

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 327**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2003 E 03760452 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2012 EP 1572950**

54 Título: **Compuestos asociados a un dominio único de TDF y análogos de los mismos**

30 Prioridad:

17.06.2002 US 389490 P

22.01.2003 US 441724 P

28.03.2003 US 458851 P

28.03.2003 US 458727 P

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

06.03.2013

73 Titular/es:

**THRASOS, INC. (100.0%)
95 SAWYER ROAD, SUITE 130
WALTHAM, MA 02453, US**

72 Inventor/es:

**CARLSON, WILLIAM, D. y
KECK, PETER, C.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 397 327 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

Compuestos asociados a un dominio único de TDF y análogos de los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a análogos del factor de diferenciación tisular (TDF). Más específicamente, la invención hace referencia a métodos basados la estructura en y a composiciones útiles en la identificación, el diseño, y la producción de moléculas que actúan como moduladores funcionales de los receptores de tipo TDF.

Antecedentes de la invención

La diferenciación celular es la característica central de la morfogénesis de tejidos que se inicia durante la embriogénesis, y continúa en varios grados durante la vida de un organismo en los mecanismos de reparación y regeneración de tejidos adultos. El grado de morfogénesis en el tejido adulto varía entre los diferentes tejidos y está relacionado, entre otras cosas, con el grado de renovación de las células en un tejido dado.

Los eventos celulares y moleculares que regulan el estímulo para la diferenciación de las células representan un área de investigación exhaustiva. En los campos médico y veterinario, se prevé que el descubrimiento del factor o los factores que controlan la diferenciación celular y morfogénesis de tejidos mejorará significativamente la capacidad para reparar y regenerar tejidos y órganos de mamíferos enfermos o dañados. Las áreas particularmente útiles para la terapéutica humana y veterinaria incluyen la cirugía reconstructiva, el tratamiento de enfermedades degenerativas de los tejidos, incluyendo, por ejemplo, artritis, enfisema, osteoporosis, cardiomiopatía, cirrosis, enfermedades degenerativas nerviosas, enfermedades inflamatorias, y cáncer, y la regeneración de tejidos, órganos y miembros. Los términos "morfogenético" y "morfogénico" a menudo se utilizan indistintamente.

Se han aislado diversos factores diferentes en los últimos años que parecen desempeñar un papel en la diferenciación celular. Recientemente, una subfamilia distinta de la "superfamilia" de polipéptidos relacionados estructuralmente referidos en la técnica como "superfamilia de polipéptidos del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta)" se han identificado como verdaderos morfógenos tisulares.

Los miembros de esta distinta "subfamilia" de los verdaderos polipéptidos morfogénicos tisulares comparten homología sustancial de la secuencia de aminoácidos dentro de sus dominios C-terminales morfogénicamente activos, incluyendo un esqueleto de seis o siete cisteínas conservado, y comparten la actividad de inducción de morfogénesis específica de tejido *in vivo* en una variedad de órganos y tejidos. Los polipéptidos aparentemente contactan e interactúan con las células progenitoras p. ej., mediante la unión de moléculas adecuadas de la superficie celular, que predisponen o estimulan de otro modo la proliferación y diferenciación de las células en un entorno morfogenéticamente permisivo. Estudios recientes sobre la unión al receptor de la superficie celular de diversos miembros de la superfamilia de polipéptidos TGF-beta sugieren que los péptidos median su actividad mediante la interacción con dos receptores diferentes, denominados receptores de tipo I y tipo II. Los receptores de Tipo I o Tipo II son ambos serina/treonina quinasas, y comparten estructuras similares: un dominio intracelular que consiste esencialmente en la quinasa, una secuencia hidrófoba, corta, prolongada suficiente para abarcar la membrana una vez, y un dominio extracelular caracterizado por una alta concentración de cisteínas conservadas.

Estos polipéptidos morfogénicos son capaces de inducir la cascada de desarrollo de eventos celulares y moleculares que culminan en la formación de nuevo tejido específico del órgano, incluyendo cualquier vascularización, formación de tejido conectivo, y la inervación del nervio como requiere el tejido de origen natural. De ha demostrado que los polipéptidos inducen la morfogénesis tanto de cartílago óseo como de hueso, así como de tejidos periodontales, dentina, hígado y tejido neural, incluyendo tejido de la retina.

Estos polipéptidos morfogénicos tisulares verdaderos son reconocidos en la técnica como una subfamilia distinta de polipéptidos diferentes de otros miembros de la superfamilia de TGF-beta puesto que comparten un alto grado de identidad de secuencia en el dominio C-terminal y puesto que los polipéptidos morfogénicos tisulares verdaderos son capaces de inducir, por su cuenta, la cascada completa de eventos que dan como resultado la formación de tejido funcional en lugar de simplemente inducir la formación de tejido fibrótico (cicatriz). Específicamente, los miembros de la familia de los polipéptidos morfogénicos son capaces de todo lo siguiente en un entorno morfogenéticamente permisivo: estimulación de la proliferación celular y de la diferenciación celular, y apoyo del crecimiento y el mantenimiento de las células diferenciadas. Los polipéptidos morfogénicos aparentemente también pueden actuar como factores endocrinos, paracrinos o autocrinos.

Como resultado de sus actividades biológicas, se ha dirigido un esfuerzo significativo hacia el desarrollo de terapias basadas en morfógeno para el tratamiento de tejidos de mamíferos, lesionados o enfermos, incluyendo, por ejemplo, composiciones terapéuticas para inducir la curación regenerativa de defectos óseos, tales como fracturas, así como

composiciones terapéuticas para preservar o restaurar propiedades metabólicas saludables en los tejidos enfermos, p. ej., tejido óseo osteopénico.

Compendio de la invención

5 En la presente memoria se describen composiciones que tienen propiedades similares a los polipéptidos de la superfamilia de TGF-beta, y métodos para el tratamiento profiláctico y terapéutico de un sujeto que tiene estados de enfermedad caracterizados por niveles aberrantes de polipéptidos de tipo TGF-beta. Más concretamente, las composiciones y los métodos tienen propiedades de tipo proteína morfogenética ósea, y son útiles en el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con la misma.

10 En un aspecto, la invención incluye un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEC ID NO: 45. En una realización, el péptido modula la transducción de señales a través de una membrana de la célula que expresa un receptor del factor de diferenciación tisular (Un TDFR), tal como, pero no limitado a un receptor de la superfamilia de TGF-beta.

15 En otro aspecto, la invención incluye una composición farmacéutica que tiene un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEC ID NO: 45 y un portador farmacéuticamente aceptable.

20 También se describen en la presente memoria compuestos de TDFRP que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 1-208, que incluyen además polinucleótidos que codifican los polipéptidos de los SEQ ID NO: 1-208. También se incluyen las variantes, análogos, homólogos, o fragmentos de las secuencias de polipéptidos y polinucleótidos, y moléculas pequeñas que incorporan estos. Los compuestos de TDFRP pueden modular la transducción de la señal a través de una membrana de una célula que expresa un receptor del factor de diferenciación tisular (un TDFR), tal como, pero no limitado a un receptor de la superfamilia de TGF-beta. También se describe en la presente memoria una molécula de ácido nucleico aislada que codifica los compuestos de TDFRP. Preferiblemente, el ácido nucleico aislado es un vector, y el vector puede incluir opcionalmente una secuencia promotora que puede estar conectada operablemente al ácido nucleico, donde el promotor causa la expresión de la molécula de ácido nucleico. El promotor puede ser inducible. El vector puede ser transformado en una célula, tal como una célula procariótica o eucariótica, preferiblemente una célula de mamífero, o más preferiblemente una célula humana. El vector puede ser un vector viral capaz de infectar una célula de mamífero y producir la expresión de un polipéptido de los SEQ ID NO: 1-208 en un animal infectado por el virus.

30 También se describe en la presente memoria una composición farmacéutica que tiene un compuesto de TDFRP y un portador farmacéuticamente aceptable.

35 También se describe en la presente memoria un anticuerpo contra un compuesto de TDFRP o un fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente a un compuesto de TDFRP. El anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como, pero no limitado a un fragmento Fab, (Fab)₂, Fv o Fc. El anticuerpo o fragmento del mismo puede ser un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo o fragmento del mismo puede ser un anticuerpo humanizado. También se describe en la presente memoria un anticuerpo o fragmento de anticuerpo inmunoespecífico para los SEQ ID NO: 1-208 o al menos 6 residuos de aminoácidos contiguos de los SEQ ID NO: 1-208, y un portador farmacéuticamente aceptable. También se describe en la presente memoria una composición farmacéutica que tiene un polipéptido o la secuencia de ácido nucleico de los SEQ ID NO: 1-208, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

40 También se describe en la presente memoria un método para preparar un compuesto de TDFRP, teniendo el método las etapas de cultivar una célula que contiene un ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 1-208 bajo condiciones que proporcionan la expresión del compuesto de TDFRP; y recuperar el compuesto de TDFRP expresado.

45 También se describe en la presente memoria un método para determinar la presencia o la cantidad del compuesto de TDFRP en una muestra, teniendo el método las etapas de proporcionar la muestra, poner en contacto la muestra con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para los SEQ ID NO: 1-208 que se une inmunoespecíficamente al compuesto de TDFRP, y determinar la presencia o cantidad del anticuerpo unido al compuesto de TDFRP, determinando así la presencia o la cantidad del compuesto de TDFRP en la muestra.

50 También se describe en la presente memoria un método para determinar la presencia o cantidad de la molécula de ácido nucleico que codifica los SEQ ID NO: 1-208 en una muestra, teniendo el método las etapas de proporcionar la muestra, poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico que hibrida con la molécula de ácido nucleico, y determinar la presencia o cantidad de la sonda hibridada con la molécula de ácido nucleico, determinando así la presencia o cantidad de la molécula de ácido nucleico en la muestra.

También se describe en la presente memoria un método para identificar un compuesto candidato que se une a los SEQ ID NO: 1-208, teniendo el método las etapas de poner en contacto el compuesto con el compuesto de TDFRP, y determinar si el compuesto candidato se une al compuesto de TDFRP.

5 También se describe en la presente memoria un método de tratamiento o prevención de un trastorno asociado al factor de diferenciación tisular, comprendiendo el método administrar a un sujeto, en donde se desea tal tratamiento o prevención, un compuesto de TDFRP en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el trastorno asociado al factor de diferenciación tisular en el sujeto. El trastorno asociado al factor de diferenciación tisular se puede seleccionar del grupo que consiste en una enfermedad degenerativa de los tejidos y la regeneración de tejidos. La enfermedad degenerativa del tejido puede ser la enfermedad renal, lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular, aterosclerosis, artritis, enfisema, osteoporosis, cardiomiopatía, cirrosis, enfermedad nerviosa degenerativa, enfermedad de Holt-Oram, enfermedad ocular, nefropatía diabética, enfermedad ósea degenerativa, enfermedad renal, enfermedad periodontal, nefropatía diabética, diabetes, aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, enfermedad inflamatoria, enfermedad inmunitaria, enfermedad esquelética, enfermedad reproductiva, enfermedad hematopoyética, o cáncer. La regeneración de los tejidos puede incluir la regeneración de músculo, tejido dendrítico, nervio, riñón, cerebro, hueso, piel, pulmón, muscular, ovario, testículo, corazón, bazo, cartílago, nervio, periodontal, dentina, hígado, tejido linfático vascular, conectivo, hematopoyético, o renal. También se describe un método de tratamiento o prevención de un trastorno asociado al factor de diferenciación tisular, mediante la administración a un sujeto en donde se desea tal tratamiento o prevención del ácido nucleico descrito en la presente memoria en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el trastorno asociado al factor de diferenciación tisular en el sujeto. El sujeto puede ser un sujeto humano. El sujeto puede ser un sujeto animal.

En un aspecto, la invención incluye un kit que tiene en uno o más recipientes, una composición farmacéutica como se describió anteriormente e instrucciones para utilizar los contenidos del mismo.

25 En otro aspecto más, la invención incluye un método para determinar la presencia de o la predisposición a una enfermedad asociada con niveles alterados de receptor de factor de diferenciación tisular en un primer sujeto mamífero, teniendo el método las etapas de proporcionar una muestra de ensayo del primer sujeto mamífero; poner en contacto la muestra de ensayo del primer sujeto mamífero con un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en el SEC ID NO 45, detectar el nivel de complejo de compuesto/receptor del factor de diferenciación tisular, cuantificar el nivel de expresión del receptor del factor de diferenciación tisular en la muestra del primer sujeto mamífero; y comparar la cantidad de receptor del factor de diferenciación tisular en la muestra de la etapa (a) con respecto a la cantidad del receptor del factor de diferenciación tisular en una muestra control de un sujeto de segundo mamífero que se sabe que no tiene, o no estar predispuesto a, la enfermedad, en donde una alteración en el nivel de expresión del receptor de factor de diferenciación tisular en el primer sujeto en comparación con la muestra control indica la presencia de, o la predisposición a la enfermedad.

También se describe en la presente memoria un método de tratamiento de un estado patológico en un mamífero, comprendiendo el método administrar al mamífero un compuesto en una cantidad que es suficiente para aliviar el estado patológico, en donde el compuesto es un compuesto que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos que incluye los SEQ ID NO: 1-208.

45 También se describe en la presente memoria un método de tratamiento de un estado patológico en un mamífero, comprendiendo el método administrar al mamífero un anticuerpo o fragmento del mismo inmunoespecífico para los SEQ ID NO: 1-208 o por al menos 6 aminoácidos contiguos de los mismos, en una cantidad suficiente para aliviar el estado patológico. También se describe en la presente memoria un método de tratamiento de un trastorno asociado al factor de diferenciación tisular en un mamífero, incluyendo el método administrar al mamífero al menos un compuesto que modula la expresión o actividad de un compuesto de TDFRP. El trastorno asociado al factor de diferenciación tisular se selecciona del grupo que consiste en enfermedad renal, lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular, aterosclerosis, artritis, enfisema, osteoporosis, cardiomiopatía, cirrosis, enfermedad nerviosa degenerativa, enfermedad de Holt-Oram, enfermedad ocular, la nefropatía diabética, enfermedad ósea degenerativa, enfermedad renal, enfermedad periodontal, nefropatía diabética, diabetes, aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, enfermedad inflamatoria, enfermedad inmunitaria, enfermedad ósea, enfermedad reproductiva, enfermedad hematopoyética, o cáncer. En otra realización más, la invención incluye un compuesto para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado al factor de diferenciación tisular, en donde el compuesto es el SEC ID NO: 45. En aún otra realización, la invención incluye el uso de un compuesto para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno asociado al factor de diferenciación tisular, en donde el compuesto es el SEQ ID NO: 45.

60 También se describe en la presente memoria un método para identificar un compuesto candidato, que se une a un compuesto de TDFRP, teniendo el método las etapas de, proporcionar un compuesto candidato, poner en contacto el compuesto candidato con el compuesto de TDFRP bajo condiciones en las que se forma un complejo entre el compuesto de ensayo y el compuesto de TDFRP, incubar el complejo bajo condiciones en las que se forman co-cristales del complejo, determinar las coordenadas atómicas estructurales del complejo por difracción de rayos X, y modelar la estructura del complejo para determinar la unión del compuesto candidato a un compuesto de TDFRP,

una preparación cristalina de un compuesto candidato y un compuesto de TDFRP. El complejo no se cristaliza, sino que el complejo se somete a espectroscopia magnética nuclear o espectroscopía de masas para determinar la unión del complejo.

- 5 También se describe en la presente memoria un mamífero no humano transgénico, por ejemplo, pero no limitado a un ratón, que tiene células de mamífero no humano genómicamente integradas, un ácido nucleico que codifica los SEQ ID NO: 1-208, que tiene un primer segmento de secuencia que es una región reguladora y un segundo segmento de secuencia que es una secuencia de polinucleótido que codifica un compuesto de TDFRP, en donde el primer segmento de secuencia primero está conectado operablemente al segundo segmento de secuencia. En una realización, el primer segmento es un elemento de expresión regulable o elementos que están sujetos a regulación específica de una célula o tejidos. Los tejidos o células pueden derivar de o cultivarse a partir del mamífero transgénico no humano.

Descripción Detallada de la Invención

Definiciones

Tal como se utiliza en la presente memoria "superfamilia de polipéptidos del Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF-beta)", hace referencia a una superfamilia de factores polipeptídicos con funciones pleiotrópicas que está compuesta de muchas citocinas multifuncionales, que incluyen, pero no están limitados a, TGF- β , activinas, inhibinas, hormona anti-Mülleriana (AMH), sustancia inhibidora Mülleriana (MIS), polipéptidos morfogenéticos óseos (BMP), y miostatina. Los isoformas de TGF- β muy similares TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 inhiben potentemente la proliferación celular de muchos tipos de células, incluidas las de origen epitelial. La mayor parte de las células mesenquimales, sin embargo, son estimuladas en su crecimiento por TGF- β . Además, los TGF- β inducen fuertemente la síntesis de matriz extracelular y la expresión de la integrina, y modulan las respuestas inmunitarias. Los BMP, también conocidas como proteínas osteogénicas (OP), son potentes inductores de la formación de hueso y cartilago y desempeñan un importante papel en el desarrollo en la inducción del mesodermo ventral, diferenciación del tejido neural, y organogénesis. Las activinas, denominadas después de su identificación inicial como activadores de la secreción de hormona estimulante del folículo (FSH) de las glándulas pituitarias, también son conocidas por promover la eritropoyesis, mediar la inducción del mesodermo dorsal, y contribuir a la supervivencia de las células nerviosas. Varios factores de crecimiento que pertenecen a la superfamilia de TGF- β juegan papeles importantes en el desarrollo embrionario y la homeostasis tisular. Su funcionamiento inapropiado ha sido implicado en varias situaciones patológicas como la fibrosis, artritis reumatoide, y la carcinogénesis. El término, el factor de diferenciación tisular (TDF), tal como se utiliza en la presente memoria, incluye, pero no está limitado a, todos los miembros de la superfamilia de polipéptidos de TGF-beta. Los polipéptidos de la superfamilia de TGF-beta pueden ser antagonistas o agonistas de los receptores de la superfamilia de TGF-beta.

Tal como se utiliza en la presente memoria "receptores de la superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF-beta)", hace referencia a receptores de polipéptidos que median los efectos pleiotrópicos de los polipéptidos de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), así como fragmentos, análogos y homólogos de los mismos. Tales receptores pueden incluir, pero no están limitados a, combinaciones distintas de receptores de serina/treonina quinasa de tipo I y tipo II. El término, receptor del factor diferenciación tisular (TDF), tal como se utiliza en la presente memoria, incluye, pero no está limitado a, todos los miembros de la superfamilia de receptores de TGF-beta.

"Aminoácido aromático", tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un aminoácido hidrófobo que tiene una cadena lateral que contiene al menos un anillo que tiene un sistema de electrones conjugado (grupo aromático). El grupo aromático puede estar sustituido adicionalmente con grupos sustituyentes tales como grupos alquilo, alqueno, alquino, hidroxilo, sulfanilo, nitro y amino, así como otros. Los ejemplos de los aminoácidos aromáticos codificados genéticamente incluyen fenilalanina, tirosina y triptófano. Los aminoácidos aromáticos no codificados genéticamente comúnmente encontrados incluyen fenilglicina, 2-naftilalanina, beta-2-tienilalanina, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, 4-clorofenilalanina, 2-fluorofenilalanina, 3-fluorofenilalanina y 4-fluorofenilalanina.

"Aminoácido alifático", tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un aminoácido apolar que tiene una cadena lineal saturada o insaturada, una cadena lateral hidrocarbonada ramificada o cíclica. Los ejemplos de aminoácidos alifáticos codificados genéticamente incluyen alanina, leucina, valina e isoleucina. Los ejemplos de los aminoácidos alifáticos no codificados incluyen norleucina (Nle).

"Aminoácido ácido", tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un aminoácido hidrófilo que tiene un valor de pK de cadena lateral de menos de 7. Los aminoácidos ácidos tienen típicamente cadenas laterales cargadas negativamente a pH fisiológico debido a la pérdida de un ión hidrógeno. Los ejemplos de los aminoácidos ácidos codificados genéticamente incluyen ácido aspártico (aspartato) y ácido glutámico (glutamato).

5 "Aminoácido alcalino", tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un aminoácido hidrófilo que tiene un valor de pK de la cadena lateral de más de 7. Los aminoácidos alcalinos típicamente tienen cadenas laterales cargadas positivamente a pH fisiológico debido a la asociación con el ión hidronio. Los ejemplos de los aminoácidos alcalinos codificados genéticamente incluyen arginina, lisina e histidina. Los ejemplos de los aminoácidos alcalinos no codificados genéticamente incluyen los aminoácidos no cíclicos, ornitina, ácido 2,3-diaminopropiónico, ácido 2,4-diaminobutírico y homoarginina.

10 "Aminoácido polar", tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un aminoácido hidrófilo que tiene una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico, pero que tiene un enlace en el que el par de electrones compartido en común por dos átomos se mantiene más cercano por uno de los átomos. Los ejemplos de los aminoácidos polares genéticamente codificados incluyen asparragina y glutamina. Los ejemplos de aminoácidos polares no codificados genéticamente incluyen citrulina, N-acetil lisina y metionina sulfóxido.

15 Como apreciarán los expertos en la técnica, la clasificación anterior no es absoluta - varios aminoácidos muestran más de una propiedad característica, y por lo tanto pueden ser incluidos en más de una categoría. Por ejemplo, la tirosina tiene tanto un anillo aromático como un grupo hidroxilo polar. Por lo tanto, la tirosina tiene propiedades duales y se puede incluir en las categorías de aromáticos y polares.

20 Un "sujeto", tal como se utiliza en la presente memoria, es preferiblemente un mamífero, tal como un ser humano, pero también puede ser un animal, p. ej., animales domésticos (p. ej., perros, gatos y similares), animales de granja (p. ej., vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares) y animales de laboratorio (p. ej., ratas, ratones, cobayas y similares).

25 Una "cantidad eficaz" de un compuesto, tal como se utiliza en la presente memoria, es una cantidad suficiente para conseguir un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, por ejemplo, una cantidad que da como resultado la prevención de o la disminución en los síntomas asociados con una enfermedad que está siendo tratada, p. ej., las enfermedades asociadas con los polipéptidos de la superfamilia de TGF-beta mencionadas anteriormente. La cantidad de compuesto administrado al sujeto dependerá del tipo y la gravedad de la enfermedad y de las características del individuo, tales como la salud general, la edad, el sexo, el peso corporal, y la tolerancia a los fármacos. También dependerá del grado, la gravedad y el tipo de enfermedad. El experto en la técnica será capaz de determinar las dosis apropiadas dependiendo de estos y otros factores. Típicamente, una cantidad eficaz de los compuestos de la presente invención, suficiente para conseguir un efecto terapéutico o profiláctico, oscila de aproximadamente 0,0001 mg por kilogramo de peso corporal por día a aproximadamente 10.000 mg por kilogramo de peso corporal por día. Preferiblemente, los intervalos de dosificación son de aproximadamente 1 mg por kilogramo de peso corporal por día a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal por día. Los compuestos de la presente invención también pueden ser administrados combinados unos con otros, o con uno o más compuestos terapéuticos adicionales.

40 Un polipéptido "aislado" o "purificado" o un polipéptido o porción biológicamente activa del mismo está sustancialmente libre de material celular o de otros polipéptidos contaminantes de la célula o tejido originales de los cuales deriva el polipéptido relacionado con el factor diferenciación tisular, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos cuando se sintetiza químicamente.

45 "Sustancialmente libre de material celular", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye preparaciones de polipéptido relacionado con el factor de diferenciación tisular en las cuales el polipéptido se separa de los componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce recombinantemente. En una realización, la expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de polipéptidos relacionados con el factor de diferenciación tisular que tienen menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de polipéptidos no relacionados con el factor de diferenciación tisular (también denominados en la presente memoria "polipéptidos contaminantes"), más preferiblemente menos de aproximadamente 20% de polipéptidos no relacionados con el factor de diferenciación tisular, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 10% de polipéptidos no relacionados con el factor de diferenciación tisular, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 5% de polipéptidos no relacionados con el factor de diferenciación tisular. Cuando el polipéptido relacionado con el factor de diferenciación tisular o una porción biológicamente activa del mismo son producidos por recombinación, también está preferiblemente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, más preferiblemente menos de aproximadamente 10%, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 5% del volumen de la preparación de polipéptidos relacionados con el factor diferenciación tisular.

60 La expresión "sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye preparaciones de polipéptidos relacionados con el factor de diferenciación tisular en los que el polipéptido está separado de los precursores químicos u otros agentes químicos que están implicados en la síntesis del polipéptido. En una realización, la expresión "sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos" incluye preparaciones de polipéptidos relacionados con el factor de diferenciación tisular que tienen menos de aproximadamente 30% (en peso seco) de precursores químicos o agentes químicos no

relacionados con el factor de diferenciación tisular, más preferiblemente menos de aproximadamente 20% de precursores químicos o agentes químicos no relacionados con el factor de diferenciación tisular, aún más preferiblemente menos de aproximadamente 10% de precursores químicos o agentes químicos no relacionados con el factor de diferenciación tisular, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 5% de precursores químicos o agentes químicos no relacionados con el factor de diferenciación tisular.

El término "variante", tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un compuesto que difiere del compuesto de la presente invención, pero conserva las propiedades esenciales del mismo. Un ejemplo no limitante de esto es un compuesto polinucleotídico o polipeptídico que tiene sustituciones conservativas con respecto al compuesto de referencia, comúnmente conocidas como variantes degeneradas. Otro ejemplo no limitante de una variante es un compuesto que es estructuralmente diferente, pero que conserva el mismo dominio activo de los compuestos de la presente invención. Las variantes incluyen prolongaciones N-terminales o C-terminales, aminoácidos protegidos terminalmente, modificaciones de los grupos funcionales de cadenas laterales de aminoácidos reactivos, p. ej., ramificación de los residuos de lisina, pegilación, y/o truncamientos de un compuesto polipeptídico. Generalmente, las variantes son en su conjunto muy similares y, en muchas regiones, idénticas a los compuestos de la presente invención. En consecuencia, las variantes pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, las regiones no codificantes, o en ambas.

Una "molécula pequeña", tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a una composición que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 5 kDa y más preferiblemente menos de aproximadamente 2 kDa. Las moléculas pequeñas pueden ser, p. ej., ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, glicopéptidos, peptidomiméticos, carbohidratos, lípidos, lipopolisacáridos, combinaciones de éstos, y otras moléculas orgánicas o inorgánicas.

Descripción Detallada

I. Composiciones de la invención

A. Polipéptidos TDFRP

En la presente memoria se describen compuestos que son análogos funcionales de los factores de diferenciación tisular, es decir, compuestos que imitan funcionalmente las proteínas de la superfamilia de TGF-beta, por ejemplo, actuando como agonistas de receptores de la superfamilia de TGF-beta. Tales compuestos son adecuados para la administración a un sujeto en el que es deseable, por ejemplo, para promover el crecimiento o la diferenciación de células y tejidos en el sujeto, tales como células renales, células mesenquimales, síntesis de matriz extracelular, expresión de integrina, formación de hueso y cartílago, inducción del mesodermo ventral, diferenciación del tejido neural, para promover la organogénesis, para promover la eritropoyesis, para inducir el crecimiento de mesodermo dorsal y células nerviosas, para promover la homeostasis de tejidos y para inducir respuestas inmunitarias. En contraste, se cree que los estados patológicos tales como la fibrosis, la artritis reumatoide, y la carcinogénesis entre otros, son el resultado de una actividad de tipo factor de diferenciación tisular excesiva. Por consiguiente, también se describen en la presente memoria compuestos que son antagonistas funcionales de los receptores de la superfamilia de TGF-beta. También se describe en la presente memoria compuestos que son antagonistas parciales y agonistas parciales de los receptores de la superfamilia de TGF-beta. Los compuestos se pueden utilizar para tratar tanto la enfermedad renal aguda como crónica, así como el accidente cerebrovascular y la lesión cerebral traumática.

También se describe en la presente memoria métodos basados en la estructura útiles en la identificación, diseño y producción de compuestos que actúan como moduladores funcionales de receptores de la superfamilia de TGF-beta.

Los presentes compuestos incluyen moléculas pequeñas, más particularmente polipéptidos, con la estructura general identificada en la presente memoria como SEQ ID NO: 1-208, es decir, péptidos relacionados con TDF (en adelante "TDFRP"), como se detalla a continuación. También se contemplan variantes, análogos, homólogos, o fragmentos de estos compuestos, tales como homólogos de especie, así como formas degeneradas de los mismos. Los polipéptidos TDFRP pueden estar protegidos terminalmente en el extremo N, p. ej., SEQ ID NO: 17, o el extremo C, p. ej., SEQ ID NO: 18, o tanto en el extremo N como el extremo C, p. ej., SEQ ID NO: 19. Los polipéptidos TDFRP pueden estar pegilados, o modificados, p. ej., ramificación, en cualquier residuo de aminoácido que contenga una cadena lateral reactiva, p. ej., un residuo de lisina. Los polipéptidos TDFRP puede ser lineales o cíclicos. La secuencia de la cola de TDFRP puede tener una longitud variable.

Los compuestos de TDFRP puede contener aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, D-aminoácidos y L-aminoácidos, y cualquier combinación de los mismos. Los compuestos pueden incluir los aminoácidos encontrados comúnmente que no están codificados genéticamente. Estos aminoácidos no codificados genéticamente incluyen, pero están limitados a, β -alanina (β -Ala) y otros omega-aminoácidos tales como ácido 3-aminopropiónico (Dap),

ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr), ácido 4-aminobutírico, etc.; ácido α -aminoisobutírico (Aib); ácido ϵ -aminohexanoico (Aha); ácido δ -aminovalérico (Ava), N-metilglicina o sarcosina (MeGly); ornitina (Orn); citrulina (Cit); t-butilalanina (t-Bua); t-butilglicina (t-bug); N-metilisoleucina (Melle); fenilglicina (PHG); ciclohexilalanina (Cha); norleucina (Nle); 2-naftilalanina (2-Nal); 4-clorofenilalanina (Phe(4-Cl)); 2-fluorofenilalanina (Phe(2-F)); 3-fluorofenilalanina (Phe (3-F)); 4-fluorofenilalanina (Phe (4-F)); penicilamina (Pen); ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico (Tic); β -2-tienilalanina (Thi); metionina sulfóxido (MSO); homoarginina (hArg), N-acetil lisina (AcLys); ácido 2,3-diaminobutírico (Dab); ácido 2,3-diaminobutírico (Dbu); p-aminofenilalanina (Phe(pNH₂)), N-metil valina (MeVal); homocisteína (HCys) y homoserina (hSer). Las variantes que de origen no natural de los compuestos se pueden producir por técnicas de mutagénesis o mediante síntesis directa. Los compuestos de TDFRP pueden ser profármacos, es decir, La actividad biológica del compuesto de TDFRP es alterada, p. ej., incrementada, al ponerse en contacto un sistema biológico *in vivo* o *in vitro*.

El TDFRP puede ser un polipéptido con la estructura general mostrada en el SEQ ID NO: 1.

X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀ (SEQ ID NO: 1), en donde X₁- X₂₀ varían independientemente ente sí, y en donde X puede ser cualquier aminoácido de origen natural o de origen no natural y en donde pueden estar ausentes hasta 17 aminoácidos. Los aminoácidos que están ausentes pueden ser contiguos o no contiguos. Alternativamente, el TDFRP es un polipéptido con la estructura general mostrada en el SEQ ID NO: 1, en donde X₁-X₂₀ varían independientemente entre sí, y en donde X puede ser cualquier aminoácido de origen natural o de origen no natural, y en donde el polipéptido incluye al menos dos residuos de Cys, y en donde pueden estar ausentes hasta 17 aminoácidos. Los aminoácidos que están ausentes pueden ser contiguos o no contiguos.

El TDFRP puede ser un polipéptido con la estructura general mostrada en el SEQ ID NO: 2.

CX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄ (SEQ ID NO: 2), en donde X₁-X₁₄ varían independientemente entre sí, y en donde X₁ es Tyr, Ile, cualquier aminoácido aromático, cualquier aminoácido alifático o cualquier aminoácido polar; en donde X₂ es Phe, Val, cualquier aminoácido aromático, o cualquier aminoácido alifático; en donde X₃ es Asp o cualquier aminoácido ácido; en donde X₄ es Asp, Glu o cualquier aminoácido ácido; en donde X₆ es Ser, Asn o cualquier aminoácido polar; en donde X₆ es Ser o cualquier aminoácido polar; en donde X₇ es Asn, Gln o cualquier aminoácido polar; en donde X₈ es Val o cualquier aminoácido alifático; en donde X₉ es Ile, Val, Leu o cualquier aminoácido alifático; en donde X₁₀ es Lys o cualquier aminoácido alcalino; en donde X₁₁ es Lys o cualquier aminoácido alcalino; en donde X₁₂ es Tyr o cualquier aminoácido polar; en donde X₁₃ es Arg o cualquier aminoácido alcalino, y en donde X₁₄ es Ser o cualquier aminoácido polar.

Las secuencias TDFRP representativas basadas en, por ejemplo pero no limitadas a, las permutaciones del SEQ ID NO: 2 se identifican en la presente memoria como SEQ ID NO: 3-208, y se describen a continuación en las Tablas 1-4.

Los presentes compuestos incluyen moléculas pequeñas, más particularmente péptidos, identificados en la presente memoria como SEQ ID NO: 3-38, que se resumen en la Tabla 1. También se contemplan las Variantes, análogos, homólogos, o fragmentos de estos compuestos, tales como homólogos de especie, así como las formas degeneradas de los mismos.

Los compuestos pueden contener sustituciones de aminoácidos sencillas, dobles, triples o múltiples en cualquier aminoácido dentro de las secuencias descritas como SEQ ID NO: 3-38. Las sustituciones pueden contener aminoácidos naturales, aminoácidos no naturales, d-aminoácidos y l-aminoácidos, y cualquier combinación de los mismos. Los compuestos pueden ser fragmentos de los SEC ID NO: 3-38, por ejemplo de aproximadamente al menos 3 aminoácidos de longitud.

Tabla 1

Secuencia	SEQ ID NO:
CKKHELYVSRDLGWQDWIIAPEGYAAYCEQ	3
CELYVSRDLGWQDWIIAPEGYAAYC	4
CFRDLGWQDWIIAPC	5
ECRDLGWQDWC	6
CRDLGWQDWIIAPC	7
CLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVRC	8
CFDDSSNVCLKKYRS	9
CFDDSSNVICKKYRS	10

Secuencia	SEQ ID NO:
CYFDDSSNVCLKKYRS	11
CAFPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKC	12
CLNSYMNATNHAC	13
CFINPETVPKC	14
CLFDDSSNVICKKYRS	15
CIVNSSDDFLCKKYRS	16
AcNH-CYFDDSSNVIC-OH	17
NH2-NH2 CYFDDSSNVIC	18
AcNH-CYFDDSSNVIC-NH2	19
CYFDDSSNVICKK	20
CYFDDSSNVICK	21
CFINPETVC	22
CYFDDSSNVICKKYKS	23
CYFDDSSNVICKRYRS	24
CYFDDSSNVICRKYRS	25
CYLDENEKVVCKNYQS	26
CYLDEYDKVVCKNYQS	27
ISVCYFDDSSNVICKKYRS	28
CYFDDSSNVIC	29
CYLDDSSNVICKKYRS	30
CYLDDSSNVLCKKYRS	31
CYFEDSSNVICKKYRS	32
NH2-NH2 CYFDDSSNVLCKKYRS	33
NH2-NH2 CYLDEDSSKVLCKNYRS	34
NH2-NH2 CYFDESSKVLCKKYRS	35
NH2-NH2 CYFDDSSNVLCKKYRSGSGGGC	36
NH2-NH2 CGGGSGSCYFDDSSNVLCKKYRS	37
CYFDDSSNVICKKYRS	38

5 Los compuestos representativos de la misma longitud que el SEC ID NO: 38 con sustituciones de aminoácidos sencillas, dobles, o triples incluyen, pero no están limitadas a, las siguientes secuencias de aminoácidos resumidas en la Tabla 2. Los SEQ ID NO: 1-37 no se ilustran exhaustivamente, pero puede ser modificadas igualmente como se describe.

Tabla 2

Secuencia	SEQ ID NO:	Secuencia	SEQ ID NO:
CIFDDSSNVICKKYRS	39	CIVDENSNVICKKYRS	96
CYVDDSSNVICKKYRS	40	CIVDESSQVICKKYRS	97
CYFDESSNVICKKYRS	41	CIVDESSNVVCKKYRS	98
CYFDDNSNVICKKYRS	42	CIVDESSNVLCKKYRS	99
CYFDDSSQVICKKYRS	43	CIVDDNSQVICKKYRS	100

ES 2 397 327 T3

Secuencia	SEQ ID NO:	Secuencia	SEQ ID NO:
CYFDDSSNVVCKKYRS	44	CIVDDNSNVVCKKYRS	101
CYFDDSSNVLCKKYRS	45	CIVDDNSNVLCKKYRS	102
CIVDDSSNVICKKYRS	46	CIVDDSSQVVCKKYRS	103
CIFDESSNVICKKYRS	47	CIVDDSSQVLCKKYRS	104
CIFDDNSNVICKKYRS	48	CIFDENSQVICKKYRS	105
CIFDDSSQVICKKYRS	49	CIFDENSNVVCKKYRS	106
CIFDDSSNVVCKKYRS	50	CIFDENSNVLCKKYRS	107
CIFDDSSNVLCKKYRS	51	CIFDESSQVVCKKYRS	108
CYVDESSNVICKKYRS	52	CIFDESSQVLCKKYRS	109
CYVDDNSNVICKKYRS	53	CIFDDNSQVVCKKYRS	110
CYVDDSSQVICKKYRS	54	CIFDDNSQVLCKKYRS	111
CYVDDSSNVVCKKYRS	55	CYVDENSQVICKKYRS	112
CYVDDSSNVLCKKYRS	56	CYVDENSNVVCKKYRS	113
CYVDENSNVICKKYRS	57	CYVDENSNVLCKKYRS	114
CYFDESSQVICKKYRS	58	CYVDESSQVVCKKYRS	115
CYFDESSNVVCKKYRS	59	CYVDESSQVLCKKYRS	116
CYFDESSNVLCKKYRS	60	CYVDDNSQVVCKKYRS	117
CYFDDNSQVICKKYRS	61	CYVDDNSQVLCKKYRS	118
CYFDDNSNVVCKKYRS	62	CYFDENSQVVCKKYRS	119
CYFDDNSNVLCKKYRS	63	CYFDENSQVLCKKYRS	120
CYFDDSSQVVCKKYRS	64	CIVDENSQVICKKYRS	121
CYFDDSSQVLCKKYRS	65	CIVDENSNVVCKKYRS	122
CIVDESSNVICKKYRS	66	CIVDENSNVLCKKYRS	123
CIVDDNSNVICKKYRS	67	CIFDENSQVVCKKYRS	124
CIVDDSSQVICKKYRS	68	CIFDENSQVLCKKYRS	125
CIVDDSSNVVCKKYRS	69	CYVDENSQVVCKKYRS	126
CIVDDSSNVLCKKYRS	70	CYVDENSQVLCKKYRS	127
CIFDENSNVICKKYRS	71	CIVDENSQVVCKKYRS	128
CIFDESSQVICKKYRS	72	CIVDENSQVLCKKYRS	129
CIFDESSNVVCKKYRS	73	CYFDDSSKVIKCKYRS	130
CIFDESSNVLCKKYRS	74	CYLDDSSNVICKKYRS	131
CIFDDNSQVICKKYRS	75	CYFDDSSKVVCKKYRS	132
CIFDDNSNVVCKKYRS	76	CYLDDSSNVVCKKYRS	133
CIFDDNSNVLCKKYRS	77	CYFDDSSKVLCKKYRS	134
CIFDDSSQWCKKYRS	78	CYLDDSSNVLCKKYRS	135
CIFDDSSQVLCKKYRS	79	CYFDDNSKVIKCKYRS	136
CYVDENSNVICKKYRS	80	CYFDESSKVIKCKYRS	137
CYVDESSQVICKKYRS	81	CYLDDSSKVIKCKYRS	138
CYVDESSNVVCKKYRS	82	CYLDDNSNVICKKYRS	139

Secuencia	SEQ ID NO:	Secuencia	SEQ ID NO:
CYVDESSNVLCKKYRS	83	CYLDESSNVICKKYRS	140
CYVDDNSQVICKKYRS	84	CYLDDSSQVICKKYRS	141
CYVDDNSNVVCKKYRS	85	CYFDDNSKVVCKKYRS	142
CYVDDNSNVLCKKYRS	86	CYFDESSINVCKKYRS	143
CYVDDSSQVVCKKYRS	87	CYLDDSSKVVCKKYRS	144
CYVDDSSQVLCKKYRS	88	CYFDDNSKVLCKKYRS	145
CYFDENSQVICKKYRS	89	CYFDESSKVLCKKYRS	146
CYFDENSNVVCKKYRS	90	CYLDDSSKVLCKKYRS	147
CYFDENSNVLCKKYRS	91	CYLDESSKVICKKYRS	148
CYFDESSQVVCKKYRS	92	CYFDENSKVICKKYRS	149
CYFDESSQVLCKKYRS	93	CYLDDNSKVICKKYRS	150
CYFDDNSQVVCKKYRS	94	CYLDESSQVICKKYRS	151
CYFDDNSQVLCKKYRS	95		

Los fragmentos representativos del SEQ ID NO: 38 (de nuevo seleccionado con fines ilustrativos) se resumen en la Tabla 3. Notablemente, los fragmentos de secuencia mostrados en la Tabla 3 incluyen fragmentos que tienen todos 11 aminoácidos, sino fragmentos más pequeños o más grandes, por ejemplo de aproximadamente 3 o más aminoácidos

5

Tabla 3

Secuencia	SEQ ID NO:
CYFDDSSNVIC	152
CYFDDSSNWC	153
CYFDDSSNVLC	154
CYFDDSSKVIC	155
CYFDDNSNVIC	156
CYFDESSNVIC	157
CYFDDSSQVIC	158
CYLDDSSNVIC	159

10 Los presentes compuestos también incluyen moléculas pequeñas, más particularmente péptidos, identificados en la presente memoria como SEQ ID NO: 160-208, (de nuevo con fines ilustrativos) resumidos la Tabla 4. También se contemplan las variantes, análogos, homólogos, o fragmentos de estos compuestos, tales como los homólogos de especie, así como las formas degeneradas de los mismos.

15

Tabla 4

Secuencia	SEQ ID NO:
CYLDDNSKVVCKKYR	160
CYLDDNSNVICKKYR	161
CYLEDNSNVTCCKYR	162
CYLEENSNWCKKYR	163
CYLDDNSKVTCKKYR	164
CYLEENSQVICKKYR	165
CYLEDNSQWCKKYR	166

ES 2 397 327 T3

Secuencia	SEQ ID NO:
CYLDDNSNFICKKYR	167
CYLDENSKVVCKKYR	168
CWLDENSNWCKKYR	169
CYLEENSNVICKKYR	170
CYLEDNSNVVCKKYR	171
CYLDENSKVICKKYR	172
CYLDENSQVTCKKYR	173
CYLEDNSNVICKKYR	174
CYLDDNSKVICKKYR	175
CYLDENSNVTCKKYR	176
CYLDDNSQVTCKKYR	177
CYLDENSQVVCKKYR	178
CYLDDNSNVTCKKYR	179
CYLDENSNVVCKKYR	180
CYLDENSQVICKKYR	181
CYLDENSNVICKKYR	182
CYLDDNSNVVCKKYR	183
CYLEDNSQVICKKYR	184
CYLDENSNVTCKKWR	185
CYLDDNSNVTCKKWR	186
CYLDENSNVVCKKWR	187
CYLDDNSNVVCKKWR	188
CYLDDNSQVTCKKWR	189
CYLDENSQVVCKKWR	190
CYLDENSNVVCKQYR	191
CYLDDNSNVTCKQYR	192
CYLDDNSQVVCKKWR	193
CYLDDNSNVVCKNYR	194
CYLDDNSNVVCKQYR	195
CYLDENSQVICKQYR	196
CYADENSNVVCKKWR	197
CYADDNSNVTCKKWR	198
CYLDDNSQVICKNYR	199
CYLDDNSQVVCKQYR	200
CYLDDNSQVICKQYR	201
CYADDNSNVVCKKWR	202
CYLDENDNVVCKKWR	203
CYLDDNDNVTCKKWR	204
CYADDNSQVVCKKWR	205

Secuencia	SEQ ID NO:
CYADDNSNVVCKQYR	206
CYLDDNDNVVCKKWR	207
CYLDDNSNIICKKWR	208

Un compuesto puede incluir un análogo u homólogo de los SEQ ID NO: 1-208. Los compuestos incluyen los que tienen homología con los SEQ ID NO: 1-208, por ejemplo, preferiblemente 50% o más de identidad de aminoácidos, más preferiblemente 75% o más de identidad de aminoácidos, y aún más preferiblemente 90% o más de identidad de aminoácidos.

La identidad de secuencia se puede medir utilizando programas de análisis de secuencias (Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin Centro de Biotecnología, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705), con los parámetros por defecto de los mismos.

En el caso de las secuencias de polipéptidos, que son menos de 100% idénticas a una secuencia de referencia, las posiciones no idénticas son, preferiblemente, pero no necesariamente, sustituciones conservativas de la secuencia de referencia. Las sustituciones conservativas incluyen típicamente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina y alanina; valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico y ácido glutámico; asparragina y glutamina; serina y treonina; lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina. Por lo tanto, en la invención se incluyen péptidos que tienen secuencias mutadas de manera que sigan siendo homólogos, por ejemplo, en secuencia, en estructura, en función, y en el carácter antigénico u otra función, a un polipéptido que tiene la secuencia parental correspondiente. Tales mutaciones pueden ser, por ejemplo, mutaciones que implican cambios conservativos de aminoácidos, por ejemplo, cambios entre aminoácidos de propiedades moleculares muy similares. Por ejemplo, los intercambios dentro del grupo alifático de alanina, valina, leucina e isoleucina pueden considerarse como conservativos. A veces la sustitución de glicina por uno de estos también puede considerarse conservativa. Otros intercambios conservativos incluyen aquellos dentro del grupo alifático de aspartato y glutamato; dentro del grupo amida de asparragina y glutamina; dentro del grupo hidroxilo de serina y treonina; dentro del grupo aromático de fenilalanina, tirosina y triptófano; dentro del grupo alcalino de lisina, arginina e histidina; y dentro del grupo que contiene azufre de metionina y cisteína. A veces la sustitución dentro del grupo de metionina y leucina también puede considerarse conservativa. Los grupos de sustitución conservativa preferidos son aspartato-glutamato; asparragina-glutamina; valina-leucina-isoleucina; alanina-valina; fenilalanina-tirosina, y lisina-arginina.

También se describen en la presente memoria compuestos que tienen secuencias alteradas incluyendo inserciones de manera que la secuencia de aminoácidos global es prolongada, mientras que el compuesto conserva todavía las propiedades agonísticas o antagonísticas de TDF apropiadas. Además, las secuencias alteradas pueden incluir deleciones internas al azar o diseñadas que truncan la secuencia de aminoácidos global del compuesto, sin embargo, el compuesto todavía conserva sus propiedades funcionales de tipo TDF. Uno o más residuos de aminoácidos dentro de los SEQ ID NO: 1-208 son remplazados por otros residuos de aminoácidos que tienen propiedades físicas y/o químicas similares a los residuos a los que remplazan. Preferiblemente, las sustituciones conservativas de aminoácidos son aquellas en las que un aminoácido es remplazado por otro aminoácido abarcado dentro de la misma clase designada, tal como se describirá más completamente a continuación. Las inserciones, deleciones y sustituciones son apropiadas cuando no suprimen las propiedades funcionales del compuesto. La funcionalidad del compuesto alterado puede ser analizada de acuerdo con los análisis *in vitro* e *in vivo* descritos a continuación que están diseñados para evaluar las propiedades de tipo TDF del compuesto alterado.

Los residuos de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1-208, los análogos u homólogos de los SEQ ID NO: 1-208 incluyen l-aminoácidos codificados genéticamente, l-aminoácidos no codificados genéticamente de origen natural, d-aminoácidos sintéticos, o d-enantiómeros de todos los anteriores.

B. Secuencias de ácido nucleico de TDFRP

También se describen en la presente memoria polinucleótidos que codifican los SEQ ID NO: 1-208, incluyendo variantes degeneradas de los mismos. En consecuencia, las secuencias de ácidos nucleicos capaces de hibridar, en condiciones poco restrictivas, con cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los SEQ ID NO: 1-208 se describen en la presente memoria. Por ejemplo, para una secuencia de ácido nucleico de alrededor de 20-40 bases, un protocolo de prehibridación, hibridación, y lavado típico es el siguiente: (1) prehibridación: incubar los filtros de nitrocelulosa que contienen el ADN diana desnaturalizado durante 3-4 horas a 55°C en 5x solución de Denhardt, 6 x SSC (20 x SSC consiste de 175 g de NaCl, 88,2 g de citrato sódico en 800 mL de H₂O ajustado a pH 7,0 con NaOH 10 N), SDS al 0,1%, y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, (2) hibridación: incubar los filtros en solución de prehibridación más sonda a 42°C durante 14-48 horas, (3) lavado: tres lavados de 15 minutos en 6 x SSC y SDS al 0,1% a temperatura ambiente, seguido por un último lavado de 1-1,5 minutos en 6 x

SSC y SDS al 0,1% a 55°C. Otros procedimientos equivalentes, p. ej., empleando disolventes orgánicos tales como formamida, son bien conocidos en la técnica.

5 También se describen en la presente memoria variantes alélicas de los mismos, es decir, las formas alternativas de origen natural de los polinucleótidos aislados que codifican polipéptidos que son idénticos, homólogos o están relacionados con los codificados por los polinucleótidos. Alternativamente, se pueden producir variantes de origen no natural mediante mecanismos de mutagénesis o mediante mecanismos de síntesis directa bien conocidos en la técnica.

10 **C. Vectores de expresión recombinantes de TDFRP**

También se describen en la presente memoria vectores que contienen una o más secuencias de ácido nucleico que codifican un TDFRP. Para la expresión recombinante de uno o más de los polipéptidos descritos en la presente memoria, el ácido nucleico que contiene toda o una porción de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido se inserta en un vector de clonación apropiado, o un vector de expresión (es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante del polipéptido insertado) mediante mecanismos de ADN recombinante bien conocidos en la técnica y como se detalla a continuación.

20 En general, los vectores de expresión útiles en los mecanismos de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, se pretende que la invención pretenda incluya dichas otras formas de vectores de expresión que no son técnicamente plásmidos, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), que cumplen funciones equivalentes.

25 Tales vectores virales permiten la infección de un sujeto y la expresión en ese sujeto de un compuesto.

Los vectores de expresión recombinantes descritos en la presente memoria comprenden un ácido nucleico que codifica un compuesto con propiedades similares a TDF en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula anfitriona, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas basándose en las células anfitrionas que se van a utilizar para la expresión que está conectada operativamente a la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, se pretende que "conectado operablemente" signifique que la secuencia de nucleótidos de interés está conectada a una o varias secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (p. ej., En un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula anfitriona cuando el vector se introduce en la célula anfitriona).

Se pretende que el término "secuencia reguladora" incluya promotores, intensificadores y otros elementos de control de la expresión (p. ej., señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990).

40 Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células anfitrionas y aquellos que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos sólo en ciertas células anfitrionas (p. ej., secuencias reguladoras específicas de tejidos). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula anfitriona que se va a transformar, el nivel de expresión del polipéptido deseado, etc. Los vectores de expresión pueden introducirse en células anfitrionas para producir así polipéptidos o péptidos, incluyendo polipéptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos como se describe en la presente memoria (p. ej., TDFRP y polipéptidos de fusión derivados de TDFRP, etc.).

50 **D. Células Anfitrionas que Expresan TDFRP**

También se describen en la presente memoria células anfitrionas que expresan TDFRP, que contienen un ácido nucleico que codifica uno o más TDFRP. Los vectores de expresión recombinantes pueden diseñarse para la expresión de TDFRP en células procarióticas o eucarióticas. Por ejemplo, los TDFRP se puede expresar en células bacterianas tales como *Escherichia coli*, células de insecto (usando vectores de expresión de baculovirus), células fúngicas, p. ej., levaduras, células de levaduras o células de mamífero. Las células anfitrionas adecuadas son comentadas adicionalmente por Goeddel, en Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990). Alternativamente, el vector de expresión recombinante puede ser transcrito y traducido *in vitro*, por ejemplo utilizando las secuencias reguladoras del promotor de T7 y la polimerasa de T7.

60 La expresión de polipéptidos en procariotas se lleva a cabo con mayor frecuencia en *Escherichia coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión ya sea de polipéptidos de fusión o no de fusión. Los vectores de fusión añaden varios aminoácidos a un polipéptido codificado allí, usualmente al extremo amino del polipéptido recombinante. Tales vectores de fusión cumplen típicamente tres propósitos: (i) aumentar la expresión de polipéptido recombinante; (ii) aumentar la solubilidad del polipéptido recombinante; y (iii) ayudar a la

purificación del polipéptido recombinante actuando como un ligando en una purificación de afinidad. A menudo, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y el polipéptido recombinante para permitir la separación del polipéptido recombinante del radical de fusión después de la purificación del polipéptido de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento cognadas, incluyen Factor Xa, trombina y enteroquinasa. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith y Johnson, 1988. *Gene* 67: 31-40), PMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan la glutatión S-transferasa (GST), polipéptido E de unión a maltosa, o polipéptido A, respectivamente, al polipéptido recombinante diana.

Los ejemplos de los vectores de expresión de *E. coli* no de fusión inducibles adecuados incluyen pTrc (Amrann et al., (1988) *Gene* 69:301-315) Y pET 11 d (Studier et al, la tecnología genética EXPRESIÓN: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89).

Una estrategia para maximizar la expresión de polipéptidos recombinante en *E. coli* consiste en expresar el polipéptido en bacterias anfitrionas con una capacidad deteriorada para escindir proteolíticamente el polipéptido recombinante. Véase, por ejemplo, Gottesman, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128. Otra estrategia consiste en alterar la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico que se va a insertar en un vector de expresión de manera que los codones individuales para cada aminoácido sean los utilizados preferentemente en el anfitrión de expresión, p. ej., *E. coli* (véase, p. ej., Wada, et al., 1992. *Nucl. Acids Res.* 20: 2111-2118). Tal alteración de secuencias de ácidos nucleicos se puede llevar a cabo mediante técnicas convencionales de síntesis de ADN.

El vector de expresión de TDFRP puede ser un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de vectores para expresión en levadura *Saccharomyces cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari, et al., 1987. *EMBO J.* 6: 229-234), PMFa (Kurjan y Herskowitz, 1982. *Cell* 30: 933-943), PJRY88 (Schultz et al., 1987. *Gene* 54: 113-123), PYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA), y picz (Invitrogen Corp, San Diego, CA). Alternativamente, se puede expresar TDFRP en células de insecto usando vectores de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de polipéptidos en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células SF9) incluyen la serie pAc (Smith, et al., 1983. *Mol. Cell. Biol.* 3: 2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers, 1989. *Virology* 170: 31-39).

Un ácido nucleico puede ser expresado en células de mamífero usando un vector de expresión de mamífero. Los ejemplos de los vectores de expresión de mamíferos incluyen pCDM8 (Seed, 1987. *Nature* 329: 840) y pMT2PC (Kaufman, et al., 1987. *EMBO J.* 6: 187-195). Cuando se utiliza en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión son proporcionadas a menudo por elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores utilizados comúnmente derivan de virus de polio, adenovirus 2, citomegalovirus y virus de simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procarióticas como eucarióticas véase, p. ej., los Capítulos 16 y 17 de Sambrook, et al, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

El vector de expresión recombinante de mamífero puede ser capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferentemente en un tipo de célula particular (p. ej., se utilizan elementos reguladores específicos de tejidos para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos de tejidos son conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de los promotores específicos de tejidos apropiados incluyen el promotor de albúmina (específico de hígado; Pinkert, et al., 1987. *Genes Dev.* 1: 268-277), promotores específicos linfoides (Calame y Eaton, 1988. *Adv. Immunol.* 43: 235-275), en particular promotores de receptores de células T (Winoto y Baltimore, 1989. *EMBO J.* 8: 729-733) e inmunoglobulinas (Banerji, et al., 1983. *Cell* 33: 729-740; Queen y Baltimore, 1983. *Cell* 33: 741-748), promotores específicos de neuronas (p. ej., el promotor de neurofilamentos; Byrne y Ruddle, 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 86: 5473-5477), promotores específicos del páncreas (Edlund, et al., 1985. *Science* 230: 912-916), y promotores específicos de glándula mamaria (p. ej., promotor de suero de leche; Patente de los Estados Unidos Núm. 4.873.316 y Publicación de la Solicitud Europea Núm. 264.166). Los promotores regulados evolutivamente también están incluidos, p. ej., los promotores hox murinos (Kessel y Gruss, 1990. *Science* 249: 374-379) y el promotor de α -fetoproteína (Campes y Tilghman, 1989. *Genes Dev.* 3: 537-546).

También se describe en la presente memoria un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ADN clonada en el vector de expresión en una orientación antisentido. Es decir, la molécula de ADN está conectada operativamente a una secuencia reguladora de una manera que permite la expresión (mediante transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que es antisentido con respecto a un ARNm de TDRFP. Se pueden seleccionar secuencias reguladoras conectadas operativamente a un ácido nucleico clonado en la orientación antisentido que dirigen la expresión continua de la molécula de ARN antisentido en una variedad de tipos de células, por ejemplo, promotores y/o intensificadores virales, o se pueden seleccionar secuencias reguladoras que dirigen la expresión constitutiva, específica de tejido o específica del tipo de célula de ARN antisentido. El vector de expresión antisentido puede estar en la forma de un plásmido recombinante, fagémido o virus atenuado en el que los ácidos nucleicos antisentido son producidos bajo el control de una región reguladora de alta eficacia, cuya actividad puede

ser determinada por el tipo celular en el cual se introduce el vector. Para una discusión de la regulación de la expresión génica utilizando genes antisentido véase, por ejemplo, Weintraub, et al., "Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis", *Reviews-Trends in Genetics*, Vol. 1(1) 1986.

5 También se describen en la presente memoria células anfitrionas en las que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Los términos "célula anfitriona" y "célula anfitriona recombinante" se usan indistintamente en la presente memoria. Se entiende que tales términos hacen referencia no sólo a la célula sujeto concreta sino también a la progenie o progenie potencial de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía estar incluida dentro del alcance del término tal como se utiliza en la presente memoria.

15 Una célula anfitriona puede ser cualquier célula procariótica o eucariótica. Por ejemplo, se puede expresar TDFRP en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto, levaduras o células de mamífero (tales como células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS). Otras células anfitrionas adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica.

20 El ADN del vector se puede introducir en células procarióticas o eucarióticas a través de técnicas convencionales de transformación o transfección. Según se utilizan en la presente memoria, se pretende que los términos "transformación" y "transfección" hagan referencia a una variedad de mecanismos reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico foráneo (por ejemplo, ADN) en una célula anfitriona, incluyendo la co-precipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano, la lipofección, o la electroporación. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células anfitrionas se pueden encontrar en Sambrook, et al. (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.), y otros manuales de laboratorio.

30 Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección utilizada, sólo una pequeña fracción de células puede integrar el DNA foráneo en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos) se introduce generalmente en las células anfitrionas junto con el gen de interés. Los diversos marcadores seleccionables incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. El ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable puede introducirse en una célula anfitriona en el mismo vector que el que codifica TDFRP o puede introducirse en un vector separado. Las células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse por selección con fármacos (p. ej., las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células mueren).

40 Una célula anfitriona que comprende un compuesto descrito en la presente memoria, tal como una célula anfitriona procariótica o eucariótica en cultivo, puede utilizarse para producir (es decir, expresar) un TDFRP recombinante. El método puede comprender cultivar la célula anfitriona (en la cual se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica TDFRP) en un medio adecuado de manera que se produce TDFRP. El método puede comprender adicionalmente la etapa de aislar TDFRP del medio o de la célula anfitriona. La purificación de polipéptidos recombinantes es bien conocida en la técnica e incluye mecanismos de purificación mediante intercambio iónico, o mecanismos de purificación por afinidad, por ejemplo con un anticuerpo para el compuesto. Los métodos de creación de anticuerpos para los compuestos descritos en la presente memoria se discuten a continuación.

E. Polipéptidos Quiméricos y de Fusión Derivados de TDFRP

50 También se describen en la presente memoria polipéptidos quiméricos o de fusión derivados de TDFRP. Según se utiliza en la presente memoria, un "polipéptido quimérico" o un "polipéptido de fusión" derivado de TDFRP comprende un TDFRP conectado operativamente a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un polipéptido que no es sustancialmente homólogo al TDFRP, p. ej., un polipéptido que es diferente del TDFRP y que se deriva del mismo organismo o de un organismo diferente (es decir, No TDFRP). En un polipéptido de fusión derivado de TDFRP, el TDFRP puede corresponder a todo o a una porción de un TDFRP. Un polipéptido de fusión derivado de TDFRP puede comprender al menos una porción biológicamente activa de un TDFRP, por ejemplo un fragmento de los SEQ ID NO: 1 a 208. Alternativamente, un polipéptido de fusión derivado de TDFRP puede comprender al menos dos porciones biológicamente activas de un TDFRP. Un polipéptido de fusión derivado de TDFRP puede comprender al menos tres porciones biológicamente activas de un polipéptido TDFRP. Se pretende que en el polipéptido de fusión, el término "conectado operativamente" indique que el polipéptido TDFRP y el polipéptido distinto de TDFRP están fusionados en marco entre sí. El polipéptido distinto de TDFRP se puede fusionar al extremo N-terminal o C-terminal del TDFRP.

El polipéptido de fusión puede ser un polipéptido de fusión de GST-TDFRP en el que las secuencias de TDFRP están fusionadas al extremo N- o C-terminal de las secuencias de GST (glutación S-transferasa). Tales polipéptidos de fusión pueden facilitar la purificación de TDFRP recombinante por métodos de afinidad.

- 5 El polipéptido de fusión puede ser un polipéptido TDFRP que contiene una secuencia señal heteróloga en su extremo N-terminal. En ciertas células anfitrionas (por ejemplo, células anfitrionas de mamífero), se puede aumentar la expresión y/o secreción de TDFRP mediante el uso de una secuencia señal heteróloga.

10 El polipéptido de fusión puede ser un polipéptido de fusión de TDFRP-inmunoglobulina en el que las secuencias de TDFRP se fusionan a secuencias derivadas de un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Los polipéptidos de fusión de TDFRP-inmunoglobulina descritos en la presente memoria se pueden incorporar a composiciones farmacéuticas y administrarse a un sujeto para inhibir una interacción entre un TDF y un polipéptido receptor TDF en la superficie de una célula, para suprimir de este modo transducción de la señal mediada por TDF *in vivo*. Se pueden utilizar polipéptidos de fusión de TDFRP-inmunoglobulina para afectar a la biodisponibilidad de un TDFRP, por ejemplo, para dirigir el compuesto a una célula o tejido concretos que tienen el antígeno requisito. La inhibición de la interacción de TDF/receptor de TDF puede ser útil terapéuticamente tanto para el tratamiento de trastornos proliferativos y diferenciativos, como para la modulación (por ejemplo, promoción o inhibir) de la supervivencia celular. Por otra parte, los polipéptidos de fusión de TDFRP-inmunoglobulina descritos en la presente memoria se pueden usar como inmunógenos para producir anticuerpos anti-TDFRP en un sujeto, para purificar ligandos de TDFRP, y en los análisis de escrutinio para identificar moléculas que inhiben la interacción de TDF con un ligando de TDF.

II. Preparación de los TDRP

25 A. Síntesis peptídica de los TDFRP

Los TDFRP se pueden sintetizar químicamente utilizando mecanismos de síntesis peptídica convencionales, p. ej., de síntesis de péptidos en fase sólida o en fase de disolución. Esto es, los compuestos descritos como SEQ ID NO: 1-208 se sintetizan químicamente, por ejemplo, sobre un soporte sólido o en disolución utilizando composiciones y métodos bien conocidos en la técnica, véase, p. ej., Fields, GB (1997) Solid-Phase Peptide Synthesis. Academic Press, San Diego.

Los TDFRP se pueden preparar mediante síntesis peptídica con Fmoc (grupo protector lábil frente a bases) o -Boc (grupo protector de α -amino lábil a los ácidos). Después de la síntesis, los TDFRP se pueden dejar a continuación sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos mediante un esquema de purificación apropiado utilizando mecanismos de purificación de polipéptidos convencionales, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, HPLC de fase inversa, por ejemplo, utilizando columnas tales como C-18, C-8, y C4, cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía basada en las interacciones hidrófobas, u otro método de purificación de polipéptidos.

40 B. Producción de los TDFRP utilizando técnicas de ADN recombinante

Alternativamente se pueden producir TDFRP mediante técnicas de ADN recombinante, por ejemplo, la expresión en exceso de los compuestos en bacterias, levadura, baculovirus o células eucarióticas produce cantidades suficientes de los compuestos. La purificación de los compuestos a partir de mezclas heterogéneas de materiales, p. ej., mezclas de reacción o productos lisados celulares u otras fracciones brutas, se lleva a cabo por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad u otros métodos de purificación de polipéptidos. Estos se pueden facilitar mediante la expresión de los compuestos descritos por los SEQ ID NO: 1-208 como fusiones a un epítipo o secuencia escindible o inerte de otro modo. La elección de un sistema de expresión, así como los métodos de purificación son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los polinucleótidos proporcionados en la presente memoria se pueden utilizar para expresar compuestos recombinantes para análisis, caracterización o uso terapéutico; como marcadores para tejidos en los que el compuesto correspondiente es expresado preferentemente (ya sea constitutivamente o en una fase particular de la diferenciación o desarrollo tisular o en estados de enfermedad).

60 Para la expresión recombinante de uno o más de los compuestos descritos en la presente memoria el ácido nucleico que contiene toda o una porción de la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido puede insertarse en un vector de expresión apropiado (es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de la secuencia codificante del péptido insertado). Los elementos reguladores pueden ser heterólogos (es decir, no el promotor del gen nativo). Alternativamente, las señales necesarias de transcripción y traducción también pueden suministrarse mediante el promotor nativo para los genes y/o sus regiones flanqueantes.

Puede utilizarse una variedad de sistemas de anfitrión-vector para expresar una o varias secuencias codificantes del péptido. Estos incluyen, pero no están limitados a: (i) sistemas de células de mamífero que están infectadas con el virus vaccinia, adenovirus, y similares; (ii) sistemas de células de insecto infectadas con baculovirus y similares; (iii) levaduras que contienen vectores de levadura o (iv) bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN plasmídico o ADN cosmídico. Dependiendo del sistema de anfitrión-vector utilizado, se puede utilizar cualquiera de los numerosos elementos de la transcripción y la traducción apropiados.

Las secuencias promotoras/intensificadoras en los vectores de expresión pueden utilizar secuencias reguladoras de plantas, animales, insectos, u hongos. Por ejemplo, se pueden utilizar elementos promotores/intensificadores de levaduras y otros hongos (p. ej., el promotor GAL4, el promotor de la alcohol deshidrogenasa, el promotor de fosfoglicerol quinasa, el promotor de la fosfatasa alcalina). Alternativamente, o además, pueden incluir regiones de control transcripcional animales, p. ej., (i) la región de control del gen de la insulina activa en de las células pancreáticas (véase, p. ej., Hanahan, et al., 1985. Nature 315: 115-122); (ii) la región de control del gen de la inmunoglobulina activa en de las células linfoides (véase, p. ej., Grosschedl, et al., 1984. Cell 38: 647-658); (iii) la región de control del gen de la albúmina activa en hígado (véase, p. ej., Pinckert, et al., 1987. Genes y Dev. 1: 268-276); (iv) la región de control del gen del polipéptido alcalino de mielina activa en células oligodendrocíticas cerebrales (véase, p. ej., Readhead, et al., 1987. Cell 48: 703-712); y (v) la región de control del gen de la hormona liberadora de gonadotropina activa en el hipotálamo (véase, p. ej., Mason, et al., 1986. Science 234: 1372-1378), y similares.

Los vectores de expresión o sus derivados incluyen, p. ej., virus humanos o animales (p. ej., virus vaccinia o adenovirus); virus de insectos (p. ej., baculovirus); vectores de levaduras, vectores bacteriófagos (p. ej., fago lambda); vectores de plásmidos y vectores cósmidos.

Se puede seleccionar la cepa de la célula anfitriona que modula la expresión de las secuencias insertadas de interés, o modifica o procesa péptidos expresados codificados por las secuencias de la manera específica deseada. Además, la expresión de ciertos promotores se puede intensificar en presencia de ciertos inductores en una cepa anfitriona seleccionada; facilitando así el control de la expresión de los compuestos diseñados genéticamente. Por otra parte, las diferentes células anfitrionas poseen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación traduccional y postraduccional (por ejemplo, glicosilación, fosforilación, y similares) de los péptidos expresados. De este modo, se pueden elegir líneas celulares o sistemas anfitriones apropiados para asegurar que se logran la modificación y el procesamiento deseada del péptido foráneo. Por ejemplo, se puede utilizar la expresión del péptido en un sistema bacteriano para producir un péptido núcleo no glicosilado; mientras que la expresión en células de mamífero asegura la glicosilación "nativo" de un péptido heterólogo.

C. Preparación de compuestos de polipéptidos quiméricos o de fusión derivados de TDFRP

Se puede producir un compuesto de un polipéptido quimérica o de fusión derivado de TDFRP descrito en la presente memoria mediante mecanismos de ADN recombinante conocidos en la técnica. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptidos se ligan entre sí juntas en marco de acuerdo con técnicas convencionales, p. ej., mediante el empleo de extremos romos o escalonados para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, rellenado de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión no deseable, y ligación enzimática. El gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales incluyendo sintetizadores automáticos de ADN. Alternativamente, puede llevarse a cabo la amplificación por PCR de fragmentos de genes usando cebadores ancla que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente pueden ser recocidos y reamplificados para generar una secuencia génica quimérica (véase, p. ej., Ausubel, et al. (Eds.) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1992). Además, muchos vectores de expresión están disponibles en el mercado que ya codifican un radical de fusión (p. ej., un polipéptido GST). Se puede clonar un ácido nucleico que codifica TDFRP en dicha vector de expresión de manera que el radical de fusión esté conectado en marco a la secuencia de ácido nucleico que codifica TDFRP.

D. Preparación de Genotecas de Polipéptidos TDFRP

Además, se pueden utilizar genotecas de fragmentos de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los TDFRP para generar una población de fragmentos de TDFRP para el escrutinio y la posterior selección de variantes de un compuesto de TDFRP. Se puede generar una genoteca de fragmentos de secuencias codificantes mediante tratamiento de un fragmento de PCR de doble hebra de una secuencia de ácido nucleico que codifica TDFRP con una nucleasa en condiciones en las que se produce muescas sólo aproximadamente una vez por molécula, desnaturalización del ADN de doble hebra, renaturalización del ADN para formar ADN de doble hebra que puede incluir pares efectores/antisentido de los diferentes productos con muescas, eliminación de porciones de hebra sencilla de dúplex reformados mediante tratamiento con nucleasa S1, y ligación de la genoteca de fragmentos resultante en un vector de expresión. Mediante este método, se pueden obtener genotecas de expresión que codifican fragmentos N-terminales, C-terminales, e internos de diversos tamaños de los polipéptidos TDFRP.

Se conocen varios mecanismos en la técnica para el escrutinio de productos génicos de genotecas combinatorias elaboradas mediante puntuales mutaciones o truncamiento, y para el escrutinio de genotecas de ADNc para determinar los productos génicos que tienen una propiedad seleccionada. Dichas técnicas son adaptables para el escrutinio rápido de las genotecas de ADN generadas mediante mutagénesis combinatoria de TDFRP. Las técnicas más ampliamente utilizadas, que son susceptibles de análisis de alto rendimiento, para el escrutinio de grandes genotecas de genes incluyen típicamente la clonación de la genoteca de genes en vectores de expresión replicables, la transformación de las células apropiadas con la genoteca de vectores resultante, y la expresión de los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. La mutagénesis recursiva de conjunto (REM), una nueva técnica que mejora la frecuencia de mutantes funcionales en las genotecas, puede utilizarse combinada con los análisis de escrutinio para identificar variantes de TDFRP. Véanse, p. ej., Arkin y Yourvan, 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 7811-7815; Delgrave, et al., 1993. Polypeptide Engineering 6:327-331.

También se puede producir una genoteca de compuestos de variantes de TDFRP, por ejemplo, mediante ligación enzimática de una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas de manera que un conjunto degenerado de secuencias potenciales de TDFRP sea expresable como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de polipéptidos de fusión más grandes (por ejemplo, para la presentación en fagos) que contienen el conjunto de secuencias de TDFRP los mismos. Existe una variedad de métodos que puede ser utilizada para producir genotecas de compuestos de variantes potenciales de TDFRP partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia génica degenerada puede realizarse en un sintetizador de ADN automático, y ligarse a continuación el gen sintético en un vector de expresión apropiado. El uso de un conjunto degenerado de genes permite la provisión, en una mezcla, de todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de secuencias potenciales de TDFRP. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados son bien conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., Narang, 1983. Tetrahedron 39: 3; Itakura, et al., 1984. Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura, et al., 1984. Science 198: 1056; Ike, et al., 1983. Nucl. Acids Res. 11:477.

E. Anticuerpos Anti-TDFRP

También se describen en la presente memoria polipéptidos y fragmentos de polipéptido adecuados para su uso como inmunógenos para generar anticuerpos anti-TDFRP. Los compuestos se pueden usar para generar anticuerpos completos y fragmentos de anticuerpos, tales como Fv, Fab o (Fab)₂, que se unen de manera inmuno-específica a cualquiera de los TDFRP descritos en la presente memoria, incluyendo anticuerpos biespecíficos u otros anticuerpos multivalentes.

Se puede utilizar un compuesto polipeptídico de TDFRP aislado, o una porción o fragmento del mismo, como inmunógeno para generar anticuerpos que se unen a TDFRP o a polipéptidos de TDF utilizando técnicas convencionales para la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Se pueden utilizar polipéptidos de TDF completos o, alternativamente, se pueden utilizar los TDFRP o los fragmentos de TDFRP como inmunógenos. Los péptidos de TDFRP comprenden al menos 4 residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos mostrada en los SEQ ID NO: 1-208, y comprenden un epítipo de TDFRP de manera que un anticuerpo generado contra el péptido forma un complejo inmunitario específico con el polipéptido de TDF o TDFRP. Preferiblemente, el péptido antigénico comprende al menos 5, 8, 10, 15, 20, o 30 residuos de aminoácidos. Algunas veces son preferibles péptidos antigénicos más largos frente a los péptidos antigénicos más cortos, dependiendo del uso y de acuerdo con métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Al menos un epítipo abarcado por el péptido antigénico puede ser una región de polipéptido de TDF que se encuentra en la superficie del polipéptido (p. ej., una región hidrófila). Como medio para dirigir la producción de anticuerpos, se pueden generar diagramas de hidropatía que muestran las regiones de hidrofilia e hidrofobia mediante cualquier método bien conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los métodos Kyte Doolittle o de Hopp Woods, con o sin transformación de Fourier (véanse, p. ej., Hopp y Woods, 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 78: 3824-3828; Kyte y Doolittle, 1982. J. Mol. Biol. 157: 105-142).

Según se describe en la presente memoria, se pueden utilizar los TDFRP o los derivados de los mismos como inmunógenos en la generación de anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a estos componentes polipeptídicos. Se describen anticuerpos para polipéptidos TDFRP humanos. Se pueden utilizar diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales para una secuencia de un polipéptido TDFRP de los SEQ ID NO: 1-208, o un derivado, fragmento, análogo u homólogo del mismo. Algunos de estos polipéptidos se describen a continuación.

Para la producción de anticuerpos policlonales, se pueden inmunizar diferentes animales anfitriones adecuados (p. ej., conejo, cabra, ratón u otro mamífero) mediante inyección con el polipéptido nativo, o una variante sintética del mismo, o un derivado de los anteriores. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, TDFRP expresado de manera recombinante o un TDFRP sintetizado químicamente. La preparación puede incluir adicionalmente un coadyuvante. Los diferentes coadyuvantes utilizados para aumentar la respuesta inmunológica

incluyen, pero no están limitados a, Freund (completo e incompleto), geles minerales (p. ej., hidróxido de aluminio), sustancias tensioactivas (p. ej., lisolecitina, polioles Pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, dinitrofenol, etc.), coadyuvantes humanos tales como el bacilo de Calmette-Guerin y *Corynebacterium parvum*, o compuestos inmunoestimuladores similares. Si se desea, se pueden aislar las moléculas de anticuerpo dirigidas contra TDF o TDFRP a partir del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y purificarse adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía con polipéptido A para obtener la fracción IgG.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra un TDFRP concreto, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos del mismo, se puede utilizar cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante cultivo continuo de la línea celular. Tales técnicas incluyen, pero no están limitadas a, la técnica del hibridoma (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, 1975. *Nature* 256: 495-497); la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (véase, p. ej., Kozbor, et al., 1983. *Immunol. Today* 4: 72) y la técnica del hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase, p. ej., Cole, et al., 1985. En: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden utilizar en la práctica de la invención y se pueden producir usando hibridomas humanos (véase, p. ej., Cote, et al., 1983. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 80: 2026-2030) o transformando células B humanas con el virus de Epstein Barr *in vitro* (véase, p. ej., Cole, et al., 1985. En: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Se pueden añadir árboles dendroméricos sintéticos con cadenas laterales de aminoácidos reactivas, por ejemplo, lisina para potenciar las propiedades inmunogénicas de los compuestos de TDFRP. Asimismo, se puede utilizar la técnica del CPG-dinucleótido para mejorar las propiedades inmunogénicas de los compuestos de TDFRP. Se pueden adaptar las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla específicos a un compuesto de TDFRP (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.946.778). Además, los métodos pueden adaptarse para la construcción de genotecas de expresión de Fab (véase, p. ej., Huse, et al., 1989. *Science* 246: 1275-1281) para permitir una identificación rápida y eficaz de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para un compuesto de TDFRP, p. ej., un polipéptido o derivados, fragmentos, análogos u homólogos del mismo. Los anticuerpos no humanos pueden ser "humanizados" mediante mecanismos bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.225.539. Los fragmentos de anticuerpo que contienen los idiotipos para un compuesto de TDFRP pueden ser producidos mediante mecanismos conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a: (i) un fragmento F(ab')₂ producido por la digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (ii) un fragmento Fab generado reduciendo los puentes disulfuro de un fragmento F(ab')₂; (iii) un fragmento Fab generado mediante tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un compuesto reductor; y (iv) fragmentos Fv.

Además, se describen en la presente memoria anticuerpos recombinantes anti-TDFRP, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones tanto humanas como no humanas, que pueden fabricarse usando técnicas de ADN recombinante convencionales. Tales anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante mecanismos de ADN recombinante conocidos en la técnica, por ejemplo utilizando los métodos descritos en la Solicitud Internacional Núm. PCT/US86/02269; Solicitud de Patente Europea Núm. 184.187; Solicitud de Patente Europea Núm. 171.496; Solicitud de Patente Europea Núm. 173.494; Publicación Internacional PCT Núm. WO 86/01533; Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.816.567; 5.225.539; Solicitud de Patente Europea Núm. 125.023; Better, et al., 1988. *Science* 240: 1041-1043; Liu, et al., 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439-3443; Liu, et al., 1987. *J. Immunol.* 139: 3.521-3.526; Sun, et al., 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 214-218; Nishimura, et al., 1987. *Cancer Res.* 47: 999-1005; Wood, et al., 1985. *Nature* 314:446-449; Shaw, et al., 1988. *J. Natl. Cáncer Inst.* 80: 1553-1559; Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi, et al. (1986) *BioTechniques* 4:214; Jones, et al., 1986. *Nature* 321: 552-525; Verhoeyan, et al., 1988. *Science* 239: 1534; y Beidler, et al., 1988. *J. Immunol.* 141: 4053-4060.

Los métodos para el escrutinio de anticuerpos que poseen la especificidad deseada para los compuestos de TDFRP incluyen, pero no están limitados a, análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA) y otros mecanismos mediados inmunológicamente conocidos en la técnica. La selección de anticuerpos que son específicos para un dominio concreto de un polipéptido TDFRP se ve facilitada por la generación de hibridomas que se unen al fragmento de un polipéptido TDFRP que posee dicho dominio. De este modo, también se proporcionan en la presente memoria anticuerpos que son específicos para un dominio deseado dentro de un TDFRP, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos del mismo.

Se pueden utilizar anticuerpos anti-TDFRP en métodos conocidos en la técnica relacionados con la localización y/o cuantificación de un polipéptido de TDF o un compuesto de TDFRP (p. ej., para su uso en la medición de los niveles del polipéptido de TDF o el compuesto de TDFRP en muestras fisiológicas apropiadas, para su uso en métodos de diagnóstico, para su uso en la formación de imágenes del polipéptido, y similares). Los anticuerpos para los TDFRP, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos, que contienen el anticuerpo derivado del dominio de unión, se pueden utilizar como compuestos farmacológicamente activos (en lo sucesivo "Agentes Terapéuticos").

Se puede utilizar un anticuerpo anti-TDFRP (por ejemplo, anticuerpo monoclonal) para aislar un compuesto de TDFRP o un polipéptido de TDF mediante técnicas convencionales, tales como la cromatografía de afinidad o la

inmunoprecipitación. Un anticuerpo anti-TDFRP puede facilitar la purificación de un polipéptido de TDF natural a partir de las células y de un TDFRP producido recombinantemente expresado en células anfitrionas. Además, se puede utilizar un anticuerpo anti-TDFRP para detectar un polipéptido de TDF o compuestos de TDFRP (por ejemplo, en un producto lisado celular o en un sobrenadante celular) con el fin de evaluar la abundancia y el patrón de expresión del polipéptido de TDF o del TDFRP. Se pueden utilizar anticuerpos anti-TDFRP diagnósticamente para controlar los niveles de polipéptido en tejido como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse mediante el acoplamiento (es decir, conectando físicamente) el anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de las sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de los complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de los materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa luciferina, y aecurina, y los ejemplos de los materiales radiactivos adecuados incluyen ^{32}P , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^{33}P , ^{14}C , ^{13}C , o ^3H .

III. Medición de la unión o la actividad biológica de los TDFRP

20 A. Agonistas y Antagonistas de TDF

Los compuestos de TDFRP pueden funcionar tanto como agonistas del receptor de TDF (es decir, miméticos) o como antagonistas de receptores de TDF, así como del propio TDF. Un agonista de TDFR (o TDF) puede conservar sustancialmente las mismas, o un subgrupo de, las actividades biológicas de la forma de origen natural del polipéptido de TDF. Un antagonista de TDFRP (o TDF) puede inhibir una o más de las actividades de la forma de origen natural del polipéptido de TDF mediante, por ejemplo, unión competitiva a un miembro aguas abajo o aguas arriba de una cascada de señalización celular que incluye el polipéptido receptor de TDF. Por lo tanto, se pueden provocar efectos biológicos específicos por el tratamiento con una variante de función limitada. El tratamiento de un sujeto con una variante que tiene un subgrupo de actividades biológicas de la forma natural del polipéptido tiene menos efectos secundarios en un sujeto con respecto al tratamiento con la forma de origen natural del polipéptido de TDF.

Por consiguiente, los compuestos descritos como SEQ ID NO: 1-208 se utilizan como agonistas o antagonistas de polipéptidos de TDF o receptores de TDF, y se utilizan, por ejemplo, para modular la transducción de señal a través de una membrana celular de una célula que expresa, p. ej., receptores de TDF de Tipo I o de TDF de Tipo II. Modulación de la transducción de la señal en tales células parece ocurrir como resultado de la interacción de unión específica de los compuestos descritos como SEQ ID NO: 1-208 con uno o más receptores de la superficie celular. La interacción específica significa la unión de los péptidos a un receptor de TDF con una constante de equilibrio de disociación mayor de 10^6 M^{-1} . Una estructura de membrana unido a la superficie celular también puede mejorar la especificidad de la interacción de unión. Las variantes de los polipéptidos TDFRP que funcionan como agonistas de la TDF (es decir, miméticos) o como antagonistas de TDFRP se pueden identificar escrutando genotecas de mutantes (p. ej., mutantes por truncamiento) de TDFRP para determinar la actividad agonística o antagónica de TDF.

45 B. Medición de la Unión de TDFRP

Un análisis de unión a TDFRP hace referencia a un formato de análisis competitivo en donde un receptor TDF, su ligando macromolecular y un TDFRP se mezclan en condiciones adecuadas para determinar la unión entre el receptor de TDF y el ligando y la evaluar de la cantidad de unión entre el receptor de TDF y su ligando. La cantidad de unión se compara con un control adecuado, que puede ser la cantidad de unión en ausencia del TDFRP, la cantidad de la unión en presencia de un inhibidor conocido, o ambas. La cantidad de unión puede ser evaluada mediante cualquier método adecuado. Los métodos de análisis de la unión incluyen, por ejemplo, ELISA, análisis de radioreceptor de unión, análisis de proximidad de centelleo, análisis de unión a receptores de la superficie celular, análisis de transferencia de energía de fluorescencia, cromatografía líquida, análisis de filtración por membranas, y similares.

En un análisis de unión ligando/receptor típico útil en la práctica de esta invención, los péptidos purificados que tienen una afinidad cuantificable, conocida para un receptor pre-seleccionado (véase, por ejemplo, Ten Dijke et al. (1994) Science 264:101-103) se marcan con un radical detectable, por ejemplo, un marcador radiactivo, un marcador cromogénico, o un marcador fluorogénico. Las alícuotas de receptores purificados, fragmentos del dominio de unión a receptores, o células que expresan el receptor de interés en su superficie se incuban con el péptido marcado en presencia de diversas concentraciones del péptido no marcado. La afinidad de unión relativa del péptido se puede medir mediante la cuantificación de la capacidad del candidato (péptido no marcado) para inhibir la unión del péptido marcado al receptor. En la realización del análisis, se incuban concentraciones fijas del receptor y el

péptido en presencia y ausencia de péptido no marcado. La sensibilidad puede ser aumentada mediante pre-incubación del receptor con el análogo de TDFRP antes de la adición de péptido marcado. Después de que el competidor marcado se ha añadido, se concede tiempo suficiente para la unión al competidor adecuado, y a continuación se separan el péptido marcado libre y el unido entre sí, y se miden uno u otro. Los marcadores útiles en la práctica de los procedimientos de escrutinio incluyen marcadores radiactivos (p. ej., ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In o ^{77}Br), marcadores cromogénicos, marcadores espectroscópicos (tales como los descritos por Haughland (1994) "Handbook of Fluorescent and Research Chemicals 5^a ed." de Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg.), o enzimas conjugadas que tienen tasas de recambio elevadas, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o beta-galactosidasa, que se utilizan combinadas con sustratos quimioluminiscentes o fluorogénicos. La señal de unión máxima es la señal medida en presencia del ligando nativo, pero sin TDFRP presente en la mezcla de análisis. La señal de fondo es la señal de unión medida sin el ligando nativo.

En un análisis de unión de compuesto/receptor típico útil en la práctica de esta técnica, los compuestos de referencia purificados que tienen una afinidad cuantificable, conocida para un receptor pre-seleccionado se marcan con un radical detectable, por ejemplo, un marcador radiactivo, un marcador cromogénico, o un marcador fluorogénico (véase, por ejemplo, Ten Dijke et al. (1994) Science 264:101-103). Las alícuotas del receptor purificado, los fragmentos del dominio de unión al receptor, o las células que expresan el receptor de interés en su superficie se incuban con compuestos marcados en presencia de diversas concentraciones de los compuestos no marcados. La afinidad de unión relativa del péptido se puede medir mediante la cuantificación de la capacidad del candidato (péptido no marcado) para inhibir la unión del péptido marcado al receptor. En la realización del análisis, las concentraciones fijas del receptor y el péptido se incuban en presencia y ausencia de péptido no marcado. La sensibilidad puede ser incrementada mediante pre-incubación del receptor con el compuesto de TDFRP antes de la adición del péptido marcado. Después de que el competidor marcado se ha añadido, se concede tiempo suficiente para la unión al competidor adecuado, y a continuación se separan el péptido marcado libre y el unido entre sí, y se miden uno u otro. Los marcadores útiles en la práctica de los procedimientos de escrutinio incluyen marcadores radiactivos (p. ej., ^{125}I , ^{131}I , ^{51}Cr , ^{111}In o ^{77}Br), marcadores cromogénicos, marcadores espectroscópicos (tales como los descritos por Haughland (1994) "Handbook of Fluorescent and Research Chemicals 5^a ed." de Molecular Probes, Inc., Eugene, Oreg.), o enzimas conjugadas que tienen altas tasas de recambio, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o beta-galactosidasa, que se utilizan combinadas con sustratos quimioluminiscentes o fluorogénicos.

Un análisis de unión a TDFRP puede hacer referencia a la mezcla de un ligando de unión a TDFRP y un compuesto de TDFRP en condiciones adecuadas para la unión entre el ligando de unión a TDFRP y el compuesto de TDFRP y a la evaluación del grado de unión entre el ligando de unión a TDFRP y el compuesto de TDFRP, por ejemplo, midiendo la constante de disociación y obteniendo la constante de unión en equilibrio a través de un análisis Scatchard o de regresión no lineal. La cantidad de unión se compara con un control adecuado de la cantidad de la unión en presencia de un inhibidor conocido, o ambos. La cantidad de unión se puede evaluar mediante cualquier método adecuado. Los métodos de análisis de unión incluyen, por ejemplo, ELISA, análisis de unión de radioreceptores, análisis de proximidad de centelleo, análisis de unión a receptores de la superficie celular, análisis de transferencia de energía de fluorescencia, cromatografía líquida, análisis de filtración por membranas, y similares.

Los análisis biofísicos para la medición directa de la unión de TDFRP a los ligandos de unión a TDFRP son, por ejemplo, la resonancia magnética nuclear, la fluorescencia, la polarización de fluorescencia, la resonancia de plasmón superficial (chips BIACOR) y similares. Los ligandos de unión a TDFRP, incluyen, pero no están limitados a, receptores de TDF, anticuerpos anti-TDFRP, lípidos, moléculas pequeñas, y ácidos nucleicos, p. ej., ADN y ARN. La unión específica se determina mediante análisis convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, análisis de unión de radioligandos, ELISA, FRET, inmunoprecipitación, SPR, RMN (RMN 2D), espectroscopía de masas y similares. También se describen en la presente memoria co-cristales de los péptidos TDFRP y ligandos de unión a TDFRP, por ejemplo, pero no limitado a, receptores de TDF, anticuerpos anti-TDFRP, lípidos, moléculas pequeñas, y ácidos nucleicos, p. ej., ADN y ARN, como un método de determinación de las interacciones moleculares. Las condiciones adecuadas para la unión entre el ligando de TDFRP y un compuesto de TDFRP dependerán del compuesto y su ligando y puede ser fácilmente determinadas por un experto normal en la técnica.

C. Medición de la Actividad Biológica de TDFRP

La actividad biológica, a saber, las propiedades agonísticas o antagónicas de polipéptidos de TDF o los compuestos de TDFRP se puede caracterizar usando cualquiera análisis *in vivo* e *in vitro* convencional que haya sido desarrollado para medir la actividad biológica del compuesto de TDFRP o un polipéptido de TDF. Los análisis *in vivo* específicos para someter a ensayo la eficacia de un péptido o análogo, p. ej., TDFRP, en una aplicación para reparar o regenerar hueso, hígado, riñón, o tejido nervioso, tejido periodontal dañados, incluyendo cementum y/o ligamento periodontal, tejidos gastrointestinal y renal, y tejidos dañados por mediación de células inmunitarias se describen en los documentos disponibles al público, que incluyen, por ejemplo, EP 0575,555; WO 93/04692; WO 93/05751; WO/06399; WO 94/03200; WO 94/06449; Y WO 94/06420. El Ejemplo 2 ilustra un análisis funcional *in vitro* para TDF. El Ejemplo 3 ilustra un análisis funcional *in vivo* para TDF.

IV. Animales Transgénicos para TDFRP

5 También se describe en la presente memoria un animal transgénico, p. ej., un mamífero que tiene un ácido nucleico que codifica un compuesto de TDFRP. Las células anfitrionas descritas en la presente memoria también se pueden utilizar para producir animales transgénicos no humanos. Por ejemplo, una célula anfitriona es un ovocito fertilizado o una célula pluripotencial embrionaria en la que se han introducido secuencias que codifican un polipéptido TDFRP. Tales células anfitrionas se pueden utilizar a continuación para crear animales transgénicos no humanos en cuyo genoma se han introducido secuencias de TDFRP exógenas o animales recombinantes homólogos cuyas secuencias de TDFRP endógenas han sido alteradas. Tales animales son útiles para estudiar la función y/o actividad de polipéptidos TDFRP y para identificar y/o evaluar moduladores de la actividad de polipéptidos TDFRP.

15 Un animal transgénico se puede crear introduciendo un ácido nucleico que codifica TDFRP en los pronúcleos masculinos de un ovocito fertilizado (p. ej., mediante microinyección, infección retroviral) y permitiendo que el ovocito se desarrolle en un animal de acogida hembra pseudopreñado. Las secuencias de ADNc de TDFRP se pueden introducir como un transgén en el genoma de un animal no humano. Las secuencias intrónicas y señales de poliadenilación también se pueden incluir en el transgén para aumentar la eficacia de la expresión del transgén. Una o varias secuencias reguladoras específicas de tejido se pueden conectar operablemente al transgén de TDFRP para dirigir la expresión del polipéptido TDFRP a células concretas. Los métodos para generar animales transgénicos mediante la manipulación de embriones y microinyección, particularmente animales tales como ratones, se han convertido en convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.736.866; 4.870.009; y 4.873.191; y Hogan, 1986. En: MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Se utilizan métodos similares para la producción de otros animales transgénicos. Un animal fundador transgénico puede ser identificado basándose en la presencia del transgén de TDFRP en su genoma y/o la expresión del ARNm de TDFRP en los tejidos o células de los animales. Un animal fundador transgénico se puede utilizar a continuación para procrear animales adicionales que portan el transgén. Por otra parte, los animales transgénicos que portan un transgén que codifica el polipéptido TDFRP puede ser cruzado con otros animales transgénicos que portan otros transgenes.

30 En el vector de recombinación homólogo, el gen de TDFRP está flanqueado en sus extremos 5' y 3' por ácido nucleico adicional para permitir que ocurra la recombinación homóloga entre el gen de TDFRP exógeno portado por el vector y un gen endógeno en una célula pluripotencial embrionaria. El ácido nucleico flanqueante adicional tiene una longitud suficiente para una recombinación homóloga satisfactoria con el gen endógeno. Típicamente, están incluidas varias kilobases de ADN flanqueante (tanto en el extremo 5' como en el 3') en el vector. Véase, p. ej., Thomas, et al., 1987. Cell 51: 503 para una descripción de vectores de recombinación homóloga. El vector se introduce luego en una línea de células pluripotenciales embrionarias (p. ej., mediante electroporación) y se seleccionan las células en las que el gen de TDFRP introducido se ha recombinado homológamente con un gen endógeno. Véase, p. ej., Li, et al., 1992. Cell 69: 915.

40 Las células seleccionadas se inyectan a continuación en un blastocisto de un animal (p. ej., un ratón) para formar quimeras de agregación. Véase, p. ej., Bradley, 1987. En: TERATOCARCINOMAS AND EMBRYONIC STEM CELLS: A PRACTICAL APPROACH, Robertson, ed. IRL, Oxford, págs. 113-152. Después se puede implantar un embrión quimérico en un animal de acogida hembra pseudopreñado adecuado y llevar a término el embrión. La progenie que alberga el ADN recombinado de manera homóloga en sus células germinales puede usarse para engendrar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de manera homóloga por transmisión de línea germinal del transgén. Los métodos para construir vectores de recombinación homóloga y animales recombinantes homólogos se describen adicionalmente por Bradley, 1991. Curr. Opin. Biotechnol. 2: 823-829; Publicaciones internacionales PCT Núms.: WO 90/11354; WO 91/01140; WO 92/0968; y WO 93/04169.

50 Se pueden producir animales no humanos transgénicos que contienen sistemas seleccionados que permiten la expresión regulada del transgén de TRFRP. Un ejemplo de tal sistema es el sistema de recombinasa cre/loxP del bacteriófago P1. Para una descripción del sistema de recombinasa cre/loxP, Véase, p. ej., Lakso, et al., 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236. Otro ejemplo de un sistema de recombinasa es el sistema de recombinasa FLP de *Saccharomyces cerevisiae*. Véase, O'Gorman, et al., 1991. Science 251:1351-2085. Si se utiliza un sistema de recombinasa cre/loxP para regular la expresión del transgen, se requieren animales que contienen transgenes que codifican tanto la recombinasa Cre como un polipéptido seleccionado. Tales animales pueden proporcionarse a través de la construcción de animales transgénicos "dobles", p. ej., apareando dos animales transgénicos, uno que contiene un transgén que codifica un polipéptido seleccionado, y el otro que contiene un transgén que codifica una recombinasa.

60 También se pueden producir clones de los animales transgénicos no humanos descritos en la presente memoria de acuerdo con los métodos descritos por Wilmut, et al., 1997. Nature 385: 810-813. En resumen, se puede aislar una célula (p. ej., una célula somática) del animal transgénico e inducir su salida del ciclo de crecimiento y entrada en la fase G0. La célula quiescente puede fusionarse después, p. ej., a través del uso de pulsos eléctricos, a un ovocito

enucleado de un animal de la misma especie de la que se aísla la célula quiescente. El oocito reconstruido se cultiva a continuación de tal manera que se desarrolla hasta una mórula o blastocito y luego se transfiere a un animal de acogida hembra seudopreñado. La descendencia nacida de este animal de acogida hembra será un clon del animal del cual se aísla la célula (p. ej., la célula somática).

5

V. Composiciones farmacéuticas

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican TDFRP, los polipéptidos TDFRP, y los anticuerpos anti-TDFRP (también denominados en la presente memoria como "compuestos activos") de la invención, y los derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos, se pueden incorporar a composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración. Tales composiciones comprenden típicamente la molécula de ácido nucleico, el polipéptido o el anticuerpo y un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en la presente memoria, se pretende que "portador farmacéuticamente aceptable" incluya cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, compuestos antibacterianos y antifúngicos, agentes compuestos isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los portadores adecuados se describen en la edición más reciente de Remington Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia modelo en el campo, que se incorpora a la presente memoria como referencia. Los ejemplos preferidos de tales portadores o diluyentes incluyen, pero no están limitados a, agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y albúmina de suero humano al 5%. También se pueden utilizar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijados. El uso de tales medios y compuestos para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio convencional o compuesto es incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios a las composiciones.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen la administración parenteral, p. ej., intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (p. ej., inhalación), transdérmica (es decir, tópica), transmucosa, y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyectables, solución salina, aceites fijados, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; compuestos antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; compuestos quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y compuestos para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples fabricados de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos compuestos antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir compuestos isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un compuesto que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo (p. ej., un polipéptido TDFRP o un anticuerpo anti-TDFRP) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión alcalino y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado a vacío y liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución filtrada estéril previamente del mismo.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el

compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un portador líquido para su uso como un enjuague bucal, en donde el compuesto en el portador líquido se aplica oralmente y se agita y se expectora o se ingiere. Los compuestos de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales coadyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un compuesto disgregante tal como ácido alginico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un antiapelmazante tal como dióxido de silicio coloidal; un compuesto edulcorante tal como sacarosa o sacarina, o un compuesto aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja .

Para la administración mediante inhalación, los compuestos se suministran en forma de una pulverización de aerosol desde el contenedor o dispensador presurizado que contiene un propelente adecuado, p. ej., un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se utilizan penetrantes apropiados para la barrera que vaya a ser penetrada en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal puede lograrse a través del uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles o cremas, como es generalmente conocido en la técnica.

Los compuestos también se pueden preparar como composiciones farmacéuticas en forma de supositorios (p. ej., con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

En una realización, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de liberación microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etilenoacetato de vinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals Inc. Las suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) también se pueden usar como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria por facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria tal como se utiliza en la presente memoria hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se vaya a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitarias de la invención están dictadas por y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico concreto a conseguir, y las limitaciones inherentes en la técnica de composición de tal compuesto activo para el tratamiento de los individuos.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria se pueden insertar en vectores y usarse como vectores de terapia génica. Los vectores para la terapia génica se puede liberar en un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.328.470) o mediante inyección estereotáctica (véase, p. ej., Chen, et al., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en donde está embebido el vehículo de liberación génica. Alternativamente, cuando el vector de liberación génica completo puede producirse intacto a partir de células recombinantes, p. ej., vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de liberación génica. Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dispensador junto con instrucciones para su administración.

VI. Métodos de Escrutinio y Detección

Los compuestos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para expresar polipéptidos TDFRP (p. ej., a través de un vector de expresión recombinante en una célula anfitriona en aplicaciones de terapia génica), para detectar el ARNm de TDFRP (p. ej., en una muestra biológica) o una lesión genética en un gen de TDFRP, y para modular la actividad de TDFRP, como se describe adicionalmente, a continuación. Además, los polipéptidos TDFRP

se puede utilizar para escrutar fármacos o compuestos que modulan la actividad o expresión del polipéptido de TDF o de TDFRP, así como para tratar trastornos caracterizados por una producción insuficiente o excesiva de polipéptidos de TDF o producción de formas polipeptídicas de TDF que tienen actividad disminuida o aberrante en comparación con polipéptido de TDF de tipo salvaje. Además, los anticuerpos anti-TDFRP se puede utilizar para detectar y aislar polipéptidos de TDF o TDFRP y modular su actividad. Por consiguiente, se puede identificar compuestos novedosos mediante los análisis de selección descritos en la presente memoria y también se pueden identificar los usos de los mismos para los tratamientos descrito, más arriba.

VII. Análisis de Escrutinio

También se describen en la presente memoria métodos para identificar moduladores, es decir, compuestos candidato o de ensayo o compuestos (p. ej., péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otros fármacos) que se unen a TDFRP o polipéptidos de TDF o tienen un efecto estimulador o inhibidor sobre, p. ej., expresión o actividad de TDFRP o un polipéptido de TDF (también denominado en la presente memoria como "análisis de escrutinio").

También se describen en la presente memoria análisis para escrutar compuestos candidato o de ensayo que se unen a o modulan la actividad TDFRP o polipéptidos de TDF o porciones biológicamente activas de los mismos. Los compuestos se pueden obtener usando cualquiera de los numerosos enfoques en los métodos de genotecas combinatorias conocidos en la técnica, incluyendo: genotecas biológicas; genotecas en fase sólida o en fase de disolución paralelas tratables espacialmente, métodos de genotecas sintéticas que requieren desconvolución; el método de genoteca "una cuenta - un compuesto", y métodos de genotecas sintéticas que utilizan la selección mediante cromatografía afinidad. El enfoque de la genoteca biológica se limita a genotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a péptidos, oligómeros no peptídicos o genotecas de moléculas pequeñas de compuestos. Véase, p. ej., Lam, 1997. *Anticancer Drug Design* 12: 145.

Las genotecas de mezclas químicas y/o biológicas, tales como extractos fúngicos, bacterianos, o de algas, son conocidas en la técnica y se pueden escrutar con cualquiera de los análisis descritos, así como los conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de los métodos para la síntesis de genotecas moleculares se pueden encontrar en la bibliografía científica, por ejemplo en: DeWitt, et al., 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6909; Erb, et al., 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422; Zuckermann, et al., 1994. *J. Med. Chem.* 37: 2678; Cho, et al., 1993. *Science* 261: 1303; Carrell, et al., 1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carell, et al., 1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; y Gallop, et al., 1994. *J. Med. Chem.* 37: 1233.

Las genotecas de compuestos pueden presentarse en disolución (p. ej., Houghten, 1992. *Biotechniques* 13: 412-421), o en cuentas (Lam, 1991. *Nature* 354: 82-84), en chips (Fodor, 1993. *Nature* 364: 555-556), bacterias (Ladner, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.223.409 (esporas), Ladner, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.233.409), plásmidos (Cull, et al., 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-1869) o en fagos (Scott y Smith, 1990. *Science* 249: 386-390; Devlin, 1990. *Science* 249: 404-406; Cwirla, et al., 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6378-6382; Felici, 1991. *J. Mol. Biol.* 222: 301-310; Ladner, Patente de los Estados Unidos Núm. 5.233.409).

La determinación de la capacidad de un compuesto para modular la actividad de un polipéptido TDFRP se puede lograr, por ejemplo, mediante la determinación de la capacidad del polipéptido TDFRP para unirse o interactuar con una molécula diana de TDFRP. Una molécula diana es una molécula a la que se une o interactúa un polipéptido TDFRP, por ejemplo, una molécula en la superficie de una célula que expresa un polipéptido que interactúa con TDFRP, una molécula en la superficie de una segunda célula, una molécula en el medio extracelular, una molécula asociada con la superficie interna de una membrana celular o una molécula citoplásmica. Una molécula diana de TDFRP puede ser una molécula distinta de TDFRP o un polipéptido TDFRP o un polipéptido de la invención. En una realización, una molécula diana de TDFRP es un componente de una ruta de transducción de la señal que facilita la transducción de una señal extracelular (p. ej., una señal generada por la unión de un compuesto a una molécula receptora de TDF unida a la membrana) a través de la membrana celular y en la célula. La diana, por ejemplo, puede ser un segundo polipéptido intracelular que tiene actividad catalítica o un polipéptido que facilita la asociación de moléculas de señalización aguas abajo con polipéptido receptor de TDF. Los compuestos suscitan agonismo o antagonismo de tales interacciones y las respuestas biológicas resultantes, medidas mediante los análisis descritos.

Determinación de la capacidad del polipéptido TDFRP para unirse a o interactuar con una molécula diana de TDFRP puede lograrse mediante uno de los métodos descritos anteriormente para determinar la unión directa. La determinación de la capacidad del polipéptido TDFRP para unirse a o interactuar con una molécula diana de TDFRP se puede lograr mediante la determinación de la actividad de la molécula diana. Por ejemplo, la actividad de la molécula diana puede determinarse detectando la inducción de un segundo mensajero celular de la diana (es decir, Ca^{2+} intracelular, diacilglicerol, IP3, etc.), detectando la actividad catalítica/enzimática de la diana y un sustrato apropiado, detectando la inducción de un gen informador (que comprende un elemento regulador sensible a TDFRP conectado operativamente a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, p. ej., luciferasa), o detectando una respuesta celular, por ejemplo, la supervivencia celular, la diferenciación celular, o la proliferación celular.

Tal análisis puede ser un análisis libre de células que comprende poner en contacto polipéptido TDFRP o una porción biológicamente activa del mismo con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto del compuesto de ensayo para unirse al polipéptido TDFRP o una porción de biológicamente activa del mismo. La unión del compuesto de ensayo al polipéptido TDFRP se puede determinar directamente o indirectamente como se ha descrito anteriormente. Tal análisis puede comprender poner en contacto el polipéptido TDFRP o una porción biológicamente activa del mismo con un compuesto conocido que se une a TDFRP para formar una mezcla de análisis, poner en contacto la mezcla de análisis con un compuesto de ensayo, y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para interactuar con un polipéptido TDFRP, en donde la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para interactuar con un polipéptido TDFRP comprende determinar la capacidad del compuesto de ensayo para unirse preferentemente a TDFRP o una porción biológicamente activa del mismo en comparación con el compuesto conocido.

Alternativamente, tal análisis puede ser un análisis libre de células que comprende poner en contacto un polipéptido TDFRP o una porción biológicamente activa o del mismo con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular (p. ej., estimular o inhibir) la actividad de un polipéptido TDFRP o una porción biológicamente activa del mismo. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad de TDFRP se puede lograr, por ejemplo, mediante la determinación de la capacidad del polipéptido TDFRP para unirse a una molécula diana de TDFRP mediante uno de los métodos descritos anteriormente para determinar la unión directa. En una realización alternativa, la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular la actividad del polipéptido TDFRP se puede lograr mediante la determinación de la capacidad del polipéptido TDFRP para modular adicionalmente una molécula diana de TDFRP. Por ejemplo, la actividad catalítica/enzimática de la molécula diana sobre un sustrato apropiado se puede determinar como se describe más arriba.

El análisis libre de células puede comprender poner en contacto polipéptido TDFRP o una porción biológicamente activa del mismo con un compuesto conocido que se une al polipéptido TDFRP para formar una mezcla de análisis, poner en contacto la mezcla de análisis con un compuesto de ensayo, y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para interactuar con un polipéptido TDFRP, en donde la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para interactuar con un polipéptido TDFRP comprende determinar la capacidad del polipéptido TDFRP para unirse preferentemente a o modular la actividad de una molécula diana de TDFRP.

En los métodos de análisis anteriores, puede ser deseable inmovilizar el polipéptido TDFRP o su molécula diana para facilitar la separación de las formas complejadas de las no complejadas de uno o ambos polipéptidos, así como para acomodar la automatización del análisis. La unión de un compuesto de ensayo al polipéptido TDFRP, o la interacción del polipéptido TDFRP con una molécula diana en presencia y ausencia de un compuesto candidato, se puede lograr en cualquier recipiente adecuado para contener los reaccionantes. Los ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. Se puede proporcionar un polipéptido de fusión que añada un dominio que permita que uno o ambos polipéptidos se unan a una matriz. Por ejemplo, los polipéptidos de fusión GST-TDFRP o polipéptidos de fusión GST-diana pueden ser adsorbidos sobre perlas de glutatión-sefarosa (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que a continuación se combinan con el compuesto de ensayo o el compuesto de ensayo y, el polipéptido diana no adsorbido o el polipéptido TDFRP, y la mezcla se incuba en condiciones que conducen a la formación de complejos (p. ej., en condiciones fisiológicas de sal y pH). Después de la incubación, las cuentas o los pocillos de la placa de microtitulación se lavan para eliminar cualquier componente no unido, la matriz inmovilizada en el caso de las cuentas, el complejo determinado directamente o indirectamente, por ejemplo, como se describe más arriba. Alternativamente, los complejos pueden disociarse de la matriz, y se puede determinar el nivel de unión o actividad del polipéptido TDFRP usando técnicas convencionales.

También se pueden usar otras técnicas para inmovilizar polipéptidos sobre matrices en los análisis de escrutinio descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se pueden inmovilizar el polipéptido TDFRP o su molécula diana utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina. Se pueden preparar polipéptido TDFRP o moléculas diana biotiniladas a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) usando mecanismos bien conocidos en la técnica (p. ej., kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.), e inmovilizarse en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, los anticuerpos reactivos con polipéptidos TDFRP o moléculas diana, pero que no interfieren en la unión del polipéptido TDFRP a su molécula diana, se pueden derivatizar a los pocillos de la placa, y atrapar la diana o polipéptido TDFRP no unidos en los pocillos mediante conjugación con el anticuerpo. Los métodos para detectar tales complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados con GST, incluyen la inmunodetección de complejos usando anticuerpos reactivos con el polipéptido TDFRP o la molécula diana, así como análisis con enzimas ligada que dependen de la detección de una actividad enzimática asociada con el polipéptido TDFRP o la molécula diana.

Los moduladores de la expresión del polipéptido TDFRP se pueden identificar en un método en el que una célula se pone en contacto con un compuesto candidato y se determina la expresión del ARNm o el polipéptido TDFRP en la

célula. El nivel de expresión del ARNm o polipéptido TDFRP en presencia del compuesto candidato se compara con el nivel de expresión del ARNm o polipéptido TDFRP en ausencia del compuesto candidato. El compuesto candidato puede identificarse a continuación como un modulador de la expresión del ARNm o polipéptido TDFRP en base a esta comparación. Por ejemplo, cuando la expresión del ARNm o polipéptido TDFRP es mayor (es decir) estadística y significativamente mayor en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un estimulador de la expresión de ARNm o del polipéptido TDFRP. Alternativamente, cuando la expresión del ARNm o del polipéptido TDFRP es menor (estadísticamente y significativamente menor) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un inhibidor de la expresión de ARNm o del polipéptido TDFRP. El nivel de expresión de ARNm o polipéptido TDFRP en las células se puede determinar por métodos descritos en la presente memoria para detectar ARNm o polipéptido TDFRP.

Los polipéptidos TDFRP descritos en la presente memoria se pueden utilizar como "polipéptidos cebo" en un análisis de dos híbridos o un análisis de tres híbrido (véase, *p. ej.*, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.283.317; Zervos, et al., 1993. Cell 72: 223-232; Madura, et al., 1993. J. Biol. Chem. 268: 12046-12054; Bartel, et al., 1993. Biotechniques 14: 920-924; Iwabuchi, et al., 1993. Oncogene 8: 1693-1696; y Brent documento WO 94/10300), para identificar otros polipéptidos que se unen o interaccionan con TDFRP ("polipéptidos de unión a TDFRP" o "TDFRP-BP") y modular la actividad de TDFRP. Tales polipéptidos de unión a TDFRP también es probable que estén involucrados en la propagación de señales por los polipéptidos TDFRP como, por ejemplo, elementos aguas arriba o aguas abajo de la ruta de TDFRP.

El sistema de dos híbridos se basa en la naturaleza modular de la mayoría de los factores de transcripción, que consisten en dominios de unión a ADN y de activación separables. Brevemente, el análisis utiliza dos constructos de ADN diferentes. En un constructo, el gen que codifica TDFRP se fusiona a un gen que codifica el dominio de unión a ADN de un factor de transcripción conocido (*p. ej.*, GAL-4). En el otro constructo, una secuencia de ADN, de una genoteca de secuencias de ADN, que codifica un polipéptido no identificado ("presa" o "muestra") se fusiona a un gen que codifica el dominio de activación del factor de transcripción conocido. Si los polipéptidos "cebo" y "presa" son capaces de interactuar, *in vivo*, formando un complejo dependiente de TDFRP, los dominios de unión a ADN y de activación del factor de transcripción se ponen en estrecha proximidad. Esta proximidad permite la transcripción de un gen informador (*p. ej.*, LacZ) que está conectado operablemente a un sitio regulador de la transcripción sensible al factor de transcripción. La expresión del gen informador se puede detectar y las colonias de células que contienen el factor de transcripción funcional se pueden aislar y utilizar para obtener el gen clonado que codifica el polipéptido que interactúa con TDFRP.

También se describe en la presente memoria el sistema que comprende información estructural relativa a las coordenadas atómicas de TDFRP que se puede conseguir por técnicas biofísicas *p. ej.*, difracción de rayos X. La unión entre un péptido TDFRP y un compuesto puede ser evaluada mediante difracción de rayos X para determinar la estructura cristalina de rayos X de los complejos de TDFRP, *p. ej.*, el complejo de polipéptido diana/fármaco. Alternativamente, se puede utilizar RMN para analizar el cambio en los desplazamientos químicos observados después de que un compuesto se une al polipéptido TDFRP. Dichos enfoques pueden ser utilizados para escrutar compuestos en función de su interacción de unión con el polipéptido TDFRP.

VIII. Análisis de Detección

A. Detección de la Expresión de TDFRP

Un método ilustrativo para detectar la presencia o ausencia de TDFRP en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica de un sujeto de ensayo y poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o un compuesto capaz de detectar el polipéptido TDFRP o el ácido nucleico (*por ejemplo*, ARNm, ADN genómico) que codifica el polipéptido TDFRP de manera que se detecta la presencia de TDFRP en la muestra biológica. Un compuesto para detectar ARNm o ADN genómico de TDFRP es una sonda de ácido nucleico marcada capaz de hibridar con ARNm o ADN genómico de TDFRP. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico de TDFRP completo o una porción del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 5, 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridar específicamente en condiciones restrictivas con ARNm o ADN genómico de TDFRP. Otras sondas adecuadas para su uso en los análisis de diagnóstico de la invención se describen en la presente memoria.

Un ejemplo de un compuesto para la detección de un polipéptido TDFRP es un anticuerpo generado contra los SEQ ID NO: 1-208, capaz de unirse al polipéptido TDFRP, preferiblemente un anticuerpo con una marca detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Se puede utilizar un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (*p. ej.*, Fab o F(ab')₂). Se pretende que el término "marcado", con respecto a la sonda o anticuerpo, incluya el marcaje directo de la sonda o anticuerpo mediante acoplamiento (*es decir*, conectando físicamente) una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como marcaje indirecto de la sonda o anticuerpo mediante reactividad con otro compuesto que está marcado directamente. Los ejemplos del marcaje indirecto incluyen detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y marcaje

terminal de una sonda de ADN con biotina de manera que ésta puede ser detectada con estreptavidina marcada con fluorescencia. Se pretende que el término "muestra biológica" incluya tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Esto es, el método de detección de la invención se puede utilizar para detectar ARNm, polipéptido, o ADN genómico de TDFRP, en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, técnicas *in vitro* para la detección de ARNm de TDFRP incluyen hibridaciones Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de polipéptido TDFRP incluyen análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de ADN genómico de TDFRP incluyen hibridaciones Southern. Además, las técnicas *in vivo* para la detección de polipéptido TDFRP incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo anti-TDFRP marcado. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un sujeto puede detectarse mediante técnicas de formación de imágenes convencionales. En una realización, la muestra biológica contiene moléculas de polipéptido del sujeto de ensayo. Alternativamente, la muestra biológica puede contener moléculas de ARNm del sujeto de ensayo o moléculas de ADN genómico del sujeto de ensayo. Una muestra biológica preferida es una muestra de leucocitos de sangre periférica aislada por medios convencionales de un sujeto.

Los métodos pueden incluir además obtener una muestra de control biológico de un sujeto de control, poner en contacto la muestra de control con un compuesto o compuesto capaz de detectar un polipéptido, ARNm o ADN genómico de TDFRP, de manera que se detecta la presencia de polipéptido, ARNm o ADN genómico de TDFRP en la muestra biológica, y comparar la presencia del polipéptido, ARNm o ADN genómico de TDFRP en la muestra control con la presencia de polipéptido, ARNm o ADN genómico de TDFRP en la muestra de ensayo.

También se contemplan kits para detectar la presencia de TDFRP en una muestra biológica. Por ejemplo, el kit puede comprender: un compuesto marcado o un compuesto capaz de detectar polipéptido o ARNm de TDFRP en una muestra biológica; medios para determinar la cantidad de TDFRP en la muestra; y los medios para comparar la cantidad de TDFRP en la muestra con un patrón. El compuesto o los compuestos se pueden envasar en un recipiente adecuado. El kit puede comprender además instrucciones para usar el kit para detectar el polipéptido o ácido nucleico de TDFRP.

30 **B. Medicina Predictiva**

La invención también se refiere al campo de la medicina predictiva en la que se utilizan análisis de diagnóstico, análisis de pronóstico, farmacogenómica y pruebas clínicas de verificación para fines pronósticos (predictivos) para tratar profilácticamente a un sujeto. Por consiguiente, un aspecto de la invención se refiere a análisis de diagnóstico para la determinación de la expresión de la molécula diana de TDFRP, así como la actividad de la molécula diana de TDFRP, en el contexto de una muestra biológica (p. ej., sangre, suero, células, tejido) para determinar de ese modo si un individuo está aquejado de una enfermedad o trastorno, o está en riesgo de desarrollar un trastorno, asociado con la expresión o actividad aberrantes de la molécula diana de TDFRP.

La invención también proporciona análisis pronósticos (o predictivos) para determinar si un individuo está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la expresión o la actividad de la molécula diana de TDFRP. Tales análisis se pueden utilizar con fines pronósticos o predictivos para tratar de ese modo a un individuo profilácticamente antes del comienzo de un trastorno caracterizado por o asociado con un polipéptido diana de TDFRP. Además, los métodos de la presente invención también se puede usar para evaluar si un individuo expresa una molécula diana de TDFRP o una forma polimorfa del polipéptido diana en los casos en los que un TDFRP de la presente invención tiene una mayor afinidad por la molécula diana de TDFRP para su forma polimorfa (o *viceversa*).

Los niveles de ciertos polipéptidos en un tejido concreto (o en la sangre) de un sujeto pueden ser indicativos de la toxicidad, eficacia, velocidad de aclaramiento o la tasa metabólica de un fármaco dado cuando se administra al sujeto. Los métodos descritos en la presente memoria también se puede utilizar para determinar los niveles de tales polipéptidos en los sujetos para ayudar en la predicción de la respuesta de tales sujetos a estos fármacos. También se describen en la presente memoria los métodos para determina la actividad del polipéptido TDFRP en un individuo para seleccionar de ese modo los compuestos terapéuticos o profilácticos apropiados para ese individuo (referido en la presente memoria como "farmacogenómica"). La farmacogenómica permite la selección de compuestos (p. ej., fármacos) para el tratamiento terapéutico o profiláctico de un individuo basándose en el genotipo del individuo (p. ej., El genotipo del individuo examinado para determinar la capacidad del individuo para responder a un compuesto concreto).

60 **C. Análisis Prognósticos**

La unión de un compuesto de TDFRP a una molécula diana del compuesto de TDFRP, p. ej., un receptor de TDF, se puede utilizar para identificar a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con la expresión o actividad de la molécula diana del compuesto de TDFRP (que se describen más arriba). Alternativamente, se pueden utilizar análisis pronósticos para identificar a un sujeto que tiene o está en riesgo de

desarrollar la enfermedad o trastorno. Por lo tanto, la invención proporciona un método para identificar una enfermedad o trastorno asociados con la expresión o actividad aberrantes de la diana del compuesto de TDFRP en el que se obtiene una muestra de ensayo de un sujeto y se detecta la unión o actividad del compuesto de TDFRP, en donde la presencia de una alteración de la unión o actividad del compuesto de TDFRP es diagnóstico para un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno asociados con la expresión o actividad aberrantes de la diana del compuesto de TDFRP. Según se utiliza en la presente memoria, una "muestra de ensayo" hace referencia a una muestra biológica obtenida de un sujeto de interés. Por ejemplo, una muestra de ensayo puede ser un fluido biológico (p. ej., suero), una muestra celular, o tejido.

Además, los análisis pronósticos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para determinar si se puede administrar a un sujeto un compuesto (p. ej., un agonista, antagonista, peptidomimético, polipéptido, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña, u otro fármaco candidato) para tratar una enfermedad o trastorno asociados con TDF asociado con la expresión o actividad aberrantes de la diana del compuesto de TDFRP. Por ejemplo, tales métodos se pueden utilizar para determinar si un sujeto puede tratarse eficazmente con un compuesto de un trastorno asociado con TDF. De este modo, la invención proporciona métodos para determinar si un sujeto puede tratarse eficazmente con un compuesto para un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrantes de la diana del compuesto de TDFRP en los que se obtiene una muestra de ensayo y se detecta una diana del compuesto de TDFRP usando el compuesto de TDFRP (p. ej., en donde la presencia de la molécula diana del compuesto de TDFRP sirve como diagnóstico para un sujeto al que se puede administrar el compuesto para tratar un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrantes de la molécula diana del compuesto de TDFRP).

El nivel de la molécula diana del compuesto de TDFRP en una muestra de sangre o tejido obtenida de un sujeto se determina y se compara con el nivel encontrado en una muestra de sangre o una muestra del mismo tipo de tejido obtenida de un individuo que está libre de la enfermedad. Una sobreabundancia (o una abundancia menor de la normal) de la molécula diana del compuesto de TDFRP en la muestra obtenida del sujeto que se sospecha que tiene la enfermedad asociada con TDF en comparación con la muestra obtenida del sujeto sano es indicativa de la enfermedad asociada a TDF en el sujeto que está siendo sometido a ensayo. Se pueden requerir exámenes adicionales para realizar un diagnóstico positivo.

Existen diversas enfermedades en las cuales se sabe que el grado de sobreexpresión (o infraexpresión) de ciertas moléculas diana del compuesto de TDFRP, referidas en la presente memoria como "polipéptidos pronósticos", es indicativo de si es probable que el sujeto con la enfermedad responda a un tipo particular de terapia o tratamiento. Por lo tanto, se puede utilizar el método de detección de una molécula diana de un compuesto de TDFRP en una muestra como método de pronóstico, p. ej., para evaluar la probabilidad de que el sujeto responda a la terapia o tratamiento. El nivel de polipéptido pronóstico relevante en una muestra de tejido o sangre adecuada del sujeto se determina y compara con un control adecuado, p. ej., el nivel en los sujetos con la misma enfermedad, pero que han respondido favorablemente al tratamiento. El grado en el que el polipéptido pronóstico está sobreexpresado (o infraexpresado) en la muestra en comparación con el control puede ser predictivo de la probabilidad de que el sujeto no responda favorablemente al tratamiento o terapia. Cuanto mayor es la sobreexpresión (o infraexpresión) con respecto al control, menor es la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento. Hay una serie de enfermedades en las cuales se sabe que el grado de sobreexpresión (o infraexpresión) de los ciertos polipéptidos diana, referidos en la presente memoria como " predictivos polipéptidos", es indicativo de si un sujeto desarrollará una enfermedad.

Por lo tanto, el método de detección de una molécula diana de TDFRP en una muestra se puede utilizar como un método de predicción de si un sujeto va a desarrollar una enfermedad. El nivel del polipéptido predictivo relevante en una muestra de tejido o de sangre adecuada de un sujeto en riesgo de desarrollar la enfermedad se determina y compara con un control adecuado, p. ej., el nivel en sujetos que no están en riesgo de desarrollar la enfermedad. El grado en el que el polipéptido predictivo está sobreexpresado (o infraexpresado) en la muestra en comparación con el control puede ser predictivo de la probabilidad de que el sujeto desarrolle la enfermedad. Cuanto mayor es la sobreexpresión (o infraexpresión) con respecto al control, mayor es la probabilidad de que el sujeto desarrolle la enfermedad.

Los métodos descritos en la presente memoria se puede realizar, por ejemplo, mediante la utilización de kits de diagnóstico pre-ensados que comprenden al menos un reactivo sonda, p. ej., un compuesto de TDFRP descrito en la presente memoria, que puede utilizarse convenientemente, p. ej., en entornos clínicos para el diagnóstico de pacientes que presentan síntomas o antecedentes familiares de una enfermedad o una dolencia que implica una molécula diana de un compuesto de TDFRP. Además, se puede utilizar cualquier tipo de célula o tejido en el que se exprese la diana del compuesto de TDFRP en los análisis pronósticos descritos en la presente memoria.

IX. Métodos de Tratamiento

También se describe en la presente memoria los métodos tanto profilácticos como terapéuticos para tratar a un sujeto en riesgo de (o susceptible a) un trastorno o que tiene un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrantes de una molécula diana del polipéptido de TDF o de TDFRP. Las moléculas diana de TDF y TDFRP, tales como los receptores de TDF, desempeñan un papel en la diferenciación celular. La diferenciación celular es la característica central de la morfogénesis tisular. La morfogénesis tisular es un proceso implicado en los mecanismos de reparación y regeneración de tejidos adultos. El grado de la morfogénesis en los tejidos adultos varía entre los diferentes tejidos y está relacionado, entre otras cosas, con el grado de recambio de las células en un tejido dado.

Las proteínas morfogenéticas óseas son miembros la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta. Ozkaynak et al. (EMBO J. 9: 2085-2093, 1990) purificaron un homólogo de la proteína bovina osteogénica novedoso, que denominaron 'proteína osteogénica-1' (OP-1). Los autores utilizaron secuencias de péptidos para clonar clones genómicos y de ADNc de OP-1 humana, más adelante denominada BMP-7. Los ADNc de BMP-7 pronosticaron un polipéptido de 431 aminoácidos que incluye una secuencia señal secretora. Los TDFRP descritos en la presente memoria son miméticos estructurales de las regiones biológicamente activas de las proteínas morfogénicas óseas, por ejemplo, pero no limitadas a, BMP-7 (OP-1), y péptidos relacionados. Las regiones biológicamente activas incluyen, por ejemplo, regiones dedo 1 y dedo 2 de BMP-7. Groppe et al. (Nature 420: 636-642, 2002) informaron sobre la estructura cristalina del Noggin antagonista (602991) unido a BMP-7.

Por lo tanto, los compuestos de TDFRP son útiles para tratar enfermedades y trastornos que son susceptibles de tratamiento con polipéptidos BMP. Las siguientes referencias describen análisis *in vitro* e *in vivo* para determinar la eficacia de BMP-7 en la profilaxis y el tratamiento de diversos estados de enfermedad; tales análisis son apropiados para determinar la actividad biológica de los compuestos TDFRP descritos en la presente memoria. Como tales, los TDFRP descritos en la presente memoria son útiles para alterar, p. ej., inhibir o acelerar, la capacidad para reparar y regenerar tejidos y órganos enfermos o dañados, así como, para el tratamiento de trastornos asociados con TDF. Las áreas particularmente útiles para las terapias humanas y veterinarias basadas en TDFRP incluyen cirugía reconstructiva, el tratamiento de enfermedades degenerativas de los tejidos, incluyendo, por ejemplo, enfermedad renal, trauma cerebral, accidente cerebrovascular, aterosclerosis, artritis, enfisema, osteoporosis, cardiomiopatía, cirrosis, enfermedades degenerativas nerviosas, enfermedades inflamatorias y cáncer, y en la regeneración de tejidos, órganos y miembros. Los TDFRP descritos en la presente memoria también se puede utilizar para promover o inhibir el crecimiento y la diferenciación de músculo, hueso, piel, tejido epitelial, corazón, nervio, tejido endocrino, vasos, cartílago, tejido periodontal, hígado, tejido retiniano y tejido conectivo, o cualquier tejido en el que se exprese un polipéptido diana de TDFRP funcional. Por consiguiente, las enfermedades asociadas con la expresión aberrante moléculas diana del polipéptido TDF o TDFRP incluyen infecciones virales, cáncer, curación, trastornos neurodegenerativos, p. ej., Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Parkinson, trastornos del sistema inmunitario, y trastornos de los huesos. Por ejemplo, las composiciones terapéuticas basadas en TDFRP son útiles para inducir la curación regenerativa de defectos óseos, tales como fracturas, así como, para preservar o restablecer propiedades metabólicas saludables en el tejido enfermo, p. ej., tejido óseo osteopéxico.

Marker et al. (Genomics 28: 576-580, 1995) estudiaron la distribución de transcritos de BMP-7 en diferentes sitios anatómicos alterados por las mutaciones del síndrome del Holt-Oram (142.900). Encontraron la expresión de BMP-7 en todas las estructuras que están alteradas en los pacientes de Holt-Oram, incluyendo el corazón, extremidades anteriores proximales y distales, clavícula, y escápula, así en como otros tejidos no afectados.

Solursh et al. (Biochem. Biophys. Res. Commun. 218: 438-443, 1996) examinaron la expresión evolutiva y temporal de OP-1 mediante hibridación con las secciones histológicas de embriones de ratas durante un período de 3 días, que comprende las fases de la línea primitiva a las fases tempranas de primordios de las extremidades. La expresión de OP-1 se detectó en el neuroepitelio de la vesícula óptica el día E11.5 y se limitó a la supuesta retina neural y la placoda del cristalino en desarrollo. A partir de E12.5-E13.5, encontraron su expresión en la retina neural, el cristalino y la córnea en desarrollo.

You y Kruse (Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 43: 72-81, 2002) estudiaron la diferenciación de miofibroblastos de la córnea y la transducción de la señal inducida por los miembros de la familia de TGFB activina A y BMP-7. Encontraron que la activina A inducía la fosforilación de SMAD2, y BMP-7 inducía SMAD1, ambos de los cuales fueron inhibidos por folistatina. Las proteínas TGFB tienen diferentes funciones en la córnea.

Los compuestos de TDFRP se pueden utilizar en la profilaxis o el tratamiento de la aterosclerosis coronaria. La inducción de BMP y la subsiguiente inhibición del crecimiento de células de la musculatura lisa vascular y/o la inducción de la formación de hueso vascular pueden contribuir a los mecanismos por los que las estatinas aumentan la estabilidad de la placa en pacientes con aterosclerosis coronaria (Emmanuele et al., Biochem Biophys Res Commun. 2003 Feb 28; 302 (1) :67-72). Además, los estudios realizados por Davies et al., (J Am Soc Nephrol. 2003 Jun; 14 (6) :1559-67) son consistentes con la deficiencia de BMP-7 como factor fisiopatológico en la insuficiencia renal crónica, y demuestran su eficacia como tratamiento potencial de la calcificación vascular.

Los compuestos de TDFRP se pueden utilizar para tratar el cáncer, p. ej., cáncer de mama y cáncer de próstata. Schwalbe et al., (Int J Oncol. 2003 Jul; 23 (1):89-95) analizaron el tejido de mama normal y muestras de tejido tumoral de 170 carcinomas ductales invasivos de la mama por inmunohistoquímica. Se observó expresión de BMP-7 en el tejido normal de mama en las yemas terminales, pero no en el ductus lactíferus. Se detectó proteína BMP-7 en las 170 muestras de tumor. La expresión de BMP-7 fue altamente correlacionada con los niveles del receptor de estrógenos ($p \leq 0,01$) y los niveles del receptor de progesterona ($p \leq 0,01$) que son marcadores importantes para la prognosis y terapia del cáncer de mama. Además, Masuda et al., (Prostate. 2003 Mar 1, 54 (4) :268-74) demostraron una mayor expresión de la proteína morfogenética ósea 7 en el cáncer de próstata con metástasis ósea.

Los compuestos de TDFRP se pueden utilizar para tratar la disfunción y las enfermedades renales, p. ej., obstrucción ureteral, insuficiencia renal aguda y crónica, fibrosis renal, y nefropatía diabética. Klahr J (Nephrol. 2003 Mar-Apr; 16 (2) :179-85) demostró que el tratamiento con BMP-7 redujo significativamente la lesión renal en un modelo de rata de obstrucción ureteral (UUO), cuando el tratamiento se inició en el momento de la lesión. Estudios posteriores sugirieron que el tratamiento con BMP-7 también atenuaba la fibrosis renal cuando se administraba después de haber comenzado la fibrosis renal. También se encontró que este protocolo de tratamiento aumentaba significativamente la función renal a partir de los niveles medidos en el grupo tratado con vehículo. BMP-7 también invirtió parcialmente la nefropatía diabética inducida en ratas por una dosis única de estreptozotocina. Se restauró tasa de filtración glomerular (TFG), disminuyó de la excreción de proteínas, y restauró la histología a la normalidad. Se puede utilizar TDFRP en la profilaxis o tratamiento de enfermedades renales, p. ej., insuficiencia renal crónica. Los estudios realizados por Klahr et al., (Kidney Int Suppl. 2002 May, (80) :23-6) indican que la administración de BMP-7 mantiene y restaura la función y la estructura renales en animales con obstrucción ureteral y nefropatía diabética.

Los compuestos de TDFRP se pueden utilizar en la profilaxis o el tratamiento de la nefropatía diabética. Wang et al., (Kidney Int. 2003 Jun; 63 (6) :2037-49) han demostrado que BMP-7 revertía parcialmente la hipertrofia renal inducida por diabetes, restaurando la GFR, la excreción de albúmina en la orina, y la histología glomerular hacia la normalidad. La restauración de la expresión por BMP-7 se asoció con una reacción de reparación satisfactoria y una inversión de la respuesta a la fatídica lesión.

El TDFRP se puede utilizar en la profilaxis o el tratamiento de la fibrosis renal. Se demostró recientemente que la administración exógena de proteína morfogenética ósea humana recombinante (BMP)-7 mejoraba la fibrosis glomerular e intersticial renal en roedores con enfermedades renales experimentales (Wang y Hirschberg, Am J Physiol Renal Physiol. 2003 May; 284 (5): F1006-13).

Los compuestos de TDFRP se pueden utilizar para facilitar la reparación de tejidos. Grande et al, (J Bone Joint Surg Am 2003; 85-A Suppl 2:111-6) demostraron que la adición del gen de BMP-7 o de Shh mejoró significativamente la calidad del tejido reparado, dando como resultado una superficie mucho más lisa y un cartílago de apariencia más hialino. Hubo, sin embargo, una diferencia notable en la persistencia de la fase de cartílago entre el grupo que recibió el gen Shh y el grupo que recibió el gen BMP-7, pareciendo que el compartimiento de subcondral en el último grupo tenía una remodelación ósea mucho más rápida.

Los compuestos de TDFRP se pueden utilizar en la profilaxis o tratamiento de enfermedades de la cavidad oral, p. ej., que afectan al recubrimiento directo de moléculas bioactivas, o inducción de la formación de dentina reparadora y la mineralización pulpa coronal o radicular (Goldberg et al., Am J Dent. 2003 Feb; 16 (1) :66-76). Además, se puede utilizar TDFRP en la profilaxis o el tratamiento de las enfermedades periodontales. Las lesiones óseas tratadas mediante liberación del gen Ad-BMP-7 demostraron una crondrogenesis rápida, con posterior osteogénesis, cementogénesis y previsible superación de los defectos óseos periodontales. Estos resultados demuestran la evidencia satisfactoria del diseño de tejido periodontal utilizando la transferencia génica ex vivo de las BMP y ofrece un nuevo enfoque para la reparación de defectos periodontales (Jin et al., J Periodontol. 2003 Feb; 74 (2) :202-13).

Se puede utilizar TDFRP en la profilaxis o el tratamiento de la lesión cerebral traumática, p. ej., accidente cerebrovascular, véase, p. ej., Cairns y Finkelstein, Phys Med Clin N Am Rehabil. 2003 Feb; 14 (1 Suppl): S135-42). La administración intravenosa de BMP-7 después de la isquemia mejora la función motora en ratas con accidente cerebrovascular (Chang et al., Stroke. 2003 Feb; 34 (2) :558-64). Además, Chang et al., (Neuropharmacology. 2002 Sep; 43 (3) :418-26) han demostrado que las proteínas morfogenéticas óseas están involucrados en la neuroprotección inducida por trasplante de tejido renal fetal en ratas con accidente cerebrovascular.

La rehabilitación después de la reparación del cartílago a base de células puede ser prolongada, dando lugar a una disminución de la productividad y la calidad de vida del paciente mediante el tratamiento de un sujeto con compuestos de TDFRP. El implante de condrocitos modificados genéticamente que expresan BMP-7 acelera la aparición de tejido de reparación de tipo hialino en los defectos del cartílago experimentales (Hidaka et al., J Res Orthop. 2003 Jul; 21 (4) :573-83).

Los compuestos de TDFRP se pueden utilizar en el diseño de tejido óseo. Lu et al., (Biochem Biophys Res Commun. Jun 2003 13; 305 (4) :882-90) han demostrado la eficacia de una matriz polimérica de BMP en la inducción de la expresión del fenotipo osteoblástico mediante células derivadas de músculo y presentan un nuevo paradigma para el diseño de tejido óseo. Los compuestos de TDFRP se pueden usar en el trasplante de hueso (Rees y Haddad, Hosp. Med 2003 Apr; 64 (4) :205-9). También se puede utilizar TDFRP para promover la curación ósea. Maniscalco et al., (Acta Biomed Ateneo Parmense. 2002; 73 (1-2) :27-33) verifican el potencial terapéutico de esta proteína BMP-7 en fracturas de tibia cerradas recientes, utilizando BMP-7 asociada con la osteosíntesis por medio de un fijador externo monolateral. Además, los compuestos de TDFRP se pueden utilizar en la regeneración de tejido óseo, p. ej., cirugía reconstructiva de la cadera. Cook et al., (Arthroplasty J. 2001 Dec; 16 (8 Supl 1) :88-94) demostraron que el uso de BMP-7 junto con hueso esponjoso triturado y puntales de aloinjerto cortical en modelos preclínicos mejoraban espectacularmente la actividad biológica del injerto, lo daba como resultado una formación de hueso nuevo y una incorporación del injerto mayor y más temprana. El uso clínico de la BMP-7 en los procedimientos reconstructivos de cadera también dio como resultado una formación de hueso nuevo mayor y más temprana en el entorno biológico más difícil en comparación con el aloinjerto hueso de solo.

Los compuestos de TDFRP se pueden utilizar para tratar defectos esqueléticos p. ej., defectos esqueléticos adquiridos y congénitos que derivan de traumas y anomalías del desarrollo, así como de la cirugía ablativa del cáncer. Rutherford et al., (Drug News Perspect. 2003 Jan-Feb; 16 (1):5-10) analizan los últimos avances en la terapia génica con proteína morfogenética ósea 7 *ex vivo* para la regeneración esquelética localizada que aborda estas limitaciones.

Se puede utilizar TDFRP en la profilaxis o el tratamiento de los trastornos de la hematopoyesis. Los estudios realizados por Detmer y Walker (Cytokine. 2002 Jan 7, 17 (1):36-42) indican que las BMP de individuo forman parte del complemento de las citoquinas que regulan el desarrollo de progenitores hematopoyéticos, y en particular apuntan a un papel para BMP-4 en el control de la eritropoyesis definitiva, así como embrionaria.

El TDFRP se puede utilizar en el tratamiento de los trastornos de la reproducción, p. ej., la esterilidad. Zhao et al., (Dev. Biol. 2001 Dic 1, 240 (1):212-22) demostraron que la mutación en BMP-7 exacerba el fenotipo de los mutantes de BMP-8a en la espermatogénesis y el epidídimo. Estos indican que, de forma similar a BMP-8a, BMP-7 juega un papel tanto en el mantenimiento de la espermatogénesis como en la función del epidídimo y sugiere adicionalmente que BMP-8 y BMP-7 señalan a través de los mismos receptores o receptores similares en estos dos sistemas.

X. Enfermedades y Trastornos

Las enfermedades y trastornos que se caracterizan por un aumento (en relación a un sujeto que no padece la enfermedad o trastorno) de los niveles o la actividad biológica de las moléculas diana de los polipéptidos de TDFRP se pueden tratar con compuestos terapéuticos basados en TDFRP que suscitan antagonismo (es decir, reducen o inhiben) sobre la actividad, que se pueden administrar de una manera terapéutica o profiláctica. Los compuestos terapéuticos que se pueden utilizar incluyen, pero no están limitados a: (i) un péptido TDFRP anteriormente mencionado, o análogos, derivados, fragmentos u homólogos del mismo, (ii) anticuerpos anti-TDFRP para un péptido anteriormente mencionado; (iii) ácidos nucleicos que codifican un péptido TDFRP; (iv) administración de ácido nucleico antisentido y ácidos nucleicos que son "disfuncionales" (es decir, debido a una inserción heteróloga dentro de las secuencias codificantes de las secuencias codificantes para un péptido TDFRP) que se utilizan para "desactivar" la función endógena del péptido TDFRP por recombinación homóloga (véase, p. ej., Capecchi, 1989. Science 244: 1288-1292); o (v) moduladores (es decir, Inhibidores, agonistas y antagonistas, incluyendo miméticos de péptidos adicionales de la invención o anticuerpos específicos para un péptido de la invención) que alteran la interacción entre un péptido antes mencionado y su compañero de unión.

Las enfermedades y trastornos que se caracterizan por una disminución (con respecto a un sujeto que no padece la enfermedad o trastorno) de los niveles o actividad biológica de una molécula diana de TDF o TDFRP se pueden tratar con compuestos terapéuticos basados en TDFRP que aumentan (es decir, son agonistas de) la actividad de TDF. Los agentes terapéuticos que regulan al alza la actividad se pueden administrar de una manera terapéutica o profiláctica. Los agentes terapéuticos que se pueden utilizar incluyen, pero no están limitados a, péptido TDFRP, o análogos, derivados, fragmentos u homólogos del mismo; o un agonista que aumenta la biodisponibilidad.

El aumento o disminución de los niveles se pueden detectar fácilmente mediante la cuantificación de los péptidos y/o ARN inducidos por TDF, obteniendo una muestra de tejido del paciente (p. ej., a partir de biopsia de tejido) y analizándola *in vitro* para determinar los niveles de ARN o péptido, la estructura y/o actividad de los péptidos expresados (o los ARNm de un péptido mencionado anteriormente). Los métodos que son bien conocidos en la técnica incluyen, pero no están limitados a, inmunoanálisis (p. ej., mediante análisis de transferencia Western, inmunoprecipitación seguida de electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico (SDS), inmunocitoquímica, etc.) y/o análisis de hibridación para detectar la expresión de los ARNm (p. ej., análisis Northern, transferencias puntuales, hibridación *in situ*, y similares).

A. Métodos Profilácticos

También se describe en la presente memoria un método para prevenir, en un sujeto, una enfermedad o afección asociada con la expresión o actividad aberrante de una molécula diana del polipéptido de TDF o TDFRP, mediante la administración al sujeto de TDFRP o un mimético de TDFRP que modula la expresión de una molécula diana del polipéptido de TDF o TDFRP o al menos una actividad de la molécula diana del polipéptido de TDF o TDFRP.

Los sujetos en riesgo de una enfermedad que está causada o a la que contribuye la expresión o actividad aberrante de una molécula diana del polipéptido de TDF o TDFRP se puede identificar, por ejemplo, mediante cualquiera o una combinación de análisis de diagnóstico o pronóstico como los descritos en la presente memoria. La administración de un compuesto profiláctico se puede producir antes de la manifestación de los síntomas característicos de la aberración, de manera que una enfermedad o trastorno se evita o, alternativamente, se retrasa su progreso. Dependiendo del tipo de aberración, por ejemplo, se puede utilizar un TDFRP, mimético TDFRP, o anticuerpo anti-TDFRP, que actúa como un compuesto agonista de TDF o antagonista de TDF para tratar al sujeto. El compuesto apropiado puede determinarse basándose en los análisis de escrutinio descritos en la presente memoria.

B. Métodos Terapéuticos

También se describen en la presente memoria métodos de modulación de la expresión o la actividad de una molécula diana de polipéptidos de TDF o TDFRP en un sujeto con fines terapéuticos. El método modulador implica poner en contacto una célula con un compuesto descrito en la presente memoria, que modula una o más de las actividades de la actividad de una molécula diana de un polipéptido de TDF o TDFRP asociada con la célula. Un compuesto que modula una actividad de una molécula diana de un polipéptido de TDF o TDFRP se describe en la presente memoria, tal como un ácido nucleico o un polipéptido, un ligando cognado de origen natural de un polipéptido TDFRP, un péptido TDFRP, un anticuerpo anti-TDFRP, un mimético de TDFRP, o una molécula pequeña. El compuesto puede estimular una o más actividades de una molécula diana de un polipéptido de TDF o TDFRP. Los ejemplos de tales compuestos estimuladores incluyen un polipéptido TDFRP y una molécula de ácido nucleico que codifica TDFRP que se ha introducido en la célula. Alternativamente, el compuesto puede inhibir una o más actividades de una molécula diana de un polipéptido de TDF o TDFRP, p. ej., anticuerpos anti-TDFRP. Estos métodos moduladores se pueden realizar *in vitro* (por ejemplo, cultivando la célula con el compuesto) o, alternativamente, *in vivo* (p. ej., administrando el compuesto a un sujeto). Los métodos de tratamiento de un individuo aquejado de una enfermedad o trastorno asociados a TDF caracterizados por la expresión o la actividad aberrante de una molécula diana de un polipéptido de TDF o TDFRP o moléculas de ácidos nucleicos que los codifican por consiguiente se describen en la presente memoria. El método puede implicar la administración de un compuesto (p. ej., un compuesto identificado por un análisis de escrutinio descrito en la presente memoria), o una combinación de compuestos que modula (p. ej., regula al alza o regula a la baja) la expresión o la actividad de una molécula diana de un polipéptido de TDF o TDFRP. Alternativamente, el método puede implicar la administración de un polipéptido TDFRP una molécula de ácido nucleico que codifica TDFRP como terapia para compensar la expresión o actividad reducida o aberrante de una molécula diana del polipéptido TDF o TDFRP.

La estimulación de la actividad de una molécula diana de un polipéptido de TDF o TDFRP es deseable en situaciones en las que molécula diana del polipéptido de TDF o TDFRP es anormalmente regulada a la baja y/o en las que es probable que el aumento de actividad de TDF tenga un efecto beneficioso. Un ejemplo de tal situación es aquella en la que un sujeto tiene un trastorno caracterizado por la proliferación y/o diferenciación celular aberrante (p. ej., fibrosis).

C. Determinación del efecto biológico de los agentes terapéuticos basados en TDFRP

Se realizan análisis *in vitro* o *in vivo* adecuados para determinar el efecto de un agente terapéutico basado en TDFRP específico y si su administración está indicada para el tratamiento del tejido afectado en un sujeto.

Se pueden realizar análisis *in vitro* con células representativas del tipo o los tipos implicados en el trastorno del paciente, para determinar si un agente terapéutico basado en TDFRP dado ejerce el efecto deseado sobre el tipo o los tipos de células. Los compuestos para su uso en la terapia se pueden someter a ensayo en sistemas de modelos animales adecuados que incluyen, pero no están limitados a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, y similares, antes de someterlos a ensayo en sujetos humanos. De un modo similar, para los ensayos *in vivo*, se puede utilizar cualquiera de los sistemas de modelos animales conocidos en la técnica antes de la administración a sujetos humanos.

D. Usos profilácticos y terapéuticos de las composiciones descritas en la presente memoria

Los compuestos de TDFRP descritos en la presente memoria son útiles en las potenciales aplicaciones terapéuticas y profilácticas implicadas en una variedad de trastornos en un sujeto, incluyendo, pero no limitados a: los que implica el desarrollo, la diferenciación y la activación de las células óseas; en enfermedades o patologías de las células en la circulación sanguínea tales como glóbulos rojos y plaquetas; diversos trastornos y/o patologías inmunológicos; enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias; enfermedades cardiovasculares; enfermedades metabólicas; enfermedades reproductivas, enfermedades renales, diabetes, traumatismo cerebral, crecimiento y metástasis del cáncer; infecciones virales, terapia del cáncer, enfermedades periodontales; regeneración de tejidos; leucemia linfoblástica aguda; gliomas; enfermedades neurológicas; trastornos neurodegenerativos; enfermedad de Alzheimer; trastorno de Parkinson; y trastornos hematopoyéticos, véase también, más abajo, Métodos de Tratamiento.

Como ejemplo, un ADNc que codifica compuesto del polipéptido TDFRP puede ser útil en la terapia génica, y el polipéptido puede ser útil cuando se administra a un sujeto que lo necesita. A modo de ejemplo no limitante, las composiciones descritas en la presente memoria tendrán eficacia para el tratamiento de pacientes que sufren de los trastornos mencionados anteriormente.

Tanto el ácido nucleico novedoso que codifica el polipéptido TDFRP, como el compuesto del polipéptido TDFRP, o los fragmentos de los mismos, también pueden ser útiles en aplicaciones de diagnóstico. Un uso adicional es como molécula anti-bacteriana (es decir, se ha encontrado que algunos péptidos poseen propiedades anti-bacterianas). Estos materiales son además útiles en la generación de anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a las sustancias novedosas de la invención para su uso en métodos terapéuticos o de diagnóstico en los que un polipéptido de la superfamilia de TGF-beta es sobreexpresado o infraexpresado en un sujeto.

EJEMPLOS

Se pretende que los siguientes ejemplos sean ilustraciones no limitantes de ciertas realizaciones de la presente invención.

Ejemplo 1 Sistemas y Métodos para el Diseño Racional de Fármacos Basado en la Estructura

Los compuestos de TDFRP descritos anteriormente son miméticos estructurales de las proteínas morfogénicas óseas, por ejemplo, pero no limitadas a BMP-7 (OP-1) y BMP-2, más concretamente miméticos estructurales de las regiones biológicamente activas de estas proteínas (p. ej., dedo 1, dedo 2 y similares). Para obtener una descripción de las condiciones de cristalización, los métodos para la obtención y la interpretación de las estructuras cristalinas resultantes, y los debates sobre las regiones biológicamente activas de estas proteínas en base a modelos estructurales, véanse, Griffith et al, Proc Natl Acad Sci USA Jan 23 1996 A.; 93 (2):878-83 y Scheufler et al., J Mol Biol. 1999 Mar 19; 287 (1):103-15.

Los presentes compuestos de TDFRP fueron diseñados y perfeccionados, en parte, sobre la base de modelos estructurales tales como la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear, y las siguientes referencias son modelos apropiados para la cristalización, la preparación y el análisis estructural de los compuestos de TDFRP descritos en la presente memoria. Los métodos de diseño de fármacos basados en la estructura utilizando polipéptidos cristalinos se describen en al menos las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.329.184 y 6.403.330 ambas de Uppenberg. Los métodos para el uso de topografía y difracción de rayos X para mejorar el crecimiento de los cristales de proteína se describen en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.468.346 de Amowitz, et al. Los métodos y aparatos para la selección automática de reflexiones de Bragg, y los sistemas para la determinación automática de la orientación cristalográfica se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.198.796 de Yokoyama, et al. Los métodos para la preparación y el marcaje de proteínas para RMN con ^{13}C , ^{15}N , y ^2H para las determinaciones estructurales se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.376.253 de Anderson, et al. La espectroscopía de RMN de proteínas grandes o complejas se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.198.281 de Wand, et al. El uso de resonancia magnética nuclear para diseñar ligandos para biomoléculas diana se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.989.827 de Fesik, et al.

El procedimiento de diseño racional de fármacos de miméticos de proteínas morfogenéticas óseas con resonancia magnética nuclear incluye las etapas de identificación de un compuesto de TDFRP candidato que es un ligando potencial de la molécula diana (tal como un receptor de TDF) utilizando espectroscopia de RMN con correlación $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ de dos dimensiones; b) formación de un complejo binario mediante la unión del compuesto de TDFRP candidato a la molécula diana, c) determinación de la estructura tridimensional del complejo binario y de este modo la orientación espacial del compuesto TDFRP candidato sobre la molécula diana. El procedimiento de diseño racional de fármacos de miméticos de proteínas morfogenéticas óseas con cristalografía de rayos X se lleva a cabo de una manera similar, pero primero se obtienen los datos estructurales formando cristales del compuesto de TDFRP candidato que es un ligando potencial de la molécula diana (o co-cristales del complejo), y obteniendo un conjunto de datos de las reflexiones atómicas después de la irradiación con rayos x. Estos mecanismos son conocidos por los expertos en la técnica a la vista de las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria.

A continuación se realizan perfeccionamientos del compuesto de TDFRP candidato para aumentar la afinidad del compuesto de TDFRP candidato para la molécula diana. Los perfeccionamientos incluyen forzar y ciclar el compuesto de TDFRP o la incorporación de aminoácidos no clásicos que inducen restricciones conformacionales. Se pueden preparar sintéticamente un compuesto de TDFRP forzado, ciclado o al que se ha conferido rigidez, con la condición de que en al menos dos posiciones de la secuencia del compuesto de TDFRP, se inserta un aminoácido o un análogo de aminoácido que proporciona un grupo funcional químico capaz de entrecruzarse para forzar, ciclar o conferir rigidez al compuesto de TDFRP después del tratamiento para formar el entrecruzamiento. La ciclación se favorecerá cuando se incorpore un aminoácido inductor de giro. Los ejemplos de aminoácidos capaces de entrecruzar un compuesto de TDFRP son la cisteína para formar disulfuros, el ácido aspártico para formar una lactona o una lactama, y un agente quelante tal como ácido gamma-carboxil-glutámico (Gla) (Bachem) para quelar un metal de transición y formar un entrecruzamiento. Se puede preparar ácido gamma-carboxil-glutámico protegido mediante la modificación de la síntesis descrita por Zee-Cheng y Olson (Biophys. Biochem. Res. Commun., 94:1128-1132 (1980)). Un compuesto de TDFRP en el que la secuencia peptídica comprende al menos dos aminoácidos susceptibles de entrecruzamiento puede ser tratado p. ej., mediante oxidación de los residuos de cisteína para formar un disulfuro o mediante la adición de un ión metálico para formar un quelato, con el fin de entrecruzar el péptido y formar un compuesto de TDFRP forzado, cíclico o al que se ha conferido rigidez.

La presente invención proporciona estrategias para preparar sistemáticamente entrecruzamientos. Por ejemplo, si se incorporan cuatro residuos de cisteína a la secuencia peptídica, se pueden utilizar diferentes grupos protectores (véase, Hiskey, in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 3, Gross and Meienhofer, eds., Academic Press: Nueva York, págs. 137-167 (1981); Ponsanti et al., *Tetrahedron*, 46:8255-8266 (1990)). El primer par de cisteínas se puede desproteger y oxidar, a continuación se puede desproteger y oxidar el segundo conjunto. De este modo se puede formar un conjunto definido de entrecruzamientos de disulfuro. Alternativamente, se pueden incorporar un par de cisteínas y un par de análogos de aminoácidos quelantes de manera que los entrecruzamientos tengan diferente naturaliza química.

Se pueden incorporar aminoácidos no clásicos al compuesto de TDFRP con el fin de introducir motivos conformacionales concretos, por ejemplo, pero no limitados a 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxilato (Kazmierski et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 113:2275-2283 (1991)); (2S,3S)-metil-fenilalanina, (2S,3R)-metilfenilalanina, (2R,3S)-metil-fenilalanina y (2R,3R)-metil-fenilalanina (Kazmierski y Hruby, *Tetrahedron Lett.* (1991)); ácido 2-aminotetrahidronaftaleno-2-carboxílico (Landis, Ph.D. Thesis, University of Arizona (1989)); hidroxil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxilato (Miiake et al., *J. Takeda Res. Labs*, 43:53-76 (1989)); beta-carbolina (D y L) (Kazmierski, Ph. D. Thesis, University of Arizona (1988)); HIC (ácido histidinisoquinolincarboxílico) (Zechel et al., *Int. J. Pep. Protein Res.*, 43 (1991)); y HIC (histidina cíclica urea). Se pueden incorporar análogos de aminoácidos y peptidomiméticos a un péptido para inducir o favorecer estructuras secundarias específicas, que incluyen, pero no están limitadas a: LL-Acp (ácido LL-3-amino-2-propenidona-6-carboxílico), un análogo dipeptídico inductor de giro beta (Kemp et al., *J. Org. Chem.* 50:5834-5838 (1985)); análogos inductores de lámina beta (Kemp et al., *Tetrahedron Lett.* 29:5081-5082 (1988)); análogos que incluyen giro beta (Kemp et al., *Tetrahedron Lett.*, 29:5057-5060 (1988)); análogos inductores de hélice (Kemp et al., *Tetrahedron Lett.*, 29:4935-4938 (1988)); análogos inductores de giro gamma (Kemp et al., *J. Org. Chem.* 54:109:115 (1989)); y análogos proporcionados por las siguientes referencias: Nagai and Sato, *Tetrahedron Lett.*, 26:647;14 650 (1985); DiMaio et al., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. p.* 1687 (1989); también un análogo de giro Gli-Ala (Kahn et al., *Tetrahedron Lett.*, 30:2317 (1989)); isómeros para el enlace amida (Jones et al., *Tetrahedron Lett.*, 29:3853-3856 (1988)) tretazol (Zabrocki et al., *J. Am. Chem. Soc.* 110:5875-5880 (1988)); DTC (Samanen et al., *Int. J. Protein Pep. Res.*, 35:501-509 (1990)); y análogos ilustrados en Olson et al., *J. Am. Chem. Sci.*, 112:323-333 (1990) y Garvei et al., *J. Org. Chem.*, 56:436 (1990). Los miméticos restringidos conformacionalmente de giros beta y protuberancias beta, y los péptidos que los contienen, se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.440.013, expedida el 8 de Agosto de 1995 a Kahn.

Una vez que se ha determinado la estructura tridimensional de un compuesto de TDFRP (o un perfeccionamiento de la misma), se puede examinar su potencial terapéutico (como antagonista o agonista) a través del uso del modelado por ordenador utilizando un programa de conexión tal como GRAM, DOCK, o AUTODOCK. Los programas informáticos que se pueden utilizar para resolver la estructura tridimensional del compuesto de TDFRP y sus complejos de unión incluyen QUANTA, CHARMM, INSIGHT, SYBYL, MACROMODE, e ICM, MOLMOL, RASMOL, y GRASP (Kraulis, *J. Appl. Crystallogr.* 24:946-950 (1991)). La mayoría de estos programas, si no todos y también otros también se pueden obtener de la Red en el Ámbito Mundial a través de Internet. El diseño racional de los compuestos de TDFRP puede incluir el ajuste computarizado de agentes potenciales al compuesto de TDFRP para averiguar en qué medida complementará o interferirá la forma y la estructura química del compuesto de TDFRP modificado la interacción entre el compuesto de TDFRP y su ligando. También se pueden emplear programas informáticos para estimar la atracción, la repulsión, y el impedimento estérico del compuesto de TDFRP terapéutico potencial con respecto al sitio de unión a TDFRP, por ejemplo. Generalmente cuanto más estrecho sea el ajuste (p. ej. a menor impedimento estérico, y/o mayor fuerza de atracción) más potente será el compuesto de TDFRP terapéutico potencial, puesto que estas propiedades son coherentes con una restricción de unión más estrecha. Además, a mayor especificidad en el diseño del compuesto de TDFRP más probable será que no interfiera con los TDFRP relacionados (p. ej., su especificidad para los receptores ALK3 pero no para los receptores ALK6 o viceversa). Esto

minimizará los efectos secundarios potenciales debidos a interacciones no deseadas con otras dianas. Por ejemplo, los receptores ALK3 son más prevalentes en tejido renal, mientras los receptores ALK6 son más prevalentes en tejido óseo; la proteína BMP-7 nativa se une a ALK6 con una afinidad mayor, y un efecto secundario potencial de la terapia con BMP-7 en las enfermedades renales es la osteogénesis. Los compuestos de TDFRP se pueden seleccionar y diseñar para incrementar la especificidad para los receptores ALK3 y disminuir la afinidad para los receptores ALK6, reduciendo de ese modo la osteogénesis no deseable en un sujeto que está siendo tratado de trastornos renales.

Inicialmente se puede obtener un compuesto de TDFRP terapéutico potencial escrutando una genoteca de péptidos al azar producida por medio de bacteriófagos recombinantes por ejemplo, (Scott and Smith, Science, 249:386-390 (1990); Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:6378-6382 (1990); Devlin et al., Science, 249:404-406 (1990)) o una biblioteca química. Un compuesto de TDFRP terapéutico candidato seleccionado de este manera se modifica a continuación sistémicamente por medio de programas de modelado por ordenador hasta que se identifican uno o más compuestos de TDFRP terapéuticos potenciales prometedores. Se ha demostrado que dicho análisis es eficaz para el desarrollo de inhibidores de la proteasa de VIH (Lam et al., Science 263:380-384 (1994); Wlodawer et al., Ann. Rev. Biochem. 62:543-585 (1993); Appelt, Perspectives in Drug Discovery and Design 1:23-48 (1993); Erickson, Perspectives in Drug Discovery and Design 1:109-128 (1993)). Se puede encontrar un método informatizado para clasificar y producir análogos de TDF-1, en la Publicación PCT WO/02/37313 de Keck, y es directamente relevante para la selección de compuesto de TDFRP como se describe en la presente memoria.

Dicho modelado por ordenador permite la selección de un número finito de modificaciones químicas racionales, en oposición al incontable número de modificaciones químicas esencialmente al azar que se podrían realizar, de las cuales cualquiera podría conducir a un fármaco útil. Cada modificación química requiere etapas químicas adicionales, que si bien son razonables para la síntesis de un número finito de compuestos, rápidamente se vuelven abrumadoras si fuera necesario sintetizar todas las posibles modificaciones. De este modo, por medio del uso del análisis estructural tridimensional descrito en la presente memoria y el modelado por ordenador, se puede escrutar rápidamente un gran número de estos compuestos de TDFRP candidato, y se pueden determinar unos pocos compuestos de TDFRP candidato probables sin la síntesis laboriosa de un número incalculable de compuestos de TDFRP.

Los compuestos de TDFRP terapéuticos candidato se pueden someter a ensayo a continuación en cualquier análisis de unión convencional (incluyendo análisis de unión de alto rendimiento) para determinar su capacidad para unirse a un TDFRP o un fragmento del mismo. Alternativamente se puede someter a ensayo el fármaco potencial para determinar su capacidad para modular (ya sea inhibir o estimular) la actividad biológica de un TDFRP. Cuando se identifica un fármaco potencial adecuado, se puede llevar a cabo opcionalmente un segundo análisis estructural del complejo de unión formado entre el ligando y el compuesto de TDFRP terapéutico candidato. Para todos los análisis de escrutinio descritos en la presente memoria generalmente serán necesarios perfeccionamientos adicionales de la estructura del compuesto terapéutico de TDFRP candidato y se pueden realizar mediante repeticiones sucesivas de cualquiera y/o todas las etapas proporcionadas por el análisis de escrutinio de fármaco concreto, incluyendo el análisis estructural adicional mediante cristalografía de rayos X o RMN, por ejemplo.

Ejemplo 2 Análisis In Vitro de la Actividad Biológica

A. Análisis de Unión de Radioligandos a Receptores para ALK-3, ALK-6 y BMPR-2:

Protocolo General: Estos análisis están basados en la competición entre TDF-1 (BMP-7 o OP-1) marcado con ¹²⁵I y compuestos de TDFRP candidato o TDF-1 no marcado para determinar la unión a sus respectivos receptores (ALK-3, ALK-6 o BMPR-2). En resumen, el procedimiento implica la inmovilización del receptor sobre placas Removawell de 96 pocillos, el bloqueo de los pocillos con BSA al 3% en PBS y el posterior lavado de los pocillos. A continuación se añaden cantidades crecientes de TDF-1 no marcado o compuestos de TDFRP o control (TDF-1 no marcado) preparados en tampón de unión. Incubar la placa durante 1 hora a temperatura ambiente, y después añadir cantidades fijas de TDF-1 marcado con ¹²⁵I (250.000 a 350.000 cpm) a los pocillos e incubar adicionalmente en frío (4°C) durante 20 horas. Aspirar el contenido de los pocillos y lavar los pocillos cuatro veces con un tampón de lavado, y contar el TDF-1 marcado con ¹²⁵I unido al receptor en un contador automático.

B. Cultivo de Células HK-2 y Determinación de la Producción de Citoquinas

Se cultivaron células HK-2 (Human Kidney-2) derivadas de PTEC inmortalizadas (ATCC número CRL-2190) en medio de queratinocitos sin suero (GIBCO número 17005-042) con un suplemento de factor de crecimiento epidérmico (EGF: 5 ng/mL) y extracto de pituitaria bovina (40 ug/mL) durante 48 horas como se ha descrito previamente (Ryan et al (1994) Kidney International 45:48-57). Las células se transfirieron a placas de 24 pocillos a una densidad de 3x10⁵ células por pocillo. Al cabo de 24 horas, las células se incubaron con medio de nueva aportación que contenía TNF-alfa (5 ng/mL) durante 20 horas. Los controles recibieron medio solo. A continuación las células se lavaron dos veces con medio de cultivo de nueva aportación y se incubaron adicionalmente con medio

de cultivo solo (control con medio, y pocillos de control con TNF) o TDF-1 a tres concentraciones diferentes (40, 200 o 1000 ng/mL) o compuestos de TDFRP a tres concentraciones diferentes (4, 20 o 100 μ M) durante sesenta horas. Durante la incubación, las células se mantuvieron en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5% a 37°C. Al final de la incubación, los medios se retiraron y se almacenaron congelados hasta su análisis. Las concentraciones de IL-6 y sICAM en sobrenadantes de cultivo se midieron mediante un ELISA específico.

C. ELISA para IL-6

Diluir el anticuerpo de captura a la concentración de trabajo en PBS, pH 7,4 sin proteína portadora. Añadir 61 μ L de anticuerpo de partida (360 μ g/mL) a 10,939 mL de PBS, someter a vórtice suavemente. Inmediatamente recubrir una microplaca de 96 pocillos (Immulon 4 HBX) con 100 μ L por pocillo del anticuerpo de captura diluido. Sellar la placa e incubar durante la noche en frío (4°C). (PBS: Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4, filtrado a 0,2 μ m). Al día siguiente vaciar los pocillos y lavar los pocillos tres veces, cada vez con 340 μ L de tampón de lavado por pocillo. (Tampón de lavado: PBS, pH 7,4 que contenía Tween-20 al 0,05%).

Preparar el tampón de bloqueo, 35 mL por placa. Para preparar el tampón de bloqueo, añadir 0,35 gramos de BSA y 1,75 gramos de sacarosa a 35 mL de PBS, pH 7,4, y mezclar suavemente el contenido. Añadir 300 μ L de tampón de bloqueo a cada pocillo y se incuba la placa durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente. Vaciar los pocillos y lavar los pocillos tres veces, cada vez con 340 μ L de tampón de lavado por pocillo.

Preparar una curva normalizada de 8 puntos usando diluciones seriadas a la mitad en diluyente reactivo. Diluir el patrón de partida, IL-6 recombinante, 70 ng/mL a una concentración inicial de 2400 ng/mL en diluyente reactivo. A continuación diluir aún más el patrón hasta un rango de trabajo, 1200, 600, 300, 150, 75, 37,5, 18,75 y 9,375 ng/mL con un diluyente reactivo (para preparar el diluyente reactivo, añadir 0,4 gramos de BSA a 40 mL de PBS, pH 7,4 y someter a vórtice suavemente). Diluir también 24 μ L de cada medio de muestra (de cultivos de células HK-2) con 376 μ L de diluyente reactivo. Añadir 100 μ L de patrón o muestra por pocillo, sellar la placa e incubar durante la noche en frío (4°C).

Al día siguiente, vaciar los pocillos y lavar tres veces, cada vez con 340 μ L de tampón de lavado por pocillo. Preparar la dilución de trabajo del anticuerpo de detección, 11 mL por placa en diluyente reactivo. Añadir 61 μ L de anticuerpo de detección de partida (0,1-10 μ g / mL) a 10,939 mL en diluyente reactivo y someter a vórtice suavemente. Añadir 100 μ L de la dilución de trabajo de anticuerpo de detección a cada pocillo. Sellar la placa e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente. Vaciar los pocillos y lavar los pocillos tres veces, cada vez con 340 μ L de tampón de lavado por pocillo.

Preparar la dilución de trabajo de estreptavidina-HRP, 11 mL por placa en diluyente reactivo. Añadir 55 μ L de la solución de partida (Núm. 890803, R&D Systems) a 10,945 mL de diluyente reactivo y someter a vórtice suavemente. Añadir 100 μ L de la dilución de trabajo de estreptavidina-HRP a cada pocillo. Sellar la placa e incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Evitar colocar la placa a la luz directa. Vaciar los pocillos y lavar los pocillos tres veces, utilizando cada vez 340 μ L de tampón de lavado por pocillo. Preparar la solución de sustrato de nueva aportación de 11 mL por placa. Mezclar 5,5 mL de reactivo colorante A (H₂O₂) y 5,5 mL de reactivo colorante B (Tetrametilbenzidina) (Núm. DY999, R&D Systems). Añadir 100 μ L de solución de sustrato a cada pocillo. Cubrir la placa e incubarla durante 20 minutos a temperatura ambiente. Evitar colocar la placa a la luz directa. Añadir 50 μ L de solución de parada (H₂SO₄ 2 N) a cada pocillo. Se requieren 6 mL de solución de partida por placa. Golpear suavemente la placa para asegurar una buena mezcla. Determinar la densidad óptica de cada pocillo inmediatamente usando un lector de microplacas (Dynex Revelation 4.22) ajustado a 450 nm y una corrección de longitud de onda a 550 nm.

D. ELISA para ICAM-1

Diluir el anticuerpo de captura a la concentración de trabajo en PBS, pH 7,4 sin proteína portadora. Añadir 61 μ L de anticuerpo de partida (720 μ g/mL) a 10,939 mL de PBS, someter suavemente a vórtice. Inmediatamente recubrir una microplaca de 96 pocillos (Immulon 4 HBX) con 100 μ L por pocillo de anticuerpo de captura diluido. Sellar la placa e incubar durante la noche en frío (4°C). (PBS: Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4, filtrado a 0,2 μ m).

Al día siguiente, vaciar los pocillos y lavar los pocillos tres veces, cada vez con 340 μ L de tampón de lavado por pocillo (tampón de lavado: PBS, pH 7,4 que contiene Tween-20 al 0,05%). Preparar el tampón de bloqueo, 35 mL por placa. Para preparar el tampón de bloqueo, añadir 0,35 gramos de BSA y 1,75 gramos de sacarosa a 35 mL de PBS, pH 7,4, y mezclar suavemente el contenido. Añadir 300 μ L de tampón de bloqueo a cada pocillo e incubar la placa durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente. Vaciar los pocillos y lavar los pocillos tres veces, cada vez con 340 μ L de tampón de lavado por pocillo.

- Preparar una curva normalizada de 8 puntos utilizando diluciones seriadas a la mitad en diluyente reactivo. Diluir el patrón de partida, sICAM-1 recombinante, 55 ng/mL a una concentración inicial de 2000 ng/mL en diluyente reactivo. A continuación diluir adicionalmente el patrón hasta un rango de trabajo, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625 y 7,813 ng/mL con un diluyente reactivo (para preparar diluyente reactivo, añadir 0,4 gramos de BSA a 40 mL de PBS, pH 7,4 y someter suavemente a vórtice). También diluir 160 uL de cada medio de muestra (a partir de cultivos de células HK-2) con 240 uL de diluyente reactivo. Añadir 100 ul de patrón o muestra por pocillo, sellar la placa e incubar durante la noche en frío (4°C). Al día siguiente, vaciar los pocillos y lavar tres veces, cada vez con 340 uL de tampón de lavado por pocillo
- 10 Preparar la dilución de trabajo de anticuerpo de detección, 11 mL por placa en diluyente reactivo. Añadir 61 uL de anticuerpo de detección de partida (18 ug/ml) a 10,939 mL en diluyente reactivo y someter a vórtice suavemente. Añadir 100 ul de la dilución de trabajo de anticuerpo de detección a cada pocillo. Se sella la placa e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 15 Vaciar los pocillos y lavar los pocillos tres veces, cada vez con 340 uL de tampón de lavado por pocillo. Preparar la dilución de trabajo de Estreptavidina-HRP, 11 mL por placa en diluyente reactivo. Añadir 55 uL de la solución de partida (Núm. 890803, R & D Systems) a 10,945 mL de diluyente reactivo y someter a vórtice suavemente. Añadir 100 ul de la dilución de trabajo de estreptavidina-HRP a cada pocillo. Sellar la placa e incubarla durante 20 minutos a temperatura ambiente. Evitar colocar la placa a la luz directa. Vaciar los pocillos y lavar los pocillos tres veces, utilizando cada vez 340 ul de tampón de lavado por pocillo. Preparar la solución de sustrato de nueva aportación de 11 mL por placa. Mezclar 5,5 mL de reactivo colorante A (H₂O₂) y 5,5 mL de reactivo colorante B (tetrametilbenzidina) (Núm. DY999, R & D Systems). Añadir 100 ul de solución de sustrato a cada pocillo. Cubrir la placa e incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Evitar colocar la placa a la luz directa. Añadir 50 ul de solución de parada (H₂SO₄ 2 N) a cada pocillo. Se requieren 6 mL de solución de parada por placa. Golpear suavemente la placa para asegurar una buena mezcla. Determinar la densidad óptica de cada pocillo inmediatamente usando un lector de microplacas. (Dynex Revelation 4.22) ajustado a 450 nm y una corrección de longitud de onda a 550 nm.

E. Resultados

- 30 A continuación se ilustran los datos de eficacia para el SEQ ID NO: 45, que se puede considerar representativo de los compuestos de TDFRP descritos en la presente memoria. En primer lugar, un compuesto de TFDRP candidato, en la presente memoria SEQ ID NO: 21, se une específicamente al receptor 1A de tipo 1 en Ser-Thr (BMPR-1A, aka. ALK3) mediante análisis de unión competitiva como se determinó anteriormente.
- 35 La FIG. 1 muestra TDF-1 frío que desplaza TDF-1 marcado del dominio extracelular del receptor (ECD) de BMPR-1A inmovilizado con una DE₅₀ de 6,5 nM (es decir, la unión se indica por una disminución de "respuesta"). La Fig. 2 muestra el SEQ ID NO: 45 y el SEQ ID NO: 16 (CIVNSSDDFLCKKYRS) un péptido de control negativo. El control negativo no inhibe la unión específica de TDF-1 marcado al receptor ALK3, pero el SEQ ID NO: 45 lo hace con una DE₅₀ ~ 240 um. El SEQ ID NO: 45 se une específicamente al receptor de tipo 2 en Ser-Thr (BMPR-2) mediante los datos de unión competitiva.
- 40 La FIG. 3 muestra TDF-1 frío que desplaza TDF-1 marcado del dominio extracelular del receptor (ECD) de BMPR-2 inmovilizado con una DE₅₀ de 6,3 nM (es decir, la unión se indica por una disminución de "respuesta"). La FIG. 4 muestra que el péptido de control TP2.009 (SEQ ID NO: 16) no inhibe la unión específica de TDF-1 marcado al receptor BMPR-2, pero el SEQ ID NO: 45 lo hace. El SEQ ID NO: 45, al igual que TDF-1, reduce el nivel de marcador de la inflamación celular IL-6 en las células del túbulo proximal renal transformadas humanas HK2 después de la estimulación inflamatoria por TNF alfa (Factor de Necrosis Tumoral Alfa).
- 45 La Fig. 5 muestra la respuesta dependiente de la dosis de IL-6 a TNF-alfa en cultivo de células HK2. Basándose en estos datos, se seleccionaron 5 ng/mL de TNF-alfa como estímulo inflamatorio. La FIG. 6 muestra el efecto eficaz del SEQ ID NO: 45 (TP2.003) sobre el nivel de IL-6 en el medio de células HK2 después de la estimulación inflamatoria. La columna abierta es el nivel de fondo sin inflamación por IL-6; La columna de color negro es el nivel de IL-6 tras la estimulación inflamatoria con TNF-alfa. Como TDF-1 (columna verde), el SEQ ID NO: 45 (TP2.003) (columna azul) disminuye el nivel de IL-6 de una manera dependiente de la dosis, por lo tanto, tiene un efecto anti-inflamatorio sobre las células HK2 con una DE₅₀ ~ 10 um. El SEQ ID NO: 45, al igual que TDF-1, reduce el nivel de marcador de la inflamación celular ICAM-1 en las células del túbulo proximal renal transformadas humanas HK2 después de la estimulación inflamatoria por el TNF-alfa (Factor de Necrosis Tumoral Alfa).
- 50 La FIG. 7 muestra el efecto eficaz del SEQ ID NO: 45 sobre el nivel de ICAM-1 en el medio de células HK2 posterior a la estimulación inflamatoria. La columna abierta es nivel de fondo sin inflamación de ICAM-1; La columna de color negro es el nivel de ICAM-1 después de la estimulación inflamatoria con TNF-alfa. Como TDF-1 (columnas de color gris claro intermedias), el SEQ ID NO: 45 (columnas de color gris oscuro más a la derecha) disminuye el nivel de ICAM-1 de una manera dependiente de la dosis, por lo tanto, tiene un efecto anti-inflamatorio sobre las células HK2 con una DE₅₀ < 4 um. El SEQ ID NO: 45, al igual que TDF-1, induce la transducción de la señal Ser-Thr en células HK2. En la ruta de señalización de Ser-Thr, el ligando (TDF-1 o TP2.003) se une al receptor de tipo 1 (ALK3) y al receptor de tipo 2 (BMPR2) induciendo la oligomerización de los receptores. El receptor de tipo 2 experimenta

fosforilación y a continuación fosforila el receptor de tipo 1, que después fosforila uno de Smad 1, 5 u 8 (ref. como Smad1 más abajo). El Smad1 fosforilado es recogido a continuación por Smad4 y transportado al núcleo. De este modo, la detección de la concentración de Smad1 en el núcleo es diagnóstico de la inducción de la transducción de la señal.

5 La FIG. 8 muestra la respuesta dependiente de la dosis de TDF-1 de la acumulación de Smad1 en el núcleo. Obsérvese que en la columna de la derecha, en las imágenes de contraste de fase las células HK2 se muestran próximas a la confluencia; las imágenes de la izquierda muestran el marcaje fluorescente de Smad-1 en el núcleo de las células HK2.

10 La FIG. 9 muestra la respuesta dependiente de la dosis del SEQ ID NO:45 de la acumulación de Smad1 en el núcleo.

FIG. 10 El SEQ ID NO:43 (TP2.007) al igual que TDF-1 lleva el nivel de IL-6 por debajo del nivel basal.

FIG. 11 TP3.004 y TP3.005 (SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:21) no muestran actividad antiinflamatoria.

FIG. 12 TP2.005 y TP2.006 (SEQ ID NO:42 y SEQ ID NO:45) no muestran actividad antiinflamatoria.

15 FIG. 13 TP2.008 (SEQ ID NO:15) muestra una actividad antiinflamatoria muy débil.

Ejemplo 3 Análisis *In Vivo* para Determinar la Actividad Biológica

20 Los análisis *in vivo* para determinar la actividad biológica de BMP-7 completo, en los modelos de rata son descritos por Borovecki et al., The Role of Bone Morphogenetic Proteins In Kidney Development and Repair, págs. 263-288 in Bone Morphogenetic Proteins, Sampath, K. ed., (Birkhauser Verlag, Basel Switzerland (2002), BMP-7, administrado sistémicamente a las ratas, detiene la progresión de la insuficiencia renal en fase terminal en un riñón vestigial (5/6 de nefrectomía). Un segundo análisis citado en esa publicación revela la profilaxis a corto plazo por BMP-7 cuando se administra sistémicamente a ratas con obstrucción ureteral unilateral (UUO). Estos modelos de roedores proporcionan modelos de mamíferos de enfermedad renal, tratables profiláctica y terapéuticamente por medio de los compuestos de TDFRP de la presente invención.

Equivalentes

30 A partir de la anterior descripción detallada de las realizaciones específicas de la invención, debe resultar evidente que se han descrito péptidos bioactivos únicos. Aunque se han descrito realizaciones concretas en la presente memoria en detalle, esto se ha realizado a modo de ejemplo con fines ilustrativos únicamente, y no se pretende que sean limitantes con respecto al alcance de las siguientes reivindicaciones adjuntas.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> THRASOS, INC.
 CARLSON, William D.
 KECK, Peter C.

5 <120> COMPUESTOS ASOCIADOS A UN DOMINIO ÚNICO DE TDF Y ANÁLOGOS DE LOS MISMOS
 <130> NLW/P77679EP00
 <140> EP03760452.7
 <141> 2003-06-17
 <150> PCT/US03/19203

10 <151> 2003-06-17
 <150> 60/389,490
 <151> 2002-06-17
 <150> 60/441,724
 <151> 2003-01-22

15 <150> 60/458,851
 <151> 2003-03-28
 <150> 60/458,727
 <151> 2003-03-28
 <160> 208

20 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <220>
 <221> rasgo_misc
 <222> (1)..(20)

30 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 1
Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa
20

<210> 2
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <220>

40 <221> rasgo_misc
 <222> (2)..(14)
 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 2
Cys Xaa Xaa
1 5 10

45 <210> 3
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 3
Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln
1 5 10 15

Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Cys Glu Gln
20 25 30

<210> 4
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 4
Cys Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile
1 5 10 15

Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Cys
20 25

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 5
Cys Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Cys
1 5 10 15

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 6
Glu Cys Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Cys
1 5 10

<210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 7
Cys Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Cys
1 5 10

<210> 8
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 8
Cys Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val
1 5 10 15

Ile Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Cys
20 25

<210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 9
Cys Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Cys Leu Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

<210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 397 327 T3

<220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 10
 Cys Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
 1 5 10 15
 5 <210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 11
 Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Cys Leu Lys Lys Tyr Arg Ser
 1 5 10 15
 10 <210> 12
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 12
 Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile
 1 5 10 15
 15 val Gln Thr Leu val His Phe Ile Asn Pro Glu Thr val Pro Lys Cys
 20 20 25 30
 <210> 13
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 13
 Cys Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Cys
 1 5 10
 25 <210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 14
 Cys Phe Ile Asn Pro Glu Thr val Pro Lys Cys
 1 5 10
 30 <210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 15
 Cys Leu Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
 1 5 10 15
 35 <210> 16
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 16
 Cys Ile val Asn Ser Ser Asp Asp Phe Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
 1 5 10 15
 40 <210> 17
 <211> 11

ES 2 397 327 T3

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> donde la cisteína de la posición 1 está acetilada.
 <400> 17
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys
1 5 10
 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> donde el residuo de cisteína de la posición 1 está amidado.
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> donde el residuo de cisteína de la posición 11 está amidado.
 <400> 18
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys
1 5 10
 <210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> donde la cisteína de la posición 1 está acetilada.
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> donde la cisteína de la posición 11 está amidada.
 <400> 19
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys
1 5 10
 <210> 20
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 20
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys
1 5 10
 <210> 21
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 21
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys Lys
1 5 10
 <210> 22
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 22
 5 Cys Phe Ile Asn Pro Glu Thr Val Cys
 1 5
 <210> 23
 <211> 16
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 23
 Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Lys Ser
 1 5 10 15
 15 <210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 24
 Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys Lys Arg Tyr Arg Ser
 1 5 10 15
 25 <210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 25
 30 Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys Arg Lys Tyr Arg Ser
 1 5 10 15
 <210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 26
 Cys Tyr Leu Asp Glu Asn Glu Lys Val Val Cys Lys Asn Tyr Gln Ser
 1 5 10 15
 40 <210> 27
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 27
 45 Cys Tyr Leu Asp Glu Tyr Asp Lys Val Val Cys Lys Asn Tyr Gln Ser
 1 5 10 15
 <210> 28
 <211> 19
 <212> PRT
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 28
 Ile Ser Val Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys
 1 5 10 15
 Tyr Arg Ser

<210> 29
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 29
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys
1 5 10

<210> 30
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 30
Cys Tyr Leu Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

<210> 31
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 31
Cys Tyr Leu Asp Asp Ser Ser Asn Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

<210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 32
Cys Tyr Phe Glu Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

<210> 33
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> donde la cisteína de la posición 11 está amidada.
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> donde la serina de la posición 11 está amidada.
 <400> 33
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

<210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> donde la cisteína de la posición 11 está amidada.
 <220>
 <221> MOD_RES

ES 2 397 327 T3

<222> (17)..(17)

<223> donde la serina de la posición 17 está amidada.

<400> 34

Cys Tyr Leu Asp Glu Asp Ser Ser Lys Val Leu Cys Lys Asn Tyr Arg
1 5 10 15

Ser

5 <210> 35

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> donde la cisteína de la posición 11 está amidada.

15 <220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> donde la serina de la posición 16 está amidada.

<400> 35

20 **Cys Tyr Phe Asp Glu Ser Ser Lys Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser**
1 5 10 15

<210> 36

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

30 <223> donde la cisteína de la posición 1 está amidada.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

<223> donde la cisteína de la posición 23 está amidada.

35 <400> 36

Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Cys
20

<210> 37

<211> 23

<212> PRT

40 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

<220>

<221> MOD_RES

45 <222> (1)..(1)

<223> donde la cisteína de la posición 11 está amidada.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (23)..(23)

50 <223> donde la serina de la posición 23 está amidada.

ES 2 397 327 T3

<400> 37
Cys Gly Gly Gly Ser Gly Ser Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val
1 5 10 15

Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
20

<210> 38
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 38
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

<210> 39
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 39
Cys Ile Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

<210> 40
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 40
Cys Tyr Val Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

<210> 41
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 41
Cys Tyr Phe Asp Glu Ser Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

<210> 42
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 42
Cys Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

<210> 43
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 43
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

<210> 44
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 397 327 T3

<220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 44
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

5
 <210> 45
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

10
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 45
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

15
 <210> 46
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

20
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 46
Cys Ile Val Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

25
 <210> 47
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

30
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 47
Cys Ile Phe Asp Glu Ser Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

35
 <210> 48
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

40
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 48
Cys Ile Phe Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

45
 <210> 49
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

50
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 49
Cys Ile Phe Asp Asp Ser Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

55
 <210> 50
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

50
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 50
Cys Ile Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

55
 <210> 51
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

<223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

ES 2 397 327 T3

<400> 51
Cys Ile Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 52
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 52
Cys Tyr Val Asp Glu Ser Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 53
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 53
Cys Tyr Val Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 54
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 54
Cys Tyr Val Asp Asp Ser Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 55
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 55
Cys Tyr Val Asp Asp Ser Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 56
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 56
Cys Tyr Val Asp Asp Ser Ser Asn Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 57
 <211> 16
 <212> PRT
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 57
Cys Tyr Phe Asp Glu Asn Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 58
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 55 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

ES 2 397 327 T3

<400> 58
Cys Tyr Phe Asp Glu Ser Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 59
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 59
Cys Tyr Phe Asp Glu Ser Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 60
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 60
Cys Tyr Phe Asp Glu Ser Ser Asn Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 61
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 61
Cys Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 62
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 62
Cys Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 63
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 63
Cys Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Asn Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 64
 <211> 16
 <212> PRT
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 64
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Gln Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 65
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50 <220>
 55 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

ES 2 397 327 T3

<400> 65
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Gln Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 66
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 66
Cys Ile Val Asp Glu Ser Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 10 <210> 67
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 67
Cys Ile Val Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 20 <210> 68
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 68
Cys Ile Val Asp Asp Ser Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 69
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 69
Cys Ile Val Asp Asp Ser Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 35 <210> 70
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 70
Cys Ile Val Asp Asp Ser Ser Asn Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 45 <210> 71
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 71
Cys Ile Phe Asp Glu Asn Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 50 <210> 72
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

ES 2 397 327 T3

<400> 72
Cys Ile Phe Asp Glu Ser Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 73
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 73
Cys Ile Phe Asp Glu Ser Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 74
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 74
Cys Ile Phe Asp Glu Ser Ser Asn Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 75
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 25 <400> 75
Cys Ile Phe Asp Asp Asn Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 76
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 76
Cys Ile Phe Asp Asp Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 77
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 40 <400> 77
Cys Ile Phe Asp Asp Asn Ser Asn Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 78
 <211> 16
 <212> PRT
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 78
Cys Ile Phe Asp Asp Ser Ser Gln Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 79
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

ES 2 397 327 T3

<400> 79
Cys Ile Phe Asp Asp Ser Ser Gln Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 80
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 80
Cys Tyr Val Asp Glu Asn Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 10 <210> 81
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 81
Cys Tyr Val Asp Glu Ser Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 20 <210> 82
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 82
Cys Tyr Val Asp Glu Ser Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 83
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 83
Cys Tyr Val Asp Glu Ser Ser Asn Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 35 <210> 84
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 84
Cys Tyr Val Asp Asp Asn Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 45 <210> 85
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 85
Cys Tyr Val Asp Asp Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 50 <210> 86
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

ES 2 397 327 T3

<400> 86
Cys Tyr Val Asp Asp Asn Ser Asn Val Leu Cys Lys Lys Arg Tyr Ser
1 5 10 15
 <210> 87
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 87
Cys Tyr Val Asp Asp Ser Ser Gln Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 88
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 88
Cys Tyr Val Asp Asp Ser Ser Gln Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 89
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 89
Cys Tyr Phe Asp Glu Asn Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 90
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 90
Cys Tyr Phe Asp Glu Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 91
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 91
Cys Tyr Phe Asp Glu Asn Ser Asn Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 92
 <211> 16
 <212> PRT
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 92
Cys Tyr Phe Asp Glu Ser Ser Gln Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 93
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

ES 2 397 327 T3

<400> 93
Cys Tyr Phe Asp Glu Ser Ser Gln Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 94
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 94
Cys Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Gln Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 95
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 95
Cys Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Gln Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 96
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 25 <400> 96
Cys Ile Val Asp Glu Asn Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 97
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 97
Cys Ile Val Asp Glu Ser Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 35 <210> 98
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 98
Cys Ile Val Asp Glu Ser Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 99
 <211> 16
 45 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 99
Cys Ile Val Asp Glu Ser Ser Asn Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 50 <210> 100
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

ES 2 397 327 T3

<400> 100
Cys Ile val Asp Asp Asn Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 101
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 101
Cys Ile val Asp Asp Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 102
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 102
Cys Ile val Asp Asp Asn Ser Asn Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 103
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 25 <400> 103
Cys Ile val Asp Asp Ser Ser Gln Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 104
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 104
Cys Ile val Asp Asp Ser Ser Gln Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 105
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 40 <400> 105
Cys Ile Phe Asp Glu Asn Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 106
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 106
Cys Ile Phe Asp Glu Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 107
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

<400> 107
Cys Ile Phe Asp Glu Asn Ser Asn Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 108
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 108
Cys Ile Phe Asp Glu Ser Ser Gln Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 109
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 109
Cys Ile Phe Asp Glu Ser Ser Gln Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 110
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 110
Cys Ile Phe Asp Asp Asn Ser Gln Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 111
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 111
Cys Ile Phe Asp Asp Asn Ser Gln Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 112
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 112
Cys Tyr Val Asp Glu Asn Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 113
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 113
Cys Tyr Val Asp Glu Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 114
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

ES 2 397 327 T3

<400> 114
Cys Tyr Val Asp Glu Asn Ser Asn Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 115
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 115
Cys Tyr Val Asp Glu Ser Ser Gln Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 116
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 116
Cys Tyr Val Asp Glu Ser Ser Gln Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 117
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 117
Cys Tyr Val Asp Asp Asn Ser Gln Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 118
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 118
Cys Tyr Val Asp Asp Asn Ser Gln Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 119
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 119
Cys Tyr Phe Asp Glu Asn Ser Gln Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 120
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 120
Cys Tyr Phe Asp Glu Asn Ser Gln Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 121
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

ES 2 397 327 T3

<400> 121
Cys Ile Val Asp Glu Asn Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 122
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 122
Cys Ile Val Asp Glu Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 123
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 123
Cys Ile Val Asp Glu Asn Ser Asn Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 124
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 124
Cys Ile Phe Asp Glu Asn Ser Gln Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 125
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 125
Cys Ile Phe Asp Glu Asn Ser Gln Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 126
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 126
Cys Tyr Val Asp Glu Asn Ser Gln Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 127
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 127
Cys Tyr Val Asp Glu Asn Ser Gln Val Leu Cys Cys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 128
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

ES 2 397 327 T3

<400> 128
Cys Ile Val Asp Glu Asn Ser Gln Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 129
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 129
Cys Ile Val Asp Glu Asn Ser Gln Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 130
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 130
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Lys Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 131
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 131
Cys Tyr Leu Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 132
 <211> 16
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 132
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Lys Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 133
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 133
Cys Tyr Leu Asp Asp Ser Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 134
 <211> 16
 <212> PRT
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 134
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Lys Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 135
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

ES 2 397 327 T3

5
 <400> 135
Cys Tyr Leu Asp Asp Ser Ser Asn Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 136
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

10
 <400> 136
Cys Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Lys Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 137
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

15
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

20
 <400> 137
Cys Tyr Phe Asp Glu Ser Ser Lys Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 138
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

25
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

30
 <400> 138
Cys Tyr Leu Asp Asp Ser Ser Lys Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 139
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

35
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

40
 <400> 139
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 140
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

45
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

50
 <400> 140
Cys Tyr Leu Asp Glu Ser Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 141
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

55
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

50
 <400> 141
Cys Tyr Leu Asp Asp Ser Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 142
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

55
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

ES 2 397 327 T3

<400> 142
Cys Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Lys Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

<210> 143
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 143
Cys Tyr Phe Asp Glu Ser Ser Lys Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

<210> 144
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 144
Cys Tyr Leu Asp Asp Ser Ser Lys Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

<210> 145
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 145
Cys Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Lys Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

<210> 146
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 146
Cys Tyr Phe Asp Glu Ser Ser Lys Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

<210> 147
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 147
Cys Tyr Leu Asp Asp Ser Ser Lys Val Leu Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

<210> 148
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 148
Cys Tyr Leu Asp Glu Ser Ser Lys Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15

<210> 149
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

<400> 149
Cys Tyr Phe Asp Glu Asn Ser Lys Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 150
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 150
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Lys Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 151
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 151
Cys Tyr Leu Asp Glu Ser Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg Ser
1 5 10 15
 <210> 152
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 152
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys
1 5 10
 <210> 153
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 153
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Val Cys
1 5 10
 <210> 154
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 154
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Leu Cys
1 5 10
 <210> 155
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 155
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Lys Val Ile Cys
1 5 10
 <210> 156
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

<400> 156
Cys Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Cys
1 5 10
 <210> 157
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 157
Cys Tyr Phe Asp Glu Ser Ser Asn Val Ile Cys
1 5 10
 <210> 158
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 158
Cys Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Gln Val Ile Cys
1 5 10
 <210> 159
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 159
Cys Tyr Leu Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Cys
1 5 10
 <210> 160
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 160
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Lys Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 161
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 161
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 162
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 162
Cys Tyr Leu Glu Asp Asn Ser Asn Val Thr Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 163
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

<400> 163
Cys Tyr Leu Glu Glu Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 164
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 164
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Lys Val Thr Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 165
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 165
Cys Tyr Leu Glu Glu Asn Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 166
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 166
Cys Tyr Leu Glu Asp Asn Ser Gln Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 167
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 167
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Asn Phe Ile Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 168
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 168
Cys Tyr Leu Asp Glu Asn Ser Lys Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 169
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 169
Cys Trp Leu Asp Glu Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 170
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

<400> 170
Cys Tyr Leu Glu Glu Asn Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 171
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 171
Cys Tyr Leu Glu Asp Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 172
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 172
Cys Tyr Leu Asp Glu Asn Ser Lys Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 173
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 173
Cys Tyr Leu Asp Glu Asn Ser Gln Val Thr Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 174
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 174
Cys Tyr Leu Glu Asp Asn Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 175
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 175
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Lys Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 176
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 176
Cys Tyr Leu Asp Glu Asn Ser Asn Val Thr Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 177
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

<400> 177
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Gln Val Thr Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 178
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 178
Cys Tyr Leu Asp Glu Asn Ser Gln Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 179
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 179
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Asn Val Thr Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 180
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 180
Cys Tyr Leu Asp Glu Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 181
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 181
Cys Tyr Leu Asp Glu Asn Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 182
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 182
Cys Tyr Leu Asp Glu Asn Ser Asn Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 183
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 183
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 184
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

<400> 184
Cys Tyr Leu Glu Asp Asn Ser Gln Val Ile Cys Lys Lys Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 185
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 185
Cys Tyr Leu Asp Glu Asn Ser Asn Val Thr Cys Lys Lys Trp Arg
1 5 10 15
 <210> 186
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 186
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Asn Val Thr Cys Lys Lys Trp Arg
1 5 10 15
 <210> 187
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 187
Cys Tyr Leu Asp Glu Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Trp Arg
1 5 10 15
 <210> 188
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 188
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Trp Arg
1 5 10 15
 <210> 189
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 189
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Gln Val Thr Cys Lys Lys Trp Arg
1 5 10 15
 <210> 190
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 190
Cys Tyr Leu Asp Glu Asn Ser Gln Val Val Cys Lys Lys Trp Arg
1 5 10 15
 <210> 191
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

<400> 191
Cys Tyr Leu Asp Glu Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Gln Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 192
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 192
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Asn Val Thr Cys Lys Gln Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 193
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 193
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Gln Val Val Cys Lys Lys Trp Arg
1 5 10 15
 <210> 194
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 194
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Asn Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 195
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 195
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Gln Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 196
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 196
Cys Tyr Leu Asp Glu Asn Ser Gln Val Ile Cys Lys Gln Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 197
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 197
Cys Tyr Ala Asp Glu Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Trp Arg
1 5 10 15
 <210> 198
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

ES 2 397 327 T3

<400> 198
Cys Tyr Ala Asp Asp Asn Ser Asn Val Thr Cys Lys Lys Trp Arg
1 5 10 15
 <210> 199
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 199
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Gln Val Ile Cys Lys Asn Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 200
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 200
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Gln Val Val Cys Lys Gln Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 201
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 201
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Gln Val Ile Cys Lys Gln Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 202
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 202
Cys Tyr Ala Asp Asp Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Lys Trp Arg
1 5 10 15
 <210> 203
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 203
Cys Tyr Leu Asp Glu Asn Asp Asn Val Val Cys Lys Lys Trp Arg
1 5 10 15
 <210> 204
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 204
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Asp Asn Val Thr Cys Lys Lys Trp Arg
1 5 10 15
 <210> 205
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea

ES 2 397 327 T3

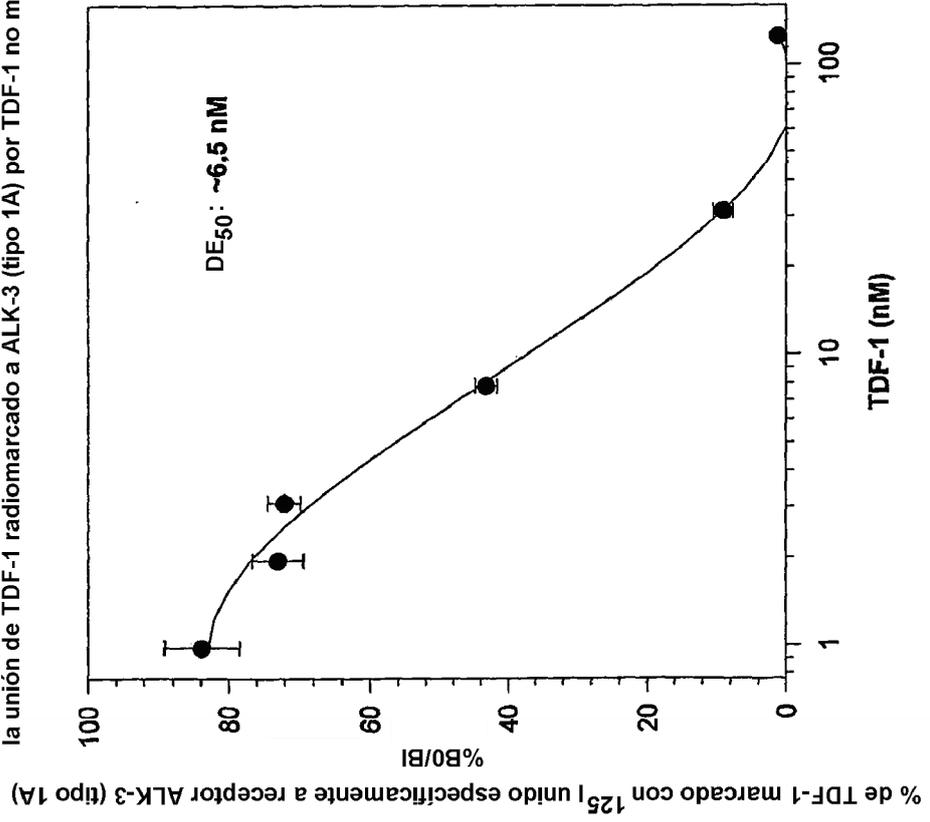
<400> 205
Cys Tyr Ala Asp Asp Asn Ser Gln Val Val Cys Lys Lys Trp Arg
1 5 10 15
 <210> 206
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 206
Cys Tyr Ala Asp Asp Asn Ser Asn Val Val Cys Lys Gln Tyr Arg
1 5 10 15
 <210> 207
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 207
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Asp Asn Val Val Cys Lys Lys Trp Arg
1 5 10 15
 <210> 208
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de polipéptidos de un mimético estructural de la proteína morfogénica ósea
 <400> 208
Cys Tyr Leu Asp Asp Asn Ser Asn Ile Ile Cys Lys Lys Trp Arg
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 45.
- 5 2. El péptido de la reivindicación 1, en donde el péptido modula la transducción de la señal a través de una membrana de una célula que expresa un receptor del factor de diferenciación tisular.
3. Una composición farmacéutica que comprende un péptido de la reivindicación 1, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 10 4. Un kit que comprende en uno o más recipientes, la composición farmacéutica de la reivindicación 3 e instrucciones para la utilización de su contenido.
- 15 5. un método para determinar la presencia de o la predisposición a una enfermedad asociada con niveles alterados del receptor del factor de diferenciación tisular en un primer sujeto mamífero, comprendiendo el método:
 - (a) proporcionar una muestra de ensayo del primer sujeto mamífero;
 - (b) poner en contacto la muestra de ensayo del primer sujeto mamífero con un péptido de la reivindicación 1;
 - (c) detectar el nivel de complejo de compuesto/receptor del factor de diferenciación tisular;
 - (d) cuantificar el nivel de expresión del receptor del factor de diferenciación tisular en la muestra del primer sujeto mamífero; y
 - 20 (e) comparar la cantidad de receptor del factor de diferenciación tisular en la muestra de la etapa (a) con respecto a la cantidad de receptor del factor de diferenciación tisular presente en una muestra de control de un segundo sujeto mamífero que se sabe que no tiene, o no está predispuesto a, la enfermedad, en donde una alteración en el nivel de expresión del receptor del factor de diferenciación tisular en el primer sujeto en comparación con la muestra de control indica la presencia o predisposición a la enfermedad.
- 25 6. El péptido de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento del cáncer, de enfermedades inflamatorias o de enfermedades renales.

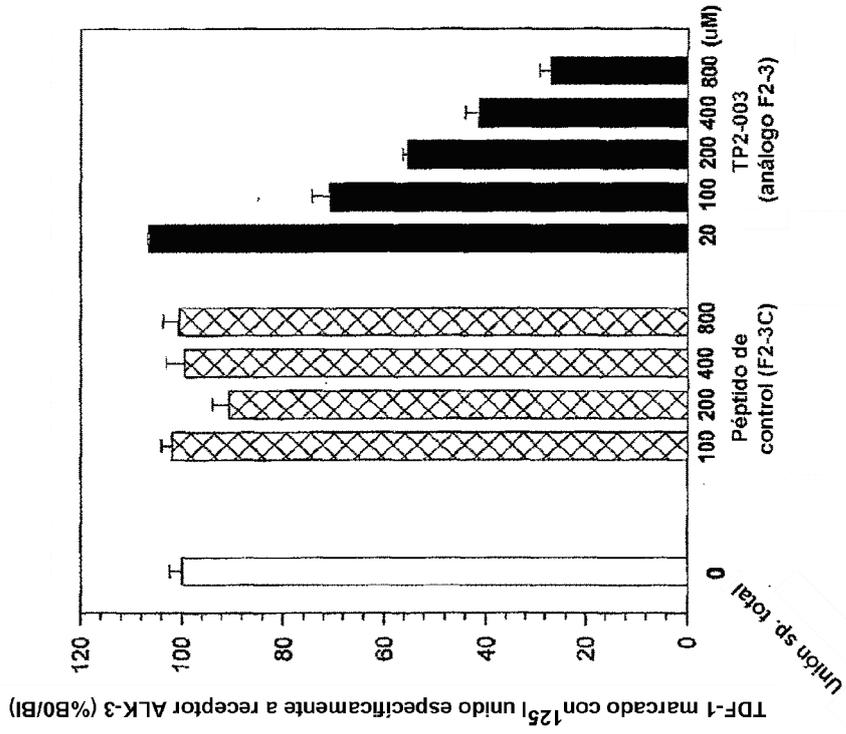
ALK-3 Curva de Calibración

Análisis de unión de radio-ligandos a receptores para ALK-3: Inhibición de la unión de TDF-1 radiomarcado a ALK-3 (tipo 1A) por TDF-1 no marcado



ALK-3: Péptido TP2-003 (SEQ ID NO: 45) y F2-3C (SEQ ID NO: 16)

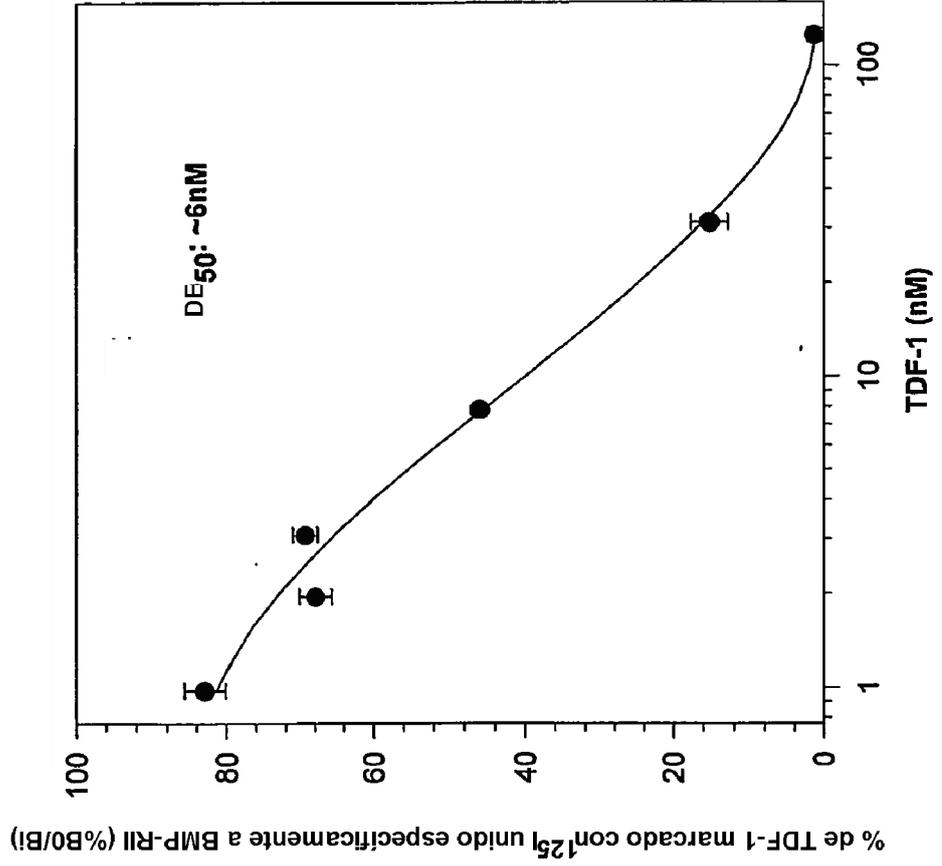
Análisis de unión de radio-ligandos a receptores para ALK-3: Competición entre TH-P-003 y TDF-1 marcado por la unión a receptor ALK-3 (tipo 1A)



BMPR2: Curva de Calibración (BMPR2)

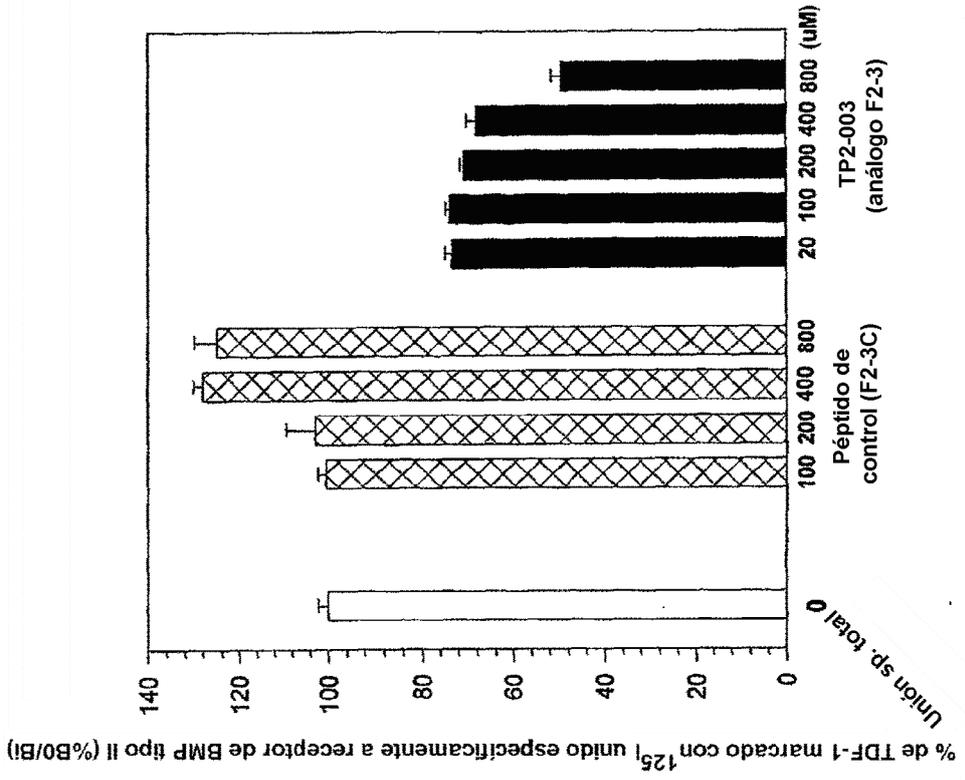
$C_{50\%} = 6,3 \text{ nM}$

Análisis de unión de radio-ligandos a receptores para receptor de BMP tipo II:
 inhibición de la unión de TDF-1 radiomarcado a BMP-RII por TDF-1 no marcado



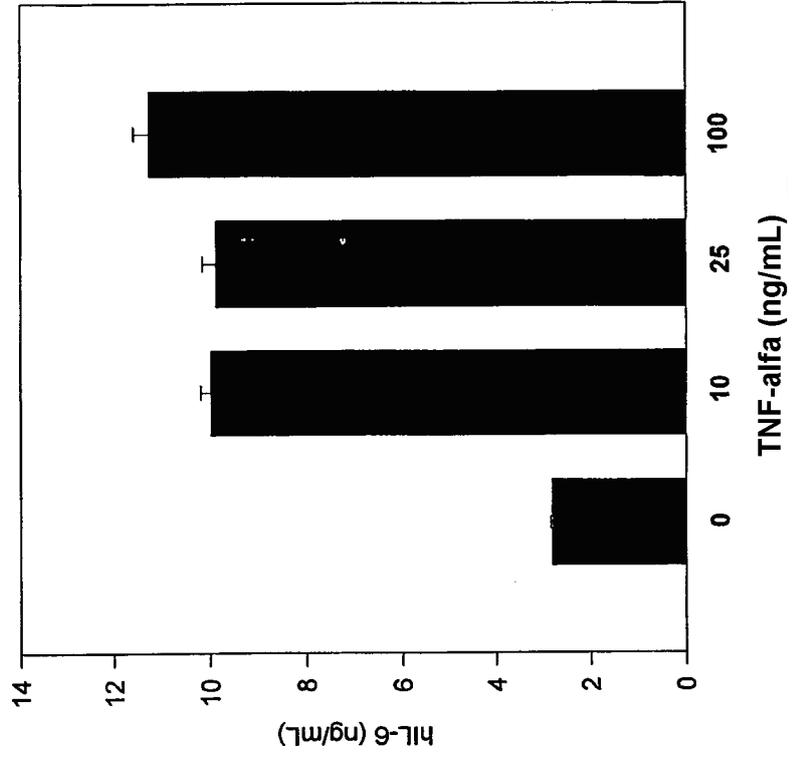
BMPR2: Péptidos TP2-003 (SEQ ID NO: 45) y F2-3c (TP2-009 o SEQ ID NO: 16)

Análisis de unión de radio-ligandos a receptores para receptor de BMP tipo II: Competición entre TH-P-003 y TDF-1 marcado por la unión a receptor de BMP tipo II



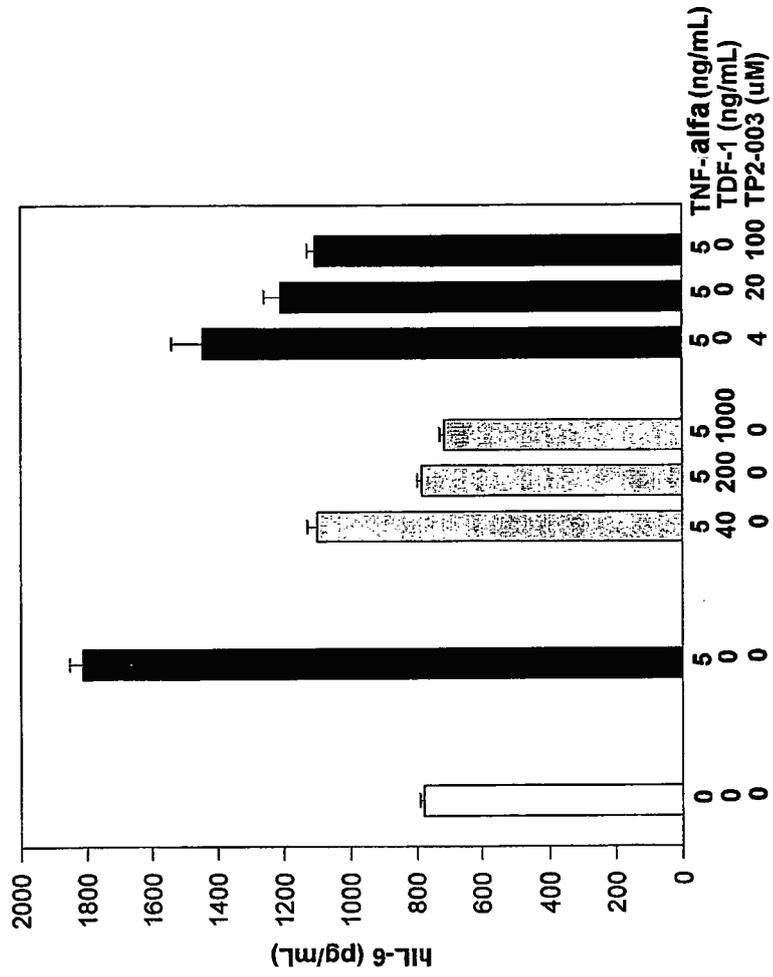
Curva Cal. TNF / IL-6

Efecto de TNF alfa sobre la producción de IL-6 en células epiteliales de túbulo proximal renal inmortalizadas humanas (HK-2)



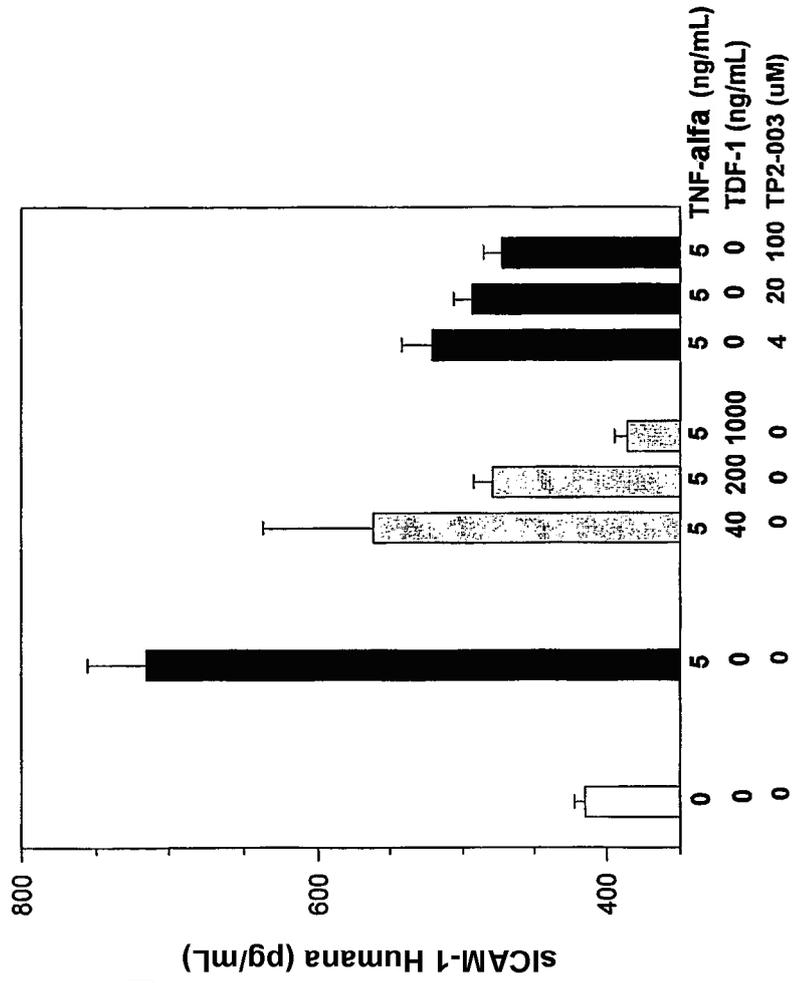
TP2.003 (SEQ ID NO: 45) Efecto sobre IL-6

Respuesta anti-inflamatoria por TDF-1 o TP2-003: Inhibición de hIL-6 inducida por TNF-alfa en células epiteliales del túbulo proximal renal inmortalizadas humanas (HK-2)

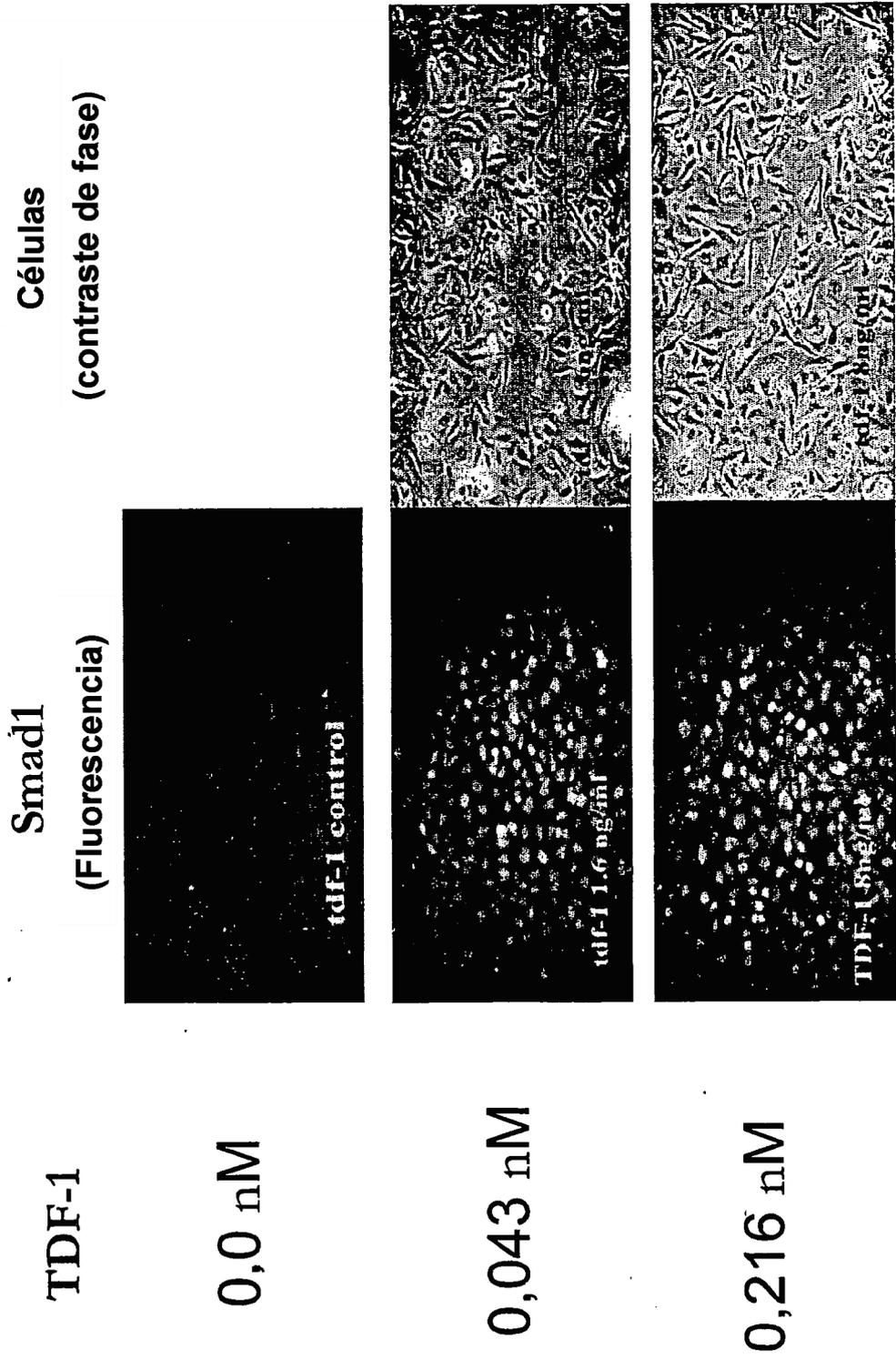


TP2.003 (SEQ ID NO: 45) Efecto sobre ICAM-1

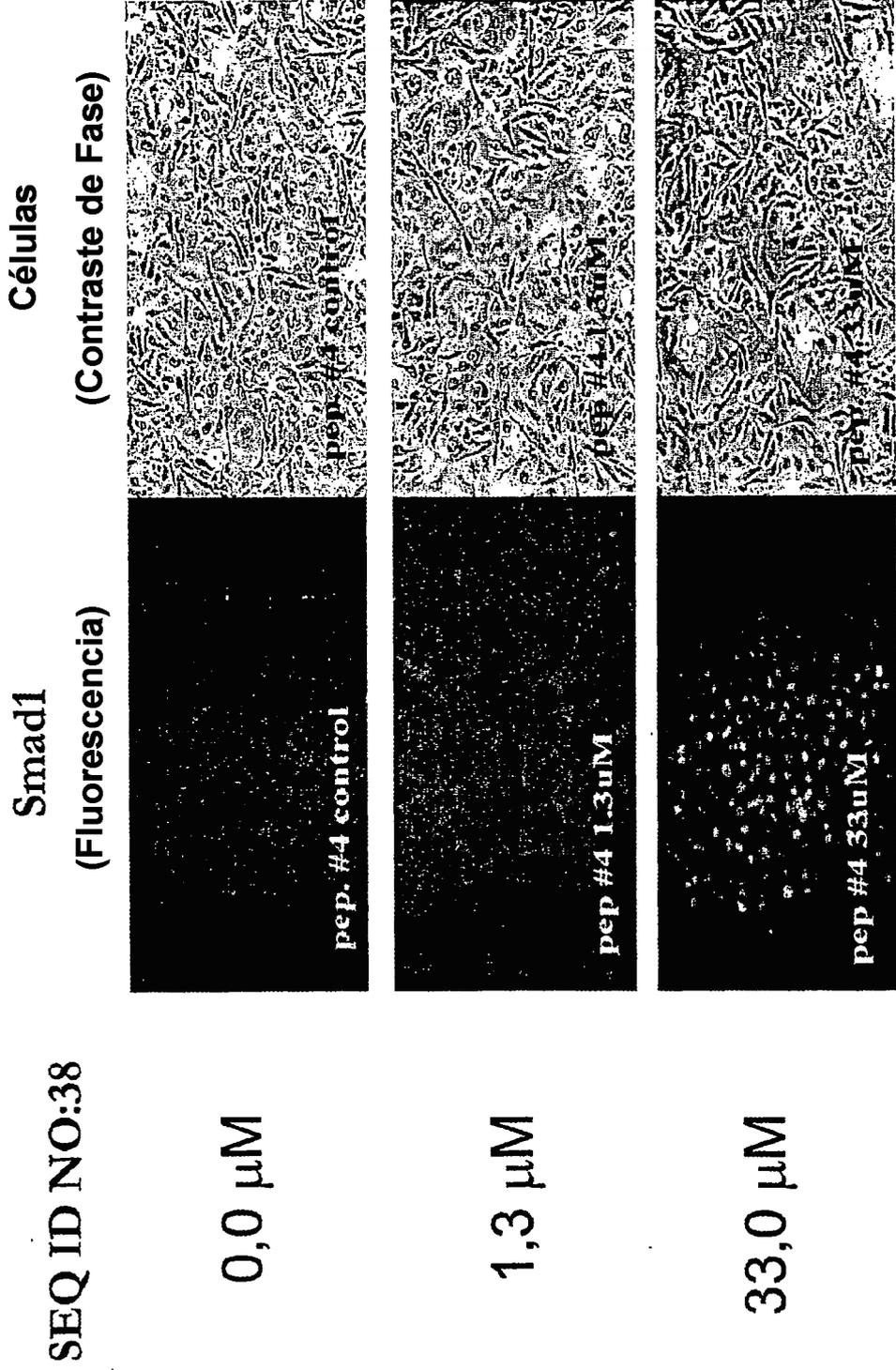
Respuesta anti-inflamatoria por TDF-1 o TP2-003: Inhibición de hICAM-1 inducida por TNF-alfa en células epiteliales del túbulo proximal renal inmortalizadas humanas (HK-2)



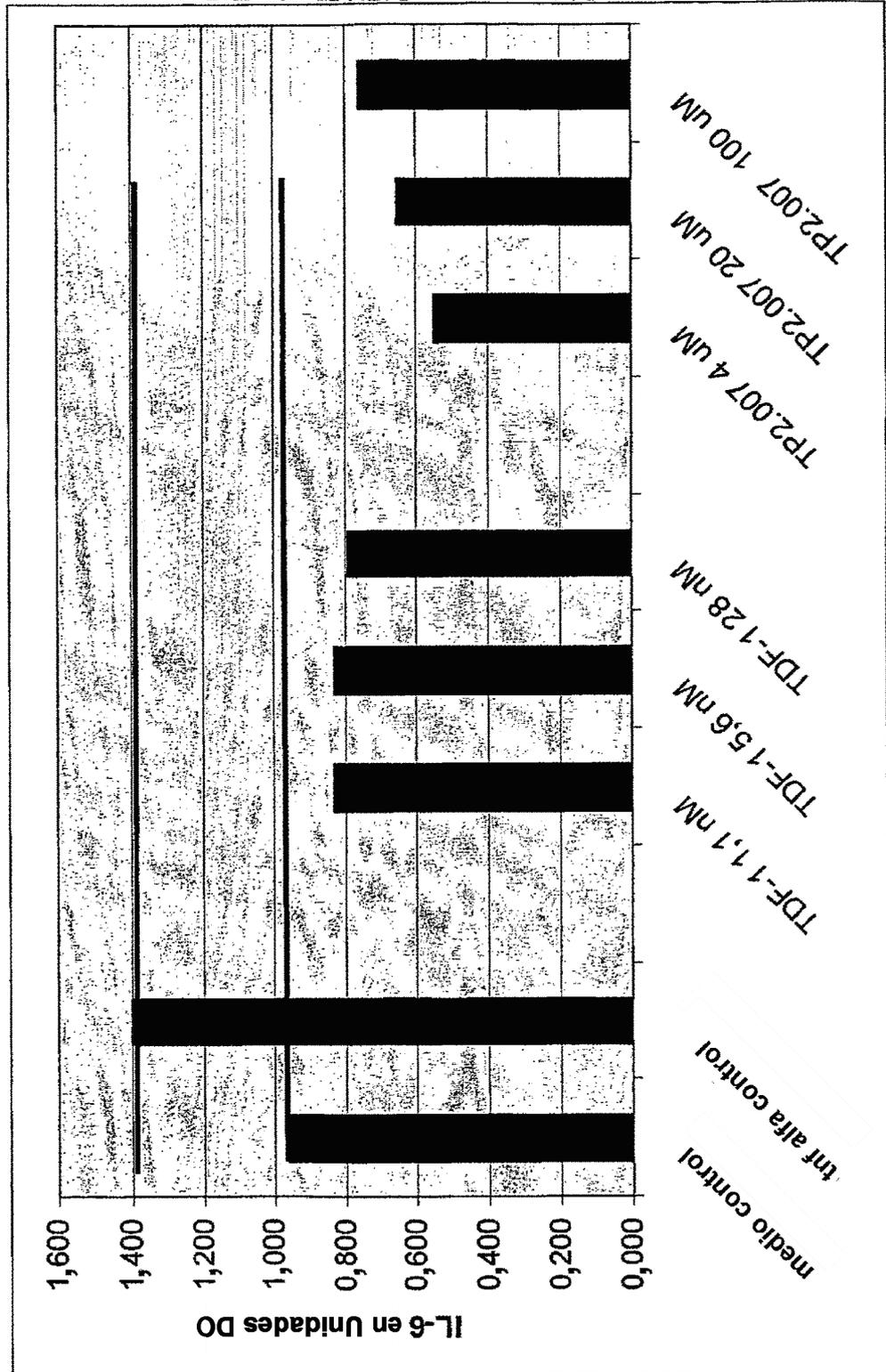
El Péptido TDF-1 Induce la Translocación de Smad1 al Núcleo (células HK2)



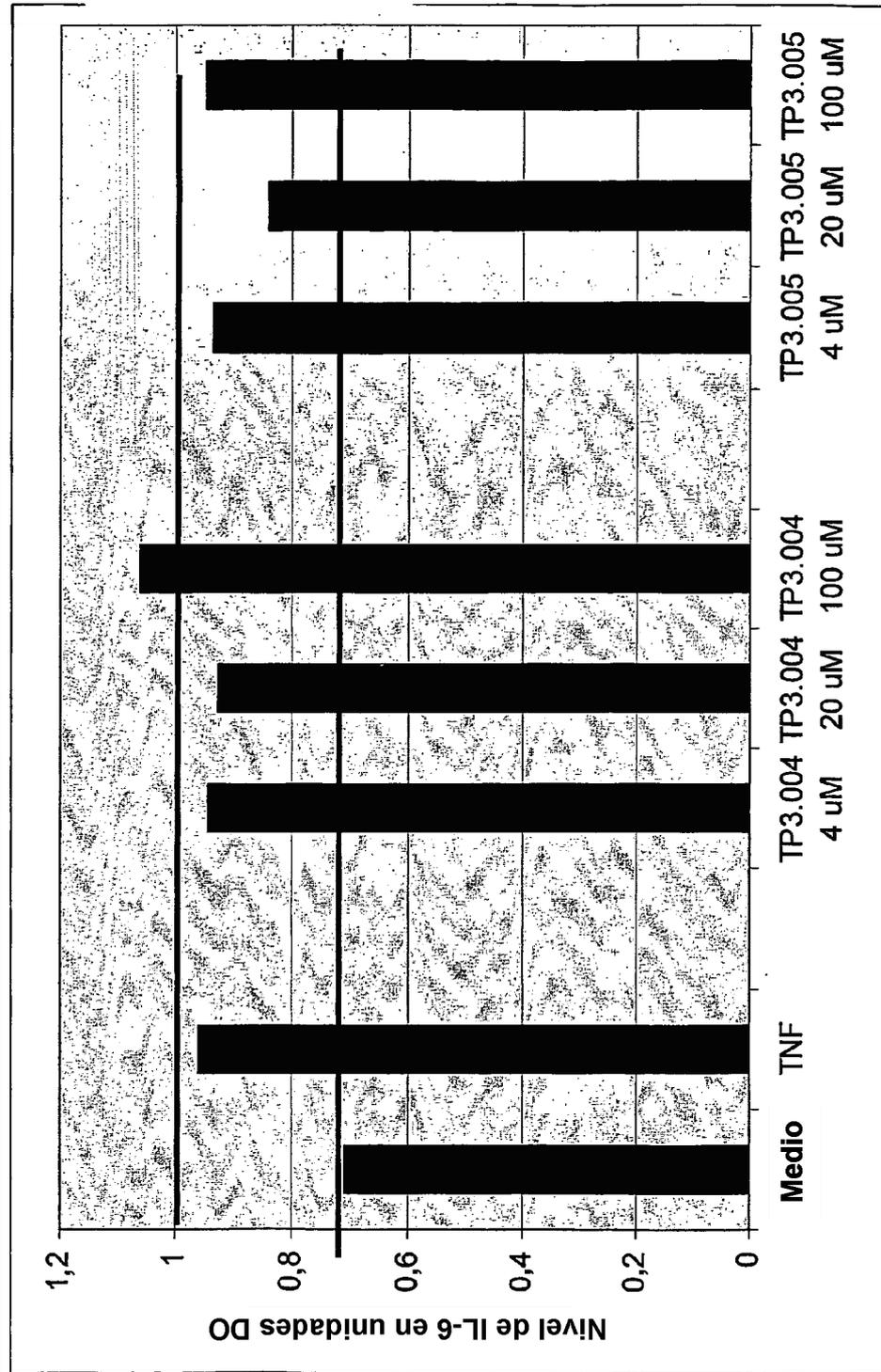
El Péptido TP2.003 (SEQ ID NO: 45) Induce la Translocación de Smad1 al Núcleo (células HK2)



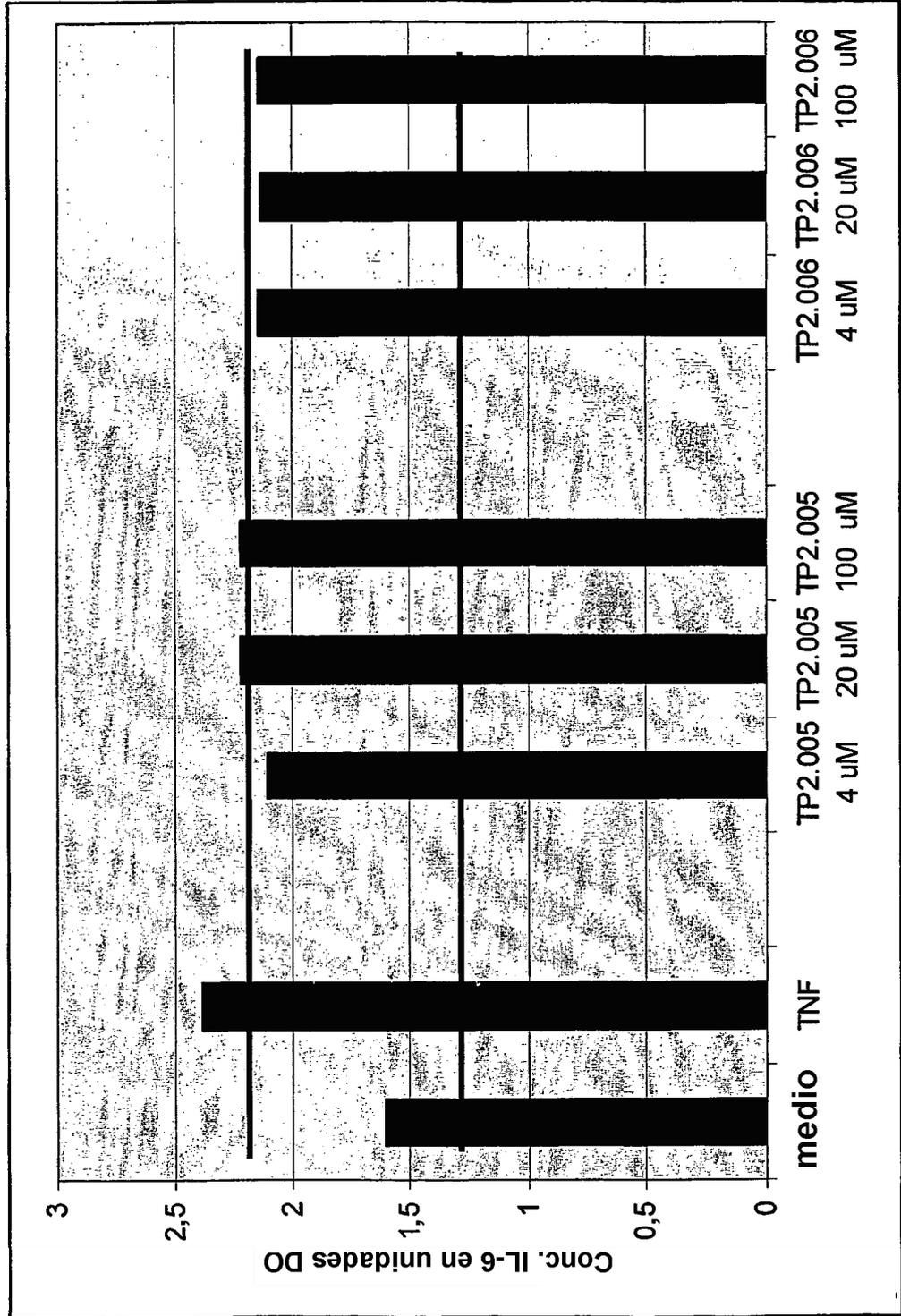
Efecto Anti-Inflamatorio de TP2-007 (SEQ ID NO: 43) sobre Células HK2



Efecto No Anti-Inflamatorio de TP2.004 (SEQ ID NO: 20) y TP2.005 (SEQ ID NO: 21) sobre células HK2



Efecto No Anti-Inflamatorio de TP2.005 (SEQ ID NO: 42) y TP2.006 (SEQ ID NO: 45) sobre células HK2



**Efecto Anti-Inflamatorio de TP2.008 (SEQ ID NO: 15)
sobre células HK2**

