

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 591**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/51** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**C12N 15/70** (2006.01)

**C12N 15/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2006 PCT/FI2006/050212**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.11.2006 WO06125866**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2006 E 06725969 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 1885749**

54 Título: **Proteína morfogenética ósea 3 y dispositivos osteogénicos y productos farmacéuticos que contienen la misma**

30 Prioridad:

**27.05.2005 FI 20055257**  
**27.05.2005 FI 20055256**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.11.2017**

73 Titular/es:

**BBS-BIOACTIVE BONE SUBSTITUTES OY**  
**(100.0%)**  
**AALENTIE 3**  
**90240 OULU, FI**

72 Inventor/es:

**BIRR, ELLI;**  
**ULMANEN, MARI;**  
**HIETALA, OILI;**  
**JUUSTILA, MARJA;**  
**KORKALA, HELI y**  
**JALOVAARA, PEKKA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 642 591 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

Proteína morfogenética ósea 3 y dispositivos osteogénicos y productos farmacéuticos que contienen la misma

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a proteínas que inducen la formación ósea llamadas proteínas morfogenéticas óseas (BMP), especialmente la BMP-3c, moléculas de ácido nucleico que codifican dichas proteínas, vectores que contienen dichas moléculas de ácido nucleico, y células huésped que expresan dichas proteínas. La presente invención se refiere también al uso de dichas proteínas morfogenéticas óseas para tratar trastornos, tales como trastornos relacionados con la formación de huesos y cartílagos. La presente invención se refiere además a dispositivos osteogénicos y composiciones farmacéuticas que contienen dichas proteínas.

**10 Antecedentes de la invención**

15 El fenómeno de la osteoinducción fue reconocido por Lancroix en 1945 cuando demostró que los extractos óseos de alcohol ácido inducían la formación ósea heterotópica en sitios ectópicos. Veinte años más tarde, Urist y sus colaboradores descalcificaron la matriz ósea y observaron la formación de nuevo cartílago y hueso cuando se implantaron por vía intramuscular. Estos descubrimientos condujeron al aislamiento y purificación del agente inductor óseo denominado BMPs a partir de la matriz ósea de diferentes especies y años después a la clonación y caracterización de varios ADNc que codifican estas nuevas proteínas. La actividad biológica de las BMPs se ha determinado mediante bioensayo en músculos de rata o de ratón o mediante mediciones de ALP en cultivos de células de mamíferos.

20 Estudios anteriores desde 1965 han demostrado que las BMPs son parte de la superfamilia TGF- $\beta$ , y como todos los miembros de la familia tienen múltiples efectos sobre la migración celular, el crecimiento y la diferenciación, especialmente en la formación ósea y en la reparación de tejidos, pero también en la embriogénesis o el cáncer. Son glicoproteínas hidrófobas de bajo peso molecular que son solubles a agentes caotróficos, tales como urea y clorhidrato de guanidinio, pero son resistentes a varias proteasas, por ejemplo, colagenasas.

25 Las BMPs se producen como grandes moléculas precursoras que se procesan proteolíticamente a péptidos maduros después de la traducción. Al igual que todos los miembros de la superfamilia TGF- $\beta$ , las BMPs tienen el patrón de siete restos de cisteína en su región C-terminal madura. Entre estas cisteínas hay tres enlaces disulfuro dentro de monómeros BMP maduros, y un enlace disulfuro que combina dos monómeros en un dímero BMP activo biológicamente.

30 Las BMPs actúan a través de receptores transmembrana específicos situados en la superficie celular de las células diana. Los receptores de BMP son serin-treonina quinasas que se asemejan a los receptores de TGF- $\beta$  y se dividen en dos subgrupos: receptores de tipo I y tipo II. Las BMPs pueden unirse fuertemente sólo al complejo heterotetramérico de estos receptores. Esta formación compleja es esencial para la transducción de señales BMP. Dentro de la célula diana, las señales BMP se transmiten al núcleo a través de moléculas de señal específicas llamadas Smads, que también son responsables de la supresión de las señales BMP.

35 Hasta ahora, se han caracterizado 16 BMPs diferentes y siete de ellas (BMPs 2-7 y 9) han demostrado ser capaces de inducir la formación ósea cuando se implantan en sitios ectópicos. Según la secuencia de aminoácidos de la parte madura, estas BMPs se dividen en dos subgrupos. Las BMPs 2 y 4 son idénticas al 86%, y las BMPs 5, 6 y 7 son idénticas al 78%. Entre estos dos grupos la identidad es sólo aproximadamente de 56%. La secuencia de aminoácidos de BMP-3 es aproximadamente 45% igual a las BMPs 2 y 4, y la BMP-9 es 50-55% idéntica a las BMPs 2, 4, 5, 6 y 7. Debido a la alta homología y a la pequeña variedad en tamaño, las BMPs resultan ser muy difíciles, arduas y costosas de separar, purificar e identificar unas de otras a nivel proteico. Esta es la razón por la cual la mayoría de las BMPs se producen en la actualidad utilizando herramientas de biología molecular. Se han probado diferentes tipos de técnicas de proteína recombinante y se han utilizado tanto sistemas eucariotas como procariontes.

45 La mayoría de las investigaciones se han centrado en las BMPs recombinantes humanas, pero con respecto a la inducción ósea eficaz de los cuernos, la familia *Cervidae* constituye un área de investigación interesante. Las cornamentas son órganos craneales óseos típicos de la familia *Cervidae* y difieren de los cuernos de la familia *Bovidae* en su patrón de crecimiento. Las cornamentas crecen desde la punta y los machos las desechan una vez al año. Se ha sugerido que las cornamentas son las estructuras de más rápido crecimiento de las especies de mamíferos y se sabe que son las únicas estructuras que se regeneran completamente cada año. Los cuernos se forman mediante modificación de la osificación endocondral, lo que significa que el proceso se realiza a través del modelo de cartílago altamente vascularizado que se calcifica y finalmente se transforma en hueso. Los cuernos constituyen un interesante modelo de regeneración del tejido mineralizado adulto y se ha demostrado que la remodelación ósea continúa hasta el momento de la formación del cuerno. Aunque la razón fundamental de la sorprendente velocidad del crecimiento de la cornamenta no se ha resuelto todavía, se ha demostrado que los cuernos contienen varias BMPs. Se ha demostrado que la cornamenta de venado expresa BMP-2 y BMP-4 (Feng et al. 1997 *Biochim Biophys Acta* 1350: 47-52; Feng et al. 1995 *Biochim Biophys Acta* 1263:163-168). Además, las cornamentas de reno expresan BMP-3b (Kapanen et al. 2002 *J Biomed Mat Res.* 59:78-83). Sin embargo, también

es posible que haya uno o más factores totalmente descubiertos que son responsables de la velocidad de crecimiento del cuerno.

Debido a su capacidad osteoinductiva, tanto las BMPs extraídas a partir de la matriz ósea desmineralizada, como las BMPs producidas por la técnica recombinante, son alternativas muy interesantes y altamente potenciales al injerto óseo. Se han utilizado diferentes BMPs en muchos estudios experimentales y clínicos.

La BMP-3 y 3b son moléculas reguladoras importantes en la inducción ósea y en la osteogénesis. Se ha demostrado que la BMP-3 es un componente principal de la osteogénesis, que tiene actividad osteogénica, pero todavía hay cierta información contradictoria de la actividad biológica de la BMP-3 humana recombinante. Según algunos estudios, posee actividad osteogénica, pero algunos estudios afirman justo lo contrario, y se ha demostrado que desempeña un papel inhibitorio en el proceso de formación de hueso siendo también un regulador negativo de la densidad ósea. Por ejemplo, WO 02/43759 describe métodos y composiciones para el tratamiento de defectos y enfermedades que implican osteoporosis o afecciones osteopénicas. Dichos métodos comprenden la aplicación en el sitio osteoporótico o de las afecciones osteopénicas, de una composición que comprende un inhibidor o antagonista de BMP-3.

Hasta ahora, la BMP-3b ha sido la única BMP caracterizada en tejido de cornamenta de renos (Kapanen *et al.* 2002). No se asignó ninguna función apropiada para la BMP-3c y se estimó que era un factor dispensable en vista del desarrollo normal. Se encontró que la preparación de la matriz de cornamenta de renos descalcificada y en polvo inducía la mineralización del hueso.

US 6 245 889 describe proteínas BMP-2 y BMP-4 humanas purificadas y procesos para producirlas. También se describe una composición farmacéutica que comprende dicha BMP-4. Como se conoce generalmente en la técnica, estas proteínas y composiciones pueden usarse en el tratamiento de defectos de hueso y cartílago y en la cicatrización de heridas y reparación de tejidos relacionados. Además, dicha composición farmacéutica puede incluir una matriz capaz de suministrar dichas proteínas BMP al sitio de daño óseo y/o cartílago, proporcionando una estructura para el hueso y el cartílago en desarrollo y óptimamente capaz de ser reabsorbida en el cuerpo. Tales matrices pueden estar formadas de materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

US 5 399 677 describe moléculas de ADN que codifican formas mutantes de proteínas morfogenéticas óseas. Las formas mutantes de BMP pueden producirse bacteriamente y replegarse para producir homodímeros o heterodímeros de BMP activos biológicamente. También se describe un método para preparar dicha BMP mutante. Dichas formas mutantes son útiles puesto que se pliegan correctamente cuando se producen en huéspedes bacterianos.

WO 98/51354 describe dispositivos osteogénicos y métodos de uso de los mismos para la reparación de defectos de hueso y cartílago. El método para producir un nuevo crecimiento óseo en un sitio de defecto óseo en un mamífero comprende la etapa de implantar en un sitio defectuoso una matriz de fosfato de calcio que comprende al menos una proteína osteogénica. Dichas proteínas osteogénicas incluyen varios morfógenos, tales como proteínas morfogenéticas óseas.

EP 1131087 describe el uso adicional para proteínas morfogenéticas, tales como proteínas BMP. Se muestra que la exposición de las células cancerosas a los morfógenos inhibe el crecimiento de las células cancerosas y hace que estas células se diferencien del fenotipo cancerígeno. El uso de morfógeno puede influir en el destino de las células cancerosas y, a su vez, aliviar los síntomas del cáncer.

WO94/01557 describe la proteína BMP-3 humana y una composición farmacéutica que contiene a la misma. La composición puede utilizarse para la implantación.

Aunque se conocen ya algunas aplicaciones de proteínas BMP conocidas como inductores de formación de hueso y cartílago o para aliviar los síntomas de cáncer, todavía existe la necesidad de mejores métodos para aislar dichas proteínas, y de mejores proteínas morfogenéticas, por ejemplo, unas que posean propiedades de formación ósea más eficiente o que sean más solubles. Tales proteínas serían útiles para mejores métodos y aplicaciones terapéuticas. También serían útiles, métodos para producir tales proteínas.

### Compendio de la invención

Sorprendentemente, en la presente invención, se descubrió una nueva proteína de tipo BMP-3 a partir de renos, denominada en la presente memoria proteína BMP-3c. A pesar de tener una alta homología de secuencia con proteínas BMP-3 ya conocidas, la BMP-3c tiene propiedades muy ventajosas relacionadas con la formación de huesos y cartílagos. Dichas propiedades son sustancialmente mejores que las propiedades de las proteínas BMP conocidas correspondientes. Dichas proteínas morfogenéticas óseas de la presente invención son útiles para inducir la formación de huesos y cartílagos en varios tipos de aplicaciones, tales como aplicaciones terapéuticas.

La proteína BMP-3c de reno de la presente invención es homóloga al 95% a la proteína BMP-3b de renos ya conocida y al 93% homóloga a la BMP-3b humana conocida. Como una BMP-3b equivalente de reno era ya conocida, la nueva proteína de la invención se denominó BMP-3c.

Un aspecto de la presente invención se refiere a una proteína morfogenética ósea 3 aislada (BMP-3) que contiene los aminoácidos esenciales de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un sitio de unión a heparina combinado con dicha proteína morfogenética ósea. El sitio de unión a heparina mejora la expresión de la proteína BMP recombinante, y también mejora la actividad biológica de la misma.

En la presente memoria se describe una molécula de ADN aislada que codifica dicha proteína morfogenética ósea.

También se describe un vector de ácido nucleico que contiene dicha molécula de ADN aislada.

También se describe una célula huésped recombinante que contiene dicha molécula de ADN o el vector de ácido nucleico mencionado anteriormente.

10 Otro aspecto más de la presente invención se refiere a una proteína morfogenética ósea que se produce cultivando dicha célula huésped recombinante para expresar dicha proteína morfogenética ósea, y recuperando dicha proteína morfogenética ósea a partir de dicha célula huésped.

También se describe una célula huésped recombinante que expresa dicha proteína morfogenética ósea.

15 Otro aspecto más de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene dicha proteína morfogenética ósea.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a dicha proteína morfogenética ósea aislada para usar como un medicamento.

20 Otro aspecto más de la presente invención se refiere al uso de dicha proteína morfogenética ósea aislada para fabricar un medicamento para trastornos relacionados con defectos óseos o cartilagosos en donde se desea la regeneración, reparación o crecimiento de los mismos.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a un dispositivo osteogénico para tratar dichos trastornos, dicho dispositivo contiene dicha proteína morfogenética ósea aislada.

También se describe un método para inducir la formación de cartílago y/o hueso para tratar dicho cartílago y/o hueso con dicha proteína morfogenética ósea aislada.

25 También se describe un método para tratar dichos trastornos relacionados con defectos óseos o cartilagosos en donde se desea la regeneración, reparación o crecimiento de los mismos, u otras enfermedades, tales como el cáncer, administrando dicha proteína morfogenética ósea aislada a un paciente que padece de dichos trastornos.

También se describe un método para mejorar la expresión de una proteína BMP recombinante en un huésped bacteriano mediante la adición de un sitio de unión a heparina al amino terminal de dicha proteína a expresar.

30 También se describe un método para mejorar o potenciar la actividad biológica de una proteína BMP recombinante mediante la adición de un sitio de unión a heparina al amino terminal de dicha proteína.

35 También se describe un método para expresar una proteína BMP en un huésped bacteriano, tal como *E coli*, mediante la adición de un sitio de unión a heparina al amino terminal de dicha proteína, en donde la proteína muestra una inmunogenicidad disminuida cuando se compara con una BMP expresada, por ejemplo, en un huésped de levadura.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra plásmidos que contienen insertos de rdBMP-3c en el vector pGEM-T<sup>®</sup> PCR (Promega).

La Figura 2 muestra plásmidos que contienen insertos de rdBMP-3c en el vector de expresión pTrcHis2 (Invitrogen).

40 La Figura 3 muestra plásmidos que contienen insertos de rdBMP-3c en el vector de expresión pET-22b(+) (Novagen).

La Figura 4 muestra las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la parte madura de BMP-3c de reno expresada a partir de pTrcrd3c. La parte madura de BMP-3c de reno aparece en el recuadro y los restos de cisteína típicos para la superfamilia de TGF- $\beta$  están marcados con letras en negrita.

45 La Figura 5 muestra las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la parte madura de BMP-3c de reno expresada a partir de pETrd3c. La parte madura de BMP-3c de reno aparece en el recuadro y los restos de cisteína típicos para la superfamilia de TGF- $\beta$  están marcados con letras en negrita.

La Figura 6 muestra el aminoácido parcial y la secuencia de nucleótidos de BMP-3c de reno. La parte madura aparece en el recuadro y los restos de cisteína típicos para los miembros de la superfamilia TGF-β están marcados con letras en negrita.

5 La Figura 7 muestra imágenes de rayos X de un músculo de la extremidad posterior de ratón: A) referencia y B) implantadas con BMP-3c de la presente invención.

10 La Figura 8 muestra una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (de sus siglas en inglés, SDS-PAGE) teñida con colorante Coomassie de las fracciones eluidas a partir de la columna HiTrap (Ejemplo 3C). Las bandas representan 1) material de partida, 2) curso del flujo, 3) primer lavado, 4) segundo lavado, 5) elución por gradiente de pH, pH 8, 6) elución por gradiente de pH, pH 6,2, 7) elución por gradiente de pH, pH 5,3, y 8) elución por gradiente de pH, pH 4,0, 9) patrón..

**Descripción detallada de la invención**

Entre las especies de mamíferos, la homología de las partes maduras previamente conocidas de BMP-3 es alta. La clonación y caracterización de la parte madura de BMP-3c de reno reveló que a nivel de aminoácidos tiene la homología más alta con la BMP-3b de reno (95%) y la BMP-3b humana (93%).

15 Las homologías de nucleótidos y aminoácidos de las proteínas BMP-3b y BMP-3 entre especies de mamíferos se presentan en la tabla 1 y en la tabla 2, respectivamente. La BMP-3b se ha caracterizado previamente a partir de seres humanos, ratones y ratas. La comparación de la homología a nivel de nucleótidos oscila entre 87-92%, y a nivel de aminoácidos entre 94-97%. Además de los organismos anteriormente mencionados, la BMP-3b también ha sido clonada a partir de renos. La homología de aminoácidos de la BMP-3b de diferentes mamíferos oscila entre 94-97%, y la homología de nucleótidos de 87-92%. La secuencia de nucleótidos de la BMP-3c de reno y la correspondiente secuencia de aminoácidos del ADNc parcial de BMP-3c de reno se muestran en la Figura 6. Generalmente las BMP-3s tienen también homología con otros tipos de BMPs.

Tabla 1. Homología de las partes maduras de BMP-3b de diferentes mamíferos a nivel de nucleótidos y aminoácidos presentada como porcentajes (%) (nt = nucleótidos, aa = aminoácidos).

| Organismo       | Humano |     | Ratón |     | Rata |     | Reno |     | rdBMP-3c |     |
|-----------------|--------|-----|-------|-----|------|-----|------|-----|----------|-----|
|                 | aa     | nt  | aa    | nt  | aa   | nt  | aa   | nt  | aa       | nt  |
| <b>Humano</b>   | 100    | 100 | 92    | 88  | 92   | 87  | 89   | 88  | 93       | 89  |
| <b>Ratón</b>    | 92     | 88  | 100   | 100 | 97   | 96  | 87   | 86  | 91       | 87  |
| <b>Rata</b>     | 92     | 87  | 97    | 96  | 100  | 100 | 87   | 85  | 91       | 86  |
| <b>Reno</b>     | 89     | 88  | 87    | 86  | 87   | 85  | 100  | 100 | 95       | 96  |
| <b>rdBMP-3c</b> | 93     | 89  | 91    | 87  | 91   | 86  | 95   | 96  | 100      | 100 |

25

Tabla 2. Homología de las partes maduras de BMP-3 de diferentes mamíferos a nivel de nucleótidos y aminoácidos presentada como porcentajes (%) (nt = nucleótidos, aa = aminoácidos).

| Organismo       | Humano |     | Ratón |     | Rata |     | rdBMP-3c |     |
|-----------------|--------|-----|-------|-----|------|-----|----------|-----|
|                 | aa     | nt  | aa    | nt  | aa   | nt  | aa       | nt  |
| <b>Humano</b>   | 100    | 100 | 94    | 88  | 97   | 87  | 81       | 69  |
| <b>Ratón</b>    | 94     | 88  | 100   | 100 | 97   | 92  | 73       | 71  |
| <b>Rata</b>     | 97     | 87  | 97    | 92  | 100  | 100 | 80       | 71  |
| <b>rdBMP-3c</b> | 81     | 69  | 73    | 71  | 80   | 71  | 100      | 100 |

30 La siguiente alineación muestra las secuencias de aminoácidos de las proteínas BMP-3b maduras de reno y de ser humano, y de BMP-3c de reno de la presente invención (preparada con el programa ClustalX 1,8 (Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994) Nucleic Acids Research, 22: 4673-4680), rdBMP-3c = BMP-3c de reno, rdBMP-3b = BMP-3b de reno, hBMP-3b = BMP-3b humana, los asteriscos muestran los mismos aminoácidos).

```

rdBMP-3c      RKKGQDVFMASSQVLDLDFDEKTMQKARKKQWDEPRVCSRRYLKVDVFADIGWNEWIISPFSF
rdBMP-3b      RKKGQDVFMASSQVLDLDFDEKTMQKA-KKQVGEPRVCSRRYLKVDVFADIGWNEWIISPFSF
hBMP-3b       RKKGQEVFMAASQVLDLDFDEKTMQKARRKQWDEPRVCSRRYLKVDVFADIGWNEWIISPFSF
              *****:****:*****:***.*****

rdBMP-3c      DAYYCSGACEFPMVKMVRPSNHATIQSIVRAVGIVPGIPEPCCVPDKMSSLGVLFLDENR
rdBMP-3b      DAYYCSGACEFPMRWRVPSNHATIQSIVRAVGIVPGIPEPCAPDKMSSLGVLFLDENR
hBMP-3b       DAYYCSGACEFPMKIVRPSNHATIQSIVRAVGIVPGIPEPCCVPDKMSSLGVLFLDENR
              *****:*****:*****:*****.****.*****

rdBMP-3c      NVVLKVYPNMSVETCACQ
rdBMP-3b      NVVLKVYPNMSVETCACQ
hBMP-3b       NVVLKVYPNMSVDTCACR
              *****:****:
    
```

- La "proteína BMP-3 de la invención" o "proteína morfogenética ósea de la invención" se refiere a una proteína que tiene actividad morfogenética ósea (o morfogénica ósea, ambas palabras se emplean de forma intercambiable), tal como la BMP-3c aislada a partir de renos como se describe en la presente memoria (SEQ ID NO: 1 del listado de secuencias adjunto o la rdBMP-3c en la alineación anterior). También se describen homólogos, análogos, derivados y fragmentos de los mismos. Dichos homólogos o derivados incluyen derivados funcionales de dicha proteína, tales como proteínas derivadas de la proteína BMP-3c de reno original o cualquier BMP de cualquier especie. Los derivados pueden diferir en longitud y pueden contener inserciones, deleciones y sustituciones de aminoácidos, como bien sabe el experto en la técnica. Una característica de la BMP de la presente invención, por ejemplo, como se describe en la alineación anterior, es que los aminoácidos se diferencian de los de proteínas BMP-3 conocidas, tales como que los aminoácidos difieren de los de la BMP-3c humana o de la BMP-3c de reno. Preferiblemente, las regiones que contienen estos aminoácidos se conservan en una BMP de la presente invención. Los aminoácidos 26 y 104 definen la región que contiene aminoácidos que difieren de la BMP-3b equivalente de reno y los aminoácidos 6 y 138 definen la región que contiene aminoácidos que difieren de la BMP-3b equivalente humana.
- Por otra parte, las inserciones, deleciones y sustituciones situadas lejos de dicha área característica, probablemente no puedan causar cambios sustanciales en la función, efecto o plegado de la BMP de la presente invención. En la presente memoria se describen ejemplos de homólogos que tienen deleciones, tales como deleciones de pocos aminoácidos, preferiblemente 1-10 aminoácidos, más preferiblemente 1-5 aminoácidos, lo más preferiblemente 1-3 aminoácidos, en el carboxilo terminal o amino terminal, dando como resultado un polipéptido más corto en donde dichas deleciones no afectan a los aminoácidos característicos de la BMP de la invención. Se prefiere que dichos homólogos tengan las propiedades ventajosas de la proteína BMP-3c de reno original, estando dichas propiedades relacionadas con dichos aminoácidos característicos y/o la región que los rodea. Dichos homólogos pueden tener sustituciones de aminoácidos que no afectan sustancialmente a la función y el efecto de la proteína de la invención. Por ejemplo, un aminoácido no localizado en el sitio activo o cerca de él puede estar sustituido por otro aminoácido que tenga propiedades estructurales y/o químicas similares (por ejemplo, hidrofóbico o hidrófilo), es decir, una sustitución conservadora de aminoácidos, siempre y cuando dicha sustitución no altere sustancialmente la función o el plegamiento de la proteína madura. Estos tipos de sustituciones son bien conocidos y comprendidos en la técnica. Ejemplos de tales propiedades de aminoácidos divididos en grupos son, hidrofóbicos (Met, Ala, Val, Leu, Ile), hidrofílicos neutros (Cys, Ser, Thr), ácidos (Asp, Glu), básicos (Asn, Gin, His, Lys, Arg), restos que influyen en la orientación de las cadenas (Gly, Pro), y aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr, Phe). Generalmente las sustituciones dentro de dichos grupos es probable que no causen cambios importantes en la estructura del esqueleto del polipéptido (por ejemplo, una conformación laminar o helicoidal), en la carga o hidrofobicidad de la molécula o en el volumen de la cadena lateral.
- Los homólogos de la BMP descritos en la presente memoria incluyen, por ejemplo, cualquier proteína morfogenética ósea conocida, tal como la BMP-3 o equivalente de la misma, que contiene o se ha modificado para contener al menos parte de los aminoácidos o secuencias conservadas, como se ha descrito anteriormente o que corresponden al área en una proteína BMP-3 homóloga en el caso de que la numeración sea diferente. También se describe cualquier proteína BMP-3c actualmente desconocida de cualquier especie modificada como se describe anteriormente.
- Cuando se compara con la proteína conocida BMP-3b de reno, la BMP-3c tiene un aminoácido R26 insertado y cinco aminoácidos sustituidos W30, D31, K75, M76 y V104, calculados a partir de la proteína BMP-3c madura como se describe en SEQ ID NO: 1. Cuando se compara con la proteína BMP-3b humana conocida, la BMP-3c tiene nueve aminoácidos sustituidos D6, S11, K27, S66, M76, V95, S109, E133 y Q138 definidos a partir de la proteína

BMP-3c madura como se describe en SEQ ID NO: 1. Estos aminoácidos son característicos de la BMP de la presente invención. Sin embargo, como E133 y Q138 se encuentran en el extremo del carboxilo terminal de la proteína madura, no pueden desempeñar un papel importante en la función de la proteína.

5 En una realización, la BMP de la presente invención es cualquier BMP-3 que contiene una secuencia de consenso de la familia BMP-3. Un ejemplo de dicha secuencia de consenso es la siguiente secuencia derivada de la siguiente alineación de ClustalX en donde se alinean varias proteínas BMP-3 de diferentes especies, correspondiendo dicha secuencia a los aminoácidos 26-104 de SEQ ID NO: 1. En dicha secuencia de consenso se fijan los aminoácidos característicos de la rdBMP-3c que difieren de la rdBMP-3b conocida (un aminoácido R26 insertado y cinco aminoácidos sustituidos W30, D31, K75, M76 y V104) pero se permiten otras variaciones conservadoras entre la familia BMP-3.

```
R-K-K-Q-W-D-E-P-R-V/N-C-S/A-R-R-Y-L-K-V-D-F-A-D-I-G-W-N/S-E-W-I-I-S-P-K-S-F-D-A-
Y-Y-C-S-G-A-C-E/Q-F-P-M-P-K-M-V/L-R/K-P-S-N-H-A-T-I-Q-S-I-V-R-A-V-G-I/V-V-P/S-G-
I-P-E-P-C-C-V
```

15 También pueden definirse otras secuencias de consenso, por ejemplo aquellas que definen un área entre los aminoácidos 6-104, 6-109 ó 6-138 de SEQ ID NO: 1, o secuencias similares que difieren en longitud, por ejemplo, por 1-20 aminoácidos. Dichas secuencias de consenso pueden definirse a partir de la alineación de abajo o alineaciones similares hechas mediante alineación de diferentes proteínas BMP relacionadas. Las secuencias de BMP alineadas son a partir de reno, ser humano, rata y rana de garras africana (*Xenopus laevis*).

```
BMP3C_RENO      RKKGQDVFMASSQVLDfDEKTMQKARKKQWDEPRVCSRRYLKVDfADIGWNEWII SPKSF
BMP3_HUMANA    KKKQRKGPHRKSQTLQfDEQTLKARRKQWIEPRNCARRYLKVDfADIGWSEWII SPKSF
BMP3_RATA      KKKQRKGPHQKQTLQfDEQTLKARRKQWIEPRNCARRYLKVDfADIGWSEWII SPKSF
BMP3_XENOPUS   KKKLRKGSRQKSQTLQfDEQTLKARRKQWNEPRNCARRYLKVDfADIGWSEWII SPKSF
BMP3B_RENO     RKKGQDVFMASSQVLDfDEKTMQKA-KKQVGEPRVCSRRYLKVDfADIGWNEWII SPKSF
BMP3B_HUMANA   RKKGQEVFMAASQVLDfDEKTMQKARRKQWDEPRVCSRRYLKVDfADIGWNEWII SPKSF
: **  :.      .*. :.***: :.*** : **  ***  *.*****.*****
```

```
BMP3C_RENO     DAYYCSGACEFPMPKMRVPSNHATIQSIVRAVGIVPGIPEPCCVDPKMSLSLGVLFDENR
BMP3_HUMANA    DAYYCSGACQFPMPKSLKPSNHATIQSIVRAVGIVPGIPEPCVPEKMSLSLILFFDENK
BMP3_RATA      DAYYCSGACQFPMPKSLKPSNHATIQSIVRAVGIVPGIPEPCVPEKMSLSLILFFDENK
BMP3_XENOPUS   DAYYCSGACQFPMPKSLKPSNHATIQSIVRAVGIVPGIPEPCVPEKMSLSLILFFDENK
BMP3B_RENO     DAYYCSGACEFPMPRWRVPSNHATIQSIVRAVGIVPGIPEPCCAPDKMSLSLGVLFDENR
BMP3B_HUMANA   DAYYCAGACEFPMPKIVRPSNHATIQSIVRAVGII PGIPEPCVDPKMNLSLGVLFDENR
*****:***:***: :.*****: :.*****. :.***.***. :.***:***:
```

```
BMP3C_RENO     NVVLKVYPNMSVETCAQ
BMP3_HUMANA    NVVLKVYPNMTVESACR
BMP3_RATA      NVVLKVYPNMTVDSACR
BMP3_XENOPUS   NVVLKVYPNMTVESACR
BMP3B_RENO     NVVLKVYPNMSVETCAQ
BMP3B_HUMANA   NVVLKVYPNMSVDTCACR
*****:***:***:
```

20 En una realización de la presente invención dicha BMP es una BMP-3 que comprende los aminoácidos 26-104 de la SEQ ID NO: 1. Dichas posiciones de aminoácidos se calculan a partir del amino terminal de cualquier proteína BMP-3 madura general, tal como la proteína BMP-3c de SEQ ID NO: 1 o un homólogo, derivado o fragmento de la misma, en donde la secuencia en el amino terminal comienza con RKKGQ, como por ejemplo en reno (véase la alineación de secuencia anterior o SEQ ID NO: 1), o en el área correspondiente. Si hubiera inserciones o deleciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicho homólogo que afectan a la numeración, éstas deben tenerse en cuenta al definir la ubicación de dichos aminoácidos esenciales, por ejemplo alineando las secuencias como se describe, y definiendo a continuación las localizaciones de dichos aminoácidos. Sin embargo, cualquiera de dichos homólogos de la BMP deberían tener sustancialmente la función y la eficacia descritas en la presente memoria. Debido a que todas las proteínas BMP-3 conocidas están altamente conservadas, definir la localización de dichos aminoácidos esenciales es inequívoca, tal como en el caso de la BMP-3b humana. Por ejemplo, en la rdBMP-3b hay una delección de un aminoácido cuando se compara con rdBMP-3c, como se muestra en la alineación anterior, pero todavía se pueden definir fácilmente los aminoácidos correspondientes en las secuencias comparadas. Además,

dichas ubicaciones se pueden definir fácilmente también a partir de otras BPMs (véase la alineación anterior). Generalmente, dicho nivel de homología puede ser de al menos 70%, preferiblemente 80%, más preferiblemente 93%, y lo más preferiblemente 95% a nivel de aminoácidos.

5 En otra realización, la BMP de la presente invención es una BMP-3 que contiene los aminoácidos 6-104 de la SEQ ID NO: 1. En otra realización, la BMP de la presente invención es una BMP-3 que contiene los aminoácidos 6-109 de la SEQ ID NO: 1. En otra realización, la BMP de la presente invención es una BMP-3 que contiene los aminoácidos 6-138 de la SEQ ID NO: 1. En otra realización, la BMP de la presente invención es BMP-3 que contiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

10 Otra realización de la presente invención proporciona la BMP como se describe anteriormente con un sitio de unión a heparina (HBS). Generalmente, esta es una secuencia de aminoácidos capaz de unirse a la heparina. En una realización, dicho sitio de unión a heparina está situado en el amino terminal de dicha BMP, tal como antes de la secuencia de SEQ ID NO: 1 u homólogo funcional de la misma. En una realización, el sitio de unión a heparina contiene la secuencia de aminoácidos AKHKQRKRG. También se describe la secuencia QAKHKQRKRG. El sitio de unión a heparina mejora la expresión de la proteína BMP recombinante y también mejora la actividad biológica de la misma. Además, el sitio de unión a heparina ayuda significativamente a la expresión de proteínas morfogenéticas óseas recombinantes en células bacterianas, tales como *E. coli*.

15 Un ejemplo proporciona una molécula de ácido nucleico, tal como una molécula de ADN o ARN, que codifica dicha BMP de la invención. Debido a la degeneración del código genético, hay una serie de diferentes secuencias de ácido nucleico que codifican la BMP de la invención. Preferiblemente, dicha molécula de ácido nucleico es una molécula de ADN. Ejemplos de dichas secuencias de ADN se describen en las figuras 4-6.

20 Un ejemplo proporciona un vector replicable que contiene la molécula de ácido nucleico descrita anteriormente en asociación operativa con una secuencia de control de la expresión del mismo. Tal vector puede usarse para producir BMP recombinante de la presente invención en un sistema huésped adecuado.

25 El ácido nucleico que codifica la BMP de la invención puede insertarse en dicho vector replicable para la clonación o para la expresión. Varios vectores están disponibles públicamente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio o sitios de restricción a endonucleasa apropiado usando técnicas bien conocidas en la técnica. Los componentes vectoriales pueden incluir, por ejemplo, una o más secuencias señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de tales vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligación estándar que son bien conocidas por un experto en la técnica.

30 Generalmente dicha BMP se puede producir recombinantemente mediante la expresión en cualquier célula huésped adecuada, tal como en una célula huésped bacteriana. Tales métodos son bien conocidos en la técnica y se describen en la bibliografía. Es esencial que la proteína se pliegue correctamente durante la expresión y que contenga las modificaciones post-traduccionales necesarias.

35 No siempre es posible expresar y purificar ciertas proteínas adecuadamente, por ejemplo debido a problemas de solubilidad o replegamiento. Generalmente *E coli* no puede realizar modificaciones post-traduccionales típicas de los sistemas celulares de mamíferos. Sin embargo, los inventores de la presente invención han producido la parte madura de la BMP-3c recombinante de reno en *E coli*, y después de la purificación y el replegado demostraron que estaba en una forma activa biológicamente.

40 Hay ciertos beneficios cuando una proteína, tal como una BMP, se expresa en un huésped bacteriano, tal como *E coli*. La proteína generalmente muestra menor inmunogenicidad cuando se compara con una proteína similar expresada, por ejemplo, en el huésped de levadura. Esto puede ser útil más tarde cuando se utiliza la proteína, por ejemplo, administrada como un medicamento. *E coli* produce proteínas sin modificaciones, tales como glicosilación. Esto es particularmente útil para las proteínas para las que la glicosilación no es un requisito, pero que podría ser un problema si la proteína se produce en otros sistemas (por ejemplo, levadura), que puede sobre-glicosilar, o añadir carbohidratos inadecuados a la proteína, lo que podría conducir a una actividad reducida o nula de la proteína expresada, y crear potencialmente un riesgo de inmunogenicidad (Pedro de Noronha Pissarra: Recombinant DNA Proteins for the Biopharmaceutical Industry and the Future for Escherichia coli. Business Briefing: Pharma Outsourcing, Londres, 2004).

45 Hay ciertos beneficios cuando una proteína, tal como una BMP, se expresa en un huésped bacteriano, tal como *E coli*. La proteína generalmente muestra menor inmunogenicidad cuando se compara con una proteína similar expresada, por ejemplo, en el huésped de levadura. Esto puede ser útil más tarde cuando se utiliza la proteína, por ejemplo, administrada como un medicamento. *E coli* produce proteínas sin modificaciones, tales como glicosilación. Esto es particularmente útil para las proteínas para las que la glicosilación no es un requisito, pero que podría ser un problema si la proteína se produce en otros sistemas (por ejemplo, levadura), que puede sobre-glicosilar, o añadir carbohidratos inadecuados a la proteína, lo que podría conducir a una actividad reducida o nula de la proteína expresada, y crear potencialmente un riesgo de inmunogenicidad (Pedro de Noronha Pissarra: Recombinant DNA Proteins for the Biopharmaceutical Industry and the Future for Escherichia coli. Business Briefing: Pharma Outsourcing, Londres, 2004).

50 Proteins for the Biopharmaceutical Industry and the Future for Escherichia coli. Business Briefing: Pharma Outsourcing, Londres, 2004).

55 Un ejemplo describe una célula huésped que contiene la molécula de nucleótido o el vector de nucleótidos descrito anteriormente. Las células adecuadas incluyen todas las células procariotas y eucariotas que son capaces de expresar la proteína de la invención. Dichas células huésped son bien conocidas en la técnica y un experto en la técnica puede elegir fácilmente una adecuada. Otro ejemplo proporciona una BMP producida cultivando dicha célula para expresar dicha proteína, y recuperando dicha proteína expresada a partir de dicha célula huésped. Se puede emplear cualquier método adecuado para recuperar o aislar la proteína, y tales métodos son bien conocidos en la técnica.

La BMP de la invención puede usarse para tratar trastornos relacionados con defectos o enfermedades del hueso, cartílago, tendón o periodonto, o similares, en donde se desea la regeneración, reparación o crecimiento de los mismos. En un ejemplo, la proteína de la invención también se puede usar para curar heridas, tales como quemaduras, incisiones y úlceras, y para la reparación de tejidos relacionados, y también para el tratamiento del

5 cáncer, como se describe en EP 1131087. Dado que las proteínas BMP generalmente carecen de especificidad de especie, el paciente que padece dicho defecto puede ser cualquier animal adecuado, preferiblemente mamífero, tal como el ser humano, y la proteína BMP que se emplea para el tratamiento puede ser de cualquier origen adecuado. El uso de proteínas BMP relacionadas para varios tipos de aplicaciones terapéuticas es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, US 6 245 889 y WO 98/51354).

10 "Trastornos relacionados con defectos del hueso, cartílago, tendón o dientes", como se emplea en la presente memoria, se refiere generalmente a cualquier trastorno conocido en el que se desee la curación o reconstrucción, es decir, la regeneración, del hueso, cartílago, tendón o periodonto. Ejemplos no limitantes de tratamientos de trastornos relacionados con defectos o enfermedades óseas, cartilaginosos, tendinosos o periodontales, o similares, son la regeneración, reparación y crecimiento del tejido óseo y periodontal; regeneración, reparación y crecimiento

15 óseo en mamíferos, tales como en el ser humano; tratamiento de anomalías en la formación o regeneración ósea; cicatrización de heridas, inducción ósea ectópica, y cicatrización de defectos óseos segmentarios en vertebrados; tratamiento de trastornos y deformaciones del esqueleto; reparación de grandes defectos óseos originados por traumatismos, extirpación de tumores o malformaciones congénitas, reconstrucción de los huesos gastados por una endoprótesis implantada en operaciones de revisión, y curación de fracturas retrasadas o no unidas; reparación de

20 defectos óseos y cartilaginosos, tales como defectos de tamaño crítico, defectos de tamaño no crítico, fracturas no unidas, fracturas no unidas segmentarias; fracturas agudas, defectos condrales, defectos osteocondrales, defectos subcondrales; formación de huesos y cartílagos locales; defectos resultantes de enfermedades degenerativas; aplicaciones dentales, tales como la reparación de tejidos periodontales, hueso alveolar, cemento dental, membrana de la raíz dentaria, relleno del conducto radicular dentario, y mejora o potenciación de la fijación del implante dental. Ejemplos de tales trastornos se pueden encontrar en Ann Rheum Dis, Volumen 62, 2003, 73-78: Reddy AH: Cartilage morphogenetic proteins: role in joint development, homeostasis and regeneration.

25 Otros ejemplos de enfermedades en donde la BMP de la presente invención es útil son, por ejemplo, el cáncer, especialmente el cáncer de pulmón, fibromialgia, psoriasis y otros trastornos dermatológicos, y trastornos reumáticos, y similares. Ejemplos de tales cánceres, y métodos y composiciones para su tratamiento, se describen en EP 1131087.

30 En una realización, la BMP-3 de la presente invención puede proporcionarse, en cualquier aplicación descrita en la presente memoria, junto con una o más proteínas morfogenéticas adicionales, tales como otra especie de proteína BMP, o similar. Generalmente, esto proporciona un efecto sinérgico, tal como se conoce en la técnica. Ejemplos de otras proteínas BMP adecuadas son, pero no se limitan a, BMP-1, BMP-2, otras BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 y BMP-8. También pueden proporcionarse otros agentes útiles terapéuticamente, tales como el factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, y factores de crecimiento transformantes (US 6 245 889). En una realización, dicha proteína morfogenética adicional se origina a partir de renos, tal como cualquier otra proteína BMP de reno. En una realización, la BMP de la presente invención se proporciona como un dímero, como un homodímero o como un heterodímero junto con otra proteína BMP como se ha descrito anteriormente. En otra

35 realización, se utiliza la BMP como un dímero o junto con otro factor o proteína, como se describe anteriormente, para la fabricación de un medicamento para tratar trastornos descritos en la memoria.

40 En una realización de la presente invención se proporciona un dispositivo osteogénico, el cual es un implante, que contiene la BMP de la invención. El dispositivo osteogénico puede contener una matriz biocompatible, tal como una matriz de fosfato de calcio, carboximetilcelulosa o colágeno, o combinaciones de los mismos. En una realización dicha matriz de fosfato de calcio es una matriz de hidroxiapatita. Dicha matriz puede proporcionar una liberación lenta de la proteína BMP y/o proporcionar el entorno apropiado para la presentación de la proteína BMP. El dispositivo osteogénico también puede contener un implante de metal rodeado por dicha matriz biocompatible. Un ejemplo de dicho metal es titanio. Algunos ejemplos de tales dispositivos osteogénicos se describen en WO 98/51354.

45 Ejemplos no limitantes de los diferentes materiales estructurales, transportadores o de soporte para formar, por ejemplo, diferentes tipos de dispositivos osteogénicos, o similares, con la proteína de la presente invención, son un medio en forma de polvo, esponja, tira, película, gel, banda o disolución o suspensión; un vehículo líquido semi-sólido adecuado para inyección intramuscular, intravenosa, intramedular o intra-articular; células madre mesenquimales aisladas; cualquier vehículo aceptable farmacéuticamente; autoinjerto o aloinjerto en forma de

50 costra; cualquier matriz aceptable farmacéuticamente; un material seleccionado del grupo que comprende hidroxiapatita, colágeno, polímeros (por ejemplo, ácido poliláctico, ácido poliglicólico), polímeros sintéticos, ácido hialurónico,  $\alpha$ -BSM, fosfato de calcio, fosfato tricálcico, biopolímeros cerámicos aporosos, biopolímeros reabsorbibles aporosos, coral, hueso desmineralizado, biovidrio, cualquier material biodegradable y combinaciones de los mismos; agentes ligantes seleccionados del grupo que comprende manitol, dextranos, vaselina blanca, alquil y metilcelulosas, agentes humectantes, tales como sal de sodio, pegamento de fibrina, fibrinógeno y trombina de mamífero, y combinaciones y mezclas de los mismos. El dispositivo osteogénico puede ser, por ejemplo, un implante tridimensional estructuralmente estable, en forma de cubo, cilindro o bloque, o en la forma de una forma anatómica o

55 60

una forma inyectable. Ejemplos de dispositivos osteogénicos, materiales útiles, y técnicas, se describen en el libro "Skeletal reconstruction and bioimplantation" (T. Sam Lindholm, 1997, Springer-Verlag, Heidelberg, Alemania).

5 En una realización de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz terapéuticamente de BMP de la invención, junto con un vehículo o transportador aceptable farmacéuticamente. Dichas composiciones farmacéuticas pueden usarse para tratar trastornos relacionados con defectos o enfermedades del hueso, cartílago, tendón o periodonto, heridas y otros defectos tisulares, o cualquier otro trastorno descrito en la presente memoria.

10 Un ejemplo describe un método para inducir la formación de hueso, cartílago, tendón, diente, o similar, en el que dicho hueso, cartílago, tendón, diente, o similar, se trata con la BMP de la invención o combinaciones de la misma como se describe anteriormente, *in vitro* o *in vivo*. Otro ejemplo describe un método para tratar trastornos descritos en la memoria que comprende administrar la BMP aislada de la presente invención a un paciente que padece de dichos trastornos. Dicha BMP puede administrarse como una composición farmacéutica o como un dispositivo osteogénico descrito anteriormente. Otras proteínas morfogenéticas u otros agentes útiles pueden administrarse conjuntamente con dicha BMP de la invención, como se describe anteriormente, para potenciar el efecto terapéutico.

15 En la siguiente descripción y ejemplos se describe cómo se produjo la parte madura de BMP-3c recombinante de reno, con y sin sitio de unión a heparina (HBS), según las realizaciones en *E coli* de la presente invención. Después de la purificación y replegamiento, se verificó la actividad osteoinductiva mediante bioensayo en músculos tensos de ratón. El bioensayo *in vivo* es un método estándar utilizado para ensayar la actividad de la BMP desde su descubrimiento. Éste incluye la implantación de BMP en el músculo de la extremidad posterior de un ratón, y la estimación de la inducción heterotópica de hueso nuevo después de 10-21 días por radiología e histología.

20 La osteoinducción se observó en los cuatro grupos de estudio (1 mg, 3 mg, 5 mg, y 8 mg, de BMP-3c recombinante de reno) y aumentó de manera dependiente de la dosis (Tabla 3).

**BMP-3c<sub>138</sub>**

| Dosis | 1 mg  | 3 mg   | 5 mg      | 8 mg   |
|-------|---|--------|-----------|--|
| Reno  | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | + - ++ | (+) + + + | (+) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> |

**BMP-3c<sub>110</sub>**

| Dosis | 1 mg  | 3 mg      | 5 mg      | 10 mg     |
|-------|---|-----------|-----------|-----------|
| Reno  | <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> | - + (+) + | ++ ++ + - | + + ++ ++ |

25 Tabla 3. Comparación de las respuestas de osteoinducción de proteínas BMP-3c<sub>138</sub> y BMP-3c<sub>110</sub> de reno, con diferentes dosis.

Los resultados del bioensayo *in vivo* se muestran en la figura 7. La figura 7A es una referencia, y la 7B es una muestra implantada con BMP-3c de la presente invención. El bioensayo se llevó a cabo como se describe en Marshall R. Urist, J.J. Chang, A. Lietze, Y. K. Huo, A. G. Brownell y R. J. DeLange (1987): Preparation and Bioassay of Bone Morphogenetic Protein and Polypeptide Fragments, Methods Enzymol 146: 294-312.

30 Hubo grandes dificultades para obtener la parte madura de rdBMP-3c recombinante expresada en *E coli* TOP10. Por lo tanto, los inventores asumieron que la mala expresión fue causada por el alto contenido de GC en la región N-terminal de la parte madura de rdBMP-3c. Debido a que el sitio de unión a heparina (HBS), que existe en el comienzo de la parte madura de BMP-2 de reno, está codificado por una secuencia de nucleótidos con bajo contenido de GC, se creó una construcción en la que se añadió esta secuencia HBS delante de la secuencia de la parte madura de rdBMP-3c, y de esta manera los inventores lograron mejorar la expresión recombinante.

35 El HBS localizado en el N-terminal de rdBMP-2 contiene 10 restos de aminoácidos básicos y recuerda a sitios de unión a heparina conocidos o postulados en otros factores de crecimiento. También es posible que la interacción entre la proteína y el HBS y la matriz extracelular, pudiera tener un efecto importante en el establecimiento de los

gradientes morfogénicos durante el desarrollo, limitando la libre difusión de una proteína. Por lo tanto, se supone que el HBS también podría mejorar la actividad biológica de rdBMP-3c recombinante prolongando la duración de la desaparición de la proteína desde el sitio de implantación.

### Ejemplos

#### 5 Clonación de ADNc de BMP-3c de reno y análisis de comparación de homología

El producto de PCR, alrededor de 400 pb, se aisló y clonó en el vector pGEM-T<sup>®</sup>. La secuencia de nucleótidos obtenida a partir de reacciones de ABI Prism, se analizó con ordenador y se comparó con secuencias de BMP humanas ya conocidas. Gracias a las investigaciones de homología, el ADNc recién clonado parecía ser más homólogo con la BMP-3b humana (homología de nucleótidos 89% y homología de aminoácidos 93%) en comparación con la BMP-3 humana (homología de nucleótidos 69% y homología de aminoácidos 81%). Cuando se comparó con todas las BMPs conocidas, el ADNc recién clonado parecía ser el más homólogo con la BMP-3b de reno (homología de nucleótidos 96% y homología de aminoácidos 95%). Por lo tanto, el ADNc de la presente invención se denominó BMP-3c de reno.

#### Expresión de la parte madura de BMP-3c de reno en células TOP10, Rosetta y Origami de *E. coli*,

15 En estudios previos, la BMP-3 humana se ha producido en células CHO, en células *E coli* y usando el sistema retroviral. Además, la BMP-3 humana y la BMP-3b de rata se han producido como proteínas recombinantes utilizando un sistema adenoviral. Sin embargo, no se ha producido ningún miembro de la subfamilia de BMP-3 de origen animal de ciervo, como proteína recombinante.

20 Los 414 nucleótidos que corresponden a la parte madura larga de 138 aminoácidos de la BMP-3c de reno se subclonaron a partir del vector pGEM-T<sup>®</sup> en el vector pTrcHis2A, y se analizó la expresión de la proteína recombinante en células TOP 10 *E coli* (Invitrogen), pero no se observó inducción. Se llegó a la conclusión de que esto podría ser causado por un alto contenido de GC en el inicio de la rdBMP-3c. También se observó que el sitio de unión a heparina existente en el comienzo de la parte madura de BMP-2 de reno tenía un contenido de GC muy bajo, y añadiéndolo frente a la parte madura de BMP-3c de reno, también podría utilizarse como una parte del procedimiento de purificación. Por lo tanto, la parte madura de BMP-3c/138 y BMP-3c/110 se clonaron en el vector pTrcHBS, y se obtuvieron pTrcH-BSBMP-3c/138 y pTrcHBSBMP-3c/110. La inducción exitosa, tanto de HBSrdBMP-3c/138 recombinante, como de HBSrdBMP-3c/110, se verificó por SDS-PAGE, y el nivel de expresión fue alto.

25 Para conseguir la expresión proteica de las proteínas BMP-3c/138 y BMP-3c/110 de reno, se ensayó otro sistema de expresión de proteínas. Por lo tanto, pET22b(+) con His6-marcador y pelB líder se eligió como nuevo sistema de expresión del vector. Se construyeron los vectores pETrd3c/138 y pETrd3c/110. Se utilizaron para la expresión las líneas Rosetta (DE3) (Novagen) y Origami B (DE3) (Novagen) de *E coli*. Mediante SDS-PAGE se verificaron las inducciones con éxito de IPTG de rdBMP-3c recombinante con ambas construcciones .

#### Actividad biológica de BMP-3c/138 y BMP-3c/110 recombinantes de reno

35 Se ha demostrado actividad osteogénica en el bioensayo cuando se produce en células CHO o en el sistema *E coli* de la BMP-3 humana recombinante, pero cuando se usaron sistemas retrovirales y adenovirales para producir BMP-3 humana recombinante no se observó función osteogénica. Utilizando el sistema de vectores adenovirales, se ha observado que la BMP-3b actúa de forma sinérgica con la BMP-2 en el procedimiento de formación ósea, pero no produjo inducción ósea por sí misma. No obstante, la BMP-3 de origen animal de venado (familia *Cervidae*) ni siquiera se ha clonado, y no ha se ha ensayado la actividad biológica de la BMP-3b de reno clonada anteriormente.

40 En este estudio se muestra que el nuevo miembro de la subfamilia BMP-3, la BMP-3c recombinante de reno, producida en células *E coli*, causan nueva formación ósea cuando se implantan en músculo tenso de ratón con una esponja de colágeno.

#### Ejemplo 1: Clonación y secuenciación de la parte 3 'del ADNc de BMP-3c de reno

##### A. Aislamiento de ARN

45 Los cuernos de un reno macho de 3 años de edad se cortaron y congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente después del sacrificio. Los cuernos congelados se cortaron en rebanadas de 0,5 cm, y se almacenaron a -70°C. El ARNm de la cornamenta de reno se aisló usando el Kit de Purificación de ARNm QuickPrep<sup>®</sup> Micro (Pharmacia Biotech). Una parte de la rebanada del cuerno de reno se cortó en pedazos pequeños (aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>) y se añadió 0,1 g de este tejido a 0,6 ml de Tampón de Extracción que contiene tiocianato de guanidinio y N-lauroil sarcosina. El tejido se homogeneizó mediante un homogeneizador Ultra Turrax 3 veces durante 10 segundos en hielo, y se enfrió entre cada homogeneización. Se añadieron 1,2 ml de Tampón de Elución, y la suspensión se homogeneizó además 1 vez durante 10 segundos. Se obtuvo una suspensión uniforme.

El homogeneizado de cuerno de reno se centrifugó con Oligo(dT)-Celulosa a velocidad máxima [14.000 rpm, RT (Temperatura ambiente), Centrifuga 5415 C (Eppendorf)] durante 1 minuto. Se eliminó el tampón del precipitado de

Oligo(dT)-Celulosa, y el homogeneizado de tejido limpio se colocó en la parte superior del mismo. El tubo se invirtió para resuspender el precipitado de Oligo(dT)-Celulosa. La suspensión se mezcló suavemente durante 5 minutos, y se centrifugó a velocidad máxima [14.000 rpm, RT, Centrifuga 5415 C (Eppendorf)] durante 10 segundos. El sobrenadante se desechó.

- 5 Se resuspendió Oligo(dT)-Celulosa en tampón de alta sal [Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, NaCl 0,5 M] y la suspensión se centrifugó a velocidad máxima [14.000 rpm, RT, Centrifuga 5415 C (Eppendorf)] durante 10 segundos. Los lavados con tampón de alta sal se repitieron 5 veces, y 2 veces más con tampón de baja sal [Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, NaCl 0,1 M]. Se añadió 3 ml de tampón de baja sal, y la suspensión se transfirió a una Columna MicroSpin. La columna MicroSpin se colocó en un tubo Eppendorf, y se centrifugó a velocidad máxima durante 5 segundos. El Oligo(dT)-Celulosa de la columna se lavó 3 veces con tampón de baja sal.

10 El ARNm del cuerno de reno se eluyó de la columna MicroSpin a un tubo Eppendorf limpio añadiendo 0,2 ml de Tampón de Elución a 65°C (Kit de Purificación de ARNm QuickPrep<sup>®</sup> Micro, Pharmacia Biotech) a la columna, y centrifugando a velocidad máxima [14.000 rpm, RT, Centrifuga 5415 C (Eppendorf)] durante 5 segundos. La etapa de elución se repitió dos veces. El ARNm aislado se precipitó añadiendo 5 µl de solución de glucógeno (5-10 mg/ml en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato)), 1/10 de volumen de disolución de acetato de K (acetato de potasio 2,5 M, pH 5,0), y 0,5 ml de etanol absoluto (enfriado a -20°C) a cada elución. Se dejó que la precipitación se produjera a -20°C durante al menos 30 minutos, y el ARNm se centrifugó a velocidad máxima [14.000 rpm, 4°C, Centrifuga 5415 C (Eppendorf)] durante 5 minutos. El ARNm precipitado se almacenó a -70°C hasta que se realizó la síntesis de ADNc.

#### 20 B. Síntesis de ADNc

La transcripción inversa del ARNm del cuerno de reno se realizó modificando las instrucciones del Kit de Síntesis de ADNc Time Saver<sup>™</sup> (Pharmacia Biotech). Se desnaturalizó por calor 3 µg de ARNm a 65°C durante 10 minutos, y se enfrió en hielo. Se añadieron 0,2 µmol de DTT, 0,5 µg de cebador Oligo(dT)<sub>12-18</sub> y el ARNm desnaturalizado por calor, a la mezcla de reacción de la Primera hebra que contenía FPLC<sup>™</sup> Cloned Murine Reverse Transcriptase, RNAGuard<sup>™</sup>, BSA libre de ARNasa/DNasa, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) en tampón acuoso (Kit de Síntesis de ADNc Time Saver<sup>™</sup>, Pharmacia Biotech). La disolución mixta se incubó a 37°C durante 1 hora. Después de la incubación, se añadió la mezcla de reacción de la Primera hebra a la mezcla de reacción de la Segunda hebra que contiene RNasa H de *E. coli*, y *E. coli* ADN polimerasa I, y dNTPs en tampón acuoso (Kit de Síntesis de ADNc Time Saver<sup>™</sup>, Pharmacia Biotech). La disolución se mezcló suavemente, y se incubó en RT durante 30 minutos. El ADNc sintetizado se almacenó a 4°C.

#### C. Selección de ADNc de cuerno de reno

Se amplificó la parte del ADNc de BMP-3c de reno mediante el método de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando cebadores degenerativos (5'-CGCAA(A/G)GACCGCA(A/G)GAAGAA(A/G)GGC-3') y (3'-TC(T/C)GT(A/G)GAGACCTGTGCCTG(T/C)CAA-5') diseñados sobre la base de la homología de genes BMP-3b ya conocidos de las diferentes especies de mamíferos (ser humano, rata y ratón). Además de 100 ng del ADNc de cuerno de reno, y 40 pmol de cada cebador, los 50 µl de mezcla de reacción PCR contenían dNTPs 0,4 mM (PCR Core Kit, Roche) y 0,7 U/µl de mezcla de enzimas High Fidelity (polimerasa Taq termostable + valoración de polimerasa, Roche) en tampón Expand High Fidelity con MgCl<sub>2</sub> (Expand High Fidelity PCR System, Roche). La reacción se realizó en el siguiente programa utilizando un aparato personal Mastercycler (Eppendorf): desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, y 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, reasociación de los cebadores a 55°C durante 1 minuto, elongación de las hebras de ADN a 72°C durante 2 minutos. La extensión final se realizó a 72°C durante 10 minutos.

#### D. Clonación en el vector pGEM<sup>®</sup>-T

45 Los productos de PCR se purificaron directamente a partir de la mezcla de reacción de PCR mediante el Sistema de Purificación de ADN Wizard<sup>®</sup> PCR Preps (Promega), y se ligó en el vector pGEM<sup>®</sup>-T (Figura 1) mediante la T4 ADN Ligasa (pGEM<sup>®</sup>-T Vector System I; Promega). Se añadieron 0,3 µg de producto de PCR purificado, y 2,3 µg/ml del vector pGEM<sup>®</sup>-T a un tampón de ligación que contiene Tris-HCl 18 mM (pH 7,8), MgCl<sub>2</sub> 6 mM, DTT 6 mM, ATP 0,3 mM, 3% de polietilenglicol y 0,14 U/µl de T4 ADN Ligasa en un volumen total de 66 µl. Se dejó que la reacción se produjera en un baño de agua a +16°C que se dejó enfriar hasta +4°C durante la noche. El plásmido recién formado se denominó pGEMrd3c/142 (Figura 1).

#### E. La producción de células competentes TOP10 F' de *Escherichia coli*

55 Las células competentes TOP10 F' de *Escherichia coli* se produjeron mediante el procedimiento cloruro de calcio/cloruro de magnesio. Se inocularon 2 ml de medio LB con células TOP10 F' de *E. coli*, y se cultivaron durante la noche a 37°C con agitación (225 rpm). A la mañana siguiente se inocularon 100 ml de medio LB fresco con 1 ml de cultivo cultivado durante la noche, y el cultivo se cultivó a 37°C con agitación (225 rpm) hasta un valor DO<sub>600</sub> de 0,5-0,6. Las células cultivadas se recogieron por centrifugación (2500 x g, 5 minutos), se resuspendieron en 10 ml de MgCl<sub>2</sub> 0,1 M, y se recogieron de nuevo mediante centrifugación (2500 x g, 5 minutos). Después del tratamiento con MgCl<sub>2</sub>, las células se resuspendieron en 10 ml de una disolución de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M, se incubaron en un baño de hielo

durante 30 minutos, y se recogieron por centrifugación (2500 x g, 5 minutos). El tratamiento se repitió con CaCl<sub>2</sub>, excepto que en la segunda vez se añadieron 3,5 ml de CaCl<sub>2</sub>, y que el tiempo de incubación fue de 1 hora. Se añadió glicerol a la suspensión hasta una concentración final de 14% (v/v) y la disolución se dividió en porciones de 200 µl. Las células competentes TOP10 F' de *E coli* se congelaron en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -70°C.

#### 5 F. Transformación de las células competentes TOP10 F' de *Escherichia coli* y selección de clones que contienen BMP-3c de reno

Las células competentes TOP10 F' de *Escherichia coli* se disolvieron en un baño de hielo durante 15 minutos. Se añadieron 20 µl de mezcla de ligación (descrita anteriormente) a 100 µl de TCM (Tris-HCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,0), y se mezcló con 200 µl de células competentes *E coli*. La mezcla se incubó en un baño de hielo durante 30 minutos antes del choque térmico (43°C, 3 minutos). Después del choque térmico se añadieron 800 µl de medio LB, y se permitió que las células se regeneraran durante 30 minutos a 37°C. Las células transformadas se recogieron por centrifugación a velocidad máxima durante 2 minutos, y se resuspendieron hasta 30 µl de medio de cultivo. La suspensión de células se sembró en dos placas de LB que contienen 25 µg/ml de ampicilina cubierta con 1 mmol de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) y 2,4 nmol de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido), y las células se cultivaron en las placas durante la noche a 37°C. Los clones positivos se reconocieron por formación de color azul basado en la complementación α del gen *lacZ*. El método se describe en detalle en Sambrook y Russel (2001), Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

#### G. Aislamiento de plásmidos pGEMrd3c y secuenciación de insertos de ADNc

Los plásmidos se aislaron por el Sistema de Purificación de ADN Wizard<sup>®</sup> Plus Minipreps (Promega), y luego se purificaron por precipitación con etanol. La identidad del ADNc se confirmó por secuenciación con ABI Prism (Perkin-Elmer Corporation). La reacción de secuenciación se realizó usando el kit de Secuenciación DYEnamic ET Terminator Cycle (Amersham Pharmacia Biotech) y el aparato Mastercycler Personal (Eppendorf). Los cebadores en la reacción de PCR para la secuenciación fueron (5'-TAATACGACTCACTATAGGGCGA-3') y (3'-ATTTAGGTGACACTATAGAATAC-5') y el programa fue como sigue: 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, re-asociación a 50°C durante 15 segundos, elongación a 60°C. Los productos de PCR amplificados se precipitaron mediante un método de precipitación con etanol. En 10 µl de reacción se añadieron 1 µl de acetato de sodio 1,5 M, tampón EDTA 250 mM, y etanol 95-100%, de manera que la concentración final de etanol era del 75%. Se dejó que la precipitación se produjera en un baño de hielo durante 7 minutos, y luego la mezcla se centrifugó durante 20 minutos. El sobrenadante se desechó, y el sedimento se lavó con 125 µl de etanol al 70% en RT. La disolución se centrifugó brevemente, y el etanol de lavado se retiró con la mayor precisión posible. El sedimento se secó a 37°C durante algunos minutos hasta que todo el etanol se evaporó completamente. El aparato ABI Prism se localizaba en el Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Universidad de Oulu, Finlandia, y la secuenciación final se realizó allí. La secuencia de nucleótidos y la correspondiente secuencia de aminoácidos de ADNc parcial de BMP-3c de reno se observa en la figura 6.

35 Ejemplo 2: Expresión de la parte madura de BMP-3c recombinante de reno en células TOP10 F' Origami B (DE3) y Rosetta (DE3) de *Escherichia coli*

#### A. Amplificación de la parte madura de BMP-3c de reno para el vector de expresión

La parte madura de BMP-3c de reno se amplificó a partir del plásmido pGEM3c/142 mediante el método de PCR usando cebadores de homología (5'-GGATCCGAGGAAGAAGGGCCAGGATGTTTTC-3') y (3'-AAGCTTTTGG-CAGGCACAGGTCTCCAC-5') (véase el Ejemplo 2 Parte B). Existen sitios de reconocimiento para enzimas de restricción *Bam* HI y *Hind* III en el extremo 5'- y 3'- de los cebadores, respectivamente.

Además de 0,05 µg de plásmido pGEMrd3c/142 y 40 pmol de cada cebador, los 50 µl de la mezcla de reacción de PCR contenían dNTPs 0,4 mM (PCR Core Kit, Roche), y 0,7 U/µl de mezcla de enzimas Expand High Fidelity (polimerasa Taq termostable + valoración de polimerasa, Roche) en tampón Expand High Fidelity con MgCl<sub>2</sub> (Roche). La reacción de PCR se llevó a cabo bajo el siguiente programa usando el aparato personal de Mastercycler (Eppendorf): desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, y 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, re-asociación de los cebadores a 55°C durante 1 minuto, elongación de las hebras de ADN a 72°C durante 2 minutos. La extensión final se realizó a 72°C durante 10 minutos. El producto de PCR se purificó directamente de la mezcla de reacción de PCR usando Wizard<sup>®</sup> PCR Preps (Promega), y se ligó al vector pGEM<sup>®</sup>-T. El plásmido recién formado con la parte madura de BMP-3c de reno se denominó pGEMrd3c/138 (figura 1).

#### B. Subclonación de la parte madura de BMP-3c de reno a partir del vector pGEM<sup>®</sup>-T para el vector de expresión pTrcHis 2A (Invitrogen) y transformación de las células competentes TOP10 F' de *Escherichia coli*

La subclonación de la parte madura de BMP-3c de reno a partir de pGEMrd3c/138 al vector de expresión pTrcHis 2A (figura 2) se realizó mediante la primera digestión de la parte madura de pGEMrd3c/138 usando las enzimas de restricción *Bam* HI y *Hind* III, y luego ligando el inserto a pTrcHis 2A, digerido con las mismas enzimas. La digestión de pGEMrd3c/138, y pTrcHis 2A mediante las enzimas *Bam* HI (Roche) y *Hind* III (Roche), se realizó en 10 µl de Tris-HCl 10 mM, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, pH 8,0 (SuRE/Cut Buffer B, Roche) con 1 U/µl de cada enzima de restricción. Se dejó que la reacción se produjera durante 1,5 horas a 37°C, y después las

enzimas de restricción se inactivaron calentando a 65°C durante 20 minutos, y congelando a -20°C. La ligación se realizó en 2x Rapid Ligation Buffer (suministrado con el vector pGEM®-T de Promega) en un baño de agua a + 16°C que se dejó enfriar lentamente hasta + 4°C durante la noche (concentración de ligasa 0,1 U/μl).

5 La construcción recién formada se verificó mediante secuenciación (el protocolo se describe en el Ejemplo 1 Parte G) usando cebadores (5'-AGAGGTATATATTAATGTATCG-3') y (3'-ATGGTCGACGCGCTATTCAG-5'). El vector de expresión que contenía pTrcHis 2A más el ADNc de la parte madura de BMP-3c de reno, se denominó pTrcrd3c (figura 2). Las células competentes TOP10 F' de *Escherichia coli* se transformaron con pTrcrd3c como se describe en el Ejemplo 1 Parte F.

10 *C. Inserción de la parte madura de BMP-3c de reno al vector de expresión pET22b(+)* (Novagen) y transformación de las células competentes *Origami B* (DE3) y *Rosetta* (DE3) de *Escherichia coli*

La subclonación de la parte madura de BMP-3c de reno al vector de expresión pET22b(+)  
 15 (Novagen) (figura 3) se realizó como se describe anteriormente (véase el Ejemplo 2, Parte B). Los plásmidos recién formados que contienen pET22b(+)  
 más el ADNc de la parte madura de BMP-3c de reno, se verificaron mediante secuenciación utilizando cebadores (5'-GGATCCGAGGAAGAAGGGCCAGGATGTTTTTC-3') y (3'-CGCAAGCTTTT-GGCAGGCACAGGTCTCCAC-5') (véase el protocolo descrito en el Ejemplo 1 Parte G) y nombrado como pETrd3c (figura 3). Las transformaciones de las células *Origami B* (DE3) y *Rosetta* (DE3) se realizaron siguiendo las instrucciones del manual de usuario enviado con las células competentes (Novagen).

*D. Expresión de la parte madura de BMP-3c recombinante de reno en cultivos celulares de Escherichia coli y recogida de las células*

20 Se cultivaron células *E coli* [TOP10, *Origami B* (DE3) o *Rosetta* (DE3)] que contienen los plásmidos pTrcrd3c o pETrd3c durante toda la noche en 50 ml de medio SOB que contiene ampicilina (100 μg/ml), y para las células *Rosetta* (DE3) también cloramfenicol (34 μg/ml), a +37°C con agitación (225 rpm). A la mañana siguiente se inocularon 1200 ml de medio SOB, que contiene los antibióticos mencionados anteriormente, con 24 ml de cultivo  
 25 cultivado durante la noche, y se incubaron a + 37°C con agitación (225 rpm) hasta que el valor DO<sub>600</sub> era de cuando las células estaban en fase de registro medio. En este punto se indujo la expresión de la proteína recombinante añadiendo IPTG hasta la concentración final de 1 mM. Después de la inducción, las células se cultivaron durante 4 a 5 horas adicionales, y después se recogieron por centrifugación. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas recombinantes producidas con las respectivas secuencias de nucleótidos se presentan en la figura 4 (pTrcrd3c) y la figura 5 (pETrd3c).

30 Ejemplo 3: Purificación y replegamiento de la parte madura de BMP-3c recombinante de reno

#### *A. Lavado de cuerpos de inclusión*

Las células recogidas se suspendieron en tampón fosfato sódico 50 mM (pH 7,0, 220 g de células/1 litro de tampón) mediante agitación. La suspensión se centrifugó a 5500 x g durante 45 minutos a +4°C. El lavado con fosfato sódico se repitió una vez. El sedimento de células se pesó, y se almacenó a -70°C durante la noche. El sedimento  
 35 congelado con células parcialmente en erupción se descongeló y se suspendió en tampón Tris-HCl 20 mM con EDTA 0,5 mM (pH 8,5, 25 mg/ml) agitando 2 minutos. La suspensión se centrifugó a 26.000 x g durante 40 minutos a + 4°C, y se repitió una vez el lavado Tris-HCl-EDTA. Se midió el sedimento sobrante. En la última etapa de lavado, el sedimento se suspendió (200 rpm/minuto, durante la noche, RT) en tampón de lisis GuHCl 6 M - fosfato de sodio 20 mM - NaCl 0,5 M (pH 8,0, 35 mg/ml) cuando el resto de células *E coli* intactas erupcionan y los cuerpos  
 40 de inclusión se hacen solubles. La suspensión se centrifugó (26.000 x g, 45 minutos, RT), se desechó el sedimento y la proteína recombinante en forma soluble en el sobrenadante restante. Finalmente, para asegurarse de deshacerse de todos los restos celulares, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 45 μm.

#### *B. Precipitación según punto isoeléctrico (pI)*

45 La BMP-3c recombinante de reno expresada a partir de pETrd3c en células *Origami B* (DE3) o *Rosetta* (DE3) de *Escherichia coli*, se precipitó por precipitación isoeléctrica en pH 9,54 (pETrd3c/138) y pH 6,35 (pETrd3c/110). El punto isoeléctrico se determinó mediante cálculos informáticos según la secuencia de aminoácidos de la BMP-3c recombinante de reno (Figura 5). El precipitante se recogió por centrifugación (12 000 x g, 30 minutos, RT) y se resuspendió en tampón de lisis (GuHCl 6 M - fosfato de sodio 20 mM - NaCl 0,5 M; pH 8,0).

#### *C. Cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC)*

50 En el método IMAC, se usaron columnas de afinidad empaquetadas HiTrap Chelating HP (Amersham Pharmacia Biotech). Las columnas se cargaron con iones Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, o Ni<sup>2+</sup>, según el manual de instrucciones aplicado por el proveedor. Después de la carga de la columna, el sobrenadante filtrado de las etapas de lavado se aplicó en la columna. La mayoría de las impurezas se eliminó lavando la columna con tampón de lisis (GuHCl 6 M - fosfato de sodio 20 mM - NaCl 0,5 M, pH 8,0) 5-10 veces el volumen del lecho. El segundo lavado se realizó con 5-10 veces el  
 55 volumen del lecho de tampón en el que el tampón de lisis GuHCl 6 M se reemplazó por Urea 6 M. La BMP-3c recombinante de reno se eluyó de la columna HiTrap mediante un gradiente de pH de pH 7,0 a pH 4,0 (urea 6 M -

fosfato de sodio 20 mM - NaCl 0,5 M). Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y las que contienen rdBMP-3c recombinante aproximadamente puro se combinaron para replegarse.

*D. Replegamiento de la parte madura de rdBMP-3c recombinante*

5 Las fracciones de BMP-3c analizadas por SDS-PAGE se agruparon y se dializaron con agua. Después de la diálisis, la proteína precipitada se recogió por centrifugación, y se resuspendió en urea 8 M, Tris/HCl 0,1 M, pH 8 en presencia de DTT 100 mM, EDTA 1 mM, y se incubó durante 2 horas a 25 grados. El pH se redujo a pH 3-4 por adición gota a gota de HCl 1 M. El DTT se eliminó completamente por diálisis con urea 6 M, HCl 10 mM, durante 2 horas a 25 grados. La diálisis se continuó a 4°C durante la noche con urea 6 M. El replegamiento de rdBMP-3c recombinante se realizó mediante diálisis en dos etapas. La primera disolución de diálisis fue Tris-HCl 20 mM - NaCl 150 mM - urea 3 M (pH 7,5). El agua de diálisis se cambió al menos seis veces durante dos a tres días. La muestra desalada se centrifugó, y el sedimento se secó por liofilización. En ese momento, la pureza de BMP-3c era del 75%, y su replegamiento medido por SDS-PAGE no reductora fue del 50%. La cuantificación del dímero replegado de BMP-3c recombinante de reno en geles teñidos con azul de Coomassie se realizó mediante densitometría..

Ejemplo 4: Adición del sitio de unión a heparina delante de la parte madura de BMP-3c/138 y BMP-3c/110 de reno

15 *A. Adición del fragmento de ADN que codifica el sitio de unión a heparina al vector pTrcHis 2A*

Se diseñaron dos cebadores complementarios, vistos en la Tabla 4, usando el sitio de unión a heparina (HBS) de la BMP-2 de reno como modelo. Se añadieron los sitios de restricción para *Bam* HI y *Kpn* I en los extremos 5' y 3' del HBS, respectivamente. Los cebadores se desnaturalizaron primero a +100°C durante 5 minutos, y luego se reasociaron permitiendo que un baño de agua pequeño de +100°C se enfriara a temperatura ambiente, y continuara hasta +4°C (1 hora). Tanto el fragmento HBS reasociado (1 µg) como el vector pTrcHis 2A (0,5 µg) se digirieron por *Bam* HI (1 U/µl) y *Kpn* I (2 U/µl) en tampón Multi-Core (Promega) a +37°C durante 1,5 horas, y se ligaron en un baño de agua a +16°C que se dejó enfriar hasta +4°C durante la noche. La construcción recién formada se comprobó por secuenciación (véase el Ejemplo 2 Parte B) y se denominó pTrcHBS (figura 2).

Tabla 4. Cebadores utilizados en la clonación del sitio de unión a la heparina

| Cebadores para la clonación de HBS |  |
|------------------------------------|--|
| 5' → 3'                            | CGGGATCCGCAAGCAAAACATAAACAGCGCAAACGCGGTACCCC |
| 3' → 5'                            | GGGGTACCGCGTTTCCGCTGTTTATGTTTTGCTTGCGGATCCCG |

25

*B. Amplificación de las partes maduras de BMP-3c/138 y BMP-3c/110 y clonación en el vector pGEM®-T*

Se crearon sitios de restricción para *Kpn* I frente a las partes maduras de rdBMPs mediante el método de PCR. Las plantillas en estas reacciones fueron genes BMP clonados en el vector pTrcHis2A entre los sitios de restricción *Bam* HI y *Hind* III (Ejemplo 2 Parte D). Los cebadores (Sigma-Genosys) diseñados para estas reacciones están en la tabla 5.

30

Tabla 5. Cebadores utilizados en la reacción de PCR creando sitios de restricción para *Kpn* y *Hind* III en BMPs

| gen        | cebador |   |
|------------|---------|---|
| BMP-3c/138 | 5'      | 5' <b>GGTACC</b> AGGAAGAAGGGCCAGGATGTTTTTC 3' |
|            | 3'      | 5' <b>AAGCTTTT</b> GGCAGGCACAGGTCTCCACAG 3'   |
| BMP-3c/110 | 5'      | 5' <b>GGTACCCAAT</b> GGGATGAGCCACGGGTC 3'     |
|            | 3'      | 5' <b>AAGCTTTT</b> GGCAGGCACAGGTCTCCACAG 3'   |

35 Las reacciones de PCR se realizaron con Expand High Fidelity System (Roche). Las reacciones incluían: tampón HF, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 200 µM de mezcla de dNTP, 0,8 µM de ambos oligos, 15 ng de ADN molde, y 3,5 U de mezcla de Enzimas de Alta Fidelidad. El programa utilizado en las reacciones fue: 94°C 4 minutos, 25 ciclos; 94°C 1 minuto, 55°C 1 minuto, 72°C 2 minutos, un ciclo; 72°C 10 minutos y la temperatura se redujo hasta 4°C.

Los tamaños de los productos de PCR se examinaron con geles de agarosa al 1%. El estándar utilizado en geles era 500 µg de 100 pb de escala (BioLabs) o de 100 pb de escala XIV (Roche). Una quinta parte de las reacciones de PCR se cargaron en geles de agarosa con tampón de carga de ADN con azul de bromofenol. Las muestras se

hicieron correr en tampón TAE 1x (Tris 40 mM, acetato de sodio 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,8) con 70 V durante 35 minutos, y se tomaron imágenes de los geles bajo luz UV.

5 Los productos de PCR se purificaron a partir de agarosa de baja temperatura de fusión al 1% de SeaPlague®GTG® (BioProducts) con el sistema de purificación de ADN Wizard®PCR Preps (Promega) según el protocolo del fabricante..

Los fragmentos de ADN purificados a partir de las reacciones de PCR se ligaron en el vector pGEM®-T con pGEM®-T y pGEM®-T Easy Vector System (Promega). Las reacciones incluían; Tampón de ligación rápida, 50 ng de vector pGEM®-T., 15-20 ng de inserto de ADN, y 3 U de T4 ADN Ligasa. Las ligaciones se realizaron en un baño de agua a 16°C que se dejó enfriar lentamente hasta 4°C durante la noche.

10 Antes de la transformación las mezclas de ligación se digirieron con 15 U de *Bam* HI (Roche) en tampón B (Roche) para eliminar posibles rastros de la plantilla de reacción de PCR (BMP en pTrcHis2A). Las reacciones de digestión se incubaron 1,5 horas a 37°C.

*C. Transformación de plásmidos en células TOP10 de E. coli*

15 Los plásmidos se transformaron en células TOP10 competentes de *Escherichia coli* (Invitrogen). Las células TOP10 se hicieron competentes con el procedimiento de cloruro de calcio/cloruro de magnesio (véase el Ejemplo 1 parte E).

20 La transformación de los plásmidos se realizó de la siguiente manera: la mezcla de ligación digerida se mezcló en 100 µl de TCM y se añadió a 200 µl de células TOP10 competentes. Las células se incubaron durante 30 minutos en hielo, y luego 3 minutos a 43°C. Se añadieron 0,8 ml de medio LB-glucosa a las células y se mezclaron invirtiendo el tubo. Las células se dejaron crecer durante 45 minutos a 37°C, y se sembraron en placas LB-glucosa+AMP+IPTG+X-GAL.

Las colonias a partir de las transformaciones se inocularon en 5 ml de LB-glucosa + 100 µl/ml de medio de ampicilina, y se cultivaron durante la noche a 37°C con agitación. Los plásmidos se aislaron a partir de los cultivos cultivados durante la noche con el sistema de purificación de ADN Wizard® Plus Minipreps (Promega) según el procedimiento de fabricación.

25 Los plásmidos se purificaron adicionalmente con precipitación con EtOH: se añadieron 5 µl de acetato de sodio 3 M pH 5,8 y 150 µl de etanol absoluto a los plásmidos purificados en agua, y se dejó precipitar el ADN a -20°C durante la noche. A la mañana siguiente, las reacciones se centrifugaron en una microcentrífuga a 14000 rpm a 4°C, se eliminó el sobrenadante, y se lavó el ADN precipitado con 500 µl de EtOH frío al 70%. Las muestras se centrifugaron de nuevo y se repitió la etapa de lavado. El ADN se secó al aire y se resuspendió en 20 µl de agua estéril.

30 Las secuencias de nucleótidos de los insertos se verificaron mediante secuenciación. Las reacciones de secuenciación contenían 5 µM de ambos cebadores y 150-300 ng de ADN plasmídico. Los cebadores de secuenciación se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Cebadores de secuenciación para los plásmidos pGEM®-T

|            |                         |
|------------|-------------------------|
| cebador 5' | TAATACGACTCACTATAGGGCGA |
| cebador 3' | ATTTAGGTGACACTATAGAATAC |

35 *B. Adición de la parte madura de BMP-3c/138 y BMP-3c/110 de reno a pTrcHBS y transformación de células competentes TOP10 F' de Escherichia coli*

40 La secuencia HBS se clonó previamente en el vector pTrcHis2A entre los sitios de restricción *Bam* HI y *Kpn* I (Ejemplo 4, parte A). Antes de la ligación, tanto el plásmido pTrcHBS, como BMP-3c/138 y BMP-3c/110 en pGEM®-T, se digirieron primero con las enzimas *Kpn* I y *Hind* III. Las reacciones de digestión con *Kpn* I de BMP en pGEM®-T contenían 800 ng de ADN plasmídico, 2xL de tampón (Roche), 150 ng de BSA, y 20 U de *Kpn* I (Roche). Las reacciones de digestión con *Kpn* I en pTrcHBS contenían 250 ng de ADN plasmídico, 2xL de tampón (Roche), 150 ng de BSA, y 20 U de *Kpn* I (Roche). Las reacciones se incubaron a 37°C durante 3 horas. Se añadió a las reacciones el tampón B (Roche) y 10 U de *Hind* III (Roche), y las reacciones se incubaron adicionalmente a 37°C durante 1 hora 30 minutos.

45 Las reacciones de ligación contenían tampón Ligación de Rápida (Promega), 125 ng del vector pTrcHBS digerido doblemente, 400 ng de BMP digerido doblemente en pGEM®-T, y 3 U de T4 ADN Ligasa (Promega). Las ligaciones se realizaron en un baño de agua a 16°C que se dejó enfriar lentamente hasta 4°C durante la noche. Las mezclas de ligación se digirieron en tampón 1 xH (Roche) con 10 U de *Pst* I (Roche) y 12,5 U de *EcoR* I (Roche), para eliminar la BMP intacta en en los plásmidos pGEM®-T y pTrc HBS. Las reacciones se incubaron 1 hora 30 minutos a 37°C.

5 Las BMP-3c/138 y BMP-3c/110 en los plásmidos pTrcHBS se transformaron en células competentes TOP10 de *E. coli*, se amplificaron, purificaron y secuenciaron de la misma manera que se describe anteriormente para los plásmidos pGEM<sup>®</sup>-T. Los cebadores de secuenciación para los plásmidos pTrcHis2A se muestran en la tabla 7. Las nuevas construcciones se denominaron pTrcHBSrd3c/138 y pTrcHBSrd3c/110 (Figura 2) en células TOP10, y se almacenaron como existencias de glicerol a -70°C. Las existencias de glicerol se fabricaron de acuerdo con el protocolo de fabricación (Invitrogen).

Tabla 7. Cebadores de secuenciación para los plásmidos pTrcHis2A

|            |                        |
|------------|------------------------|
| cebador 5' | AGAGGTATATATTAATGTATCG |
| cebador 3' | ATGGTCGACGGCGCTATTCAG  |

10 *C. Expresión de las partes maduras de BMP-3c/138 y 3c/110 recombinante de reno con sitio de unión a heparina en cultivos de células TOP 10 de Escherichia coli*

Los ensayos de expresión piloto se realizaron como sigue; se inocularon 2 ml de medio SOB que contienen 50 µg/ml de ampicilina con una única colonia TOP10 recombinante. Las células se cultivaron durante la noche a 37°C con agitación (225 rpm). Por la mañana se inocularon 20 ml de medio SOB fresco con 50 µg/ml de ampicilina con 0,4 ml del cultivo cultivado por la noche, y las células se cultivaron a 37°C con agitación hasta que se alcanzó un valor DO<sub>600</sub> de 0,6.

15 Se añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mM para inducir la producción de proteínas en las células. Después de la inducción, las células se cultivaron durante 5 horas a 37°C con agitación. Se recogieron muestras de 0,5 ml del cultivo en puntos de tiempo de 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h y 5 horas después de la inducción. Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 30 segundos, y los sedimentos celulares se resuspendieron en 50 µl de tampón de muestra Laemmli (BIO-RAD) que contiene 5% de β-mercaptoetanol.

20 Las muestras resuspendidas en tampón de muestra se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron. Se cargaron 5 µl de cada muestra y 2 µl de patrón Dual Color (BIO-RAD) en 16,8% de SDS-PAGE. Se separaron proteínas de diferentes tamaños en tampón SDS (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS al 0,1%) a 200 V durante 1 hora 10 minutos. Los geles de SDS se tiñeron con Disolución de Coloración R-250 Azul Coomassie (BIO-RAD), y se eliminó el exceso del colorante con una disolución de ácido acético 1,7 M -metanol 2,5 M.

25 Para expresar cantidades mayores de proteína recombinante se inocularon 50 ml de medio SOB que contiene 100 µg/ml de ampicilina con la colonia TOP10 recombinante. Las células se cultivaron durante la noche a 37°C con agitación (225 rpm). A la mañana siguiente se inocularon 1200 ml de medio SOB fresco con 50 µg/ml de ampicilina con 25 ml del cultivo cultivado durante la noche. Los cultivos de células recombinantes se cultivaron a 37°C con agitación hasta que se alcanzó un valor DO<sub>600</sub> de 0,6.

30 Para inducir la producción de proteína recombinante en las células se añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mM. Después de la inducción, las células se cultivaron durante 5 horas a 37°C con agitación. Después de la incubación, los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm durante 17 minutos y se recogieron y pesaron los sedimentos celulares.

35 Las células se pre-lavaron suspendiéndolas primero en H<sub>2</sub>O (g/5 ml) y se centrifugó a 10000 rpm con un rotor SS-34 durante 20 minutos. La segunda etapa de lavado se realizó con la misma proporción de tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,0. La centrifugación se repitió y se continuó el lavado con la misma proporción de Tris 25 mM - tampón EDTA 10 mM pH 7,3. Al final de las células de prelavado se centrifugaron una vez más, y se pesaron.

40 Ejemplo 5: Aislamiento y purificación de la parte madura de BMP-3c/138 y BMP3c/110 recombinante de reno con sitio de unión a heparina (HBSrdBMP-3c)

*A. Recolección de células TOP10 de Escherichia coli y aislamiento y purificación de cuerpos de inclusión*

Se homogeneizaron 1 g de células (peso húmedo) por 5 ml en frío, Tris 0,1 M, pH 7, tampón EDTA 1 mM. Se añadieron 1,5 mg de Lisozima (Roche) por gramo de células en la mezcla, y las células se incubaron 30 minutos a 4°C. Las células se interrumpieron con un homogenizador celular de alta presión Disruptor APV-2000. Se añadió MgCl<sub>2</sub> hasta una concentración final de 3 mM, y DNasa I (Roche) hasta una concentración final de 10 µg/ml, y la mezcla se incubó durante 30 minutos a RT para digerir el ADN.

50 Se añadió a la disolución la mitad del volumen de una mezcla de EDTA de 60 mM, Triton X-100 6%, NaCl 1,5 M, pH 7 y la mezcla se incubó durante 30 minutos a 4°C. Los cuerpos de inclusión se centrifugaron por centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C con un rotor SS-34. El sedimento se resuspendió en una proporción de 8 ml por gramo de células en tampón Tris 0,1 M, pH 7 - EDTA 20 mM, y se repitió la etapa de centrifugación. El cuerpo de inclusión aislado se pesó y se almacenó a -20°C.

*B. Purificación IMAC para HBSrdBMP-3c*

El cuerpo de inclusión aislado se mezcló durante la noche con agitación con 35 mg/ml hasta GuHCl 6 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,02 M, NaCl 0,5 M, pH 8 (tampón de lisis). A la mañana siguiente la disolución se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos con un rotor SS-34. El sobrenadante se filtró a través de un filtro Whatman GB 002 (Schleicher & Schuell). La centrifugación y la filtración se repitieron una vez más, y la muestra se almacenó a 4°C.

La columna de afinidad HiTrap Chelating HP empaquetada (Amersham Biociences) se cargó con iones Co<sup>2+</sup>, y se ajustó con tampón de muestra (tampón de lisis, pH 8) según el procedimiento de fabricación. Se aplicaron 30-40 ml de la muestra de proteína filtrada a la columna, y se lavó con 50 ml de tampón de lisis, pH 8. El segundo lavado se realizó con 50 ml de urea 6 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,02 M, NaCl 0,5 M, pH 8.

La proteína deseada con el marcador His6 se eluyó de la columna con 200 ml de urea 6 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,02 M, NaCl 0,5 M, pH 4. En la etapa final, la columna se lavó con 200 ml de urea 6 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,02 M, NaCl 0,5 M, imidazol 0,5 M, pH 8. Se recogieron fracciones de 50 ml durante cada etapa. Las muestras de la fracción se analizaron con SDS-PAGE y se combinaron las fracciones que contienen la mayor parte de la proteína recombinante.

Ejemplo 6: Purificación y replegamiento de la parte madura de BMP-3c/138 y BMP3c/110 recombinante de reno con sitio de unión a heparina (HBSrdBMP-3c)

*A. Purificación IMAC para HBSrdBMP-3c*

Se lisaron las células *Escherichia coli* por agitación en GuHCl 6 M - fosfato de sodio 20 mM - NaCl 0,5 M (pH 8,0) durante 2 horas, y se filtró a través de un filtro de 45 µm. En el método de purificación IMAC, se usaron columnas de afinidad HiTrap Chelating HP empaquetadas (Amersham Pharmacia Biotech). Las columnas se cargaron con iones Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, o Ni<sup>2+</sup> según el manual de instrucciones aplicado por el proveedor. Se aplicó el lisado filtrado a la columna, y se lavó con 15 veces el volumen del lecho del tampón de lisis. La segunda etapa de lavado se realizó con 40 veces el volumen del lecho de urea 6 M - fosfato de sodio 20 mM - NaCl 0,5 M (pH 7,5). En el tercer tampón de lavado se añadió imidazol 0,05 M en el segundo tampón de lavado y el volumen de lavado fue 15 veces el volumen del lecho. La HBSrdBMP-3c recombinante se eluyó de la columna mediante un gradiente de imidazol de 0,05 M a 0,5 M en urea 6 M - fosfato de sodio 20 mM - NaCl 0,5 M (pH 7,5). Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE, y las que contienen la HBSrdBMP-6 recombinante más altamente purificada, se combinaron y se dializaron con tampón de fosfato de sodio 100 mM (pH 7,5) durante el fin de semana. La proteína recombinante precipitada se recogió por centrifugación y se disolvió en urea 8 M - fosfato de sodio 100 mM - Tris-HCl 10 mM (pH 7,5). Antes de la purificación de la columna de afinidad por heparina, la disolución de proteína recombinante se filtró a través de un filtro de 45 µm.

*B. Purificación de la columna de afinidad por heparina para HBSrdBMP-3c recombinante*

El filtrado obtenido después de la purificación IMAC, se aplicó en una columna HiTrap Heparin HP lista para usar (Amersham Pharmacia Biotech) que se ajustó con urea 8 M - fosfato de sodio 100 mM - Tris-HCl 10 mM (pH 7,5). La columna se lavó entonces con 20 veces el volumen del lecho del mismo tampón, y se eluyó la HBSrdBMP-3c recombinante de la columna de heparina por gradiente de NaCl de 0 M a 2 M también en el mismo tampón. Se combinaron las fracciones con la pureza más alta de HBSrdBMP-3c analizadas por SDS-PAGE y análisis Western blot. En el análisis de Western blot se usaron anticuerpos específicos frente His6 y BMP-3c. Las fracciones combinadas estaban listas para el procedimiento de replegamiento.

*C. Replegamiento de HBSrdBMP-3c /138 y HBSrdBMP-3c/110 recombinante*

El replegamiento de HBSrdBMP-3c recombinante se realizó como se describe en el Ejemplo 3, parte D, para rdBMP-3c recombinante.

Ejemplo 7: El ensayo de la actividad biológica de la parte madura de BMP-3c/138 y BMP-3c/110 recombinantes de reno, con y sin sitio de unión a heparina

Se ensayó la actividad biológica de un liofilizado de BMP-3c/138, BMP-3c/110, HBSrdBMP-3c/138 y HBSrdBMP-3c/110 recombinante de reno implantando 1 mg, 3 mg y 5 mg de proteína recombinante absorbida en una esponja de colágeno o cápsula de gelatina Lyostrypt® en músculo tenso de ratón. Se usó BSA como control. Se realizó una radiografía de las patas traseras, y los sitios del implante se diseccionaron y fijaron en una disolución de formalina neutra al 10%. Los implantes fijos se cortaron en secciones de 7 µm, y se tiñeron con tinción de hematoxilina-eosina. Las secciones se examinaron con un microscopio óptico. Se evaluó mediante radiografías el área y la densidad óptica de la nueva formación ósea. Las imágenes radiográficas se transfirieron a un ordenador utilizando un escáner óptico (HP Scan Jet, Hewlett Packard, EE.UU.). Se evaluaron las formaciones de hueso nuevo ectópico y ortopédico como las áreas (mm<sup>2</sup>) de tejido calcificado visible en las radiografías definidas mediante el uso del programa informático Scion Image Beta 4.02 (Scion Corp., EE.UU.). Se midió la densidad óptica media (mmAl) del área definida con el mismo equipo. La calibración de la densidad óptica se realizó utilizando una cuña de aluminio (Al) de 0,25 mmAl, dando un rango de densidad calibrado de hasta 4 mmAl.

## Resultados

### Clonación de ADNc parcial de BMP-3c de reno

La secuencia de nucleótidos obtenida a partir de las reacciones de ABI Prism, se analizó con ordenador y se comparó con secuencias de BMP ya conocidas. Debido a las búsquedas de homología, el ADNc recién clonado parecía ser más homólogo con BMP-3b de reno (homología de nucleótidos 96% y homología de aminoácidos 95%) y con BMP-3b humana (homología de aminoácidos 93%), Tabla 1. Las homologías de la proteína BMP-3c con las otras proteínas BMP-3 de mamífero fueron las más elevadas para BMP-3 humana (homología de aminoácidos 91%), Tabla 2.

### Expresión de la parte madura de BMP-3c de reno

En primer lugar, se insertaron dos partes maduras diferentes de BMP-3c de reno en el vector pTrcHis2A, y las células TOP 10 de *E. coli* se transformaron mediante los vectores pTrc3c/138 y pTrc3c/110 resultantes. La expresión de proteína recombinante se indujo por IPTG. La producción de proteínas recombinantes se comprobó mediante SDS-PAGE, pero no se observó inducción con ambos vectores. Se esperaba que esto fuera causado por varios codones en rdBMP-3c que eran raros para el empleo del codón *E. coli*. También podría ser posible que fuese causado por un contenido de GC ligeramente alto en el comienzo de la secuencia de codificación de ambas proteínas rdBMP-3c (mediante BMP-3c/138 los primeros 10 codones tienen un contenido de GC de 53%, y mediante BMP-3c/110 de 63%).

Debido a estos hechos, se decidió probar otro sistema vectorial con diferentes líneas celulares de *E. coli*. Se seleccionaron pET22b(+) (Novagen) con His6-marcador y pelB líder como el nuevo vector de expresión, y se eligieron para la expresión las líneas Rosetta (DE3) y Origami B (DE3) de *E. coli*. Se clonó el ADN de ambas partes maduras de BMP-3c de reno que codifican proteínas en pET22b (+), y los nuevos plásmidos se denominaron pETrd3c/138 y pETrd3c/110, y tanto las células Rosetta (DE3) como las Origami B (DE3) se transformaron con estos vectores construidos. Cuando se analizó en SDS-PAGE, se observó sobreexpresión de proteínas rdBMP-3c (Figura 8). Debido a estudios de expresión, se usaron principalmente células Rosetta (DE3) con vectores pETrd3c en la producción de proteínas rdBMP-3c recombinantes.

### Purificación de proteínas rdBMP-3c

Las proteínas recombinantes rdBMP-3c de reno se sobreexpresaron en *E. coli*. Después del tratamiento de lavado, precipitación por punto isoeléctrico, y solubilización de los cuerpos de inclusión, el contenido de rdBMP-3c recombinante de reno fue del 85%.

La siguiente etapa de purificación fue la cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC). Después de la elución de la columna con gradiente de pH, la pureza de rdBMP-3c medida a partir del SDS-PAGE fue de hasta 75% (Figura 8). La proteína aislada con la parte madura de rdBMP-3c/138 tenía un PM de 20.400 Da, y con la parte madura de rdBMP-3c/110, 17.100 Da, como se muestra por la movilidad electroforética en el SDS-PAGE en condiciones reductoras.

### Purificación de proteínas HBSrdBMP-3c

Las proteínas HBSrdBMP-3c/138 y HBSrdBMP-3c/110 recombinantes de reno se sobreexpresaron en *E. coli* y se produjeron como cuerpos de inclusión (IBs). Después del tratamiento de lavado, precipitación por punto isoeléctrico y solubilización de los cuerpos de inclusión, el contenido de HBSrdBMP-3c recombinante de reno fue del 50%.

La siguiente etapa de purificación fue la cromatografía de afinidad (IMAC y Heparina). Después de la elución de las columnas, la pureza de HBSrdBMP-3c medida a partir del SDS-PAGE fue de hasta 90%. Las proteínas aisladas con la parte madura de HBSrdBMP-3c/138 tenían un PM de 20.300 Da, y HBSrdBMP-3c/110 de 17.000 Da, como se muestra por la movilidad electroforética en el SDS-PAGE en condiciones reductoras.

### Ensayos de replegamiento y de la actividad de rdBMP-3c/138, rdBMP-3c/110, HBSrd3c/138 y HBSrd3c/110

El replegamiento *in vitro* de las proteínas rdBMP-3c desnaturalizadas se cuantificó midiendo mediante densitometría el dímero replegado de la proteína en geles teñidos con Azul de Coomassie. La cantidad de dímero replegado medida por SDS-PAGE no reductora fue para las proteínas rdBMP-3c sin HBS del 50%, y para HBSrdBMP-3c de más del 70%.

La actividad osteoinductiva inducida por las proteínas rdBMP-3c sin HBS aumentó de manera dependiente de la dosis, al menos hasta 5 mg (Tabla 3). Cuando se comparó la actividad biológica de BMP-3c/138 a la de BMP-3c/110, parecía que BMP-3c/110 era un inductor más potente de la formación ósea. De hecho, el replegado era un 20% mayor para el rdBMP-3c con HBS, que sin HBS, lo hace que el HBSrdBMP-3c sea de gran valor.

Esta invención se ha descrito con énfasis en algunas de las realizaciones y aplicaciones preferidas. Sin embargo, será evidente para los expertos en la técnica, que se pueden preparar y utilizar variaciones en las realizaciones

descritas, y que la invención puede ser puesta en práctica de otra manera que la descrita específicamente en la presente memoria dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

**Lista de secuencias**

- 5 <110> BBS-Bioactive Bone Substitutes Oy
- <120> rdBMP-3c
- <130> OP101245
- 10 <150> FI 20055256
- <151> 2005-05-27
- <160> 1
- 15 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 138
- 20 <212> PRT
- <213> Rangifer tarandus tarandus
- <400> 1

Arg Lys Lys Gly Gln Asp Val Phe Met Ala Ser Ser Gln Val Leu Asp  
 1 5 10 15

Phe Asp Glu Lys Thr Met Gln Lys Ala Arg Lys Lys Gln Trp Asp Glu  
 20 25 30

Pro Arg Val Cys Ser Arg Arg Tyr Leu Lys Val Asp Phe Ala Asp Ile  
 35 40 45

Gly Trp Asn Glu Trp Ile Ile Ser Pro Lys Ser Phe Asp Ala Tyr Tyr  
 50 55 60

Cys Ser Gly Ala Cys Glu Phe Pro Met Pro Lys Met Val Arg Pro Ser  
 65 70 75 80

Asn His Ala Thr Ile Gln Ser Ile Val Arg Ala Val Gly Ile Val Pro  
 85 90 95

Gly Ile Pro Glu Pro Cys Cys Val Pro Asp Lys Met Ser Ser Leu Gly  
 100 105 110

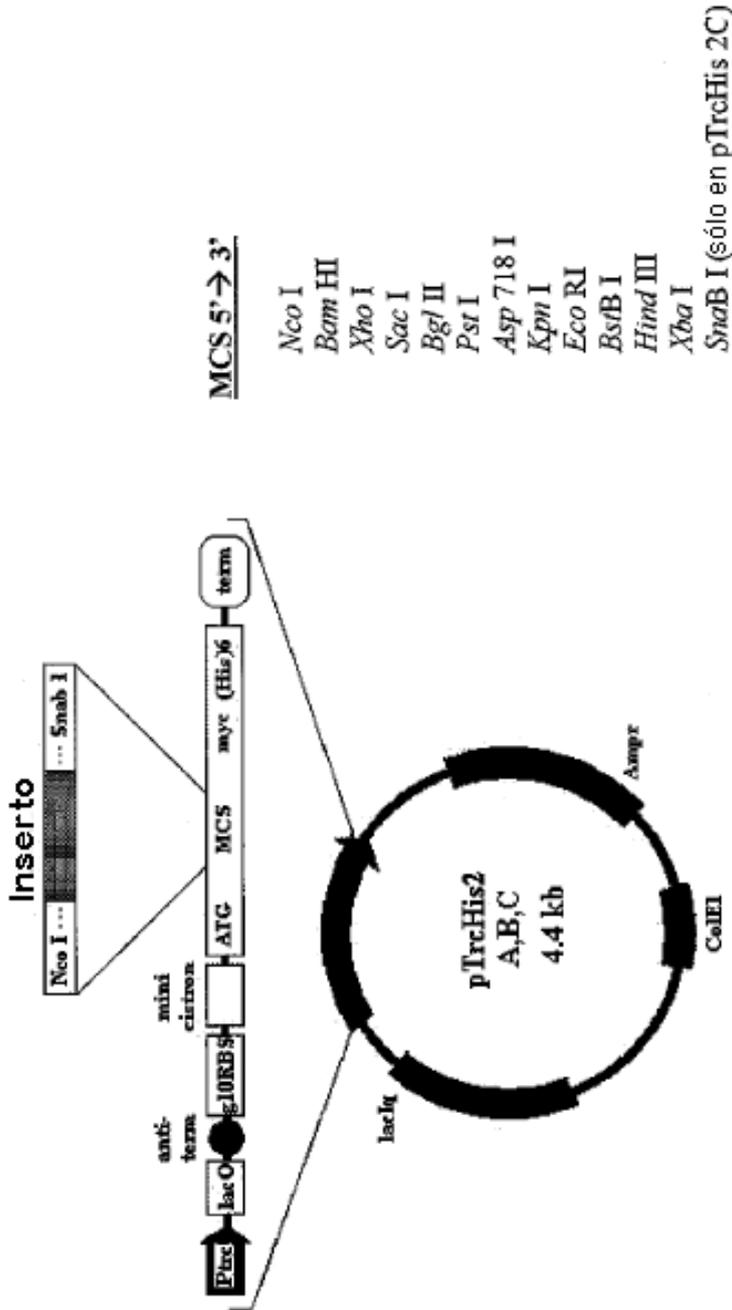
Val Leu Phe Leu Asp Glu Asn Arg Asn Val Val Leu Lys Val Tyr Pro  
 115 120 125

25 Asn Met Ser Val Glu Thr Cys Ala Cys Gln  
 130 135

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína morfogenética ósea 3 aislada (BMP-3), caracterizada por que contiene la secuencia de consenso:  
R-K-K-Q-W-D-E-P-R-V/N-C-S/A-R-R-Y-L-K-V-D-F-A-D-I-G-W-N/S-E-W-I-I-S-P-K-S-F-D-A-  
Y-Y-C-S-G-A-C-E/Q-F-P-M-P-K-M-V/L-R/K-P-S-N-H-A-T-I-Q-S-I-V-R-A-V-G-I/V-V-P/S-G-  
I-P-E-P-C-C-V.
- 5 2. La proteína morfogenética ósea 3 de la reivindicación 1, caracterizada por que se obtiene mediante la expresión en un huésped bacteriano.
3. La proteína morfogenética ósea 3 de la reivindicación 2, caracterizada por que el huésped bacteriano es *E coli*, tal como una célula TOP10, Origami o Rosetta de *E coli*.
4. La proteína morfogenética ósea 3 de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizada por que contiene los aminoácidos 26-104 de SEQ ID NO: 1.
- 10 5. La proteína morfogenética ósea 3 de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizada por que contiene los aminoácidos 6-104 de SEQ ID NO: 1.
6. La proteína morfogenética ósea 3 de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizada por que contiene los aminoácidos 6-109 de SEQ ID NO: 1.
- 15 7. La proteína morfogenética ósea 3 de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizada por que contiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
8. La proteína morfogenética ósea 3 de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por que en el amino terminal contiene un sitio de unión a heparina que contiene la secuencia de aminoácidos AKHKQRKRGY.
9. Una composición farmacéutica, caracterizada por que contiene la proteína morfogenética ósea de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 20 10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, caracterizada por que contiene dicha proteína morfogenética ósea como homodímero o como heterodímero junto con otra proteína morfogenética ósea.
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 9 ó 10, caracterizada por que contiene además otra proteína morfogenética ósea, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos o factor de crecimiento transformante.
- 25 12. El uso de la proteína morfogenética ósea de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para la fabricación de un medicamento para tratar trastornos relacionados con el hueso, cartílago, tendón o diente, en donde se desea la regeneración, reparación o crecimiento de los mismos.
13. Un dispositivo osteogénico, caracterizado por que es un implante que contiene la proteína morfogenética ósea de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 30 14. El dispositivo osteogénico de la reivindicación 13, caracterizado por que contiene dicha proteína morfogenética ósea como homodímero o como heterodímero junto con otra proteína morfogenética ósea.
15. El dispositivo osteogénico de la reivindicación 13 ó 14, caracterizado por que contiene además otra proteína morfogenética ósea, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos o factor de crecimiento transformante.
- 35 16. El dispositivo osteogénico de cualquiera de las reivindicaciones 13-15, caracterizado por que contiene una matriz biocompatible.
17. El dispositivo osteogénico de la reivindicación 16, caracterizado por que dicha matriz biocompatible contiene fosfato de calcio, carboximetilcelulosa o colágeno o combinaciones de los mismos.
- 40 18. Un método *in vitro* para inducir la formación de hueso, cartílago, tendón o diente, caracterizado por tratar dicho hueso, cartílago, tendón o diente con la proteína morfogenética ósea de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.





| Plásmido        | Inserto   | Sitio de restricción en el extremo 5' | Sitio de restricción en el extremo 3' |
|-----------------|---|---------------------------------------|---------------------------------------|
| pTrcd3c/138     | ADNC de la parte madura de BMP-3c               | Bam HI                                | Hind III                              |
| pTrcd3c/110     | ADNC de la parte madura de BMP-3c               | Bam HI                                | Hind III                              |
| pTrcHBS         | Sitio de unión a heparina                       | Bam HI                                | Kpn I                                 |
| pTrcHBSrd3c/138 | HBS + ADNC de la parte madura de BMP-3c de reno | Bam HI (Kpn I)                        | Hind III                              |
| pTrcHBSrd3c/110 | HBS + ADNC de la parte madura de BMP-3c de reno | Bam HI (Kpn I)                        | Hind III                              |

Fig. 2

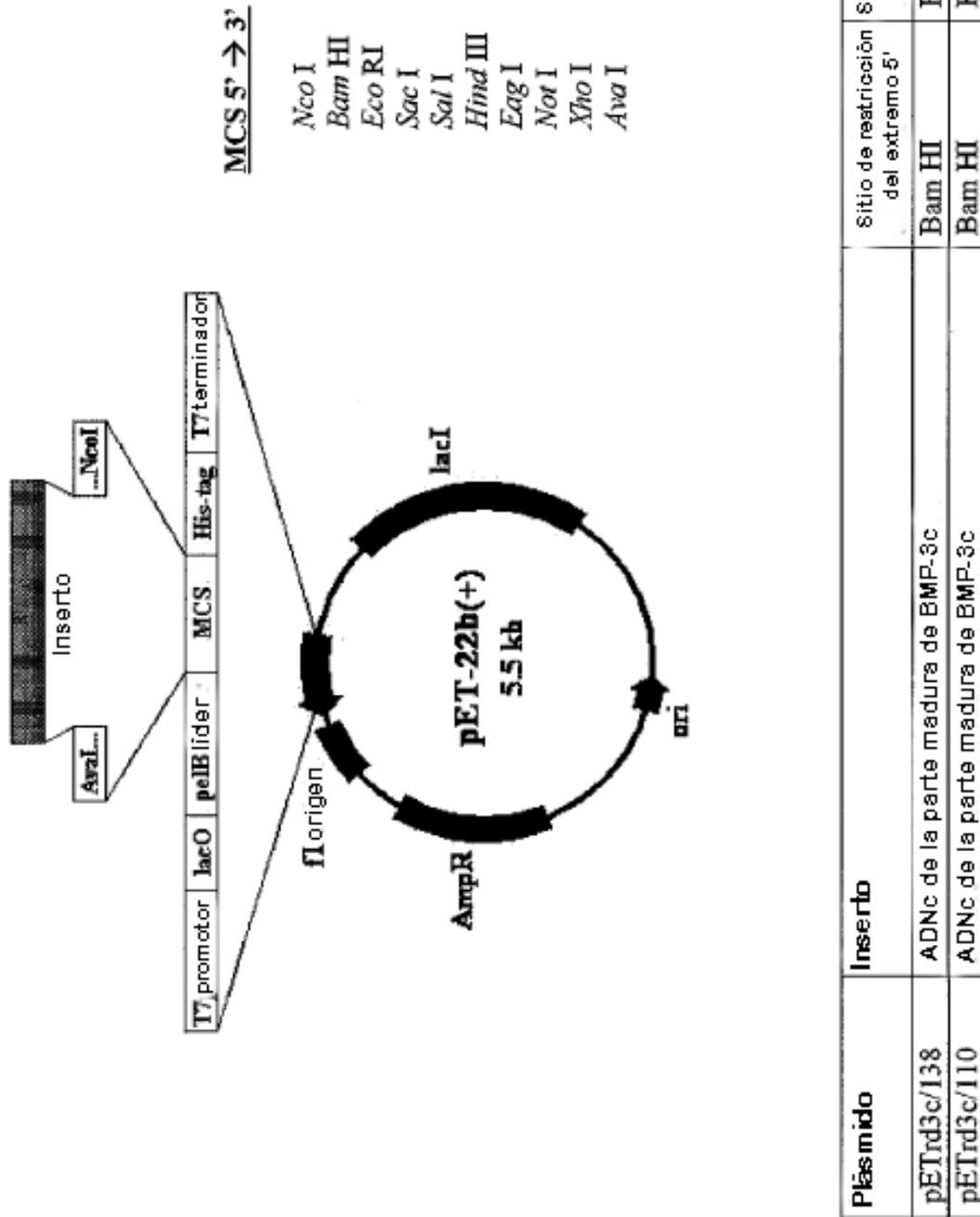


Fig. 3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1   | atg | gat | ccg | agg | aag | aag | ggc | cag | gat | gtt | ttc | atg | gcc | tcc | tca | 39  |
|     | M   | D   | P   | R   | K   | K   | G   | Q   | D   | V   | F   | M   | A   | S   | S   |     |
|     |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
| 40  | cag | gtg | ctg | gac | ttt | gac | gag | aag | acg | atg | cag | aaa | gcc | cgg | aag | 78  |
|     | Q   | V   | L   | D   | F   | D   | E   | K   | T   | M   | Q   | K   | A   | R   | K   |     |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |
| 79  | aag | caa | tgg | gat | gag | cca | cgg | gtc | tgt | tcc | cgg | agg | tat | ctg | aag | 117 |
|     | K   | Q   | W   | D   | E   | P   | R   | V   | C   | S   | R   | R   | Y   | L   | K   |     |
|     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     | 45  |     |
| 118 | gtg | gac | ttc | gcg | gac | ata | ggg | tgg | aat | gaa | tgg | atc | atc | tca | ccc | 156 |
|     | V   | D   | F   | A   | D   | I   | G   | W   | N   | E   | W   | I   | I   | S   | P   |     |
|     |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     |     | 60  |     |
| 157 | aag | tct | ttc | gac | gcc | tac | tac | tgc | tca | gga | gcc | tgc | gag | ttc | ccc | 195 |
|     | K   | S   | F   | D   | A   | Y   | Y   | C   | S   | G   | A   | C   | E   | F   | P   |     |
|     |     |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     | 75  |     |
| 196 | atg | ccc | aag | atg | gtc | cgc | cca | tcc | aac | cac | gcc | acc | atc | cag | agc | 234 |
|     | M   | P   | K   | M   | V   | R   | P   | S   | N   | H   | A   | T   | I   | Q   | S   |     |
|     |     |     |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |
| 235 | atc | gtc | agg | gcc | gtg | ggc | atc | gtc | cca | ggc | atc | cca | gag | ccg | tgc | 273 |
|     | I   | V   | R   | A   | V   | G   | I   | V   | P   | G   | I   | P   | E   | P   | C   |     |
|     |     |     |     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     |     | 105 |     |
| 274 | tgt | gtt | ccc | gac | aag | atg | agc | tct | ctt | ggg | gtc | ctt | ttc | ctg | gat | 312 |
|     | C   | V   | P   | D   | K   | M   | S   | S   | L   | G   | V   | L   | F   | L   | D   |     |
|     |     |     |     | 110 |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     |     | 120 |     |
| 313 | gag | aac | cgg | aac | gtg | gta | ctg | aag | gtg | tac | ccc | aac | atg | tct | gtg | 351 |
|     | E   | N   | R   | N   | V   | V   | L   | K   | V   | Y   | P   | N   | M   | S   | V   |     |
|     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |
| 352 | gag | acc | tgt | gcc | tgc | caa | aag | ctt | ggg | ccc | gaa | caa | aaa | ctc | atc | 390 |
|     | E   | T   | C   | A   | C   | Q   | K   | L   | G   | P   | E   | Q   | K   | L   | I   |     |
|     |     |     |     | 140 |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     |     | 150 |     |
| 391 | tca | gaa | gag | gat | ctg | aat | agc | gcc | gtc | gac | cat | cat | cat | cat | cat | 429 |
|     | S   | E   | E   | D   | L   | N   | S   | A   | V   | D   | H   | H   | H   | H   | H   |     |
|     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |     |     |     | 165 |     |
| 430 | cat | tga |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 436 |
|     | H   | -   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

Fig. 4

|     |     |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1   | atg | aaa | tac  | ctg | ctg | ccg | acc | gct | gct | gct | ggt | ctg | ctg | ctc | ctc | 45  |
|     | M   | K   | Y    | L   | L   | P   | T   | A   | A   | A   | G   | L   | L   | L   | L   | 15  |
|     |     |     |      |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     |     |
| 46  | gct | gcc | cag  | ccg | gcg | atg | gcc | atg | gat | atc | gga | att | aat | tgg | gat | 90  |
|     | A   | A   | Q    | P   | A   | M   | A   | M   | P   | I   | G   | I   | N   | S   | D   | 30  |
|     |     |     |      |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     |     |
| 91  | ccg | agg | aag  | aag | ggc | cag | gat | ggt | ttc | atg | gcc | tcc | tca | cag | gtg | 135 |
|     | P   | R   | K    | K   | G   | Q   | D   | V   | F   | M   | A   | S   | S   | Q   | V   | 45  |
|     |     |     |      |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     |     |
| 136 | ctg | gac | ttt  | gac | gag | aag | acg | atg | cag | aaa | gcc | ccg | aag | aag | caa | 180 |
|     | L   | D   | F    | D   | E   | K   | T   | M   | Q   | K   | A   | R   | K   | K   | Q   | 60  |
|     |     |     |      |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     |     |     |
| 181 | lgg | gat | gag  | cca | ccg | gtc | tgt | tcc | ccg | agg | tat | ctg | aag | gig | gac | 225 |
|     | W   | D   | E    | P   | R   | V   | C   | S   | R   | R   | Y   | L   | K   | V   | D   | 75  |
|     |     |     |      |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     |     |     |
| 226 | ttc | gcg | gac  | ata | ggg | tgg | aat | gaa | tgg | atc | atc | tca | ccc | aag | tct | 270 |
|     | F   | A   | D    | I   | G   | W   | N   | E   | W   | I   | I   | S   | P   | K   | S   | 90  |
|     |     |     |      |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     |     |     |
| 271 | ttc | gac | gcc  | tac | tac | lgc | tca | gga | gcc | tgc | gag | ttc | ccc | atg | ccc | 315 |
|     | F   | D   | A    | Y   | Y   | C   | S   | G   | A   | C   | E   | F   | P   | M   | P   | 105 |
|     |     |     |      |     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     |     |     |
| 316 | aag | atg | gtc  | cgc | cca | tcc | aac | cac | gcc | acc | atc | cag | agc | atc | gtc | 360 |
|     | K   | M   | V    | R   | P   | S   | N   | H   | A   | T   | I   | Q   | S   | I   | V   | 120 |
|     |     |     |      |     | 110 |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     |     |     |
| 361 | agg | gcc | gtg  | ggc | atc | gtc | cca | ggc | atc | cca | gag | ccg | tgc | tgt | gtt | 405 |
|     | R   | A   | V    | G   | I   | V   | P   | G   | I   | P   | E   | P   | C   | C   | V   | 135 |
|     |     |     |      |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     |     |     |
| 406 | ccc | gac | aag  | atg | agc | tct | ctt | ggg | gtc | ctt | ttc | ctg | gat | gag | aac | 450 |
|     | P   | D   | K    | M   | S   | S   | L   | G   | V   | L   | F   | L   | D   | E   | N   | 150 |
|     |     |     |      |     | 140 |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     |     |     |
| 451 | cgg | aac | gtg  | gta | cig | aag | gtg | tac | ccc | aac | atg | tct | gtg | gag | acc | 495 |
|     | R   | N   | V    | V   | L   | K   | V   | Y   | P   | N   | M   | S   | V   | E   | T   | 165 |
|     |     |     |      |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |     |     |     |     |
| 496 | tgt | gcc | tgc  | caa | aag | ctt | gcg | gcc | gca | ctc | gag | cac | cac | cac | cac | 540 |
|     | C   | A   | C    | Q   | K   | L   | A   | A   | A   | L   | E   | H   | H   | H   | H   | 180 |
|     |     |     |      |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |     |     |     |     |
| 541 | cac | cac | tga  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 549 |
|     | H   | H   | stop |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

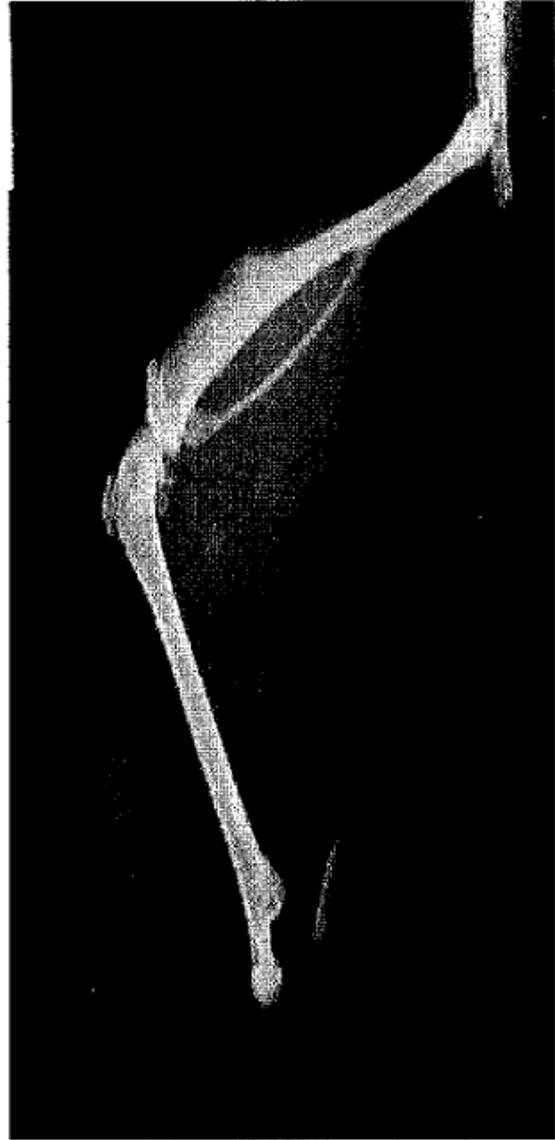
Fig. 5

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1   | cgc | aag | gac | cgc | agg | aag | aag | ggc | cag | gat | gtt | ttc | atg | gcc | tcc | 45  |
|     | R   | K   | D   | R   | R   | K   | K   | G   | Q   | D   | V   | F   | M   | A   | S   |     |
|     |     |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| 46  | tca | cag | gtg | ctg | gac | ttt | gac | gag | aag | acg | atg | cag | aaa | gcc | cgg | 90  |
|     | S   | Q   | V   | L   | D   | F   | D   | E   | K   | T   | M   | Q   | K   | A   | R   |     |
|     |     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |
| 91  | aag | aag | caa | tgg | gat | gag | cca | cgg | gtc | tgt | tcc | cgg | agg | tat | ctg | 135 |
|     | K   | K   | Q   | W   | D   | E   | P   | R   | V   | C   | S   | R   | R   | Y   | L   |     |
|     |     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |
| 136 | aag | gtg | gac | ttc | gcg | gac | ata | ggg | tgg | aat | gaa | tgg | atc | atc | tca | 180 |
|     | K   | V   | D   | F   | A   | D   | I   | G   | W   | N   | E   | W   | I   | I   | S   |     |
|     |     |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |
| 181 | ccc | aag | tct | ttc | gac | gcc | tac | tac | tgc | tca | gga | gcc | tgc | gag | ttc | 225 |
|     | P   | K   | S   | F   | D   | A   | Y   | Y   | C   | S   | G   | A   | C   | E   | F   |     |
|     |     |     |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |
| 226 | ccc | atg | ccc | aag | atg | gtc | cgc | cca | tcc | aac | cac | gcc | acc | atc | cag | 270 |
|     | P   | M   | P   | K   | M   | V   | R   | P   | S   | N   | H   | A   | T   | I   | Q   |     |
|     |     |     |     |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |
| 271 | agc | atc | gtc | agg | gcc | gtg | ggc | atc | gtc | cca | ggc | atc | cca | gag | cgg | 315 |
|     | S   | I   | V   | R   | A   | V   | G   | I   | V   | P   | G   | I   | P   | E   | P   |     |
|     |     |     |     |     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |
| 316 | tgc | tgt | gtt | ccc | gac | aag | atg | agc | tct | ctt | ggg | gtc | ctt | ttc | ctg | 360 |
|     | C   | C   | V   | P   | D   | K   | M   | S   | S   | L   | G   | V   | L   | F   | L   |     |
|     |     |     |     |     | 110 |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |
| 361 | gat | gag | aac | cgg | aac | gtg | gta | ctg | aag | gtg | tac | ccc | aac | atg | tct | 405 |
|     | D   | E   | N   | R   | N   | V   | V   | L   | K   | V   | Y   | P   | N   | M   | S   |     |
|     |     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |
| 406 | gtg | gag | acc | tgt | gcc | tgc | caa |     |     |     |     |     |     |     |     | 450 |
|     | V   | E   | T   | C   | A   | C   | Q   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

Fig. 6



A



B

Fig. 7

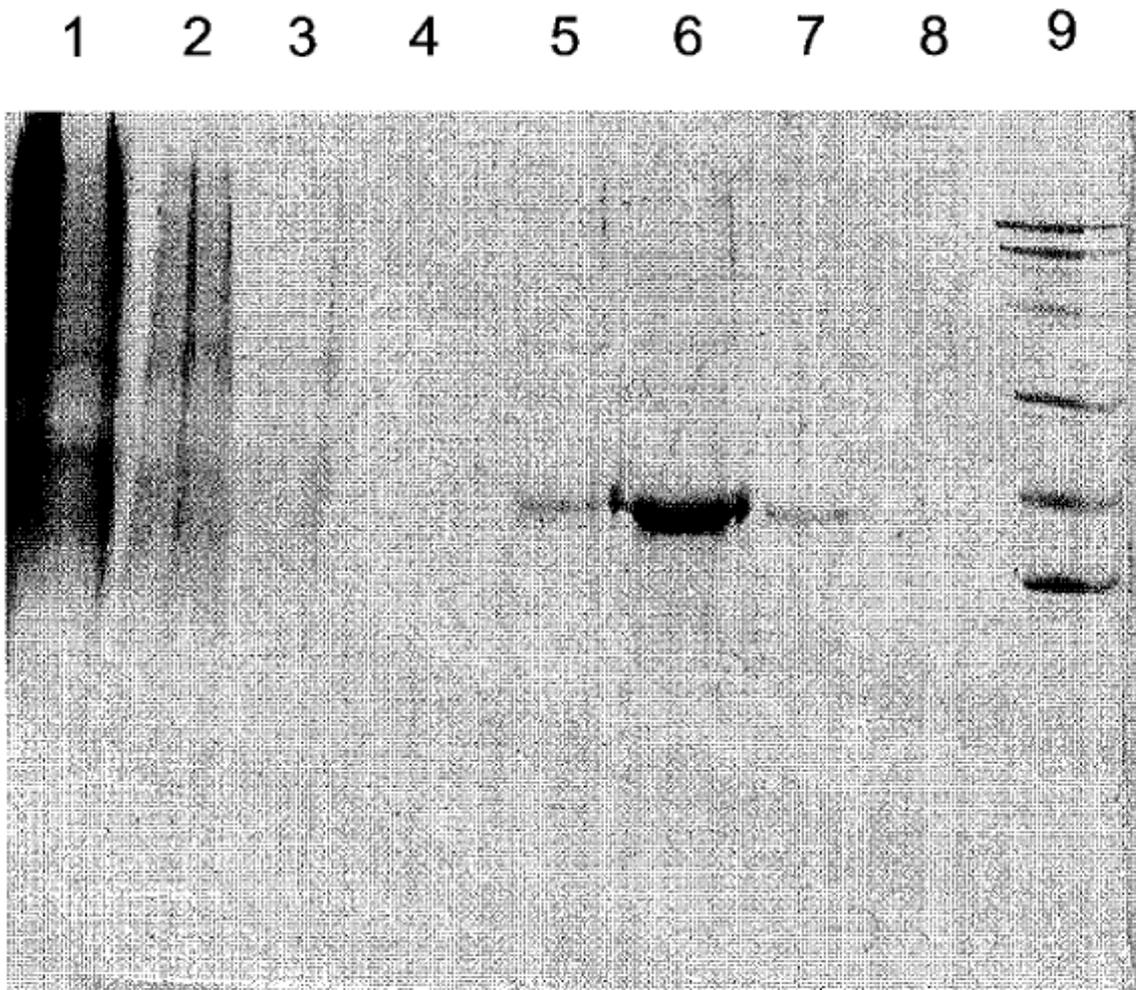


Fig. 8