

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 853**

51 Int. Cl.:

C07K 14/51

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2012** **PCT/EP2012/074549**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013** **WO13083649**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2012** **E 12795011 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017** **EP 2788374**

54 Título: **Mutante de GDF-5 para inducir la formación de cartílago**

30 Prioridad:

05.12.2011 EP 11191973

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

24.08.2017

73 Titular/es:

**BIOPHARM GESELLSCHAFT ZUR
BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON
PHARMAKA MBH (100.0%)
Czernyring 22
69115 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**PLÖGER, FRANK y
WAGNER, FLORIAN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 630 853 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

Mutante de GDF-5 para inducir la formación de cartílago

La presente invención se dirige a proteínas relacionadas con GDF-5 que tienen una capacidad mejorada para inducir la formación de cartílago y una capacidad reducida para inducir la formación de hueso. Las nuevas proteínas son particularmente útiles en el tratamiento de defectos del cartílago, en los que la formación de hueso no es deseable.

Las articulaciones sinoviales son esenciales para la función biomecánica del esqueleto. Una función incorrecta como la observada en enfermedades artríticas da como resultado directamente una pérdida grave de calidad de vida. Por lo tanto, la biología de las articulaciones ha estado en el foco de una investigación intensiva durante años que ha conducido a una comprensión de la anatomía y la histología de las articulaciones así como las propiedades biomecánicas y los papeles del cartílago y otros componentes en la función y el mantenimiento de las articulaciones.

GDF-5 (Hötten y cols. 1994, *Biochem. Biophys Res. Commun.* 204, 646-652) es un morfógeno que se ha observado que promueve la proliferación celular, la diferenciación y/o la formación tisular en varios tejidos. La proteína también se conoce como proteína morfogénica MP52, proteína morfogenética ósea-14 (BMP-14) o proteína morfogenética derivada del cartílago-1 (CDMP-1). GDF-5 muestra actividad condrogénica y las mutaciones congénitas de GDF-5 provocan defectos en articulaciones de los dedos, las muñecas y los tobillos en ratones y seres humanos (Storm y cols., 1994; Thomas y cols., 1997). La expresión de GDF-5 está sorprendentemente limitada a regiones en las que se desarrollarán articulaciones y es uno de los marcadores iniciales de la formación de articulaciones (Storm y Kingsley, 1999). Se requiere la señalización del receptor de BMP para el mantenimiento posnatal del cartílago articular (Rountree, 2004, *PLoS Biol.* noviembre de 2004, 2(11))

El GDF-5 está estrechamente relacionado con GDF-6 y GDF-7. Estas tres proteínas forman un subgrupo distinto de la superfamilia TGF- β , presentando así propiedades biológicas comparables y un grado extraordinariamente alto de identidad de secuencia de aminoácidos (véase, por ejemplo, Wolfman y cols. 1997, *J. Clin. Invest.* 100, 321-330). Todos los miembros de la familia son sintetizados inicialmente como proteínas precursoras mayores que posteriormente sufren escisión proteolítica en una acumulación de residuos básicos de aproximadamente 110-140 aminoácidos desde el extremo C, liberando así las partes de proteína madura C-terminales del prodominio N-terminal. Los polipéptidos maduros están estructuralmente relacionados y contienen un dominio bioactivo conservado que comprende seis o siete residuos de cisteína canónicos que es responsable del motivo de "nudo de cistina" tridimensional característico de estas proteínas. Las proteínas relacionadas con GDF-5 naturales son moléculas homodímeras y actúan principalmente a través de la interacción con complejos receptores específicos que están compuestos por serina/treonina cinasas receptoras tipo I y tipo II. Posteriormente, las cinasas receptoras activan proteínas Smad, que a continuación propagan las señales hacia el núcleo para regular la expresión génica diana.

Se ha demostrado repetidamente que miembros del subgrupo GDF-5/-6/-7 son inductores y reguladores primordialmente importantes del hueso y el cartílago (Cheng y cols. 2003, *J. Bone & Joint Surg.* 85A, 1544-1552; Settle y cols. 2003, *Developm. Biol.* 254, 116-130). GDF-5 y las proteínas relacionadas se unen a y oligomerizan dos tipos de receptores de serina-treonina cinasa unidos a la membrana denominados tipo I y II. Durante la unión a ligandos, estos complejos transducen señales mediante miembros fosforilantes de la familia SMAD de factores de transcripción, que al activarse entran en el núcleo y regulan la transcripción de genes sensibles (Massague, 1996). Experimentos recientes han implicado a dos receptores de tipo I diferentes en el modelado esquelético, BMPR-IA y BMPR-IB. Ambos receptores se expresan en patrones dinámicos durante el desarrollo normal. En varias estructuras límbicas, por ejemplo, en interzonas articulares y el pericondrio, se observa una expresión solapada de BMPR-IA y BMPR-IB (Mishina y cols., 1995; Zou y cols. 1997; Baur y cols. 2000). Con respecto a los patrones de expresión de BMPR-IA y BMPR-IB, la transducción de señales de GDF-5 debe ser efectuada por la interacción tanto con BMPR-IA como con BMPR-IB (Chang y cols., 1994; Zou y cols., 1997). Las mutaciones completas en el gen *bmpr-1 b* producen ratones viables con defectos en la formación de huesos y articulaciones que se asemejan mucho a los observados en ratones que carecen de GDF-5 (Storm y Kingsley, 1996; Yi y cols. 2000), mientras que se sabe que los ratones *bmpr-1a*/ mueren tempranamente en la embriogénesis (Mishina y cols. 1995). Sin embargo, una inactivación condicional de BMPR-IA bajo el control de un conductor GDF-5-Cre sortea la letalidad embrionaria y produce ratones viables que formaban normalmente articulaciones. Pero, después del nacimiento, el cartílago articular dentro de las articulaciones se desgasta en un proceso reminiscente de la osteoartritis, que apunta a la importancia de este receptor en la homeostasis y la reparación del cartílago (Rountree y cols., 2004).

La actividad de las proteínas silvestres de la familia de proteínas relacionadas con GDF-5 generalmente da como resultado la formación de cartílago y hueso. Sin embargo, existen diferentes afecciones médicas en las que es deseable una formación de cartílago, sin embargo, la formación de tejido óseo no se desea. Por ejemplo, es evidente que en caso de defectos articulares, la formación de cartílago es deseable mientras que se debe evitar la osificación.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es usar específicamente el efecto de inducción de formación de cartílago de proteínas relacionadas con GDF-5 y cortar el efecto inductor de la formación de hueso. Este objetivo se

resolvió al proporcionar proteínas variantes de GDF-5 humano maduro como las representadas por los aminoácidos 382 a 501 de SEQ ID N°: 2 que comprende una sustitución de aminoácido seleccionada de R399E, W417F y W417R. Sorprendentemente, se encontró que es posible proporcionar variantes de proteínas relacionadas con GDF-5 que tengan una capacidad mejorada para inducir la formación de cartílago y una capacidad reducida para inducir la formación de hueso. Esto se puede conseguir al modificar proteínas relacionadas con GDF-5 de modo que tengan una afinidad incrementada para el BMPR-IB y/o una afinidad reducida para el BMPR-IA.

GDF-5 silvestre se une a BMPR-IB in vitro con aproximadamente de 40 a 120 veces más afinidad ($K_D \square 8-27$ pM) en comparación con BMPR-IA ($K_D \square 1-1,1$ nM). Se encontró que al modificar la afinidad de unión de proteínas relacionadas con GDF-5 de modo que la afinidad para BMPR-IB se incrementa mientras se reduce la afinidad para BMPR-IA, se facilita la formación de cartílago mientras se reduce la formación de hueso. Esto se puede conseguir mediante sustituciones específicas de uno o más residuos de aminoácido con relación a un sitio de unión a BMPR-IB y/o BMPR-IA en la secuencia de aminoácidos de una proteína relacionada con GDF-5.

La afinidad de unión de proteínas relacionadas con GDF-5 que tienen sustituciones específicas se compara con la afinidad de unión de una proteína relacionada con GDF-5 silvestre humana, en particular GDF-5 silvestre humano.

A fin de evitar malentendidos y ambigüedades, algunos términos usados frecuentemente en la presente se definen y ejemplifican como sigue:

El término "dominio de nudo de cistina", según se usa en la presente, significa la región de aminoácidos rica en cisteína bien conocida y conservada que está presente en las partes maduras de proteínas de la superfamilia de TGF- β tales como, p. ej., GDF-5 humano y forma una estructura proteínica tridimensional conocida como nudo de cistina. En este dominio, la localización respectiva de los residuos de cisteína entre sí es importante y solo se deja variar ligeramente a fin de no perder la actividad biológica. Se ha demostrado que el dominio de nudo de cistina es suficiente para la función biológica de la proteína (Schreuder y cols. (2005), *Biochem Biophys Res Commun.* 329, 1076-86). Secuencias de consenso para dominios de nudo de cistina son muy conocidas en el estado de la especialidad. Según la definición definida en la presente, el dominio de nudo de cistina de una proteína empieza con el primer residuo de cisteína que participa en el nudo de cistina de la proteína respectiva y termina con el residuo que sigue a la última cisteína que participa en el nudo de cistina de la proteína respectiva. Por ejemplo, el dominio de nudo de cistina de la proteína precursora de GDF-5 humano (SEQ ID N°: 2) consiste en los aminoácidos 400-501 (véase también la FIG. 1).

El término "proteína relacionada con GDF-5" según se usa en la presente significa cualquier proteína presente en la naturaleza o creada artificialmente que esté muy estrechamente relacionada con el factor de crecimiento/diferenciación 5 humano (hGDF-5). Una característica común de todas las proteínas relacionadas con GDF-5 es la presencia de un dominio de nudo de cistina con una identidad de aminoácidos de al menos 60% con el dominio de nudo de cistina de 102 aa de GDF-5 humano (aminoácidos 400-501 of SEQ ID N°: 2), que es suficiente para la función biológica de la proteína. El término "proteínas relacionadas con GDF-5" incluye proteínas pertenecientes al grupo de proteínas de GDF-5, GDF-6 y GDF-7 procedentes de especies de vertebrados o mamíferos así como variantes recombinantes de las mismas con tal de que estas proteínas muestren el porcentaje de identidad susodicho con el dominio de nudo de cistina de GDF-5 humano. El valor limitativo de 60% es muy adecuado para separar miembros del grupo GDF-5/-6/-7 de proteínas así como variantes de los mismos de proteínas adicionales tales como GDF y BMP relacionados más distantemente. Una comparación de los dominios de nudo de cistina de 102 aa de GDF-5 humano, GDF-6 humano y GDF-7 humano (véase la FIG. 2) revela el alto grado de identidad de aminoácidos entre estas proteínas. El GDF-6 humano comparte 87 (85%) y el GDF-7 humano comparte 83 (81%) residuos idénticos con el dominio de nudo de cistina de GDF-5 humano. Los dominios respectivos de moléculas de GDF-5/-6/-7 procedentes de otras especies de vertebrados y mamíferos que se han identificado hasta ahora también muestran porcentajes de identidad muy altos de al menos 75% (entre 79% y 99%), en comparación con GDF-5 humano. En contraste, los GDF y BMP que no pertenecen al subgrupo GDF-5/-6/-7 presentan valores de identidad muy inferiores por debajo de 60%.

La determinación de posiciones de aminoácidos correspondientes en secuencias de aminoácidos relacionadas así como el cálculo de los porcentajes de identidad se pueden realizar fácilmente con la ayuda de algoritmos de alineamiento estándar y opcionalmente programas informáticos que usan estos algoritmos. Por ejemplo, las identidades de aminoácidos en esta solicitud de patente (es decir, la FIG. 2) se han calculado al alinear secuencias con el programa gratuito ClustalX (Versión 1.81) con parámetros por defecto y el recuento posterior de residuos idénticos a mano. Los ajustes por defecto para el alineamiento por pares (baja exactitud) son: parámetro de apertura de huecos: 10,00; parámetro de extensión de huecos 0,10; Matriz de peso de proteínas: Gonnet 250. El programa ClustalX se describe con detalle en Thompson, J. D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D.G. (1997): *The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research* 24:4876-4882. ClustalX es una interfaz de Windows para el programa de alineamiento de múltiples secuencias ClustalW y esta disponible, p. ej., de diversas fuentes, es decir mediante un ftp anónimo de <ftp-igbmc.u-strasbg.fr>, <ftp.embl-heidelberg.de>, <ftp.ebi.ac.uk> o a través de descarga desde la siguiente página de Internet: <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/>. El programa y el algoritmo ClustalW también se describen con

detalle en Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994): CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680. Proteínas relacionadas con GDF-5 especialmente preferidas presentan identidades de aminoácidos de al menos 70%, 80%, 90% o 95% con el dominio de nudo de cistina de 102 aa de GDF-5 humano.

Ejemplos no limitativos para proteínas relacionadas con GDF-5 de vertebrado y mamífero son precursores y proteínas maduras de GDF-5 humano (divulgado como MP52 en el documento WO95/04819 y como GDF-5 humano en Hotten y cols. 1994, *Biochem. Biophys Res. Commun.* 204, 646-652), GDF-5/MP52 humanos recombinantes (rh) (documento WO96/33215), MP52 Arg (documento WO97/06254); MP52 humanas de HMW (WO97/04095), CDMP-1 (documento WO96/14335), GDF-5 de ratón (*Mus musculus*) (documento US 5.801.014), GDF-5 de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) (Sanyal y cols. 2000, *Mol Biotechnol.* 16, 203-210), GDF-5 de pollo (*Gallus gallus*) (nº de registro del NCBI NP_989669), GDF-5 de rana africana de uñas (*Xenopus laevis*) (nº de registro del NCBI AAT99303), GDF-5 monómero (documentos WO 01/1 1041 y WO 99/6161 1), GDF-6/BMP-13 humanos (documento US 5.658.882), GDF-6 de ratón (nº de registro del NCNP_038554), GDF-6/CDMP-2 (WO96/14335), GDF-7/BMP-12 humanos (documento US 5.658.882), GDF-7 de ratón (nº de registro del NC AAP97721), GDF-7/CDMP-3 (documento WO96/14335). También se cubren por la invención proteínas relacionadas con GDF-5 que tienen mutaciones adicionales tales como sustituciones, adiciones y supresiones, con tal de que estas mutaciones adicionales no eliminen completamente la actividad biológica de la proteína.

La presente invención se basa en el hallazgo de los inventores de que es posible mediante modificaciones específicas en la región de la secuencia de aminoácidos de una proteína relacionada con GDF-5 que está implicada en la unión a BMPR-IB y/o BMPR-IA cambiar la proteína de tal modo que tenga una capacidad mejorada para inducir la formación de cartílago y una capacidad reducida para inducir la formación de hueso.

Se encontró que las proteínas que tienen una afinidad incrementada para BMPR-IB y/o proteínas que tienen una afinidad reducida para BMPR-IA son más capaces de inducir la formación de cartílago mientras que se reduce la formación de hueso. Estas propiedades son especialmente pronunciadas en proteínas que muestran tanto una afinidad incrementada para BMPR-IB como una afinidad reducida para BMPR-IA.

Las proteínas relacionadas con GDF-5 de la presente invención se pueden obtener mediante modificación química o tecnología de manipulación genética, prefiriéndose las proteínas recombinantes. Las proteínas se pueden obtener al reemplazar al menos un residuo de aminoácido con relación a un sitio de unión a BMPR-IB y/o BMPR-IA en la secuencia de aminoácidos de una proteína relacionada con GDF-5.

Una proteína de la invención es una variante de GDF-5 humano, por la que el residuo de triptófano en la posición 414 se intercambia con arginina (W414R). En referencia a la secuencia madura de GDF-5 (para el GDF-5 monómero maduro mostrado en SEQ ID N°: 4), esto corresponde a una sustitución en la posición 33. Sorprendentemente, se encontró que esta variante proteínica tiene una afinidad considerablemente reducida para el BMPR-IA. En contraste, la afinidad para el BMPR-IB está casi inalterada.

Una proteína variante de la invención adicional comprende la sustitución de aminoácidos R399E. En referencia a la secuencia madura de GDF-5 (para el GDF-5 monómero maduro mostrado en SEQ ID N°: 4), esto corresponde a una sustitución en la posición 18. Dicha variante proteínica tiene una afinidad reducida para el BMPR-IA.

Preferiblemente, las proteínas relacionadas con GDF-5 de la presente invención están presentes como proteínas "aisladas". Esto significa que la proteína de la presente invención está sustancialmente separada de otras proteínas y moléculas peptídicas que están presentes en la fuente natural de la proteína aislada (p. ej. otros polipéptidos de la proteína de la fuente natural). Por ejemplo, un péptido expresado recombinante se considera aislado. Según una realización preferida de la invención, la proteína variante es una proteína recombinante. Además, un péptido también se considera aislado si se ha alterado mediante intervención humana o ha sido expresado por un organismo que no es su fuente natural. Por otra parte, una proteína "aislada" está libre de algo del otro material celular con el que está asociado naturalmente cuando se sintetiza químicamente. Se excluyen específicamente de la definición de proteína "aislada" las mezclas o composiciones no purificadas.

Según otra realización, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica una proteína de la presente invención. El ácido nucleico tiene una secuencia tal que se alcance una sustitución de ciertos residuos con relación a un sitio de unión a BMPR-IB y/o BMPR-IA de la respectiva proteína relacionada con GDF-5 silvestre. Se conocen generalmente los tripletes de bases que codifican estos aminoácidos y la degeneración del código genético. El ácido nucleico puede ser una secuencia de ADN y/o una secuencia de ARN con tal de que la proteína según la invención se pueda obtener a partir de este ácido nucleico durante la expresión en un sistema adecuado. El ácido nucleico de la invención puede ser totalmente o parcialmente sintético. Los ácidos nucleicos comprenden secuencias polinucleotídicas de una sola hebra y/o totalmente o parcialmente de doble hebra. El ácido nucleico se puede producir mediante cualquier medio adecuado incluyendo preparaciones genómicas, preparaciones de ADNc, síntesis in vitro, PCR, RT-PCR y/o transcripción in vitro o in vivo.

Se prefieren particularmente ácidos nucleicos "aislados", que están sustancialmente separados de moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico (p. ej. secuencias que codifican otros polipéptidos). Preferiblemente, un ácido nucleico "aislado" está libre de al menos algunas de las secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir, secuencias situadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en su replicón presente en la naturaleza. Por ejemplo, un ácido nucleico clonado se considera aislado. Un ácido nucleico también se considera aislado si ha sido alterado mediante intervención humana o se ha situado en un locus o localización que no es su lado natural o si se introduce en una célula. Por otra parte, un ácido nucleico aislado puede estar libre de algo del otro material celular con el que está asociado naturalmente o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente.

De un modo preferido, los ácidos nucleicos de la invención se pueden preparar mediante una síntesis génica total o mediante mutagénesis dirigida al sitio del ácido nucleico que codifica proteínas relacionadas con GDF-5 silvestres o modificadas. Los métodos incluyen ligación dirigida por plantilla, PGR recursiva, mutagénesis con casetes, mutagénesis dirigida al sitio o se pueden utilizar otras técnicas que son muy conocidas en la especialidad.

Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden comprender secuencias de ácido nucleico adicionales que pueden añadir funciones adicionales al ácido nucleico aislado de la invención. Por ejemplo, tales secuencias de ácido nucleico adicionales pueden comprender secuencias de ácido nucleico que permiten la expresión apropiada de una proteína de la invención y pueden abarcar secuencias promotoras, secuencias reguladoras, señales de detención, orígenes de replicación y similares. El experto está totalmente al tanto de tales secuencias de ácido nucleico funcionales y de cómo disponerlas en orden para llegar a una molécula de ácido nucleico con las propiedades deseadas.

También se divulgan vectores de expresión en los que el ácido nucleico está insertado en un sistema vectorial adecuado, seleccionándose el sistema vectorial según la expresión deseada de la proteína. El sistema vectorial puede ser un sistema vectorial eucariótico sino que preferiblemente es un sistema vectorial procariótico con el que las proteínas se puede producir de un modo particularmente fácil y puro. Un vector de expresión adecuado se muestra, por ejemplo, en el documento WO 96/33215. El vector de expresión también puede ser un vector viral que se puede usar, por ejemplo, en enfoques de terapia génica.

También se divulgan células hospedadoras y organismos transgénicos. Las células hospedadoras y los organismos transgénicos se caracterizan por que contienen un ácido nucleico o un vector de expresión según la invención y por que son capaces de usar la información presente en los ácidos nucleicos y en el vector de expresión, respectivamente, para la expresión de las proteínas según la invención. Así, la presente divulgación se refiere a organismos o células transgénicos transformados o transfectados transitoriamente o establemente con al menos un ácido nucleico o al menos un vector que codifica una proteína de la invención o a una progenie de tales organismos o células transgénicos. Por otra parte, la presente divulgación se refiere a células, cultivos celulares, tejidos y/o partes de organismos transgénicos. Se entiende que para el propósito de la presente divulgación el término "organismo transgénico" no solo abarca el organismo en el que el ácido nucleico de la invención se ha introducido transitoriamente o establemente sino que también se refiere a la progenie de tales organismos independientemente de la distancia generacional, con tal de que estos organismos todavía comprendan el ácido nucleico de la invención y expresen la proteína de la invención.

Preferiblemente, el organismo o la célula transgénica es de origen procariótico o eucariótico. Preferiblemente, el organismo transgénico es un microorganismo. Microorganismos preferidos son bacterias, levaduras, algas u hongos. Células hospedadoras adecuadas son preferiblemente células procarióticas, en particular cepas de E. coli. Células hospedadoras particularmente útiles son descendentes de E. coli W31 10 como los mostrados por ejemplo en el documento WO 96/33215. En una realización preferida, las células hospedadoras, preferiblemente de origen humano, también pueden ser útiles para un trasplante a pacientes que los necesiten.

La preparación de un organismo transformado o de una célula transformada requiere introducir el ADN apropiado en el organismo o célula hospedador apropiado. Esta disponible una multitud de métodos para este procedimiento que se denomina transformación. Así, a modo de ejemplo, el ADN se puede introducir directamente mediante microinyección o mediante bombardeo de micropartículas o nanopartículas revestidas con ADN. La célula también se puede permeabilizar químicamente, por ejemplo usando polietilenglicol, de modo que el ADN pueda entrar en la célula a través de difusión. El ADN también se puede transformar a través de fusión de protoplastos con otras unidades que contienen ADN tales como minicélulas, células, lisosomas o liposomas. Otro método adecuado para introducir ADN es la electroporación en la que las células se permeabilizan reversiblemente mediante un impulso eléctrico.

También se analiza en la presente un método para producir una proteína que tiene una capacidad mejorada para inducir la formación de cartílago y una capacidad reducida para inducir la formación de hueso, que comprende las etapas de:

(i) aleatorizar al menos una posición de aminoácido en una región de una proteína relacionada con GDF-5 con relación a un sitio de unión a BMPR-IB y/o BMPR-IA a fin de obtener variantes proteínicas,

(ii) analizar las variantes proteínicas obtenidas en (i) con respecto a su afinidad para el BMPR-IB y/o el BMPR-IA,

5 (iii) seleccionar las variantes proteínicas que proporcionan una afinidad incrementada para el BMPR-IB y/o una afinidad reducida para el BMPR-IA.

Las regiones de una proteína relacionada con GDF-5 implicada en la unión a BMPR-IA o BMPR-IB se conocen en la especialidad. En la etapa (i) al menos una posición de aminoácido en uno o ambas de estas regiones se aleatoriza. Se prefiere aleatorizar al menos dos, tres o más posiciones de aminoácido. Los aminoácidos presentes en la secuencia silvestre de una proteína relacionada con GDF-5 se reemplazan por otros aminoácidos mediante modificaciones químicas o preferiblemente mediante tecnología de manipulación genética. Métodos para producir las variantes proteínicas aleatorizadas de la etapa (i) abarcan la síntesis de novo sintética de las proteínas y/o la expresión de las proteínas a partir de un ácido nucleico que codifica las mismas. De un modo preferido particular, las variantes proteínicas de la etapa (i) se preparan mediante expresión usando los respectivos ácidos nucleicos.

15 Preferiblemente, se obtienen variantes proteínicas para todos los otros aminoácidos posibles en la posición pertinente. Sin embargo, también es posible llevar a cabo una sustitución específica de uno o más aminoácidos por otros aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos hidrófilos se pueden reemplazar por aminoácidos hidrófobos. Alternativamente, los aminoácidos hidrófobos se pueden reemplazar por aminoácidos hidrófilos. También es posible una sustitución conservativa, en la que se mantiene el carácter hidrófilo o hidrófobo. Mediante la sustitución, 20 preferiblemente se lleva a cabo un intercambio por un aminoácido que tiene otra demanda estérica.

La pluralidad de variantes proteínicas obtenida en la etapa (i) se analiza a continuación con respecto a su afinidad para BMPR-IB y/o para BMPR-IA. Esto se puede efectuar de un modo que es conocido y habitual en el campo técnico. Métodos para evaluar interacciones proteína-receptor son una práctica común.

25 En la etapa (iii), se seleccionan las variantes proteínicas que proporcionan una afinidad incrementada para BMPR-IB y/o una afinidad reducida para BMPR-IA. Sorprendentemente, se encontró que estas proteínas particulares tienen una capacidad mejorada para inducir la formación de cartílago y una capacidad reducida para inducir la formación de hueso.

30 Se divulgan además anticuerpos contra las proteínas relacionadas con GDF-5 descritas. Estos anticuerpos son específicos para las proteínas relacionadas con GDF-5 recombinantes reivindicadas. Preferiblemente, son específicos para las regiones de proteínas relacionadas con GDF-5 que contienen una o más de las sustituciones de aminoácidos descritas en la presente. Preferiblemente, los anticuerpos son específicos para una región de una proteína recombinante derivada de una proteína relacionada con GDF-5 con relación a un sitio de unión a BMPR-IB y/o BMPR-IA. Estos anticuerpos se pueden generar al usar los fragmentos de las proteínas que se describen anteriormente como inmunógenos para generar anticuerpos mediante métodos conocidos. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden ser cualesquiera isotipos. También se divulgan fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos Fab o fragmentos Fab₂. Los anticuerpos también pueden ser anticuerpos humanizados o anticuerpos genéricos, etc.

45 Los anticuerpos son, entre otras cosas, adecuados como una herramienta analítica. Se pueden usar para investigar la absorción y la distribución de una proteína según la invención en el cuerpo. Por otra parte, los anticuerpos anteriores son adecuados para estudiar la cinética de liberación.

Una materia adicional de la presente solicitud es una composición farmacéutica que comprende la proteína relacionada con GDF-5 recombinante o un ácido nucleico o un vector o una célula hospedadora según la invención. En principio, son adecuadas cualesquiera composiciones farmacéuticas que ya se hayan publicado en contexto con proteínas relacionadas con GDF-5. Un vector de expresión o una célula hospedadora se pueden considerar ventajosos como sustancias activas en una composición farmacéutica. También se pueden usar combinaciones de una proteína según la invención con otras proteínas en composiciones farmacéuticas preferidas. Por supuesto, la invención también comprende composiciones farmacéuticas que contienen sustancias adicionales como, p. ej., aditivos o portadores farmacológicamente aceptables. La formulación puede incluir antioxidantes, conservantes, agentes colorantes, saborizantes y emulsionantes, agentes de suspensión, disolventes, cargas, agentes de aumento de volumen, tampones, vehículos de aporte, excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Por ejemplo, un portador o vehículo adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o una solución salina mezclada con una proteína portadora adecuada tal como albúmina sérica. Un antioxidante preferido para la preparación de la composición de la presente invención es el ácido ascórbico.

60 El disolvente o diluyente de la composición farmacéutica puede ser bien acuoso o bien no acuoso y puede contener otros excipientes farmacéuticamente aceptables que son capaces de modificar y/o mantener un pH, una osmolaridad, una viscosidad, una transparencia, una escala, una esterilidad, una estabilidad, una velocidad de

disolución o un olor de la formulación. De forma similar, se pueden incluir otros componentes en la composición farmacéutica según la presente invención a fin de modificar y/o mantener la velocidad de liberación de la sustancia farmacéuticamente eficaz. Tales componentes modificadores son sustancias empleadas habitualmente en la especialidad a fin de formular dosificaciones para administración parenteral en forma bien unitaria o bien de múltiples dosis.

La composición farmacéutica finalmente formulada preparada según la presente invención se puede almacenar en viales estériles en la forma de una solución, una suspensión, un gel, una emulsión, un polvo sólido o deshidratado o liofilizado. Estas formulaciones se pueden almacenar bien en una forma lista para usar o bien en una forma, p. ej. en el caso de un polvo liofilizado, que requiera reconstitución antes de la administración. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas anteriores y otras se conocen en la especialidad y se describen, por ejemplo, en Gus Remington's Pharmaceutical Sciences (18^a Ed., Mack Publishing Co., Eastern, Pa., 1990, 1435-1712). Tales formulaciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación in vivo y la velocidad de depuración in vivo del componente farmacéuticamente eficaz.

Otras formas de administración eficaces comprenden formulaciones parenterales de liberación lenta, es decir retardadas, nebulizaciones inhaladas o formulaciones oralmente activas. Por ejemplo, una formulación de liberación lenta puede comprender proteínas unidas a o incorporadas en preparaciones en partículas de compuestos poliméricos (tales como poli(ácido láctico, poli(ácido glicólico), etc.) o liposomas.

La composición farmacéutica según la presente invención también se puede formular para administración parenteral, p. ej., mediante infusión o inyección, y también puede incluir formulaciones de liberación lenta o circulación sostenida. Tales composiciones terapéuticas administradas parenteralmente típicamente están en la forma de soluciones acuosas parenteralmente aceptables libres de pirógenos que comprenden el componente o los componentes farmacéuticamente eficaces en un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica puede comprender un material de matriz, p. ej. en casos en los que se pretende la regeneración de cartilago. Es ventajoso para la proteína, el ácido nucleico, el vector de expresión o la célula hospedadora que se apliquen en y/o sobre un material de matriz biocompatible. Material de matriz, según se usa en la presente, significa un portador o una matriz que actúa como un andamiaje para la incorporación, la ligazón, la proliferación y la diferenciación celulares y/o como un dispositivo potencial de aporte y almacenamiento para las proteínas relacionadas con GDF-5 recombinantes de la invención. En contraste con las matrices sólidas, los portadores consisten en materiales amorfos que no tienen superficies definidas y que carecen de una conformación específica, es decir alquilcelulosa, pluronics, gelatinas, polietilenglicoles, dextrinas, aceites vegetales, azúcares y otras sustancias líquidas y viscosas.

Materiales de matriz ejemplares se describen, por ejemplo, en el documento WO 98/21972. Estos materiales de matriz son igualmente adecuados para las proteínas según la invención. El material de matriz puede ser trasplantado al paciente, p. ej. quirúrgicamente, en donde la proteína o el ADN que codifica la proteína puede ser liberado lentamente desde el material de matriz y a continuación ser eficaz a lo largo de un período prolongado. Todos los tipos de materiales de matriz son útiles según la presente invención con tal de que sean biocompatibles y se seleccionen para la zona o indicación de uso. El material de matriz puede ser un material natural, un material natural modificado así como un material sintético. Se abarcan todas las matrices ya conocidas para proteínas morfogenéticas. La matriz extracelular comprende por ejemplo diversos colágenos como por ejemplo los tipos I, II, V, IX, X, XI y XIII, proteoglicanos y glicosaminoglicanos adicionales como, por ejemplo, sulfatos de condroitina, biglicanos, decorinas y/o ácido hialurónico o proteínas no colagenosas como, p. ej., osteopontina, laminina, fibronectina, vitronectina y proteína de matriz del cartilago. Todos los materiales naturales mencionados también se pueden usar en formas modificadas artificialmente. Para una lista no limitativa de portadores y matrices útiles, véase además Kirker-Head, 2000, Advanced Drug Delivery 43, 65-92).

Una posibilidad adicional se refiere a formulaciones liposómicas que comprenden la proteína relacionada con GDF-5 recombinante según la invención. Los liposomas usados en dichas formulaciones son conocidos comúnmente para el experto en la especialidad. En particular, formulaciones liposómicas preferidas se divulgan en el documento WO 2008/049588. Formulaciones liposómicas más preferidas se describen en las páginas 9 a 13 del documento WO 2008/049588.

Por otra parte, las proteínas variantes de GDF-5 de la invención se pueden administrar en combinación con otras sustancias farmacéuticamente activas. Dichas sustancias farmacéuticamente activas pueden ser, por ejemplo, analgésicos tales como analgésicos localmente eficaces u otras sustancias que tienen un efecto positivo sobre enfermedades, en las que se desea la formación de cartilago, como inhibidores de proteasas. Estos son solo ejemplos de posibles aditivos, y un trabajador experto en la especialidad puede añadir fácilmente otros excipientes que se usan en preparaciones farmacéuticas o que generalmente se consideran seguros.

Debido a su capacidad mejorada para inducir la formación de cartilago, las proteínas variantes de GDF-5 recombinantes la presente invención son particularmente adecuadas para el uso en el tratamiento de enfermedades, en las que se desea la formación de cartilago pero la formación de hueso no es deseable. Así, otro aspecto de la

presente invención es el uso de las proteínas, los ácidos nucleicos, los vectores o las células hospedadoras presentes en el tratamiento de estas enfermedades. En particular, las proteínas, los ácidos nucleicos, los vectores o las células hospedadoras presentes se usan en el tratamiento de defectos del cartílago o para el tratamiento de la rotura o la separación traumática del cartílago, en particular defectos del cartílago relacionados con la edad, por ejemplo debidos a desgaste, osteoartritis, artritis reumatoide, lesiones relacionadas con el deporte, enfermedades que pueden afectar al cartílago como condrodistrofias, enfermedades caracterizadas por una perturbación del crecimiento y la posterior osificación del cartílago, acondroplasia, costocondritis, hernia discal y reparación discal, policondritis recidivante, reparación de defectos del cartílago asociados con tumores, bien benignos o bien malignos, como condroma o condrosarcoma.

Otro aspecto es un método para el tratamiento de enfermedades, en las que se desea la formación de cartílago pero no se desea la formación de hueso, que comprende la etapa de administrar una proteína, un ácido nucleico, un vector o una célula hospedadora según la invención a un paciente que necesite tal tratamiento.

Según se usa en la presente, el término "tratar" se refiere a invertir, aliviar, o inhibir el avance de una enfermedad, un trastorno o una afección o uno o más síntomas de tal enfermedad, trastorno o afección a la que se aplica tal término. Según se usa en la presente, tratar también se puede referir a disminuir la probabilidad o incidencia de la presencia de una enfermedad, un trastorno o una afección en un mamífero en comparación con una población de control no tratada o en comparación con el mismo mamífero antes del tratamiento. Por ejemplo, según se usa en la presente, tratar se puede referir a prevenir una enfermedad, un trastorno o una afección y puede incluir retrasar o prevenir el comienzo de una enfermedad, un trastorno o una afección y puede incluir retrasar o prevenir el comienzo de una enfermedad, un trastorno o una afección o retrasar o prevenir los síntomas asociados con una enfermedad, un trastorno o una afección. Según se usa en la presente, tratar también se puede referir a reducir la gravedad de una enfermedad, un trastorno o una afección o los síntomas asociados con tal enfermedad, trastorno o afección antes de que el mamífero sufra la enfermedad, el trastorno o la afección. Tal prevención o reducción de la gravedad de una enfermedad, un trastorno o una afección antes del sufrimiento se refiere a la administración de la composición de la presente invención que se describe en la presente a un sujeto que no es en el momento de la administración cuando sufre la enfermedad, el trastorno o la afección. Según se usa en la presente, tratar también se puede referir a prevenir la recaída de una enfermedad, un trastorno o una afección o de uno o más síntomas asociados con tal enfermedad, trastorno o afección.

Los siguientes Ejemplos junto con las Figuras y los Protocolos de secuencia pretenden ilustrar adicionalmente la invención.

La SEQ ID N°: 1 muestra la secuencia de ADN y la SEQ ID N°: 2 muestra la secuencia proteínica del precursor de GDF-5 humano.

SEQ ID N°: 3 muestra la secuencia de ADN y la SEQ ID N°: 4 muestra la secuencia proteínica del GDF-5 monómero maduro humano.

Figuras

La FIG. 1 muestra características adicionales de la proteína precursora de GDF-5 humana según la SEQ ID N°: 2:

aa 001-381 preprodominio (letras en negrita)

aa 001-027 péptido de señal (negrita y subrayado)

aa 382-501 parte proteínica madura

aa 400-501 dominio de nudo de cistina (subrayado)

La FIG. 2 muestra una comparación de los dominios de nudo de cistina de 102 aa de GDF-5 humano (SEQ ID N°: 2), GDF-6 humano (secuencia 26 de la Pat. EE. UU. N° 5.658.882) y GDF-7 humano (secuencia 2 de la Pat. EE. UU. N° 5.658.882). Los residuos de aminoácido que son idénticos en las tres moléculas se destacan mediante márgenes.

La FIG. 3 muestra los resultados de un ensayo de fosfatasa alcalina (ALP) con mutante de GDF-5 humano recombinante W414R (según se describe en el ejemplo 2).

FIG. 4 muestra los resultados de un ensayo de fosfatasa alcalina (ALP) con mutante de GDF-5 humano recombinante I449V (según se describe en el ejemplo 3).

FIG. 5 muestra los resultados de un ensayo de fosfatasa alcalina (ALP) con mutante de GDF-5 humano recombinante R399E (según se describe en el ejemplo 3).

FIG. 6 muestra los resultados de un ensayo de fosfatasa alcalina (ALP) con mutante de GDF-5 humano recombinante S439E (según se describe en el ejemplo 3).

5 FIG. 7 muestra los resultados de un ensayo de fosfatasa alcalina (ALP) con mutante de GDF-5 humano recombinante R399M (según se describe en el ejemplo 3).

FIG. 8 muestra los resultados de un ensayo de fosfatasa alcalina (ALP) con mutante de GDF-5 humano recombinante W414R (según se describe en el ejemplo 3).

Ejemplo 1: Creación, expresión y purificación de proteínas relacionadas con GDF

10 Se han aislado ADN que codifican las partes maduras de proteínas de GDF-5 humano, GDF-6 humano y GDF-7 humano de células osteoprogenitoras ROB-C26 humanas (Yamaguchi y cols. 1991, Calcif. Tissue Int. 49, 221-225) a través de la técnica RT-PCR y posteriormente se han ligado a vectores plasmídicos procarióticos. A fin de identificar residuos de aminoácido funcionalmente importantes en las partes maduras de GDF-5, -6 y -7, se han introducido diversas mutaciones individuales en estas secuencias a través de mutagénesis dirigida al sitio.

15 Todas las mutaciones individuales se crearon al usar el estuche de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange™ con la ADN polimerasa PfuTurbo™ y la DPN I endonucleasa de Stratagene según el manual de instrucciones del fabricante.

20 Usando la cepa bacteriana W3110BP transformada con los plásmidos e inducida con IPTG, las proteínas se expresaron en cuerpos de inclusión. Estos cuerpos de inclusión se aislaron usando un tampón de homogeneización (Tris HCl 25 mM pH 7,3, EDTA NaOH 10 mM pH 8, urea 8 M) y tampón de lavado (urea 1 M, Tris HCl 20 mM, pH 8,3, EDTA NaOH 10 mM pH 8,0) según procedimientos estándar. Se llevó a cabo una purificación adicional en una columna en fase inversa Aquapore Octyl (Applied Biosys, (CV = 7,8 ml) 100x10, 20μ, N° 186470) con un gradiente de 100% de Eluyente A (TFA al 0,1%, HPLC H₂O) a 100% de Eluyente B (TFA al 0,1%, CH₃N al 90%, HPLC H₂O) en 104 minutos (caudal: 3 ml/min). Después de un control por transferencia Western, las fracciones que contenían la proteína mutante se reunieron y se liofilizaron.

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

35 A continuación, la solución se incubó durante 48 h a 22°C y el repliegue se detuvo al cambiar el pH hasta 3-4 añadiendo HCl al 18%. Después de la centrifugación, el monómero no replegado se separó de la forma dímera al llevar a cabo una segunda RP-HPLC bajo las mismas condiciones. Las fracciones que contenían la proteína dimerizada se reunieron, se liofilizaron y se almacenaron a -70°C.

40 Ejemplo 2: Medida de la actividad biológica de diferentes variantes de proteínas relacionadas con GDF in vitro mediante ensayo de ALP

Se incubaron $2,0 \times 10^5$ células de C2C12-Ib (una línea celular que sobreexpresa establemente el receptor BMPR-IB) y células de C2C12 durante 3-4 días en 20 ml de medio de cultivo celular (α -MEM, penicilina/estreptomicina, L-glutamina 2 mM, FCS al 10%) a 37°C, CO₂ al 5%, saturado con H₂O. Posteriormente, las células se lavaron con PBS (solución salina tamponada con fosfato), se tripsinizaron y se resuspendieron en medio de cultivo hasta una densidad de 3×10^4 células/ml. Se transfirieron 150 μl a cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h a 37°C, CO₂ al 5%, saturado con H₂O. Después de lavar con medio los pocillos se cargaron con 120 μl de nuevo medio de cultivo. Se añadieron 40 μl de diferentes soluciones de proteína mutante o silvestre (disuelta en HCl 10 mM y diluida al menos 250 veces en medio), seguido por otra etapa de incubación durante 72 h a 37°C, CO₂ al 5%, saturado con H₂O. Después de lavar con PBS, se añadieron 150 μl de solución de lisis (0,2% de Nonidet P40, 0,2 g de MgCl₂ x 6H₂O, ajustado hasta 1.000 ml con agua), seguido por una incubación de 15-18 h a 37°C, CO₂ al 5%, saturado con H₂O. Posteriormente, se transfirieron 50 μl de cada pocillo a una nueva placa de 96 pocillos. A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 μl de solución de sustrato (tampón de sustrato de dietanolamina concentrado 2,5 veces + 148 g/l de PNPP (p-nitrofenilfosfato sódico)) y las placas se incubaron durante 4 min. a 37°C, CO₂ al 5%, saturado con H₂O. La reacción de ALP se detuvo posteriormente con 100 μl de 30 g/l de NaOH y finalmente la densidad óptica se midió con un lector de microplacas automático a 405 nm considerando la sustracción del valor del blanco.

Como un ejemplo, los resultados (valores promedio de 2 experimentos independientes) que se refieren a mutante de hGDF-5 W414R para células C2C12-Ib se muestran en la FIG. 3. Se han usado en este ensayo cinco concentraciones de proteína diferentes (14 ng/ml, 44,5 ng/ml, 133,2 ng/ml, 400 ng/ml y 1.200 ng/ml). La proteína mutante W414R exhibe actividad biológica en células en las que se sobreexpresa el receptor BMPR-IB (células C2C12-Ib), indicando que el sitio de unión a BMPR-IB de W414R es funcionalmente activo. La proteína silvestre (rhGDF-5) servía como un control en el sistema de ensayo.

Resultados adicionales de la actividad biológica de mutantes de hGDF-5 adicionales para las líneas celulares C2C12 y C2C12-Ib se muestran en la tabla 1.

Ejemplo 3: Medida de la actividad biológica de diferentes variantes de proteínas relacionadas con GDF in vitro mediante el ensayo de ALP

Se incubaron 5×10^5 células para ATDC-5 y 5×10^5 células para MCHT1/26 durante 3-4 días en 20 ml de medio de cultivo celular (α -MEM, L-glutamina 2 mM, FCS al 10%, para MCHT1/26; DMEM/F12 (1:1), FCS al 5%) a 37°C, CO₂ al 5%, saturado con H₂O. Posteriormente, las células se lavaron con PBS (solución salina tamponada con fosfato), se tripsinizaron y se resuspendieron en medio de cultivo hasta una densidad de 3×10^4 células/ml. Se transfirieron 150 μ l a cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h a 37°C, CO₂ al 5%, saturado con H₂O. Después de lavar con medio los pocillos se cargaron con 120 μ l de nuevo medio de cultivo para MCHT1/26 y se añadieron 120 μ l de medio de ensayo para ATDC-5 (DMEM/F12 (1:1), FCS al 0,5%) más 40 μ l de diferentes diluciones de proteína mutante o silvestre (disuelta en HCl 10 mM y diluida al menos 250 veces en medio), seguido por otra etapa de incubación durante 72 h a 37°C, CO₂ al 5%, saturado con H₂O. Después de lavar con PBS, se añadieron 150 μ l de solución de lisis (solución de lisis MCHT1/26: Nonidet P40 al 0,2%, MgCl₂ 1 mM; solución de lisis ATDC-5: glicina Na 100 mM, Nonidet P40 al 1%, MgCl₂ 1 mM), seguido por 1 h de incubación para ATDC-5 y 15 – 18 h para MCHT1/26 a 37°C, CO₂ al 5%, saturado con H₂O. Posteriormente, se transfirieron 50 μ l de cada pocillo a una nueva placa de 96 pocillos. A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 μ l de solución de sustrato (tampón de sustrato de dietanolamina concentrado 2,5 veces + 148 g/l de PNPP (p-nitrofenilfosfato sódico)) y las placas se incubaron durante otras 60 min. a 37°C, CO₂ al 5%, saturado con H₂O. La reacción de ALP se detuvo posteriormente con 100 μ l de 30 g/l de NaOH y finalmente la densidad óptica se midió con un lector de microplacas automático a 405 nm considerando la sustracción del valor del blanco.

Resultados ejemplares (valores promedio de 2 experimentos independientes) relativos a los mutantes de hGDF-5 I449V, R399E, S439E, R399M, W414R se muestran en las FIG. 4-8, respectivamente. Se han usado en este ensayo cinco concentraciones de proteína diferentes (14,8 ng/ml, 44,5 ng/ml, 133,2 ng/ml, 400 ng/ml, 1.200 ng/ml). En comparación con GDF-5 silvestre, las proteínas mutantes exhiben una actividad biológicamente superior sobre células ATDC-5 en comparación con células MCHT1/26 en este sistema de ensayo.

Ejemplo 4: Medidas de afinidad con Biacore de proteínas relacionadas con GDF-5

Se usó un sistema BiacoreT100 (Biacore, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB) para todos los experimentos con biosensores. Aproximadamente 200 unidades de resonancia (RU) de los ectodominios receptores de proteínas de fusión de Fc de BMPR-IB, BMPR-IA o BMPR-II se inmovilizaron en chips biosensores G CM5. Se registraron sensogramas de interacción a un caudal de 60 μ l/min. a 30°C en HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 300 mM, EDTA 3,4 mM, Tween 20 al 0,005%. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado usando concentraciones de ligando de 0,05 a 100 nM. Todas las afinidades de unión aparentes se obtuvieron usando BIAevaluation v. 2.2.4 (Biacore, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, GB). Las afinidades para la interacción a receptor tipo de ligando se derivaron al ajustar los datos cinéticos a un modelo de unión de Langmuir 1:1 (*KD* (kin)). Debido a la cinética de unión rápida (que supera 10⁶ M⁻¹ s⁻¹ (para *kon*) y 10⁻² s⁻¹ (para *koff*)) las afinidades de unión aparentes para la interacción ligando:BMPR-II se determinaron a partir de la dependencia con la dosis de la unión en equilibrio (*KD* (eq)).

Los resultados de las medidas de afinidad con Biacore para diferentes variantes de GDF-5 humano se muestran en la tabla 1.

	ALP				Biacore (KD)			Afinidad de IB veces superior sobre IA	Afinidad de IB veces superior sobre IA en comparación con WT
	MOHT1/26	ATDC-5	C2C12	C2C12-1b	BMPR-IA	BMPR-IB	BMPR-II	KD(IA) : KD(IB) (M)	
GDF-5 WT	+++	+++	0	+++	1* - 1,1** nM	8* - 27** pM	32 nM	40** - 122*	1
R399M	+++	++++	+	++	0.54 nM*	2.5 pM*	32 nM	216*	1,8
R399E	0	+++	0	++	22.5 nM*	172 pM*	32 nM	130*	1,1
M412V	0	++	0	++	13 nM**	39 pM**	n.d.	333**	8,3
W414R	0	+	0	+++	20.3 nM*	30 pM*	no binding	668*	5,5
W417F	0/+	+	0	+++	27 nM**	46 pM**	n.d.	587**	14,7
W417R	0	+	0	+++	98 nM**	37 pM**	n.d.	2649**	66,2
R438K	+	++	0	++(+)	32.5 nM*	45 pM*	32 nM	717*	5,9
S439K	0	+	0	++	43.4 nM*	10 pM*	10 nM	2400*	19,7
S439E	0	++	0	++(+)	25 nM**	43 pM**	n.d.	581**	14,5
I449V	0/+	+	0	++(+)	5.7 nM**	26 pM**	n.d.	219**	5,5

* = Resultados de la medida de afinidad 1 relativos a GDF-5, afinidad a BMPR-IA: 1 nM, afinidad a BMPR-IB: 8 pM

** = Resultados de la medida de afinidad 2 relativos a GDF-5, afinidad a BMPR-IA: 1,1 nM, afinidad a BMPR-IB: 27 pM

5 0 = Sin actividad de ALP

+ a +++++ = Actividad de ALP, el número + representa la intensidad de la actividad de ALP

n. d. = no determinado

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Biopharm Gesellschaft zur biotechnologischen Entwicklung von Pharmaka mbH

5 <120> Mutante de GDF-5 para inducir la formación de cartílago

<130> 52328P EP

<160> 4

10 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2703

15 <212> ADN

<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

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

<223> precursor de GDF-5

<400> 1

```

ccatggcctc gaaagggcag cggtgatttt tttcacataa atatatcgca cttaaagtga      60
tttagacagc atgacatcag agagtaatta aattggtttg ggttggaatt ccgtttccaa      120
ttcctgagtt caggtttgta aaagattttt ctgagcacct gcaggcctgt gagtgtgtgt      180
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtga agtattttca ctggaaagga ttcaaaacta      240
gggggaaaaa aaaactggag cacacaggca gcattacgcc attcttcctt cttggaaaaa      300
tccctcagcc ttatacaagc ctccctcaag ccctcagtca gttgtgcagg agaaaggggg      360
cggttggctt tctcctttca agaacgagtt attttcagct gctgactgga gacggtgcac      420
gtctggatac gagagcattt ccactatggg actggatata aacacacacc cggcagactt      480
caagagtctc agactgagga gaaagccttt ccttctgctg ctactgctgc tgccgctgct      540
tttgaagtc cactcctttc atggtttttc ctgccaaacc agaggcacct ttgctgctgc      600
cgctgttctc tttggtgtca ttcagcggct ggccagagg atg aga ctc ccc aaa      654
                               Met Arg Leu Pro Lys
                               1           5

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

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

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

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

```

25

55	60	65	
acc aat gcc aat gcc agg gca aag gga ggc acc ggg cag aca gga ggc Thr Asn Ala Asn Ala Arg Ala Lys Gly Gly Thr Gly Gln Thr Gly Gly 70 75 80 85			894
ctg aca cag ccc aag aag gat gaa ccc aaa aag ctg ccc ccc aga ccg Leu Thr Gln Pro Lys Lys Asp Glu Pro Lys Lys Leu Pro Pro Arg Pro 90 95 100			942
ggc ggc cct gaa ccc aag cca gga cac cct ccc caa aca agg cag gct Gly Gly Pro Glu Pro Lys Pro Gly His Pro Pro Gln Thr Arg Gln Ala 105 110 115			990
aca gcc cgg act gtg acc cca aaa gga cag ctt ccc gga ggc aag gca Thr Ala Arg Thr Val Thr Pro Lys Gly Gln Leu Pro Gly Gly Lys Ala 120 125 130			1038
ccc cca aaa gca gga tct gtc ccc agc tcc ttc ctg ctg aag aag gcc Pro Pro Lys Ala Gly Ser Val Pro Ser Ser Phe Leu Leu Lys Lys Ala 135 140 145			1086
agg gag ccc ggg ccc cca cga gag ccc aag gag ccg ttt cgc cca ccc Arg Glu Pro Gly Pro Pro Arg Glu Pro Lys Glu Pro Phe Arg Pro Pro 150 155 160 165			1134
ccc atc aca ccc cac gag tac atg ctc tcg ctg tac agg acg ctg tcc Pro Ile Thr Pro His Glu Tyr Met Leu Ser Leu Tyr Arg Thr Leu Ser 170 175 180			1182
gat gct gac aga aag gga ggc aac agc agc gtg aag ttg gag gct ggc Asp Ala Asp Arg Lys Gly Gly Asn Ser Ser Val Lys Leu Glu Ala Gly 185 190 195			1230
ctg gcc aac acc atc acc agc ttt att gac aaa ggg caa gat gac cga Leu Ala Asn Thr Ile Thr Ser Phe Ile Asp Lys Gly Gln Asp Asp Arg 200 205 210			1278
ggt ccc gtg gtc agg aag cag agg tac gtg ttt gac att agt gcc ctg Gly Pro Val Val Arg Lys Gln Arg Tyr Val Phe Asp Ile Ser Ala Leu 215 220 225			1326
gag aag gat ggg ctg ctg ggg gcc gag ctg cgg atc ttg cgg aag aag Glu Lys Asp Gly Leu Leu Gly Ala Glu Leu Arg Ile Leu Arg Lys Lys 230 235 240 245			1374
ccc tcg gac acg gcc aag cca gcg gcc ccc gga ggc ggg cgg gct gcc Pro Ser Asp Thr Ala Lys Pro Ala Ala Pro Gly Gly Gly Arg Ala Ala 250 255 260			1422
cag ctg aag ctg tcc agc tgc ccc agc ggc cgg cag ccg gcc tcc ttg Gln Leu Lys Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gly Arg Gln Pro Ala Ser Leu 265 270 275			1470
ctg gat gtg cgc tcc gtg cca ggc ctg gac gga tct ggc tgg gag gtg Leu Asp Val Arg Ser Val Pro Gly Leu Asp Gly Ser Trp Glu Val 280 285 290			1518
ttc gac atc tgg aag ctc ttc cga aac ttt aag aac tcg gcc cag ctg Phe Asp Ile Trp Lys Leu Phe Arg Asn Phe Lys Asn Ser Ala Gln Leu 295 300 305			1566
tgc ctg gag ctg gag gcc tgg gaa cgg ggc agg gcc gtg gac ctc cgt			1614

Cys	Leu	Glu	Leu	Glu	Ala	Trp	Glu	Arg	Gly	Arg	Ala	Val	Asp	Leu	Arg	
310					315					320					325	
ggc	ctg	ggc	ttc	gac	cgc	gcc	gcc	cgg	cag	gtc	cac	gag	aag	gcc	ctg	1662
Gly	Leu	Gly	Phe	Asp	Arg	Ala	Ala	Arg	Gln	Val	His	Glu	Lys	Ala	Leu	
				330					335					340		
ttc	ctg	gtg	ttt	ggc	cgc	acc	aag	aaa	cgg	gac	ctg	ttc	ttt	aat	gag	1710
Phe	Leu	Val	Phe	Gly	Arg	Thr	Lys	Lys	Arg	Asp	Leu	Phe	Phe	Asn	Glu	
			345					350					355			
att	aag	gcc	cgc	tct	ggc	cag	gac	gat	aag	acc	gtg	tat	gag	tac	ctg	1758
Ile	Lys	Ala	Arg	Ser	Gly	Gln	Asp	Asp	Lys	Thr	Val	Tyr	Glu	Tyr	Leu	
		360					365					370				
ttc	agc	cag	cgg	cga	aaa	cgg	cgg	gcc	cca	ctg	gcc	act	cgc	cag	ggc	1806
Phe	Ser	Gln	Arg	Arg	Lys	Arg	Arg	Ala	Pro	Leu	Ala	Thr	Arg	Gln	Gly	
	375					380					385					
aag	cga	ccc	agc	aag	aac	ctt	aag	gct	cgc	tgc	agt	cgg	aag	gca	ctg	1854
Lys	Arg	Pro	Ser	Lys	Asn	Leu	Lys	Ala	Arg	Cys	Ser	Arg	Lys	Ala	Leu	
390					395					400					405	
cat	gtc	aac	ttc	aag	gac	atg	ggc	tgg	gac	gac	tgg	atc	atc	gca	ccc	1902
His	Val	Asn	Phe	Lys	Asp	Met	Gly	Trp	Asp	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	
				410					415					420		
ctt	gag	tac	gag	gct	ttc	cac	tgc	gag	ggg	ctg	tgc	gag	ttc	cca	ttg	1950
Leu	Glu	Tyr	Glu	Ala	Phe	His	Cys	Glu	Gly	Leu	Cys	Glu	Phe	Pro	Leu	
			425					430					435			
cgc	tcc	cac	ctg	gag	ccc	acg	aat	cat	gca	gtc	atc	cag	acc	ctg	atg	1998
Arg	Ser	His	Leu	Glu	Pro	Thr	Asn	His	Ala	Val	Ile	Gln	Thr	Leu	Met	
		440					445					450				
aac	tcc	atg	gac	ccc	gag	tcc	aca	cca	ccc	acc	tgc	tgt	gtg	ccc	acg	2046
Asn	Ser	Met	Asp	Pro	Glu	Ser	Thr	Pro	Pro	Thr	Cys	Cys	Val	Pro	Thr	
		455				460					465					
cgg	ctg	agt	ccc	atc	agc	atc	ctc	ttc	att	gac	tct	gcc	aac	aac	gtg	2094
Arg	Leu	Ser	Pro	Ile	Ser	Ile	Leu	Phe	Ile	Asp	Ser	Ala	Asn	Asn	Val	
470					475					480					485	
gtg	tat	aag	cag	tat	gag	gac	atg	gtc	gtg	gag	tgc	tgt	ggc	tgc	agg	2142
Val	Tyr	Lys	Gln	Tyr	Glu	Asp	Met	Val	Val	Glu	Ser	Cys	Gly	Cys	Arg	
				490					495					500		
tagcagcact	ggccctctgt	cttctctgggt	ggcacatccc	aagagcccct	tctgcactc											2202
ctggaatcac	agaggggtca	ggaagctgtg	gcaggagcat	ctacacagct	tgggtgaaag											2262
gggattccaa	taagcttgct	cgctctctga	gtgtgacttg	ggctaaaggc	ccccttttat											2322
ccacaagtcc	ccctggctga	ggattgctgc	cogtctgctg	atgtgaccag	tggcaggcac											2382
aggtccaggg	agacagactc	tgaatgggac	tgagtcccag	gaaacagtgc	tttccgatga											2442
gactcagccc	accattttctc	ctcacctggg	cottctcagc	ctctggactc	tctaagcac											2502
ctctcaggag	agccacaggt	gccactgcct	cctcaaatca	catttggtgcc	tgggtgacttc											2562
ctgtccctgg	gacagttgag	aagctgactg	ggcaagagtg	ggagagaaga	ggagagggct											2622

ES 2 630 853 T3

tggatagagt tgaggagtgt gaggctgtta gactgttaga tttaaagtga tattgatgag 2682

ataaaaagca aaactgtgcc t 2703

<210> 2

<211> 501

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 2

ES 2 630 853 T3

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

Gly Gln Asp Asp Arg Gly Pro Val Val Arg Lys Gln Arg Tyr Val Phe
 210 215 220
 Asp Ile Ser Ala Leu Glu Lys Asp Gly Leu Leu Gly Ala Glu Leu Arg
 225 230 235 240
 Ile Leu Arg Lys Lys Pro Ser Asp Thr Ala Lys Pro Ala Ala Pro Gly
 245 250 255
 Gly Gly Arg Ala Ala Gln Leu Lys Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gly Arg
 260 265 270
 Gln Pro Ala Ser Leu Leu Asp Val Arg Ser Val Pro Gly Leu Asp Gly
 275 280 285
 Ser Gly Trp Glu Val Phe Asp Ile Trp Lys Leu Phe Arg Asn Phe Lys
 290 295 300
 Asn Ser Ala Gln Leu Cys Leu Glu Leu Glu Ala Trp Glu Arg Gly Arg
 305 310 315 320
 Ala Val Asp Leu Arg Gly Leu Gly Phe Asp Arg Ala Ala Arg Gln Val
 325 330 335
 His Glu Lys Ala Leu Phe Leu Val Phe Gly Arg Thr Lys Lys Arg Asp
 340 345 350
 Leu Phe Phe Asn Glu Ile Lys Ala Arg Ser Gly Gln Asp Asp Lys Thr
 355 360 365
 Val Tyr Glu Tyr Leu Phe Ser Gln Arg Arg Lys Arg Arg Ala Pro Leu
 370 375 380
 Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala Arg Cys
 385 390 395 400
 Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp Asp Asp
 405 410 415
 Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu Gly Leu
 420 425 430
 Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Val
 435 440 445
 Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro Pro Thr
 450 455 460

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

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

Ser Cys Gly Cys Arg
500

<210> 3

<211> 360

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(360)

<223> GDF-5 monómero maduro humano

<400> 3

gca cca cta gca act cgt cag ggc aag cga ccc agc aag aac ctt aag 48
Ala Pro Leu Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys
1 5 10 15

gct cgc tgc agt cgg aag gca ctg cat gtc aac ttc aag gac atg ggc 96
Ala Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly
20 25 30

tgg gac gac tgg atc atc gca ccc ctt gag tac gag gct ttc cac tgc 144
Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys
35 40 45

gag ggg ctg tgc gag ttc cca ttg cgc tcc cac ctg gag ccc acg aat 192
Glu Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn
50 55 60

cat gca gtc atc cag acc ctg atg aac tcc atg gac ccc gag tcc aca 240
His Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr
65 70 75 80

cca ccc acc gcc tgt gtg ccc acg cga ctg agt ccc atc agc atc ctc 288
Pro Pro Thr Ala Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu
85 90 95

ttc att gac tct gcc aac aac gtg gtg tat aag cag tat gag gac atg 336
Phe Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met
100 105 110

gtc gtg gag tcg tgt ggc tgt agg 360
Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg
115 120

<210> 4

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 630 853 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Proteína variante de GDF-5 humano maduro representada por los aminoácidos 382 - 501 de SEQ ID N°: 2 y que comprende una sustitución de aminoácido, seleccionada del grupo que consiste en R399E, W417F y W417R.

5 2. Un ácido nucleico que codifica una proteína variante según la reivindicación 1.

3. La proteína variante según la reivindicación 1 o el ácido nucleico según la reivindicación 2, para el uso en el tratamiento de enfermedades, en las que se desea la formación de cartílago pero no se desea la formación de hueso.

10 4. La proteína variante o el ácido nucleico para el uso según la reivindicación 3 para el uso en el tratamiento de defectos del cartílago o para el tratamiento de la rotura o la separación traumática del cartílago, en particular defectos del cartílago relacionados con la edad, por ejemplo debidos a desgaste, osteoartritis, artritis reumatoide, lesiones relacionadas con el deporte, enfermedades que pueden afectar al cartílago como condrodistrofias, enfermedades caracterizadas por una perturbación del crecimiento y la posterior osificación del cartílago, 15 acondroplasia, costochondritis, hernia discal y reparación discal, policondritis recidivante, reparación de defectos del cartílago asociados con tumores, bien benignos o bien malignos, como condroma o condrosarcoma.

20 5. Una composición farmacéutica que comprende una proteína variante según la reivindicación 1, un ácido nucleico según la reivindicación 2, un vector que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 2 o una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 2 como el agente activo, opcionalmente en combinación con aditivos o portadores farmacéuticamente aceptables.

25

1	<u>mrlpklltfl</u>	<u>lwylawldle</u>	<u>fictvlgapd</u>
lgqrpqgtrp glakaeaker pplarnvfrp			
61	gghsygggat	nanarakggt	gqtggltqpk
kdepkklppr pggpepkpgh ppqtrqatar			
121	tvtpkgqlpg	gkappkagsv	pssflkkar
epggpprepke pfrpppitph eymlslyrtl			
181	sdadrkggns	svkleaglan	titsfidkgq
ddrgpvvrkq ryvfdisale kdglldgaelr			
241	ilrkkpsdta	kpaapgggra	aqlklsscps
grqpaslldv rsvpgldgsg wevfdiwklf			
301	rnfknsaqlc	leleawergr	avdlrglgfd
raarqvheka lflvfgrtkk rdlffneika			
361	rsgqddktvy	eylfsqrrkr	raplatrqgk
rpsknlkarc <u>srkalhvnfk</u> <u>dmgwddwlia</u>			
421	<u>pleyeafhce</u>	<u>glcefplrsh</u>	<u>leptnhaviq</u>
<u>tlmnsmdp</u> <u>es tpptccvptr</u> <u>lspisilfid</u>			
481	<u>sannvvykqy</u>	<u>edmvvescgc</u>	<u>r</u>

FIG. 1

```

hgdf-6 : CSRKPLHYNFKRIQMDDMITAPIEVEAYHCEGVCEQEPILRSHTLEPTNHAIICQTL
hgdf-7 : CSRKPLHYNFKRIQMDDMITAPIEVEAYHCEGVCEQEPILRSHTLEPTNHAIICQTL
hgdf-5 : CSRKALHYNFKRIQMDDMITAPIEVEAYHCEGVCEQEPILRSHTLEPTNHAVICQTL

hgdf-6 : YKQIEDMVVESSGGCR
hgdf-7 : YKQIEDMVVEAAGCR
hgdf-5 : YKQIEDMVVESSGGCR

```

Fig. 2

FIG. 3

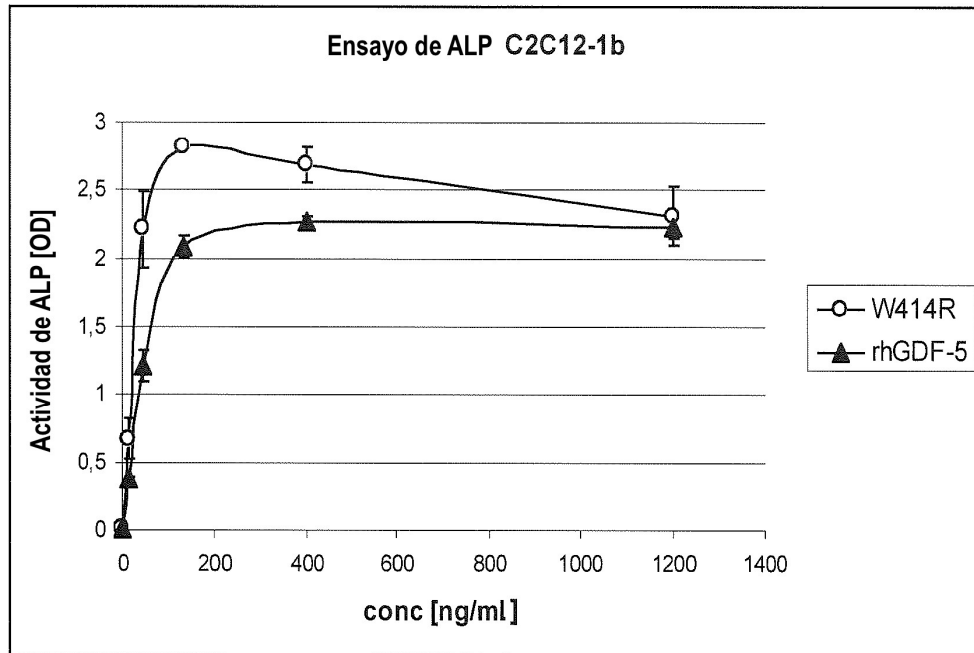


FIG. 4

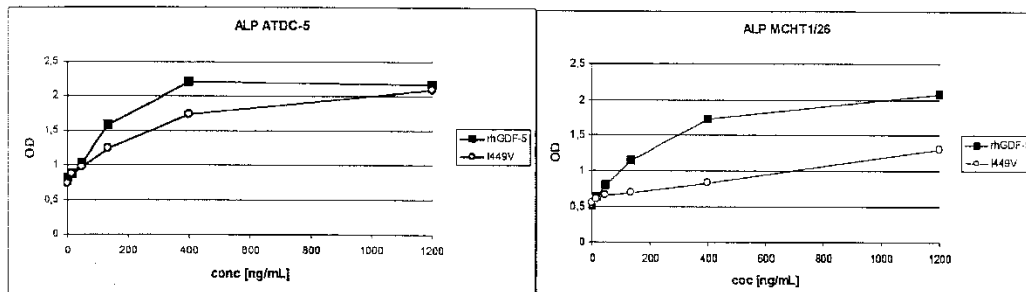


Fig. 5

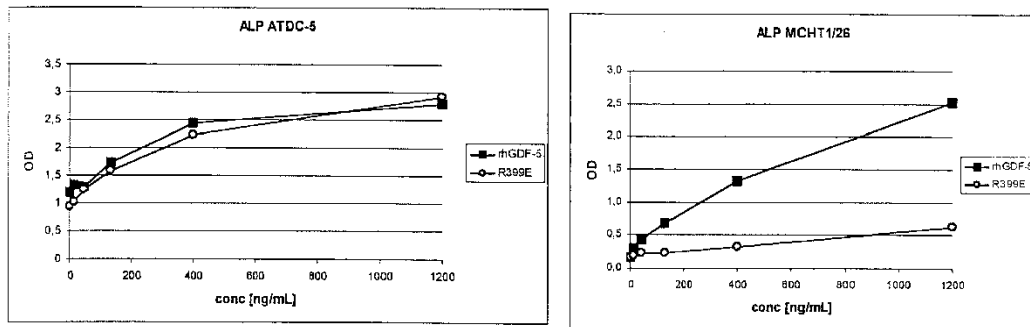


Fig. 6

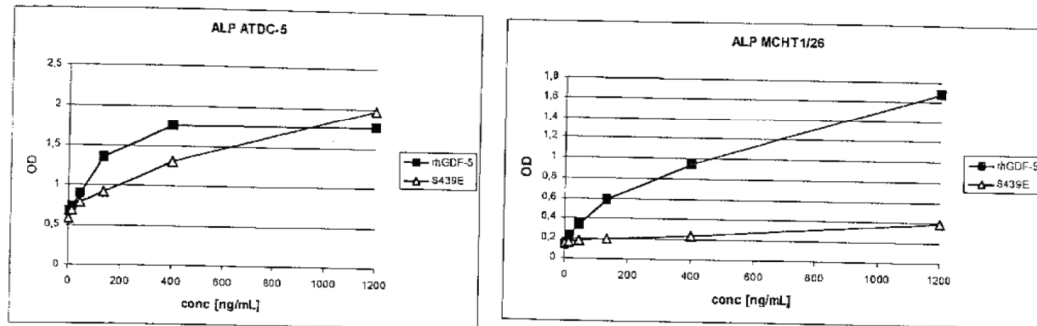


Fig. 7

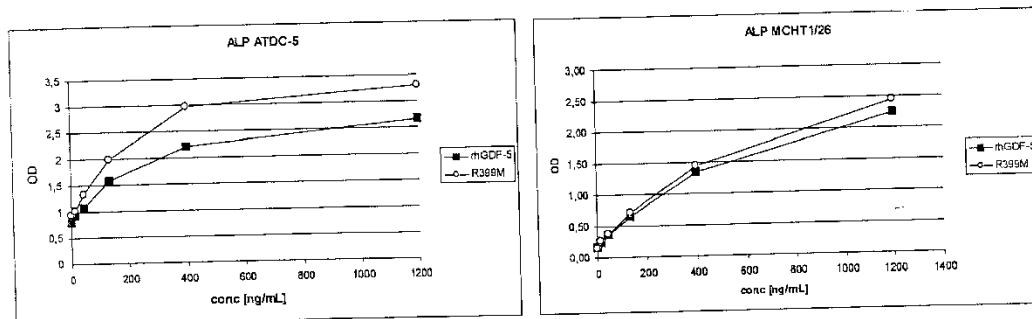


Fig. 8

