMP) es una proteína que tiene una actividad morfogenética ósea en tejido óseo descalcificado. Aunque se ha trabajado enérgicamente en el aislamiento de BMP desde los años 1970, fue bastante difícil aislarla como una proteína individual. La clonación génica de BMP según se esperaba se llevó a cabo por Wozney en 1989 mediante tecnología de biología molecular, usando las secuencias de aminoácidos derivadas de péptidos desconocidos que se separaron tratando con una enzima la fracción que tiene actividades morfogenéticas óseas. El gen se introdujo inmediatamente en las células cultivadas de animal, y la actividad de la proteína expresada se midió *in vivo* y se demostró prácticamente la actividad de BMP en la proteína  
20 (Wang, E. A. et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 87, p. 2220-2224). Continuando la clonación de una proteína con actividades morfogenéticas óseas utilizando homología, hasta ahora se han aislado varios números de las proteínas con actividades morfogenéticas óseas en una estructura similar. Esas proteínas pertenecen todas a la superfamilia del TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante), y han demostrado tener la actividad para provocar osificación ectópica *in vivo*, básicamente. Se afirma que la osificación provocada por BMP es cartilaginosa interna, y parece reproducir la formación de hueso largo en una etapa embrionaria. Por lo tanto, la propia BMP se puede usar  
25 como un agente médico para el tratamiento para compensar la falta de hueso.

En el documento WO 96/33215 también se ha dado a conocer la actividad morfogenética ósea de una de esas proteínas, denominada MP52. En particular, el documento WO 96/33215 describe una proteína que consiste en 119  
30 restos de aminoácidos que deriva de la región madura de dicha proteína MP52 y muestra la misma actividad morfogenética ósea que la proteína MP52 madura humana.

El documento EP 0 691 349 describe derivados peptídicos sintéticos que tienen actividad antagonista de la proteína morfogenética ósea, que consisten en dos péptidos pequeños y un ligador químico, a través del cual se acoplan los dos péptidos. El documento EP 0 691 349 también proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades relacionadas con los huesos, que comprende dichos derivados peptídicos, o una sal  
35 terapéuticamente aceptable de los mismos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Por otro lado, puesto que se describieron los genes de BMP y se prepararon los anticuerpos específicos frente a las BMPs, las BMPs también se expresaron en el sitio de calcificación ectópica, que hasta ahora no había tenido ningún tratamiento médico, y parece que hay algunas posibilidades de relación entre las BMPs y esas enfermedades. Por ejemplo, se ha puesto recientemente en evidencia que la BMP existe o está incluida en enfermedades tales como osteosis neurótica, osificación ectópica provocada por estrés de operación, miositis osificante traumática, osificación por defecto de suministro de oxígeno, tumor osteogénico, especificado como enfermedades refractarias tales como osificación del ligamento longitudinal posterior (OPLL) (Spine, 17-3S, S33, 1992) y parte de calcificación de esclerosis arterial (J. Clin. Invest., vol. 91, p. 1800, 1993). Además, los síntomas principales de osificación heterotópica pseudomaligna (PHO), tumor óseo pseudomaligno y miositis osificante circunscrita son dolor y la aparición de la masa de tejido duro en el músculo. Aunque todavía no se conoce con detalle las causas de estas enfermedades, parece que BMP tiene una relación con la aparición de tejido duro en el músculo de los pacientes. Se considera que BMP existe en el tejido en el que BMP no existe de forma natural, actúa sobre el autocrino, y forma tejido duro semejante a un hueso. Hasta ahora no existe ningún tratamiento eficaz para OPLL. Cuando el síntoma neuronal compresivo es crítico, se realiza una escisión. Sin embargo, el pronóstico no es tan bueno. Tampoco hay  
40 ningún tratamiento para la calcificación de arterias.

Parece que la supresión de la existencia de BMP puede ser uno de los tratamientos principales para estas enfermedades. Otro tratamiento, tal como la administración de antagonistas de BMP, también parece eficaz. Se piensa que los receptores de BMP, los anticuerpos neutralizados frente a BMP y los péptidos de BMP que corresponden al sitio de unión, una BMP con resto de aminoácidos específico químicamente modificado, tienen  
55 actividad semejante a los antagonistas de BMP.

Hasta ahora se han llevado a cabo muchos estudios respecto a una relación entre la estructura y la actividad de las BMPs, y se especula que algunos sitios de las BMPs maduras se relacionan con la unión al receptor. Se sabe que

un péptido sintetizado basándose en estos estudios funciona como un antagonista frente a las BMPs (solicitud de patente JP, Hei 7 ('95)- 200175).

#### SUMARIO DE LA INVENCION

5 Aparte de los péptidos sintéticos, se desea que existan muchos tipos de métodos para la terapia de diversas enfermedades de huesos y cartílagos tales como hiperplasia. El objeto de esta invención es proporcionar una nueva proteína antagonista de BMP como agente terapéutico eficaz para las enfermedades anteriores relacionadas con el hueso, en la que un resto de aminoácido específico se modifica químicamente o se sustituye mediante tecnología de ingeniería genética.

#### BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

10 La Fig. 1 muestra una comparación de actividades inductoras de ALPasa por MP52s humanas maduras alquiladas en la metionina y aquellas de MP52 humana madura sin modificar, en células MC3T3-E1, que se separaron mediante la diferencia en el tiempo de retención en la HPLC de fase inversa. En la figura, la línea continua con círculos negros representa MPC52 humana madura sin modificar, la línea continua con cuadrados negros representa MP52 humana madura alquilada en una metionina, la línea discontinua con triángulos negros representa MP52 humana madura alquilada en dos metioninas, la línea continua con círculos blancos representa MP52 humana madura alquilada en tres metioninas, la línea discontinua con triángulos blancos representa MP52 humana madura alquilada en cuatro metioninas, respectivamente. Los círculos negros mostrados en el eje Y representan actividad de ALPasa en células no tratadas con ningún reactivo.

20 La Fig. 2 muestra la actividad antagónica de MP52 humana madura con la metionina oxidada y MP52 humana madura con el triptófano alilsulfenilado en diferentes estirpes celulares. (A) representa sus actividades antagónicas frente a rh-BMP-2 madura en células C3H10T ½, y (B) muestra sus actividades antagónicas frente a MP52 humana madura en células MC3T3-E1, respectivamente. En ambas figuras, la línea continua con círculos negros representa MP52 humana madura con triptófano alilsulfenilado, y la línea discontinua con círculos blancos representa MP52 humana madura con metionina oxidada, respectivamente. En (A), el cuadrado negro muestra la actividad de ALPasa inducida por 300 ng/ml de rh-BMP-2 madura sola en células C3H10T ½. En (B), el cuadrado negro muestra la actividad de ALPasa inducida por 600 ng/ml de MP52 humana madura sin modificar sola en células MC3T3-E1. Los cuadrados blancos representan la actividad en los experimentos sin ningún reactivo.

#### DESCRIPCION DE LA REALIZACION PREFERIDA

30 La presente invención se refiere a una proteína madura que tiene una actividad antagónica frente a proteínas morfogénicas óseas, caracterizada porque se obtiene a partir de la secuencia de aminoácidos SEC ID NO:1 de MP52 humana madura convirtiendo al menos un resto entre los restos de metionina en la posición 30, 71 y/o 74, o entre los restos de triptófano en la posición 32 y/o 35 de dicha secuencia SEC ID NO:1, en un resto de metionina oxidado o alquilado o en un resto de triptófano alilsulfenilado en el anillo indólico, o sustituyendo dichos restos de metionina en la posición 30, 71 y/o 74, o dichos restos de triptófano en la posición 32 y/o 35 de dichas secuencias SEC ID NO:1 por un resto de aminoácido hidrófilo o un resto de aminoácido polar.

35 Cuando se convierte al menos un resto de dicha metionina, la modificación química para dicho resto de metionina es una reacción de oxidación o una reacción de alquilación. Cuando la modificación química de dicho resto de metionina es una reacción de oxidación, entre las proteínas maduras preferidas de la invención está aquella en la que se oxidan cuatro restos de metionina y que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO 5.

40 Cuando la modificación química de dicho resto de metionina es una reacción de alquilación, entre las proteínas maduras preferidas de la invención está aquella en la que se S-carboximetila al menos un resto de metionina y que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO 6.

45 Cuando se convierte al menos un resto de dicho triptófano, la modificación química para dicho resto de triptófano es una reacción de alilsulfenilación.

Entre las proteínas maduras preferidas de la invención está aquella en la que se alilsulfenilan dos restos de triptófano y que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO 7.

La presente invención se refiere a proteínas maduras de la invención como se define anteriormente que tienen una actividad antagónica.

50 Entre las proteínas maduras preferidas de la invención está aquella en la que se alilsulfenilan los dos restos de triptófano en la posición 32 y/o 35 de la secuencia de aminoácidos de MP52 humana madura (SEC ID NO: 1) y que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7.

La presente invención se refiere a proteínas maduras de la invención como se define anteriormente que tienen una actividad antagónica frente a proteínas morfogénicas óseas, en las que dicha MP52 humana madura es una proteína dímera.

Además, la presente invención se refiere a una proteína madura que tiene una actividad antagónica frente a proteínas morfogenéticas óseas, caracterizada porque se obtiene convirtiendo al menos un resto de restos de triptófano en la posición 28 y/o 31 de la secuencia de aminoácidos SEC ID NO:2 de BMP-2 humana madura, en la posición 30 y/o 33 de la secuencia de aminoácidos SEC ID NO:3 de BMP-4 humana madura, o la posición 52 y/o 55 de la secuencia de aminoácidos SEC ID NO:4 de BMP-7 humana madura en un resto de triptófano alilsulfenilado en el anillo indólico, o sustituyendo dichos restos de triptófano en la posición 28 y/o 31 de SEC ID NO:2 de BMP-2 humana madura, y/o en la posición 30 y/o 33 de SEC ID NO:3 de BMP-4 humana madura, y/o en la posición 52 y/o 55 de SEC ID NO: 4 de BMP-7 humana madura por un resto de aminoácido hidrófilo o un resto de aminoácido polar en lugar de dicho resto de triptófano.

Además, la presente invención se refiere a una proteína madura que tiene una actividad antagónica frente a proteínas morfogenéticas óseas, caracterizada porque se obtiene mediante tecnología de ingeniería genética sustituyendo

a) al menos un resto de aminoácido de tres restos de aminoácidos hidrófobos en la posición 26, 67 y 70 de la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 2 de BMP-2 humana madura;

b) al menos un resto de aminoácido de tres restos de aminoácidos hidrófobos en la posición 28, 69 y/o 72 de la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 3 de BMP-4 humana madura; o

c) al menos un resto de aminoácido de tres restos de aminoácidos hidrófobos en la posición 50, 91 y/o 94 de la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 4 de BMP-7 humana madura,

posiciones las cuales corresponden a aquellas de restos de metionina situados en la posición 30<sup>a</sup>, 71<sup>a</sup>, y 74<sup>a</sup> de la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:1 de MP52 humana madura,

por un resto de aminoácido hidrófilo o un resto de aminoácido polar.

La presente invención se refiere a proteínas maduras de la invención como se define anteriormente que tienen una actividad antagónica frente a proteínas morfogenéticas óseas, en las que dicha BMP-2 humana madura, BMP-4 humana madura o BMP-7 humana madura es una proteína dímera.

La presente invención se refiere además a un agente para terapia y/o prevención de osificación ectópica, que contiene como ingrediente eficaz una proteína madura de la invención definida anteriormente, que muestra una actividad antagónica frente a proteínas morfogenéticas óseas.

Además, la presente invención se refiere a un agente para terapia y/o prevención de enfermedades metabólicas con calcificación, que contiene como ingrediente eficaz una proteína madura de la invención como se define anteriormente, que muestra una actividad antagonista frente a proteínas morfogenéticas óseas.

Además, la presente invención se refiere a un agente para terapia y/o prevención de enfermedades metabólicas con calcificación y/u osificación ectópica como se define anteriormente, en el que dicha osificación ectópica o enfermedad metabólica es osteosis neurótica, miositis osificante traumática, osificación ectópica provocada por estrés de operación, osificación por defecto de suministro de oxígeno, tumor osteogénico, osificación del ligamento longitudinal posterior, osificación heterotópica pseudomaligna, tumor óseo pseudomaligno, miositis osificante circunscrita, esclerosis arterial y/o enfermedad de Paget.

Además, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una proteína madura según la invención como el ingrediente activo farmacéutico. Preferiblemente, la proteína madura es un antagonista de BMP.

Las proteínas que pertenecen a la superfamilia de TGF- $\beta$  se suponen cada una a partir de su estructura génica que se sintetizan como un precursor en células y se forman en un homodímero peptídico maduro (tipo activo) después de diversos procesamientos. Se sabe que el tipo activo de TGF- $\beta$ 1 humana madura es un dímero del péptido de 112 restos COOH-terminal (Nature, 316, 701- 705, 1985). La expresión "BMP madura", como se usa aquí, significa una BMP que está compuesta sustancialmente de una secuencia de aminoácidos homóloga a los 112 restos de aminoácidos COOH-terminal del tipo activo de TGF- $\beta$ 1 humana. Las proteínas que pertenecen a la superfamilia de TGF- $\beta$  en la presente invención se ejemplifican como BMP-2, BMP-4, BMP-7, MP52 humana, etc.

Los inventores intentaron una modificación química y una sustitución con un aminoácido para MP52 humana que pertenece a la superfamilia de TGF- $\beta$ , y particularmente que es un miembro de la familia de BMP, con el objetivo de preparar una proteína químicamente modificada que actúa fuertemente como un antagonista de BMP a través de la unión al sitio de unión de BMP en el receptor.

Se supone que el tipo activado de MP-52 humana es una forma dímera, y que el sitio de unión al receptor de MP52 madura es una parte expuesta en el exterior de la molécula proteica. De este modo, se especula que el sitio de unión al receptor está compuesto de dos regiones peptídicas vecinales (las posiciones de aminoácidos desde la 20<sup>a</sup> Arg a la 38<sup>a</sup> Ala, y desde la 60<sup>a</sup> Glu a la 77<sup>a</sup> Glu en SEC ID NO 1 del Listado de Secuencias) en la formación de un

dímero de MP52 humana.

Se preparó una proteína de la que se modificaron químicamente dos tipos de restos de aminoácidos, debido a que se sabe que el contenido de triptófano y metionina es generalmente bajo en la composición de aminoácidos de la proteína, permitiendo la modificación química selectiva, y, a partir de la estructura tridimensional supuesta de MP52 humana, que tres (las posiciones 30<sup>a</sup>, 71<sup>a</sup>, y 74<sup>a</sup>) de cuatro restos de metionina en el monómero de MP52 humana madura existen en el sitio de unión al receptor supuesto, y que dos (32<sup>o</sup> y 35<sup>o</sup>) de dos restos de triptófano en el monómero de MP52 humana madura existen en el sitio de unión al receptor supuesto de MP52 madura.

La modificación química de esta invención significa que las cadenas laterales de metionina o triptófano se modifican en un grado suficiente para hacer inactiva a la proteína manteniendo una capacidad de unión al receptor. Para la modificación química, se aplicó un método convencional en estudios sobre química proteica. El método se describe en "Protein Chemistry IV", p. 6-118, 1977, Jap. Soc. Biochem. La metionina es un aminoácido hidrófobo y se puede modificar en un resto hidrófilo mediante modificación química. Las modificaciones químicas en hidrofilia creciente se ejemplifican mediante oxidación de metionina para obtener sulfóxido de metionina o sulfona de metionina usando un oxidante, o mediante alquilación para obtener S-carboximetilmetionina usando ácido  $\alpha$ -halogenoacético. La oxidación de metionina se lleva a cabo mediante peróxido de hidrógeno, ácido perfórmico, ácido peryódico, N-clorosuccinimida, y N-bromosuccinimida. Además, como ácido  $\alpha$ -halogenoacético se puede usar ácido monoyodoacético y monoyodoacetamida.

La modificación química del anillo indólico de triptófano da un cambio sutil de entorno y estructura cercana a él. Los ejemplos adecuados son alilsulfenilación de la segunda posición del núcleo indólico mediante cloruro de p- u o-nitrofenilsulfenilo, cloruro de 2-nitro-4-carboxifenilsulfenilo, cloruro de 2,4-dinitrofenilsulfenilo, o 2-hidroxi-5-nitrobencilación de la 3<sup>a</sup> posición del núcleo indólico mediante bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobencilo, bromuro de dimetil(2-hidroxi-5-nitrobencil)sulfonilo.

En particular, la presente invención se refiere a una proteína madura de la que se modifican químicamente uno a 4 restos de metionina o 1 a 2 restos de triptófano en una secuencia de aminoácidos de MP52 humana madura mostrada en SEC ID NO 1 del Listado de Secuencias.

La proteína mostrada en SEC ID NO 1 del Listado de Secuencias se puede producir mediante el método descrito en la Solicitud de Patente Internacional WO 96/33215. Puesto que 3 de 4 restos de metionina existen en el sitio de unión al receptor de MP52 humana madura producida por dicho método y existen allí 2 restos de triptófano, y esos aminoácidos son todos hidrófobos, se supone que estos aminoácidos hidrófobos desempeñan un papel importante en la actividad morfogénica ósea.

MP52 humana madura de la presente invención no sólo incluye la proteína madura con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO 1 del Listado de Secuencias, sino también la unión de Ala o Arg-Ala al término N de la secuencia de aminoácidos de dicha proteína madura como se describe, respectivamente, en las solicitudes de patentes internacionales WO 95/04819 y WO 97/06254.

Comparando las secuencias de aminoácidos de las proteínas maduras de otras BMPs, tales como BMP-2 humana (SEC ID NO 2), BMP-4 humana (SEC ID NO 3), BMP-7 humana (SEC ID NO 4), etc., con la de la proteína MP52 humana madura, se encuentra que en esas proteínas morfogénicas óseas los aminoácidos que corresponden a las posiciones de restos de metionina de MP52 humana madura son todos restos de metionina o aminoácidos hidrófobos.

En concreto, se estima que el sitio de unión al receptor de BMP-2 humana madura está formado por los péptidos con la secuencia de aminoácidos desde la 16<sup>a</sup> Arg a la 34<sup>a</sup> Ala y desde la 56<sup>a</sup> Asn hasta la 73<sup>a</sup> Lys mostrada en SEC ID NO 2 del Listado de Secuencias (Science 242, 1528-1534, 1988). Los aminoácidos de BMP-2 humana madura, que corresponden a la posición de las metioninas de la MP52 humana madura (30<sup>a</sup>, 71<sup>a</sup> y 74<sup>a</sup>), están sustituidos por la 26<sup>a</sup> Val, 67<sup>a</sup> Val y 70<sup>a</sup> Val.

Se estima que el sitio de unión al receptor de BMP-4 humana madura está formado por los péptidos con la secuencia de aminoácidos desde la 18<sup>a</sup> Arg hasta la 36<sup>a</sup> Ala y desde la 58<sup>a</sup> Asn hasta la 75<sup>a</sup> Ser mostrada en SEC ID NO 3 del Listado de Secuencias (DNA Seq. 5 (5), 272-275, 1995). Los aminoácidos de BMP-4 humana madura, que corresponden a la posición de las metioninas de MP52 humana madura (30<sup>a</sup>, 71<sup>a</sup> y 74<sup>a</sup>), están sustituidos por la 28<sup>a</sup> Val, 69<sup>a</sup> Val y 72<sup>a</sup> Val.

Se estima que el sitio de unión al receptor de BMP-7 humana madura está formado por los péptidos con la secuencia de aminoácidos desde la 40<sup>a</sup> Lys hasta la 58<sup>a</sup> Ala y desde la 80<sup>a</sup> Asn hasta la 97<sup>a</sup> Glu mostrada en SEC ID NO 4 del Listado de Secuencias (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93(2), 878-883, 1996). Los aminoácidos de BMP-7 humana madura, que corresponden a la posición de las metioninas de MP52 humana madura (30<sup>a</sup>, 71<sup>a</sup> y 74<sup>a</sup>), están sustituidos por la 50<sup>a</sup> Leu, 91<sup>a</sup> Val y 94<sup>a</sup> Ile.

Es difícil llevar a cabo una modificación química selectivamente en los aminoácidos hidrófobos cuyas posiciones corresponden a aquellas de metionina de MP52 humana madura. Sin embargo, es posible sustituir aminoácidos hidrófobos por aminoácidos hidrófilos o polares mediante tecnología de ingeniería genética.

Puesto que los restos de triptófano están conservados en todas las BMPs descritas anteriormente, es posible sustituir aminoácidos hidrófobos por aminoácidos hidrófilos o polares mediante un método de modificación química o mediante tecnología de ingeniería genética. Los restos de triptófano también desempeñan un papel importante a la hora de realizar un cambio en una estructura tridimensional en la modificación química y la tecnología de manipulación genética.

De este modo, la presente invención se refiere a MP52 humana madura, en particular, que se obtiene convirtiendo uno a 4 restos de metionina o uno a 2 restos de triptófano que existen en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO 1 del Listado de Secuencias en restos hidrófilos o restos de aminoácidos polares mediante tecnología de manipulación recombinante. En la presente invención, los aminoácidos hidrófilos y los aminoácidos polares son ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, serina, treonina, etc. En la presente invención, cuando los restos de metionina o los restos de triptófano se convierten en otros aminoácidos hidrófilos o polares, la proteína de la presente invención se puede obtener transformando un ADN recombinante en *E. coli* que se obtiene sustituyendo los codones que corresponden a las metioninas en las posiciones 30<sup>a</sup>, 71<sup>a</sup>, 74<sup>a</sup> y 111<sup>a</sup>, o los codones que corresponden a triptófanos en las posiciones 32<sup>a</sup> y 35<sup>a</sup>, mostrados en SEC ID NO 1, por los codones de ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, serina, treonina, etc.

Además, la presente invención se refiere a cualesquiera proteínas maduras que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEC ID NOS 2 a 4, de la cual uno a dos restos de triptófano se someten a modificación química.

La presente invención se refiere además a cualesquiera proteínas maduras que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NOS 2 a 4, en la que los aminoácidos hidrófobos que consisten en el sitio de unión al receptor, 1 a 3 aminoácidos hidrófobos que corresponden a las posiciones de los restos de metionina 30<sup>a</sup>, 71<sup>a</sup> y 74<sup>a</sup>, o 1 a 2 restos de triptófano, están sustituidos por aminoácidos hidrófilos o aminoácidos polares. En la presente invención, los aminoácidos hidrófobos son metionina, valina, leucina, isoleucina o triptófano.

La presente invención se refiere a la proteína madura que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO 5 del Listado de Secuencias, en la que se oxidan 4 restos de metionina de los restos de metionina. En detalle, para la oxidación del resto de metionina se añade peróxido de hidrógeno a una concentración final de 0,014% a 2 mg/ml de la proteína madura, y la reacción se lleva a cabo durante más de 15 horas a temperatura ambiente y después se puede obtener la proteína madura, cuyos restos de metionina están en forma de sulfóxido de metionina.

La presente invención se refiere a la proteína madura que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO 6 del Listado de Secuencias, en la que se alquilan 1 a 4 restos de metionina de los restos de metionina. Con detalle, se añade ácido monoyodoacético a una concentración 50 a 100 mayor en relación molar que los restos de metionina a 2 mg/ml de la proteína madura, y la reacción se lleva a cabo durante más de 15 horas a temperatura ambiente y después se puede obtener la proteína madura, cuyos restos de metionina están S-carboximetilados.

La presente invención se refiere a la proteína madura que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO 7 del Listado de Secuencias, en la que se alilsulfenilan 2 restos de triptófano de los restos de triptófano. Con detalle, se añaden 20 equivalentes de cloruro de p-nitrofenilsulfenilo en ácido acético al 100% a 2 mg/ml de la proteína madura, y la reacción se lleva a cabo durante 1 hora a temperatura ambiente y después se puede obtener la proteína madura, cuyos restos de triptófano están alilsulfenilados.

La presente invención se refiere a la proteína madura que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO 2 del Listado de Secuencias, en la que están alilsulfenilados 1 a 2 restos de triptófano en las posiciones 28<sup>a</sup> y 31<sup>a</sup>.

La presente invención se refiere a la proteína madura que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO 2 del Listado de Secuencias, en la que uno o todos los restos 26<sup>o</sup>, 67<sup>o</sup> y 70<sup>o</sup> de valina, o uno o los dos restos 28<sup>o</sup> y 31<sup>o</sup> de triptófano, están sustituidos por ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, serina, treonina, etc.

La presente invención se refiere a la proteína madura que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO 3 del Listado de Secuencias, en la que uno o los dos restos 30<sup>o</sup> y 33<sup>o</sup> de triptófano están alilsulfenilados.

La presente invención se refiere a la proteína madura que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO 3 del Listado de Secuencias, en la que uno o todos los restos 28<sup>o</sup>, 69<sup>o</sup> y 72<sup>o</sup> de valina, o uno o los dos restos 30<sup>o</sup> y 33<sup>o</sup> de triptófano, están sustituidos por ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, serina, treonina, etc.

La presente invención se refiere a la proteína madura que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO 4 del Listado de Secuencias, en la que uno o los restos 52<sup>o</sup> y 55<sup>o</sup> de triptófano están alilsulfenilados.

La presente invención se refiere a la proteína madura que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO 4 del Listado de Secuencias, en la que uno o todos de 50<sup>a</sup> leucina, 91<sup>a</sup> valina, 94<sup>a</sup> isoleucina, 131<sup>a</sup> metionina, o uno o ambos restos 52<sup>o</sup> y 55<sup>o</sup> de triptófano, están sustituidos por ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, serina, treonina, etc.

La actividad semejante a un antagonista de BMP de la proteína modificada químicamente o sustituida por otros aminoácidos en la presente invención se puede demostrar midiendo la actividad de fosfatasa alcalina (ALPasa) como un marcador de actividad biológica, añadiendo en un medio de cultivo de una estirpe celular clonal de la calva murina (célula MC3T3-E1), que tiene propiedad osteoblástica, que determinó Kodama et al. (Kodama, H. et al. (1981) Jpn. J. Oral Biol., vol. 23, p.899). La ALPasa se usa a menudo como una enzima marcadora para la diferenciación/maduración en osteoblastos y células del cartílago (Pfeilschifter, J., et al., Endocrinology (1987), vol. 121, p 212-218; Rodan, G. A., et al., Calcium regulating hormones and bone metabolism, Elsevier Science Publishers B.V., (1992), p 183-196).

La proteína madura obtenida mediante los ejemplos 1 a 3 en la presente invención inhibió de manera independiente de la dosis el incremento de las actividades de ALPasa que fueron inducidas por BMP-2 humana madura recombinante (rh-BMP-2) o MP52 humana madura en la estirpe celular MC3T3-E1 y en la estirpe celular C3H10T 1/2 que tiene propiedad osteoblástica. El resultado indicó que la proteína en la presente invención pudo inhibir no sólo la actividad de MP52 humana sino también las actividades de otras BMPs.

La presente invención se refiere a un agente para terapia y/o prevención de osificación ectópica, que contiene como ingrediente eficaz cualquier proteína descrita anteriormente.

Además, la presente invención se refiere a un agente para terapia y/o prevención de enfermedades metabólicas con calcificación, que contiene como ingrediente eficaz cualquier proteína madura descrita anteriormente.

La proteína de la presente invención es eficaz en terapia como agente supresor del empeoramiento de la afección de OPLL y esclerosis arterial, de tratamiento de tumor en hueso y cartílago en el que se expresa BMP, y de tratamiento de otras enfermedades óseas metabólicas. Puede suprimir el empeoramiento de la afección reduciendo la función de osteoblastos mediante su uso a lo largo del ciclo del hueso metabólico, tal como enfermedad de Paget. También puede ser útil como reactivo para identificar o evaluar sistemas de agentes médicos que compiten con BMP y la unión al receptor.

El método de administración se puede ejemplificar como administraciones intravenosas e intramusculares. A la administración intravenosa se puede aplicar no sólo una inyección intravenosa estándar sino también una infusión de goteo intravenoso.

Por ejemplo, se puede preparar como una preparación en polvo para inyección. En este caso, se puede añadir al agente uno o más de dos tipos de excipientes solubles en agua, tales como manitol, azúcar, lactosa, maltosa, glucosa y fructosa, y se puede disolver en agua. Y después de colocar la mezcla en viales o ampollas, se liofilizan y después se cierran herméticamente para ser una preparación para inyección.

Aunque la dosificación de administración clínica para adultos durante un día puede variar y también depender de los métodos de administración, edades, peso, afecciones de pacientes, etc., habitualmente es 0,01-5 mg de la proteína.

Esta invención se describe con detalle mediante los ejemplos descritos más abajo. Sin embargo, esta invención no está restringida a estos ejemplos.

## EJEMPLOS

**Ejemplo 1.** Preparación de MP52 humana madura cuyo resto de metionina está oxidado.

(1) Oxidación del resto de metionina de MP52 humana madura mediante peróxido de hidrógeno (conversión en sulfóxido de metionina)

Se añadió peróxido de hidrógeno a MP52 humana madura (concentración 2 mg/ml) disuelta en 2 mM de EDTA - 10 mM de ácido clorhídrico a la concentración final de 0,014%, y la disolución se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante más de 15 horas.

(2) Separación de MP52 humana madura oxidada en la metionina

MP52 humana madura que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO 1 (en lo sucesivo MP52 humana madura sin modificar) y MP52 humana madura con la metionina oxidada, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO 5, se separaron usando HPLC de fase inversa en base a una diferencia entre los tiempos de retención de ambas proteínas. La oxidación aumentó la propiedad hidrófila de las proteínas, y el tiempo de retención de MP52 humana madura oxidada en la metionina en la HPLC de fase inversa se hace más rápido que el de MP52 humana madura sin modificar. Las condiciones de separación son las siguientes. Para la columna, se usó la columna Nucleosil 5-C18-300 (4,6 mm I.D. X 150 mm, GL Science Corp.) al caudal de 1,3 ml por minuto a 45°C; para detectar los picos, se midió la absorbancia a 214 nm y 280 nm. Para disolvente, se usó agua que contiene 0,05% de TFA como disolución A, y acetonitrilo que contiene 0,05% de TFA como disolución B. La elución de las proteínas se llevó a cabo con un gradiente lineal de disolución B desde 25% hasta 45% durante 80 minutos usando una bomba de HPLC, HP1050 (Hewlett Packard).

En estas condiciones, MP52 humana madura sin modificar eluyó a alrededor de 51 minutos, mientras que MP52

humana madura oxidada en la metionina eluyó a alrededor de 47 minutos. De este modo, ambas se separaron fácilmente.

### (3) Determinación de la oxidación del resto de metionina

5 La oxidación del resto de metionina se detectó comparando los patrones de elución de la cromatografía en columna de fase inversa de fragmentos digeridos con tripsina de MP52 humana madura sin modificar y MP52 humana madura oxidada en la metionina.

10 MP52 humana madura sin modificar tiene siete restos de cisteína, como se muestra en SEC ID NO 1 del Listado de Secuencias. Seis de siete restos de cisteína forman tres enlaces de disulfuro intramoleculares, y la cisteína que queda forma un dímero. Para la digestión enzimática completa es necesario reducir el enlace de disulfuro y bloquear el grupo SH, para inhibir la reunión. Para este fin, se usó ditiotreitól para reducir el enlace de disulfuro, y el resto de cisteína se alquiló (S-carboximetilación) antes de la digestión con tripsina.

15 En primer lugar, MP52 humana madura sin modificar y MP52 humana madura oxidada en la metionina liofilizadas se disolvieron en 8 M de urea - 0,2 M de bicarbonato de amonio - 2 mM de EDTA (pH 8,5) a la concentración final de 1 mg/ml, y se añadió un exceso molar de 50 veces de ditiotreitól (DTT) a resto de cisteína y se hizo reaccionar a 50°C durante 30 minutos. A esta disolución se añadió un exceso molar de 250 veces de monoyodoacetamida a resto de cisteína y se hizo reaccionar durante 30 minutos con agitación para producir MP52 humana madura sin modificar S-carboximetilada y MP52 humana madura oxidada en la metionina S-carboximetilada. La digestión de estas proteínas se llevó a cabo añadiendo tripsina. Después de una dilución de cuatro veces de esta disolución con agua para obtener la concentración final de urea de 2 M, a la relación en peso de 1/50 a las proteínas, a 37°C durante 20 horas, la digestión de tripsina se aplicó a la columna de HPLC de fase inversa para separar todos los fragmentos. Las condiciones de separación son las siguientes. Para la separación se usó la columna Nucleosil 5-C18-300 (4,6 mm I.D. X 150 mm, GL Science Corp.) al caudal de 1,3 ml por minuto a 45°C; para detectar los picos, se midió la absorbancia a 214 nm. Para el disolvente, se usó agua que contiene 0,05% de TFA como disolución A, y acetonitrilo que contiene 0,05% de TFA como solución B. La elución de los péptidos se llevó a cabo mediante un gradiente lineal de disolución B desde 0% hasta 45% durante 90 minutos después de mantener 0% durante los cinco minutos 25 iniciales, usando la bomba de HPLC HP1050 (Hewlett Packard).

30 Subsiguientemente, se llevó a cabo el análisis de la composición de aminoácidos para determinar las posiciones del péptido digerido en la estructura primaria de MP52 humana madura sin modificar alquilada reducida y MP52 humana madura oxidada en la metionina alquilada reducida. La operación del análisis de la composición de aminoácidos se basó principalmente en Zoku Seikagaku Zikken Kouza (Tokyo Kagaku Doujin), Vol. 2, Protein Chemistry (I), sección 4. Más abajo se da una breve descripción. La hidrólisis se llevó a cabo en un vapor de HCl 6N que contiene 0,1% de fenol a 110°C durante 21 horas usando PICO. TAG. WORK STATION (Waters). Tras esta etapa, el análisis de la composición de aminoácidos se llevó a cabo mediante el método de PTC usando como aminoácido patrón Amino acid standard H (Pierce). Los PTC-aminoácidos se separaron mediante HPLC de fase inversa usando una bomba de HPLC (modelo 510; Waters), una Wakopak WS-PTC (4,0 mm I.D. X 200 mm; Wako Pure Chemicals), y disolventes para eluyente A de PTC-aminoácidos y eluyente B de PTC-aminoácidos (ambos de Wako Pure Chemicals). 35

40 Los tiempos de retención de HPLC de los péptidos de tripsina identificados en las estructuras primarias de MP52 madura sin modificar y oxidada se compararon entre sí. Los fragmentos de tripsina de MP52 humana madura que contiene restos de metionina fueron de tres tipos, que corresponden a: la posición desde 29<sup>a</sup> a 56<sup>a</sup> (29-56; que contiene la metionina 30<sup>a</sup>) mostrada en SEC ID NO 1, la posición desde 57<sup>a</sup> a 88<sup>a</sup> (57-88; que contiene las metioninas 71<sup>a</sup> y 74<sup>a</sup>) en SEC ID NO 1, y la posición desde 107<sup>a</sup> a 119<sup>a</sup> (10-119; incluyendo la metionina 111<sup>a</sup>) en SEC ID NO 1. El tiempo de elución de los fragmentos respectivos derivados de la MP52 humana madura sin modificar alquilada reducida fue alrededor de 84 min, 62 min, y 36 min en orden. En comparación, los fragmentos 45 derivados de la MP52 humana madura oxidada en la metionina alquilada reducida (SEC ID NO 5) fueron alrededor de 80 min, 48 min, y 31 min en orden, mostrando una elución más pronto que la de los fragmentos derivados de la MP52 humana madura sin modificar alquilada reducida.

50 Por otro lado, no hubo ninguna diferencia para otros fragmentos que no contienen metionina. Como resultado, se determinó la reacción específica de oxidación de los restos de metionina.

### **Ejemplo 2.** Preparación de MP52 humana madura cuyo resto de metionina se S-carboximetiló

#### (1) Alquilación del resto de metionina de MP52 humana madura mediante ácido monoyodoacético

55 Aunque la mayor reactividad de alquilación usando ácido monoyodoacético se observa en los restos de SH del resto de cisteína, la reacción de alquilación se produce casi selectivamente en el resto de metionina en una condición ácida, debido a que todos los restos de cisteína de MP52 humana madura sin modificar forman enlaces de disulfuro como se describe anteriormente. Por lo tanto, la operación se llevó a cabo según lo siguiente. Se añadió ácido monoyodoacético (relación molar; 50-100 veces mayor que los moles de resto de metionina) a MP52 humana madura sin modificar con una concentración de 2 mg/ml disuelta en 10 mM de ácido clorhídrico, y se incubó a temperatura ambiente durante 3-18 horas.



## (2) Separación de MP52 humana madura cuyo resto de metionina se alquiló

MP52 humana madura sin modificar y MP52 humana madura alquilada en la metionina que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO 6 se separaron basándose en una diferencia en los tiempos de retención entre ambas proteínas usando HPLC de fase inversa. Las condiciones de separación (columna empleada, caudal, longitudes de onda para la detección, y bomba para HPLC) fueron las mismas que las del Ejemplo 1 (2). Para el disolvente, se usó agua que contiene 0,05% de TFA como disolución A, y acetonitrilo que contiene 0,05% de TFA como disolución B. La elución de las proteínas se realizó mediante un gradiente lineal de disolución B desde 30% a 45% durante 60 minutos después de cinco minutos de una condición inicial.

En esta condición, MP52 humana madura sin modificar eluyó como un pico a alrededor de 38 minutos, y, en contraste con esto, MP52 humana madura alquilada mostró cuatro picos (tiempos de elución: 36 min, 34 min, 32 min, y 29 min) distintos del pico a alrededor de 38 minutos, que es el tiempo de elución de MP52 humana madura sin modificar. El tiempo de dilución es menor según el procedimiento de la reacción, a saber, dependiendo del número creciente de metioninas alquiladas. Estos picos se recogieron para identificar estas proteínas mediante el análisis de la composición de aminoácidos similar al Ejemplo 1 (3). En el análisis de la composición de aminoácidos, se detectan metioninas alquiladas como un pico separado de las metioninas no modificadas, debido a que las metioninas alquiladas no se descomponen por hidrólisis. A saber, el progreso de la reacción se puede determinar mediante una disminución en los picos de metionina.

Mediante el experimento de separación, se supo que el pico de elución a 29 min fue aquel de MP52 madura alquilada en las cuatro metioninas, el pico de elución a 32 min fue aquel de la alquilada en las tres metioninas, el pico de elución a 34 min fue aquel de la alquilada en dos metioninas, y el pico de elución a 36 min fue el de la alquilada en una metionina. Además, se supo que el pico de elución a alrededor de 38 min fue el de la no alquilada. Las composiciones de aminoácidos de estos picos tenían una buena concordancia con las de los valores teóricos de MP52 humana madura, excepto por el valor de metionina. En consecuencia, se confirmó que la reacción de alquilación para el resto de metionina se produce específicamente, y los picos separados muestran etapas de progresión de la reacción de alquilación diferentemente.

## (3) Determinación de los restos de metionina alquilados

El resto de metionina alquilado se determinó comparando los patrones de elución de fragmentos digeridos con tripsina de MP52 humana madura sin modificar y MP52 humana madura alquilada en la metionina, en HPLC de fase inversa.

De forma similar al Ejemplo 1 (3), los restos de cisteína se bloquearon mediante alquilación antes de la digestión con tripsina, después de la reducción de los enlaces de disulfuro usando ditioneitol. Puesto que la S-carboximetilación se llevó a cabo usando ácido monoyodoacético para la alquilación de metionina, la alquilación de cisteína se llevó a cabo usando 4-vinilpiridina como reactivo de alquilación para ácido monoyodoacético, que no fue similar al Ejemplo 1. La reacción de alquilación tiene lugar casi selectivamente en cisteína reducida a pH 8,5, y apenas en metionina. De este modo, la razón de emplear una alquilación diferente es detectar una reacción lateral en la metionina.

En primer lugar, se disolvieron MP52 humana madura sin modificar y MP52 humana madura alquilada en la metionina liofilizadas en una disolución de 6 M de guanidina - HCl - 0,4 M de tampón de Tris-HCl (pH 8,5) a la concentración final de 1 mg/ml, y se redujeron con un exceso molar de 50 veces de ditioneitol (DTT) a restos de cisteína, a 50°C durante 30 minutos. La S-piridil-etilación se llevó a cabo añadiendo un exceso molar de 250 veces de 4-vinilpiridina a restos de cisteína, y se incubó durante 30 minutos con agitación. La disolución se aplicó en una columna de desalación (PD-10; Pharmacia) equilibrada con 6 M de guanidina - HCl - 0,4 M de tampón de Tris-HCl (pH 8,5), para eliminar el reactivo en exceso, y seguido de HPLC de fase inversa usando una columna de fase inversa (Cosmasil 10C18-300, 4,6 mm I.D. X 100 mm, Nakalai Tesque Inc.). Se recogió una fracción que tiene una absorción tanto a 280 nm derivada de triptófano como 254 nm derivada de piridina, mediante el detector de UV.

Tras esta etapa, se llevó a cabo la digestión con tripsina mediante el mismo método que el del Ejemplo 1 (3), para separar los fragmentos digeridos.

Finalmente, la posición de los fragmentos respectivos en la estructura primaria de MP52 madura se determinó mediante el análisis de la composición de aminoácidos de la misma manera como el Ejemplo 1 (3).

Usando la HPLC de fase inversa, se llevó a cabo una comparación de los tiempos de elución de los fragmentos de tripsina respectivos de MP52 humana madura sin modificar y MP52 humana madura alquilada en la metionina, cuya posición en las secuencias primarias se determinó mediante el análisis de la composición de aminoácidos. Los fragmentos de tripsina de MP52 humana madura que contiene resto de metionina fueron de tres tipos, que corresponden a: la posición de aminoácidos de 29<sup>a</sup> a 56<sup>a</sup> (29-56; que contiene la metionina 30<sup>a</sup>) mostrada en SEC ID NO 1, la posición de aminoácidos de 57<sup>a</sup> a 88<sup>a</sup> (57-88; que contiene las metioninas 71<sup>a</sup> y 74<sup>a</sup>) en SEC ID NO 1, y la posición de aminoácidos de 107<sup>a</sup> a 119<sup>a</sup> (107-119; que contiene la metionina 11<sup>a</sup>) en SEC ID NO 1. El tiempo de elución de los fragmentos respectivos derivados de MP52 humana madura sin modificar fue alrededor de 77 min, 58 min, y 36 min en orden. En comparación, los fragmentos derivados de MP52 humana madura alquilada en la

metionina (SEC ID NO 6) fueron alrededor de 74 min, 42 min, y 30 min en orden, mostrando una elución más temprana que la de los fragmentos de MP52 humana madura sin modificar.

Por otro lado, el tiempo de elución de otros fragmentos que no contienen metionina fue el mismo entre MP52 humana madura sin modificar y la alquilada en la metionina.

- 5 En el análisis de la composición de aminoácidos, sólo el número de restos de metionina derivados de la MP52 humana madura alquilada en la metionina fue diferente de los valores teóricos. La secuencia N-terminal de estos fragmentos se analizó usando un secuenciador (modelo 476A; Applied Biosystems), y se confirmó que la alquilación se produjo específicamente en los restos de metionina.

### **Ejemplo 3** Preparación de MP52 humana madura cuyo triptófano se alilsulfeniló

- 10 (1) Alilsulfenilación de restos de triptófano de MP52 humana madura mediante cloruro de p-nitrofenilo.

Se añadió una relación molar de veinte veces de cloruro de p-nitrofenilo, que se disolvió en ácido acético al 100%, a la MP52 humana madura sin modificar (2 mg/ml disuelta en ácido acético al 50%), y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora.

#### (2) Separación de MP52 humana madura alilsulfenilada

- 15 MP52 humana madura sin modificar y MP52 humana madura alilsulfenilada que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID NO 7 se separaron basándose en la diferencia en el tiempo de retención de columna en la HPLC de fase inversa. El tiempo de elución de MP52 humana madura alilsulfenilada está retrasado en comparación con MP52 humana madura sin modificar en la HPLC de fase inversa, lo que se debe a un incremento en la propiedad hidrófoba por la alilsulfenilación. Las condiciones de separación son las siguientes: la columna empleada, el caudal, y la bomba para HPLC fueron los mismos que los del Ejemplo 1 (2), y la temperatura de la columna y las longitudes de onda para la detección fueron 40°C y 214 nm y 365 nm, respectivamente. Para el disolvente, se usó para elución agua que contiene 0,05% de TFA como disolución A, y acetonitrilo que contiene 0,05% de TFA como disolución B. Las eluciones de las proteínas se llevaron a cabo mediante un gradiente lineal de disolución B desde 25% hasta 60% durante 35 minutos después de mantener durante cinco minutos con 25% de disolución B. En estas condiciones, MP52 humana madura sin modificar eluyó a alrededor de 22 min, y, en comparación, MP52 humana madura alilsulfenilada en el triptófano eluyó a alrededor de 26 min. La diferencia de tiempos de elución entre estas proteínas permite su separación fácil.
- 20
- 25

#### (3) Determinación de la alilsulfenilación de triptófano

- 30 Después de la reducción del enlace de disulfuro mediante el mismo método descrito en el Ejemplo 1, MP52 humana madura sin modificar, cuyos restos de cisteína se alquilaron (S-carboximetilaron), y MP52 humana madura alilsulfenilada en el triptófano se digirieron con tripsina, y los fragmentos de la digestión se separaron mediante columna de fase inversa C18. Las posiciones de los aminoácidos de los fragmentos se determinaron mediante el análisis de la composición de aminoácidos.

- 35 El fragmento de tripsina de MP52 humana madura que contiene restos de triptófano fue aquel que corresponde a la posición desde las posiciones 29<sup>a</sup> a 56<sup>a</sup> (29-56; que contienen las posiciones 32<sup>a</sup> y 35<sup>a</sup> de triptófano) sola mostrada en SEC ID NO 1. Sólo el tiempo de elución (alrededor de 95 min) de un fragmento que contiene resto de triptófano, que deriva de MP52 humana madura alilsulfenilada (SEC ID NO 7), se retrasó en comparación con el tiempo de elución (alrededor de 84 min) de un fragmento derivado de la MP52 humana madura sin modificar. Por otro lado, el tiempo de elución de otros fragmentos que no contienen triptófano no mostró ningún cambio. El análisis de la secuencia N-terminal mostró diferencia solamente en el resto de triptófano entre MP52 humana madura sin modificar y la modificada.
- 40

### **Ejemplo 4** Ensayo de inhibición de actividad morfogénica ósea

- 45 La actividad antagonista de BMP-2 de la proteína madura de esta invención se ensayó añadiendo la proteína a medio de cultivo de células MC3T3-E1, que son una estirpe celular clonal de calva murina establecida por el Dr. Kodama et al. y tiene propiedades semejantes a osteoblastos, o células C3H10T 1/2, que son una estirpe celular mesenquimatosa y multipotente que se diferencian en osteoblastos, condrocitos, miocitos, células grasas, según la condición de cultivo. Estas estirpes celulares se cultivaron según el método descrito por Dr. Takuwa et al. Para las células MC3T3-E1, se inocularon  $5 \times 10^3$  células por  $\text{cm}^2$  y se cultivaron en medio  $\alpha$ -MEM que contiene 10% de suero fetal bovino, durante tres días. Después de lavar las células con el medio  $\alpha$ -MEM, el medio se sustituyó por medio  $\alpha$ -MEM que contiene 0,3% de seroalbúmina bovina. A este medio, se añadió la proteína madura de la invención con diversas concentraciones y la rh-BMP-2 madura (BMP-2 humana recombinante), y después se cultivó durante tres días (post cultivo). La actividad de ALPasa en las células se midió mediante análisis colorimétrico usando fosfato de p-nitrofenilo como sustrato.
- 50

Las condiciones de cultivo de células C3H10T ½ fueron las mismas que las de las células MC3T3-E1, excepto que el medio usado para el precultivo fue medio de cultivo BME que contiene 10% de suero fetal bovino, y el medio usado para el post cultivo fue medio de cultivo BME que contiene 2% de suero fetal bovino.

5 La Fig. 1 muestra el resultado de la actividad de ALPasa por MP52 humana madura alquilada en la metionina, en comparación con la de MP52 humana madura sin modificar, en células MC3T3-E1. Ambas proteínas se obtuvieron de la diferencia en el tiempo de retención en la HPLC de fase inversa en el Ejemplo 2. En la figura, la línea continúa con círculos negros representa MP52 humana madura sin modificar, la línea continua con cuadrados negros representa MP52 humana madura alquilada en una metionina, la línea discontinua con triángulos negros representa MP52 humana madura alquilada en dos metioninas, la línea continua con círculos blancos representa MP52 humana madura alquilada en tres metioninas, la línea discontinua con triángulos blancos representa MP52 humana madura alquilada en cuatro metioninas, respectivamente. Los círculos negros mostrados en el eje Y presentan actividad de células sin tratamiento por ningún reactivo. Como se muestra en la Fig. 1, la actividad inductora de ALPasa en células MC3T3-E1 disminuyó dependiendo del transcurso de la alquilación de metionina.

15 La Fig. 2 muestra la actividad antagónica de MP52 humana madura con la metionina oxidada obtenida en el ejemplo 1 y de MP52 humana madura alilsulfenilada en el triptófano obtenida en el ejemplo 3, en dos estirpes celulares diferentes. La Fig. 2 (A) representa una actividad antagónica frente a rh-BMP-2 madura en células C3H10T ½. La Fig. 2 (B) muestra una actividad antagónica frente a MP52 humana madura en células MC3T3-E1. En ambas figuras, la línea continua con círculos negros representa MP52 humana madura alilsulfenilada en el triptófano, y la línea discontinua con círculos blancos representa MP52 humana madura oxidada en la metionina, respectivamente. En la Fig. 2 (A), el cuadrado negro muestra la actividad de ALPasa inducida por 300 ng/ml de rh-BMP-2 madura sola, en células C3H10T ½. En la Fig. 2 (B), el cuadrado negro muestra la actividad de ALPasa inducida por 600 ng/ml de MP52 humana madura sin modificar sola, en células MC3T3-E1. Los cuadrados blancos representan la actividad en los experimentos sin ningún reactivo.

25 Como se muestra en la Fig. 2 (A), 300 ng/ml de rh-BMP-2 madura promovieron la actividad de ALPasa en células C3H10T ½ alrededor de 40 veces más que el grupo de control. La MP52 humana madura modificada de esta invención inhibió la actividad de ALPasa de un equivalente a 20 equivalentes molares, de manera dependiente de la dosis. Además, como se muestra en la Fig. 2 (B), 600 ng/ml de la MP52 humana madura sin modificar promovieron la actividad de ALPasa en células MC3T3-E1 alrededor de 3 veces más que el grupo de control. La MP52 humana madura modificada en los aminoácidos de esta invención inhibió la actividad de ALPasa de un equivalente a 10 equivalentes molares, de una manera dependiente de la dosis.

30 Texto libre del listado de secuencias

<210> 1

<223> MP52 madura

<210> 2

35 <223> BMP-2 madura

<210> 3

<223> BMP-4 madura

<210> 4

<223> BMP-7 madura

40 <210> 5

<223> Proteína MP52 madura. Nota: las Met 30<sup>a</sup>, 71<sup>a</sup>, 74<sup>a</sup> y 111<sup>a</sup> se modifican a sulfóxido de Met.

<210> 6

<223> Proteína MP52 madura. Nota: las Met 30<sup>a</sup> y/o 71<sup>a</sup> y/o 74<sup>a</sup> y/o 111<sup>a</sup> se modifican a s-carboximetil Met.

<210> 7

45 <223> Proteína MP52 madura. Nota: los Trp 32<sup>o</sup> y 35<sup>o</sup> se modifican a alilsulfenil Trp.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Hoechst Marion Roussel

<120> PROTEÍNA MADURA QUE TIENE ACTIVIDAD ANTAGONISTA FRENTE A PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSEA.

<130> JH98K011 PCT SECUENCIAS EN INGLÉS  
<140>  
<141>  
<150> 10-288103  
5 <151> 09-10-1998  
<160> 7  
<170> PatentIn Ver. 2.1  
<210> 1  
<211> 119  
10 <212> PRT  
<213> Humano  
<220>  
<221> CADENA  
<222> (1)..(119)  
15 <223> MP52 madura  
<300>  
<301> MAKISHIMA, Fusoa  
TAKAMATSU, Hiroyuki  
MIKI, Hideo  
20 KAWAI, Shinji  
KIMURA, Michio  
MATSUMOTO, Tomoaki  
KATSUURA, Mieko  
ENOMOTO, Koichi  
25 SATOH, Yusuke  
<302> Nueva proteína y procedimiento para producirla.  
<310> WO 96/33215  
<312> 24-10-1996  
<313> 1 a 119  
30 <400> 1

ES 2 382 992 T3

Pro Ser Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala  
1 5 10 15

Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp  
20 25 30

Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu  
35 40 45

Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His  
50 55 60

Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro  
65 70 75 80

Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe  
85 90 95

Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val  
100 105 110

Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg  
115

<210> 2

<211> 114

<212> PRT

5 <213> Humano

<220>

<221> CADENA

<222> (1)..(114)

<223> BMP-2 madura

10 <300>

<301> WANG, Elizabeth A.

WOZNEY, John M.

ROSEN, Vicki A.

<302> Nuevas composiciones osteoinductoras.

15 <310> WO 88/00205

<312> 14-01-1988

ES 2 382 992 T3

<313> 1 a 114

<400> 2

Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg  
1 5 10 15

His Pro Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile  
20 25 30

Val Ala Pro Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro  
35 40 45

Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile Val Gln  
50 55 60

Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val  
65 70 75 80

Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Glu  
85 90 95

Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Asp Met Val Val Glu Gly Cys Gly  
100 105 110

Cys Arg

<210> 3

5 <211> 116

<212> PRT

<213> Humano

<220>

<221> CADENA

10 <222> (1)..(116)

<223> BMP-4 madura

<300>

<301> WOZNEY, John M.

ROSEN, Vicki

15 CELESTE, Anthony J.

MITSOCK, Lisa M.

WHITTERS, Matthew J.

KRIZ, Ronald W.

HEWICK, Rodney M.

WANG, Elizabeth A.

5 <302> Nuevos reguladores de la formación ósea: clones moleculares y actividades.

<303> Science

<304> 242

<305> 4885

<306> 1528-1534

10 <307> 16-12-1988

<308> Genbank/M22490

<313 > 1 a 116

<400> 3

Ser Pro Lys His His Ser Gln Arg Ala Arg Lys Lys Asn Lys Asn Cys  
 1 5 10 15

Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp  
 20 25 30

Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr Gln Ala Phe Tyr Cys His Gly Asp  
 35 40 45

Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile  
 50 55 60

Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Ser Ile Pro Lys Ala Cys  
 65 70 75 80

Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu  
 85 90 95

Tyr Asp Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Glu Met Val Val Glu Gly  
 100 105 110

Cys Gly Cys Arg  
 115

15

<210> 4

<211> 139

<212> PRT  
<213> Humano  
<220>  
<221> CADENA  
5 <222> (1)..(139)  
<223> BMP-7 madura  
<300>  
<301> OZKAYNAK, Engin  
RUEGER, David C.  
10 DRIER, Eric A.  
CORBETT, Clare  
RIDGE, Richard J.  
SAMPATH, Ruber T.  
OPPERMANN, Hermann  
15 <3 02> ADNc OP-1 codifica una proteína osteogénica en la familia de TGF-beta.  
<303> EMBO J.  
<304> 9  
<305> 7  
<306> 2085-2093  
20 <307> 1990  
<308> librería de datos EMBL/X51801  
<313> 1 a 139  
<400> 4



ES 2 382 992 T3

Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys  
1 5 10 15

Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser  
20 25 30

Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg  
35 40 45

Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala  
50 55 60

Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn  
65 70 75 80

Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro  
85 90 95

Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile  
100 105 110

Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr  
115 120 125

Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His  
130 135

<210> 5

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Humano

<220>

<221> CADENA

<222> (1)..(119)

<223> Proteína MP52 madura. Nota: las Met 30<sup>a</sup>, 71<sup>a</sup>, 74<sup>a</sup> y 111<sup>a</sup> se modifican a sulfóxido de Met.

10 <400> 5

ES 2 382 992 T3

```

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

```

<210> 6

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Humano

<220>

<221> CADENA

<222> (1)..(119)

<223> Proteína MP52 madura. Nota: las Met 30<sup>a</sup> y/o 71<sup>a</sup> y/o 74<sup>a</sup> y/o 111<sup>a</sup> se modifican a s-carboximetil Met.

10 <400> 6

## ES 2 382 992 T3

Pro Ser Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala  
1                            5                            10                            15

Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp  
                          20                            25                            30

Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu  
                          35                            40                            45

Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His  
                          50                            55                            60

Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro  
                          65                            70                            75                            80

Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe  
    85                            90                            95

Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val  
                          100                            105                            110

Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg  
                          115

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Humano

<220>

<221> CADENA

<222> (1)..(119)

<223> Proteína MP52 madura. Nota: los Trp 32° y 35° se modifican a alilsulfenil Trp.

10 <400> 7

ES 2 382 992 T3

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

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína madura que tiene una actividad antagónica frente a proteínas morfogenéticas óseas, caracterizada porque se obtiene a partir de la secuencia de aminoácidos SEC ID NO:1 de MP52 humana madura convirtiendo al menos un resto entre restos de metionina en la posición 30, 71 y/o 74, o entre restos de triptófano en la posición 32 y/o 35, de dicha secuencia SEC ID NO:1, en un resto de metionina oxidado o alquilado o en un resto de triptófano alilsulfenilado en el anillo indólico, o sustituyendo dichos restos de metionina en la posición 30, 71 y/o 74, o dichos restos de triptófano en la posición 32 y/o 35, de dicha secuencia SEC ID NO:1, por un resto de aminoácido hidrófilo o un resto de aminoácido polar.
- 10 2. La proteína madura según la reivindicación 1, en la que se oxidan los restos de metionina en la posición 30, 71 y/o 74 y además el resto de metionina en la posición 111 de la secuencia de aminoácidos de MP52 humana madura de SEC ID NO: 1, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 5.
3. La proteína madura según la reivindicación 1, en la que la reacción de alquilación es S-carboximetilación, en la que al menos un resto de metionina se S-carboximetila, y que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 6.
- 15 4. La proteína madura según la reivindicación 1, en la que los dos restos de triptófano están alilsulfenilados, y que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 7.
5. La proteína madura según la reivindicación 1, en la que el resto de aminoácido hidrófilo o el resto de aminoácido polar se selecciona del grupo que consiste en ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, serina y treonina.
- 20 6. La proteína madura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicha MP52 humana madura es una proteína dímera.
- 25 7. Una proteína madura que tiene una actividad antagonista frente a proteínas morfogenéticas óseas, caracterizada porque se obtiene convirtiendo al menos un resto de restos de triptófano en la posición 28 y/o 31 de la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 2 de BMP-2 humana madura, en la posición 30 y/o 33 de la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 3 de BMP-4 humana madura, o en la posición 52 y/o 55 de la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 4 de BMP-7 humana madura en un resto de triptófano alilsulfenilado en el anillo indólico, o sustituyendo dichos restos de triptófano en la posición 28 y/o 31 de SEC ID NO: 2 de BMP-2 humana madura y/o en la posición 30 y/o 33 de SEC ID NO: 3 de BMP-4 humana madura y/o en la posición 52 y/o 55 de SEC ID NO: 4 de BMP-7 humana madura por un resto de aminoácido hidrófilo o un resto de aminoácido polar en lugar de dicho resto de triptófano.
- 30 8. Una proteína madura que tiene una actividad antagonista frente a proteínas morfogenéticas óseas, caracterizada porque se obtiene mediante tecnología de ingeniería genérica sustituyendo
- a) al menos un resto de aminoácido de tres restos de aminoácidos hidrófobos en la posición 26, 67 y 70 de la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 2 de BMP-2 humana madura;
- b) al menos un resto de aminoácido de tres restos de aminoácidos hidrófobos en la posición 28, 69 y/o 72 de la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 3 de BMP-4 humana madura; o
- 35 c) al menos un resto de aminoácido de tres restos de aminoácidos hidrófobos en la posición 50, 91 y/o 94 de la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 4 de BMP-7 humana madura,
- posiciones las cuales corresponden a aquellas de restos de metionina situados en la posición 30<sup>a</sup>, 71<sup>a</sup>, y 74<sup>a</sup> de la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:1 de MP52 humana madura,
- por un resto de aminoácido hidrófilo o un resto de aminoácido polar.
- 40 9. La proteína madura según la reivindicación 7 y 8, en la que el resto de aminoácido hidrófilo o el resto de aminoácido polar se selecciona del grupo que consiste en ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, histidina, serina y treonina.
10. La proteína madura según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la que dicha BMP-2 humana madura, BMP-4 humana madura, o BMP-7 humana madura es una proteína dímera.
- 45 11. Un agente para terapia y/o prevención de osificación ectópica, que contiene una proteína madura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 como ingrediente eficaz que muestra una actividad antagonista frente a una proteína morfogenética ósea.
- 50 12. Un agente para terapia y/o prevención de enfermedades metabólicas con calcificación, que contiene una proteína madura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 como ingrediente eficaz que muestra una actividad antagonista frente a una proteína morfogenética ósea.

- 5 13. Un agente para terapia y/o prevención según las reivindicaciones 11 ó 12, en el que dicha osificación ectópica o enfermedad metabólica es osteosis neurótica, miositis osificante traumática, osificación ectópica provocada por estrés de operación, osificación por defecto de suministro de oxígeno, tumor osteogénico, osificación del ligamento longitudinal posterior, osificación heterotópica pseudomaligna, tumor óseo pseudomaligno, miositis osificante circunscrita, esclerosis arterial y/o enfermedad de Paget.
14. Una composición farmacéutica que comprende una proteína madura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 como el ingrediente activo farmacéutico.
15. La composición farmacéutica de la reivindicación 14, en la que la proteína madura es un antagonista de BMP.
- 10 16. Uso de una proteína madura según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 como reactivo para identificar o evaluar sistemas de agentes médicos que compiten con BMP y la unión al receptor.

1/2

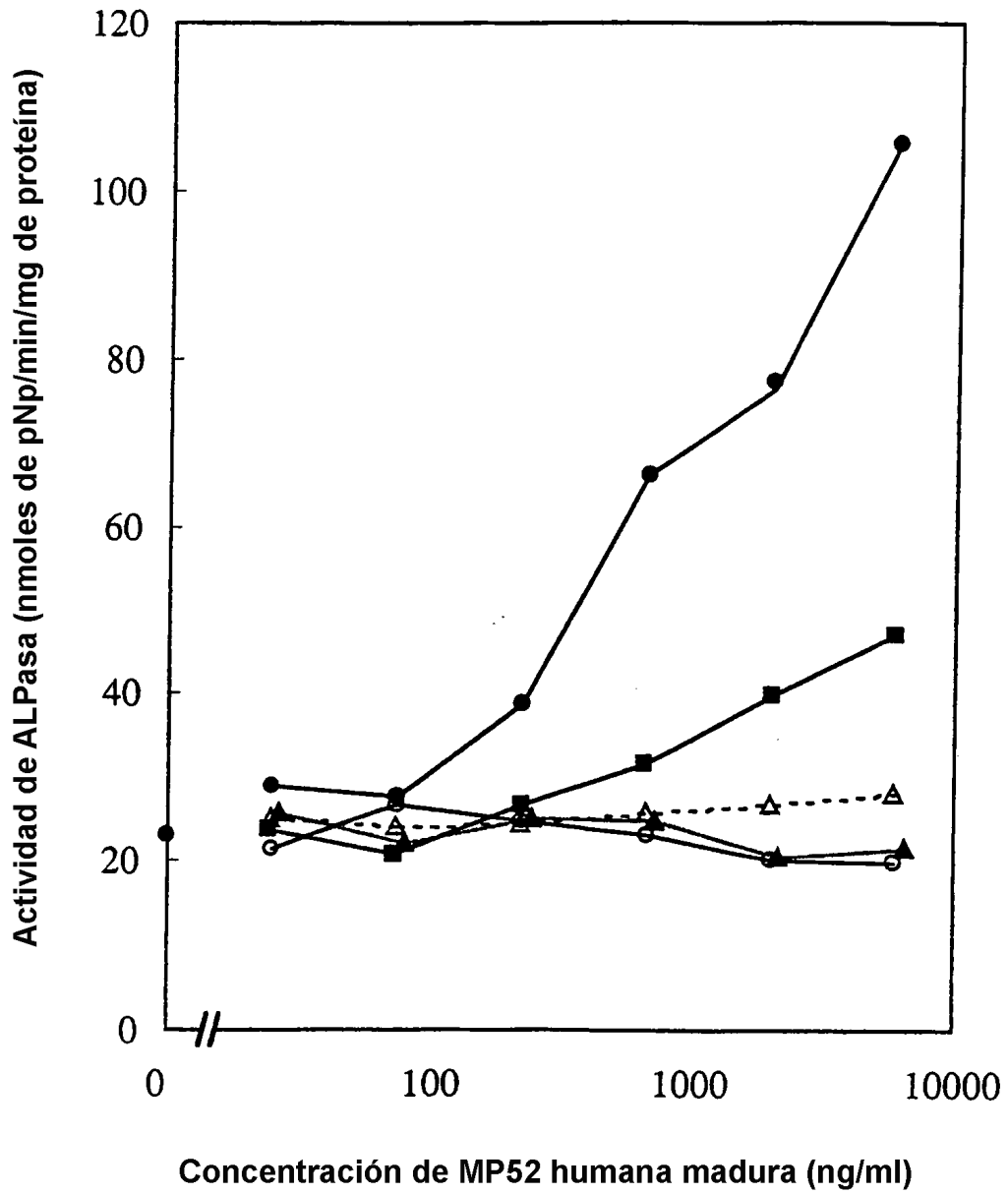


FIGURA 1

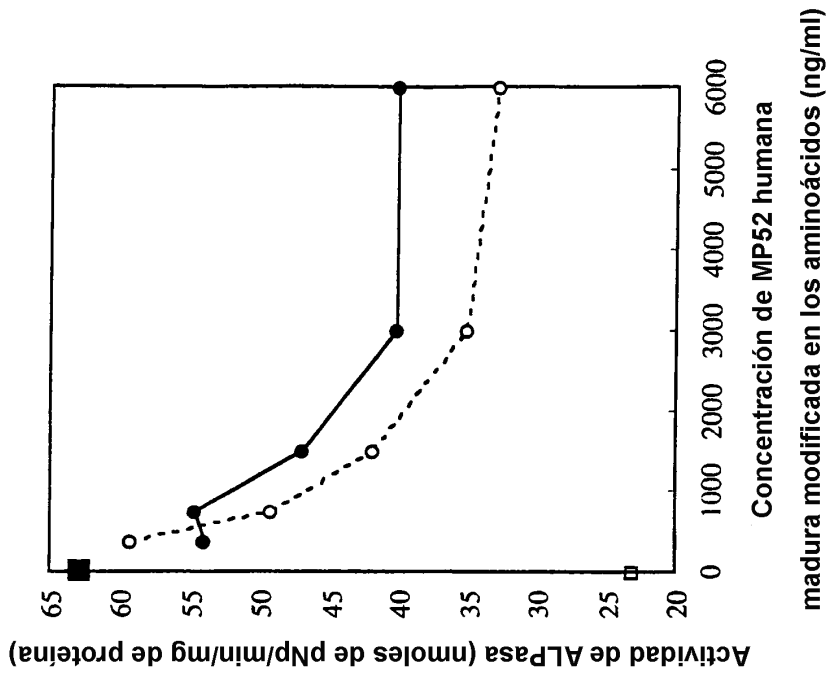


FIGURA 2A

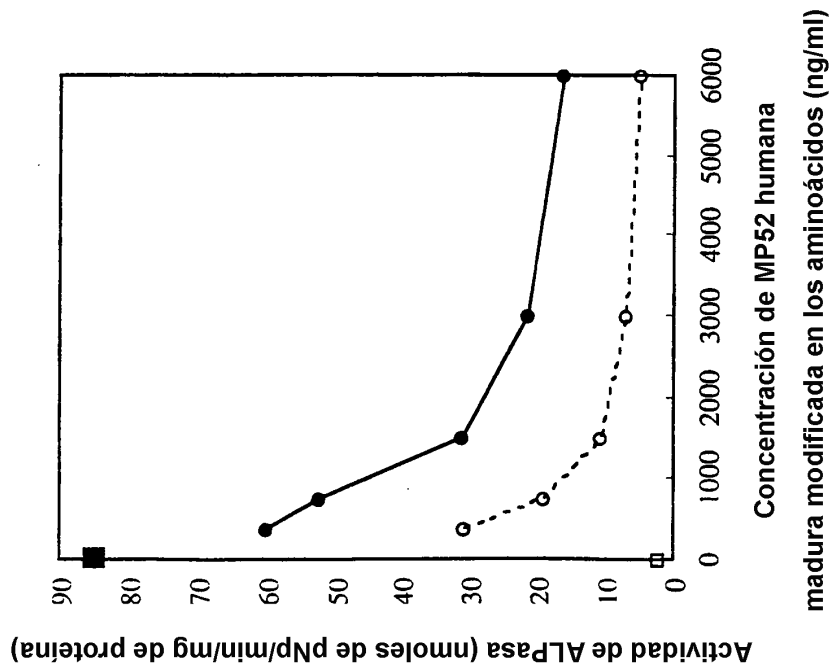


FIGURA 2B