



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0712496-1 A2**

(22) Data de Depósito: 01/06/2007
(43) Data da Publicação: 25/09/2012
(RPI 2177)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 1/22
C07K 17/02
G01N 33/543
A61K 38/18
C07K 14/495
C07K 14/51

(54) Título: PEPTÍDEO ISOLADO, COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO O REFERIDO PEPTÍDEO, ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADO E MÉTODOS DE PURIFICAR UMA PROTEÍNA NA SUPERFAMÍLIA DO FATOR BETA DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO (TGF-?) E DE ESTABILIZAR UMA SOLUÇÃO CONTENDO UMA PROTEÍNA NA SUPERFAMÍLIA TGF-B.

(57) Resumo: PEPTÍDEO ISOLADO, COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO O REFERIDO PEPTÍDEO, ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADO E MÉTODOS DE PURIFICAR UMA PROTEÍNA NA SUPERFAMÍLIA DO FATOR BETA DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO (TGF-B) E DE ESTABILIZAR UMA SOLUÇÃO CONTENDO UMA PROTEÍNA NA SUPERFAMÍLIA TGF-B. A presente invenção refere-se a membros da superfamília de TGF-B e fragmentos de peptídeo baseados nas proteínas membro que são empregados para purificar soluções contendo proteínas membro ou como terapêuticos.

(30) Prioridade Unionista: 02/06/2006 US 60/810,798

(73) Titular(es): Wyeth

(72) Inventor(es): Christopher Todd Brown, Emily Sheng-Ming Shen, Jimin Zhang, Paul John Yaworsky, Stephane H. Olland, Wei Liu, Zhijian Lu

(74) Procurador(es): Dannemann , Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007013053 de 01/06/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/143161 de 13/12/2007

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "PEPTÍDEO ISOLADO, COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO O REFERIDO PEPTÍDEO, ÁCIDO NUCLEÍCO ISOLADO E MÉTODOS DE PURIFICAR UMA PROTEÍNA NA SUPERFAMÍLIA DO FATOR BETA DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO (TGF-B) E DE ESTABILIZAR UMA SOLUÇÃO CONTENDO UMA PROTEÍNA NA SUPERFAMÍLIA TGF-B".

Referência cruzada a pedidos relacionados

Este pedido reivindica prioridade para o Pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos número 60/810.798, depositado em 2 de junho de 2006, que está incorporado por meio deste por referência na sua totalidade.

Campo da invenção

A presente de invenção refere-se ao uso de peptídeos e proteínas da superfamília de TGF- β e seus mutantes.

Antecedentes da invenção

Reguladores naturais do crescimento, diferenciação e função celular forneceram importantes ferramentas farmacêuticas, clínicas e laboratoriais e alvos para a intervenção terapêutica. Uma variedade de tais reguladores foi mostrada ter profundos efeitos sobre as vias básicas de diferenciação celular e desenvolvimento. A superfamília do fator de crescimento transformante beta (TGF- β) é uma grande família de proteínas multifuncionais que regulam uma variedade de funções celulares incluindo a proliferação, migração, diferenciação celular e apoptose. TGF- β , o membro fundador, foi mostrado desempenhar uma variedade de papéis que variam desde a formação de padrão embrionário a regulação do crescimento celular em tecidos adultos. O TGF- β exerce suas funções biológicas por cascatas de transdução de sinal que por sua vez ativam e/ou suprimem a expressão de um grupo de genes específicos. Outros membros da superfamília de TGF- β incluem a família de TGF- β , fatores de diferenciação do crescimento (GDFs), activinas, inibinas, Proteínas Morfogênicas Ósseas (BMPs) e outros ligante relacionados. A transdução de sinal mediada por BMP é importante para uma variedade de processos normais, incluindo crescimento ósseo e a função do sistema nervoso, olhos e órgãos tais como os rins. BMPs têm diversas atividades biológicas em diferentes contextos biológicos, incluindo a indução de cartilagem, osso e tecido conjuntivo, e papéis nos rins, dentes, intestinos, pele e desenvolvimento de pêlos.

BMPs podem ser produzidas em laboratório, entretanto, há poucos procedimentos convenientes para a purificação desses materiais e o desenvolvimento de métodos de purificação tem sido frequentemente assis-
temático e demorado, com processos de purificação algumas vezes levando
5 até 6 meses para se desenvolver. Conseqüentemente é desejado ter méto-
dos mais eficazes para purificar BMPs e outros membros da superfamília de
TGF- β .

Definições

Conforme usado neste documento, e nas reivindicações ane-
10 xas, as formas no singular "um", "uma", e "o(a)" incluem a referência no plu-
ral a menos que o contexto claramente indique de outra forma. Desta forma,
por exemplo, uma referência a "uma célula" inclui uma pluralidade de tais
células, e uma referência a "um anticorpo" é uma referência a um ou mais
anticorpos e equivalentes destes conhecidos daqueles versados na técnica,
15 e assim em diante.

Os termos "polinucleotídeo", "sequência de nucleotídeo", "ácido
nucleico", "molécula de ácido nucleico", "sequência de ácido nucleico", e
"oligonucleotídeo" se refere a uma série de bases de nucleotídeos (também
chamados "nucleotídeos") no DNA e RNA, e significam qualquer cadeia de
20 dois ou mais nucleotídeos. Os polinucleotídeos podem ser misturas quiméri-
cas ou derivados ou versões modificadas destes, de fita simples ou fita du-
pla. O oligonucleotídeo pode ser modificado na porção da base, porção de
açúcar, ou esqueleto de fosfato, por exemplo, para melhorar a estabilidade
da molécula, seus parâmetros de hibridização, etc. O oligonucleotídeo anti-
25 senso pode compreender uma porção de base modificada que é selecionada
do grupo que inclui mas não é limitado a 5-fluorouracila, 5-bromouracila, 5-
clorouracila, 5-iodouracila, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-
(carboxiidroxilmetil)uracila, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-
carboximetilaminometiluracila, diidrouacila, beta-D-galactosilqueosina, ino-
30 sina, N-6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-
dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5- metilcito-
sina, N-6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracila, 5- metoxiami-

nometil-2-tiouracila, beta-D-manosilqueosina, 5'- metoxicarboximetiluracila, 5-metoxiuracila, 2-metiltio-N-6-isopenteniladenina, vibutoxosina, pseudouracila, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-, tiouracila, 2-tiouracila, 4-tiouracila, 5-metiluracila, metiléster de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, 5 5-metil-2-tiouracila, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracila, e 2,6-diaminopurina. Uma sequência de nucleotídeo carrega tipicamente informação genética, incluindo a informação usada pelo maquinário celular para fazer proteínas e enzimas. Estes termos incluem polinucleotídeos genômicos de fita dupla, de fita simples e cDNA, RNA e qualquer polinucleotídeo sintético e manipulado geneticamente, e ambos os polinucleotídeos senso e antissenso. Isto inclui moléculas de fita simples e de dupla fita, isto é, híbridos de DNA-DNA, DNA-RNA e RNA-RNA, assim como "ácidos peptídeo nucleicos" (PNA) formados por conjugar bases a um esqueleto de aminoácido. Isto também inclui ácidos nucleicos que contêm bases modificadas, por exemplo, 15 tio-uracila, tio-guanina, e flúor-uracila, ou que contêm carboidrato, ou lipídios.

Polinucleotídeos para uso com modalidades da invenção podem ser sintetizados por métodos padrão conhecidos na técnica, por exemplo, pelo uso de um sintetizador de DNA automático (tais como aqueles que são comercialmente disponíveis por Biosearch, Applied Biosystems, etc.). 20 Como exemplos, oligonucleotídeos de fosforotioato podem ser sintetizados pelo método de Stein *et al*, Nucl. Acids Res., 16, 3209, (1988), oligonucleotídeos de metilfosfonato podem ser preparados pelo uso de suportes de vidro de poro controlado (Sarin *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 7448-7451, (1988), etc. Vários métodos foram desenvolvidos para liberar DNA ou RNA 25 às células, por exemplo, moléculas antissenso podem ser injetadas diretamente no local do tecido, ou moléculas antissenso modificadas, desenhadas para atingir as células desejadas (antissenso ligado a peptídeos ou anticorpos que se ligam especificamente aos receptores ou antígenos expressos sobre a superfície da célula alvo) podem ser administradas sistemicamente. 30 Alternativamente, moléculas de RNA podem ser geradas por transcrição *in vitro* ou *in vivo* de sequências de DNA que codificam a molécula de RNA antissenso. Tais sequências de DNA antissenso podem ser incorporadas em

uma grande variedade de vetores que incorporam promotores de RNA polimerase antissenso tais como os promotores de polimerase T7 ou SP6. Alternativamente, construtos de cDNA antissenso que sintetizam RNA antissenso constitutivamente ou de forma induzível, dependendo do promotor usado, podem ser introduzidos de forma estável em linhagens celulares. Entretanto, frequentemente é difícil se obter concentrações intracelulares suficientes do antissenso para suprimir a tradução de mRNAs endógenos. Portanto uma abordagem preferida utiliza um construto de DNA recombinante no qual o oligonucleotídeo antissenso é colocado sob o controle de um promotor forte. O uso de tal construto para transfectar células alvo no paciente resultará na transcrição de quantidades suficientes de RNAs fita simples que formarão pares de bases complementares com os transcritos de genes alvo endógenos e assim impedem a tradução do mRNA do gene alvo. Por exemplo, um vetor pode ser introduzido *in vivo* tal que ele é absorvido por uma célula e direciona a transcrição de um RNA antissenso. Tal vetor pode permanecer epissômico ou pode se tornar integrado cromossomicamente, contando que ele possa ser transcrito para produzir o RNA antissenso desejado. Tais vetores podem ser construídos por métodos de tecnologia de DNA recombinante padronizados na técnica. Os vetores podem ser de plasmídeo, virais, ou outros conhecidos na técnica, usados para replicação e expressão em células de mamífero. A expressão da sequência que codifica o RNA antissenso pode ser por qualquer promotor conhecido na técnica por agir em células de mamífero, preferivelmente humanas. Tais promotores podem ser induzíveis ou constitutivos. Tais promotores incluem mas não são limitados a: a região do promotor precoce de SV40 (Bernoist & Chambon, *Nature*, 290, 304-310, (1981)), o promotor contido na repetição 3' longa do vírus do Sarcoma de Rous, Yamamoto *et al.*, *Cell*, 22, 787-797, (1980), o promotor da timidina quinase de herpes, Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 1441-1445, (1981), as sequências regulatórias do gene de metalotioneína (Brinster *et al.*, *Nature* 296, 39-42, (1982)), etc. Qualquer tipo de plasmídeo, cosmídeo, cromossomo artificial de levedura ou vetor viral pode ser usado para preparar o construto de DNA recombinante e pode ser introduzido di-

retamente no local do tecido. Alternativamente, vetores virais podem ser usados, os quais infetam seletivamente o tecido desejado, em cujo caso, a administração pode ser obtida por outra via (por exemplo, sistemicamente).

Os polinucleotídeos podem ser flanqueados por sequências regulatórias naturais (controle de expressão), ou podem estar associados com sequências heterólogas, incluindo promotores, sítios de entrada de ribossomo internos (IRES) e outras sequências de sítios de ligação de ribossomo, intensificadores, elementos de resposta, supressores, sequências de sinal, sequências de poliadenilação, íntrons, regiões não-codificantes 5' e 3' e similares. Os ácidos nucleicos também podem ser modificados por vários meios conhecidos na técnica. Exemplos não limitantes de tais modificações incluem metilação, "caps", substituição de um ou mais dos nucleotídeos de ocorrência natural por um análogo, e modificações internucleotídicas tais como, por exemplo, aquelas com ligações não-carregadas (por exemplo, fosfonatos de metila, fosfotriésteres, fosforoamidatos, carbamatos, etc.). Os polinucleotídeos podem conter uma ou mais porções adicionais ligadas covalentemente, tais como, por exemplo, proteínas (por exemplo, nucleases, psoraleno, etc.), quelantes (por exemplo, metais, metais radioativos, ferro, metais oxidativos, etc.), e alquilantes. Os polinucleotídeos podem ser derivatizados pela formação de uma ligação de fosfotriéster de metila ou etila ou fosforamidato de alquila. Além disso, os polinucleotídeos aqui contidos também podem ser modificados com um marcador capaz de fornecer um sinal detectável, tanto diretamente quanto indiretamente. Marcadores exemplares incluem radioisótopos, moléculas fluorescentes, biotina, e similares.

"Identidade" ou "similaridade", conforme conhecido na técnica, são relações entre duas ou mais sequências de polipeptídeo ou duas ou mais sequências de polinucleotídeo conforme determinado por comparar as sequências. Na técnica, identidade também significa o grau de relação das sequências entre as sequências de polipeptídeo conforme determinado pelo pareamento entre fitas de tais sequências. Tanto a identidade como a similaridade podem ser facilmente calculadas por métodos conhecidos tais como aqueles descritos em: Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed.,

Oxford University Press, Nova Iorque, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nova Iorque, 1993; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A. M., & Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nova Jersey, 1994; e Sequence Analysis Primer, Gribkov, M. & Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nova Iorque, 1991. Métodos comumente empregados para determinar a identidade ou a similaridade entre as sequências incluem, mas não são limitados àqueles descritos em Carillo, H., & Lipman, D., SIAM J Applied Math., 48:1073 (1988). Métodos para determinar a identidade e a similaridade são codificados em programas de computador disponíveis publicamente. Métodos de programas de computador preferidos para determinar a identidade e a similaridade entre duas sequências incluem, mas não são limitados, ao pacote de programas GCG, Devereux, J., *et al.*, Nucleic Acids Research, 12(1), 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, e FASTA Atschul, S. F. *et al.*, J Molec. Biol., 215, 403 (1990)).

"Homólogo" refere-se ao grau de similaridade de sequência entre dois polímeros (isto é, sequências de polipeptídeo ou moléculas de ácido nucleico). As estatísticas de porcentagem de homologia referidas aqui refletem a homologia máxima possível entre os dois polímeros, isto é, a porcentagem de homologia quando os dois polímeros são alinhados a fim de ter o maior número de posições pareadas (homólogas).

O termo "porcentual de homologia" refere-se à extensão de identidade de sequência de aminoácido entre os polipeptídeos. A homologia entre quaisquer dois polipeptídeos é uma função direta do número total de aminoácidos pareados em uma dada posição em qualquer sequência, por exemplo, se metade do número total de aminoácidos em qualquer uma das sequências são iguais então as duas sequências são ditas exibir 50% de homologia.

O termo "fragmento", "análogo" e "derivado" quando se referindo a polipeptídeos refere-se a um polipeptídeo que pode reter essencialmente a mesma função ou atividade biológica que o polipeptídeo original. Desta

forma, um análogo pode incluir uma proteína precursora que pode ser ativada por clivagem de uma porção da proteína precursora para produzir um polipeptídeo maduro ativo. O fragmento, análogo, ou derivado do polipeptídeo pode ser um no qual um ou mais dos aminoácidos são substituídos por resíduos de aminoácido conservados ou não-conservados e tais resíduos de aminoácido podem ou não ser os codificados pelo código genético, ou aqueles nos quais um ou mais dos resíduos de aminoácido incluem um grupo substituinte, ou aqueles nos quais o polipeptídeo é fundido com um composto tal como polietileno glicol para aumentar a meia-vida do polipeptídeo, ou aqueles nos quais aminoácidos adicionais são fundidos ao polipeptídeo tal como um peptídeo de sinal ou uma sequência tal como um sinalizador de poliistidina que é empregada para a purificação do polipeptídeo ou da proteína precursora. Tais fragmentos, análogos ou derivados são considerados estar dentro do escopo da presente invenção.

O termo "polipeptídeo" refere-se a um polímero de aminoácidos sem relação com a extensão do polímero; desta forma, "peptídeos", "oligopeptídeos", e "proteínas" estão incluídas dentro da definição de polipeptídeo e usadas intercambiavelmente neste documento. Este termo também não especifica ou exclui modificações químicas ou de pós-expressão dos polipeptídeos da invenção, embora modificações químicas e de pós-expressão destes polipeptídeos possam ser incluídas ou excluídas como modalidades específicas. Portanto, por exemplo, modificações a polipeptídeos que incluem a ligação covalente de grupos glicosila, grupos acetila, grupos fosfato, grupos de lipídio, e similares são expressamente abrangidas pelo termo polipeptídeo. Além disso, polipeptídeos com estas modificações podem ser especificados como espécies individuais a serem incluídas ou excluídas da presente invenção. As modificações naturais ou outras modificações químicas, tais como aquelas listadas nos exemplos acima podem ocorrer em qualquer local em um polipeptídeo, incluindo no arcabouço do peptídeo, nas cadeias laterais dos aminoácidos, e nas terminações amino ou carboxila. Será apreciado que o mesmo tipo de modificação pode estar presente no mesmo grau ou em graus variados em vários locais em um dado polipeptí-

deo. Ainda, um dado polipeptídeo pode conter vários tipos de modificações. Os polipeptídeos podem ser ramificados, por exemplo, como um resultado de ubiquitinação, e eles podem ser cíclicos, com ou ramificações. As modificações incluem acetilação, acilação, ADP-ribosilação, amidação, ligação covalente de flavina, ligação covalente de uma porção heme, ligação covalente de um nucleotídeo ou derivado de nucleotídeo, ligação covalente de um lipídio ou de um derivado de lipídio, ligação covalente de fosfatidilinositol, reticulação, ciclização, formação de ligação de dissulfeto, desmetilação, formação de reticulações covalentes, formação de cisteína, formação de piroglutamato, formilação, gama-carboxilação, glicosilação, formação de âncora de GPI, hidroxilação, iodinação, metilação, miristoilação, oxidação, peguilação, processamento proteolítico, fosforilação, prenilação, racemização, selenoilação, sulfatação, adição de aminoácidos a proteínas mediada por RNA de transferência tal como arginilação, e ubiquitinação (vide, por exemplo, proteins - structure and molecular properties, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman & Company, Nova Iorque (1993); Posttranslational Covalent Modification of Proteins, b. c. Johnson, Ed., Academic Press, Nova Iorque, pgs. 1-12, 1983; Seifter *et al.*, Meth Enzymol 182:626-646, 1990; Rattan *et al.*, Ann NY Acad Sci 663:48-62, 1992). Também incluídos dentro da definição estão polipeptídeos que contêm um ou mais análogos de um aminoácido (incluindo, por exemplo, aminoácidos que não ocorrem naturalmente, aminoácidos que ocorrem naturalmente apenas em um sistema biológico não relacionado, aminoácidos modificados de sistemas de mamíferos, estereoisômeros de vários aminoácidos, etc.), polipeptídeos com ligações substituídas, assim como outras modificações conhecidas na técnica, tanto de ocorrência natural como não-natural. O termo "polipeptídeo" também pode ser usado intercambiavelmente com o termo "proteína" ou "peptídeo".

O termo "análogo de peptídeo *finger-1*" refere-se a um oligopeptídeo que é pelo menos 75% homólogo a uma porção da região *finger-1* de um membro da superfamília de TGF-beta. Em algumas modalidades, o análogo de peptídeo *finger-1* é pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% homólogo à sequência selvagem. Em certas

modalidades, o oligopeptídeo inclui pelo menos 8 resíduos de aminoácido, pelo menos 16 resíduos de aminoácido, ou pelo menos 24 resíduos de aminoácido. Análogos de peptídeo *finger-1* podem ser mutantes nos quais um ou mais aminoácidos foram alterados ou deletados e podem incluir resíduos de aminoácidos não-naturais ou modificados.

O termo "peptídeo" refere-se a qualquer polímero de dois ou mais aminoácidos, em que cada aminoácido é ligado a um ou dois outros aminoácidos através de uma ligação peptídica (--CONH--) formada entre os grupos NH₂ e COOH de aminoácidos adjacentes. Em uma modalidade, os aminoácidos são aminoácidos que ocorrem naturalmente, particularmente alfa-aminoácidos da forma enantiomérica L. Entretanto, outros aminoácidos, formas enantioméricas, e derivados de aminoácido podem ser incluídos em um peptídeo. Peptídeos incluem "polipeptídeos", que por hidrólise, geram mais do que dois aminoácidos. Os polipeptídeos podem incluir proteínas, que compreendem tipicamente 50 ou mais aminoácidos.

Os polipeptídeos de acordo com modalidades da presente invenção podem ser fornecidos em uma forma isolada, e podem ser purificados até a homogeneidade. Os polipeptídeos e polinucleotídeos em certos casos são pelo menos 90% puros, pelo menos 95% puros, pelo menos 98% puros ou pelo menos 99% puros.

O termo "polipeptídeo" refere-se a um polímero de aminoácidos sem relação com a extensão do polímero; desta forma, "peptídeos", "oligopeptídeos" e "proteínas" estão incluídos dentro da definição de polipeptídeo e são usados intercambiavelmente neste documento. Este termo também não especifica ou exclui modificações químicas ou de pós-expressão dos polipeptídeos da invenção, embora modificações químicas e de pós-expressão destes polipeptídeos possam ser incluídas ou excluídas como modalidades específicas. Portanto, por exemplo, modificações a polipeptídeos que incluem a ligação covalente de grupos glicosila, grupos acetila, grupos fosfato, grupos de lipídio, e similares são expressamente abrangidas pelo termo polipeptídeo. Além disso, polipeptídeos com estas modificações podem ser especificados como espécies individuais a serem incluídas ou

excluídas da presente invenção. As modificações naturais ou outras modificações químicas, tais como aquelas listadas nos exemplos acima podem ocorrer em qualquer local em um polipeptídeo, incluindo no arcabouço do peptídeo, nas cadeias laterais dos aminoácidos, e nas terminações amino ou carboxila. Será apreciado que o mesmo tipo de modificação pode estar presente no mesmo grau ou em graus variados em vários locais em um dado polipeptídeo. Ainda, um dado polipeptídeo pode conter vários tipos de modificações. Os polipeptídeos podem ser ramificados, por exemplo, como um resultado de ubiquitinação, e eles podem ser cíclicos, com ou sem ramificações.

As modificações incluem acetilação, acilação, ADP-ribosilação, amidação, ligação covalente de flavina, ligação covalente de uma porção heme, ligação covalente de um nucleotídeo ou derivado de nucleotídeo, ligação covalente de um lipídio ou de um derivado de lipídio, ligação covalente de fosfatidilinositol, reticulação, ciclização, formação de ligação de dissulfeto, desmetilação, formação de reticulações covalentes, formação de cisteína, formação de piroglutamato, formilação, gama-carboxilação, glicosilação, formação de âncora de GPI, hidroxilação, iodinação, metilação, miristoilação, oxidação, pegulação, processamento proteolítico, fosforilação, prenilação, racemização, selenoilação, sulfatação, adição de aminoácidos a proteínas mediada por RNA de transferência tal como arginilação, e ubiquitinação (vide, por exemplo, proteins - structure and molecular properties, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman & Company, Nova Iorque (1993); Posttranslational Covalent Modification of Proteins, b. c. Johnson, Ed., Academic Press, Nova Iorque, pgs. 1-12, 1983; Seifter *et al.*, Meth Enzymol 182:626-646, 1990; Rattan *et al.*, Ann NY Acad Sci 663:48-62, 1992). Também incluídos dentro da definição estão polipeptídeos que contêm um ou mais análogos de um aminoácido (incluindo, por exemplo, aminoácidos que não ocorrem naturalmente, aminoácidos que ocorrem naturalmente apenas em um sistema biológico não relacionado, aminoácidos modificados de sistemas de mamíferos, etc.), polipeptídeos com ligações substituídas, assim como outras modificações conhecidas na técnica, tanto de ocorrência natural como não-natural. O termo "polipeptídeo" também pode ser usado intercambiavelmente com o termo

"proteína" ou "peptídeo".

O termo "peptídeo" refere-se a qualquer polímero de dois ou mais aminoácidos, em que cada aminoácido é ligado a um ou dois outros aminoácidos através de uma ligação peptídica (--CONH--) formada entre os grupos NH_2 e COOH de aminoácidos adjacentes. Preferivelmente, os aminoácidos são aminoácidos que ocorrem naturalmente, particularmente alfa-aminoácidos da forma enantiomérica L. Entretanto, outros aminoácidos, formas enantioméricas, e derivados de aminoácido podem ser incluídos em um peptídeo. Peptídeos incluem "polipeptídeos", que por hidrólise, geram mais do que dois aminoácidos. Os polipeptídeos podem incluir proteínas, que compreendem tipicamente 50 ou mais aminoácidos.

O termo "isolado" significa que o material é removido de seu ambiente original ou nativo (por exemplo, o ambiente natural se ele for de ocorrência natural). Portanto, um polipeptídeo que ocorre naturalmente presente em um animal vivo não está isolado, mas o mesmo polipeptídeo, separado por intervenção humana de algum ou todos os materiais coexistentes no sistema natural, é isolado. Polipeptídeos poderiam ser parte de uma composição, e ainda serem isolados em que tal vetor ou composição não é parte do ambiente no qual ele é encontrado na natureza. De forma similar, o termo "substancialmente purificado" refere-se a uma substância, que foi separada ou removida de outra forma, através de intervenção humana, do ambiente químico imediato no qual ela ocorre na natureza. Polipeptídeos substancialmente purificados podem ser obtidos ou produzidos por qualquer uma de várias técnicas e procedimentos geralmente conhecidos no campo.

O termo "purificação" refere-se ao aumento da atividade específica ou concentrado de um polipeptídeo ou polipeptídeos particulares em uma amostra. Em uma modalidade, a atividade específica é expressa como a razão entre a atividade do polipeptídeo alvo e a concentração do polipeptídeo total na amostra. Em outra modalidade, a atividade específica é expressa como a razão entre a concentração do polipeptídeo alvo e a concentração do polipeptídeo total. Métodos de purificação incluem, mas não são limitados a diálise, centrifugação, e técnicas de cromatografia em coluna, que são

procedimentos bem-conhecidos daqueles versados na técnica. Vide por exemplo, Young *et al.*, 1997, "Production of biopharmaceutical proteins in the milk of transgenic dairy animals," *BioPharm* 10(6): 34-38.

"Associado com": Quando uma entidade está "associada com" a outra conforme descrito aqui, elas estão ligadas por uma interação covalente ou não-covalente direta ou indireta. Preferivelmente, a associação é covalente. Interações não-covalentes desejáveis incluem ligação de hidrogênio, interações de van der Waals, interações hidrofóbicas, interações magnéticas, interações eletrostáticas, etc.

O termo "isolado" significa que o material é removido de seu ambiente original ou nativo (por exemplo, o ambiente natural se ele for de ocorrência natural). Portanto, um polipeptídeo que ocorre naturalmente presente em um animal vivo não está isolado, mas o mesmo polinucleotídeo ou polipeptídeo separado por intervenção humana de algum ou todos os materiais coexistentes no sistema natural, é isolado. Por exemplo, um "fragmento de ácido nucleico isolado" é um polímero de RNA ou DNA que é de fita simples ou de dupla fita, opcionalmente contendo bases de nucleotídeos sintéticas, não-naturais ou alteradas. Um fragmento de ácido nucleico isolado na forma de um polímero de DNA por ser compreendido de um ou mais segmentos de cDNA, DNA genômico, ou DNA sintético e combinado com carboidrato, lipídio, proteína ou outros materiais. Tais polinucleotídeos poderiam ser parte de um vetor e/ou tais polinucleotídeos ou polipeptídeos poderiam ser parte de uma composição, e ainda serem isolados em que tal vetor ou composição não é parte do ambiente no qual ele é encontrado na natureza. De forma similar, o termo "substancialmente purificado" refere-se a uma substância, que foi separada ou removida de outra forma, através de intervenção humana, do ambiente químico imediato no qual ela ocorre na natureza. Polipeptídeos ou ácidos nucleicos substancialmente purificados podem ser obtidos ou produzidos por qualquer uma de várias técnicas e procedimentos geralmente conhecidos no campo.

Os termos "substancialmente puro" e "isolado" não são pretendidos para excluir misturas de polipeptídeos com substâncias que não estão

associadas com os polipeptídeos na natureza.

Métodos gerais para expressar e recuperar a proteína estranha produzida por um sistema de célula de mamífero são fornecidos por exemplo, por Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture," em *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland *et al.* (eds.), página 163 (Wiley-Liss, Inc. 1996). Técnicas usuais para recuperar a proteína produzida por um sistema bacteriano são fornecidas por exemplo, por Grisshammer *et al.*, "Purification of over-produced proteins from *E. coli* cells," em *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2ª edição, Glover *et al.* (eds.), páginas 59 a 92 (Oxford University Press 1995). A transformação de células de inseto e a produção de polipeptídeos estranhos nelas são descritas por Guarino *et al.*, US5162222 e publicação WIPO WO94/06463. Métodos para isolar proteínas recombinantes de um sistema de baculovírus também são descritos por Richardson (ed.), "Baculovirus Expression Protocols" (The Humana Press, Inc. 1995). Em uma modalidade, os polipeptídeos da invenção podem ser expressos usando um sistema de expressão de baculovírus (vide, Luckow *et al.*, *Bio/Technology*, 1988, 6, 47, "Baculovirus Expression Vectors: a Laboratory Manual", O'Rielly *et al.* (Eds.), W. H. Freeman & Company, Nova Iorque, 1992, US 4.879,236, cada um dos quais está incorporado por meio deste por referência na sua totalidade). Além disso, o sistema de expressão de baculovírus completo MAXBAC™ (Invitrogen) pode, por exemplo, ser usado para produção em células de inseto.

Os polipeptídeos de acordo com várias modalidades da presente invenção também podem ser isolados pela utilização propriedades particulares. Por exemplo, cromatografia de adsorção de íon de metal imobilizado (IMAC) pode ser usada para purificar proteínas ricas em histidina, incluindo as que compreendem sinalizadores de poli-histidina. Resumidamente, um gel é primeiro aplicado com íons de metal divalente para formar um quelato (Sulkowski, *Trends in Biochem.* 3: 1 (1985)). Proteínas ricas em histidina serão adsorvidas a esta matriz com diferentes afinidades, dependendo do íon de metal usado e serão eluídas por eluição competitiva, redução do pH, ou uso de agentes quelantes fortes. Outros métodos de purificação incluem

a purificação de proteínas glicosiladas por cromatografia de afinidade de lectina, e cromatografia de troca de íon (M. Deutscher, (ed.), Meth. Enzymol. 182:529 (1990)). Dentro de modalidades adicionais da invenção, uma fusão do polipeptídeo de interesse e um sinalizador de afinidade (por exemplo, proteína de ligação a maltose, um domínio de imunoglobulina) pode ser construída para facilitar a purificação.

O termo "*in vitro*" se refere a um ambiente artificial e às reações ou aos processos que ocorrem dentro de um ambiente artificial. Ambientes *in vitro* incluem, mas não são limitados a, tubos de teste e culturas celulares.

O termo "*in vivo*" se refere ao caráter observável de uma célula ou de um organismo. Tal caráter observável pode envolver a aparência física, assim como uma quantidade de composições fisiológicas particulares presentes na célula ou no organismo.

O termo "via de transdução de sinal" refere-se a moléculas que propagam um sinal extracelular através da membrana celular para se tornar um sinal intracelular. Este sinal pode então estimular uma resposta celular. As moléculas de polipeptídeo envolvidas em processos de transdução de sinal podem ser proteínas tirosina quinases receptoras e não-receptoras.

"Receptor" refere-se a uma estrutura molecular dentro de uma célula ou sobre a superfície da célula que é geralmente caracterizada pela ligação seletiva de uma substância específica.

Os termos "composto" ou "agente" são usados neste documento de forma intercambiável para se referir a um composto ou compostos ou composição de matéria que, quando administrada a um indivíduo (ser humano ou animal) induz um efeito farmacológico e/ou fisiológico desejado por ação local e/ou sistêmica.

O termo "indivíduo" refere-se a qualquer mamífero, incluindo um indivíduo humano, ou um não-humano. Indivíduos não-humanos podem incluir animais experimentais, de teste, do campo, de lazer ou de companhia.

Um indivíduo pode ser um ser humano. Um indivíduo pode ser um animal domesticado, tal como um cachorro, gato, vaca, cabra, carneiro, porco, etc. Um indivíduo pode ser um animal experimental, tal como um camundongo,

rato, coelho, macaco, etc.

Conforme usado neste documento, o termo "molécula pequena" é usado para se referir a moléculas, quer de ocorrência natural ou criadas artificialmente (por exemplo, através de síntese química), que tem um peso molecular relativamente baixo. Em muitas modalidades, moléculas pequenas são monoméricas e têm um peso molecular de menos do que cerca de 1500 g/mol. Moléculas pequenas preferidas são biologicamente ativas em que elas produzem um efeito local ou sistêmico em animais, preferivelmente mamíferos, mais preferivelmente seres humanos. Em certas modalidades preferidas, a pequena molécula é um fármaco. Preferivelmente, embora não necessariamente, o fármaco é um que já foi considerado seguro e eficaz para uso pela agência ou corpo governamental apropriado. Por exemplo, fármacos para uso humano listados pela FDA sob 21 C.F.R. §§ 330.5, 331 até 361, e 440 até 460; fármacos para uso veterinário listados pela FDA sob 21 C.F.R. §§ 500 até 589, incorporados neste documento por referência, todos são considerados aceitáveis para uso de acordo com a presente invenção.

Sumário da Invenção

Em um aspecto, a invenção é um meio de cromatografia que compreende uma resina de cromatografia derivatizada com um peptídeo que é pelo menos 75% homóloga a uma porção de uma proteína que é um membro da superfamília de TGF- β . O membro pode ser um TGF- β , um fator de diferenciação de crescimento (GDF), uma proteína morfogênica óssea, uma activina, ou uma inibina. O peptídeo pode ser uma molécula substancialmente completa da proteína. O peptídeo pode ser pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95% homólogo a uma porção de um peptídeo *finger-1* do membro.

Em outro aspecto, a invenção é um método de purificar uma amostra que inclui um fator de crescimento que é um membro da superfamília de TGF- β . O método inclui fornecer uma coluna de cromatografia que contém uma resina de cromatografia derivatizada com um peptídeo que é pelo menos 75% homólogo a uma porção de uma proteína que é um mem-

bro da superfamília de TGF- β , aplicar a coluna com a amostra sob condições nas quais o fator de crescimento tende a agregar, e eluir o fator de crescimento da coluna sob condições nas quais o fator de crescimento tende a solubilizar. O peptídeo não precisa ser uma porção do fator de crescimento.

Em outro aspecto, a invenção é um meio de cromatografia que compreende uma resina de cromatografia derivatizada com um peptídeo que é pelo menos 75% homólogo a uma porção de um peptídeo *finger-1* de um membro da superfamília de TGF- β .

Em outro aspecto, a invenção é uma solução de proteínas morfogênicas ósseas em um solvente que compreende uma concentração predeterminada de uma proteína morfogênica óssea predeterminada, e uma concentração predeterminada de um peptídeo que é pelo menos 75% homólogo a uma porção de um peptídeo *finger-1* de um membro da superfamília de TGF- β . O membro da superfamília de TGF- β pode, mas não precisa ser a proteína morfogênica óssea predeterminada.

Em outro aspecto, a invenção é um método de estabilizar uma solução da proteína morfogênica óssea. O método inclui adicionar uma concentração predeterminada de um peptídeo que é pelo menos 75% homólogo a uma porção de um peptídeo *finger-1* de um membro da superfamília de TGF- β a uma solução da proteína morfogênica óssea.

Em outro aspecto, a invenção é uma composição que inclui um peptídeo que é pelo menos 75% homólogo a uma porção de um peptídeo *finger-1* de um membro da superfamília de TGF- β a uma solução da proteína morfogênica óssea e um veículo. O veículo pode ser um gel, um polímero, osso desmineralizado, uma sutura, uma malha cirúrgica, uma cerâmica, uma micela, ou qualquer combinação dos acima. Por exemplo, o veículo pode incluir uma solução tampão, colágeno, uma esponja de colágeno, ou um material a base de celulose. Alternativamente ou adicionalmente, o veículo pode incluir um ou mais de alquilcelulose (incluindo hidroxialquilcelulose), incluindo metilcelulose, etilcelulose, hidroxietilcelulose, hidroxipropilcelulose, hidroxipropil-metilcelulose, e carboximetilcelulose. Em outras modalidades, o

veículo pode incluir poligliconato, ácido hialurônico, ácido polilático, polietileno glicol, alginato de sódio, polietileno glicol, óxido de polioxietileno, polímero de carboxivinila, e álcool polivinílico. O peptídeo pode ser estabilizado por um ou mais de um polipropileno glicol conjugado, a um grupo sialila conjugado, uma cadeia de polisialila conjugada, incorporação de aminoácidos modificados, incorporação de aminoácidos não-naturais, ligações covalentes intercadeia, ligações covalentes intracadeia, ligações não-covalente intercadeia, ligações não-covalentes intercadeia, e um intensificador de apresentação.

10 Em outro aspecto, a invenção é um método de ensaio que compreende colocar uma população de células em contato com um peptídeo que é pelo menos 75% homólogo a uma porção de um peptídeo *finger-1* de um membro da superfamília de TGF- β e detectar uma alteração em uma característica das células quando o peptídeo está presente versus quando o peptídeo está ausente. A característica pode ser selecionada de um estágio em um ciclo celular, expressão de um gene ou de uma proteína, uma característica fenotípica mensurável ou visível, um nível de expressão de um gene ou de uma proteína, e a transdução de um sinal do receptor. O método pode ainda incluir colocar as células em contato com uma proteína que é um membro da superfamília de TGF- β . O peptídeo pode ser limitado a uma configuração particular.

25 Em outro aspecto, a invenção é um método de ensaio que compreende colocar a população de receptores em contato com uma quantidade conhecida de um peptídeo que é pelo menos 75% homólogo a um peptídeo *finger-1* de uma porção de um membro da superfamília de TGF- β e detectar uma alteração na quantidade de peptídeo que não está ligada aos receptores. Os receptores podem ser colocados em contato com uma proteína que é um membro da superfamília de TGF- β .

30 Em outro aspecto, a invenção é uma composição que compreende um peptídeo que é pelo menos 75% homólogo a uma porção de um peptídeo *finger-1* de um membro da superfamília de TGF- β e um agente que aumenta a estabilidade *in vivo* do peptídeo com relação à eliminação do a-

nimal.

Em outro aspecto, a invenção é um método de ensaio que compreende colocar uma população de receptores em contrato com uma quantidade conhecida de um peptídeo que é pelo menos 75% homólogo a um peptídeo *finger-1* de uma porção de um membro da superfamília de TGF- β e uma pequena molécula e detectar uma alteração na quantidade de peptídeo que não está ligado aos receptores quando a pequena molécula está presente versus quando a pequena molécula está ausente.

Breve descrição dos desenhos

10 A invenção é descrita com referência às várias figures do desenho, nas quais

Figura 1 é um esquema de BMP-2, mostrando as regiões *finger* e as várias hélices e folhas- β (adaptado de Scheufler, *et al.*, *J. Mol. Bio.* (1999), **287**: 103-115).

15 Figura 2 é um esquema de um método de cromatografia de afinidade de acordo com uma modalidade exemplar da invenção.

Figura 3 é um cromatograma (A) e uma fotografia de um gel de SEC (B) mostrando a eluição de BMP-3 a partir de uma coluna empregando BMP-12 imobilizada.

20 Figura 4 é um cromatograma (A) e uma fotografia de um gel de SEC (B) mostrando a eluição de BMP-3 a partir de uma coluna empregando BMP-2 imobilizada.

25 Figura 5 é um cromatograma (A) e uma fotografia de um gel de SEC (B) mostrando a eluição de BMP-12 a partir de uma coluna empregando BMP-12 imobilizada.

Figura 6 é um cromatograma (A) e uma fotografia de um gel de SEC (B) mostrando a eluição de BMP-12 a partir de uma coluna empregando BMP-2 imobilizada.

30 Figura 7 é um conjunto de fotografias de géis de SEC (A: não-reduzido, B: reduzido) mostrando a eluição de várias BMPs a partir de coluna de HPLC de fase reversa empregando BMPs imobilizadas.

Figura 8 é um cromatograma (A) e uma fotografia de um gel de

SEC (B) mostrando a eluição de BMP-3 a partir de uma coluna empregando fragmentos mutantes de BMP-2 imobilizados.

Figura 9 é um cromatograma (A) e uma fotografia de um gel de SEC (B) mostrando a eluição de BMP-3 a partir de uma coluna empregando fragmentos selvagens de BMP-2 imobilizados.

Figura 10 é um cromatograma (A) e uma fotografia de um gel de SEC (B) mostrando a eluição de BMP-12 a partir de uma coluna empregando fragmentos mutantes de BMP-2 imobilizados.

Figura 11 é um cromatograma (A) e uma fotografia de um gel de SEC (B) mostrando a eluição de BMP-12 a partir de uma coluna empregando fragmentos mutantes de BMP-2 imobilizados.

Figura 12 é um cromatograma (A) e uma fotografia de um gel de SEC (B) mostrando a eluição de GDF-9 a partir de uma coluna empregando fragmentos mutantes de BMP-2 imobilizados.

Figura 13 é um gráfico que ilustra a turvação de soluções de 0,5 mg/mL de BMP-12 com relação às concentrações de NaCl e 2-metil-2,4-pentanediol em Tris a 50 mM, pH 8.

Figura 14 é uma fotografia de um gel após SEC do eluato de resinas conjugadas com peptídeos BMP-*finger* e aplicado com BMP-12 sob várias condições.

Descrição detalhada de certas modalidades preferidas

Em certas modalidades, uma porção do primeiro peptídeo *finger* de uma BMP é empregada para executar a cromatografia de afinidade. A estrutura secundária de membros da superfamília de TGF- β é tipificada por suas folhas- β antiparalelas separadas por uma alfa-hélice de quatro voltas aproximadamente perpendicular às fitas nas folhas- β . A segunda das duas folhas- β tem uma conformação cruzada torcida. A estrutura é frequentemente estabilizada por um nó de cisteínas formado como pares de resíduos de cisteína de ligações de dissulfeto intercadeia. Alguns membros da superfamília de TGF- β são ainda estabilizados pela formação de dímeros ou multímeros de ordem maior. A figura 1 mostra as regiões *finger* e as várias hélices e folhas- β em uma BMP exemplar, BMP-2. Para vários membros da su-

perfamília de TGF- β , as folhas- β podem ser subdividas em nove fitas- β . Outras características de BMP-2, tais como a alfa hélice-2 e a fita β 5a, não são encontradas em todos os membros da superfamília de TGF- β , alguns dos quais podem exibir hélices adicionais e fitas- β que não são encontradas em BMP-2 (Scheufler, *et al*, J. Mol. Bio. (1999), 287: 103-115).

Membros exemplares da superfamília de TGF- β incluem mas não são limitados a BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8A, BMP8B/OP2, BMP9/GDF2, BMP10, BMP11/GDF11, BMP12/GDF7, BMP13/GDF6, BMP15, BMP16/nodal, BMP17/LeftyB, BMP18/Lefty2/TGF β 4, α inibina, Inibina β A, Inibina β B, Inibina β C, Inibina β E/BMP14/GDF12, TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, GDF1, GDF3/Vgr-2, GDF5, GDF8, GDF9, GDF10/BMP3B, GDF15, artemina, GDNF (fator neurotrófico derivado da glia), substância inibidora do ducto Mulleriano, neuturina, e persefina. Embora a discussão abaixo foque em BMP, os ensinamentos podem ser aplicados a qualquer membro da superfamília de TGF- β .

As BMPs tendem a se agregar e precipitar em pH fisiológico (Ruppert, *et al.*, 1996 *Eur J Biochem.* 1996, 237(I):295-302). Em algumas modalidades, esta tendência foi explorada por ligar BMPs inteiras ou análogos de peptídeos *finger-1* derivados dos seus primeiros domínios como ligantes ligados a esferas de sefarose para produzir resinas de cromatografia de afinidade.

Cromatografia

Figura 2 ilustra os princípios da purificação por afinidade de acordo com certas modalidades da invenção. Uma BMP ou análogo de peptídeo *finger-1* é imobilizado sobre um meio de cromatografia. Meios exemplares incluem agarose (por exemplo, Sepharose™), poliestireno, sílica, dextran, e acrilamida. Os meios são então misturados em uma coluna e acordo com técnicas conhecidas daqueles versados na técnica. A coluna é aplicada com uma solução contendo uma BMP sob condições que favorecem a precipitação de BMP. Em uma modalidade, as BMPs são aplicadas na coluna a partir de meio condicionado com CHO contendo dextran sulfato ou heparina, por exemplo, 100 microgramas/mililitro em pH fisiológico. Em algumas mo-

dalidades, a solução também pode incluir NaCl 1,2 M. Outras impurezas podem ser lavadas da coluna enquanto que a BMP permanece agregada na coluna. As BMPs são então lavadas da coluna sob condições que promovem a solvatação. Um versado na técnica reconhecerá que a força iônica e o pH do solvente de corrida podem ser otimizados para várias combinações de análogos de peptídeo *finger-1* imobilizados e materiais sendo purificados.

Em algumas modalidades, podem ser usados aditivos para otimizar a solubilidade ou insolubilidade do material sendo purificado. Por exemplo, dextran sulfato ou heparina podem ser adicionados a um meio de cultura para favorecer a solubilização da BMP enquanto que ela está sendo expressa e secretada pelas células. Antes de se aplicar na coluna, o Meio Condicionado pode ser ajustado para um força iônica alta para promover a captura eficaz e/ou agregação durante o processo de cromatografia.

Solubilizantes de BMP exemplares são conhecidos daqueles versados na técnica e incluem, mas não são limitados a ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido hidrocloreto, alcoóis, acetonitrila, propileno glicol, glicerol, Tween-80 CHAPS (ácido 3-((3-colamidopropil)dimetilamonio)-1-Propanossulfônico), L-arginina, uréia a 6M, e Guanidina HCl a 6M. Um versado na técnica reconhecerá que estes solventes variam em sua agressividade com relação à solubilização de BMP. Em certas modalidades, BMPs são eluídas com uma solução a 500 mM de arginina ou 50 mM de ácido acético.

Precipitadores de BMP exemplares são conhecidos daqueles versados na técnica e incluem mas não são limitados a solventes com pH maior do que cerca de 5, soluções de sal incluindo, por exemplo, cloreto de sódio, sais de fosfato, sais de sulfato de amônio e sódio, e citrato. A concentração de cloreto de sódio para promover a precipitação depende do pH da solução. Algumas proteínas de TGF- β precipitarão em soluções de alta concentração de sal e baixo pH, ou vice-versa. Um versado na técnica reconhecerá como otimizar a concentração de sal e o pH para obter as características de precipitação desejadas para proteínas particulares.

Fragmentos de peptídeos *finger* de BMP podem ser empregados

dos ao invés da região *finger* inteira. A sequência particular usada para a cromatografia ou para as aplicações descritas abaixo pode ter pelo menos 8, pelo menos 16, ou pelo menos 24 resíduos de aminoácido. A sequência pode ser pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 5 90%, ou pelo menos 95% homóloga à região correspondente da proteína nativa. Em algumas modalidades, os mutantes podem ser formados por resíduos de serina no lugar de resíduos de cisteína na sequência nativa. Isto pode reduzir a ligação cruzada entre as cadeias de peptídeo sobre as esferas de sefarose, o que pode interferir com a nucleação de agregados de 10 BMP.

Modificações à sequência de peptídeo também podem ser feitas para melhorar a ligação do peptídeo ao substrato. Por exemplo, peptídeos terminados em lisina se ligarão facilmente às esferas de cromatografia através da formação de ligações de amida. Se a sequência natural do peptídeo 15 desejado já não for terminada em lisina, ela pode ser modificada para adicionar o resíduo de lisina. Alternativamente ou adicionalmente, a terminação N do peptídeo pode ser amidada e a terminação C acetilada para garantir que apenas uma extremidade do peptídeo se ligue à esfera de substrato. Em uma modalidade alternativa, um espaçador pode ser interposto entre o 20 peptídeo e a esfera de substrato. O espaçador fornece flexibilidade de conformação adicional ao peptídeo, fornecendo a ele mais liberdade para atingir a estrutura secundária otimizada para nuclear agregados de peptídeo. O espaçador pode ser um oligômero de um ou dois aminoácidos ou pode exibir homologia pelo menos parcial a uma porção não-ligante de uma proteína 25 que é um membro da superfamília de TGF- β ou qualquer outra proteína. Alternativamente, ou adicionalmente, um espaçador pode ter uma porção que exibe homologia parcial a uma porção de uma proteína que é um membro da superfamília de TGF- β e uma porção que não. Em algumas modalidades, a eficácia do peptídeo ligado pode variar dependendo de se a extremidade 30 livre é C-terminal ou N-terminal. Aminoácidos individuais também podem ser deletados, modificados conforme descrito neste documento ou de acordo com outros métodos conhecidos daqueles versados na técnica, ou substituí-

dos.

Estabilizadores da solução de BMP

Em algumas modalidades análogos de peptídeo *finger-1* podem ser usados para estabilizar soluções de BMPs em vários veículos farmacologicamente aceitáveis. Em algumas modalidades, as BMPs são dissolvidas em uma solução contendo uma concentração particular de análogos de peptídeo *finger-1*. Em algumas modalidades, a proporção das concentrações é 1:1, mas pode ser menor ou maior. Sem estar ligado por nenhuma teoria particular, acredita-se que o análogo de peptídeo *finger-1* competirá com as primeiras regiões da proteína, impedindo a multimerização de BMPs monoméricas ou dimerizadas. Como um resultado, pode ser desejável ter uma concentração maior de peptídeo do que de proteína, por exemplo, 2:1, 5:1, 10:1, 20:1, ou 30:1.

Em algumas modalidades, a concentração de proteína a ser liberada está em uma faixa de cerca de 0,01 a cerca de 4 mg por cc ou ml de veículo, por exemplo, cerca de 0,05 mg a cerca de 1,5 mg por cc. Veículos exemplares de BMPs incluem os materiais discutidos abaixo para composições terapêuticas, materiais formadores de hidrogel e outros polímeros e veículos tais como aqueles descritos na Patente U.S. No. 6.620,406, cujos conteúdos estão incorporados neste documento por referência.

Ensaio

Em outra modalidade, análogos de peptídeo *finger-1* são usados em ensaios biológicos. Por exemplo, um análogo de peptídeo *finger-1* pode interagir com o receptor de BMP e induzir uma resposta biológica relacionada com BMP, por exemplo, transdução de sinal. Os ensaios também podem determinar respostas tais como uma alteração no ciclo celular, expressão de um gene ou proteína particular, uma alteração visível ou mensurável no fenótipo, uma alteração no nível ou estado de modificação de uma proteína, ou outras características da célula. Esta resposta pode ser medida usando kits de teste de rastreamento ou ensaios disponíveis. O análogo de peptídeo *finger-1* pode ser usado para testar células particulares para determinar de forma simples se elas são responsivas à BMP ou identificar

BMPs particulares às quais a célula é mais ou menos sensível. Por exemplo, podem ser identificadas células que respondem aos análogos de peptídeo *finger-1* por modificar uma atividade metabólica, por exemplo, por aumentar ou diminuir a produção de uma proteína, polinucleotídeo, metabólito, ou outro componente celular particular. Em uma modalidade alternativa, o análogo de peptídeo *finger-1* é empregado como um competidor de BMP. Nesta modalidade, o análogo do peptídeo *finger-1* compete com proteínas de BMP para se ligar com o receptor da célula. Por exemplo, células de câncer, bactérias, e outras células envolvidas na doença podem ser testadas quanto à presença de receptores de BMP particulares ou outros receptores cuja ligação com análogos de peptídeo *finger-1* inibe uma função particular da célula. Alternativamente, ou adicionalmente, podem ser realizados ensaios com receptores isolados ao invés de com células. Em algumas modalidades, métodos de rastreamento de alta produtividade que usam receptores conhecidos podem ser usados para testar interações do receptor-peptídeo.

Modalidades exemplares nas quais os primeiros análogos de peptídeo *finger* podem ser empregados como agonistas de BMP incluem, mas não são limitados ao uso dos primeiros análogos de peptídeo *finger* de BMP-2 para tratar osteoporose, reparar e regenerar fraturas ósseas, e regeneração de cartilagem, primeiros análogos de peptídeo *finger* de BMP-12 para reparo de tendão, primeiros análogos de peptídeo *finger* de BMP-9 para indução de diferenciação neuronal colinérgica, e primeiros análogos de peptídeo *finger* de GDF-19 para o tratamento de insuficiência cardíaca. Modalidades exemplares nas quais os primeiros análogos de peptídeo *finger* podem ser empregados como antagonistas de BMP incluem, mas não são limitadas ao uso dos primeiros análogos de peptídeo *finger* de BMP3 para tratar osteoporose, fratura óssea, doenças ósseas, BMP15 e GDF9 para contracepção, GDF3 para tratar diabetes tipo II, obesidade, e síndrome metabólica, BMP4 para reparo ou regeneração do tecido nervoso periférico ou do SNC, TGF- β para tratar vários cânceres e tumores, ou GDF8 para tratar distrofia muscular, sarcopenia, fraqueza, ou distúrbios neurológicas. Nesta modalidade, o primeiro fragmento de peptídeo *finger* compete com a proteína comple-

ta para se ligar aos receptores, mas então impede a resposta celular ou tecidual que a proteína poderia promover de outra forma.

A ligação do peptídeo pode ser medida ou testada mais diretamente usando um ensaio de radioreceptor, no qual o peptídeo marcado na amostra compete com a BMP na marcada pela ligação à célula ou ao receptor particular, ou vice-versa. A marcação pode ser feita com ^{125}I , ^{35}S , ^{32}P , ou outros radioisótopos adequados. Conforme a ligação do análogo de peptídeo *finger-1* aumenta, ele reduz a quantidade de BMP que é capaz de ligar. O complexo receptor-BMP é então isolado do ligante livre, por exemplo, por lavagem (no caso de uma linhagem celular aderente), filtração rápida ou centrifugação (no caso de uma linhagem celular não-aderente ou receptor ligado a um suporte sólido), ou precipitação do complexo receptor-ligante com anticorpos, polietileno glicol, ou outro agente precipitante seguido por filtração ou centrifugação (no caso de um receptor solúvel). A comparação com uma curva padrão preparada com concentrações conhecidas de ligante marcado permite a quantificação exata de qualquer concentração de peptídeo ou proteína na amostra. A quantidade de ligante marcado no complexo é então quantificada, tipicamente por contagem gama, e comparada com padrões conhecidos. Estes métodos foram descritos na literatura usando outros receptores (M. Williams, *Med. Res. Rev.*, 11: 147-184 (1991); M. Higuchi & B. B. Aggarwal, *Anal Biochem.*, 204: 53-58 (1992); M. J. Cain, R. K. Garlick e P. M. Sweetman, *J. Cardiovasc. Pharm.*, 17: S150-S151 (1991); cada um dos quais estão incorporados neste documento por referência), e são facilmente adaptados para o presente sistema. Outros métodos de quantificar peptídeos ou BMPs incluem radioimunoensaio e ELISA, conforme descrito em 4.857.456.

Alternativamente, ou adicionalmente, uma vez que um análogo de peptídeo *finger-1* particular é identificado, ele pode ainda ser otimizado por substituir aminoácidos individuais para estabilizar uma estrutura secundária particular, impedir a formação de ligações cys-cys intercadeia, ou criar um melhor ajuste com o receptor da célula. Tais mutações podem ser identificadas usando modelos de computador ou usando técnicas biológicas. Por

exemplo, métodos secundários de mutagênese de proteína podem ser encontrados em Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2^a ed. (Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press) (1990). Em tal modalidade, pode ser desejável usar o peptídeo ou peptídeo otimiza-

5 do como terapêutico atuando como um mimético de BMP. Em outras modalidades, resíduos de aminoácido individuais ou peptídeos podem ser modificados quimicamente, por exemplo, por glicosilação ou derivatização com polietileno glicol.

Em outra modalidade, o análogo de peptídeo *finger-1* interage

10 diretamente com proteínas de BMP completas. Por exemplo, o análogo de peptídeo *finger-1* pode ser usado para testar proteínas BMP por impedir homo- ou heterodimerização da proteína. Nesta modalidade, pode ser desejável modificar o análogo de peptídeo *finger-1* a fim de que ele possa ser internalizado por uma célula, onde a dimerização frequentemente ocorre. Al-

15 ternativamente, ou adicionalmente, o peptídeo pode ser empregado para modular positivamente a dimerização de proteínas BMP. A interação do análogo de peptídeo *finger-1* e da proteína BMP pode ser testada usando qualquer uma das técnicas descritas acima. Além disso, testes para o tamanho da proteína, por exemplo, eletroforese em gel nativo, espectroscopia de

20 massa, ou cromatografia de filtração de gel, podem ser empregados para caracterizar o efeito do análogo de peptídeo *finger-1*. Em algumas modalidades, o análogo do peptídeo *finger-1* pode ser usado como um terapêutico que age como um antagonista de BMP por impedir a função apropriada de BMP.

25 Em outra modalidade, análogos de peptídeo *finger-1* podem ser empregados como rastreadores para identificar substâncias, por exemplo, moléculas pequenas, que modulam positivamente ou negativamente as interações BMP-BMP ou BMP-receptor. Receptores exemplares incluem, mas não são limitados a receptores de serina-treonina quinase, por exemplo,

30 ACVR1/ALK2, ACVR1B/ALK4, ACVR1C/ALK7, ACVR2/ACTRII, ACVR2B/ACTRIIB, ACVRL1/ALK1, BMPR1A/ALK3, BMPR1B/ALK6, BMPR2/T-ALK, TGF β R1/ALK5, e TGF β R2, e co-receptores tais como RGMa,

RGMb/DRAGON, RGMc/HFE2, TGF β R3, Cripto, Cryptic, e Endoglin. Por exemplo, ensaios de alta produtividade podem ser empregados para identificar uma pequena molécula inibidora de uma BMP. Um ensaio livre de célula pode ser conduzido da mesma forma que um ensaio FRET no qual o rastreamento detecta quebra da interação BMP-peptídeo. Por exemplo, o BMP ou análogo de peptídeo BMP *finger-1* posso ser modificado com uma molécula doadora, enquanto que a outra é modificada com uma molécula aceptora.

Em outra modalidade, análogos de peptídeo *finger-1* podem ser modificados para serem restritos em uma configuração particular para reter uma estrutura secundária particular. Por exemplo, aminoácidos particulares no análogo de peptídeo *finger-1* podem ser substituídos por cisteínas que formarão ligações de dissulfeto e estabilizam uma conformação particular. Alternativamente ou adicionalmente, as cisteínas podem ser adicionadas às extremidades N- e C-terminais do análogo de peptídeo *finger-1* para restringir o peptídeo ou estabilizar uma conformação particular. Em algumas modalidades, pode ser desejável desenovelar análogos de peptídeo *finger-1* selvagens ou mutantes e permitir que eles reenovelem em uma configuração alternativa. Por exemplo, o análogo de peptídeo *finger-1* pode ser solubilizado e desnaturado usando um agente caotrópico. A separação do análogo de peptídeo *finger-1* do agente caotrópico permite que ele reenovele em uma configuração termodinamicamente favorecida. Quando resíduos de cisteína estão presentes na sequência de aminoácido primária da proteína, pode ser desejado realizar o reenovelamento em um ambiente que permita a formação correta de ligações de dissulfeto (por exemplo, um sistema redox). Métodos gerais de reenovelamento são descritos em Kohno, Meth. Enzym., 185:187-195 (1990). Chaperoninas também podem ser empregadas para mediar o enovelamento.

Composições terapêuticas

Análogos de peptídeo *finger-1* identificados como tendo potencial terapêutico podem ser aplicados ao tecido na forma de uma solução tampão. Uma solução tampão exemplar é uma composição que compreende, além do peptídeo, cerca de 1,0 a cerca de 10,0% (p/v) de glicina, cerca

de 0,1 a cerca de 5,0% (p/v) de um açúcar, por exemplo, sacarose, cerca de 1 a cerca de 20 mM de cloridrato de ácido glutâmico, e opcionalmente cerca de 0,01 a cerca de 0,1% de um tensoativo não-iônico, tal como polissorbatato 80 ou Tween. Soluções exemplares são de cerca de 1% a cerca de 20% p/v
5 de veículo celulósico/tampão. De desejado, um sal pode ser adicionado.

Materiais mais viscosos também podem ser usados como veículos. Tais materiais podem incluir materiais farmacologicamente aceitáveis que tem viscosidade e polaridade tal que, quando combinados com o análogo de peptídeo *finger-1*, formam uma composição que possui características
10 de manuseio apropriadas para o local do tecido. Por exemplo, pode ser desejável ter material relativamente menos viscoso (mas ainda não líquido) para uso em um local periodontal do que em uma fratura óssea. Adicionar o veículo ao peptídeo permite que o análogo de peptídeo *finger-1* permaneça no local de doença ou de lesão por um tempo suficiente para permitir que
15 análogo de peptídeo *finger-1* aja sobre as células locais por regular positivamente ou negativamente várias atividades metabólicas. O veículo também pode permitir que o análogo de peptídeo *finger-1* seja liberado no local da lesão, defeito ou doença ao longo de um intervalo de tempo.

Uma família exemplar de veículos para administração dos peptídeos são polímeros particulados porosos, descritos em detalhe na Patente
20 U.S. No. 5.171.579, cuja descrição completa está incorporada neste documento por referência. Um veículo alternativo útil para a presente invenção é uma formulação de proteína osteogênica, polímeros particulados porosos, e outro agente sequestrante ou veículo, tal como um material celulósico. Outros materiais que podem ser empregados como veículos ou agentes sequestrantes incluem carboximetilcelulose, ácido hialurônico, alginato de sódio, polietileno glicol, óxido de polioxietileno, polímero de carboxivinila e álcool polivinílico. Estas composições são descritas no pedido PCT publicado
25 WO 93/00050, cuja descrição completa está por meio deste incorporada por referência. O agente sequestrante pode estar presente em uma concentração de cerca de 1 a cerca de 10% (p/v do implante). Onde polímeros particulados porosos são empregados como o veículo, agente sequestrante de po-
30

límero particulado poroso/celulósico pode ser opcionalmente combinado com glicerol aquoso como um diluente, por exemplo, em concentrações de cerca de 10 a cerca de 80% (v/v) com proporções exemplares de agente sequestrante /solução líquida: polímeros particulados porosos de cerca de 0,1 a
5 cerca de 0,9 (v/v).

Outra família exemplar de veículos são materiais colagenosos. Materiais colagenosos adequados incluem esponjas de colágeno Collastat™ e Helistat™ (Integra LifeSciences Corp., Plainsboro, NJ.). Outros materiais que podem ser adequados para uso na presente invenção são descritos na
10 Patente U.S. Nos. 5.206.028; Patente U.S. No. 5.024.841; Patente U.S. No. 5.256.418. Um veículo de colágeno pode estar na forma de uma esponja. A esponja de colágeno pode ser carregada com um peptídeo antes da administração por embeber a esponja em um volume desejado e a concentração de peptídeo por um período de tempo adequado. A esponja de colágeno
15 pode ser embebida com peptídeo em uma faixa de cerca de 10% a cerca de 150% v/v [ml de proteína/cc de esponja seca], por exemplo, cerca de 10 a cerca de 60% v/v. Alternativamente, o peptídeo pode ser adsorvido à esponja de colágeno durante a produção. Neste caso, peptídeo pode ser adicionado à esponja de colágeno durante a produção e liofilizado para formar um
20 produto unitário. O peptídeo pode ser adicionado em uma proporção de cerca de 10 a cerca de 150% v/v, por exemplo, em uma faixa de cerca de 60 a cerca de 80% v/v.

Outra família exemplar de veículos são materiais baseados em celulose tais como alquilcelulose (incluindo hidroxialquilcelulose), incluindo
25 metilcelulose, etilcelulose, hidroxietilcelulose, hidroxipropilcelulose, hidroxipropil-metilcelulose, e carboximetilcelulose, por exemplo, os sais catiônicos de carboximetilcelulose (CMC). A reticulação e o peso molecular destes materiais e qualquer outro veículo de polímero descrito neste documento pode ser modificado para ajustar a taxa de liberação do peptídeo encapsulado e
30 para estabilizar o peptídeo *in vivo*.

No caso de veículos celulósicos, o veículo pode estar na forma de um gel viscoso celulósico. A viscosidade de materiais celulósicos pode

ser aumentada através de meios mecânicos, tal como alta agitação por um período adequado de tempo, seguido por autoclavação. O peptídeo e o veículo celulósico podem estar em uma solução tampão adequada. Uma solução tampão exemplar é uma composição que compreende cerca de 1,0 a
5 cerca de 10,0% (p/v) de glicina, cerca de 0,1 a cerca de 5,0% (p/v) de um açúcar, preferivelmente sacarose, cerca de 1 a cerca de 20 mM de cloridrato de ácido glutâmico, e opcionalmente cerca de 0,01 a cerca de 0,1% de um tensoativo não-iônico, tal como polissorbato 80. Soluções exemplares são de cerca de 1% a cerca de 20% p/v de veículo celulósico/tampão. Se desejado,
10 um sal pode ser adicionado. a quantidade de peptídeo combinada com um veículo de gel viscoso pode estar em uma faixa de cerca de 0,05 a cerca de 1,5 mg, por exemplo, de cerca de 0,1 a cerca de 1,0 mg por centímetro cúbico de material de implante necessário.

Outros materiais que podem ser adequados para uso como veí-
15 culos para análogos do peptídeo *finger-1* de acordo com várias modalidades incluem, mas não estão limitados a osso desmineralizado, poligliconato, ácido hialurônico, suturas ou malha cirúrgica, polímeros sensíveis a temperatura, e minerais e cerâmicas, tais como fosfatos de cálcio, hidroxiapatita, etc, e combinações destes. Outros veículos em potencial incluem veículos para
20 formulações injetáveis de BMPs. Veículos adequados para formulações injetáveis incluem, por exemplo, colágeno solúvel, ácido hialurônico, ácido polilático/polietileno glicol e polímeros.

Análogos de peptídeo *finger 1* para uso nessa modalidade podem simplesmente ser combinados com o veículo e a proteína completa ou
25 podem ser imobilizados sobre o veículo. Por exemplo, peptídeos terminados em amina podem ser acoplados a veículos carboxilados usando técnicas de química de polímero usuais. Em outro exemplo, os peptídeos podem ser terminados com carbóxi-NHS e ligados a polímeros aminados. Alternativamente ou adicionalmente, os peptídeos podem ser biotinizados e coordena-
30 dos com veículos que foram funcionalizados com estreptavidina.

Veículos alternativos para análogos do peptídeo *finger-1* incluem micelas. Por exemplo, técnicas de emulsão dupla tais como aquelas

descritas em Gref, *et al*, Science, 1994, 263:1600- 1603 podem ser usadas para encapsular composições terapêuticas em micelas que podem então ser administradas a um indivíduo usando qualquer uma das técnicas descritas neste documento ou qualquer outra das técnicas de liberação conhecidas por aqueles versados na técnica. Em algumas modalidades, a superfície da micela pode incluir um agente de direcionamento. O agente direcional pode estar acoplado covalentemente à micela ou pode ser retido usando interações ligante-receptor (por exemplo, biotina-estreptavidina) ou interações eletrostáticas. Agentes de direcionamento exemplares incluem anticorpos e fragmentos de anticorpos, ligantes de ácido nucleico (por exemplo, aptâmeros), oligonucleotídeos, oligopeptídeos, polissacarídeos, lipoproteínas de baixa densidade (LDLs), folato, transferrina, asialicoproteínas, proteína gp120 do envelope do vírus da imunodeficiência humana (HIV), carboidratos, polissacarídeos, ligantes de receptores enzimáticos, ácido siálico, glicoproteína, lipídio, molécula pequena, agente bioativo, biomolécula, fragmentos imunorreativos tais como os fragmentos Fab, Fab', ou F(ab')₂, etc.

Peptídeos para uso como terapêuticos podem ser modificados para aumentar sua estabilidade *in vivo*, aumentando seu tempo de circulação e reduzindo a taxa de eliminação pelo corpo. Por exemplo, os peptídeos podem ser funcionalizados ou combinados com uma cadeia de polialquileno glicol tal como polietileno glicol (PEG) ou polipropileno glicol (PPG). O peso molecular otimizado de tais cadeias de polímero pode ser otimizado usando técnicas conhecidas por aqueles versados na técnica. Alternativamente ou adicionalmente, os peptídeos podem ser conjugados com grupos sialila ou cadeias de polisialila. Peptídeos também podem ser modificados pela modificação química de resíduos de aminoácidos com grupos químicos menores tais como metila, sulfato, etc. Resíduos de aminoácidos individuais também podem ser substituídos por resíduos de aminoácidos não-naturais tais como D-estereoisômeros ou resíduos beta. Em algumas modalidades, peptídeos podem ser estabilizados por ligações covalentes ou não covalentes entre ou intracadeia. Essas ligações podem ser promovidas pela adição de resíduos de aminoácidos apropriados ao peptídeo ou pela modificação de aminoáci-

dos no peptídeo com grupos químicos apropriados, tais como tiol, doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, etc. Os peptídeos também podem estar associados ou fundidos (por exemplo, nas terminações N ou C ou internamente) com a extensão completa ou um fragmento de uma proteína natural ou sintética que atue como um intensificador de apresentação. Proteínas exemplares são conhecidas daqueles versados na técnica e incluem albumina sérica bovina.

Análogos do peptídeo *finger-1*, em um tampão adequado ou combinados com um veículo adequado, tais como aqueles descritos acima, podem ser aplicados diretamente em um tecido e/ou a um local com necessidade de reparação tecidual. Por exemplo, o peptídeo pode ser fisicamente aplicado ao tecido através de aspensão ou imersão ou usando uma escova ou outro aplicador adequado, tal como uma seringa para injeção. Alternativamente ou adicionalmente, o peptídeo pode ser aplicado diretamente no local com necessidade de reparação tecidual.

Em algumas modalidades, composições terapêuticas de acordo com uma modalidade da invenção podem ser administradas a um indivíduo ou podem ser formuladas primeiro para liberação por qualquer via disponível incluindo, mas não limitada às vias parenteral (por exemplo, intravenosa), intradérmica, subcutânea, oral, nasal, brônquica, oftálmica, transdérmica (tópica), transmucosa, retal, e vaginal. Composições farmacêuticas inventivas podem incluir um polipeptídeo purificado ou proteína expressa por uma linhagem celular de mamífero e um agente de liberação (isto é, um polímero catiônico, um transportador molecular de peptídeo, tensoativo, etc., conforme descrito acima) em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável. Como usado neste documento, a expressão "veículo farmacêuticamente aceitável" inclui solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardantes da absorção e similares, compatíveis com a administração farmacêutica. Componentos ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições.

Uma composição farmacêutica é formulada para ser compatível

com sua via de administração pretendida. Soluções ou suspensões usadas para aplicação parenteral, intradérmica ou subcutânea podem incluir os seguintes componentes: um diluente estéril tal como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietileno glicóis, glicerina, propileno glicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tais como álcool benzílico ou metil parabenos; antioxidantes tais como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes tais como ácido etilenodiaminotetracético; tampões tais como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para ajuste de tonicidade tais como cloreto de sódio ou dextrose. O pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, tais como ácido hidrocloreto, ou hidróxido de sódio. A preparação parenteral pode ser embalada em ampolas, seringas descartáveis ou frascos de doses múltiplas feitos de vidro ou plástico.

Composições farmacêuticas adequadas para uso injetável geralmente incluem soluções aquosas estéreis (onde solúvel em água) ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersão estéril injetável. Para administração intravenosa, veículos adequados incluem salina fisiológica, água bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) ou salina tamponada com fosfato (PBS). Em todos os casos, a composição deve ser estéril e deve ser fluida na medida em que exista a facilidade de aspiração para seringa. Formulações farmacêuticas exemplares são estáveis sob as condições de produção e armazenamento e são preservadas contra a ação contaminante de microorganismos tais como bactérias e fungos. Em geral, o veículo relevante pode ser um solvente ou um meio de dispersão que contenha, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, e polietileno glicol líquido e similares) e misturas adequadas destes. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. A prevenção da ação de microorganismos pode ser obtida por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, e similares. Em muitos casos, será desejável incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, polialcoóis tais

como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada de composições injetáveis pode ser conseguida pela inclusão na composição de um agente que retarde a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

5 Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas pela incorporação do polipeptídeo purificado ou proteína na quantidade necessária em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, como necessário, seguido por esterilização por filtração. Geralmente, dispersões são preparadas pela incorporação do polipeptídeo
10 purificado ou proteína expressos em uma linhagem celular de mamífero em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e outros ingredientes necessários dentre aqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, métodos exemplares de preparação são secagem a vácuo e secagem por congelamento, as
15 quais fornecem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução previamente esterilizada por filtração deste.

 Composições orais podem incluir um diluente inerte ou um veículo comestível. Para o propósito de administração terapêutica oral, o polipeptídeo ou proteína purificada pode ser incorporada com excipientes e usada na forma de comprimidos, pastilhas ou cápsulas, por exemplo, cápsulas gelatinosas. Composições orais também podem ser preparadas usando um veículo líquido para uso como enxaguante bucal. Agentes de ligação farmacologicamente compatíveis e/ou materiais adjuvantes podem ser incluídos como parte da composição. Os comprimidos, pílulas, cápsulas, pastilhas
20 e similares podem conter qualquer um dos seguintes ingredientes ou compostos de uma natureza similar: um ligante tal como celulose microcristalina, goma tragacanto ou gelatina; um excipiente tal como amido ou lactose, um agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel ou amido de milho; um
25 lubrificante tal como estearato de magnésio ou Sterotes; um antiaderente tal como dióxido de silicone coloidal; um agente adoçante tal como sacarose ou sacarina; um agente flavorizante tal como hortelã, salicilato de metila ou fla-

vorizante de laranja. Formulações para liberação oral podem incorporar vantajosamente agentes para melhorar a estabilidade dentro do trato gastrointestinal e/ou intensificar a absorção.

Para administração por inalação, as composições inventivas que compreendem um polipeptídeo purificado ou uma proteína expressa em uma linhagem celular de mamífero e um agente de liberação são preferivelmente liberados na forma de um pulverizador em aerossol de um recipiente pressurizado ou dispensador que contém um propelente adequado, por exemplo, um gás tal como dióxido de carbono, ou um nebulizador. A presente invenção contempla a liberação das composições usando um spray nasal, inalador ou outro liberador direto para a via aérea superior e/ou inferior. A administração intranasal de vacinas de DNA dirigidas contra vírus da influenza tem mostrado induzir respostas de célula T CD8, indicando que pelo menos algumas células no trato respiratório podem absorver DNA quando liberadas por essa via e os agentes de liberação da invenção intensificarão a absorção celular. De acordo com certas modalidades da invenção, as composições que compreendem um polipeptídeo purificado expresso em uma linhagem celular de mamífero e um agente de liberação são formuladas como grandes partículas porosas para administração em aerossol. A absorção transepitelial de composições de acordo com uma modalidade da invenção pode ser intensificada usando as técnicas descritas no Pedido de Publicação de Patente U.S. No. 20030235536, cujo conteúdo está incorporado nesse documento por referência.

A administração sistêmica também pode ser por meio transmucoso ou transdérmico. Para administração transmucosa ou transdérmica, penetrantes apropriados para a barreira a ser permeada são usados na formulação. Tais penetrantes são geralmente conhecidos na técnica, e incluem, por exemplo, para administração transmucosa, detergentes, sais biliares e derivados do ácido fusídico. A administração transmucosa pode ser obtida através do uso de sprays nasais ou supositórios. Para administração transdérmica, o polipeptídeo purificado ou proteína e agentes de liberação são formulados em unguentos, pomadas, géis ou cremes como geralmente co-

nhecido na técnica.

As composições também podem ser preparadas na forma de supositórios (por exemplo, com bases convencionais para supositório tais como manteiga de cacau e outros glicerídeos) ou enemas de retenção para liberação retal.

Em uma modalidade, as composições são combinadas com um agente que protegerá o polipeptídeo ou proteína contra a rápida eliminação pelo corpo, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes e sistemas de liberação microencapsulados. O agente também pode servir como um veículo para a composição. Polímeros biocompatíveis, biodegradáveis podem ser usados, tais como acetato de vinil etileno, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Métodos para preparação de tais formulações ficarão claros para aqueles versados na técnica. Os materiais podem também ser obtidos comercialmente de Alza Corporation e Nova Pharmaceuticals, Inc. Suspensões lipossomais (incluindo lipossomas dirigidos para células infectadas com anticorpos monoclonais para antígenos virais) também podem ser usadas como veículos farmacêuticamente aceitáveis. Esses podem ser preparados de acordo com métodos conhecidos por aqueles versados na técnica, por exemplo, como descrito na Patente U.S. No. 4.522.811.

É vantajoso formular composições orais ou parenterais em forma de dosagem unitária para facilitar a administração e uniformidade da dosagem. Forma de dosagem unitária como usado neste documento refere-se a unidades fisicamente separadas adequadas como dosagens unitárias para o indivíduo a ser tratado; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de polipeptídeo ou proteína ativa calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico necessário.

O polipeptídeo ou proteína de acordo com uma modalidade da invenção pode ser administrado em vários intervalos e durante períodos de tempo diferentes conforme necessário. O técnico apreciará que certos fatores podem influenciar a dosagem e o tempo necessário para tratar efetivamente um indivíduo, incluindo, mas não limitado à severidade de uma doen-

ça ou desordem, aos tratamentos prévios, à saúde em geral e/ou à idade do indivíduo, e outras doenças presentes. Geralmente, o tratamento de um indivíduo com um polipeptídeo ou proteína conforme descrito neste documento pode incluir um tratamento único ou, em muitos casos, pode incluir uma série de tratamentos. Além disso, é compreendido que doses apropriadas podem depender da potência do polipeptídeo ou da proteína e podem ser adaptadas para o receptor particular, por exemplo, através da administração de doses crescentes até que uma resposta pré-selecionada desejada seja obtida. Entende-se que um nível de dose específico para qualquer indivíduo animal particular pode depender de uma variedade de fatores incluindo a atividade do polipeptídeo ou da proteína específica empregada, da idade, do peso corporal, da saúde geral, do sexo e da dieta do indivíduo, do tempo de administração, da via de administração, da taxa de excreção, de qualquer combinação de fármacos e do grau de expressão ou atividade a ser modulada.

A presente invenção inclui o uso de composições inventivas para tratamento de animais não-humanos. Consequentemente, doses e métodos de administração podem ser selecionados de acordo com princípios conhecidos de farmacologia veterinária e medicina. Instruções podem ser encontradas, por exemplo, em Adams, R. (ed.), *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 8ª edição, Iowa State University Press; ISBN: 0813817439; 2001.

Composições farmacêuticas inventivas podem estar incluídas em um recipiente, embalagem ou dispensador junto com instruções para administração.

Exemplos

Exemplo 1

BMP-12 foi imobilizada sobre esferas de Sepharose™ ativadas com NHS em uma proporção de cerca de 20 mg:4 ml e o meio resultante combinado com água ou tampão de salina neutra para preparar uma coluna. Meio condicionado com CHO adicionado com NaCl 1,2 M foi aplicado na coluna. Em alguns casos, o meio foi pré-concentrado com relação à BMP

antes da aplicação. A coluna foi lavada com 15 CV (volumes de coluna) de NaCl a 1,2 M em Na_2HPO_4 40 mM em pH 7,2, seguido por arginina 0,5 M / NaCl a 0,5 M em Tris 20 mM em pH 7,5 (15 CV) e uma lavagem com pouco sal (acetato de amônio a 50 mM em pH 7, 15 CV). A coluna foi eluída posteriormente com ácido acético, usando um gradiente de 5 CV para ácido acético a 50 mM em pH 3, seguido por captura de 15 CV. Finalmente, a coluna foi eluída com 15 CV da solução de ácido acético com cloridrato de guanidina a 6M (GuHCl).

BPM-3 foi capturada de forma eficaz pelo meio de cromatografia e eluída com ácido acético (Figura 3A). O eluato foi analisado usando HPLC. Como visto na Figura 3B, um fragmento de pró-peptídeo co-purifica junto com a proteína madura e agregados de resíduos de BMP-3 madura também foram observados no pico da guanidina.

Exemplo 2

BMP-2 foi imobilizada sobre esferas de sefarose como no Exemplo 1 e usadas para testar a aplicação e a eluição de BMP-3. Como mostrado na Figura 4, BMP-3 foi eficazmente capturada pela solução de força iônica alta e foi eluída com ácido acético. Como para a coluna de BMP-12, um fragmento de pró-peptídeo co-purifica junto com a proteína madura e agregados de resíduos de BMP-3 madura também foram observados no pico da guanidina.

Exemplo 3

BMP-12 foi aplicada e eluída de uma coluna de afinidade com BMP-12 como no Exemplo 1. BMP-12 foi eficazmente capturada pela coluna usando uma solução com muito sal e eluída com ácido acético e guanidina (Figura 5). Ambas as formas monomérica e dimérica de BMP-12 foram capturadas.

Exemplo 4

BMP-12 foi aplicada e eluída de uma coluna de afinidade com BMP-2 como nos Exemplos 1 e 2. BMP-12 foi eficazmente capturada pela coluna usando uma solução de elevada força iônica e foi eluída com ácido acético e guanidina (Figura 6).

Exemplo 5

Resinas de afinidade com BMP usando BMP-12 e BMP-2 foram preparadas como descrito nos Exemplos 1 e 2 e usadas para preparar colunas de HPLC. Essas colunas foram aplicadas com BMP-3 e BMP-12. Como
5 mostrado na Figura 7, BMP-12 e BMP-2 foram igualmente eficazes como ligantes de afinidade para HPLC de fase reversa. Em alguns casos, técnicas de cromatografia por exclusão de tamanho ou de fase reversa foram empregadas para aumentar a purificação.

Exemplo 6

10 Um mutante do peptídeo *finger-1* de BMP-2 (SDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGEK) foi ligado a esferas de sefarose através de uma lisina C-terminal em uma proporção de 5 mg de peptídeo/mL de resina. 4 mL da resina resultante (1,6 x 2,0 cm) foram usados para preparar uma coluna. A coluna foi aplicada com BMP-3 e eluída como no Exemplo 1. Como mos-
15 trado na Figura 8, BMP-3 foi eficazmente capturada pela coluna usando solução com concentração alta de sal e eluída, junto com um fragmento de pró-peptídeo, e ácido acético. Em geral, cromatografia com os peptídeos imobilizados forneceu um produto de pureza mais elevada do que a proteína total.

Exemplo 7

Um peptídeo *finger 1* de BMP-12 selvagem (KELGWDDWIIA-PLDYEAYHCEGLC) foi usado para purificar BMP-3 como no Exemplo 1. Como mostrado na Figura 9, BMP-3 foi eficazmente capturada pela coluna usando a solução com alta concentração de sal e eluída em ácido acético.
25 Foi eluído menos do fragmento de pró-peptídeo do que no Exemplo 6. Em geral, BMP-12 imobilizada foi menos eficaz do que BMP-2 mutante. SDS-PAGE mostrou que o peptídeo de BMP-12 imobilizado oligomerizou, talvez devido aos resíduos livres de cisteína.

Exemplo 8

30 BMP-12 foi purificada usando uma coluna preparada com o peptídeo mutante de BMP-2 descrito no Exemplo 6. Como mostrado na Figura 10, BMP-12 foi eficazmente capturada pela coluna com o uso de solução

com alta concentração de sal e eluída com ácido acético. Uma pequena quantidade de BMP-12 eluiu com GuHCl a 6M.

Exemplo 9

5 BMP-12 foi purificada usando uma coluna preparada com o peptídeo selvagem de BMP-12 descrito no Exemplo 7. Como mostrado na Figura 11, BMP-12 foi eficazmente capturada pela coluna usando a solução de alta força iônica e eluída com ácido acético. Uma pequena quantidade de BMP-12 eluiu com GuHCl a 6M.

Exemplo 10

10 GDF-9 foi purificada usando uma coluna preparada com o primeiro peptídeo *finger* mutante de BMP-2 descrito no Exemplo 6. Como mostrado na Figura 12, GDF-9 foi eficazmente capturada pela coluna usando uma solução com alta concentração de sal e eluída com arginina a 500 mM e com ácido acético. Um contaminante de menor peso molecular também
15 estava presente.

Exemplo 11- apresentado em exemplos previstos para os mutantes de peptídeos remanescentes

Resinas de afinidade para BMP são preparadas usando um ou mais dos seguintes peptídeos:

BMP2	Fing1	WT	SDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGEC
BMP2	Fing1	Mut1	SDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGEK
BMP2	Fing1	Mut2	SDVGANDWIVAPPGYHAFYCHGEC
BMP2	Fing1	Mut3	SDVGANDWIVAPPGYHAFYCHGEK
BMP2	Fing1	Mut4	SDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHAEC
BMP2	Fing1	Mut5	SDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHAEK
BMP2	Fing1	Mut6	SDVGANDWIVAPPGYHGFYCHGEC
BMP2	Fing1	Mut7	SDVGANDWIVAPPGYHGFYCHGEK
BMP2	Fing1	WT	LYVDFSDVGWNDWIVAPPGYHAFY
BMP2	Fing1	Mut1	LYVDFSDVGANDWIVAPPGYHAFY
BMP2	Fing1	Mut2	LYVDFSDVGWNDWIVAPPGYHGFY

BMP12	Fing1	WT	<u>KELGWDDWIIAPLDYEAYHCEGLC</u>
BMP12	Fing1	Mut1	<u>KELGWDDWIIAPLDYEAYHCEGLK</u>
BMP12	Fing1	Mut2	<u>AELGWDDWIIAPLDYEAYHCEGLK</u>
BMP3	Fing1	WT	<u>ADIGWSEWIIISPKSFDAYYCSGAC</u>
BMP3	Fing1	Mut1	<u>ADIGWSEWIIISPKSFDAYYCSGAK</u>

Tabela 1: Sequências de Peptídeos Exemplares para Preparação de Resinas de Afinidade

Exemplo 12

- 5 *Rastreamento de Solubilidade de BMP* – Um robô para manipulação de líquidos Tecan foi usado para misturar uma placa master de reagentes, 800 a μL x concentração de 1,25 (para cada solução; vide Tabelas 2 e 3), cada uma em tampão Tris 50 mM em pH 8. Um pipetador de 8 canais foi usado para transferir 80 a μL de material da placa master para a metade
- 10 da área de uma microplaca UV, a partir da qual foi lida A_{320} de cada amostra para definir um branco. Um pipetador de repetição foi usado para adicionar 20 a μL de BMP-12 a 2,5 mg/ml em TFA 0,1% para fazer uma solução de 0,5 mg/ml, que foi então agitada a 14.000 rpm. A absorção de UV (A_{320}) foi lida e a absorção do branco foi subtraída para determinar a solubilidade. O
- 15 procedimento foi repetido com uma faixa mais ampla de concentrações de 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD) e um grupo melhor de concentrações de sal (Tabela 4), Um gráfico que compara a turvação de soluções de BMP-12 com relação às concentrações de NaCl e MPD é mostrado na Figura 13.

NaCl, M	1-Propanol, %					
	0	2,5	5	10	15	25
0	1,724	1,848	2,134	2,000	3,172	1,419
0,1	1,745	2,135	2,212	1,945	3,199	0,104
0,25	1,804	2,397	2,300	2,105	1,392	0,022
0,5	1,953	2,170	1,629	1,313	0,305	-0,001
0,75	1,911	2,023	1,541	1,032	0,094	-0,003
1	1,988	1,601	1,817	1,000	0,040	-0,010

1,25	1,702	1,376	1,643	1,018	0,033	0,022
1,5	1,981	1,358	1,598	0,973	0,036	0,478

Tabela 2

NaCl, M	2-Metil-2,4-pentanodiol, %					
	2,5	5	10	15	20	25
0	1,936	2,122	2,148	2,035	2,136	2,631
0,1	1,900	2,338	2,341	2,287	2,573	0,715
0,25	2,061	2,399	2,434	2,433	1,006	0,119
0,5	2,045	2,414	2,258	1,420	0,165	0,020
0,75	1,985	2,076	2,211	0,818	0,099	0,001
1	2,133	1,903	2,110	0,400	0,089	-0,015
1,25	1,819	1,643	1,688	0,257	0,040	-0,011
1,5	1,767	1,521	1,798	0,227	0,045	0,003

Tabela 3

NaCl, M	2-Metil-2,4-pentanodiol, %									
	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40	45
0,00	1,936	2,122	2,148	2,035	2,136	2,631	3,443	3,006	3,519	3,308
0,05	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	1,994	0,979	0,376	0,330	0,318
0,10	1,900	2,338	2,341	2,287	2,573	0,626	0,206	0,150	0,083	0,087
0,25	2,061	2,399	2,434	2,433	1,006	0,047	- 0,015	- 0,065	0,015	- 0,012
0,50	2,045	2,414	2,258	1,420	0,165	0,038	- 0,091	0,026	0,024	- 0,008
0,75	1,985	2,076	2,211	0,818	0,099	0,001				
1,00	2,133	1,903	2,110	0,400	0,089	-0,015				
1,25	1,819	1,643	1,688	0,257	0,040	-0,011				
1,50	1,767	1,521	1,798	0,227	0,045	0,003				

5 Tabela 4

Exemplo 13

Resinas de afinidade foram acopladas com os peptídeos listados na Tabela 5. As resinas acopladas, mais uma resina não conjugada para uso como um controle, foram suspensas em etanol 16%, NaCl a 150 mM e tampão Tris a 20 mM em pH 7,5 em uma proporção de 25% v/v (por exemplo,

10

25% de etanol, 75% de tampão Tris). Um robô para manipulação de líquidos Tecan foi empregado para aliquotar 200 μ L de cada pasta em um das oito fileiras de uma placa de filtro de poliestireno de 96 poços (filtros hidrofílicos de 0,45 μ m, número de catálogo da Whatman 770-1806). Centrifugação a 1200 g por 3 min removeu a fase líquida, deixando 50 μ L de resina úmida sobre os filtros. As resinas foram então equilibradas com os tampões de corrida listados na Tabela 6 (K é o coeficiente que caracteriza a força de ligação de proteína a uma resina em particular em um tampão em particular). Uma placa aplicada com BMP-12 foi preparada pela adição de 40 μ L de solução de cromatografia de exclusão de tamanho de baixo peso molecular (LMW SEC) (BEP, dialisada em TFA 0,1% e concentrada para 3,76 mg/mL) a 260 μ L de cada tampão de corrida em uma placa de 96 poços, resultando em 0,48 mg/ml de proteína em cada poço. As resinas foram aplicadas pela transferência de 150 μ L da placa de aplicação para a placa de filtro e então incubando por 20 min sobre uma plataforma de agitação para facilitar a ligação. A placa de filtro foi centrifugada e o filtrado coletado em uma placa UV de 96 poços. A concentração de proteína no filtrado ou fluxo de passagem foi calculada como $(A_{280}-A_{320})/1,3$. A placa de filtro foi então lavada com 150 μ L de ácido acético a 100 mM, seguido por 150 μ L de guanidina-HCl a 4M e acetato de sódio a 50 mM em pH 4,0. A concentração de proteína foi medida no novo filtrado como descrito acima. Como mostrado na Tabela 6, as resinas acopladas aos peptídeos 747, 747, 748 e 749 se ligam a BMP-12 com alta afinidade nos tampões de corrida 1 a 5. Entretanto, para os peptídeos 750 e 751, a ligação foi forte em MES a 25 mM em pH 6 mas fraca em ácido acético a 50 mM com NaCl a 0,1 M em pH 3,0, o que pode permitir um processo ligação-eluição eficaz sem a necessidade de reagentes caotrópicos ou orgânicos. As amostras do fluxo de passagem e de eluição com ácido acético da coluna 4 da placa (aplicada com MES pH 6) foram analisadas sobre um gel (Figura 14).

Nome do peptídeo	ID	Peptídeo
BMP2 N-trun 1S	751	Ac-SDVGWNDWIVAPPGYHAFYSHGEK
BMP2 N-trun 1	750	Ac-SDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGEK
BMP12 N-trun_1S	749	Ac-ELGWDDWIIAPLDYEAYHSEGLK
BMP5	748	Ac-RDLGWQDWIIAPEGYAAFYSDGEK
BMP2 Full	747	Ac-LYVDFSDVGWNDWIVAPPGYHAFYSHGEK
BMP2 C-trunc_2	746	Ac-LYV**SDVGWNDWIVK
BMP2 N-trunc_2	745	Ac-VAPPGYHAFYSHGEK

Tabela 5

Condições de corrida*	1	2	3	4	5	6	10	11	12
Resina	Ácido acético 50 mM, NaCl a 0,1 M, pH 2,9	Ácido acético 50 mM, NaCl a 0,1 M, pH 2,9	Acetato de sódio 25 mM pH 5,0	MES 25 mM pH 6,0	HEPES 25 mM pH 7,0	CHES 1M pH 9,7	Tris 50 mM, NaCl a 0,1 M, MPD 40% pH 8,0	NaCl a 0,25M, MDP 30%, pH 8,0	Tris 50 mM, NaCl a 0,1M, MPD 20% pH 8,0
Concentração do fluxo da passagem (flow-through), mg/mL	0,425	0,408	0,410	0,397	0,396	0,686	0,488	0,482	0,467
	0,397	0,410	0,407	0,426	0,397	0,626	0,464	0,431	0,435
	0,150	0,052	0,070	0,029	0,162	0,710	0,505	0,515	0,486
	0,114	0,029	0,046	0,035	0,103	0,659	0,482	0,450	0,438
	0,106	0,023	0,024	0,022	0,055	0,626	0,407	0,375	0,383
	0,175	0,050	0,032	0,025	0,116	0,653	0,434	0,416	0,404
	0,337	0,164	0,163	0,037	0,290	0,577	0,423	0,342	0,364
	0,349	0,156	0,124	0,035	0,216	0,647	0,435	0,425	0,411

K do fluxo de passagem	Controle	0	1	1	1	1	1	1	0	0
	745	1	1	1	0	1	1	0	0	0
	746	7	25	18	47	6	6	0	0	0
	747	10	47	28	38	11	11	0	0	0
	748	11	59	57	62	23	23	1	1	1
	749	5	26	42	56	9	9	0	0	1
	750	1	6	6	36	2	2	0	1	1
	751	1	6	9	38	4	4	0	0	1
Concentração de eluição de HAc 100 mM, mg/mL	Controle	0,066	0,064	0,070	0,129	0,073	0,073	0,129	0,073	0,073
	745	0,058	0,057	0,073	0,104	0,077	0,077	0,104	0,077	0,077
	746	0,154	0,208	0,296	0,320	0,249	0,249	0,320	0,249	0,249
	747	0,123	0,147	0,274	0,304	0,255	0,255	0,304	0,255	0,255
	748	0,123	0,151	0,264	0,304	0,257	0,257	0,304	0,257	0,257
	749	0,098	0,175	0,275	0,321	0,280	0,280	0,321	0,280	0,280
	750	0,096	0,194	0,226	0,311	0,187	0,187	0,311	0,187	0,187
	751	0,102	0,219	0,285	0,355	0,254	0,254	0,355	0,254	0,254

* Condições de corrida que desenvolveram precipitação:

HEPES 50 mM, NaCl 0,5 M, 1-propanol 25%, pH 7,0

Tris 50 mM, NaCl 0,5 M, IPA 25%, pH 8,6

HEPES 50 mM, NaCl 0,5 M, tert-butanol 25%, pH 7,0

		0	0	0	0	0	0	-1	0
K de eluição de HAc 100 mM	Controle	0	0	0	0	0	0	-1	0
	745	1	1	0	0	0	0	-1	0
	746	3	3	0	1	0	0	1	1
	747	6	6	0	2	0	0	1	1
	748	6	6	0	2	0	0	2	2
	749	6	4	0	2	0	0	1	1
	750	1	2	0	1	0	0	1	0
	751	1	1	0	1	0	0	1	0

Controle	108	103	105	116	102
	745	100	103	105	116
746	91	88	97	87	100
747	81	68	90	88	90
748	85	84	89	87	87
749	86	88	90	88	102
750	100	93	96	85	109
751	104	97	100	92	107

Rendimento, %

Tabela 6

Outras modalidades da invenção ficarão claras para aqueles versados na técnica a partir de uma consideração da relatório descritivo ou da prática da invenção descrita neste documento. É pretendido que o relatório descritivo e os exemplos sejam considerados apenas exemplares, com o verdadeiro escopo e espírito da invenção sendo indicados pelas reivindicações a seguir.

Listagem de Sequência

<110> LU, ZHIJIAN
 LIU, WEI
 ZHANG, JIMIN
 YAWORSKY, PAUL JOHN
 OLLAND, STEPHANE H.
 BROWN, CHRISTOPHER TODD
 SHEN, EMILY SHENG-MING

<120> USO DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS DA SUPERFAMÍLIA DE TGF-BETA PARA MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO E TERAPÊUTICOS

<130> 08702.0213-00000

<140> 11/809,383

<141> 2007-06-01

<150> 60/810,798

<151> 2006-06-02

<160> 23

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 24

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<400> 1

Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr His
 1 5 10 15

Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Lys
 20

<210> 2

<211> 24

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<400> 2

Lys Glu Leu Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Asp Tyr Glu
 1 5 10 15

Ala Tyr His Cys Glu Gly Leu Cys
 20

<210> 3
<211> 24
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<400> 3
Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr His
1 5 10 15

Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys
20

<210> 4
<211> 24
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<400> 4
Ser Asp Val Gly Ala Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr His
1 5 10 15

Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys
20

<210> 5
<211> 24
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<400> 5
Ser Asp Val Gly Ala Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr His
1 5 10 15

Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Lys
20

<210> 6
<211> 24
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<400> 6

Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr His
 1 5 10 15

Ala Phe Tyr Cys His Ala Glu Cys
 20

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<400> 7

Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr His
 1 5 10 15

Ala Phe Tyr Cys His Ala Glu Lys
 20

<210> 8

<211> 24

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<400> 8

Ser Asp Val Gly Ala Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr His
 1 5 10 15

Gly Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys
 20

<210> 9

<211> 24

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<400> 9

Ser Asp Val Gly Ala Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr His
 1 5 10 15

Gly Phe Tyr Cys His Gly Glu Lys
20

<210> 10
<211> 24
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<400> 10
Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala
1 5 10 15

Pro Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr
20

<210> 11
<211> 24
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<400> 11
Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Ala Asn Asp Trp Ile Val Ala
1 5 10 15

Pro Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr
20

<210> 12
<211> 24
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<400> 12
Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala
1 5 10 15

Pro Pro Gly Tyr His Gly Phe Tyr
20

<210> 13
 <211> 24
 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>
 <223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<400> 13
 Lys Glu Leu Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Asp Tyr Glu
 1 5 10 15

Ala Tyr His Cys Glu Gly Leu Lys
 20

<210> 14
 <211> 24
 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>
 <223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<400> 14
 Ala Glu Leu Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Asp Tyr Glu
 1 5 10 15

Ala Tyr His Cys Glu Gly Leu Lys
 20

<210> 15
 <211> 24
 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>
 <223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<400> 15
 Ala Asp Ile Gly Trp Ser Glu Trp Ile Ile Ser Pro Lys Ser Phe Asp
 1 5 10 15

Ala Tyr Tyr Cys Ser Gly Ala Cys
 20

<210> 16
 <211> 24
 <212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<400> 16

Ala	Asp	Ile	Gly	Trp	Ser	Glu	Trp	Ile	Ile	Ser	Pro	Lys	Ser	Phe	Asp
1				5					10					15	

Ala	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Gly	Ala	Lys
			20				

<210> 17

<211> 24

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<220>

<223> Acetilação n-term

<400> 17

Ser	Asp	Val	Gly	Trp	Asn	Asp	Trp	Ile	Val	Ala	Pro	Pro	Gly	Tyr	His
1				5					10					15	

Ala	Phe	Tyr	Ser	His	Gly	Glu	Lys
			20				

<210> 18

<211> 24

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<220>

<223> Acetilação n-term

<400> 18

Ser	Asp	Val	Gly	Trp	Asn	Asp	Trp	Ile	Val	Ala	Pro	Pro	Gly	Tyr	His
1				5					10					15	

Ala	Phe	Tyr	Cys	His	Gly	Glu	Lys
			20				

<210> 19

<211> 23

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>
 <223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<220>
 <223> Acetilação n-term

<400> 19
 Glu Leu Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Asp Tyr Glu Ala
 1 5 10 15
 Tyr His Ser Glu Gly Leu Lys
 20

<210> 20
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<220>
 <223> Acetilação n-term

<400> 20
 Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala
 1 5 10 15
 Ala Phe Tyr Ser Asp Gly Glu Lys
 20

<210> 21
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
 <223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<220>
 <223> Acetilação n-term

<400> 21
 Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala
 1 5 10 15
 Pro Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr Ser His Gly Glu Lys
 20 25

<210> 22
<211> 14
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<220>
<223> Acetilação n-term

<400> 22
Leu Tyr Val Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Lys
1 5 10

<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Descrição da sequência artificial: Peptídeo sintético

<220>
<223> Acetilação n-term

<400> 23
Val Ala Pro Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr Ser His Gly Glu Lys
1 5 10 15

REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeo isolado, caracterizado pelo fato de que compreende uma seqüência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 1, 4-9, 11, 12, 13, 14, 3 16-23.

5 2. Peptídeo isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a seqüência de aminoácido compreende pelo menos 8 resíduos de aminoácidos contíguos.

 3. Peptídeo isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a seqüência de aminoácido compreende pelo menos
10 16 resíduos de aminoácidos contíguos.

 4. Peptídeo isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a seqüência de aminoácido compreende pelo menos 24 resíduos de aminoácidos contíguos.

 5. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um
15 peptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 em combinação com um segundo agente selecionado do grupo que consiste em um veículo, uma população de células, uma BMP, uma população de receptores da superfamília TGF β , e uma molécula pequena usada para inibir a ligação do receptor da superfamília TGF β .

20 6. Composição de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que é ligada a uma resina de cromatografia.

 7. Composição de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que o veículo é um solvente, um gel, um polímero, um osso desmineralizado, uma sutura, uma tela cirúrgica, uma cerâmica, uma micela,
25 uma solução tampão, um colágeno, uma esponja de colágeno, um material baseado em celulose, ou qualquer combinação dos acima.

 8. Composição de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que o veículo compreende uma ou mais de alquilcelulose (incluindo hidroxialquilcelulose), incluindo metilcelulose, etilcelulose, hidroxietilcelulose, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, e/ou carboximetilcelulose.
30 lose.

 9. Composição de acordo com a reivindicação 5, caracterizada

pelo fato de que o veículo compreende poligliconato, ácido hialurônico, ácido polilático, poli(etileno)glicol, alginato de sódio, poli(etileno)glicol, óxido de polioxietileno, polímero de carboxivinila, ou poli(vinil álcool).

5 10. Composição de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que o peptídeo é estabilizado por um poli(propileno glicol) conjugado, um grupo sialila conjugado, uma cadeia de polisialila conjugada, incorporação de aminoácidos modificados, incorporação de aminoácidos não-naturais, ligações covalentes intercadeia, ligações covalentes intracadeia, ligações não-covalentes intercadeia, ligações não covalentes intercadeia,
10 e/ou um intensificador de apresentação.

11. Ácido nucléico isolado, caracterizado pelo fato de que compreende uma seqüência que codifica o peptídeo como definido na reivindicação 1.

12. Método de purificar uma proteína na superfamília do fator beta de transformação do crescimento (TGF- β) a partir de uma amostra, caracterizado pelo fato de que compreende:

prover uma coluna de cromatografia contendo uma resina de cromatografia derivatizada com um peptídeo como definido na reivindicação 1.

20 carregar a coluna com a amostra;
e eluir a proteína a partir da coluna.

13. Método de estabilizar uma solução contendo uma proteína na superfamília TGF- β , caracterizado pelo fato de que compreende adicionar uma concentração pré-determinada de um peptídeo como definido na reivindicação 1 à solução.

25 14. Método de acordo com a reivindicação 12 ou 13, caracterizado pelo fato de que a proteína na superfamília TGF- β é uma BMP ou um fator de diferenciação do crescimento (GDF).

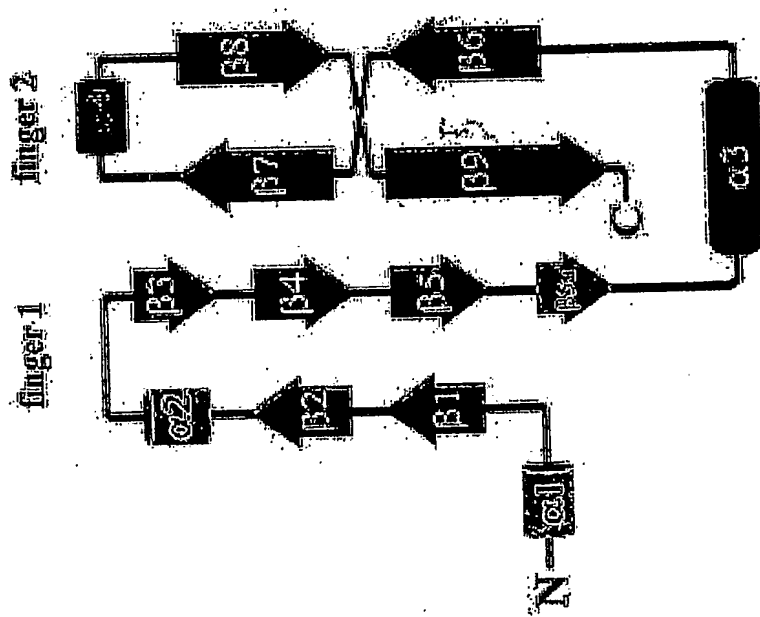


FIG. 1

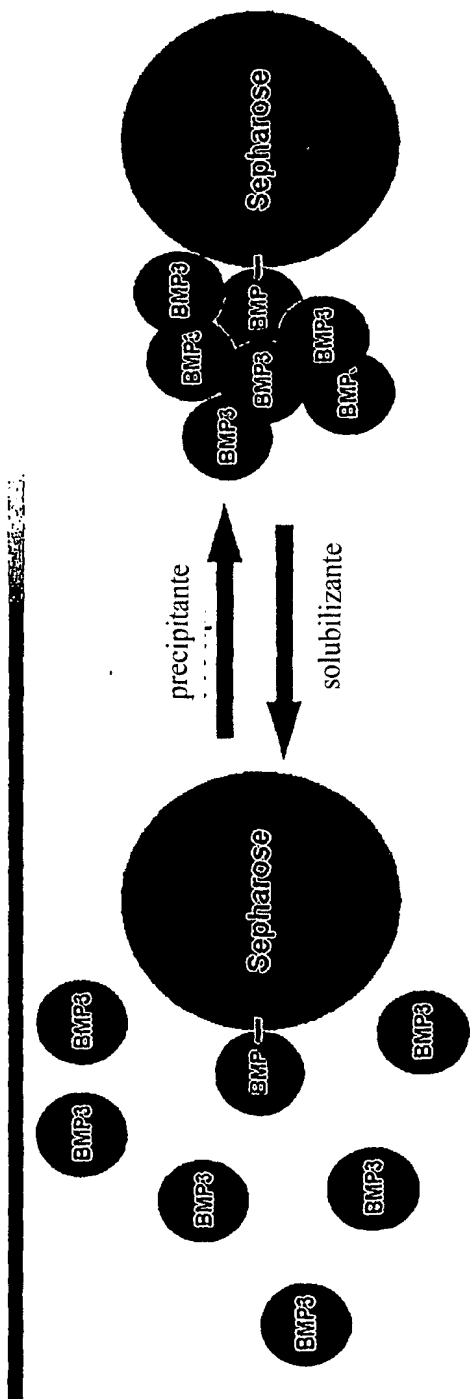


FIG. 2

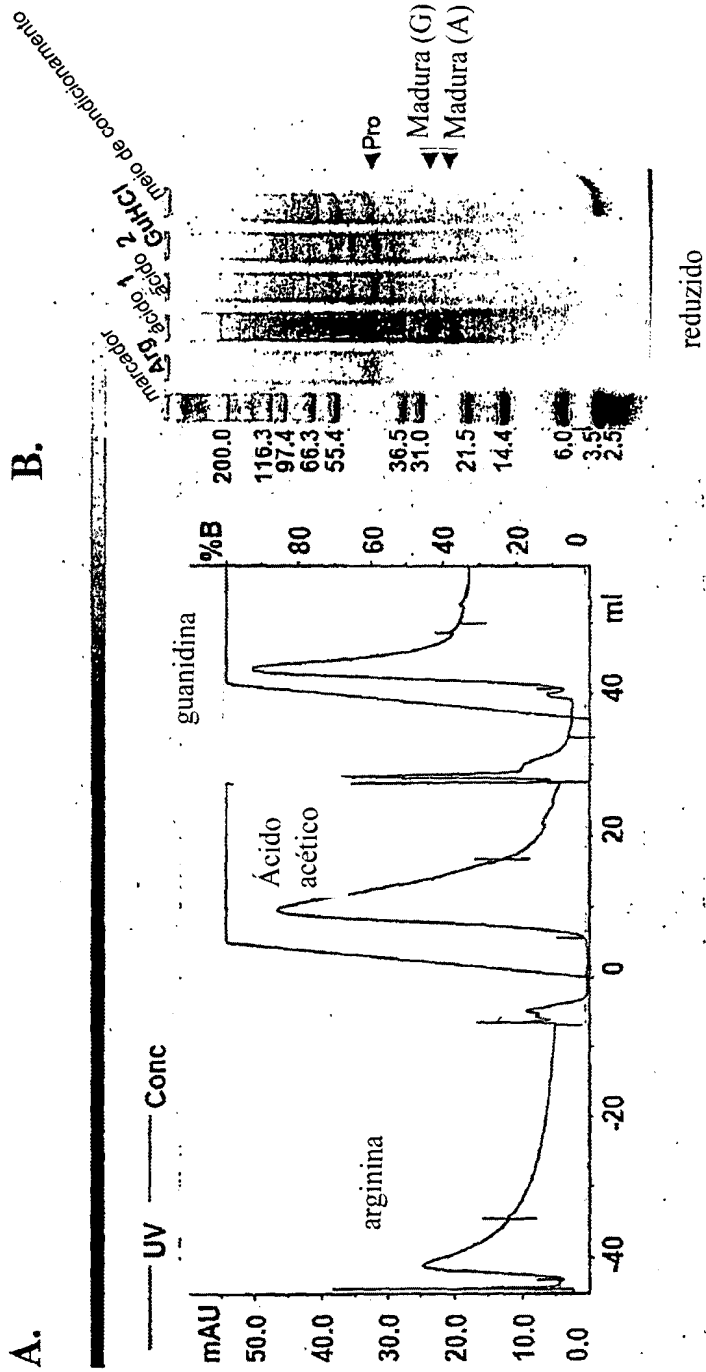
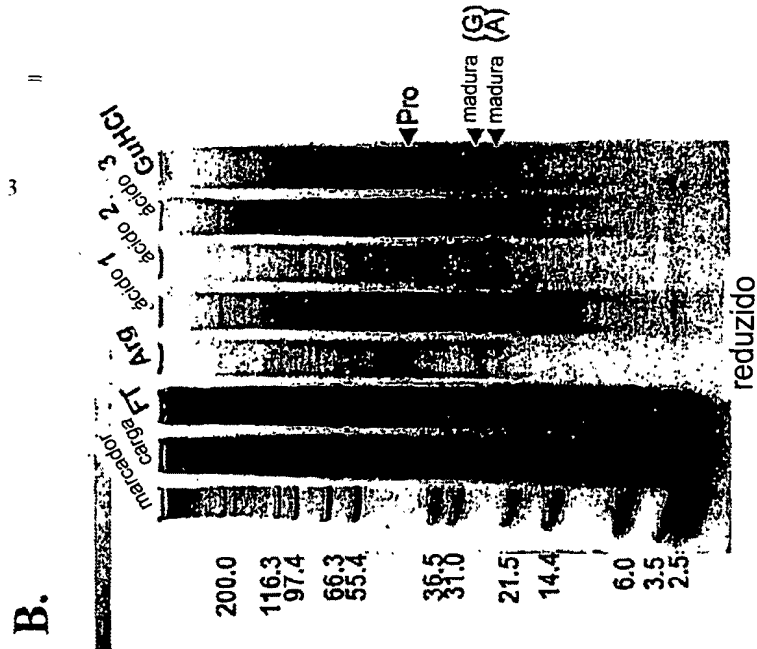


FIG. 3



B.

A.

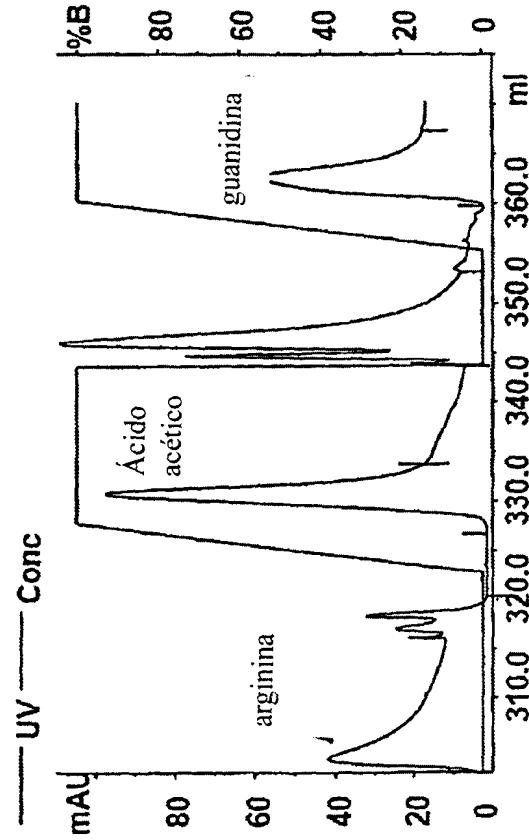


FIG. 4

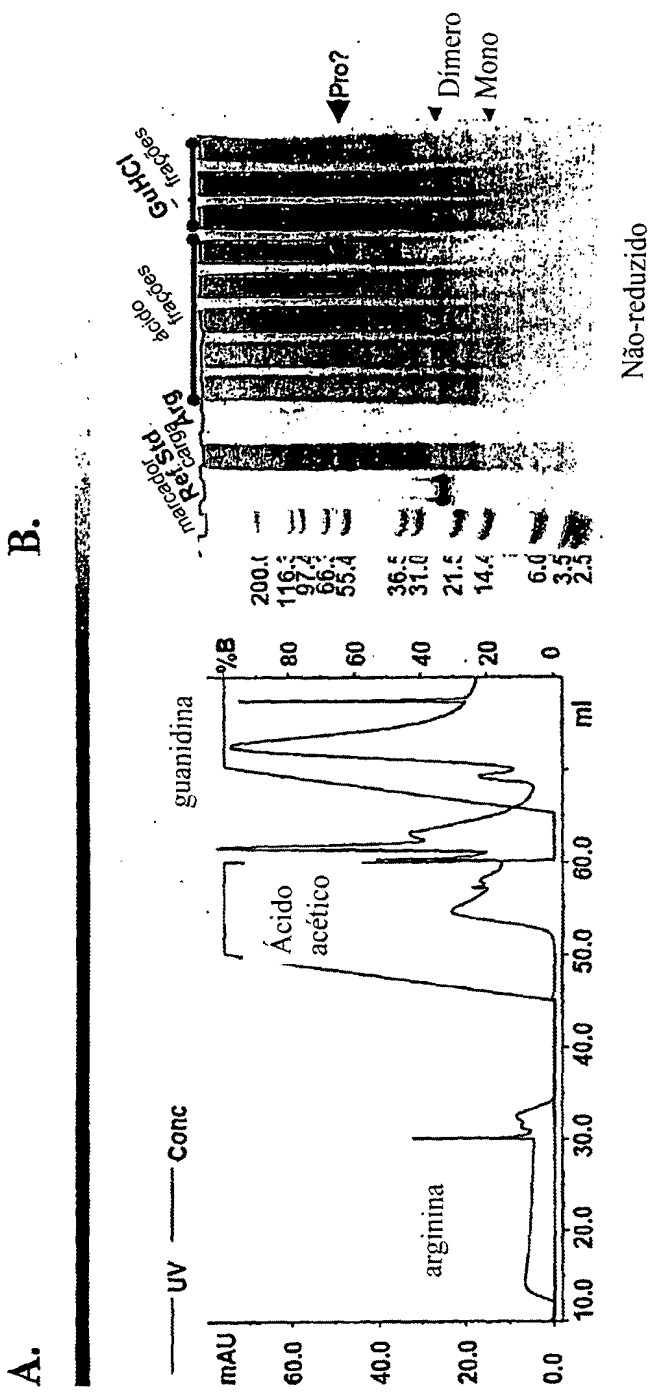
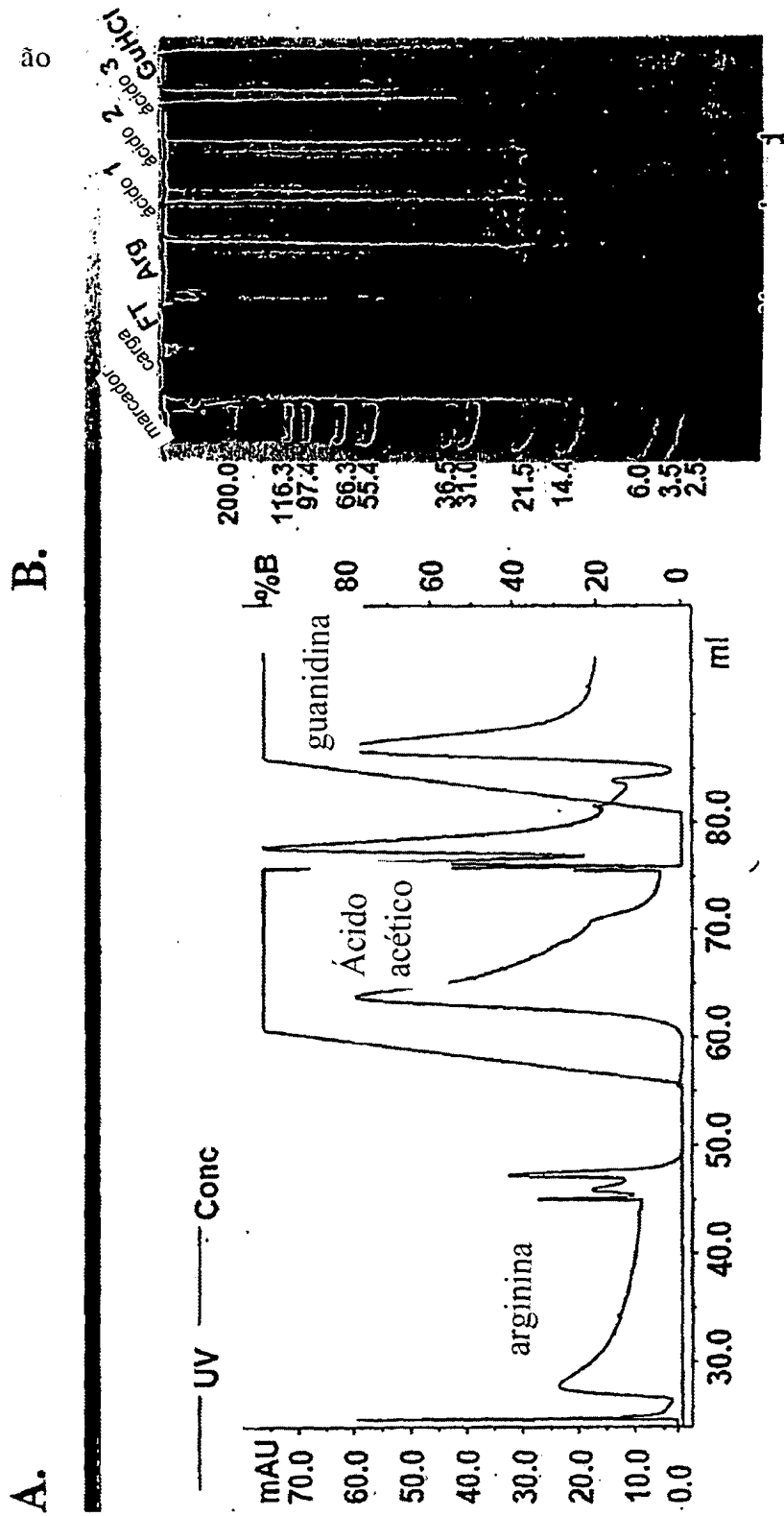


FIG. 5



Não-reduzido

FIG. 6

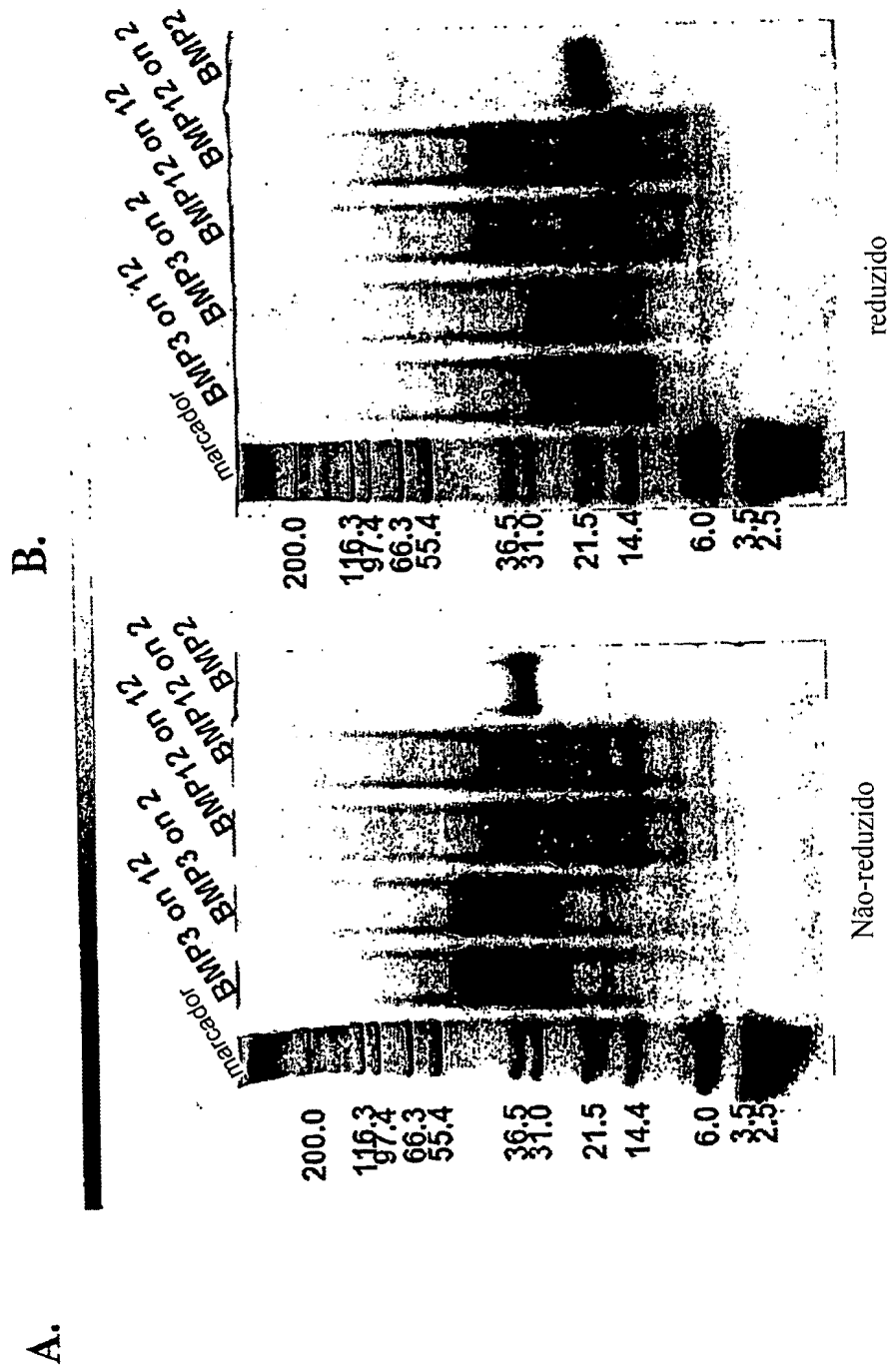
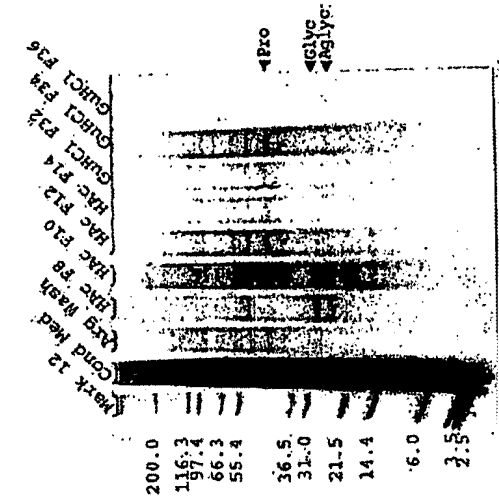


FIG. 7

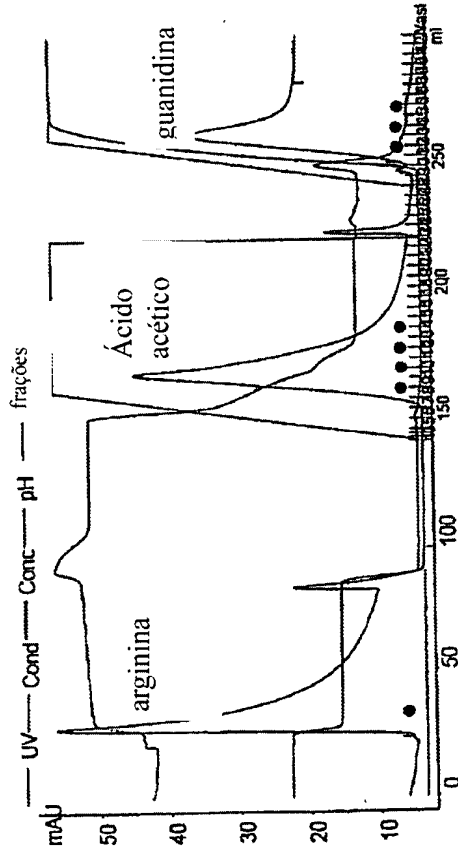
B.

BMP-3: Purificação por afinidade com 1° peptídeo
finger Mut1 de BMP-2



Aplicação de 20 µL de concentrado 10X reduzido

A.



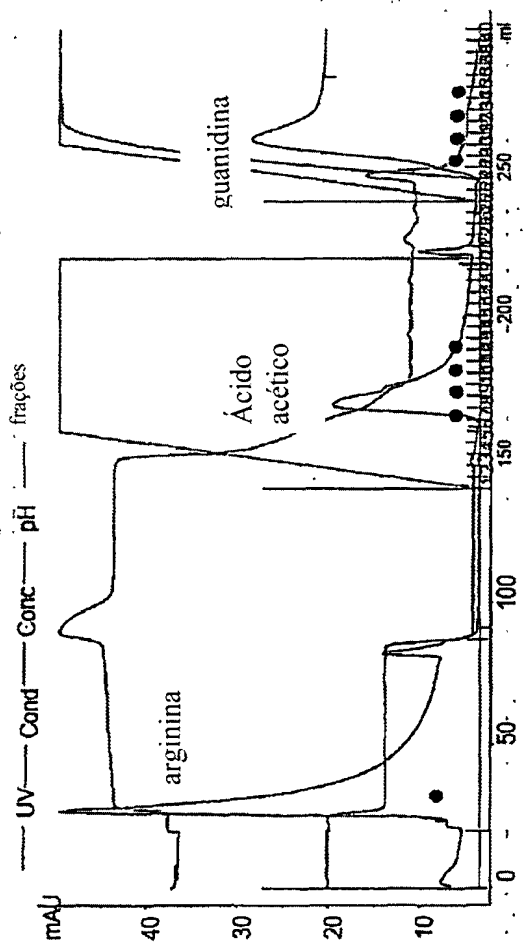
BMP2 Fing1 Mut1: SDVGWNDWIIVAPPGYHAFYCHGEK

(Ligado através da lisina C-terminal)

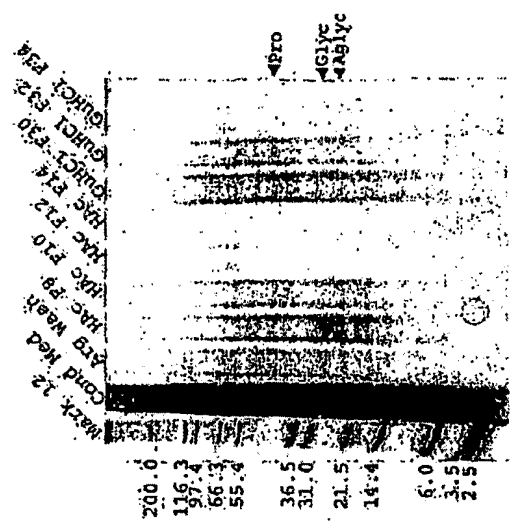
FIG. 8

A. B.

BMP-3: Purificação por afinidade com 1° peptídeo
finger WT de BMP-12



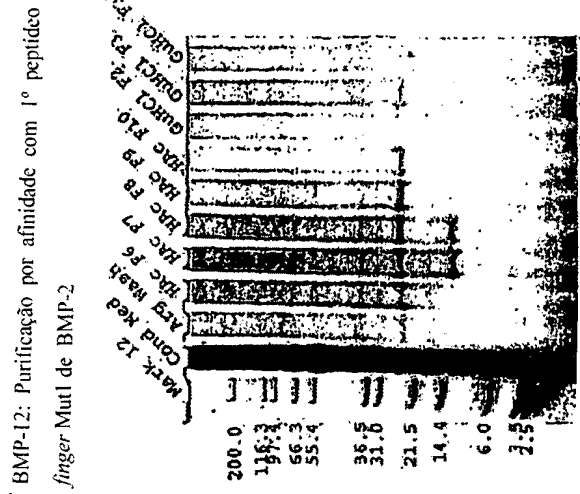
BMP12 Fing1 WT: KELGWDDWIIAFLDYEAYHCEGLC
(Ligado através da lisina N-terminal)



Aplicação de 20 µL de concentrado 10X reduzido

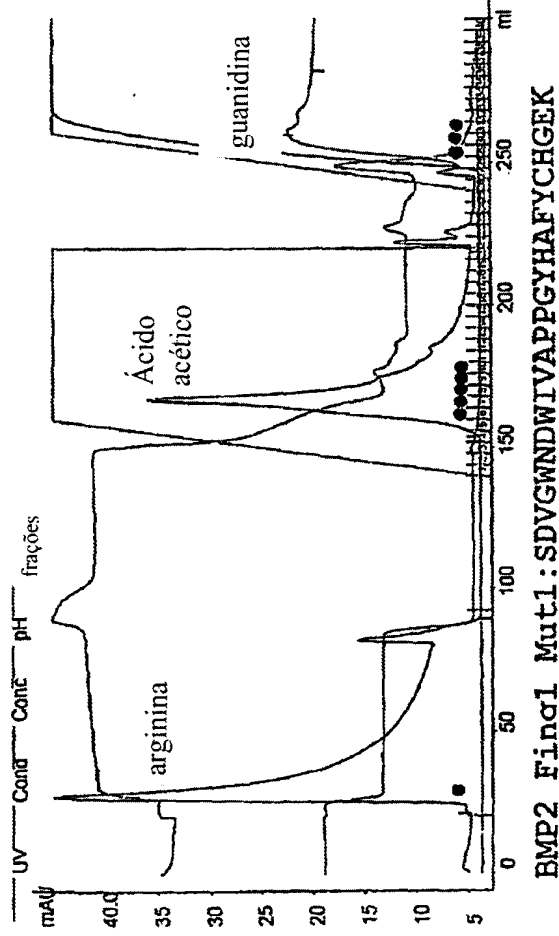
FIG. 9

B.



Aplicação de 20 µl. de concentrado 10X. não-reduzido

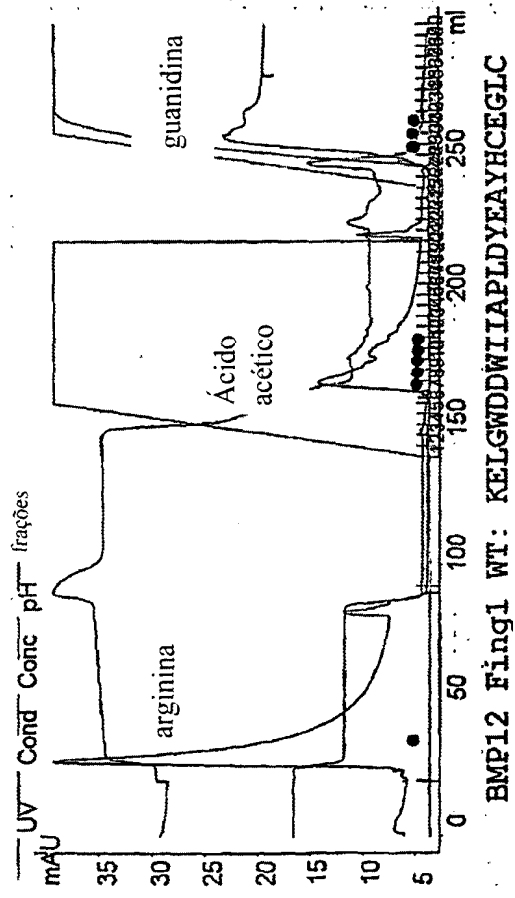
A.



(Ligado através da lisina C-terminal)

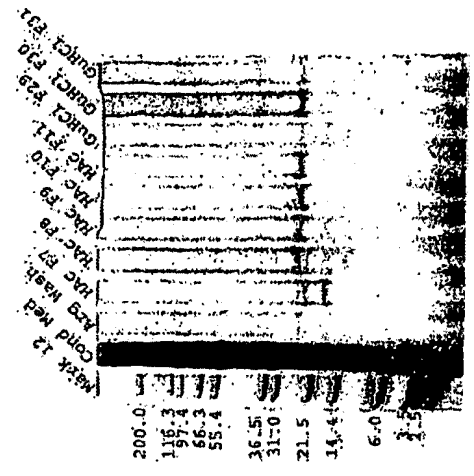
FIG. 10

A.



B.

BMP-12: Purificação por afinidade com 1º peptídeo
finger WT de BMP-12



Aplicação de 20 µl. de concentrado 10X, não-reduzido

FIG. 11

(Ligado através da lisina N-terminal)

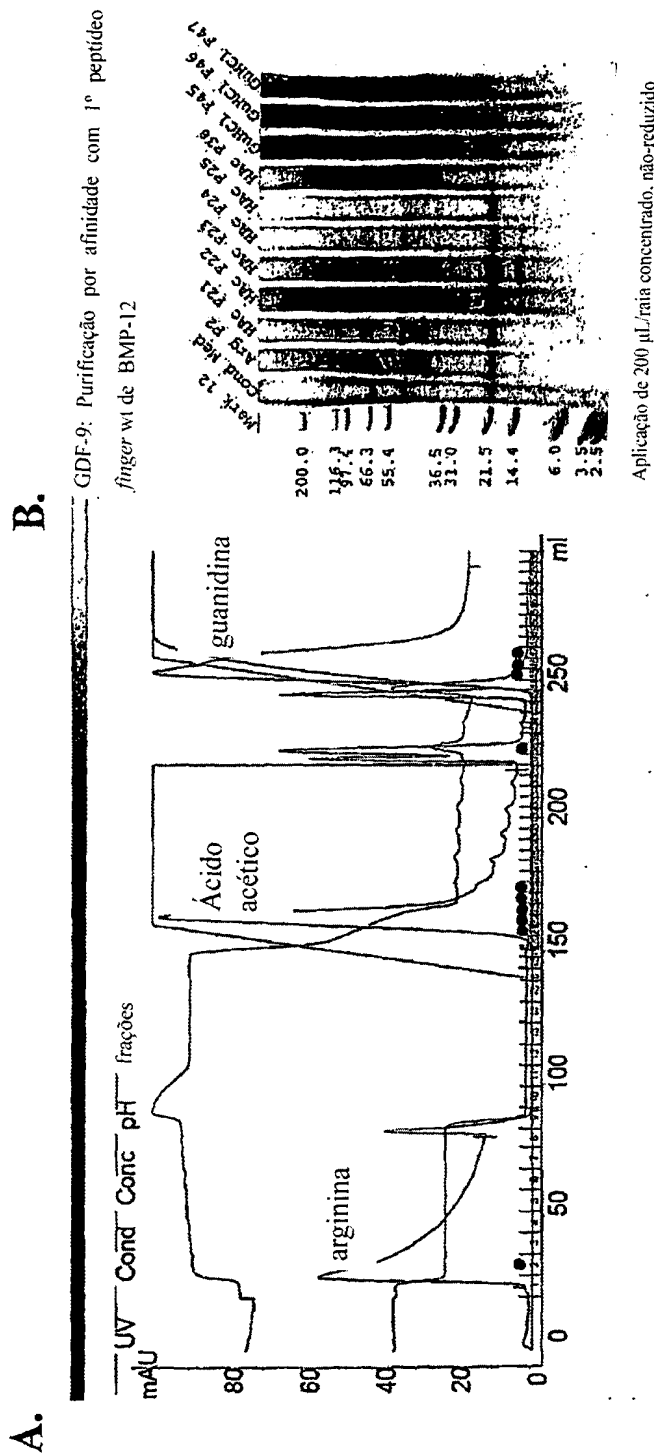


FIG. 12

Turvação de BMP-12 a 0,5 mg/mL vs. [NaCl] e [MPD]

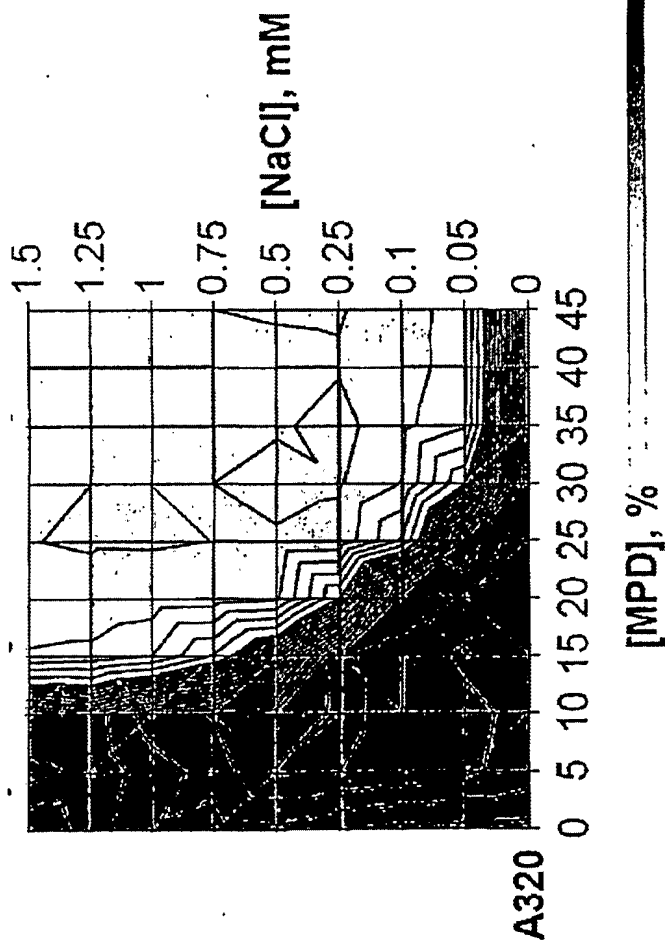


FIG. 13

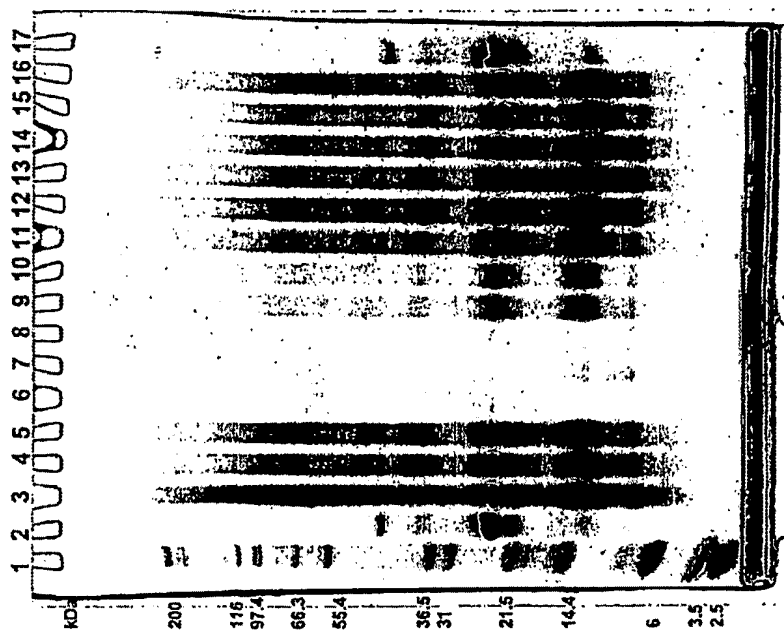


FIG. 14

RESUMO

Patente de Invenção: "PEPTÍDEO ISOLADO, COMPOSIÇÃO COMPRE-
ENDENDO O REFERIDO PEPTÍDEO, ÁCIDO NUCLÉICO ISOLADO E
MÉTODOS DE PURIFICAR UMA PROTEÍNA NA SUPERFAMÍLIA DO FA-
5 TOR BETA DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO (TGF-B) E DE
ESTABILIZAR UMA SOLUÇÃO CONTENDO UMA PROTEÍNA NA SU-
PERFAMÍLIA TGF-B".

A presente invenção refere-se a membros da superfamília de
TGF- β e fragmentos de peptídeo baseados nas proteínas membro que são
10 empregados para purificar soluções contendo proteínas membro ou como
terapêuticos.