



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 272 063**

(51) Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)

**C07K 14/51** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **99917029 .3**

(86) Fecha de presentación : **14.05.1999**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1078054**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2001**

(54) Título: **Monómero de MP52/GFD-5 con actividad morfogenética ósea y agente medicinal que contiene el mismo para prevención y tratamiento de enfermedades de cartílago y hueso.**

(30) Prioridad: **22.05.1998 JP 10-141379**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2007**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2007**

(73) Titular/es: **BIOPHARM GESELLSCHAFT ZUR  
BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON  
PHARMAKA mbH  
Czernyring 22  
69115 Heidelberg, DE**

(72) Inventor/es: **Kawai, Shinji;  
Kimura, Michio;  
Muraki, Yoshifumi y  
Katsuura, Mieko**

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 272 063 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

Monómero de MP52/GFD-5 con actividad morfogenética ósea y agente medicinal que contiene el mismo para prevención y tratamiento de enfermedades de cartílago y hueso.

## Antecedentes de la invención

## (1) Campo de la invención

La presente invención se refiere a las proteínas monómeras MP52 y GDF-5, cuya cisteína relacionada con una formación dímica de una proteína ha sido reemplazada con otro aminoácido. Además, la presente invención se refiere a un método para preparación de dichas proteínas monómeras en grandes cantidades y con una pureza elevada por utilización de *Escherichia coli* transformada con un plásmido que contiene una secuencia de DNA que puede expresar una u otra de dichas proteínas monómeras. Adicionalmente, la presente invención se refiere a un agente que contiene una o ambas de dichas proteínas monómeras para prevención y tratamiento de una enfermedad que afecta al hueso y/o al cartílago.

## (2) Descripción de la técnica anterior

Actualmente, se conocen estrógeno, calcitonina, vitamina D3, sus derivados y derivados del ácido bisfosfónico como agentes preventivos o terapéuticos para enfermedades óseas. Recientemente, se ha comunicado que se encuentra actividad morfogenética ósea en una serie de una proteína morfogenética ósea (a la que se hace referencia en lo sucesivo como "BMP") perteneciente a la superfamilia TGF- $\beta$ , desde BMP-2 hasta BMP-14.

Adicionalmente, se ha consignado que una proteína designada GDF-5 o MP52 humana tiene actividad morfogenética ósea (documentos WO93/16099, WO95/4819, WO94/15949 y Nature Vol. 368, 1994, p. 639-643). GDF-5, como se describe en el documento WO94/15949 es la proteína de ratón homóloga de la MP52 humana.

Se considera que la MP52 humana madura es una proteína que tiene 120 residuos de aminoácidos que comienzan con alanina en un terminal N, y su secuencia ha sido descrita en estas solicitudes de patente.

Estas proteínas existen como un homodímero que tiene un solo enlace disulfuro en la naturaleza. Por el contrario, la fabricación de su proteína recombinante se lleva a cabo utilizando sus homodímeros o heterodímeros para producir una proteína que presenta la actividad. Por ejemplo, se ha consignado MP52 humana en la publicación de la solicitud de patente no examinada, JP 031098/97. Entre tanto, existen dos tipos denominados receptor tipo I y receptor tipo II en los receptores de la superfamilia TGF- $\beta$ . La transmisión intracelular de señales por los receptores de la superfamilia TGF- $\beta$  que contienen estas proteínas morfogenéticas óseas (dímeros) requiere la combinación simultánea de estas proteínas a la vez con los receptores tipo I y tipo II, y se considera que se forma un polímero por reunión de dos o más dímeros que realizan la transmisión intracelular de señales (Bone, Vol. 19, 1996, p. 569-574). Se ha considerado que para la formación de polímeros es importante que la proteína debe ser un dímero. No se ha encontrado todavía la actividad en un monómero. Además, la preparación de estos recombinantes monómeros no ha sido realizada todavía.

## Sumario de la invención

Los autores de la presente invención han intentado una producción en gran escala de monómeros de MP52 humana por una tecnología de ingeniería genética utilizando *Escherichia coli*. A saber, los autores de la presente invención construyeron un plásmido de secuencia de DNA codificante de la secuencia de aminoácidos que tiene 119 residuos descrita en SEQ ID NO: 1, entre los cuales el codón del residuo cisteína de No. 83, que está unido a un puente disulfuro entre moléculas monómeras de MP52, se convirtió en el codón de alanina. Adicionalmente, los autores de la invención han tenido éxito en la expresión de una gran cantidad de monómeros de MP52 humana utilizando *Escherichia coli* por empleo del plásmido y replegamiento para producir monómeros de la proteína descrita en SEQ ID NO: 1 del Listado de Secuencias con alta pureza y con rendimiento muy alto.

Se ha encontrado, sorprendentemente, que el monómero posee actividad para inducir la diferenciación a osteocitos en algunas líneas de células (MC3T3-E1 y ATDC5) a pesar de que, de acuerdo con las ideas convencionales, únicamente un dímero tiene actividad morfogenética ósea. La presente invención se ha completado por observación de que la actividad para inducir la diferenciación es dos veces mayor que la del dímero sobre la base de concentración en peso.

## Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 es un mapa de plásmido del vector de expresión (pKOT279) obtenido en el Ejemplo 1 (2).

Fig. 2 es una figura comparativa de las actividades promotoras de la diferenciación de osteoblastos entre el monómero de la presente invención y el dímero de MP52 humana. (A) muestra la actividad en células MC3T3-E1 y (B) muestra la misma en células ATDC5. El círculo blanco muestra la actividad del monómero y el círculo negro muestra la del dímero de MP52 humana.

**Descripción de la realización preferida**

A saber, la presente invención se refiere a las proteínas monómeras de MP52 humana y su homólogo de ratón GDF-5, cuya cisteína relacionada con una formación de dímero de la proteína ha sido reemplazada con otro amino-ácido, un método para expresar dichas proteínas monómeras y un agente para prevenir y tratar una enfermedad que afecta al hueso y/o al cartílago que contiene una o ambas de dichas proteínas monómeras.

La presente invención se refiere a las proteínas monómeras MP52 y GDF-5, cuya cisteína relacionada con una formación de dímero de la proteína ha sido reemplazada con otro aminoácido.

Otro aminoácido puede ser cualquier aminoácido seleccionado de un grupo constituido por alanina, treonina, serina, y valina teniendo en cuenta el tamaño de una cadena lateral de aminoácido. El aminoácido más preferible es alanina.

La presente invención se refiere a una proteína monómera que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 1.

En detalle, la proteína monómera es una proteína en la cual la cisteína está reemplazada con alanina, y dicha cisteína contribuye al enlace disulfuro intermolecular de un dímero de MP52 humana que tiene un enlace disulfuro intermolecular, y está presente en la posición 83-ava de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. La proteína monómera obtenida por la presente invención exhibe una actividad dos veces mayor en la inducción de la diferenciación que una proteína dímera producida a partir de la proteína monómera.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a un método para preparación de dicha proteína monómera a expresar por utilización de *Escherichia coli*, levadura, células de insecto, y células de mamífero que han sido transformadas por un plásmido que tiene una secuencia de DNA susceptible de expresión de dicha proteína monómera. En detalle, la presente invención se refiere a un método para preparación de una proteína que tiene 119 residuos de aminoácidos derivada de MP52 humana representada por SEQ ID NO: 2, por empleo de *Escherichia coli*. Dicho de otro modo, la presente invención se refiere a la construcción de un plásmido que tiene una secuencia de DNA que codifica una secuencia de aminoácidos en la cual se añade metionina al terminal N de la secuencia de amino-ácidos derivada de MP52 humana en la cual la alanina ha reemplazado a la cisteína de la posición 83-ava de 119 residuos representados por SEQ ID NO: 1. Para el cDNA de MP52 humana, una porción madura se amplificó exclusivamente por la reacción en cadena de la polimerasa (método PCR) utilizando un vector de plásmido como DNA molde que contenía cDNA descrito en el documento WO93/16099. El método PCR utilizado en la invención significa la amplificación general a partir de una cantidad muy pequeña de un fragmento de DNA o RNA de un ácido nucleico por el método descrito en el documento USP 4.683.195.

En la presente invención, se obtuvo una proteína monómera mutante por construcción de un plásmido que tenía una secuencia de DNA que codifica una secuencia de aminoácidos en la cual se añade metionina al terminal N de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, por transformación del plásmido en *Escherichia coli*, por solubilización del cuerpo de inclusión obtenido por cultivo del *Escherichia coli* y por purificación. La presente invención se refiere a un método para preparación de la proteína por replegamiento que exhibe una actividad y purificación de dicha proteína para obtener una proteína monómera descrita en SEQ ID NO: 2.

Concretamente, para la proteína monómera de la presente invención, se obtuvo la proteína monómera MP52 mutante por aplicación de los cuerpos de inclusión solubilizados de *Escherichia coli* a una columna SP-Sepharose FF (Amersham Pharmacia Biotech) y a una columna Superdex 200 pg (Amersham Pharmacia Biotech). Subsiguientemente, la proteína monómera purificada de la presente invención se obtiene por replegamiento seguido por paso a través de una columna HPLC RESOURCE RPC de fase inversa (Amersham Pharmacia Biotech). Las propiedades físicas y químicas de la presente proteína monómera obtenida se analizan sobre la base de los datos de una secuencia de aminoácidos N-terminal, una composición de aminoácidos, y electroforesis.

Las propiedades biológicas de la proteína monómera de la presente invención se evaluaron por la actividad para inducir diferenciación de dos clases de líneas de células osteoblastos de las cuales la actividad promotora de fosfatasa alcalina se encontraba ya en un dímero de MP52 humana. Comparando sobre la base de concentraciones en peso, la proteína monómera de la presente invención exhibía una actividad dos veces mayor que la de la proteína dímera convencional.

La presente invención se refiere a un agente preventivo o terapéutico para enfermedades de cartílago y/o hueso que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 como ingrediente eficaz. En detalle, la proteína monómera de la presente invención tiene actividad para inducir la diferenciación, es decir, una actividad morfogenética para cartílago y hueso, y por consiguiente, se refiere a un agente preventivo o terapéutico para osteoporosis, enfermedades congénitas de hueso y/o cartílago, y osteoartritis tal como osteoartritis articular y osteoartritis de la articulación de la cadera, o artrosteítis, deterioro de cartílago tal como deterioro del menisco, degeneración de déficit de hueso y cartílago causado por lesión y disección de tumores, déficit de hueso y cartílago, fractura, enfermedades congénitas de cartílago y/o hueso tales como acondroplasia, discondrogénesis, acondrogénesis, palatosquisis, y disosteogénesis, y un déficit de raíces dentales y alvéolos dentales.

Adicionalmente, la proteína de la presente invención, que tiene actividad morfogénica de hueso y cartílago, puede utilizarse para terapia de injerto de huesos en el campo de la cirugía estética. La terapia incluye el campo de la cirugía veterinaria.

5 Como en un método de administración sistémico, son posibles administraciones intravenosas, intramusculares, e intra-abdominales; en una administración intravenosa, puede aplicarse un goteo intravenoso además de una inyección intravenosa general.

10 Una preparación de inyección puede ser, por ejemplo, una preparación de polvo para inyección. En este caso, una o más clases de excipiente soluble en agua apropiado tales como manitol, sacarosa, lactosa, maltosa, glucosa, o fructosa se añaden para disolución en agua, se dividen en viales o ampollas, se liofilizan, y se sellan herméticamente para constituir un producto.

15 Para un método de administración local, se trata de un método para cubrir la superficie de un cartílago, hueso, o diente del sitio con la presente proteína por utilización de pasta de colágeno, cola de fibrina, u otros adhesivos. Entre ellos, un hueso utilizado para injerto óseo puede aplicarse también a un hueso artificial utilizado convencionalmente, así como a un hueso natural. Los huesos artificiales incluyen huesos fabricados a partir de materiales naturales o materiales inorgánicos artificiales tales como metales, materiales cerámicos, y vidrios. Los materiales inorgánicos artificiales se ilustran preferiblemente por hidroxiapatito. Por ejemplo, se utiliza un metal para un material interno e  
20 hidroxi-apatito para un material externo de un hueso artificial. Adicionalmente, la presente proteína puede administrarse a un tejido carcinomatoso para mejorar la reconstrucción de un hueso. Es también posible utilizarse la misma para injerto de cartílago.

25 La dosis de administración es determinada por un médico que tenga a su cargo el caso considerando los diversos factores siguientes que afectan a la acción de la presente proteína: el peso de hueso y cartílago a reconstruir, el sitio y el estado de deterioro de hueso y cartílago, el sexo y la edad del paciente, la gravedad de la infección, la duración de administración, y otros factores clínicos. La dosis puede variar de acuerdo con la clase del vehículo utilizada para la construcción que se realiza en combinación con la presente proteína. En general, por lo que concierne a la dosis, aprox.  $10^{-10}$  ng como la presente proteína monómera para un peso húmedo dado de hueso y cartílago durante el uso  
30 como una composición que contiene un vehículo y  $0,1-10^4$   $\mu$ g para un paciente como inyección para aplicación local y sistémica se administran preferiblemente en el intervalo de frecuencia que va desde una sola vez al día a una vez a la semana.

35 Puede esperarse un efecto multiplicador por la aplicación simultánea de un factor de crecimiento conocido tal como el factor de crecimiento I afín a la insulina para regeneración de hueso y cartílago. Así, un monómero fabricado por sustitución de cisteína de la proteína MP52 y fabricación industrial de este monómero no ha sido consignado. El monómero tiene una actividad morfogénica para cartílago y hueso y es útil como agente terapéutico para enfermedades de cartílago y/o hueso. Adicionalmente, la proteína monómera MP52 de la presente invención exhibe una actividad dos veces mayor en peso que la de un dímero de la proteína y permite una reducción a la mitad de una dosis eficaz  
40 de un agente terapéutico para enfermedades de cartílago y/o hueso. Este hecho puede aplicarse para la fabricación de factores morfogénicos óseos mencionados anteriormente, pertenecientes a la superfamilia TFG- $\beta$ .

45 La proteína monómera derivada de MP52 humana y que tiene una secuencia de aminoácidos descrita por SEQ ID NO: 2 tiene una actividad dos veces mayor en una línea celular de osteoblastos para inducir la diferenciación que la del dímero, y es útil como agente preventivo o terapéutico para enfermedades de cartílago y/o hueso. Adicionalmente, un cambio de un aminoácido de la proteína monómera de la presente invención reduce la cisteína y por tanto, facilita la preparación de una proteína monómera en masa y en condiciones de pureza posible por utilización de *Escherichia coli*.

## 50 Ejemplos

Esta invención se explicará de modo más ilustrativo por la vía de los ejemplos siguientes. Los ejemplos que siguen deben considerarse en todos los aspectos como ilustrativos y no restrictivos.

### 55 Ejemplo 1

#### *Preparación de un vector de expresión monómero de MP52 humana*

##### *(1) Aislamiento de una región madura de un mutante de MP52 humana*

60 El monómero de MP52 humana se preparó por reemplazamiento de un residuo cisteína que se considera como formador de un dímero con otro residuo de aminoácido a fin de prevenir la formación de un dímero con el monómero de MP52 humana. En la presente invención, el codón de cisteína (TGC) de la posición 83-ava de la MP52 humana madura que comenzaba con prolina descrita en SEQ ID NO: 1 del Listado de Secuencias del documento WO96/33215 se convirtió en el codón de alanina (GCC).  
65

La sustitución de un residuo de aminoácido se llevó a cabo utilizando un iniciador PCR (dirección directa) en el cual se ha introducido una mutación objetivo con referencia al método de mutación (Sección 8.5) por la reacción en

cadena de la polimerasa (PCR) descrita en Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc.). La secuencia del iniciador PCR utilizado fue descrita en SEQ ID NO:3 como iniciador de sentido y en SEQ ID NO: 4 como iniciador inverso.

La PCR se llevó a cabo utilizando un vector de expresión de MP52 humana (pKOT245) descrito en WO96/33915 como DNA molde (10 ng, 10 pM de cada uno de los iniciadores de sentido e iniciadores inversos, dNTP de 0,4 mM, MgCl<sub>2</sub> de 2,5 mM, y DNA-polimerasa LA Taq (5U, Takara Shuzo Co., Ltd.; No. de catálogo RR013A), en el mismo tubo de ensayo. Se realizaron 30 ciclos de reacción, de los cuales un ciclo incluyó desnaturalización (94°C, 1 min), reasociación de iniciadores (55°C, 1 min), y alargamiento de iniciadores (72°C, 2 min). El producto PCR se digirió con las enzimas de restricción *Nco*I y *Hind*III, se separó por electroforesis con 1,5% de agarosa de punto de fusión bajo (FMC BioProducts Co., No. de catálogo 5170B) y se purificó para obtener un fragmento de DNA que tenía aprox. 170 bases como producto objetivo.

El vector de expresión de MP52 humana monómera (pKOT279) se preparó por reemplazamiento de un fragmento de DNA de *Nco*I-*Hind*III en el cual se introdujo la mutación por el método mencionado anteriormente con la región *Nco*I-*Hind*III de un vector de expresión de MP52 humana monómera (pKOT277) producido por modificación de un vector de expresión de MP52 humana monómera (pKOT245) descrito en el documento WO96/33215. Concretamente, por preparación del vector de expresión de MP52 humana monómera (pKOT277) del cual el promotor lacZ, que se transcribe en la dirección inversa a una MP52 existente aguas abajo del terminador del vector de expresión de MP52 humana monómera (pKOT245) descrito en el documento WO96/33915, por digestión de dicho vector de expresión de MP52 (pKOT277) mediante las enzimas de restricción *Nco*I y *Hind*III, separación por electroforesis en 1,5% de agarosa de punto de fusión bajo (FMC BioProducts Co., No. de catálogo 5170B) y por purificación, se obtuvo un fragmento de DNA que tenía 2717 pares de bases para un producto objetivo. El fragmento de DNA y el fragmento de DNA de aprox. 170 pares de bases en el que se introdujo la mutación, se ligaron utilizando el Kit de Ligación de DNA (Takara Shuzo Co., Ltd., No. de catálogo 6021) para preparar un vector de expresión de MP52 humana monómera (pKOT279, 2,9 kb). El vector fue depositado en el organismo National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566 Japón, en fecha 5 de febrero de 1998 (Depósito No. Bikoukenki No. FERM P-16625) y fue transferido a la International Depository Authority de acuerdo con el Tratado de Budapest en fecha 3 de febrero de 1999 (Depósito No. FERM BP6637). Para la secuencia de bases del vector de expresión monómero de MP52 humana de la presente invención, la introducción de la mutación objetivo y la corrección de la secuencia de bases (secuencia distinta de la del sitio en el que se introdujo la mutación) de la MP52 humana producida fueron confirmadas por utilización de un secuenciador de DNA (Amersham Pharmacia Biotech, ALF).

## (2) Transformación

La transformación se experimentó de acuerdo con el método del cloruro de rubidio de Kushner *et al.* (Genetic Engineering p. 17, Elsevier, 1978). A saber, se introdujo pKOT279 en *Escherichia coli* W3110M de acuerdo con el método anterior para hacer que *Escherichia coli* expresara una proteína de la presente invención.

### Ejemplo 2

#### Cultivo

##### (1) Cultivo

El *Escherichia coli* que expresaba una proteína de la presente invención se precultivó en un medio de cultivo SOC modificado (triptona Bacto 20 g/l, extracto de levadura Bacto 5 g/l, NaCl 0,5 g/l, MgCl<sub>2</sub> 0,95 g/l, y glucosa 3,6 g/l), se añadieron 100 ml de resuspensión de células (triptona Bacto 20 g/l, ácido cítrico 4,3 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,675 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,275 g/l, NaCl 0,865 g/l, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 100 mg/l, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1 mg/l, MnSO<sub>4</sub>·nH<sub>2</sub>O 0,5 mg/l, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2 mg/l, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O 0,225 mg/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 0,1 mg/l, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2,25 mg/l, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 6 mg/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2,2 g/l, tiamina·HCl 5,0 mg/l, metionina 2 g/l, y glucosa 3 g/l) a 5 l de un medio de cultivo para producción a un cultivo en un recipiente de cultivo de 10 l con agitación aireada, isopropil-β-D-tiogalacto-piranosido de concentración 1 mM en una etapa que alcanzó una profase de multiplicación logarítmica (DO<sub>550</sub> = 50) y se añadió al cultivo por DO<sub>550</sub> más allá de 150. Durante el cultivo, la temperatura se reguló a 31°C y el pH se reguló a 7,2 por adición de amoníaco. Se reguló la concentración de oxígeno disuelto al 50% de la saturación de aire por aumento de la velocidad de agitación a fin de prevenir la disminución de la concentración de oxígeno disuelto. Se añadió una solución de glucosa al 50% que contenía fosfato 0,1M para hacer la concentración de glucosa 0,2% con referencia al aumento rápido de la concentración de oxígeno disuelto como indicación a fin de conseguir una concentración mayor de células en cultivo.

##### (2) Preparación de los cuerpos de inclusión de *Escherichia coli*

La solución de cultivo obtenida por dicho método se pasó tres veces a través de un homogeneizador de alta presión (LAB40-10RBF1, APV, Gohrin Co.) a una presión de 560 bar para disgregar las células y se centrifugó para recoger un precipitado que contenía los cuerpos de inclusión.

## Ejemplo 3

*Purificación*(1) *Solubilización de los cuerpos de inclusión de Escherichia coli*

Los cuerpos de inclusión recogidos se lavaron dos veces con solución tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,3) que contenía urea 1M y EDTA 5 mM y se centrifugaron a 4°C y 3000 x g durante 30 min; el precipitado obtenido se solubilizó por sonicación en solución tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,3) que contenía urea 8M, NaCl 50 mM, DTT 64 mM, y EDTA 5 mM.

(2) *Purificación de la proteína monómera desnaturalizada*

La solución solubilizada se centrifugó a 4°C y 20.000 x g durante 30 min, y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante recogido se aplicó a una columna SP-Sepharose FF (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con solución tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,3), urea 6M, DTT 10 mM, y EDTA 1 mM, se lavó con la solución, y se eluyó con la solución que contenía NaCl 0,4M. El material eluido se sometió a filtración sobre gel con una columna Superdex 200 pg (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con solución tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,3), urea 6M, NaCl 0,5M, DTT 10 mM, y EDTA 1 mM para obtener una proteína monómera desnaturalizada simple.

(3) *Replegamiento*

Solución tampón Na-glicina 50 mM (pH 9,8), NaCl 0,5M, CHAPS 20 mM, y GSSG (glutatión oxidado) 3 mM en una cantidad 9 veces mayor se añadieron a la solución de la proteína monómera desnaturalizada obtenida por el tratamiento anterior, seguido por agitación para replegamiento a 4°C durante 20 h.

(4) *Purificación de una proteína monómera que tiene actividad*

La muestra replegada se diluyó 2,8 veces con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 14 mM y se sometió a precipitación isoelectrica. El precipitado se recogió por centrifugación a 3000 x g durante 30 min y se disolvió en TFA al 0,05%. La solución se aplicó a una columna RESOURCE RPC (Amersham Pharmacia Biotech) de HPLC en fase inversa equilibrada previamente con TFA al 0,05% y se eluyó con TFA al 0,05% y un gradiente 0-50% de acetonitrilo. El material eluido se observó por medio de un absorciómetro respecto a absorbancia a 280 nm para obtener una fracción de proteína monómera purificada de la presente invención. Se añadió NaOH 5N a la fracción de proteína, para llevarla dentro del intervalo comprendido entre pH 6,5 y 7,5 para precipitación en el punto isoelectrico. El precipitado se recogió por centrifugación a 10.000 x g durante 10 h y se disolvió en HCl 10 mM para producir aprox. 3 mg/ml a fin de obtener una proteína monómera que tenía una actividad de la presente invención.

(i) *Análisis de la secuencia N-terminal*

El análisis del terminal N de la composición de aminoácidos de la proteína monómera purificada de la presente invención obtenida anteriormente se llevó a cabo utilizando un secuenciador (Applied Biosystems, Modelo 476A).

(ii) *Análisis de la composición de aminoácidos*

La composición de aminoácidos de la proteína monómera purificada de la presente invención obtenida arriba fue examinada por un analizador de aminoácidos (Waters, PICO.TAG.WORK STATION).

(iii) *Análisis por electroforesis*

El peso molecular de la proteína monómera purificada de la presente invención arriba obtenida se investigó por SDS-PAGE en condiciones no reductoras, encontrándose un peso molecular de aprox. 14 kDa.

Por los resultados dados en (i), (ii) y (iii), se ha encontrado que la proteína monómera de la presente invención es una proteína monómera que tiene 119 residuos de aminoácidos de los cuales el terminal N comienza con Pro, representada en SEQ ID NO: 2 del Listado de Secuencias.

## Ejemplo 4

*Medida de la actividad biológica*

Se evaluó la actividad inductora de diferenciación por empleo de dos líneas de células de cultivo; ATDC5 (Riken Gene Bank, RCB 0565) para diferenciar como una célula de cartílago derivada de una célula de embrión de ratón y MC3T3-E1 (Riken Gene Bank, RCB 1126) que tenía propiedades semejantes a las de un osteoblasto derivado de un ratón, sobre la base de la referencia a la actividad promotora de fosfatasa alcalina de dicha proteína. El resultado se muestra en Fig. 2.

## ES 2 272 063 T3

ATDC5 y MC3T3-E1 de la concentración de 10.000 células por ml se suspendieron en medio de cultivo DF (Gibco Ltd.) que contenía 5% de suero fetal de bovino y en medio MEM- $\alpha^-$  (Gibco Ltd.) que contenía 10% de suero fetal de bovino, respectivamente, y se inocularon en 24 placas a 1 ml por pocillo a fin de cultivar a 37°C durante 3 días bajo 5% de CO<sub>2</sub>.

Subsiguientemente, las células se lavaron con el medio MEM- $\alpha^-$  sin suero, y se añadió un dímero natural o una proteína monómera diluida escalonadamente con el medio MEM- $\alpha^-$  que contenía 0,3% de albúmina de bovino a razón de 0,5 ml por pocillo a fin de iniciar la inducción de la diferenciación. El cultivo se llevó a cabo durante 3 días, se lavaron las células dos veces con PBS (solución tampón de fosfato 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) y se añadieron 250  $\mu$ l de solución citolítica (0,2% de NP-40, MgCl<sub>2</sub> 1 mM), y se mantuvieron en reposo a 37°C durante 2 horas. Después de esta etapa, el volumen total de la solución citolítica que contenía células disgregadas se transfirió a un microtubo y se centrifugó (10.000 x g, 5 min) para utilizar su sobrenadante para el ensayo.

Se midió una actividad enzimática por observación del aumento de absorbancia de p-nitrofenol (pNp) que era el producto disociado derivado de fosfato de p-nitrofenilo como sustrato con una concentración final de 10 mM por disolución en tampón de glicina 0,1M, pH 10,4, ZnCl<sub>2</sub> 1 mM y MgCl<sub>2</sub> 1 mM, a 405 nm.

El aumento de absorbancia se observó cada 2 min durante 40 min y se calculó la actividad promotora de la fosfatasa alcalina ( $\mu$ m pNp/min) sobre la base de los datos del intervalo que presentaba linealidad.

Adicionalmente, la concentración de proteína del mismo sobrenadante se conoció por utilización de un Estuche de Ensayo de Proteínas BCA (Amersham Pharmacia Biotech) y la actividad de fosfatasa alcalina por proteína se representó en nmol pNp/min/mg de proteína.

### *Texto Libre del Listado de secuencias*

<210> 1

<223> Residuos de aminoácidos relevantes en SEQ ID NO: 1 desde 1 a 82 y desde 84 a 119 en el documento WO95/04819.

Nota: el residuo de aminoácido 83 es alanina en lugar de cisteína.

<210> 3

<223> Iniciador PCR de sentido para introducción de la mutación.

<210> 4

<223> Iniciador de PCR inverso para introducción de la mutación.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una proteína monómera MP52 o GDF-5, cuya cisteína relacionada con una formación de dímero de la proteína ha sido reemplazada con otro aminoácido.
2. La proteína monómera de acuerdo con la reivindicación 1, en la cual dicho otro aminoácido es un amino-ácido seleccionado del grupo constituido por serina, treonina, alanina y valina.
- 10 3. La proteína monómera de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en la cual dicho otro aminoácido es alanina.
4. Una proteína monómera que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en SEQ ID NO: 2.
- 15 5. Un método para expresión que utiliza *Escherichia coli*, una levadura, una célula de insecto, o una célula de mamífero transformada con un plásmido que comprende una secuencia de DNA que puede expresar una proteína monómera de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 6. Un agente que comprende la proteína monómera de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que contiene una cantidad eficaz de la proteína monómera para prevenir y tratar una enfermedad que afecta al hueso y/o al cartílago.
7. El agente para prevenir y tratar una enfermedad que afecta al hueso y/o al cartílago de acuerdo con la reivindicación 6, en el cual la enfermedad es osteoporosis.
- 25 8. El agente para prevenir y tratar una enfermedad que afecta al hueso y/o al cartílago de acuerdo con la reivindicación 6, en el cual la enfermedad es osteoartritis o artrosteítis.
9. El agente para prevención y tratamiento de una enfermedad que afecta al hueso y/o al cartílago de acuerdo con la reivindicación 6, en el cual la enfermedad es fractura ósea.
- 30 10. El agente para prevención y tratamiento de una enfermedad que afecta al hueso y/o al cartílago de acuerdo con la reivindicación 6, en el cual la enfermedad es una falta de raíces dentales y alvéolos dentales.

35

40

45

50

55

60

65



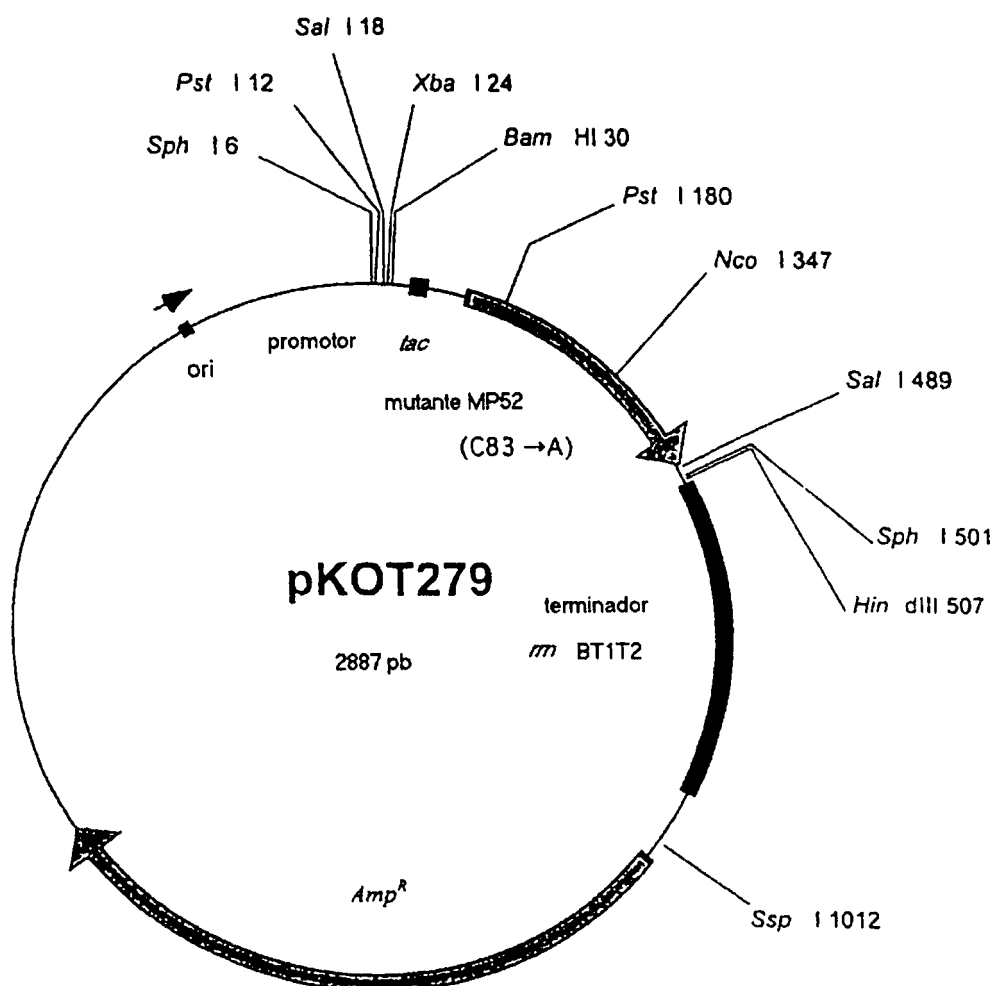


FIGURE 1

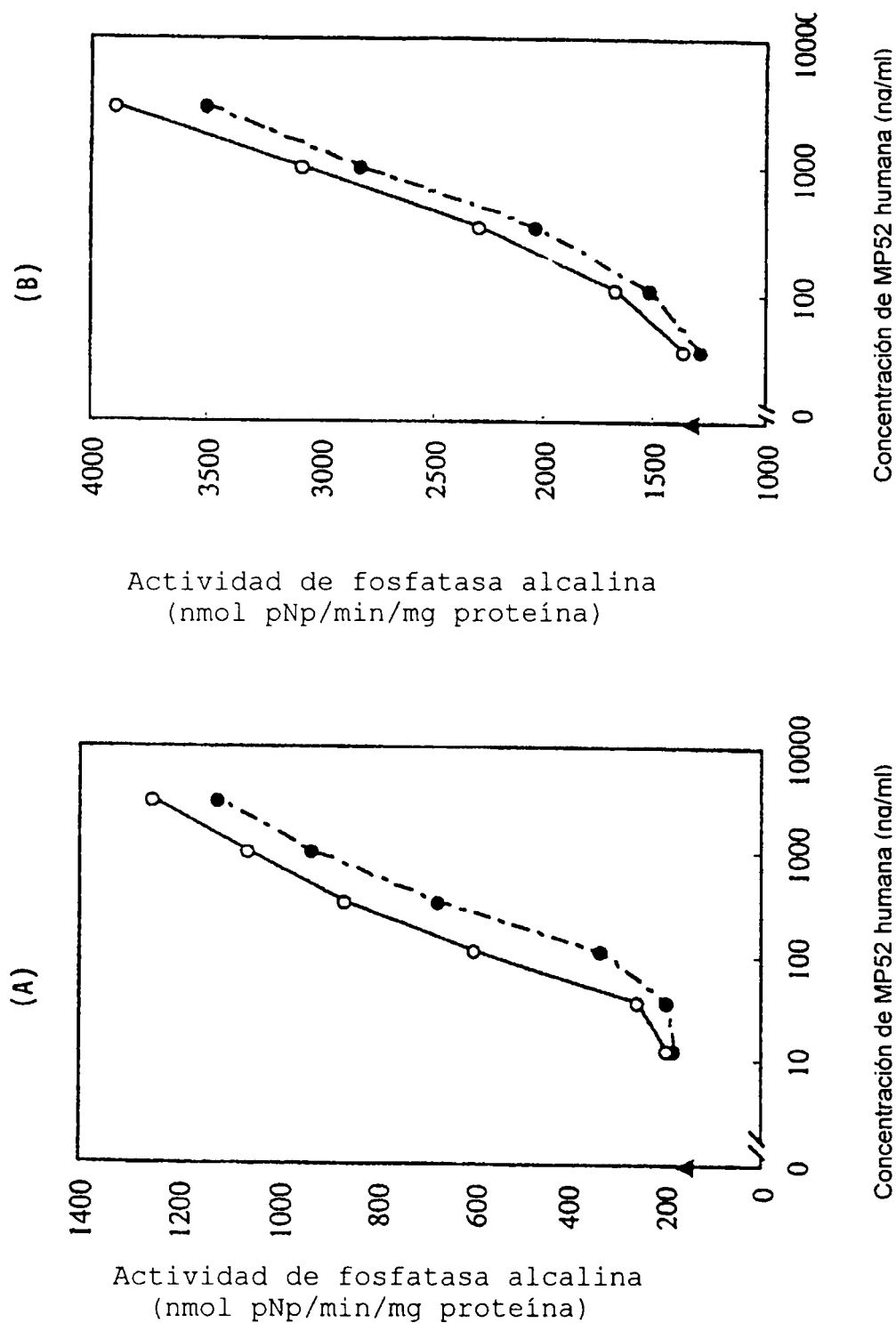


FIGURE 2

## ES 2 272 063 T3

### LISTA DE SECUENCIAS

<110> Nueva proteína monómera con actividad morfogenética ósea y agente medicinal que contiene la misma para prevenir y tratar enfermedades de cartílago y hueso.

5

<130> JH98K008 PCT, SECUENCIAS EN INGLÉS

<140>

10

<141>

<150> 10-141379

<151> 1998-05-22

15

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 357

<212> DNA

25

<213> HUMANA

<220>

<221> CDS

30

<222> (1)..(357)

<223> residuos de aminoácidos relevantes en SEQ ID NO: 1 desde 1 a 82 y desde 84 a 119 en el documento WO95/04819.

Nota: el residuo de aminoácido 83 es alanina en lugar de cisteína

35

<300>

<301> HOTTEN, Gertrud  
NEIDHARDT, Helge  
PAULISTA, Michael

40

<302> Nuevo factor de crecimiento/diferenciación de la familia TGF-beta

<310> WO 95/04819

<311> 1995-02-16

45

50

55

60

65

# ES 2 272 063 T3

<400> 1

```

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

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

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

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

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

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

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

50     gtg gag tcg tgt ggc tgt agg   357
      Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg
          115

```

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> HUMANA

65

# ES 2 272 063 T3

<400> 2

```

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

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

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

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

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

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

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

40     Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg
      115

```

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> HUMANA

<220>

<221> Característica\_mixta

<222> (1)..(39)

<223> Iniciador PCR de sentido para introducción de la mutación

<400> 3

```

60     catgccatgg accccgagtc cacaccaccc accgcctgt

```

39

<210> 4

<211> 37

<212> DNA

<213> HUMANA

ES 2 272 063 T3

 $\langle 220 \rangle$ 

<221> Característica\_mixta

## <222> Complemento ((1..(37)))

5 <223> Iniciador PCR inverso para introducción de la mutación

<400> 4

10       cccaagcttg catgcctgcc ggtcgactac ctacagc

37

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65