INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1378572 E**

(51) Classificação Internacional:
C12N 15/12 (2006.01) ***C07K 14/51*** (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1994.05.12**

(30) Prioridade(s): **1993.05.12 US 0061464**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.01.07**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.10.25**
001/2007

(73) Titular(es):
GENETICS INSTITUTE, INC.
87 CAMBRIDGEPARK DRIVE CAMBRIDGE, MA 02140 **US**

(72) Inventor(es):
ANTHONY JOSEPH CELESTE **US**
JOHN MARTIN WOSNEY **US**

(74) Mandatário:
ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES DE BMP-11**

(57) Resumo:

RESUMO

"COMPOSIÇÕES DE BMP-11"

São divulgadas proteínas BMP-11 purificadas e processos para a sua produção. As proteínas podem ser úteis para aumentar a sobrevivência de células neuronais.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÕES DE BMP-11"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a uma nova família de proteínas purificadas designadas BMP-11, a moléculas de DNA que as codificam, e processos para a sua obtenção. Os inventores designaram previamente as proteínas BMP-11 como Activina WC. As proteínas BMP-11 podem ser úteis para induzir formação de osso e/ou cartilagem e na cicatrização de feridas e reparação de tecidos, ou para aumentar a actividade de outras proteínas morfogenéticas do osso. As proteínas BMP-11 podem também ser úteis na regulação da produção de hormona folículo-estimulante, para contracepção, para promover a sobrevivência de células neurais, para estimular hematopoiese, e para supressão do desenvolvimento de tumores nas gónadas.

A Patente dos Estados Unidos 4 798 885 divulga DNA que codifica as cadeias α e β da inibina pré-pro. A Patente dos Estados Unidos 5 071 834 divulga composições farmacêuticas de activina com duas cadeias $beta_B$ formuladas num transportador farmaceuticamente aceitável.

A Patente dos Estados Unidos 5,102,807 divulga

uma proteína inibina purificada que suprime a produção de FSH sem supressão da produção de hormona luteinizante.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A proteína BMP-11 é um membro da superfamília de proteínas TGF-β. A superfamília TGF-β inclui a família de proteínas conhecida como proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), assim como um grupo de proteínas que são designadas inibina-β. Como aqui discutido, quando dimerizada com outra BMP-11 (homodímero), espera-se que a proteína BMP-11 demonstre actividade de BMP-11, como aqui descrito, como pode ser medida de acordo com os ensaios descritos nos exemplos aqui apresentados. Quando dimerizadas como um heterodímero com proteínas inibina-α ou com outras proteínas inibina-β, é esperado que o heterodímero inibina β/BMP-11 demonstre efeitos na produção da hormona folículo-estimulante (FSH), como aqui descrito. É também esperado que, na forma homodimérica ou na forma heterodimérica com outro membro da família de proteínas morfogenéticas do osso, a BMP-11 irá exibir actividade de BMP, *i.e.*, a capacidade para induzir a formação de osso, cartilagem e/ou outro tecido conjuntivo. Deste modo, dependendo do ambiente da BMP-11, pode formar dímeros que iram demonstrar actividade de activina ou inibina, ou actividade de indução de osso, cartilagem e/ou de outro tecido conjuntivo. Consequentemente, a actividade de BMP-11 é definida como a capacidade de regular a produção de FSH no ensaio aqui descrito no Exemplo 8, ou a capacidade para induzir a

formação de osso, cartilagem e/ou outro tecido conjuntivo nos ensaios aqui descritos nos Exemplos 5 a 7.

As proteínas designadas inibinas e activinas são produzidas nas gónadas e existem naturalmente no fluido folicular. Estas proteínas actuam ao nível da glândula pituitária anterior para inibir (inibinas) ou estimular (activinas) a libertação de hormona folículo-estimulante (FSH) [para revisões ver, *e.g.*, Ying, S.-Y., *Endocr. Rev.*, **9:** 267-293 (1988) ou Ling, N. *et al.*, *Vitamins and Hormones*, 44: 1-46 (Academic Press 1988)]. Resumidamente, proteínas diméricas constituídas por uma cadeia de inibina α e uma cadeia de inibina β (β_A ou β_B) são designadas inibinas e são caracterizadas pela sua capacidade de inibir a libertação de hormona folículo-estimulante(FSH), enquanto que outras proteínas diméricas constituídas por duas cadeias de inibina β (β_A ou β_B) são designadas activinas e são caracterizadas pela sua capacidade de estimulação da libertação da hormona folículo-estimulante(FSH) [ver, *e.g.*, Ling *et al.*, *Nature*, **321:**779-782 (1986) ou Vale, *et al.*, *Nature*, **321:** 776-779 (1986) ou Mason *et al.*, *Nature*, **318:** 659-663 (1985) ou Forage *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83:** 3091-3095 (1986)].

É reconhecido que a FSH estimula o desenvolvimento de óvulos nos ovários de mamíferos (Ross *et al.*, em *Textbook of Endocrinology*, ed. Williams, p. 355 (1981) e que a excessiva estimulação dos ovários com FSH conduzirá a ovulações múltiplas. A FSH é também importante

na formação testicular. Deste modo, a BMP-11, em heterodímeros com um membro da família da inibina, pode ser útil com contraceptivo com base na capacidade das inibinas para diminuir a fertilidade em mamíferos fêmea e diminuir a espermatogénese em mamíferos macho. A administração de quantidades suficientes de outras inibinas pode induzir infertilidade nestes mamíferos. A BMP-11, como um homodímero ou como um heterodímero com outras subunidades proteicas do grupo inibina-β, pode ser útil como uma terapêutica indutora de fertilidade, baseada na capacidade das moléculas de activina de estimularem a libertação de FSH de células da pituitária anterior. Ver, por exemplo, a Patente dos Estados Unidos 4 798 885. A BMP-11 pode também ser útil para antecipar o início da fertilidade em mamíferos sexualmente imaturos, de modo a aumentar o desempenho reprodutivo durante a vida de animais domésticos, tais como, vacas, ovelhas e porcos. É ainda contemplado que a BMP-11 pode ser útil na promoção de sobrevivência de células neurais [ver, *e.g.*, Schubert *et al.*, *Nature*, **344:** 868-870 (1990)], na modulação de hematopoiese por indução da diferenciação de células eritróides [ver, *e.g.*, Broxmeyer *et al.*, *Prod. Natl. Acad. Sci. USA*, **85:** 9052-9056 (1988) ou Eto *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **142:** 1095-1103 (1987)], na supressão do desenvolvimento de tumores nas gónadas [ver, *e.g.*, Matzuk *et al.*, *Nature*, **360:** 313-319 (1992)] ou no aumento da actividade de proteínas morfogenéticas do osso [ver, *e.g.*, Ogawa *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **267:** 14233-14237 (1992)].

As proteínas BMP-11 podem ser adicionalmente caracterizadas pela sua capacidade de modulação da libertação da hormona folículo-estimulante (FSH) em bioensaios *in vitro* estabelecidos utilizando células da pituitária anterior de rato como descrito [ver, *e.g.*, Vale *et al.*, *Endocrinology*, **91:** 562-572 (1972); Ling *et al.*, *Nature*, **321:** 779 782 (1986) ou Vale *et al.*, *Nature*, **321:** 776-779 (1986)]. É contemplado que a proteína BMP-11 da invenção, quando composta como um homodímero ou um heterodímero com outras cadeias inibina β irá exibir efeitos estimuladores na libertação da hormona folículo-estimulante (FSH) de células da pituitária anterior como descrito (Ling *et al.*, *Nature*, **321:** 779-782 (1986) ou Vale *et al.*, *Nature*, **321:** 776-779 (1986)]. Adicionalmente, é contemplado que a proteína BMP-11 da invenção, quando composta como um heterodímero com a cadeia inibina α, irá inibir a libertação da hormona folículo-estimulante (FSH) de células da pituitária anterior como descrito [ver, *e.g.*, Vale *et al.*, *Endocrinology*, **91:** 562-572 (1972). Deste modo, dependendo da composição em particular, espera-se que a proteína BMP-11 da invenção possa ter efeitos contrários e opostos na libertação de hormona folículo-estimulante (FSH) da pituitária anterior.

Foi demonstrado que a activina A (a composição homodimérica de inibina β_A) possui actividade eritropoiética-estimulante [ver *e.g.* Eto *et al.*, *Biochem. Biophys*: Res. Commun., **142:** 1095-1103 (1987) e Murata *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85:** 2434-2438 (1988) e Yu *et al.*,

Nature, **380:** 765-767 (1987)]. É contemplado que a proteína BMP-11 da invenção possui uma actividade eritropoiética-estimulante semelhante. Esta actividade da proteína BMP-11 pode ser adicionalmente caracterizada pela capacidade da proteína BMP-11 para demonstrar actividade de eritropoietina no ensaio biológico realizado utilizando a linha celular humana K-562 como descrito por (Lozzio *et al.*, *Blood* **45:** 321-334 (1975) e na Patente U.S. N° 5 071 834].

As estruturas de várias proteínas, designadas BMP-1 até BMP-9, foram previamente elucidadas. A actividade indutora única destas proteínas, assim como a sua presença no osso, sugere que são reguladores importantes de processo de reparação do osso, e que podem estar envolvidas na manutenção normal do tecido ósseo. A proteína BMP-11 da presente invenção está relacionada com as proteínas BMP acima referidas, e é esperado que partilhe actividades de BMP, tais como, a capacidade para induzir osso, cartilagem e/ou outro tecido conjuntivo, tais como, tendão ou ligamento, e as actividades de cicatrização de feridas das BMPs. Adicionalmente, espera-se que as proteínas da invenção possam actuar concertadamente com, ou talvez sinergeticamente com, outras proteínas e factores de crescimento relacionados. Métodos e composições terapêuticas adicionais da invenção compreendem deste modo uma quantidade terapêutica de pelo menos uma proteína BMP-11 da invenção com uma quantidade terapêutica de pelo menos uma das outras proteínas BMP divulgadas em patentes e pedidos de patentes em co-propriedade abaixo descritos. Tais combinações podem

compreender moléculas distintas das proteínas BMP ou heteromoléculas constituídas por diferentes unidades BMP. Mais ainda, as proteínas BMP-11 podem ser combinadas com outros agentes benéficos para o tratamento de defeitos do osso e/ou cartilagem, ferida, ou tecido em questão. Estes agentes incluem vários factores de crescimento, tais como, factor de crescimento epidérmico (EGF), factor de crescimento fibroblástico (FGF), factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), factores de crescimento transformador (TGF-α e TGF-β), e factor de crescimento fibroblástico k (kFGF), hormona da paratiróide (PTH), factor de inibição da leucemia (LIF/HILDA/DIA), factores de crescimento tipo-insulínico (IGF-I e IGF-II). Porções destes agentes podem também ser utilizadas em composições da presente invenção.

A sequência de DNA (SEQ ID NO: 1) e a sequência aminoacídica (SEQ ID NO: 2) de BMP-11 bovina e a sequência de DNA (SEQ ID NO: 10) e a sequência aminoacídica (SEQ ID NO: 11) de BMP-11 humana são aqui apresentadas na Listagem de Sequências. As proteínas activina têm a capacidade de regular a produção de hormona folículo-estimulante (FSH), e deste modo BMP-11 pode ser útil como um contraceptivo ou uma terapêutica indutora de fertilidade. Na forma homodimérica ou em heterodímeros com proteínas do grupo inibina-β, é esperado que a proteína BMP-11 purificada demonstre actividade de activina, e pode ser utilizada para estimular a FSH. Adicionalmente, espera-se que a proteína BMP-11 purificada possa ser útil para a indução de osso, cartilagem e/ou outro tecido conjuntivo.

Uma sequência isolada de DNA que codifica uma BMP-11 é seleccionada preferencialmente do grupo constituído por:

(a) nucleótido n°375 ou n°390 a n°704 da SEQ ID NO. 1;

(b) nucleótido n°76 ou n°775 a n°1 086 da SEQ ID NO. 10; e

(c) sequências que com ela hibridam sob condições restringentes de hibridação e codificam uma proteína que possui actividade de BMP-11.

O DNA da BMP-11 da invenção compreende preferencialmente uma sequência de DNA seleccionada do grupo constituído por:

(a) nucleótidos que codificam os aminoácidos 1 ou 6 a 109 da SEQ ID NO. 2;

(b) nucleótidos que codificam os aminoácidos 1 ou 6 a 109 da SEQ ID NO. 11; e

(c) sequência que com ela hibrida sob condições restringentes de hibridação e codifica uma proteína que possui actividade de BMP-11.

A BMP-11 bovina pode ser produzida por cultura de uma célula transformada com uma sequência de DNA compreendendo o nucleótido n° 375 ao nucleótido n° 704 como apresentado na SEQ ID NO: 1 e recuperando e purificando do

meio de cultura uma proteína caracterizada pela sequência aminoacídica compreendendo o aminoácido nº1 ao nº109 como apresentado na SEQ ID NO: 2 substancialmente isenta de outros materiais proteináceos com os quais é co-produzida.

Espera-se que a BMP-11 humana seja homóloga da BMP-11 bovina. A invenção, consequentemente, inclui métodos para a obtenção de sequências de DNA que codificam BMP-11 humana, de sequências de DNA obtidas por estes métodos, e da proteína humana codificada por estas sequências de DNA. Este método compreende a utilização da sequência nucleotídica de BMP-11 bovina ou suas porções para desenhar sondas para rastreio de bibliotecas para o gene humano ou seus fragmentos utilizando técnicas convencionais. A sequência de DNA que codifica parte da proteína humana BMP-11 (SEQ ID NO: 3) e a correspondente sequência aminoacídica (SEQ ID NO: 4) são apresentados na Listagem de Sequências. Estas sequências podem também ser utilizadas de modo a se desenhar sondas para se obter o gene completo de BMP-11 humana através de técnicas convencionais. A BMP-11 humana pode ser produzida por cultura de uma célula transformada com a sequência de DNA de BMP-11 e recuperando e purificando a BMP-11 do meio de cultura. A proteína expressa purificada encontra-se substancialmente livre de outro material proteináceo com o qual é co-produzida, assim como de outros contaminantes.

A proteína purificada recuperada é contemplada para demonstrar a capacidade de regulação da produção de

FSH. As proteínas da invenção podem ser caracterizadas adicionalmente pela capacidade de regulação da produção de hormona folículo-estimulante (FSH) em bioensaios *in vitro* estabelecidos utilizando células da pituitária anterior de rato. As proteínas BMP-11 podem também ser caracterizadas pela capacidade para induzir a formação de osso, cartilagem e/ou outro tecido conjuntivo, por exemplo, no ensaios em rato de formação de osso abaixo descrito.

Outro aspecto da invenção proporciona composições farmacêuticas possuindo uma quantidade terapeuticamente eficaz da proteína BMP-11 num veículo ou transportador farmaceuticamente aceitável. As composições BMP-11 da invenção podem ser úteis para a regulação da hormona folículo-estimulante, e podem ser úteis na contracepção. As composições da invenção podem conter adicionalmente pelo menos um outro agente terapeuticamente útil, tais como, as proteínas BMP BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6 e BMP-7, divulgadas por exemplo nas Patentes dos Estados Unidos 5 108 922; 5 013 649; 5 116 738; 5 106 748; 5 187 076; e 5 141 905; BMP-8, divulgada na publicação PCT W091/18098; e BMP-9, divulgada na publicação PCT W093/00432, e BMP-10, divulgada no pedido de patente co-pendente com o número de série 08/061,695, submetido a 12 de Maio, 1993. As composições BMP-11 podem também ser úteis para várias utilizações envolvendo regulação da produção da hormona folículo-estimulante, incluindo contracepção. Estes métodos, de acordo com a invenção, incluem a administração a um doente que necessite de tal tratamento, de uma quantidade eficaz de BMP-11.

As composições da invenção podem compreender, para além de proteína BMP-11, outros membros do grupo de proteínas inibina-β ou proteínas inibina-α, assim como outros agentes terapeuticamente úteis incluindo factores de crescimento, tais como, factor de crescimento epidérmico (EGF), factor de crescimento fibroblástico (FGF), factor de crescimento transformador (TGF-α e TGF-β), e factor de crescimento do tipo-insulínico (IGF).

As composições BMP-11 da presente invenção podem também ser úteis para o tratamento de vários defeitos do osso e/ou cartilagem, doença periodontal e vários tipos de feridas. Estes métodos, de acordo com a invenção, incluem administrar a um doente que necessita tal formação de osso e/ou cartilagem, cicatrização de feridas ou reparação de tecido, uma quantidade eficaz de uma proteína BMP-11. Estes métodos podem também incluir a administração de uma proteína da invenção conjuntamente com pelo menos uma das novas proteínas BMP divulgadas nas patentes e pedidos de patentes em co-propriedade acima descritas. Adicionalmente, estes métodos podem também incluir a administração de uma proteína BMP-11 com outros factores de crescimento incluindo EGF, FGF, TGF-α, TGF-β, e IGF.

Um outro aspecto da invenção são sequências de DNA que codificam para a expressão de uma proteína BMP-11. Tais sequências incluem a sequência de nucleótidos numa direcção 5' to 3' ilustrada na SEQ ID NO: 1 ou sequências

de DNA que hibridam sob condições restringentes com a sequência de DNA da SEQ ID NO: 1 e codificam uma proteína que possui actividade de BMP-11. Finalmente, variações alélicas ou outras das sequências da SEQ ID NO: 1, quer tais alterações nucleotídicas resultem em alterações na sequência peptídica ou não, são também incluídas na presente invenção.

Um outro aspecto da invenção são sequências de DNA que codificam para a expressão de uma proteína BMP-11. Tais sequências incluem a sequência de nucleótidos numa direcção 5' para 3' ilustrada na SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 10, e sequências de DNA que, mas devido à degeneração do código genético, são idênticas à sequência de DNA da SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 10, e codificam uma proteína da SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 11. Ainda incluídas na presente invenção encontram-se sequências de DNA que hibridam sob condições restringentes com a sequência de DNA da SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 10 e codificam uma proteína que possui actividade de BMP-11. Finalmente, variações alélicas ou outras das sequências da SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 10, quer tais alterações nucleotídicas resultem em alterações na sequência peptídica ou não, mas em que a sequência peptídica ainda possui actividade de BMP-11, são também incluídas na presente invenção.

Um outro aspecto da invenção inclui vectores compreendendo uma sequência de DNA como acima descrito em associação operacional com uma sequência de controlo de expressão para esse fim.

Estes vectores podem ser utilizados num processo novo para produção de uma proteína BMP-11 da invenção em que uma linha celular transformada com uma sequência de DNA que codifica uma proteína BMP-11 em associação operacional com uma sequência de controlo de expressão para esse fim, é colocada em cultura num meio de cultura adequado e uma proteína BMP-11 é recuperada e purificada a partir dai. Este processo pode utilizar várias células conhecidas tanto procariotas como eucariotas como células hospedeiras para expressão do polipéptido.

A presente invenção inclui também a utilização de, sequências de DNA e vectores da invenção em aplicações de terapia genética. Em tais utilizações, os vectores podem ser transfectados nas células de um doente *in vitro*, e as células podem ser re-introduzidas num doente. Alternativamente, os vectores podem ser introduzidos num doente *in vivo* por intermédio de transfecção dirigida.

Outros aspectos e vantagens da presente invenção tornar-se-ão aparentes após consideração da seguinte descrição detalhada e suas formas de realização preferidas.

Descrição das Sequências

SEQ ID NO: 1 é uma sequência nucleotídica parcial da BMP-11 bovina que codifica o polipéptido BMP-11 bovino maduro.

SEQ ID NO: 2 é a sequência do aminoácido de um pró-péptido parcial e o polipéptido BMP-11 bovino completo maduro, codificado pela SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3 é uma sequência nucleotídica parcial da BMP-11 humana.

SEQ ID NO: 4 é uma sequência parcial de aminoácido para o polipéptido BMP-11 humano codificada pela SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 5 e 6 são iniciadores da BMP-11 bovina utilizados para isolar a BMP-11 humana ou outras proteínas BMP-11.

SEQ ID NO: 7 é uma sequência de DNA que é inserida em pMT2 CXM para adicionar um sítio de reconhecimento *Xho*I perto da origem de replicação SV40.

SEQ ID NO: 8 é uma sequência de DNA inserida em pMT21 para inserir um sítio de reconhecimento *Xho*I a montante do gene DHFR.

SEQ ID NO: 9 é uma sequência de DNA compreendendo uma porção da sequência líder do Vírus EMC.

SEQ ID NO: 10 é uma sequência de DNA que codifica um pró-péptido parcial e a proteína BMP-11 humana completa madura.

SEQ ID NO: 11 é a sequência aminoacídica de um pró-péptido parcial e da proteína BMP-11 humana completa madura codificado pela SEQ ID NO: 10.

Descrição Detalhada da Invenção

BMP-11

A sequência nucleotídica da BMP-11 bovina (SEQ ID NO: 1) e a sequência que codifica aminoácido (SEQ ID NO: 2) e a sequência nucleotídica de BMP-11 humana (SEQ ID NO: 10) e a sequência que codifica aminoácido (SEQ ID NO: 11) são aqui apresentadas na Listagem de Sequências. As proteínas BMP-11 bovinas purificadas da presente invenção são produzidas por cultura de uma célula hospedeira transformada com uma sequência de DNA compreendendo o DNA que codifica a sequência da SEQ ID NO: 1 do nucleótido nº 375 ao nº 704 ou o DNA que codifica a sequência da SEQ ID NO: 10 do nucleótido nº 760 ao nº 1 086 e recuperando e purificando do meio de cultura uma proteína que contém a sequência aminoacídica ou uma sequência substancialmente homóloga como representado pelos aminoácidos nº 1 a nº 109 da SEQ ID NO: 2 ou aminoácidos nº 1 ao nº 109 da SEQ ID NO: 11. Para a produção de proteínas BMP-11 em células de mamífero, a sequência de DNA compreende adicionalmente um pró-péptido adequado ligado de acordo com a grelha com as sequências de DNA acima referidas codificam para BMP-11. O pró-péptido pode ser o pró-péptido nativo da BMP-11 ou um pró-péptido de outro membro da superfamília TGF-β.

A sequência de BMP-11 humana da presente invenção é obtida utilizando a sequência de DNA da BMP-11 bovina completa ou fragmentos, ou a sequência parcial de BMP-11 humana da SEQ ID NO: 3 como uma sonda. Deste modo, a sequência de DNA BMP-11 humana 1 compreende a sequência de DNA dos nucleótidos nº 28 a nº 185 da SEQ ID NO: 3. A proteína humana BMP-11 compreende a sequência aminoacídica dos aminoácidos nº 1 a nº 52 da SEQ ID NO: 4.

É esperado que a BMP-11, como expressa por células de mamífero, tais como, células CHO, exista como uma população heterogénea de espécies operacionais da proteína BMP-11 com N terminais variáveis. Espera-se que espécies operacionais compreendam uma sequência aminoacídica pelo menos iniciada por um resíduo de cisteína no aminoácido nº 6 da SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 10, ou adicionalmente na direcção do N-terminal. Deste modo, é esperado que as sequências de DNA que codificam proteínas BMP-11 operacionais compreendam os nucleótidos nº 375 ou nº 390 a 701 da SEQ ID NO: 1 ou os nucleótidos nº 760 ou nº 775 a nº1 086 da SEQ ID NO: 10, e podem compreender sequência nucleotídica adicional na direcção 5' da SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 10.

O N-terminal da BMP-11 humana foi determinado experimentalmente por expressão em *E. coli* de acordo com o seguinte: [M]NLGLDXDEHSSE, em que X designa um resíduo de aminoácido sem um sinal claro, consistente com uma loca-

lização de cisteína nessa posição. Deste modo, espera-se que esta espécie de BMP-11 possuirá um N-terminal no aminoácido n° 1 da SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 10, e que as sequências de DNA que codificam esta espécie compreendam os nucleótidos n° 375 a n° 701 da SEQ ID NO: 1 (bovina) ou os nucleótidos n° 760 a 1 086 da SEQ ID NO: 10 (humana). O peso molecular aparente do monómero de BMP-11 humana foi determinado por SDS-PAGE como sendo aproximadamente 12 kd. A proteína humana BMP-11 existe como uma solução sem cor, transparente em ácido trifluoracético a 0,1%.

As proteínas BMP-11 recuperadas do meio de cultura são purificadas isolando-as de outros materiais proteináceos com os quais são co-produzidas e de outros contaminantes presentes.

As proteínas BMP-11 podem ser caracterizadas pela capacidade de regulação da produção de FSH. As proteínas BMP-11 podem ser adicionalmente caracterizadas pela capacidade de modulação da libertação da hormona folículo-estimulante (FSH) em bioensaios *in vitro* estabelecidos utilizando células da pituitária anterior de rato como descrito [ver, *e.g.*, Vale *et al.*, *Endocrinology*, **91**: 562-572 (1972); Ling *et al.*, *Nature*, **321**: 779-782 (1986) ou Vale *et al.*, *Nature*, **321**: 776-779 (1986)]. As proteínas BMP-11 podem também ser caracterizadas pela capacidade para induzir a formação de osso, cartilagem e/ou outro tecido conjuntivo. Tal actividade indutora de tecido da BMP-11 pode ser adicionalmente caracterizada pela capacidade para

induzir a formação de osso, cartilagem e/ou outro tecido conjuntivo nos ensaios descritos nos exemplos abaixo.

As proteínas BMP-11 aqui apresentadas também incluem factores codificados pelas sequências similares às da SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 10, mas em que são proporcionadas modificações naturais (*e.g.* variações alélicas na sequência nucleotídica que pode resultar em alterações aminoacídicas no polipéptido) ou deliberadamente pensadas. Por exemplo, polipéptidos sintéticos podem duplicar por completo ou parcialmente sequências contínuas dos resíduos de aminoácidos da SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 11. Estas sequências, em virtude de partilharem características de conformação e estrutura primária, secundária ou terciária com os polipéptidos de inibina-β da SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 11 podem possuir actividade de BMP-11 em comum com estas. Deste modo, elas podem ser utilizadas como substitutos biologicamente activos para polipéptidos BMP-11 que ocorrem naturalmente em processos terapêuticos.

Outras mutações específicas das sequências das proteínas BMP-11 aqui descritas envolvem modificações de sítios de glicosilação. Estas modificações podem envolver sítios de glicosilação ligados em O ou ligados em N. Por exemplo, a ausência de glicosilação ou apenas glicosilação parcial resulta da substituição ou deleção de aminoácidos nos sítios de reconhecimento de glicosilação ligado em asparagina. Os sítios de reconhecimento de glicosilação

ligado em asparagina compreendem sequências tripeptídicas que são especificamente reconhecidas por enzimas de glicosilação celular apropriadas. Estas sequências tripeptídicas são asparagina-X-treonina ou asparagina-X-serina, em que X é normalmente qualquer aminoácido. Várias substituições ou deleções de aminoácidos numa ou em ambas a primeira ou terceira posições aminoacídicas de um sítio de reconhecimento de glicosilação (e/ou deleção de aminoácido na segunda posição) resulta na não-glicosilação na sequência tripeptídica modificada. Adicionalmente, a expressão da proteína BMP-11 em células bacterianas resulta em proteína não-glicosilada, sem alterar os sítios de reconhecimento de glicosilação.

A presente invenção compreende também as novas sequências de DNA, sem associação com sequências de DNA que codificam outro material proteináceo, e codificam para expressão de Proteínas BMP-11. Estas sequências de DNA incluem as apresentadas na SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 10 numa direcção 5' para 3' e aquelas sequências que com elas hibridam sob condições de hibridação restringentes, por exemplo, SSC a 0,1X, SDS a 0,1% a 65 °C [ver, Maniatis *et al.*, Molecular Cloning (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory (1982), páginas 387 a 389] e codificam uma proteína que possui actividade de BMP-11. Estas sequências de DNA incluem também aquelas que compreendem a sequência de DNA da SEQ ID NO: 3 e aquelas que com elas hibridam sob condições de hibridação restringentes e codificam uma proteína que possui actividade de BMP-11.

De modo semelhante, as sequências de DNA que codificam para proteínas BMP-11 codificadas pelas sequências da SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 10, mas que diferem na sequência do codão devido às degenerescências do código genético ou variações alélicas (alterações de bases que ocorrem naturalmente na população da espécie que podem ou não resultar numa alteração de aminoácido) também codificam os novos factores aqui descritos. Variações nas sequências de DNA da SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 10 que são causadas por mutações pontuais ou por modificações induzidas (incluindo inserção, deleção, e substituição) para aumentar a actividade, semi-vida ou produção dos polipéptidos codificados estão também compreendidas na invenção.

Outro aspecto da presente invenção proporciona um método novo para a produção de proteínas BMP-11. O método da presente invenção envolve a cultura de uma linha celular adequada, que foi transformada com a sequência de DNA que codifica uma proteína BMP-11 da invenção, sob o controlo de sequências reguladoras conhecidas. As células hospedeiras transformadas são colocadas em cultura e as proteínas BMP-11 são recuperadas e purificadas do meio de cultura. As proteínas purificadas encontram-se substancialmente livres de outras proteínas com as quais são co-produzidas, assim como de outros contaminantes.

Células ou linhas celulares adequadas podem ser células de mamífero, tais como, células do ovário de

hamster chinês (CHO). A selecção de células hospedeiras de mamífero adequadas e métodos para transformação, cultura, amplificação, rastreio, produção de produto e purificação são conhecidos na técnica. Ver, *e.g.*, Gething e Sambrook, *Nature*, **293**: 620-625 (1981), ou alternativamente, Kaufman *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, **5**: (7): 1750-1759 (1985) ou Howley *et al.*, Patente U.S. 4 419 446. Outra linha celular adequada de mamífero, que é descrita nos exemplos que acompanham, é a linha celular de macaco COS-1. A célula de mamífero CV-1 pode também ser adequada.

As células bacterianas podem também ser hospedeiras adequadas. Por exemplo, as várias estirpes de *E. coli* (*e.g.*, HB101, MC1061) são bem conhecidas como células hospedeiras na área da biotecnologia. Várias estirpes de *B. subtilis*, *Pseudomonas*, outros bacilos e afins podem também ser utilizados neste método.

Muitas estirpes de células de leveduras conhecidas por peritos na técnica podem também estar disponíveis como células hospedeiras para expressão dos polipéptidos da presente invenção. Adicionalmente, quando desejável, podem ser utilizadas células de insecto como células hospedeiras no método da presente invenção. Ver, *e.g.* Miller *et al.*, *Genetic Engineering*, **8**: 277-298 (Plenum Press 1986) e referências aí citadas.

Outro aspecto da presente invenção proporciona vectores para utilização no método da expressão destes

novos polipéptidos BMP-11. De modo preferido os vectores possuem as novas sequências de DNA completas acima descritas que codificam os novos factores da invenção. Adicionalmente, os vectores possuem sequências de controlo de expressão apropriadas permitindo expressão das sequências da proteína BMP-11. Alternativamente, os vectores que incorporam sequências modificadas como acima descrito são também formas de realização da presente invenção. Adicionalmente, a sequência da SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 10 ou outras sequências que codificam proteínas BMP-11 podem ser manipuladas para expressar uma BMP-11 madura por deleção de sequências pró-peptídicas que codificam BMP-11 e substituindo-as com sequências que codificam os pró-péptidos completos de outras proteínas BMP, proteínas activina ou outros membros da superfamília TGF-β.

Os vectores podem ser utilizados no método de transformação de linha celulares e conter sequências reguladoras seleccionadas em associação operacional com as sequências codificantes de DNA da invenção que têm a capacidade de comandar a sua replicação e expressão em células hospedeiras seleccionadas. As sequências reguladoras para tais vectores são conhecidas por peritos na técnica e podem ser seleccionadas de acordo com as células hospedeiras. Tal selecção é rotina e não faz parte da presente invenção. Para expressão em células hospedeiras de mamífero, o vector pode compreender uma sequência codificante que codifica um pró-péptido adequado para secreção de proteínas pela célula hospedeira ligada em

grelha de leitura apropriada à sequência que codifica proteína BMP-11 madura. O pró-péptido adequado que codifica sequências pode ser obtido a partir de DNA que codifica proteínas da superfamília de proteínas TGF-β, por exemplo, incluindo BMP-2 a BMP-9. Por exemplo, ver a Patente dos Estados Unidos 5 168 150, a divulgação da qual é aqui incorporada por referência, em que um DNA que codifica uma porção precursora de uma proteína de mamífero outra que não BMP-2 é fundido ao DNA que codifica uma proteína BMP-2 madura. Deste modo, a presente invenção inclui moléculas de DNA quiméricas compreendendo uma sequência de DNA que codifica um pró-péptido de um membro da superfamília de proteínas TGF-β ligado em grelha de leitura correcta a uma sequência de DNA que codifica um polipéptido BMP-11. O termo "quimérico" é utilizado para significar que o pró-péptido tem origem num polipéptido diferente de BMP-11.

Uma proteína da presente invenção, que regula a produção de FSH, tem possível aplicação no aumento da fertilidade, quando expressa numa composição como um homodímero ou como um heterodímero com outras proteínas da família inibina-β. As proteínas da presente invenção podem também ser úteis para contracepção, quando expressas numa composição como um heterodímero com proteínas da família inibina-α.

A proteína da presente invenção, que induz formação de cartilagem e/ou osso em circunstâncias em que o osso não se forma normalmente, tem aplicação na

cicatrização de fracturas ósseas e defeitos de cartilagem em humanos e outros animais. Tal preparação utilizando uma proteína BMP-11 pode ter utilização profiláctica na redução de fracturas fechadas assim como abertas e também no fixação melhorada de articulações artificiais. A formação *de novo* de osso, induzida por um agente osteogénico, contribui para a reparação de defeitos craniofaciais congénitos, induzidos por trauma, ou induzidos por recessão oncogénica, e é também útil em cirurgia plástica cosmética. Uma proteína BMP-11 pode ser utilizada no tratamento de doença periodontal, e noutros processos de reparação do dente. Tais agentes podem proporcionar um ambiente para atrair células formadoras de osso, estimular o crescimento de células formadoras de osso ou induzir a diferenciação de progenitores de células formadoras de osso. Os polipéptidos BMP-11 da invenção podem também ser úteis no tratamento de osteoporose. Foram descritos vários factores osteogénicos, indutores de cartilagem e indutores de osso. Ver, *e.g.*, as Aplicações de patentes europeias 148 155 e 169 016 para sua discussão.

As proteínas da invenção podem também ser utilizadas na cicatrização de feridas e reparação relacionada de tecidos. Os tipos de feridas incluem, mas não estão limitados a queimaduras, incisões e úlceras. (Ver, *e.g.* Publicação PCT WO84/0110 para discussão de cicatrização de feridas e reparação relacionada de tecidos).

Um outro aspecto da invenção é um método terapêutico e composição para a reparação de fracturas e outro condições relacionadas com defeitos na cartilagem e/ou osso ou doenças periodontais. A invenção compreende adicionalmente métodos terapêuticos e composições para cicatrização de feridas e reparação de tecidos. Tais composições compreendem uma quantidade terapeuticamente eficaz de pelo menos uma das proteínas BMP-11 da invenção misturada com um veículo, transportador ou matriz farmaceuticamente aceitável.

Tal preparação utilizando uma proteína BMP-11 pode também aumentar a sobrevivência neuronal e deste modo ser útil no transplante e tratamento de condições exibindo uma diminuição na sobrevivência neuronal.

É esperado que as proteínas BMP-11 da invenção possam actuar concertadamente com ou talvez sinergisticamente com outras proteínas e factores de crescimento relacionados. Outros métodos e composições terapêuticas da invenção compreendem consequentemente uma quantidade terapêutica de pelo menos uma proteína BMP-11 da invenção com uma quantidade terapêutica de pelo menos uma das proteínas BMP ou outros factores de crescimento divulgados em patentes e aplicações em co-propriedade acima descritas. Tais combinações podem compreender moléculas isoladas ou heteromoléculas constituídas por subunidades diferentes. Por exemplo, um método e composição da invenção podem compreender a dímero ligado através de persulfureto compreen-

dendo uma subunidade de proteína BMP-11 e uma subunidade de uma proteína inibina-α, uma proteína inibina-β ou uma proteína BMP, tais como BMP-1 a BMP-10. Os agentes úteis com BMP-11 podem incluir vários factores de crescimento, tais como, factor de crescimento epidérmico (EGF), factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crescimento transformadores (TGF-α e TGF-β), e factor de crescimento tipo insulínico (IGF). Os métodos e as composições terapêuticas adicionais da invenção compreendem uma quantidade terapêutica de pelo menos uma proteína BMP-11 da invenção com uma quantidade terapêutica de pelo menos uma das proteínas BMP divulgadas em patentes e aplicações em co-propriedade acima descritas. Tais combinações podem compreender moléculas isoladas das proteínas BMP ou heteromoléculas compreendendo diferentes subunidades BMP. Por exemplo, um método e composição da invenção podem compreender um dímero ligado através de persulfureto compreendendo uma subunidade de proteína BMP-11 e uma subunidade de uma das proteínas "BMP" acima descritas. Deste modo, a presente invenção inclui um polipéptido BMP-11 purificado que é um heterodímero em que uma subunidade compreende pelo menos a sequência aminoacídica do aminoácido nº 1 ao aminoácido nº 109 da SEQ ID NO: 2 ou SEQ ID NO: 11, e uma subunidade compreende uma sequência aminoacídica para uma proteína morfogenética de osso seleccionada do grupo constituído por BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8 e BMP-9. Uma outra forma de realização pode compreender um heterodímero de subunidades BMP-11. Adicionalmente, as proteínas BMP-11

podem ser combinadas com outros agentes benéficos para o tratamento de defeitos no osso e/ou cartilagem, ferida, ou tecido em questão. Estes agentes incluem vários factores de crescimento, tais como, factor de crescimento epidérmico (EGF), factor de crescimento fibroblástico (FGF), factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crescimento transformadores (TGF-α e TGF-β), e factor de crescimento fibroblástico k (kFGF), hormona da paratiróide (PTH), factor de inibição de leucemia (LIF/HILDA/DIA), factores de crescimento tipo insulínico (IGF-I e IGF-II). Porções destes agentes podem também ser utilizadas em composições da presente invenção.

As proteínas BMP-11 da presente invenção podem também ser utilizadas em composições em combinação com proteínas morfogenéticas do osso. Ver por exemplo, Ogawa *et al.*, WO 92/14481 (1992); Ogawa *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **267:** 14233-14237 (1992). As proteínas morfogenéticas do osso úteis em tais composições incluem BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6 e BMP-7, divulgadas, por exemplo, nas Patentes dos Estados Unidos 5 108 922; 5 013 649; 5 116 738; 5 106 748; 5 187 076; e 5 141 905; BMP-8, divulgada na publicação PCT W091/18098; e BMP-9, divulgada na publicação PCT W093/00432; e BMP-10 divulgada no pedido de patente co-pendente com o número de série 08/061,695, submetido a 12 de Maio, 1993.

A preparação e formulação de tais composições proteicas fisiologicamente aceitáveis, respeitando devida-

mente o pH, isotonicidade, estabilidade e afins, está contemplada na perícia da técnica. As composições terapêuticas são também presentemente valiosas para aplicações veterinárias devido à falta de especificidade específica nas proteínas BMP e TGF. Particularmente, os animais domésticos e cavalos de raças apuradas são para além dos doentes humanos desejáveis para tal tratamento com BMP-11 da presente invenção.

O método terapêutico inclui a administração tópica, sistemática, ou local da composição como um implante ou dispositivo. Quando administrada, a composição terapêutica para utilização nesta invenção encontra-se, obviamente, numa forma isento de pirogénio, fisiologicamente aceitável. Adicionalmente, a composição pode ser de modo desejado encapsulada ou injectada numa forma viscosa para transporte para o local danificado do osso, cartilagem ou tecido. A administração tópica pode ser adequada para cicatrização de feridas e reparação de tecidos. Os agentes terapeuticamente úteis, para além das proteínas BMP-11, que podem também opcionalmente ser incluídos na composição como acima descrito podem, alternativamente ou adicionalmente, ser administrados simultaneamente ou sequencialmente com a composição de BMP-11 nos métodos da invenção.

A composição inclui, de modo preferido para a formação de osso, cartilagem ou outro tecido conjuntivo, uma matriz com a capacidade de transportar BMP-11 ou outras proteínas BMP para o local de tecido danificado que

necessita de ser reparado, proporcionando uma estrutura para o osso e cartilagem em desenvolvimento e com a capacidade óptima de ser reabsorvida pelo corpo. A matriz pode proporcionar libertação lenta de BMP-11 e/ou outra proteína indutora de osso, assim como apresentação apropriada e ambiente adequado para infiltração celular. Tais matrizes podem ser formadas por materiais presentemente utilizados para outras aplicações médicas implantadas. A escolha do material da matriz é baseada em biocompatibilidade, biodegradabilidade, propriedades mecânicas, aparência cosmética e propriedades de interface. A aplicação particular das composições BMP-11 irá definir a formulação apropriada. As potenciais matrizes para as composições podem ser sulfato de cálcio, trifosfato de cálcio, hidroxiapatite, ácido poliláctico e polianidridas biodegradáveis e quimicamente definidos. Outros materiais potenciais são biodegradáveis e bem definidos biologicamente, tais como, osso, tendão ou colagénio dérmico. Matrizes adicionais são compostas por proteínas puras ou componentes de matriz extracelulares. Outras matrizes potenciais são não-biodegradáveis e quimicamente definidas, tais como, aglomerado de hidroxiapatite, biovidro, aluminatos, ou outras cerâmicas. As matrizes podem compreender combinações de quaisquer dos acima mencionados tipos de material, tais como, ácido poliláctico e hidroxiapatite ou colagénio e trifosfato de cálcio. As biocerâmicas podem ser alteradas na composição, tais como em aluminato de cálcio-fosfato e processadas para alterar o tamanho do poro, o tamanho da partícula, a forma da partícula, e a biodegradabilidade.

O progresso pode ser monitorizado através de avaliação periódica do crescimento e/ou reparação do osso. O progresso pode ser monitorizado, por exemplo, através de raios x, determinações histomorfométricas e marcação com tetraciclina.

O regime de dosagem será determinado pelo médico assistente considerando vários factores que modificam a acção da proteína BMP-11, *e.g.* a idade, sexo, e dieta dos doentes, a gravidade de qualquer infecção, tempo de administração e outros factores clínicos. A dosagem pode variar com o tipo de proteína BMP ou factor de crescimento presente na composição. A dosagem pode também variar com o tipo de matriz utilizada.

Os exemplos que se seguem ilustram a prática da presente invenção na recuperação e caracterização de proteína BMP-11 bovina e na sua utilização para recuperar as proteínas BMP-11 humanas e outras, obtendo as proteínas humanas e expressando as proteínas via técnicas recombinantes.

EXEMPLO 1

BMP-11 bovina

São plaqueados 800 000 recombinantes de uma biblioteca genómica bovina construída no vector lambda

EMBL3, a uma densidade de 8 000 placas de bacteriófago recombinante por placa em 100 placas. São feitas réplicas duplicadas de nitrocelulose das placas de bacteriófago recombinante destas placas e amplificadas. Um fragmento de DNA de BMP-7 humana correspondendo aos nucleótidos n° 1081 a n° 1403 (Figura 4, Patente dos Estados Unidos 5 141 905) é marcado com ^{32}P pelo procedimento de iniciador aleatório de Feinberg *et al.* *[Anal. Biochem.* **132:** 6-13 (1983)] e hibridado com um conjunto de filtros em tampão de hibridação convencional (SHB) (SSC a 5x, SDS a 0,170, Denhardt's a 5x, 100 µg/mL de DNA de esperma de Salmão) a 60 °C durante 2 a 3 dias. Os filtros são lavados sob condições restringentes reduzidas (SSC a 4X, SDS a 0,1% a 60 °C). São encontrados múltiplos recombinantes que hibridam positivamente. São seleccionadas 52 placas de bacteriófago recombinante que são positivas por hibridação e re-plaqueadas para placas secundárias. São feitas réplicas duplicadas de nitrocelulose das placas recombinantes destas 52 placas secundárias e amplificadas. Um conjunto de filtros de nitrocelulose é feito hibridar com a sonda de DNA de BMP-7 humana como acima descrito e são lavados sob as mesmas condições de restringência reduzidas. O outro conjunto de filtros é feito hibridar com uma sonda mista de BMP-5, BMP-6, e BMP-7 em SHB a 65 °C durante a noite e lavado com SSC a 0,1X, SDS a 0,1% a 65 °C (condições restringentes de hibridação e lavagem). A sonda mista é composta por quantidades relativamente iguais de fragmentos de DNA marcados com ^{32}P compreendendo os nucleótidos n° 1452 a n° 2060 (Figura 4, Patente dos Estados Unidos 5 106

748) da sequência de BMP-5 humana, os nucleótidos n° 1395 a n° 1698 (Figura 4, Patente dos Estados Unidos 5 187 076) da sequência de BMP-6 humana, e os nucleótidos n° 1081 a n° 1403 (Figura 4, Patente dos Estados Unidos 5 141 905) da sequência de BMP-7 humana. Os fragmentos de DNA de BMP-5, BMP-6 e BMP-7 são marcados com ^{32}P pelo procedimento de iniciação aleatória e iguais números de contagens por minuto (cpms) de cada sonda são combinados e adicionados à SHB possuindo o outro conjunto de réplicas de filtros de nitrocelulose das 52 placas secundárias. São seleccionados para análises adicionais 14 recombinantes, que hibridaram positivamente com a sonda de BMP-7 humana sob as condições de restringência reduzida e exibiram hibridação fraca ou nula com a sonda mista BMP-5/6/7 sob condições de restringência elevada. Todos os 14 recombinantes que exibem estas características de hibridação são purificados em placa e é preparado DNA bacteriófago de cada. A região que hibrida positivamente de um dos 14 recombinantes exibindo as características de hibridação acima descritas, designada λ7r-30, está localizada num fragmento de restrição de *SacI* de 0,5 kb. Este fragmento é subclonado num vector plasmídico (pGEM-3) e realiza-se análise da sequência de DNA. A sequência parcial de DNA (SEQUÊNCIA ID NO. 1) e a sequência aminoacídica derivada (SEQUÊNCIA ID NO. 2) do clone λ7r-30 são apresentadas na Listagem de Sequências.

O bacteriófago λ7r-30 foi depositado na ATCC a 7 de Abril, 1993, e foi-lhe atribuído o número de acesso ATCC 75439. Este depósito está de acordo com os requisitos do

Tratado de Budapeste de Reconhecimento Internacional do Depósito de Microrganismos para o Fim de Procedimentos de Patentes e suas regulamentações.

Este clone λ7r-30 codifica pelo menos uma porção da proteína BMP-11 bovina da presente invenção. A sequência nucleotídica do clone λ7r-30 contém uma grelha de leitura aberta de 456 nucleótidos nº 246-701 da SEQ ID NO: 1. A sequência nucleotídica de nº 324 a nº 701 da SEQ ID NO: 1 define uma grelha de leitura aberta de 378 nucleótidos, que codificam pelo menos 126 aminoácidos da porção C-terminal de uma Proteína BMP-11 bovina, como determinado por alinhamento com outras proteínas BMP e outras proteínas na família TGF-β. A sequência nucleotídica nº 246 a nº 323 define uma grelha de leitura aberta contígua com uma sequência que codifica o previsto péptido BMP-11 de 126 aminoácidos, no entanto, um grau reduzido de identidade de aminoácidos do péptido deduzido desta região da sequência de DNA (nº 246 a nº 323) com outras proteínas BMP e outras proteínas da família TGF-β e a presença de múltiplas sequências de consenso de aceitação de excisão potenciais torna difícil definir o limite 5' deste exão do gene de BMP-11 bovina. A presença de um codão stop em grelha nas posições nucleotídicas nº 243 a nº 245 indica que a sequência nucleotídica do clone λ7r-30 contém pelo menos uma fronteira exão/intrão do Gene de BMP-11 bovina.

Baseado no conhecimento de outras proteínas na família TGF-β, prevê-se que o precursor polipeptídico de

BMP-11 seria clivado na sequência multibásica ARG-SER-ARG-ARG de acordo com a sequência consenso proteolítica de processamento de ARG-X-X-ARG proposta. A clivagem do precursor polipeptídico de BMP-11 é esperada gerar um péptido maduro com 109 aminoácidos iniciado pelo aminoácido ASN na posição nº 1. O processamento de BMP-11 na forma madura é esperado envolver dimerização e remoção da região N-terminal de um modo análogo ao processamento da proteína TGF-β aparentada [Gentry *et al.*, *Molec. & Cell. Biol.*, **8:** 4162 (1988); Derynck *et al.*, *Nature*, **316:** 701 (1985)].

É deste modo contemplado que as espécies maduras operacionais de BMP-11 compreendem um homodímero de duas subunidades polipeptídicas, cada subunidade compreendendo os aminoácidos nº 1 a nº 109 com um peso molecular previsto de aproximadamente 12 000 daltons. São contempladas espécies operacionais adicionais compreendendo os aminoácidos nº 6 a nº 109, incluindo assim o primeiro resíduo conservado de cisteína. Como com outros membros da família de proteínas TGF-β, a região carboxi-terminal da proteína BMP-11 exibe uma conservação de sequência maior do que a porção mais amino-terminal. A percentagem de identidade aminoacídica da proteína BMP-11 no domínio C-terminal rico em cisteína (aminoácidos nº 6 a nº 109) com a região correspondente de outras proteínas na família TGF-β é como se segue: BMP-2, 39%; BMP-3, 37%; BMP-4, 37%; BMP-5, 42%, BMP-6, 45%; BMP-7, 42%; BMP-8, 39%; BMP-9, 40%; Vg1, 39%; GDF-1, 34%; TGF-β 1, 36%; TGF-β 2, 38%; TGF-β 3, 38%; inibina β(B), 41%; inibina β(A), 39%.

EXEMPLO 2

BMP-11 humana

Os genes para as BMP-11 bovina e humana são supostos serem significativamente homólogos, assim sendo, a sequência codificante bovina ou uma sua porção é utilizada como uma sonda para perscrutar uma biblioteca genómica humana ou como um sonda para identificar uma linha celular ou tecido humano que sintetiza a proteína humana análoga. Uma biblioteca genómica humana, tal como a da Stratagene com o número de catálogo 944201, pode ser perscrutada com tal sonda, e os presumíveis positivos isolados e a sequência de DNA obtida. A evidência que este recombinante codifica uma porção da BMP-11 humana assenta nas homologias estruturais da proteína e do gene bovino/humano.

Uma vez obtido um bacteriófago recombinante possuindo DNA que codifica uma porção da molécula de BMP-11 humana, a sequência codificante humana pode ser utilizada como uma sonda para identificar uma linha celular ou tecido humano que sintetiza mRNA para BMP-11. Alternativamente, a sequência que codifica BMP-11 bovina pode ser utilizada como uma sonda para identificar tal linha celular ou tecido humano. Descrito de modo resumido, o RNA é extraído de uma célula ou fonte de tecido seleccionada e submetido a electroforese num gel de agarose com formaldeído e transferido para nitrocelulose, ou feito reagir com

formaldeído e visualizado directamente em nitrocelulose. A nitrocelulose é então feita hibridar com uma sonda derivada de uma sequência que codifica BMP-11 bovina ou humana. Alternativamente, a sequência que codifica BMP-11 bovina é utilizada para desenhar oligonucleótidos iniciadores que irão amplificar especificamente uma porção da sequência que codifica BMP-11 situada na região localizada entre os iniciadores utilizados para realizar a reacção específica de amplificação. É contemplado que as sequências de BMP-11 bovina e humana permitirão amplificar especificamente sequências correspondentes que codificam BMP-11 humana a partir de moldes de mRNA, cDNA ou DNA genómico. Uma vez identificada uma fonte positiva por um dos métodos acima descritos, o mRNA é seleccionado por cromatografia em oligo (dT) celulose e o cDNA e sintetizado e clonado em λgt10 ou noutros vectores bacteriófagos λ conhecidos de peritos na técnica (*i.e.* λZAP) técnicas estabelecidas (Toole *et al.*, *supra*). É também possível realizar-se a reacção de amplificação governada pelo iniciador oligonucleotídico, acima descrita, directamente num cDNA ou biblioteca genómica humana pré-estabelecidos que foi clonado num vector bacteriófago λ. Em tais casos, uma biblioteca que produz um produto de DNA especificamente amplificado que codifica uma porção da proteína humana BMP-11 pode ser perscrutada directamente, utilizando o fragmento de DNA amplificado que codifica BMP-11 como uma sonda.

É previsto que os iniciadores oligonucleotídicos desenhados com base na sequência de DNA do clone genómico

λ7r-30 de BMP-11 bovina permitam a amplificação específica de sequências que codificam BMP-11 humana. O seguinte iniciador oligonucleotídico é desenhado com base nos nucleótidos n° 501 a n° 521 da sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO. 1 e sintetizado num sintetizador automático de DNA.

Iniciador C: TAGTCTAGATGCTCCGGCCAGTGCGAGTAC

Os primeiros nove nucleótidos do iniciador C (sublinhados) compreendem a sequência de reconhecimento para a endonuclease de restrição *Xba*I que pode ser utilizada para facilitar a manipulação de uma sequência especificamente amplificada de DNA que codifica a proteína BMP-11 da invenção e não são consequentemente derivados da sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 1.

O seguinte iniciador oligonucleotídico é desenhado com base nos nucleótidos, n° 701 a n° 678 da sequência de DNA apresentada na SEQ ID NO: 1 e sintetizado num sintetizador automático de DNA:

Iniciador D: TGCGGATCCGGAGCAGCCACAGCGATCCAC

Os primeiros nove nucleótidos do iniciador D (sublinhados) compreendem a sequência de reconhecimento para a endonuclease de restrição *Bam*HI que pode ser utilizada para facilitar a manipulação de uma sequência de DNA especificamente amplificada que codifica a proteína

BMP-11 da invenção e não são consequentemente derivados da sequência de DNA presente na SEQ ID NO: 1.

Os símbolos convencionais dos nucleótido nos iniciadores acima identificados são como se segue: A, adenosina; C, citosina, G, guanina; e T, timina.

Os iniciadores C e D acima identificados são utilizados como iniciadores para permitir a amplificação de um nucleótido específico a partir de DNA genómico humano. A reacção de amplificação é realizada de acordo com o seguinte:

O DNA genómico humano (fonte: linfócitos do sangue periférico) é desnaturado a 100 °C durante cinco minutos e depois arrefecido em gelo antes da adição a uma mistura de possuindo 200 µM de cada trifosfato de desoxinucleótido (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), Tris-HCl a 10 mM pH8,3, KCl a 50 mM, $MgCl_2$ a 1,5 mM, gelatina a 0,001%, 1,25 unidades de *Taq* DNA polimerase, iniciador oligonucleotídico C a 100 pM e iniciador oligonucleotídico D a 100 pM. Esta mistura de reacção é depois sujeita a ciclos térmicos de acordo com o que se segue: 3 minutos a 94 °C, 1 minuto a 50 °C, 1 minuto a 72 °C durante um ciclo, depois 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 50 °C, 1 minuto a 72 °C durante trinta e nove ciclos.

O DNA que é especificamente amplificado por esta reacção é separado do excesso de iniciadores oligonu-

cleotídicos C e D utilizados para iniciar a amplificação pela utilização de um protocolo baseado numa resina de purificação de DNA de acordo com as condições sugeridas pelo fabricante. O produto resultante de DNA é digerido com as endonucleases de restrição *Xba*I e *Bam*HI, extraído com fenol, extraído com clorofórmio. A substituição de tampão e a remoção de pequenos fragmentos de DNA resultantes da digestão por restrição *Xba*I/*Bam*HI é conseguida através da diluição do produto de DNA digerido em Tris-Hcl a 10 mM pH8,0, EDTA a Mm seguido de centrifugação através de um microconcentrador centricon™ 30 (W.R. Grace & Co., Beverly, Ma.; Produto nº 4209). O produto de DNA amplificado digerido com *Xba*I/*Bam*HI resultante é subclonado num vector plasmídico (pBluescript) entre os sítios de restrição *Xba*I e *Bam*HI da região de sítios múltiplos de ligação. A análise da sequência de DNA dos subclones resultantes indica que a sequência de DNA do produto especificamente amplificado codifica uma porção da proteína BMP-11 humana desta invenção. A sequência de DNA (SEQ ID NO: 3) e a sequência aminoacídica derivada (SEQ ID NO: 4) deste fragmento de DNA especificamente amplificado são apresentadas na Listagem de sequências.

Os nucleótidos nº 1 a nº 27 desta sequência compreendem a porção do iniciador oligonucleotídico C e os nucleótidos, nº 186 a nº 213 compreendem a porção do iniciador oligonucleotídico D utilizados para realizar a reacção de amplificação específica. Devido à função dos iniciadores oligonucleotídicos C e D (desenhados com base

na sequência de DNA de BMP-11 bovina) na iniciação da reacção de amplificação, eles podem não corresponder exactamente à sequência efectiva que codifica uma BMP-11 humana e não são consequentemente traduzidos na derivação acima apresentada da sequência aminoacídica. A sequência de DNA, do nucleótido nº 28 ao nº 185 da SEQ ID NO: 3, ou suas porções, especificamente amplificada a partir do molde de DNA genómico humano pode ser utilizada como uma sonda para identificar outras sequências que codificam BMP-11 humana a partir de bibliotecas genómicas humanas ou cDNA humano através de técnicas convencionais de hibridação/rastreio conhecidas por peritos na técnica.

Um milhão e duzentos mil recombinantes de uma biblioteca de cDNA de cérebro humano fetal (número de catálogo da Stratagene 936206) construída no vector λZAPII são plaqueados a uma densidade de 24000 placas de bacteriófagos recombinantes por placa em 50 placas. São executadas réplicas duplicadas de nitrocelulose das placas de bacteriófagos recombinantes para estas placas. É sintetizada uma sonda oligonucleotídica desenhada com base nos nucleótidos nº 53-nº 82 da SEQ ID NO: 3 num sintetizador automático de DNA. Esta sonda oligonucleotídica é marcada radioactivamente com λ^{32}P-ATP e é feita hibridar com ambos os conjuntos das réplicas duplicadas de nitrocelulose em SHB a 65 °C. São encontrados nove recombinantes que dão hibridação positiva. Um dos recombinantes que dão hibridação positiva, designado λFB30.5, é purificado em placa. São preparados stocks de placa de bacteriófago do clone de cDNA do λFB30.5 purificado e é

isolado DNA do bacteriófago. Um plasmídeo bacteriano designado FB30.5, produzido pelo protocolo de excisão *in vivo* descrito pelo distribuidor (Stratagene) e possuindo a inserção completa do clone de cDNA do bacteriófago λFB30.5, foi depositado na ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland E.U.A de acordo com os requisitos do Tratado de Budapeste e foi designado ATCC nº 69619. Uma porção da sequência de DNA do clone FB30.5 é apresentada na SEQ ID NO: 10.

São plaqueados um milhão de recombinantes de uma biblioteca genómica humana (Stratagene, número de catálogo 944201) construída no vector λFIX a uma densidade de 20 000 placas de bacteriófago recombinante por placa em 50 placas. São feitas réplicas duplicadas de nitrocelulose das placas de bacteriófago recombinante a partir destas placas. É sintetizada uma sonda oligonucleotídica desenhada com base nos nucleótidos nº 57-nº 86 da SEQ ID NO: 10, com a excepção de uma substituição inadvertida de CAC por GCG nos nucleótidos nº 59-nº 61 da SEQ ID NO: 10, num sintetizador automático de DNA. Esta sonda oligonucleotídica é marcada radioactivamente com λ^{32}P-ATP e é feita hibridar com ambos os conjuntos das réplicas duplicadas de nitrocelulose em SHB a 65 °C. São encontrados cinco recombinantes positivos para hibridação. Um dos recombinantes positivos para hibridação, designado 30GEN.4, é purificado em placa. São preparados stocks de placa de bacteriófago do clone genómico 30GEN.4 purificado e é isolado DNA do bacteriófago. Um stock de bacteriófago deste clone genómico foi depositado na ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland E.U.A de

acordo com os requisitos do Tratado de Budapeste e foi designado TCC nº 75775. Uma porção da sequência de DNA do clone 30GEN.4 é apresentada na SEQ ID NO: 10. Foi determinado que uma porção da sequência de DNA do clone genómico 30GEN.4 era idêntica a uma porção da sequência de DNA do clone de cDNA FB30.5. A extensão desta sobreposição (nucleótidos nº 1-nº 198) da SEQ ID NO: 10 foi utilizada como uma base para compilar a sequência parcial codificante da proteína BMP-10. O clone genómico 30GEN.4 é esperado conter sequências codificantes 5' adicionais da proteína humana BMP-11 que se espera que codifiquem o restante do precursor polipeptídico de BMP-11, incluindo a metionina iniciadora. A sequência parcial de BMP-11 humana é apresentada na SEQ ID NO: 10 e note-se que foi determinado que os nucleótidos nº 1-198 estão presentes em ambos o clone genómico 30GEN.4 e o clone de cDNA FB30.5 enquanto que os nucleótidos nº 199-nº 1270 são inteiramente derivados do clone de cDNA FB30.5. A SEQ ID NO: 10 prevê um precursor da proteína humana BMP11 de pelo menos 362 aminoácidos. Baseado no conhecimento de outras BMPs e outras proteínas da família TGF-β, prevê-se que o precursor polipéptido seria clivado na sequência multibásica ARG-SER-ARG-ARG (aminoácidos nº -4 ao nº -1 da SEQ ID NO: 11) de acordo com a sequência consenso proteolítica de processamento de ARG-X-X-ARG proposta. A clivagem do precursor polipeptídico de BMP-11 humana neste local produziria um péptido maduro com 109 aminoácidos iniciado pelo aminoácido ASN na posição nº 1da SEQ ID NO: 11. O processamento de BMP-11 humana na forma madura é esperado envolver dimerização e remoção da região N-terminal de um modo

análogo ao processamento da proteína TGF-β aparentada [L.E. Gentry *et al.*, *Molec. & Cell. Biol.*, **8**: 4162 (1988); R. Derynck *et al.*, *Nature*, **316**: 701 (1985)]. É contemplado que as espécies maduras operacionais de BMP-11 humana compreendem um homodímero de duas subunidades polipeptídicas, cada subunidade compreendendo os aminoácidos n° 1 a n° 108 da SEQ ID NO: 11, com um peso molecular previsto de aproximadamente 12 000 daltons. São contempladas espécies operacionais adicionais compreendendo os aminoácidos n° 7 a n° 108 da SEQ ID NO: 11, incluindo assim o primeiro resíduo conservado de cisteína. São também contempladas moléculas heterodiméricas compreendendo uma subunidade de BMP-11 e outra subunidade de outro membro da superfamília BMP/TGF-β.

EXEMPLO 3

Expressão de BMP-11

De modo a se produzirem proteínas BMP-11 bovina, humana ou de outro mamífero, o DNA que as codificam é transferido para um vector de expressão adequado e introduzido em células de mamífero ou de outros hospedeiros eucariotas ou procariotas preferidos por técnicas convencionais de engenharia genética. O sistema de expressão preferido para BMP-11 humana recombinante biologicamente operacional está contemplado ser células de mamífero transformadas estáveis.

Os peritos na técnica podem construir vectores de expressão mamífero utilizando a sequência da SEQ ID NO: 1

ou a SEQ ID NO: 10, ou outras sequências de DNA que codificam proteínas BMP-11 ou outras sequências modificadas e vectores conhecidos, tais como, pCD [Okayama *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, **2**: 161-170 (1982)], pJL3, pJL4 [Gough *et al.*, *EMBO J.*, **4**: 645-653 (1985)] e pMT2 CXM.

O vector de expressão mamífero pMT2 CXM é um derivado de p91023 (b) (Wong *et al.*, *Science* **228**: 810-815, 1985) diferindo do último uma vez que contém o gene de resistência à ampicilina em vez do gene de resistência à tetraciclina e contém ainda um sítio *Xho*I para a inserção de clones de cDNA. Os elementos funcionais de pMT2 CXM foram descritos (Kaufman, R.J., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 689-693) e incluem os genes de adenovírus VA, a origem de replicação SV40 incluindo o intensificador de 72 pb, o promotor tardio principal de adenovírus incluindo um sítio de excisão 5' e a maioria da sequência líder tripartida de adenovírus presente em mRNAs tardios de adenovírus, um sítio de aceitação de excisão, uma inserção DHFR, o sítio de poliadenilação precoce (SV40), e sequências pBR322 necessárias para propagação em *E. coli*.

O plasmídeo pMT2 CXM é obtido por digestão com *Eco*RI de pMT2-VWF, o qual foi depositado na "American Type Culture Collection (ATCC)", Rockville, MD (USA) com o número de acesso ATCC 67122. A digestão com *Eco*RI excisa a inserção de cDNA presente no pMT2-VWF, produzindo pMT2 em forma linear que pode ser ligado e utilizado para transformar *E. coli*. HB 101 ou DH -5 em resistência à ampicilina. O DNA do plasmídeo pMT2 pode ser preparado por

métodos convencionais. É então construído pMT2 CXM utilizando mutagénese de saída/entrada por ansa [Morinaga, *et al.*, *Biotechnology* **84:** 636 (1984). Isto remove as bases 1075 a 1145 em relação ao sítio *Hind*III perto da origem SV40 de replicação e sequências intensificadoras de pMT2. Adicionalmente insere a seguinte sequência:

5' PO-CATGGGCAGCTCGAG-3'

no nucleótido 1 145. Esta sequência contém o sítio de reconhecimento para a endonuclease de restrição *XhoI*. Um derivado de pMT2 CXM, designado pMT23, contém sítios de reconhecimento para as endonucleases de restrição *Pst*I, *Eco*RI, *Sal*I e *Xho*I. O DNA dos plasmídeos pMT2 CXM e pMT23 pode ser preparado por métodos convencionais.

O pEMC2β1 derivado de pMT21 pode também ser adequado na prática da invenção. O pMT21 é derivado de pMT2 que é derivado de pMT2-VWF. Como acima descrito a digestão com *Eco*RI excisa a inserção de cDNA presente na pMT-VWF, produzindo pMT2 em forma linear que pode ser ligado e utilizado para transformar *E. coli* HB 101 ou DH-5 em resistência à ampicilina. O DNA do plasmídeo pMT2 pode ser preparado por métodos convencionais.

O pMT21 é derivado a partir de pMT2 através das seguintes duas modificações. Em primeiro lugar, são removidos 76 pb da região não traduzida 5' do cDNA de DHFR incluindo um fragmento de 19 resíduos G da formação de caudas G/C para clonagem de cDNA. Neste processo, é

inserido um sítio *Xho*I para se obter a seguinte sequência imediatamente a montante de DHFR:

5' -CTGCAGGCGAGCCTGAATTCCTCGAGCCATCATG-3'

*Pst*I *Eco*RI *Xho*I

Em segundo lugar, é introduzido um sítio *Cla*I único por digestão com *Eco*RV e *Xba*I, tratamento com o fragmento Klenow da *DNA polimerase I*, e ligação a um ligante *Cla*I (CATCGATG). Isto remove um segmento de 250 pb da região de RNA (VAI) associada do adenovírus mas não interfere com a expressão genética ou função de RNA VAI. O pMT21 é digerido com *Eco*RI e *Xho*I, e utilizado para produzir o vector pEMC2B1.

É obtida uma porção do líder EMCV a partir de pMT2-ECAT1 [S.K. Jung, *et al.*, *J. Virol* **63**: 1651-1660 (1989)] por digestão com *Eco*RI e *Pst*I, resultando num fragmento de 2752 pb. Este fragmento é digerido com *Taq*I produzindo um fragmento *Eco*RI-*Taq*I de 508 pb que é purificado por electroforese em gel agarose de baixa temperatura de fusão. São sintetizados um adaptador de 68 pb e a sua cadeia complementar com uma extremidade saliente 5' *Taq*I e uma extremidade saliente 3' *Xho*I que possui a seguinte sequência:

5' -CGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTT

*Taq*I

GAAAAACACGATTGC-3'

*Xho*I

Esta sequência é semelhante à sequência líder do vírus EMC do nucleótido 763 ao 827. O ATG na posição 10 do líder do vírus EMC também muda para um ATT e é seguido por um sítio *XhoI*. Uma ligação tripartida do fragmento pMT21 *Eco*RI-*Xho*I, do fragmento *Eco*RI-*Taq*I do vírus EMC, e o oligonucleótido de 68 pb adaptador *Taq*I-*Xho*I adaptador resultando no vector pEMC2β1.

Este vector contém a origem de replicação e intensificador SV40, o promotor tardio principal de adenovírus, uma cópia de cDNA da maioria da sequência líder tripartida do adenovírus, uma pequena sequência interveniente híbrida, um sinal de poliadenilação SV40 e o gene *VA I* de adenovírus, marcadores DHFR e β-lactamase e uma sequência EMC, em relações apropriadas para governar a elevada expressão do cDNA desejado em células de mamífero.

A construção de vectores pode envolver modificação das sequências de DNA de BMP-11. Por exemplo, o cDNA de BMP-11 pode ser modificado por remoção dos nucleótidos não-codificantes nas extremidades 5' e 3' da região codificante. Os nucleótidos não-codificantes removidos podem ou não ser substituídos por outras sequências que se sabe serem benéficas para expressão. Estes vectores são transformados em células hospedeiras apropriadas para expressão de proteínas BMP-11. Adicionalmente, a sequência da SEQ ID NO: 1 ou da SEQ ID NO: 10 ou de outras sequências que codificam proteínas BMP-11 podem ser manipuladas para

expressar uma BMP-11 madura removendo sequências de pró-péptidos que codificam BMP-11 e substituindo-as com sequências que codificam pró-péptidos completos de outras proteínas BMP, proteínas activina ou outros membros da superfamília TGF-β.

Os peritos na técnica podem manipular as sequências da SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 10 eliminando ou substituindo as sequências reguladoras de mamífero que flanqueiam a sequência codificante com sequências bacterianas para produzir vectores bacterianos para expressão intracelular ou extracelular em células bacterianas. Por exemplo, as sequências codificantes podem ser manipuladas adicionalmente (*e.g.* ligadas a outros ligantes conhecidos ou modificadas por deleção de sequências não-codificantes ou alterando nucleótidos por outras técnicas conhecidas). A sequência codificante BMP-11 modificada pode então ser inserida num vector bacteriano conhecido utilizando procedimentos tais como descrito em T. Taniguchi *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **77**: 5230-5233 (1980). Este vector bacteriano exemplar pode depois ser transformado em células bacterianas hospedeiras e a proteína BMP-11 aí expressa. Para uma estratégia para a produção de expressão extracelular de proteínas BMP-11 em células bacterianas, ver, *e.g.* pedido de patente europeu EPA 177 343.

Podem ser efectuadas manipulações semelhantes para a construção de um vector de insecto [Ver, *e.g.* procedimentos descritos no pedido de patente europeu publicado

155 476] para expressão em células de insecto. Um vector de levedura pode também ser construído utilizando sequências reguladoras de levedura para expressão intracelular ou extracelular dos factores da presente invenção por células de leveduras. [Ver, *e.g.*, procedimentos descritos no pedido PCT publicado W086/00639 e no pedido de patente europeu EPA 123 289].

Um método para a produção de níveis elevados de uma proteína BMP-11 da invenção em células de mamífero pode envolver a construção de células possuindo cópias múltiplas do gene *BMP-11* heterólogo. O gene heterólogo é ligado a um marcador amplificável, *e.g.* o gene *dihidrofolato redutase* (DHFR) para o que células possuindo um número elevado de cópias do gene podem ser seleccionadas para propagação em concentrações crescentes de metotrexato (MTX) de acordo com os procedimentos de Kaufmark e Sharp, *J. Mol. Biol.*, **159:** 601-629 (1982). Esta abordagem pode ser utilizada com vários tipos diferentes de células:

Por exemplo, um plasmídeo possuindo uma sequência de DNA para uma BMP-11 da invenção em associação operacional com outras sequências de plasmídeo que permitem a sua expressão e o plasmídeo de expressão DHFR pAdA6SV(A)3 [Kaufman e Sharp, *Mol. Cell Biol.*, **2:** 1304 (1982)] podem ser co-introduzidos em células CHO deficientes em DHFR, DUKX-BII, por vários métodos incluindo co-precipitação com fosfato de cálcio e transfecção, electroporação ou fusão de protoplasto. São seleccionados transformadores que

expressam DHFR para crescimento em meio alfa com soro fetal de vitela dialisado, e subsequentemente seleccionados para amplificação por crescimento em concentrações crescentes de MTX (*e.g.* paços sequenciais em MTX a 0,02, 0,2, 1,0 e 5 μM) como descrito, em Kaufman *et al.*, *Mol Cell Biol.*, **5:** 1750 (1983). Os transformadores são clonados, e a expressão de BMP-11 biologicamente operacional é monitorizada por um ou mais dos ensaios de actividade de BMP-11 descritos nos Exemplos 5 a 8 em baixo. A expressão de BMP-11 deverá aumentar com níveis crescentes de resistência a MTX. Os polipéptidos BMP-11 são caracterizados utilizando técnicas convencionais conhecidas na técnica, tais como, marcação por pulsos com metionina ou cisteína[35S] e electroforese em gel de poliacrilamida. Procedimentos semelhantes podem ser seguidos para produzir outras proteínas BMP-11 aparentadas.

EXEMPLO 4

Actividade Biológica da Expressão de BMP-11

Para medir a actividade biológica das proteínas BMP-11 expressas obtidas no Exemplo 3 acima apresentado, as proteínas são recuperadas da cultura celular e purificadas isolando as proteínas BMP-11 de outro material proteináceo com o qual são co-produzidas, assim como de outros contaminantes. A proteína purificada pode ser avaliada de acordo com os ensaios para actividade de BMP-11 descritos nos Exemplos 5 a 8 abaixo apresentados.

EXEMPLO 5

BIOENSAIOS W-20

A. Descrição de células W-20

A utilização de células de estroma da medula óssea W-20 como uma linha celular indicadora é baseada na conversão destas células em células tipo osteoblasto após tratamento com uma proteína BMP [Thies *et al.*, *Journal of Bone and Mineral Research*, **1:** 305 (1990); e Thies *et al.*, *Endocrinology*, **130:** 1318 (1992)]. Especificamente, as células W-20 são uma linha celular clonal de células do estroma de medula óssea derivada de ratinhos adultos por investigadores no laboratório do Dr. D. Nathan, Children's Hospital, Boston, MA. O tratamento de células W-20 com certas proteínas BMP resulta em (1) produção aumentada de fosfatase alcalina, (2) indução de cAMP estimulado por PTH, e (3) indução da síntese de osteocalcina pelas células. Enquanto que (1) e (2) representam características associadas com o fenótipo osteoblasto, a capacidade para sintetizar osteocalcina é uma propriedade fenotípica apenas exibida por osteoblastos maduros. Adicionalmente, observou-se até à data a conversão de células do estroma W-20 em células tipo osteoblasto apenas após tratamento com BMPs. Deste modo, as actividades exibidas *in vitro* por células W-20 tratadas com BMP estão correlacionadas com a actividade *in vivo* de formação de osso conhecida para BMPs.

Em baixo são descritos dois ensaios *in vitro* úteis para a comparação de actividades BMP de moléculas osteo-indutoras novas.

B. Protocolo do Ensaio de Fosfatase Alcalina W-20

As células W-20 são plaqueadas em placas de cultura de tecidos de 96 poços a uma densidade de 10 000 células por poço em 200 µL de meio (DME com soro fetal de vitela a 10% inactivado por calor, glutamina a 2 mM e penicilina a 100 Unidades/mL + estreptomicina a 100 µg/mL. As células são deixadas a ligar durante a noite num incubador com ar a 95%, CO_2 a 5% a 37 °C.

Os 200 µL de meio são removidos de cada poço com uma pipeta multicanal e substituídos com um volume igual de amostra do teste dispensada em DME com soro fetal de vitela a 10% desactivado por calor, glutamina a 2 mM e penicilina-estreptomicina a 1%. As substâncias do teste são ensaiadas em triplicado.

As amostras do teste e padrões são incubados por um período de 24 horas com as células W-20 indicadoras. Após as 24 horas, as placas são removidas do incubador a 37 °C e os meios de teste são removidos das células.

As camadas de células W-20 são lavadas 3 vezes com 200 µL por poço de soro fisiológico tamponado com fosfato isento de cálcio/magnésio e estas lavagens são eliminadas.

Adicionam-se 50 µL de água destilada redestilada num destilador de vidro de borossilicato a cada poço e as placas de ensaio são então colocadas num banho de etanol e gelo seco para congelação rápida. Uma vez congeladas, as placas de ensaio são removidas do banho de etanol e gelo seco e descongeladas a 37 °C. Este passo é repetido 2 vezes mais, num total de 3 procedimentos de congelar-descongelar. Uma vez completo, a fosfatase alcalina ligada à membrana está disponível para quantificação.

Adicionam-se 50 µL da mistura de ensaio (glicina a 50 mM, Triton X-100 a 0,05%, $MgCl_2$ a 4 mM, fosfato de p-nitrofenol, pH = 10,3 a 5 mM) a cada poço de ensaio e as placas de ensaio são então incubadas durante 30 minutos a 37 °C num banho de água com agitação a 60 oscilações por minuto.

No fim dos 30 minutos de incubação, a reacção é interrompida pela adição de 100 µL de NaOH a 0,2 N a cada poço e colocando as placas de ensaio em gelo.

A absorvância espectrofotométrica para cada poço é medida a um comprimento de onda de 405 nanómetros. Estes valores são depois comparados com padrões conhecidos para dar uma estimativa da actividade da fosfatase alcalina em cada amostra. Por exemplo, utilizando quantidades conhecidas de fosfato de p-nitrofenol, são produzidos valores de absorvância. Isto é apresentado na Tabela I.

Tabela I

Valores de Absorvância para Padrões Conhecidos de Fosfato de p-nitrofenol	
Fosfato de p-nitrofenol µmoles	Absorvância média(405 nm)
0,000	0
0,006	0,261 +/- 0,024
0,012	0,521 +/- 0,031
0,018	0,797 +/- 0,063
0,024	1,074 +/- 0,061
0,030	1,305 +/- 0,083

Os valores de absorvância para quantidades conhecidas de BMPs podem ser determinados e convertidos em µmoles de fosfato de p-nitrofenol clivadas por unidade de tempo como apresentado na Tabela II.

Tabela II

Valores de Fosfatase alcalina para células W-20 tratadas com BMP-2		
Concentração de BMP-2 ng/mL	Leitura de Absorvância 405 nmetros	µmoles de substrato por hora
0	0,645	0,024
1,56	0,696	0,026
3,12	0,765	0,029
6,25	0,923	0,036
12,50	1,121	0,044
25,0	1,457	0,058
50,0	1,662	0,067
100,0	1,977	0,080

Estes valores são depois utilizados para comparar as actividades de quantidades conhecidas de BMP-11 com BMP 2.

C. Protocolo de RIA para Osteocalcina

As células W-20 são plaqueadas a 10^6 células por poço em pratos de cultura de tecidos multipoços com 24 poços em 2 mL de DME possuindo soro fetal de vitela a 10% desactivado por calor, glutamina a 2 mM. As células são deixadas a ligar durante a noite numa atmosfera de ar a 95% CO_2 a 5% a 37 °C.

No dia seguinte meio é mudado para DME possuindo soro fetal de vitela a 10%, glutamina a 2 mM e a substância do teste num volume total de 2 mL. Cada substância do teste é administrada em poços em triplicado. As substâncias do teste são incubadas com as células W-20 durante um total de 96 horas com substituição às 48 horas pelos mesmos meios do teste.

Ao fim de 96 horas, são removidos 50 µL do meio do teste de cada poço e avaliados quanto à produção de osteocalcina utilizando um radioimunoensaio para osteocalcina de ratinho. Os detalhes do ensaio são descritos no kit fabricado por Biomedical Technologies Inc., 378 Page Street, Stoughton, MA 02072. Os reagentes para o ensaio são encontrados como os produtos número BT-431 (padrão

osteocalcina de ratinho), BT-432 (Osteocalcina cabra anti-ratinho), BT-431R (osteocalcina de ratinho iodinada), BT-415 (soro normal de cabra) e BT-414 (IgG burro anti-cabra). O RIA para osteocalcina sintetizada por células W-20 em resposta a tratamento com BMP é efectuado como descrito no protocolo fornecido pelo fabricante.

Os valores obtidos para as amostras do teste são comparados com valores para padrões conhecidos de osteocalcina de ratinho e com a quantidade de osteocalcina produzida por células W-20 em resposta a exposição a quantidades conhecidas de BMP-2. Os valores para síntese de osteocalcina induzida por BMP-2 em células W-20 são apresentados na Tabela III.

Tabela III

Síntese de Osteocalcina por Células W-20	
Concentração de BMP-2 ng/mL	Síntese de Osteocalcina ng/poço
0	0,8
2	0,9
4	0,8
8	2,2
16	2,7
31	3,2
62	5,1
125	6,5
250	8,2
500	9,4
1 000	10,0

EXEMPLO 6

Ensaio de Sampath-Reddi Rosen-Modificado

É utilizada uma versão modificada do ensaio de formação de osso em rato descrito em Sampath e Reddi, *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, **80:** 6591-6595 (1983) para avaliar a actividade indutora de osso, cartilagem e/ou outro tecido conjuntivo de proteínas BMP-11. Este ensaio modificado é aqui designado por ensaio Sampath-Reddi Rosen-modificado. O passo de precipitação com etanol do procedimento Sampath-Reddi é substituído por diálise (se a composição é uma solução) ou diafiltração (se a composição é uma suspensão) da fracção a ser ensaiada contra água. A solução ou suspensão é depois equilibrada a TFA a 0,1%. A solução resultante é adicionada a 20 mg de matriz de rato. Uma amostra simulacro de matriz de rato não tratada com a proteína funciona como um controlo. Este material é congelado e liofilizado e o pó resultante é encapsulado em cápsulas de gelatina n° 5. As cápsulas são implantadas subcutaneamente na área torácica abdominal de ratos Long Evans macho com 21-49 dias. Os implantes são removidos após 7-14 dias. Metade de cada implante é utilizada para análise de fosfatase alcalina [ver, Reddi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **69:** 1601 (1972)].

A outra metade de cada implante é fixada e processada para análise histológica. São coradas secções de 1 µm de glicolmetacrilato com Von Kossa e fucsina ácida

para registar a quantidade de formação induzida de osso e cartilagem presente em cada implante. Os termos +1 a +5 representam a área de cada secção histológica de um implante ocupada por novas células de osso e/ou cartilagem e matriz. Um registo +5 indica que mais do que 50% do implante é osso novo, e/ou cartilagem produzidos como um resultado directo da proteína no implante. Um registo de +4, +3, +2, e +1 indicaria que mais do que 40%, 30%, 20% e 10% respectivamente do implante contém cartilagem e/ou osso novos.

As proteínas BMP-11 desta invenção podem ser avaliadas para actividade neste ensaio.

EXEMPLO 7

Actividade biológica de BMP-11 expressas

Para medir a actividade biológica das proteínas BMP-11 expressas obtidas no Exemplo 3 acima apresentado, as proteínas são recuperadas da cultura celular e purificadas isolando as proteínas BMP-11 de outro material proteináceo com o qual são co-produzidas, assim como de outros contaminantes. A proteína purificada pode ser testada de acordo com o ensaio de formação de osso em rato descrito no Exemplo 6.

A purificação é efectuada utilizando técnicas convencionais conhecidas por peritos na técnica.

A análise proteica é realizada utilizando técnicas convencionais, tais como, SDS-PAGE em acrilamida [Laemmli, *Nature* **227**: 680 (1970)] corado com prata [Oakley, *et al. Anal. Biochem*, **105**: 361 (1980)] e por imunotransferência: [Towbin, *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350 (1979)].

As descrições precedentes detalham formas de realização presentemente preferidas da presente invenção. São esperadas ocorrerem várias modificações e variações na sua prática aos peritos na técnica: tendo em consideração estas descrições. Crê-se que essas modificações e variações estejam consideradas nas Reivindicações aqui em apêndice.

EXEMPLO 8

Testes para determinar a actividade de activina da BMP-11

A purificação é efectuada utilizando técnicas convencionais conhecidas por peritos na técnica. É contemplado, como com outras proteínas da superfamília TGF-β, que a purificação pode incluir a utilização de sefarose de Heparina.

A análise proteica é realizada utilizando técnicas convencionais, tais como, SDS-PAGE em acrilamida [Laemmli, *Nature* **227**: 680 (1970)] corada com prata [Oakley,

et al. Anal. Biochem., **105:** 361 (1980)] e por imunotransferência [Towbin, *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76:** 4350 (1979)].

As proteínas BMP-11 podem ser caracterizadas adicionalmente pela sua capacidade de modulação da libertação da hormona folículo-estimulante (FSH) em bioensaios *in vitro* estabelecidos utilizando células da pituitária anterior de rato como descrito, por exemplo, em Vale *et al.*, *Endocrinology*, **91:** 562-72 (1972); Ling *et al.*, *Nature*, **321:** 779-782 (1986) ou Vale *et al.*, *Nature*, **321:** 76-79 (1986), as divulgações das quais são aqui incorporadas por referência.

Alternativamente, as BMP-11 podem ser caracterizadas pela sua capacidade para estimular actividade de eritropoietina na linha celular humana K-562, como descrito por Lozzio *et al.*, *Blood*, **45:** 321-334 (1975) e na Patente dos Estados Unidos N° 5 071 834, na coluna 15, cujas divulgações são aqui incorporadas por referência.

Adicionalmente, as BMP-11 podem ser caracterizadas pela sua actividade em ensaios de sobrevivência celular, como descrito em Schubert, *Nature*, **344:** 868-870 (1990), a divulgação do qual é incorporado por referência.

As descrições precedentes, detalham formas de realização presentemente preferidas da presente invenção.

São esperadas ocorrerem várias modificações e variações na sua prática aos peritos na técnica tendo em consideração estas descrições. Crê-se que essas modificações e variações estejam consideradas nas Reivindicações aqui em apêndice.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE: Genetics Institute, LLC

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Composições de BMP-11

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 11

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:
(A) DESTINATÁRIO: Genetics Institute, LLC
(B) RUA: 87 Cambridge Park Drive
(C) ESTADO: MA
(D) PAÍS: EUA
(F) CÓDIGO: 02140

(v) FORMA LEGÍVEL EM COMPUTADOR
(A) TIPO DE MEIO: disquete
(B) COMPUTADOR: compatível com PC da IBM
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(D) PROGRAMA DE COMPUTADOR: PatentIn Release #1.0, Versão #1.25

(vi) DADOS DO PRESENTE PEDIDO DE PATENTE:
(A) NÚMERO DO PEDIDO DE PATENTE:
(B) DATA DE PEDIDO:
(C) CLASSIFICAÇÃO:

(ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES:
(A) TELEFONE: 617 876-1170
(B) TELEFAX: 617 876-5851

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 789 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: dupla
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iv) FONTE ORIGINAL:
(A) ORGANISMO: *Bos taurus*
(B) ESTIRPE: Activina Bovina WC

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME/CHAVE: CDS
(B) LOCALIZAÇÃO: 324..704

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME/CHAVE: propriedade_misc
(B) LOCALIZAÇÃO: 322..323
(C) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "extremidade 3'putativa do intrão"

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME/CHAVE: péptido_mat
(B) LOCALIZAÇÃO: 375..701

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 1:

```
AAACTGTATT TTGGGGTGAA GGTGTGAGTT AATAGATTCA CGGGACAACA AAGATGGGCT      60

GTTGTTGAGA CCTTGGGCCA AGGGGCTGAT GAGGGTCAGG TTGCCAAGAG AGAGAGAATT     120

AGGGAAGGTG AGTTTAGGGA GACATGGCTA GCTGGCAAGA AAAGTGGGTA GAAAACAGGG     180

GTTGGGGAGG GGAGCACTGG AGAAGCTCAG AAATCACTTG GTCTCTGTTC TCCTGCCCCT     240

ACTGAGGGGC AGGTGAGAAG AAACAGGGAG TAGGAGCTCC TCGAGGCTCT ATTACATCTC     300

TTTCTCCTCT CCCTCACCCC CAG CAT CCT TTT ATG GAG CTT CGA GTC CTA          350
                      His Pro Phe Met Glu Leu Arg Val Leu
                      -17  -15             -10
```

```
GAG AAC ACA AAA CGG TCC CGG CGG AAC CTG GGC CTG GAC TGC GAT GAA     398
Glu Asn Thr Lys Arg Ser Arg Arg Asn Leu Gly Leu Asp Cys Asp Glu
            -5                  1               5

CAT TCA AGT GAG TCC CGC TGT TGC CGC TAC CCC CTC ACT GTG GAC TTT     446
His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe
     10                  15                  20

GAG GCT TTT GGC TGG GAC TGG ATC ATC GCT CCT AAA CGC TAC AAG GCC     494
Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala
 25                  30                  35                  40

AAC TAC TGC TCC GGC CAG TGC GAG TAC ATG TTT ATG CAA AAG TAT CCG     542
Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu Tyr Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro
                45                  50                  55

CAC ACC CAC TTG GTG CAA CAG GCT AAC CCA AGA GGC TCT GCG GGG CCC     590
His Thr His Leu Val Gln Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro
            60                  65                  70

TGC TGC ACA CCC ACC AAG ATG TCC CCA ATC AAC ATG CTC TAC TTC AAT     638
Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn
        75                  80                  85

GAC AAG CAG CAG ATT ATC TAC GGC AAG ATC CCT GGC ATG GTG GTG GAT     686
Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Gly Met Val Val Asp
     90                  95                  100

CGC TGT GGC TGC TCC TAAGGTGGGG GACAGCGGAT GCCTCCCCAA CAGACCCTGC     741
Arg Cys Gly Cys Ser
105                 110

CCCTAGACTC CCCCAGCCCT GACCCCCTGC TCCCCGGCCC TAGAGCTC                789
```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 126 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:

```
His Pro Phe Met Glu Leu Arg Val Leu Glu Asn Thr Lys Arg Ser Arg
-17     -15                 -10                  -5

Arg Asn Leu Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys
  1               5                  10                  15

Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp
                20                  25                  30

Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys
            35                  40                  45

Glu Tyr Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln
        50                  55                  60

Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met
    65                  70                  75

Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr
80                  85                  90                  95

Gly Lys Ile Pro Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
                100                 105
```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 213 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: dupla
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iv) FONTE ORIGINAL:
(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(B) ESTIRPE: Activina Humana WC

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME/CHAVE: CDS
(B) LOCALIZAÇÃO: 28..183

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME/CHAVE: propriedade_misc
(B) LOCALIZAÇÃO: 184..185
(C) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "dois terços de codão na extremidade de clone parcial"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 3:

```
TCTAGATGCT CCGGCCAGTG CGAGTAC ATG TTC ATG CAA AAA TAT CCG CAT          51
                              Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro His
                                1               5

ACC CAT TTG GTG CAG CAG GCC AAT CCA AGA GGC TCT GCT GGG CCC TGT        99
Thr His Leu Val Gln Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys
     10                  15                  20

TGT ACC CCC ACC AAG ATG TCC CCA ATC AAC ATG CTC TAC TTC AAT GAC       147
Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp
 25                  30                  35                  40

AAG CAG CAG ATT ATC TAC GGC AAG ATC CCT GGC ATG GTGGTGGATC            193
Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Gly Met
                45                  50

GCTGTGGCTG CTCCGGATCC                                                 213
```

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 52 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 4:

Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala Asn
1 5 10 15

Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro
20 25 30

Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Lys
35 40 45

Ile Pro Gly Met
50

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 30 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iv) FONTE ORIGINAL:
(A) ORGANISMO: iniciador C para Activina Bovina WC

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME/CHAVE: propriedade_misc
(B) LOCALIZAÇÃO: 1..9
(C) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "sítio de restrição para *XbaI*"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 5:

TAGTCTAGAT GCTCCGGCCA GTGCGAGTAC 30

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 30 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iv) FONTE ORIGINAL:
(A) ORGANISMO: iniciador D para Activina Bovina WC

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME/CHAVE: propriedade_misc
(B) LOCALIZAÇÃO: 1..9
(C) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "sítio de restrição para *BamHI*"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 6:

TGCGGATCCG GAGCAGCCAC AGCGATCCAC 30

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 15 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iv) FONTE ORIGINAL:
(A) ORGANISMO: DNA inserido em pMT2 CXM

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 7:

CATGGGCAGC TCGAG 15

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 34 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iv) FONTE ORIGINAL:
(A) ORGANISMO: DNA inserido em pMT21

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME/CHAVE: propriedade_misc
(B) LOCALIZAÇÃO: 1..6
(C) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "sítio de restrição para *Pst*"

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME/CHAVE: propriedade_misc
(B) LOCALIZAÇÃO: 15..26
(C) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "sítios de restrição para *Eco*RI e *Xho*I"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 8:

CTGCAGGCGA GCCTGAATTC CTCGAGCCAT CATG 34

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 68 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iv) FONTE ORIGINAL:
(A) ORGANISMO: Porção da sequência líder do vírus EMC

(x) INFORMAÇÃO SOBRE A PUBLICAÇÃO:
(A) AUTORES: Jung, S K
(C) REVISTA: *J. Virol.*
(D) VOLUME: **63**
(F) PÁGINAS: 1651-1660
(G) DATA: 1989

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 9:

CGAGGTTAAA AAACGTCTAG GCCCCCCGAA CCACGGGGAC GTGGTTTTCC TTTGAAAAAC 60

ACGATTGC 68

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 1 270 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: DNA (genómico)

(iv) FONTE ORIGINAL:
(A) ORGANISMO: BMP-11 Humana

(iv) FONTE DIRECTA:
(B) CLONE: FB30.5

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME/CHAVE: CDS
(B) LOCALIZAÇÃO: 1..1 086

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME/CHAVE: péptido_mat
(B) LOCALIZAÇÃO: 760..1 086

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 10:

```
GAG CGC TCC AGC CGG CCA GCC CCG TCC GTG GCG CCC GAG CCG GAC GGC      48
Glu Arg Ser Ser Arg Pro Ala Pro Ser Val Ala Pro Glu Pro Asp Gly
-253         -250                -245                -240

TGC CCC GTG TGC GTT TGG CGG CAG CAC AGC CGC GAG CTG CGC CTA GAG      96
Cys Pro Val Cys Val Trp Arg Gln His Ser Arg Glu Leu Arg Leu Glu
        -235                -230                -225

AGC ATC AAG TCG CAG ATC TTG AGC AAA CTG CGG CTC AAG GAG GCG CCC     144
Ser Ile Lys Ser Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Lys Glu Ala Pro
    -220                -215                -210
```

```
AAC ATC AGC CGC GAG GTG GTG AAG CAG CTG CTG CCC AAG GCG CCG CCG      192
Asn Ile Ser Arg Glu Val Val Lys Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro
-205                -200                -195                -190

CTG CAG CAG ATC CTG GAC CTA CAC GAC TTC CAG GGC GAC GCG CTG CAG      240
Leu Gln Gln Ile Leu Asp Leu His Asp Phe Gln Gly Asp Ala Leu Gln
                -185                -180                -175

CCC GAG GAC TTC CTG GAG GAG GAC GAG TAC CAC GCC ACC ACC GAG ACC      288
Pro Glu Asp Phe Leu Glu Glu Asp Glu Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr
            -170                -165                -160

GTC ATT AGC ATG GCC CAG GAG ACG GAC CCA GCA GTA CAG ACA GAT GGC      336
Val Ile Ser Met Ala Gln Glu Thr Asp Pro Ala Val Gln Thr Asp Gly
        -155                -150                -145

AGC CCT CTC TGC TGC CAT TTT CAC TTC AGC CCC AAG GTG ATG TTC ACA      384
Ser Pro Leu Cys Cys His Phe His Phe Ser Pro Lys Val Met Phe Thr
    -140                -135                -130

AAG GTA CTG AAG GCC CAG CTG TGG GTG TAC CTA CGG CCT GTA CCC CGC      432
Lys Val Leu Lys Ala Gln Leu Trp Val Tyr Leu Arg Pro Val Pro Arg
-125                -120                -115                -110

CCA GCC ACA GTC TAC CTG CAG ATC TTG CGA CTA AAA CCC CTA ACT GGG      480
Pro Ala Thr Val Tyr Leu Gln Ile Leu Arg Leu Lys Pro Leu Thr Gly
                -105                -100                -95

GAA GGG ACC GCA GGG GGA GGG GGC GGA GGC CGG CGT CAC ATC CGT ATC      528
Glu Gly Thr Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Arg His Ile Arg Ile
            -90                 -85                 -80

CGC TCA CTG AAG ATT GAG CTG CAC TCA CGC TCA GGC CAT TGG CAG AGC      576
Arg Ser Leu Lys Ile Glu Leu His Ser Arg Ser Gly His Trp Gln Ser
        -75                 -70                 -65

ATC GAC TTC AAG CAA GTG CTA CAC AGC TGG TTC CGC CAG CCA CAG AGC      624
Ile Asp Phe Lys Gln Val Leu His Ser Trp Phe Arg Gln Pro Gln Ser
    -60                 -55                 -50
```

```
AAC TGG GGC ATC GAG ATC AAC GCC TTT GAT CCC AGT GGC ACA GAC CTG      672
Asn Trp Gly Ile Glu Ile Asn Ala Phe Asp Pro Ser Gly Thr Asp Leu
-45                 -40                 -35                 -30

GCT GTC ACC TCC CTG GGG CCG GGA GCC GAG GGG CTG CAT CCA TTC ATG      720
Ala Val Thr Ser Leu Gly Pro Gly Ala Glu Gly Leu His Pro Phe Met
                -25                 -20                 -15

GAG CTT CGA GTC CTA GAG AAC ACA AAA CGT TCC CGG CGG AAC CTG GGT      768
Glu Leu Arg Val Leu Glu Asn Thr Lys Arg Ser Arg Arg Asn Leu Gly
            -10                 -5                  1

CTG GAC TGC GAC GAG CAC TCA AGC GAG TCC CGC TGC TGC CGA TAT CCC      816
Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro
      5                  10                  15

CTC ACA GTG GAC TTT GAG GCT TTC GGC TGG GAC TGG ATC ATC GCA CCT      864
Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro
 20                  25                  30                  35

AAG CGC TAC AAG GCC AAC TAC TGC TCC GGC CAG TGC GAG TAC ATG TTC      912
Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu Tyr Met Phe
                40                  45                  50

ATG CAA AAA TAT CCG CAT ACC CAT TTG GTG CAG CAG GCC AAT CCA AGA      960
Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala Asn Pro Arg
            55                  60                  65


GGC TCT GCT GGG CCC TGT TGT ACC CCC ACC AAG ATG TCC CCA ATC AAC     1008
Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn
        70                  75                  80

ATG CTC TAC TTC AAT GAC AAG CAG CAG ATT ATC TAC GGC AAG ATC CCT     1056
Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro
     85                  90                  95

GGC ATG GTG GTG GAT CGC TGT GGC TGC TCT TAAGGTGGGG GATAGAGGAT       1106
Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
100                 105

GCCTCCCCCA CAGACCCTAC CCCAAGACCC CTAGCCCTGC CCCCATCCCC CCAAGCCCTA   1166
```

GAGCTCCCTC CACTCTTCCC GCGAACATCA CACCGTTCCC CGACCAAGCC GTGTGCAATA 1226

CAACAGAGGG AGGCAGGTGG GAATTGAGGG TGAGGGGTTT GGGG 1270

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 362 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO: 11:

Glu Arg Ser Ser Arg Pro Ala Pro Ser Val Ala Pro Glu Pro Asp Gly
-253 -250 -245 -240

Cys Pro Val Cys Val Trp Arg Gln His Ser Arg Glu Leu Arg Leu Glu
-235 -230 -225

Ser Ile Lys Ser Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Lys Glu Ala Pro
-220 -215 -210

Asn Ile Ser Arg Glu Val Val Lys Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro
-205 -200 -195 -190

Leu Gln Gln Ile Leu Asp Leu His Asp Phe Gln Gly Asp Ala Leu Gln
-185 -180 -175

Pro Glu Asp Phe Leu Glu Glu Asp Glu Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr
-170 -165 -160

Val Ile Ser Met Ala Gln Glu Thr Asp Pro Ala Val Gln Thr Asp Gly
-155 -150 -145

Ser Pro Leu Cys Cys His Phe His Phe Ser Pro Lys Val Met Phe Thr
-140 -135 -130

```
Lys Val Leu Lys Ala Gln Leu Trp Val Tyr Leu Arg Pro Val Pro Arg
-125                -120                -115                -110

Pro Ala Thr Val Tyr Leu Gln Ile Leu Arg Leu Lys Pro Leu Thr Gly
                -105                -100                 -95

Glu Gly Thr Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Arg His Ile Arg Ile
            -90                 -85                 -80

Arg Ser Leu Lys Ile Glu Leu His Ser Arg Ser Gly His Trp Gln Ser
        -75                 -70                 -65

Ile Asp Phe Lys Gln Val Leu His Ser Trp Phe Arg Gln Pro Gln Ser
    -60                 -55                 -50

Asn Trp Gly Ile Glu Ile Asn Ala Phe Asp Pro Ser Gly Thr Asp Leu
-45                 -40                 -35                 -30

Ala Val Thr Ser Leu Gly Pro Gly Ala Glu Gly Leu His Pro Phe Met
                -25                 -20                 -15

Glu Leu Arg Val Leu Glu Asn Thr Lys Arg Ser Arg Arg Asn Leu Gly
            -10                 -5                  1

Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro
      5                  10                  15


Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro
 20                  25                  30                  35

Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu Tyr Met Phe
                40                  45                  50

Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala Asn Pro Arg
            55                  60                  65

Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn
        70                  75                  80

Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro
     85                  90                  95
```

Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
100 105

Lisboa, 30 de Novembro de 2006

REIVINDICAÇÕES

1. Processo *in vitro* para aumentar a sobrevivência das células neuronais compreendendo a administração de uma composição compreendendo um polipéptido BMP-11 purificado a uma célula, em que o polipéptido BMP-11 compreende uma sequência aminoacídica codificada por uma sequência de DNA escolhida a partir de:

(a) sequências de DNA compreendendo os nucleótidos 375 ou 390 a 701 da SEQ ID No. 1;

(b) sequências de DNA compreendendo os nucleótidos 760 ou 775 a 1 086 da SEQ ID No. 10;

(c) sequências de DNA que codificam a mesma sequência aminoacídica que as sequências de DNA de (a) ou (b);

(d) variações alélicas que ocorrem naturalmente da sequência de DNA de (a) ou (b) que codificam um polipéptido possuindo actividade de BMP-11; e

(e) sequências de DNA que hibridam sob condições restringentes com as sequências de DNA de (a), (b) ou (c) e que codificam um polipéptido possuindo actividade de BMP-11.

2. Processo da reivindicação 1, em que o polipéptido BMP-11 compreende uma sequência aminoacídica codificada por uma sequência de DNA escolhida a partir de:

(a) nucleótidos 375 ou 390 a 701 da SEQ ID No. 1;

(b) nucleótidos 760 ou 775 a 1 086 da SEQ ID No. 10;

(c) sequências de DNA que codificam a mesma sequência aminoacídica que as sequências de DNA de (a) ou (b);

(d) variações alélicas que ocorrem naturalmente da sequência de DNA de (a) ou (b) que codificam um polipéptido possuindo actividade de BMP-11; e

(e) sequências de DNA que hibridam sob condições restringentes com as sequências de DNA de (a), (b) ou (c) e que codificam um polipéptido possuindo actividade de BMP-11.

3. Processo da reivindicação 1, em que o polipéptido BMP-11 compreende uma sequência aminoacídica escolhida a partir de:

(a) sequência aminoacídica do aminoácido 1 ao 108 da SEQ ID No. 11;

(b) sequência aminoacídica do aminoácido 7 ao 108 da SEQ ID No. 11;

(c) sequência aminoacídica do aminoácido 1 ao 109 da SEQ ID No. 11; e

(d) sequência aminoacídica do aminoácido 6 ao 109 da SEQ ID No. 11.

4. Utilização de um polipéptido BMP-11 na preparação de um medicamento para o tratamento de uma condição, em que a referida condição é caracterizada por um decréscimo na sobrevivência neuronal, e em que o polipéptido BMP-11 compreende uma sequência aminoacídica codificada por uma sequência de DNA escolhida a partir de:

(a) sequências de DNA compreendendo os nucleótidos 375 ou 390 a 701 da SEQ ID No. 1;

(b) sequências de DNA compreendendo os nucleótidos 760 ou 775 a 1 086 da SEQ ID No. 10;

(c) sequências de DNA que codificam a mesma sequência de aminoácido que as sequências de DNA de (a) ou (b);

(d) variações alélicas que ocorrem naturalmente da sequência de DNA de (a) ou (b) que codificam um polipéptido possuindo actividade de BMP-11; e

(e) sequências de DNA que hibridam sob condições

restringentes com as sequências de DNA de (a), (b) ou (c) e codificam um polipéptido possuindo actividade de BMP-11.

5. Utilização de um polipéptido BMP-11 na preparação de um medicamento para aumentar a sobrevivência neuronal num tratamento de transplante, em que o polipéptido BMP-11 compreende uma sequência aminoacídica codificada por uma sequência de DNA escolhida a partir de:

(a) sequências de DNA compreendendo os nucleótidos 375 ou 390 a 701 da SEQ ID No. 1;

(b) sequências de DNA compreendendo os nucleótidos 760 ou 775 a 1 086 da SEQ ID No. 10;

(c) sequências de DNA que codificam a mesma sequência de aminoácido que as sequências de DNA de (a) ou (b);

(d) variações alélicas que ocorrem naturalmente da sequência de DNA de (a) ou (b) que codificam um polipéptido possuindo actividade de BMP-11; e

(e) sequências de DNA que hibridam sob condições restringentes com as sequências de DNA de (a), (b) ou (c) e codificam um polipéptido possuindo actividade de BMP-11.

6. Utilização de qualquer das reivindicações 4 ou 5, em que o polipéptido BMP-11 compreende uma sequência aminoacídica codificada por um DNA escolhido a partir de:

(a) nucleótidos 375 ou 390 a 701 da SEQ ID No. 1;

(b) nucleótidos 760 ou 775 a 1 086 da SEQ ID No. 10; e

(c) sequências de DNA que codificam a mesma sequência aminoacídica que as sequências de DNA de (a) ou (b).

7. Utilização das reivindicações 4 ou 5, em que o polipéptido BMP-11 é um dímero.

8. Polipéptido BMP-11 compreendendo uma sequência aminoacídica escolhida a partir de:

(a) sequência aminoacídica do aminoácido 1 ao 108 da SEQ ID No. 11; e

(b) sequência aminoacídica do aminoácido 7 ao 108 da SEQ ID No. 11.

9. Polipéptido BMP-11 compreendendo um homodímero de duas subunidades polipeptídicas, compreendendo cada subunidade os aminoácidos 7 a 108 da SEQ ID No. 11.

10. Polipéptido BMP-11 compreendendo uma sequência aminoacídica codificada por uma sequência de DNA escolhida a partir de:

a) nucleótidos 375 ou 390 a 701 da SEQ ID No. 1;

b) nucleótidos 760 ou 775 a 1 086 da SEQ ID No. 10; e

c) sequências alélicas que ocorrem naturalmente e sequências equivalentes de codão degenerativas de (a) ou (b)

para utilização como um medicamento.

11. Polipéptido BMP-11 compreendendo uma sequência aminoacídica escolhida a partir de:

(a) sequência aminoacídica de -17 a -1 da SEQ ID No. 2;

(b) sequência aminoacídica de -253 a -1 da SEQ ID No. 11;

(c) sequência aminoacídica codificada pela sequência dos nucleótidos 1 ao 759 da SEQ ID No. 10;

(d) sequência aminoacídica codificada por sequências alélicas que ocorrem naturalmente e sequências

equivalentes de codão degenerativas da sequência nucleotídica de (c); e

(e) sequência aminoacídica codificada por uma sequência de DNA que hibrida sob condições restringentes com a sequência nucleotídica de (c) e codifica um polipéptido com actividade de BMP-11.

12. Polipéptido BMP-11 compreendendo uma sequência aminoacídica escolhida a partir de:

(a) sequência aminoacídica de -17 a -1 da SEQ ID No. 2;

(b) sequência aminoacídica de -253 a -1 da SEQ ID No. 11;

(c) sequência aminoacídica codificada pela sequência dos nucleótidos 1 ao 759 da SEQ ID No. 10;

(d) sequência aminoacídica codificada por sequências alélicas que ocorrem naturalmente e sequências equivalentes de codão degenerativas da sequência nucleotídica de (c); e

(e) sequência aminoacídica codificada por uma sequência de DNA que hibrida sob condições restringentes com a sequência nucleotídica de (c) e codifica um polipéptido com actividade de BMP-11.

13. Polipéptido BMP-11 de quaisquer das reivindicações 8 a 12, para utilização como um medicamento.

14. Composição farmacêutica compreendendo o polipéptido BMP-11 da reivindicação 13.

15. Composição farmacêutica compreendendo uma proteína BMP-11 codificada por uma sequência de DNA escolhida a partir do grupo constituído por:

(a) sequências de DNA compreendendo os nucleótidos 375 ou 390 a 701 da SEQ ID No. 1;

(b) sequências de DNA compreendendo os nucleótidos 760 ou 775 a 1 086 da SEQ ID No. 10;

(c) sequências de DNA que codificam os aminoácidos 1 ou 6 a 109 da ID No. 2;

(d) sequências de DNA que codificam os aminoácidos 1 ou 6 a 109 da ID No. 11;

(e) sequências de DNA compreendendo sequências alélicas que ocorrem naturalmente e sequências de codão degenerativas de quaisquer de (a) a (d); e

(f) sequências de DNA que hibridam sob condições

restringentes com as sequências de DNA de quaisquer de (a) a (e) e que codificam um polipéptido possuindo actividade de BMP-11, em que a actividade de BMP-11 é escolhida de entre regulação da produção de hormona folículo-estimulante, promoção de sobrevivência celular neuronal, estimulação de hematopoiese e supressão do desenvolvimento de tumores nas gónadas.

16. Composição farmacêutica da reivindicação 15, em que a referida sequência de DNA compreende ainda uma segunda sequência de DNA que codifica uma propéptido 5' adequado e ligado em fase com a referida sequência de DNA.

17. Composição farmacêutica da reivindicação 16, em que o propéptido é de um membro da superfamília de proteínas TGF-β.

18. Composição farmacêutica de quaisquer das reivindicações 14 a 17 compreendendo adicionalmente pelo menos uma proteína morfogenética de osso.

19. Utilização da composição farmacêutica de quaisquer das reivindicações 14 a 18 para a preparação de uma composição farmacêutica para a regulação da produção da hormona folículo-estimulante para contracepção ou para o tratamento de defeitos do osso e/ou cartilagem, doença periodontal ou feridas.

Lisboa, 30 de Novembro de 2006