

(11) Número de Publicação: **PT 1948689 E**

(51) Classificação Internacional:

C07K 14/51 (2011.01) **A61K 38/18** (2011.01)
A61P 19/00 (2011.01) **A61P 19/10** (2011.01)
A61P 25/00 (2011.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2006.11.17**

(30) Prioridade(s): **2005.11.18 EP 05025261**

(43) Data de publicação do pedido: **2008.07.30**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.04.11**
089/2012

(73) Titular(es):

BIOPHARM GESELLSCHAFT ZUR
BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON
PHARMAKA MBH
CZERNYRING 22 69115 HEIDELBERG DE

(72) Inventor(es):

JENS POHL DE
MICHAEL KRUSE DE
FRANK PLOËGER DE

(74) Mandatário:

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MUTANTES DO FATOR DE CRESCIMENTO COM ATIVIDADE ELEVADA**

(57) Resumo:

O PRESENTE PEDIDO DE PATENTE DIZ RESPEITO A NOVOS MUTANTES BLOSSINTÉTICOS DO FATOR DE CRESCIMENTO, DERIVADOS DO GDF-5, OS QUAIS EXIBEM UMA ATIVIDADE BIOLÓGICA MELHORADA. AS MUTAÇÕES NAS POSIÇÕES 453 E 456 DO GDF-5 HUMANO SÃO DIVULGADAS, ASSIM COMO O USO DESTES MUTANTES NA TERAPIA DE DOENÇAS ASSOCIADAS À DEGENERAÇÃO/DESTRUIÇÃO DOS TECIDOS.

RESUMO

"MUTANTES DO FATOR DE CRESCIMENTO COM ATIVIDADE ELEVADA"

O presente pedido de patente diz respeito a novos mutantes biossintéticos do fator de crescimento, derivados do GDF-5, os quais exibem uma atividade biológica melhorada. As mutações nas posições 453 e 456 do GDF-5 humano são divulgadas, assim como o uso destes mutantes na terapia de doenças associadas à degeneração/destruição dos tecidos.

DESCRIÇÃO

"MUTANTES DO FATOR DE CRESCIMENTO COM ATIVIDADE ELEVADA"

A presente invenção refere-se a novos mutantes recombinantes biossintéticos do fator de crescimento que exibem uma atividade biológica melhorada. A referida atividade melhorada da proteína é conseguida através da substituição de aminoácidos específicos das proteínas do fator de crescimento original que são proteínas naturais da superfamília de moléculas de sinalização do fator de crescimento beta-transformante. As proteínas recombinantes aqui fornecidas são particularmente adequadas para induzir a regeneração, a estimulação do crescimento e a diferenciação de várias células, tecidos e órgãos. A invenção também se refere a moléculas de ácido nucleico que codificam para as referidas proteínas mutantes recombinantes, vetores de expressão e células hospedeiras que contêm as moléculas de ácidos nucleicos, anticorpos dirigidos contra as referidas proteínas mutantes, composições farmacêuticas e métodos para produzir os mutantes do fator de crescimento.

A superfamília de proteínas do fator de crescimento beta-transformante (TGF-beta) compreende mais de 35 membros incluindo TGF-betas, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), ativinas, inibinas e fatores de crescimento/diferenciação (GDFs). As proteínas da superfamília TGF-beta promovem a proliferação e a diferenciação de células, bem como a formação de tecidos e são relevantes para uma grande variedade de métodos e aplicações de tratamento médico. Estas moléculas diméricas atuam através de complexos receptores específicos que são compostos por receptores serina/treonina cinase do tipo I e

tipo II. Os receptores de cinase ativam subsequentemente as proteínas Smad, as quais então propagam os sinais para o núcleo de modo a regular a expressão do gene alvo. As vias de sinalização independentes Smad são também iniciadas por estes receptores e resultam na indução da via MAP cinase. As Smads são uma família única de moléculas de transdução de sinal que podem transmitir sinais diretamente a partir dos receptores da superfície celular para o núcleo, onde regulam a transcrição através da interação com os parceiros de ligação ao ADN, bem como os coativadores transpcionais e corepressores.

Os membros desta família de proteínas são inicialmente sintetizados como proteínas precursoras de grandes dimensões, que subsequentemente sofrem clivagem proteolítica num aglomerado de resíduos básicos com aproximadamente 110-140 aminoácidos a partir da terminação C, libertando assim a parte da proteína madura da terminação C do prodomínio N-terminal. Todos os polipeptídos maduros estão estruturalmente relacionados e contêm um domínio bioativo conservado, compreendendo seis ou sete resíduos de cisteína canónicos, que são responsáveis pelos motivos tridimensionais característicos "laços de cistina" destas proteínas.

Os vários membros da superfamília podem ainda ser classificados em subfamílias e grupos distintos, com base na extensão da homologia/identidade do seu motivo em laço de cistina. As famílias sobreponíveis de proteínas morfogenéticas ósseas e fatores de crescimento/diferenciação (GDFs) são conhecidas por desempenhar um conjunto diversificado de funções no sistema esquelético e em outros tecidos (ver p.ex. Ducy e Karsenty 2000, *Kidney Int* 57., 2207-2214 para uma análise).

Especialmente o GDF-5 humano (a proteína é também conhecida como MP52, CDMP-1 ou, por vezes, como BMP-14), o GDF-6 (CDMP-2, BMP13) e o GDF-7 (CDMP-3, BMP-12) foram agrupados em conjunto por diversos autores, devido às suas propriedades biológicas comparáveis e ao grau extraordinariamente elevado de identidade na sequência de aminoácidos (ver p.ex. Mikic 2004, *Annals of Biomedical Engineering* 32, 466-476; Wolfman et al. 1997, *J. Clin. Invest.* 100, 321-330).

Além das funções proeminentes do subgrupo GDF-5/-6/-7 na formação de novo de osso e cartilagem (Cheng et al. 2003, *J. Bone & Joint Surg. Am.* 85-A, 1544-1552; Settle et al. 2003, *Developm. Biol.* 254, 116-130), tem sido repetidamente demonstrado que os membros deste subgrupo são também indutores e reguladores importantes de tendões e ligamentos (Wolfman et al. 1997, *J. Clin. Invest.* 100, 321-330), dos tecidos nervosos (Farkas et al. 1997, *Neurosci Lett.* 236, 120-122; Watakabe et al. 2001, *J. Neurochem.* 76, 1455-1464), ligamentos periodontais e dentes (Sena et al 2003, *J. Dent. Res.* 82, 166-171; Morotome et al. 1998, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 85 - 90) e outros tecidos.

As estruturas de genes e proteínas de vários BMPs /GDFs que ocorrem naturalmente, incluindo o GDF-5, GDF-6 e GDF-7 foram anteriormente elucidadas. Poderiam ser identificados vários mutantes do GDF-5 de perda de função, os quais levam ao encurtamento dos dedos das mãos e pés (braquidactilia do tipo C) e outras anomalias do esqueleto, tais como braquipodismo em animais (Storm et al. 1994, *Nature* 368, 639-643) e displasias acromesomélicas em humanos (Thomas et al. 1996, *Nature Gen.* 12, 315-317). Em relação a estes mutantes, verificou-se que substituições específicas de aminoácidos nas posições 173, 204, 400, 438, 441 e 498 do

GDF-5 humano reduz ou elimina completamente a função da proteína (Schwabe *et al.* 2004, Amer. J. Med Genet. 124A, 356-363). Em contraste, apenas alguns GDF-mutantes com atividade biológica melhorada são conhecidos até à data. Um exemplo raro é divulgado no documento WO 01/11041 e refere-se ao GDF-5 monomérico activo que carece do resíduo de cisteína normalmente responsável pela dimerização.

A busca pelas moléculas responsáveis pela atividade indutora do osso, cartilagem e outros tecidos levou à descoberta de um conjunto de moléculas designadas como fatores de crescimento/diferenciação. Devido às suas atividades únicas indutoras de tecido, estas proteínas foram aplicadas com sucesso na investigação terapêutica e na cirurgia regenerativa em que elas promovem e auxiliam o processo de cura natural dos tecidos danificados, quer isoladamente ou em combinação com um transportador específico e/ou materiais da matriz. No entanto, existe uma grande necessidade de desenvolver formas melhoradas e mais eficientes destas proteínas para tais fins.

Este objeto é resolvido de acordo com a invenção, fornecendo novas proteínas recombinantes derivadas de proteínas relacionadas com o GDF-5 e que exibem uma atividade biológica melhorada, como descrito aqui e nas reivindicações anexas.

A fim de evitar mal-entendidos e ambiguidades, alguns termos frequentemente utilizados aqui são definidos e exemplificados como se segue:

O termo "domínio em laço de cistina", tal como aqui utilizado, corresponde à região de aminoácidos rica em cisteína, bem conhecida e conservada, que está presente nas

partes maduras das proteínas da superfamília TGF-beta, tais como o GDF-5 humano e que forma uma estrutura proteica tridimensional conhecida como laço de cistina. Neste domínio, a respetiva localização dos resíduos de cisteína entre si, é importante e só é permitida variar ligeiramente, a fim de não perder atividade biológica. As sequências de consenso para os domínios em laço de cistina são conhecidas no estado da arte. De acordo com a definição aqui definida a domínio em laço de cistina de uma proteína começa com o primeiro resíduo de cisteína participando no laço de cistina da respetiva proteína e termina com o resíduo de cisteína que se segue à última cisteína que participa no laço de cistina da respetiva proteína. Por exemplo, o domínio em laço de cistina do precursor proteico do GDF-5 humano (SEQ ID NO 1) compreende os aminoácidos 400-501 (ver também a Fig. 1).

O termo "proteína relacionada com o GDF-5", tal como aqui utilizado, significa qualquer proteína que ocorre naturalmente ou artificialmente criada que compreende um domínio em laço de cistina com uma identidade de aminoácidos de pelo menos 60% com o domínio de 102 aa do laço de cistina do GDF-5 humano (aminoácidos 400-501 da fig. 1/SEQ ID NO 1) e que comporta um resíduo de metionina em uma posição equivalente ao resíduo de metionina 453 (M453) do GDF-5 humano e um resíduo de metionina ou leucina numa posição equivalente à metionina 456 (M456) do GDF-5 humano. Incluem-se as proteínas que pertencem ao grupo das proteínas GDF-5, GDF-6 e GDF-7 de espécies de vertebrados ou de mamíferos, bem como suas variantes recombinantes, desde que estas proteínas satisfaçam os requisitos acima mencionados.

Os exemplos não limitativos de proteínas relacionadas com o

GDF-5 de acordo com a definição acima são GDF-5 humanos (divulgados como MP52 no documento WO 95/04819 e em Hötten *et al.* 1994, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 646-652), GDF-5 humano/MP52 recombinante (WO 96/33215), GDF-5 de rato (US 5,801,014), CDMP-1 (WO 96/14335), MP52s humanos HMW (WO 97/04095), GDF-5 de coelho (Sanyal *et al.* 2000, *MoI Biotechnol.* 16, 203-210), GDF-6 humano/BMP-13 (US 5.658.882), GDF-6 bovino (Acesso NCBI N° P55106), GDF-6 de rato (Acesso NCBI N° NP_038554), GDF-6/CDMP-2 (WO 96/14335), GDF-7 humano/BMP-12 (US 5.658.882), GDF-7 de rato (Acesso NCBI N° AAP97721), GDF-7/CDMP-3 (WO 96/14335), GDF-5 de galinha (Acesso NCBI N° NP_989669), GDF-5 de *Xenopus laevis* (Acesso NCBI N° AAT99303), GDF-5, -6 e -7 monoméricos (WO 01/11041 e WO 99/61611), como apresentado nas FIG. 3 e 4.

O termo "mutante ML", tal como aqui utilizado, significa uma proteína recombinante derivada de uma proteína relacionada com o GDF-5 na qual, após alinhamento com o GDF-5 humano, tal como descrito no presente pedido de patente, o aminoácido equivalente à metionina 453 (M453) do GDF-5 humano não é metionina, e/ou o aminoácido equivalente à metionina 456 (M456) do GDF-5 humano (SEQ ID NO 1) não é a metionina (M) nem leucina (L).

O termo "atividade biológica melhorada" tal como aqui utilizado refere-se a uma atividade biológica de uma acumulação do mutante ML até, pelo menos, 120% da atividade da respetiva proteína não mutada.

O termo "atividade biológica" indica a atividade de uma proteína relacionada com o GDF-5 tal como medida por um ou mais dos seguintes ensaios:

- a) um ensaio *in vitro* da fosfatase alcalina (ALP), *p.ex.*, tal como descrito em Takuwa et al . (1989), *AMJ. Physiol.* 257, E797-E803),
- b) medição do aumento da sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos, tal como descrito por exemplo por Krieglstein et al. 1995 (*J. Neuroscience Res.* 42, 724-732) ou Sullivan et al. 1997 (*Neuroscience Letters* 233, 73-76);
- c) a medida da excrescência de fibras nervosas a partir da retina embrionária *p.ex.*, tal como descrito no documento WO 97/03188;
- d) o potencial angiogénico destas proteínas como verificadas, por exemplo, em um modelo de microbolsa da córnea *in vivo* tal como descrito em Yamashita et al. 1997 (*Exp. Cell Research* 235, 218-226);
- e) efeitos de proteínas relacionadas com o GDF-5 na diferenciação terminal de mioblastos, tal como determinado como descrito *p.ex.* por Inada et al 1996 (*Biochem Biophys Res Commun* 222, 317-322);
- f) em testes *in vivo* medindo o potencial indutor de tais proteínas relativas a tendões e ligamentos, *p.ex.* como divulgado em Wolfman et al. 1997, *J. Clin. Invest.* 100, 321-330;
- g) medição da cascata da transdução de sinal através da ativação de Smads usando um ensaio com gene repórter com base nos elementos de ligação a Smad anteriores ao gene luciferase de pirilampo, *p.ex.*, como descrito anteriormente (Nohe et al, 2002. *J Biol Chem.* 277, 5330-5338.)

O termo "variante", tal como aqui utilizado, significa qualquer um dos polipéptidos seguintes:

- a) fragmentos biologicamente ativos de uma proteína
- b) constructos de proteína que contenham sequências adicionais em excesso relativamente à sequência original da proteína

c) qualquer combinação de a) e b)

O grupo GDF-5/-6/-7 de proteínas da superfamília TGF-beta, que compreende o GDF-5 como o seu membro mais bem caracterizado, é altamente conservado entre as espécies de vertebrados/mamíferos (Ducy e Karsenty 2000, *Kidney Int.* 57, 2207-2214). Verificou-se agora surpreendentemente, por meio de estudos de mutação e outras experiências, que resíduos de aminoácidos que correspondem a metionina 453 (M453) e metionina 456 (M456) do GDF-5 humano podem ser substituídos com alguns aminoácidos específicos, sem efeitos negativos sobre o função da proteína. Além disso, estas substituições chegam a aumentar a atividade biológica das proteínas de forma significativa.

Esta forma de realização da invenção é ainda ilustrada pelas figuras 1, 2 e 3. A FIG. 1 apresenta a proteína precursora GDF-5 humana (Hötten *et al.* 1994, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 646-652) que consiste de um prodomínio de 381 aa (aa 1-381 incluindo o péptido de sinal (aa 1-27), letras a negrito) e uma parte madura com 120 aa (aa 382-501). A parte madura ou especialmente o domínio em laço de cistina (aa 400-501, sublinhado) é suficiente para a função biológica da proteína. Os resíduos M453 e M456 (caixas cinzentas) estão localizados dentro deste domínio em laço de cistina. Os resíduos correspondentes nos domínios em laço de cistina de outras proteínas relacionadas com o GDF-5 são apresentados na FIG. 2 e FIG. 3 (marcado por setas). Os resíduos correspondentes em proteínas não apresentadas nestas figuras podem ser facilmente determinados por um alinhamento de sequências com o GDF-5 humano.

Tem sido verificado em proteínas relacionadas com o GDF-5

que, quando o resíduo de metionina na posição correspondente à metionina 453 (M453) do GDF-5 humano do tipo selvagem (SEQ. ID NO 1) é substituído por um aminoácido escolhido de entre alanina (A), valina (V) ou isoleucina (I), a proteína recombinante resultante tem atividade biológica aumentada.

Numa forma de realização preferida, o aminoácido escolhido é a valina (V) para a posição M453.

Também se tem verificado que, quando o resíduo de metionina na posição correspondente à metionina 456 (M456) do GDF-5 humano do tipo selvagem (SEQ. ID NO 1) é substituído por um aminoácido escolhido a partir de alanina (A), valina (V) ou isoleucina (I), quer independentemente ou em combinação com uma substituição de M453, a proteína recombinante resultante tem atividade biológica aumentada.

Numa forma de realização preferida, o aminoácido escolhido é a valina (V) para a posição M456.

Estes mutantes ML de proteínas relacionadas com o GDF-5 nas quais os equivalentes M453 e/ou M456 são substituídos pelos aminoácidos especificados acima exibem uma atividade biológica que supera significativamente a atividade das respetivas proteínas não mutadas.

Como um exemplo, a Fig.5 apresenta a capacidade melhorada do mutante hGDF-5 ML com M453V/M456V para induzir a fosfatase alcalina *in vitro*. A proteína mutante exibe uma atividade biológica de 585,5% (a 133 ng/mL), 356,3% (a 400 ng/ml) e 236,3% (a 1200 ng/ml) da atividade da proteína do tipo selvagem (rh-GDF-5) neste ensaio (média de experiências múltiplas). Assim, a atividade média é de

585,5 + 356,3 + 236,3: 3 = 392,7% da atividade da proteína do tipo selvagem (rh-GDF-5). A atividade mínima medida para o mutante com uma concentração única de proteína e numa única experiência foi 150% da atividade da proteína do tipo selvagem.

Assim, são englobados pela presente invenção os mutantes ML que exibem uma atividade biológica melhorada, acumulando até pelo menos 120% da atividade da respetiva proteína não mutada. Especialmente preferidos são os mutante ML relacionados com o GDF-5 com atividades biológicas melhoradas de pelo menos 150%, de preferência 160%, mais preferencialmente, pelo menos 170%, mais preferencialmente, pelo menos 180% e mais preferencialmente pelo menos 200% da atividade biológica da respetiva proteína não mutada.

As atividades biológicas das proteínas relacionadas com o GDF-5 e seus mutantes ML, *i.e.*, no campo da indução de tecido ósseo, de cartilagem e conjuntivo, tais como, *i.e.*, o ligamento periodontal pode ser facilmente determinado com a ajuda de sistemas de ensaio estabelecidos. Mais útil e preferido é um teste *in vitro* comum conhecido como fosfatase alcalina (ALP) de ensaio (Takuwa *et al.* 1989, *Am. J. Physiol.* 257, E797-E803), que também é demonstrado no exemplo 2 / FIG. 5. As proteínas relacionadas com o GDF-5 têm sido demonstradas como aumentando a atividade da fosfatase alcalina, *i.e.*, em células osteoprogenitoras ROB-C26 (Yamaguchi *et al.* 1991, *Calcif. Tissue Int.* 49, 221-225), tal como descrito em WO 95/04819, em células embrionárias ATDC5 (Riken Gene Bank, ROB 0565), em células de estroma de rato MCHT-1/26 e em células de ligamento periodontal (HPDL), tal como demonstrado em Nakamura *et al.* 2003, *J. Periodontal Res.* 38, 597-605.

As proteínas relacionadas com o GDF-5, tal como aqui definidas, incluem uma domínio em laço de cistina com uma identidade de aminoácidos de pelo menos 60%, de preferência pelo menos 75%, mais preferencialmente pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 90% e mais preferencialmente pelo menos 95%, para o domínio de 102 aa do laço de cistina do GDF-5 humano. Um valor limite de 60% está bem adequado aos membros separados do grupo de proteínas GDF-5/-6/-7, bem como suas variantes a partir de proteínas adicionais tais como outras GDFs e BMPs. Uma comparação dos domínios em laço de cistina com 102 aa do GDF-5 humano, GDF-6 humano e GDF-7 humano (Fig. 2) revela o grau elevado de identidade de aminoácidos entre estas proteínas. O GDF-6 humano partilha 87 (85%) e o GDF-7 humano 83 (81%) de resíduos idênticos com o domínio em laço de cistina do GDF-5 humano. Os respetivos domínios das moléculas GDF-5/-6/-7 de outras espécies de vertebrados e de mamíferos que tenham sido identificados até agora também apresentam percentagens de identidade muito elevadas de, pelo menos, 75% (entre 79% e 99%), quando comparadas com o GDF-5 humano (Fig. 4). Em contraste, os GDFs e BMPs não pertencentes ao subgrupo GDF-5/-6/-7 exibem valores de identidade muito mais baixos, inferiores a 60%.

A determinação das correspondentes posições de aminoácidos nas sequências de aminoácidos relacionadas, bem como o cálculo das percentagens de identidade entre elas pode ser realizada com a ajuda de algoritmos de alinhamento bem conhecidos e programas de computador, opcionalmente usando estes algoritmos. As identidades de aminoácidos no presente pedido de patente foram calculadas através do alinhamento de sequências com o programa de uso livre ClustalX (Versão 1.81) com os parâmetros padrão e contagem manual

subsequente de resíduos idênticos. As configurações padrão para alinhamento aos pares (precisão lenta) são: parâmetro distância de abertura: 10,00; parâmetro da extensão da abertura 0,10; Matriz de peso da proteína: Gonnet 250. O programa ClustalX é descrito em detalhe em:

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak.F., Jeanmougin. F. e Higgins.DG (1997)

A interface windows do ClustalX: estratégias flexíveis para alinhamento de sequências múltiplas auxiliado por ferramentas de análise de qualidade.

Nucleic Acids Research 24:4876-4882.

O ClustalX é uma interface windows para o programa de alinhamento de sequências múltiplas ClustalW e está, i.e., disponível a partir de várias fontes, i.e., por ftp anônimo a partir de [ftp-igbmc.u-strasbg.fr](ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr), [ftp.embl-heidelberg.de](ftp://ftp.embl-heidelberg.de), [ftp.ebi.ac.uk](ftp://ftp.ebi.ac.uk) ou via download a partir a seguinte página: <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/Biolnfo/>. O programa ClustalW e algoritmo também está descrito em detalhe em:

Thompson, J.D., Higgins, D.G. e Gibson, T.J. (1994)

CLUSTALW: melhorar a sensibilidade do alinhamento de sequências múltiplas progressivas através do peso das sequências, das penalizações na abertura, específicas das posições e escolha da matriz de peso. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.

Os mutantes ML de acordo com a invenção que são derivados de proteínas relacionadas com o GDF-5 são geralmente aplicáveis em todas as indicações em que proteínas relacionadas com o GDF-5, tais como GDF-5, GDF-6 e GDF-7 são também úteis. Foi demonstrado que as proteínas

relacionadas com o GDF-5 são indutores e reguladores/diferenciadores importantes de, i.e., osso e cartilagem (Cheng et al. 2003, *J. Bone & Joint Surg. Am.* 85-A, 1544-1552; Settle et al. 2003, *Developm. Biol.* 254, 116-130), o tecido conjuntivo, tal como tendão e ligamento (Wolfman et al. 1997, *J. Clin. Invest.* 100, 321-330) tecido nervoso, (Farkas et al. 1997, *Neurosci Lett.* 236, 120-122; Watakabe et al. 2001, *J. Neurochem.* 76, 1455-1464), as células estaminais (Shimaoka et al. 2003, *J. Biomed. Materials Res. Part A* 68A, 168-176; Bai et al. 2004, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 453 - 460) e / ligamento periodontal e dentes (Sena et al 2003, *J. Dent. Res.* 82, 166-171; Morotome et al. 1998, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 85-90).

Os mutantes ML da presente invenção compreendem uma sequência que corresponde a uma das seguintes sequências de aminoácidos genéricas

a)

CX₁X₂KX₃LHVX₄FX₅X₆X₇GWDDWX₈IAPLX₉YEAX₁₀HCX₁₁GX₁₂CX₁₃FPX₁₄RSHLEPTN
HAX₁₅
IQTLZ₁NSMX₁₆PX₁₇X₁₈X₁₉PX₂₀X₂₁CCVPX₂₂X₂₃LX₂₄PISILX₂₅X₂₆DX₂₇X₂₈NNVVY
X₂₉X₃₀YEX₃₁MVVEGX₃₂CGCR ou

b) CX₁X₂KX₃LHVX₄FX₅X₆X₇GWDDWX₈IAPLX₉YEAX₁₀HCX₁₁GX₁₂CX₁₃FPX₁₄RSHLE
PTNHAX₁₅
IQTLMNSZ₂X₁₆PX₁₇X₁₈X₁₉PX₂₀X₂₁CCVPX₂₂X₂₃LX₂₄PISILX₂₅X₂₆DX₂₇X₂₈NNVVY
X₂₉X₃₀YEX₃₁MVVEGX₃₂CGCR ou

c) CX₁X₂KX₃LHVX₄FX₅X₆X₇GWDDWX₈IAPLX₉YEAX₁₀HCX₁₁GX₁₂CX₁₃FPX₁₄RSHLE
PTNHAX₁₅
IQTLZ₁NSZ₂X₁₆PX₁₇X₁₈X₁₉PX₂₀X₂₁CCVPX₂₂X₂₃LX₂₄PISILX₂₅X₂₆DX₂₇X₂₈NNVV

YX₂₉X₃₀YEX₃₁MVVE₃₂CGCR,

e em que

cada X significa qualquer aminoácido,
 Z_1 significa alanina (A), isoleucina (I), ou valina (V),
 Z_2 significa alanina (A), isoleucina (I), ou valina (V)
e em que

X₁ significa asparagina (N) ou serina (S)

X₂ significa arginina (R) ou lisina (K)

X₃ significa alanina (A), glutamina (Q), prolina (P) ou serina (S)

X₄ significa asparagina (N) ou ácido aspártico (D)

X₅ significa arginina (R) ou a lisina (K)

X₆ significa ácido aspártico (D) ou ácido glutâmico (E)

X₇ significa leucina (L) ou metionina (M)

X₈ significa isoleucina (I) ou valina (V)

X₉ significa ácido aspártico (D) ou ácido glutâmico (E)

X₁₀ significa histidina (H), fenilalanina (F) ou tirosina (Y)

X₁₁ significa ácido aspártico (D) ou ácido glutâmico (E)

X₁₂ significa leucina (L), metionina (M) ou valina (V)

X₁₃ significa ácido aspártico (D) ou ácido glutâmico (E)

X₁₄ significa isoleucina (I) ou leucina (L)

X₁₅ significa isoleucina (I) ou valina (V)

X₁₆ significa alanina (A), asparagina (N) ou ácido aspártico (D)

X₁₇ significa arginina (R), asparagina (N), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), glicina (G) ou serina (S)

X₁₈ significa alanina (A), asparagina (N), serina (S) ou treonina (T)

X₁₉ significa alanina (A), metionina (M) ou treonina (T)

X₂₀ significa alanina (A) ou prolina (P)

X₂₁ significa serina (S) ou treonina (T)

X₂₂ significa alanina (A), serina (S) ou treonina (T)

X₂₃ significa arginina (R) ou a lisina (K)

X₂₄ significa serina (S) ou treonina (T)

X₂₅ significa fenilalanina (F) ou tirosina (Y)

X₂₆ significa isoleucina (I) ou treonina (T)

X₂₇ significa alanina (A) ou serina (S)

X₂₈ significa alanina (A) ou glicina (G)

X₂₉ significa asparagina (N) ou lisina (K)

X₃₀ significa ácido glutâmico (E) ou glutamina (Q)

X₃₁ significa ácido aspártico (D) ou ácido glutâmico (E),

X₃₂ significa alanina (A), glutamina (Q), serina (S) ou treonina (T)

Z₁ significa alanina (A), isoleucina (I), ou valina (V),

Z₂ significa alanina (A), isoleucina (I), ou valina (V),

ou uma sequência correspondente em que a cisteína responsável pela formação do dímero é substituída por um aminoácido diferente ou é eliminada.

Estas sequências genéricas foram compiladas a partir de uma comparação dos domínios em laço de cistina de sequências dos GDF-5, GDF-6 e GDF-7 de vertebrados, de acordo com a Fig. 3. As posições que não estão conservados nas proteínas alinhadas são indicadas com um X nas sequências genéricas. As posições que estão mutadas de acordo com a presente invenção são indicadas com um Z.

Em outra forma de realização preferida, a proteína mutante ML de acordo com a invenção é um mutante ML de uma proteína GDF-5 de vertebrado ou recombinante ou uma sua variante. Os mais preferidos são mutantes ML de uma proteína GDF-5 de mamífero ou suas variantes. Os exemplos de proteínas GDF-5

de vertebrados e mamíferos são: GDF-5 humano (divulgado como MP52 no documento WO 95/04819 e como GDF-5 humano em Hotten *et al.* 1994, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 646-652), GDF-5 humano recombinante/MP52 (WO 96/33215), MP52s humanos HMW (WO 97/04095), CDMP-1 (WO 96/14335), GDF-5 de rato (*Mus musculus*) (US 5.801.014), GDF-5 de coelho (*Oryctolagus cuniculus*) (Sanyal *et al.* 2000, *MoI Biotechnol.* 16, 203-210), GDF-5 de galinha (*Gallus gallus*) (Acesso NCBI N° NP_989669), GDF-5 de sapo africano com garras (*Xenopus laevis*) (Acesso NCBI N° AAT99303).

Outra forma de realização preferida da invenção inclui proteínas mutantes ML de proteínas monoméricas relacionadas com o GDF-5. Nestas proteínas monoméricas, a cisteína que é responsável pela formação de dímeros ou é substituída por outro aminoácido ou eliminada. Tais proteínas são, por exemplo, descritas nos documentos WO 01/11041 e WO 99/61611, que são aqui incorporados como referência. Uma proteína monomérica especialmente preferida é um GDF-5 recombinante monomérico, tal como aí se encontra divulgado.

Incluídos nestas formas de realização estão também mutantes ML de versões alélicas dos genes/proteínas acima mencionados, bem como mutantes ML das proteínas de vertebrados, mamíferos e recombinantes ou suas variantes, possuindo mutações adicionais tais como substituições, adições e deleções, desde que estas mutações adicionais não tenham qualquer efeito essencial sobre a atividade da proteína e cumpram os requisitos das reivindicações.

Em geral, o mutante ML da proteína GDF-5 de vertebrado ou de mamífero ou recombinante ou sua variante é esperado que mostre todas as atividades já descritas do GDF-5 e que possa ser aplicado onde quer que as formas de GDF acima

mencionadas recombinante e do tipo selvagem -5 tenham sido utilizadas com sucesso. Por exemplo, o GDF-5 é considerado como sendo um promotor muito eficaz da formação do osso e de cartilagem, bem como da formação de tecido conjuntivo (ver, por exemplo o documento WO 95/04819, Hötten *et al.* 1996, *Growth Factors* 13, 65-74; Storm *et al.* 1994, *Nature* 368, 639-643; Chang *et al.* 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 28.227-28.234) e da formação da fixação ao tecido conjuntivo (EP 0 831 884. Neste contexto, o GDF-5 é útil para aplicações relativas às juntas entre elementos esqueléticos (ver, por exemplo Storm e Kingsley 1996, *Development* 122, 3969-3979). Um exemplo para o tecido conjuntivo é o tendão e ligamento (Wolfman *et al.* 1997, *J. Clin. Invest.* 100, 321-330; Aspenberg e Forslund 1999, *Acta Orthop Scand* 70, 51-54; WO 95/16035). A proteína é útil para a reparação do menisco e dos discos espinais /intervertebrais (Walsh *et al.* 2004, *Coluna* 29, 156-63) e aplicações de fusão espinal (Spiro *et al.* 2000, *Biochem Soc Trans.* 28, 362-368). O GDF-5 pode ser benficialmente aplicado em aplicações dentárias (dental e periodontal) (ver por exemplo WO 95/04819, WO 93/16099; Morotome *et al.* 1998, *Biochem Biophys Res Comm* 244, 85-90), tais como a regeneração da dentina ou do ligamento periodontal.

O GDF-5 também é útil na cura de feridas de qualquer tipo. É também benéfico para promover o crescimento do tecido no sistema neuronal e a sobrevivência de neurónios, *p.ex.*, dopaminérgicos. Neste contexto, o GDF-5 pode ser utilizado para tratar doenças neurodegenerativas tais como, *p.ex.*, a doença de Parkinson e, possivelmente, também a doença de Alzheimer ou a doença de Huntington (ver por exemplo WO 97/03188; Krieglstein *et al.*, (1995) *J. Neurosci Res* 42., 724-732; Sullivan *et al.*, (1997) *Neurosci Lett* 233, 73-76; Sullivan *et al.* (1998), *Eur. J. Neurosci* 10, 3681-3688). O

GDF-5 permite manter a função nervosa ou reter a função nervosa em tecidos já danificados. O GDF-5 é, por conseguinte, considerado como sendo um fator neurotrófico geralmente aplicável.

Também é útil para doenças oculares, em particular da retina, córnea e do nervo ótico (ver por exemplo WO 97/03188; You *et al.* (1999), *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40, 296-311), para o crescimento do cabelo e no tratamento e diagnóstico de distúrbios relacionados com a pele (WO 02 / 076.494; Battaglia *et al.* 2002, *Trans. Orthop. Res. Soc.* 27, 584), e para a indução da angiogéneses (Yamashita *et al.* 1997 *Exp. Res celulares.* 235, 218-26).

Por um lado, há a prevenção ou terapia de doenças associadas aos danos no osso e/ou na cartilagem ou afectando uma doença óssea e/ou da cartilagem, ou em geral situações nas quais a formação de cartilagem e/ou de osso é desejável ou para a fusão espinal e por outro lado, há a prevenção ou terapia de tecidos danificado ou doentes associada ao tecido conjuntivo incluindo tendão e/ou ligamento, tecido periodontal ou dental incluindo implantes dentários, tecido neural incluindo o tecido do SNC e situações neuropatológicas, tecido do sistema sensorial, fígado, pâncreas, tecido cardíaco, do vaso sanguíneo, tecido renal, do útero e da tiróide, a pele, membranas mucosas, endotélio, epitélio, para a promoção ou indução do crescimento do nervo, regeneração dos tecidos, angiogéneses, cicatrização de feridas incluindo úlceras, queimaduras, ferimentos ou enxertos de pele, indução ou proliferação de células progenitoras ou das células de medula óssea, para a manutenção de um estado de proliferação ou diferenciação para o tratamento ou preservação de tecidos ou células para transplante de órgãos ou tecidos, para a integridade do

revestimento gastrointestinal, para o tratamento de distúrbios na fertilidade, contraceção ou gravidez.

As doenças relativas aos órgãos sensoriais, tais como o olho, também devem ser incluídas na indicação preferida da composição farmacêutica de acordo com a invenção. Como doenças neuronais novamente as doenças de Parkinson e Alzheimer podem ser mencionadas como exemplos.

O exemplo 3 e a FIG. 6 descrevem os resultados de um ensaio de fosfatase alcalina com o GDF-5 humano recombinante (WO 96/33215) e o mutante ML M453V/M456V do GDF-5 humano recombinante (rhGDF-5). O GDF-5 humano recombinante foi utilizado como um padrão/controlo com 100% de atividade biológica. A proteína mutante exibe uma atividade biológica de 585,5% (a 133 ng/mL), 356,3% (a 400 ng/mL) e 236,3% (a 1200 ng/mL) da atividade da proteína de tipo selvagem (rh-GDF-5) neste ensaio (média de várias experiências). Assim, a atividade média é de 585,5 + 356,3 + 236,3: 3 = 392,7% da atividade da proteína do tipo selvagem (rh-GDF-5). A atividade mínima medida para o mutante com uma concentração única de proteína e numa única experiência foi de 150% da atividade da proteína de tipo selvagem.

Os mutantes ML de acordo com a invenção podem ser facilmente produzidos em vários sistemas de expressão procarióticos e eucarióticos, em particular por expressão em procariotas e subsequente renaturação/rearranjo de acordo com métodos conhecidos (ver, i.e., o documento WO 96/33215).

Um objeto adicional da presente invenção é um ácido nucleico que codifica para um mutante ML de acordo com a invenção. O ácido nucleico tem uma sequência tal que uma

substituição de um ou ambos os resíduos equivalentes a M453 e M456 do GDF-5 humano com um dos aminoácidos especificados no presente pedido são alcançados. Os tripletos de bases que codificam para estes aminoácidos e a degeneração do código genético, são geralmente conhecidos. O ácido nucleico pode ser uma sequência de ADN e/ou uma sequência de ARN, desde que a proteína de acordo com a invenção possa ser obtida a partir deste ácido nucleico após expressão num sistema adequado.

Os vetores de expressão são um objeto adicional da invenção presente, em que o ácido nucleico é inserido em um sistema de vetor adequado, sendo o sistema de vetor selecionado de acordo com a expressão desejada da proteína. O sistema de vetor pode ser um sistema de vetor eucariótico, mas o preferido é um sistema de vetor procariótico, com o qual as proteínas podem ser produzidas de uma maneira particularmente fácil e pura. Um vetor de expressão adequado é *i.e.* apresentado no documento WO 96/33215. O vetor de expressão também pode ser um vetor viral que pode ser usado, *i.e.*, em abordagens de terapia genética.

As células hospedeiras são também um objeto da presente invenção. As células hospedeiras são caracterizadas pelo facto de conter um ácido nucleico ou um vetor de expressão de acordo com a invenção e elas são capazes de utilizar a informação presente nos ácidos nucleicos e no vetor de expressão, respetivamente, para a expressão de mutantes ML de acordo com a invenção. As células hospedeiras adequadas são, de preferência, células procarióticas, em particular e na sua maioria estirpes de *E. coli*. As estirpes hospedeiras particularmente úteis são descendentes da *E. coli* W3110, tal como apresentado, por exemplo, no documento WO

96/33215. Numa forma de realização preferida, as células hospedeiras, preferencialmente de origem humana, podem também ser úteis para o transplante para pacientes com necessidade das mesmas.

Outro objeto da presente invenção são os anticorpos contra mutantes ML. Estes anticorpos de acordo com a presente invenção são específicos para o mutante ML recombinante reivindicado. Eles são específicos para as regiões do nó de cistina de proteínas relacionadas com o GDF-5 contendo uma ou mais das substituições de aminoácidos aqui descritas. Os anticorpos são específicos para uma região de uma proteína recombinante derivada de uma proteína relacionada com o GDF- de acordo com a invenção, cobrindo os aminoácidos 453-456. Estes anticorpos de acordo com a presente invenção podem ser gerados usando os fragmentos da proteína da invenção, tal como descrito acima, como imunogénios para gerar anticorpos por métodos conhecidos. Os anticorpos podem ser monoclonais ou policlonais e podem ser de qualquer isotipo. Também compreendidos estão os fragmentos de anticorpos tais como os fragmentos Fab ou os fragmentos Fab2. Os anticorpos também podem ser anticorpos humanizados ou anticorpos quiméricos, etc.

Outros objetos do presente pedido de patente são composições farmacêuticas e/ou de diagnóstico, compreendendo pelo menos um mutante ML de uma proteína relacionada com o GDF-5 ou um ácido nucleico ou um vetor ou uma célula hospedeira de acordo com a invenção. São geralmente adequadas todas as composições farmacêuticas que já foram publicadas em contexto com proteínas relacionadas com o GDF-5. Um vetor de expressão ou uma célula hospedeira podem ser considerados como sendo vantajosos como substâncias ativas numa composição farmacêutica e/ou de

diagnóstico. Também as combinações de uma proteína de acordo com a invenção com outras proteínas podem ser usadas em composições farmacêuticas preferidas. Especialmente preferidas para aplicações neurais são as combinações com outras proteínas da superfamília TGF-beta, tais como, *i.e.*, o GDNF (ver WO 97/03188). Para aplicações relativas à cartilagem e/ou ao osso a combinação com BMPs, em geral, ou com uma proteína indutora de manutenção da cartilagem, tal como a BMP-9 (ver *p.ex.* o documento WO 96/39170) é útil. As combinações com outras proteínas, tais como *p.ex.* NGF, BDNF, EGF, PDGF, NT-3, -4, -5, cordina e/ou proteínas de ouriço são também possíveis (ver *p.ex.* o documento WO 97/03188). É claro que esta invenção também compreende as composições farmacêuticas contendo substâncias adicionais tais como, *p.ex.*, substâncias auxiliares e um transportador farmacologicamente aceitáveis. A formulação pode incluir antioxidantes, conservantes, corantes, aromatizantes e agentes emulsionantes, agentes de suspensão, solventes, enchimentos, agentes de volume, tampões, veículos de distribuição, excipientes e/ou adjuvantes farmacêuticos. Por exemplo, um transportador adequado ou veículo pode ser água para injeção, solução salina fisiológica, ou uma solução salina misturada com uma proteína transportadora adequada, tal como a albumina do soro. Um antioxidante preferido para a preparação da composição da presente invenção é o ácido ascórbico.

As composições cosméticas conhecidas na arte, de preferência hipoalergénicas e com o pH controlado são especialmente preferidas e incluem águas de colónia, embalagens, loções, leites corporais ou loções leitosas. As referidas preparações contêm, além do composto ativo, os componentes usualmente empregues em tais preparações. Os exemplos de tais componentes são óleos, gorduras, ceras,

agentes tensioativos, humectantes, agentes espessantes, antioxidantes, estabilizadores da viscosidade, agentes quelantes, tampões, conservantes, perfumes, corantes, alcanóis inferiores e semelhantes. Se desejado, podem ser incorporados outros ingredientes nas composições, p.ex, agentes anti-inflamatórios, antibacterianos, antifúngicos, desinfectantes, vitaminas, filtros solares, antibióticos ou outros agentes anti-acne.

O solvente ou diluente da composição farmacêutica pode ser aquoso ou não-aquoso e pode conter outros excipientes farmaceuticamente aceitáveis que são capazes de modificar e/ou manter um pH, osmolaridade, viscosidade, limpidez, escala, esterilidade, estabilidade, velocidade de dissolução ou odor da formulação. De um modo semelhante, outros componentes podem ser incluídos na composição farmacêutica de acordo com a presente invenção, a fim de modificar e/ou manter a taxa de libertação da substância farmaceuticamente eficaz. Tais componentes modificadores são substâncias normalmente empregues na arte a fim de formular dosagens para administração parentérica em qualquer forma unitária ou multi-dose. A composição farmacêutica e/ou de diagnóstico finalmente formulada, preparada de acordo com a presente invenção pode ser armazenada em frascos estéreis na forma de uma solução, suspensão, gel, emulsão, sólido ou pó desidratado ou liofilizado. Estas formulações podem ser armazenadas quer numa forma pronta-a-usar, ou sob uma forma, p.ex., no caso de um pó liofilizado, que requer reconstituição antes da administração. As acima referidas e outras formulações farmacêuticas adequadas são conhecidas na arte e são descritos em, por exemplo, Gus Remington 's Pharmaceutical Sciences (18^a Ed., Mack Publishing Co., Eastern, Pa., 1990, 1435-1712). Tais formulações podem influenciar o estado

físico, estabilidade, taxa de libertação *in vivo* e taxa de depuração *in vivo* do componente farmaceuticamente eficaz. Outras formas de administração eficazes compreendem a libertação lenta parentérica, *i.e.*, formulações retardadas, nebulizados inaláveis ou formulações oralmente ativas. Por exemplo, uma formulação de libertação lenta pode compreender proteínas ligadas a, ou incorporados em, preparações de partículas de compostos poliméricos (tais como o ácido polilático, ácido poliglicólico, etc) ou lipossomas. A composição farmacêutica de acordo com a presente invenção também pode ser formulada para administração parentérica, *p.ex.*, por infusão ou injeção e pode também incluir a libertação lenta ou formulações de circulação controlada. Tais composições terapêuticas administradas por via parentérica estão tipicamente na forma de soluções aquosas parentericamente aceitáveis isentas de pirogénios, compreendendo o(s) componente(s) farmaceuticamente eficaz(es) em um transportador e/ou diluente farmaceuticamente aceitável.

A composição farmacêutica pode compreender um material de matriz, *i.e.*, nos casos em que se pretende a regeneração do osso ou da cartilagem. É vantajoso para a proteína, o ácido nucleico, o vetor de expressão ou para a célula hospedeira quando são aplicados em e/ou sobre um material de matriz biocompatível. O material de matriz, tal como aqui utilizado, significa um transportador ou matriz atuando como um suporte para o recrutamento, ligação, proliferação e diferenciação celular e/ou como um dispositivo de entrega e armazenamento potencial para mutantes ML de proteínas relacionadas com o GDF-5. Ao contrário das matrizes sólidas, os transportadores consistem em materiais amorfos que não têm superfícies definidas e carecem de uma forma específica, *i.e.*, alquilceluloses, poloxâmeros, gelatinas,

polietilenoglicóis, dextrinas, óleos vegetais, açúcares e outras substâncias líquidas e viscosas.

Os usos de proteínas relacionadas com o GDF-5 ou morfogénios semelhantes tais como BMPs, em combinação com materiais de matriz são extensivamente publicados e descritos, tais como *p.ex.*, no documento WO 98/21972. Estes materiais de matriz são igualmente adequados para mutantes ML de acordo com a invenção. O material de matriz pode ser transplantado para o paciente, por exemplo, cirurgicamente, em que a proteína ou o ADN que codifica para a proteína pode ser lentamente libertado a partir do material de matriz e, em seguida, ser eficaz durante um longo período de tempo. Todos os tipos de materiais de matriz são úteis de acordo com a presente invenção, desde que sejam biocompatíveis e selecionados para a área pretendida ou tenham indicação de uso. O material de matriz pode ser um material natural, um material natural modificado, bem como um material sintético. Todas as matrizes já conhecidas para as proteínas morfogenéticas estão englobadas. Os exemplos de materiais naturais são, *p.ex.*, materiais ósseos autólogos, heterólogos ou xenólogos, colagénio, *p.ex.*, colagénio do tipo I e III, ou metais como o titânio. Também podem ser usados outros componentes da matriz extracelular. A matriz extracelular compreende por exemplo os vários colagénios, como por exemplo os tipos I, II, V, IX, X, XI e XIII, proteoglicanos e glicosaminoglicanos adicionais, como por exemplo o condroitinossulfato, biglicano, decorina e/ou ácido hialurónico, ou proteínas não colagénicas como, *p.ex.* a osteopontina, laminina, fibronectina, vitronectina, trombospondina, proteína da matriz da cartilagem e fosfoproteína dentina. Todos os materiais naturais mencionados também podem ser utilizados em formas modificadas artificialmente. Os exemplos de materiais

naturais modificados são o osso desmineralizado, mineral ósseo termo-incinerado, osso sinterizado ou ácido hialurônico reticulado quimicamente (hidrogel), ou ligas metálicas. Os exemplos de materiais sintéticos são polímeros tais como o ácido poliglicólico, polilactido e derivados de polilactido, tais como *p.ex.* o ácido polilático, poli (lactido-co-glicólido), copolímeros do ácido polilactido-polietilenoglicol ou L-lactido glicólido, polifosfatos adicionais, polietilenoglicol, copolímeros de polioxietileno polioxipropileno ou materiais contendo fosfatos de cálcio, tais como beta-fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$), alfa-fosfato tricálcico e hidroxilapatite. Outros exemplos de outros materiais de matriz úteis pertencentes a um dos grupos acima mencionados são $Ca(OH)_2$, coral, mineral ósseo natural, quitina, as partículas ósseas não desmineralizadas, partículas ósseas cerâmicas, dentina de cerâmica, lascas irradiadas de osso esponjoso, emplastro de Paris, vidro bioativo, cerâmica de vidro contendo apatite-wollastonite. Também uma combinação dos transportadores e/ou matrizes acima mencionados pode formar o material da matriz como por exemplo a combinação de hidroxipapatite e colagénio (*p.ex.*, HEALOS, anteriormente disponível a partir de Orquest, Inc., CA, EUA, [agora DePuy Acromed, MA, EUA]), uma combinação de ácido poliglicólico e ácido polilático ou derivados polilactídeos, ou compósitos de coral-colagénio. Para obter uma lista não limitativa de transportadores e matrizes úteis, ver mais *i.e.* Kirker-Head-2000, Advanced Drug Delivery 43, 65-92.

Os exemplos seguintes não limitativos em conjunto com as figuras e protocolos de sequências pretendem ilustrar melhor a invenção.

As SEQ ID NOS 1 e 2 mostram o ADN e a sequência de proteína

do precursor do GDF-5 humano. Nos mutantes humanos preferidos da proteína GDF-5 com atividade biológica melhorada, o resíduo de metionina na posição 453 e/ou o resíduo de metionina na posição 456 são substituídos por outros aminoácidos.

A FIG. 1 apresenta características adicionais da proteína precursora do GDF-5 humano de acordo com a SEQ ID NO 1:

aa 001-381 pré-prodomínio (letras a negrito)
aa 382-501 parte da proteína madura
aa 400-501 domínio em laço de cistina (sublinhado)
aa 453 resíduo metionina 453 (caixa cinza)
aa 456 resíduo metionina 456 (caixa cinza).

A FIG. 2 apresenta uma comparação dos domínios em nó de cistina com 102 aa do GDF-5 humano (SEQ ID NO 1), GDF-6 humano (sequência 2 da patente US 5.658.882) e do GDF-7 humano (sequência 26 da patente US 5.658.882). Os resíduos de aminoácidos que são idênticos em todas as três moléculas estão assinalados a preto. Os resíduos M453 e M456 do GDF-5 humano e resíduos equivalentes do GDF-6 e GDF-7 humanos são marcadas por setas.

A FIG 3 apresenta uma comparação dos domínios em laço de cistina com 102 aa das sequências de GDF-5, -6 e -7 de vertebrados do género *Homo*, adicionalmente *Cercopithecus*, *Macaca*, *Bos*, *Mus*, *Gallus*, *Danio* e *Xenopus*, que estão disponíveis no "Entrez" Base de Dados de Proteínas NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>) sob os números de acesso apresentados na figura. Os resíduos M453 e M456 do GDF-5 humano e resíduos equivalentes de outras proteínas estão marcados por setas.

A FIG 4 apresenta uma tabela com as identidades de sequência dos domínios em nó de cistina de BMPs e GDFs conhecidos para domínio em nó de cistina do GDF-5 humano.

A FIG 5 apresenta os resultados de um ensaio da fosfatase alcalina (ALP) com GDF-5 humano recombinante (rh-GDF-5) e hGDF-5 mutante ML M453V/M456V (como descrito no exemplo 2).

A FIG 6 apresenta cortes histológicos (coloração do cálcio recém-formado AlizarinRed-S) e monitorizações μ TC dos suportes tratados com fator de crescimento, 4 semanas após a implantação em ratinhos SCID de acordo com o exemplo 3.

A FIG 7 apresenta uma estimativa da formação de osso novo nos suportes de acordo com o exemplo 3. Em cada grupo, foram examinados três animais ($n = 3$) e foi determinado um valor cumulativo. A escala seguinte foi utilizada:

sem osso	0
1-10% de osso	1
10-50% de osso	2
50-100% de osso	3

Exemplo 1: Criação, expressão e purificação dos mutantes ML

Os ADNs que codificam para as partes maduras das proteínas do GDF-5 humano, GDF-6 humano e GDF-7 humano foram isolados a partir de células osteoprogenitoras humanas ROB-C26 (Yamaguchi *et al.* 1991, *Calcif. Tissue Int.* 49, 221-225) através da técnica RT-PCR e subsequentemente ligados em vetores plasmídicos procarióticos. A fim de identificar os resíduos de aminoácidos funcionalmente importantes nas partes maduras do GDF-5, -6 e -7, várias mutações únicas foram introduzidas nestas sequências via mutagénese

dirigida ao local. Todas as mutações individuais foram criadas usando o kit de mutagénese dirigida ao local QuickChange (TM) com a polimerase de ADN PfuTurbo $\langle T_m \rangle$ e a endonuclease DPN I da Stratagene de acordo com o manual de instruções do fabricante.

Usando a estirpe bacteriana W3110BP transformada com os plasmídeos e induzida com IPTG, as proteínas foram expressas em corpos de inclusão. Estes corpos de inclusão foram isolados usando um tampão de homogeneização (Tris HCl 25 mM pH 7,3, EDTA 10 mM, NaOH pH 8, ureia 8 M) e tampão de lavagem (ureia 1 M, Tris HCl 20 mM pH 8,3, EDTA 10 mM, NaOH pH 8,0) de acordo com procedimentos padrão. A purificação adicional foi realizada em uma coluna de fase reversa em Aquapore Octyl (Applied Biosys, (CV = 7,8 mL) 100x10, 20 μ , N° 186470) com um gradiente de Eluente A a 100% (TFA 0,1%, HPLC H₂O) para Eluente B a 100% (TFA 0,1%, CH₃N 90%, HPLC H₂O) em 104 minutos (taxa de fluxo: 3 mL/min). Depois de um controlo por *Western blot*, as frações contendo a proteína mutante foram reunidas e liofilizadas.

As proteínas mutantes foram dissolvidas em tampão de dissolução (Guanidina HCl 6 M, Tris 50 mM, NaCl 150 mM, DTT 3 mM pH = 8,0), a concentração de proteína foi exatamente ajustada para 2,6 mg/mL e o pH foi ajustado entre 8 e 9. Após 2 h de incubação à temperatura ambiente, o tampão de rearranjo (NaCl 1 M, Tris 50 mM, EDTA 5 mM, GSSG 1 mM, GSH 2 mM, Chaps 33 mM, pH = 9,5) foi adicionado sob agitação suave para alcançar uma concentração final de 0,16 mg/mL.

A solução foi, em seguida, incubada durante 48 h a 22° C e o rearranjo foi parado por alteração do pH para 3-4 por adição de HCl a 18%. Após a centrifugação, o monómero não

rearranjado foi separado a partir da forma de dímero ao ser submetido a um segundo RP-HPLC sob as mesmas condições. As frações contendo a proteína dimerizada foram reunidas, liofilizadas e armazenadas a -70° C.

Exemplo 2: Medição da atividade biológica dos mutantes ML in vitro pelo ensaio ALP

1×10^4 células da linha celular osteocondroprogenitora ATDC-5 foram incubadas durante a noite em placas de 96 poços em meio de cultura de células (alfa-MEM, penicilina / estreptomicina, L-glutamina 2 mM, FCS 10%) a 37° C., CO₂ 5%, saturada com H₂O. No dia seguinte, as células foram estimuladas com as proteínas relacionadas com o GDF-5 e seus mutantes durante 72 horas com as concentrações de ligandos indicados. As células foram subsequentemente lavadas com PBS (solução salina tamponada de fosfato). A lise celular foi realizada em 100 µL de tampão de lise alcalina 1 (glicina 0,1 M, pH 9,6, NP-40 1%, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 1 mM) durante 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, 100 µL de tampão de lise alcalina 2 foi adicionado (glicina 0,1 M, pH 9,6, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 1 mM + PNPP 2mg/mL). As placas foram incubadas a 37° C, 5% de CO₂, saturada com H₂O. A reação da ALP foi interrompida posteriormente com 100 µL de NaOH 30g/L e, finalmente, a densidade ótica foi medida com um leitor de microplacas automático a 405 nm tendo em consideração a subtração do valor do branco.

Como um exemplo, os resultados (valores médios de 2 experiências independentes) em relação ao mutante M453V/M456V do hGDF-5 são apresentados na FIG. 5. A proteína mutante exibe uma atividade biológica de 585,5% (a 133 ng/mL), 356,3% (a 400 ng / mL) e 236,3% (a 1200 ng/mL) da atividade da proteína do tipo selvagem (rh-GDF-5) neste ensaio (média de várias experiências). A

atividade mínima medida para o mutante para uma concentração única da proteína e numa única experiência foi de 150% da atividade da proteína do tipo selvagem.

Exemplo 3:

Formação óssea ectópica *in vivo*: um modelo em rato SCID para rhGDF-5, rhGDF-5 M453V/M456V e BMP-2

As capacidades de indução óssea melhoradas dos mutantes ML das proteínas relacionadas com o GDF-5 também foram verificadas *in vivo*. As cerâmicas do beta-fosfato tricálcico (chronOS (R), Synthes/ RMS Foundation) foram utilizadas como biomateriais biodegradáveis com um tamanho de 3x3x3,5 mm. Os fatores de crescimento foram dissolvidos em acetato de sódio pH 4, como se segue: rhGDF-5, numa concentração de 10 µg em 7 µL; rhGDF-5 M453V/M456V numa concentração de 10 µg em 9 µL e BMP-2 (Induct OS Wyeth (R) - Lote N° 20603) foi primeiro dissolvido em água estéril numa concentração de 3 mg/mL e em seguida dissolvido em acetato de sódio em uma concentração de 10 µg em 7 µL. Os controlos foram saturados com 7 µL de acetato de sódio. Após o revestimento dos suportes foram então secos durante 10 minutos e armazenados a -20° C. Antes da implantação, os suportes foram carregados com 10 µL de fibronectina. Neste estudo foram usados ratos (SCID) com imunodeficiência combinada grave (30 + / - 2 g). Sob anestesia geral i.p., foi criada rapidamente uma bolsa subcutânea através de uma incisão com um centímetro na parte de trás. Um suporte carregado foi inserido na bolsa. A ferida foi fechada com suturas interrompidas simples. Os animais foram sacrificados após quatro semanas e os suportes foram recolhidos. Foram realizados exames histológicos e µTC (µTC 80 SCANCO MEDICAL). Para os exames histológicos, os suportes foram embebidos em cera de parafina e secções de 5 µm de espessura foram coradas com AlizarinRed-S (0,5%) e

Verde Rápido (0,04%) para demonstrar o cálcio novo construído no interior dos suportes.

Os resultados são apresentados nas Fig. 6 e 7. Os controlos não apresentaram qualquer sinal de uma nova formação óssea ectópica. Os suportes carregados com rhGDF-5 apresentaram uma quantidade média de osso recém-construído com alguma formação óssea no suporte. O rhGDF-5 M453V/M456V teve o valor mais elevado de formação óssea de novo. Os suportes carregados com rhGDF-5 453V/M456V apresentaram osso proeminente no suporte. Os suportes tratados com BMP-2 apresentaram osso proeminente nos suportes, mas sem serem tão homogéneos como os suportes carregados com rhGDF-5 453V/M456V. Em resumo, os resultados confirmaram que o rhGDF-5 453V/M456V leva à formação óssea fortemente reforçada neste modelo de ratinho SCID.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Biopharm Gesellschaft zur biotechnologischen Entwicklung von Pharmaka mbH

<120> Mutantes do Fator de Crescimento com Atividade Elevada

<130> 36878PEP

<160> 2

<170> PatentIn Versão 3.3

<210> 1

<211> 2703

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (640)..(2142)

<400> 1
 ccatggcctc gaaagggcag cggtgatTTT tttcacataa statatcgca cttaaatgag 60
 tttcagacacgc atgacatcg agagtaattt aattggTTTg ggTTgaaatt ccgtttccaa 120
 ttccTGAGTT caggTTTgta aaagatTTTt ctgagcacct gcaggcctgt gagtgtgtgt 180
 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt aGTatTTca ctggaaagga ttcaaaaacta 240
 gggggaaaaaa aaaaactggag cacacaggca gcattacgccc attcttcctt ctggaaaaaa 300
 tcccttcaagcc ttatacaagg ctccttcaag ccctcagtc aTTgtgcagg agaaagggggg 360
 cggTTggctt ttcctttca agascagtt atTTTcagtt gctgactgga gacggtgac 420
 gtctggatAC gagagcattt ccactatggg actggataca sacacacacc cggcagactt 480
 casagagtctc agactgagga gaaagccTTT cttctgtctg ctactgtgc tgccgctgtct 540
 tttgaaagtcc cactccttcc atggTTTtcc ctgccaaacc agaggcacct ttgctgtgc 600
 cgtctgttcc ttgggtgtca ttcagccggct ggcccaagg atg aga ctc ccc aaa 664
 Met Arg Leu Pro Lys
 1 5

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

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

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

gcc cgg aac gtc ttG egg cca ggg ggt cac agc tat ggt ggg ggg gcc 846
 Ala Arg Asn Val Phe Arg Pro Gly Gly His Ser Tyr Gly Gly Gly Ala
 55 60 65

acc aat gcc aat gcc egg gca aag gga ggc acc ggg cag aca gga ggc 894
 Thr Asn Ala Asn Ala Arg Ala Lys Gly Gly Thr Gly Gln Thr Gly Gly
 70 75 80 85

ctg aca cag ccc aag aag gat gaa ccc aaa aag ctg ccc ccc aga ccg Leu Thr Gln Pro Lys Lys Asp Glu Pro Lys Lys Leu Pro Pro Arg Pro 90 95 100	942
ggc ggc cct gaa ccc aag cca gga cac cct ccc caa aca aag cag cgt Gly Gly Pro Glu Pro Lys Pro Gly His Pro Pro Gln Thr Arg Gln Ala 105 110 115	990
aca gcc cgg act gtg acc cca aaa gga cag ctt ccc gga ggc aag gca Thr Ala Arg Thr Val Thr Pro Lys Gly Gln Leu Pro Gly Gly Lys Ala 120 125 130	1038
ccc cca aaa gca gga tct gtc ccc agc tcc ttc ctg ctg aag aag gcc Pro Pro Lys Ala Gly Ser Val Pro Ser Ser Phe Leu Leu Lys Lys Ala 135 140 145	1086
agg gag ccc ggg ccc cca cga gag ccc aag gag ccc ttt cgc cca ccc Arg Glu Pro Gly Pro Pro Arg Glu Pro Lys Glu Pro Phe Arg Pro Pro 150 155 160 165	1134
ccc atc aca ccc cac gag tac atg ctc tct tac agg acg atg tcc Pro Ile Thr Pro His Glu Tyr Met Leu Ser Leu Tyr Arg Thr Leu Ser 170 175 180	1182
gat gct gac aga aag gga ggc aac agc agc gtg aag ttg gag gct ggc Asp Ala Asp Arg Lys Gly Gly Asn Ser Ser Val Lys Leu Glu Ala Gly 185 190 195	1230
ctg gcc aac acc atc acc agc ttt att gac aaa ggg caa gat gac cga Leu Ala Asn Thr Ile Thr Ser Phe Ile Asp Lys Gly Gln Asp Asp Arg 200 205 210	1278
ggc ccc gtg gtc agg aag cag agg tac gtg ttt gac att agt gcc ctg Gly Pro Val Val Arg Lys Gln Arg Tyr Val Phe Asp Ile Ser Ala Leu 215 220 225	1326
gag aag gat ggg ctg ctg ggg gcc gag ctg cgg atc ttg cgg aag aag Glu Lys Asp Gly Leu Leu Gly Ala Glu Leu Arg Ile Leu Arg Lys Lys 230 235 240 245	1374
ccc tcg gac acg gcc aag cca gcg gcc ccc gga ggc ggg cgg gct gcc Pro Ser Asp Thr Ala Lys Pro Ala Ala Pro Gly Gly Arg Ala Ala 250 255 260	1422
cag ctg aag ctg tcc agc tgc ccc agc ggc cgg cag ccc gcc tcc ttg Gln Leu Lys Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gly Arg Gln Pro Ala Ser Leu 265 270 275	1470
ctg gat gtg cgc tcc gtg cca ggc ctg gac gga tct ggc tgg gag gtg Leu Asp Val Arg Ser Val Pro Gly Leu Asp Gly Ser Gly Trp Glu Val 280 285 290	1518
tcc gac atc tgg aag ctc ttc cga aac ttt aag aac tcc gcc cag ctg Phe Asp Ile Trp Lys Leu Phe Arg Asn Phe Lys Asn Ser Ala Gln Leu 295 300 305	1566
tgc ctg gag ctg gag gcc tgg gaa cgg ggc aag gcc gtg gac ctc cgt Cys Leu Glu Leu Glu Ala Trp Glu Arg Gly Arg Ala Val Asp Leu Arg 310 315 320 325	1614
ggc ctg ggc tcc gac cgc gcc gcc cgg cag gtc cac gag aag gcc ctg Gly Leu Gly Phe Asp Arg Ala Ala Arg Gln Val His Glu Lys Ala Leu 330 335 340	1662
tcc ctg gtg ttt ggc cgc acc aag aaa cgg gac ctg ttc ttt aat gag Phe Leu Val Phe Gly Arg Thr Lys Lys Arg Asp Leu Phe Phe Asn Glu 345 350 355	1710

att aag gcc cgc tct ggc cag gac gat aag acc gtc tat gag tac ctg Ile Lys Ala Arg Ser Gly Gln Asp Asp Lys Thr Val Tyr Glu Tyr Leu 360 365 370	1758
ttc agc cag cgg cgs aca cgg cgg gcc cca ctg gcc act cgc cag ggc Phe Ser Gln Arg Arg Lys Arg Arg Ala Pro Leu Ala Thr Arg Gln Gly 375 380 385	1808
aag cga ccc agc aag sac ctt aag gct cgc tgc agt cgg aag gca ctg Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu 390 395 400 405	1854
cat gtc aac ttc aag gac atg ggc tgg gac tgg atc atc gca ccc His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro 410 415 420	1902
ctt gag tac gag gct ttc cac tgc gag ggg ctg tgc ggg ttc cca ttg Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu 425 430 435	1950
cgc tcc cac ctg gag ccc acg aat cat gca gtc atc cag acc ctg atg Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Val Ile Gln Thr Leu Met 440 445 450	1998
aac tcc atg gac ccc ggg tcc aca cca ccc acc tgc tgg ccc acg Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr 455 460 465	2046
cgg ctg agt ccc atc agc atc ctc att gac tct gcc aac aac gtc Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val 470 475 480 485	2094
gtg tat aag cag tat gag gac atg gtc gtg gag tcg tgg ggc tgc agg Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg 490 495 500	2142
tagcagcaact ggccctctgt ctccctgggt ggcacatccc aagagccctt ccctgcactc ctggaaatcac agaggggtca ggaagctgtg gcaggagcat ctacacagct tgggtgaaag gggattccaa taagcttgcg cgcctctctga gtgtgacttg ggctaaaggc ccccttttat ccacaagttc ccctggctga ggattgctgc cccgtctgtg atgtgaccag tggcaggcac aggccaggg agacagactc tgaatggac tgagtcccaag gaaacagtgc tttcccgatga gactcagccc accatttctc ctacacccggg ccttctcage ctctggactc tcccaaggcac ctctcaggag agccacaggt gccactgcct cctcaasatca catttgcgcc tggtgacttc ctgtccctgg gacagttgag aagctgactg ggcaagagtg ggagagaaaga ggagagggct tggatagagt tgaggagtgt gaggctgtta gactgtttaga tttaatgtt tattgttag ataaaaagca aaactgtgcc t	2202
<210> 2 <211> 501 <212> PRT <213> Homo sapiens	2262
<400> 2	2322
Met Arg Leu Pro Lys Leu Leu Thr Phe Leu Leu Trp Tyr Leu Ala Trp 1 5 10 15	2382
ataaaaagca aaactgtgcc t	2502
ctctcaggag agccacaggt gccactgcct cctcaasatca catttgcgcc tggtgacttc	2562
ctgtccctgg gacagttgag aagctgactg ggcaagagtg ggagagaaaga ggagagggct	2622
tggatagagt tgaggagtgt gaggctgtta gactgtttaga tttaatgtt tattgttag	2682
ataaaaagca aaactgtgcc t	2703

Met Arg Leu Pro Lys Leu Leu Thr Phe Leu Leu Trp Tyr Leu Ala Trp
1 5 10 15

Leu Asp Leu Glu Phe Ile Cys Thr Val Leu Gly Ala Pro Asp Leu Gly
 30 35 30
 Gln Arg Pro Gln Gly Thr Arg Pro Gly Leu Ala Lys Ala Glu Ala Lys
 35 40 45
 Glu Arg Pro Pro Leu Ala Arg Asn Val Phe Arg Pro Gly Gly His Ser
 50 55 60
 Tyr Gly Gly Gly Ala Thr Asn Ala Asn Ala Arg Ala Lys Gly Gly Thr
 65 70 75 80
 Gly Gln Thr Gly Gly Leu Thr Gln Pro Lys Lys Asp Glu Pro Lys Lys
 85 90 95
 Leu Pro Pro Arg Pro Gly Pro Glu Pro Lys Pro Gly His Pro Pro
 100 105 110
 Gln Thr Arg Gln Ala Thr Ala Arg Thr Val Thr Pro Lys Gly Gln Leu
 115 120 125
 Pro Gly Gly Lys Ala Pro Pro Lys Ala Gly Ser Val Pro Ser Ser Phe
 130 135 140
 Leu Leu Lys Lys Ala Arg Glu Pro Gly Pro Pro Arg Glu Pro Lys Glu
 145 150 155 160
 Pro Phe Arg Pro Pro Pro Ile Thr Pro His Glu Tyr Met Leu Ser Leu
 165 170 175
 Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Ala Asp Arg Lys Gly Gly Asn Ser Ser Val
 180 185 190
 Lys Leu Glu Ala Gly Leu Ala Asn Thr Ile Thr Ser Phe Ile Asp Lys
 195 200 205
 Gly Gln Asp Asp Arg Gly Pro Val Val Arg Lys Gln Arg Tyr Val Phe
 210 215 220
 Asp Ile Ser Ala Leu Glu Lys Asp Gly Leu Leu Gly Ala Glu Leu Arg
 225 230 235 240
 Ile Leu Arg Lys Lys Pro Ser Asp Thr Ala Lys Pro Ala Ala Pro Gly
 245 250 255
 Gly Gly Arg Ala Ala Gln Leu Lys Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gly Arg
 260 265 270
 Gln Pro Ala Ser Leu Leu Asp Val Arg Ser Val Pro Gly Leu Asp Gly
 275 280 285

Ser Gly Trp Glu Val Phe Asp Ile Trp Lys Leu Phe Arg Asn Phe Lys
 290 295 300

 Asn Ser Ala Gln Leu Cys Leu Glu Leu Glu Ala Trp Glu Arg Gly Arg
 305 310 315 320

 Ala Val Asp Leu Arg Gly Leu Gly Phe Asp Arg Ala Ala Arg Gln Val
 325 330 335

 His Glu Lys Ala Leu Phe Leu Val Phe Gly Arg Thr Lys Lys Arg Asp
 340 345 350

 Leu Phe Phe Asn Glu Ile Lys Ala Arg Ser Gly Gln Asp Asp Lys Thr
 355 360 365

 Val Tyr Glu Tyr Leu Phe Ser Gln Arg Arg Lys Arg Arg Ala Pro Leu
 370 375 380

 Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala Arg Cys
 385 390 395 400

 Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp Asp Asp
 405 410 415

 Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu Gly Leu
 420 425 430

 Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Val
 435 440 445

 Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro Pro Thr
 450 455 460

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

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

 Ser Cys Gly Cys Arg
 500

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína relacionada com o GDF-5 com actividade biológica melhorada em que
 - a) O aminoácido na posição correspondente à metionina 453 (M453) do GDF-5 humano do tipo selvagem (SEQ ID NO 1) é alanina, valina ou isoleucina, e/ou,
 - b) O aminoácido na posição correspondente à metionina 456 (M456) do GDF-5 humano do tipo selvagem (SEQ ID NO 1) é alanina, valina ou isoleucina e em que compreende uma sequência que corresponde a uma das seguintes fórmulas genéricas de aminoácidos:

b)

CX₁X₂KX₃LHVX₄FX₅X₆X₇GWDDWX₈IAPLX₉YEAX₁₀HCX₁₁GX₁₂CX₁₃FPX₁₄RS_H
LEPTNHAX₁₅IQTLZ₁NSMX₁₆PX₁₇X₁₈X₁₉PX₂₀X₂₁CCVPX₂₂X₂₃LX₂₄PISILX₂₅
X₂₆DX₂₇X₂₈NNVVYX₂₉X₃₀YEX₃₁MVVE₃₂CGCR ou

b)

CX₁X₂KX₃LHVX₄FX₅X₆X₇GWDDWX₈IAPLX₉YEAX₁₀HCX₁₁GX₁₂CX₁₃FPX₁₄RS_H
LEPTNHAX₁₅IQTLMNSZ₂X₁₆PX₁₇X₁₈X₁₉PX₂₀X₂₁CCVPX₂₂X₂₃LX₂₄PISILX₂₅
X₂₆DX₂₇X₂₈NNVVYX₂₉X₃₀YEX₃₁MVVE₃₂CGCR ou

c)

CX₁X₂KX₃LHVX₄FX₅X₆X₇GWDDWX₈IAPLX₉YEAX₁₀HCX₁₁GX₁₂CX₁₃FPX₁₄RS_H
LEPTNHAX₁₅IQTLZ₁NSZ₂X₁₆PX₁₇X₁₈X₁₉PX₂₀X₂₁CCVPX₂₂X₂₃LX₂₄PISILX₂₅
X₂₆DX₂₇X₂₈NNVVYX₂₉X₃₀YEX₃₁MVVE₃₂CGCR,

em que

X₁ significa asparagina (N) ou serina (S)

X₂ significa arginina (R) ou lisina (K)

X₃ significa alanina (A), glutamina (Q), prolina (P) ou serina (S)

X₄ significa asparagina (N) ou ácido aspártico (D)

X₅ significa arginina (R) ou a lisina (K)

X₆ significa ácido aspártico (D) ou ácido glutâmico (E)

X₇ significa leucina (L) ou metionina (M)

X₈ significa isoleucina (I) ou valina (V)

X₉ significa ácido aspártico (D) ou ácido glutâmico (E)

X₁₀ significa histidina (H), fenilalanina (F) ou tirosina (Y)

X₁₁ significa ácido aspártico (D) ou ácido glutâmico (E)

X₁₂ significa leucina (L), metionina (M) ou valina (V)

X₁₃ significa ácido aspártico (D) ou ácido glutâmico (E)

X₁₄ significa isoleucina (I) ou leucina (L)

X₁₅ significa isoleucina (I) ou valina (V)

X₁₆ significa alanina (A), asparagina (N) ou ácido aspártico (D)

X₁₇ significa arginina (R), asparagina (N), ácido aspártico (D), ácido glutâmico (E), glicina (G) ou serina (S)

X₁₈ significa alanina (A), asparagina (N), serina (S) ou treonina (T)

X₁₉ significa alanina (A), metionina (M) ou treonina (T)

X₂₀ significa alanina (A) ou prolina (P)

X₂₁ significa serina (S) ou treonina (T)

X₂₂ significa alanina (A), serina (S) ou treonina (T)

X₂₃ significa arginina (R) ou a lisina (K)

X₂₄ significa serina (S) ou treonina (T)

X₂₅ significa fenilalanina (F) ou tirosina (Y)

X₂₆ significa isoleucina (I) ou treonina (T)
X₂₇ significa alanina (A) ou serina (S)
X₂₈ significa alanina (A) ou glicina (G)
X₂₉ significa asparagina (N) ou lisina (K)
X₃₀ significa ácido glutâmico (E) ou glutamina (Q)
X₃₁ significa ácido aspártico (D) ou ácido glutâmico (E),
X₃₂ significa alanina (A), glutamina (Q), serina (S) ou treonina (T)

Z₁ significa alanina (A), isoleucina (I), ou valina (V),
Z₂ significa alanina (A), isoleucina (I), ou valina (V).

Ou uma sequência correspondente em que a cisteína responsável pela formação de dímeros é substituída por um aminoácido diferente ou é eliminada.

2. Proteína de acordo com a reivindicação 1, em que a proteína relacionada com o GDF-5 é uma proteína GDF-5 de vertebrados ou um seu fragmento biologicamente ativo ou uma sua versão alélica.
3. Proteína de acordo com a reivindicação 2, em que a proteína relacionada com o GDF-5 é o GDF-5 humano (SEQ ID NO 1) ou um seu fragmento biologicamente ativo.
4. Ácido nucleico codificando para uma proteína de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores 1 a 3.
5. Vítor de expressão compreendendo um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 4.

6. Célula hospedeira contendo um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 4 ou um vetor de expressão de acordo com a reivindicação 5.
7. Composição farmacêutica compreendendo uma proteína de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, ou/e um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 4, ou/e um vetor de expressão de acordo com a reivindicação 5, ou/e uma célula hospedeira de acordo com a reivindicação 6.
8. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 7, compreendendo adicionalmente substâncias auxiliares e/ou veiculares farmaceuticamente aceitáveis.
9. Composição farmacêutica de acordo com as reivindicações 7 ou 8, em que a proteína e/ou o ácido nucleico e/ou o vetor e/ou a célula hospedeira estão contidos no interior ou sobre um material de matriz biocompatível.
10. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 9, para uso no diagnóstico, prevenção e/ou terapia de danos ou doenças associados ao osso e cartilagem danificados.
11. Composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, para uso na promoção do crescimento da cartilagem e/ou osso e/ou na fusão espinal, para o diagnóstico, prevenção e/ou terapia de tecidos de vasos sanguíneos danificados ou doentes e para a indução da angiogénesse.
12. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 10, em que a referida doença associada aos danos nos ossos e na cartilagem é a osteoporose.

13. Método para a produção de uma proteína recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, compreendendo a preparação recombinante de uma proteína derivada de uma proteína relacionada com o GDF-5 por

- a) Substituição do aminoácido na posição correspondente à metionina 453 (M453) do GDF-5 humano do tipo selvagem (SEQ ID NO 1) com alanina, valina ou isoleucina; e/ou
- b) Substituição do aminoácido na posição correspondente à metionina 456 (M456) do GDF-5 humano do tipo selvagem (SEQ ID NO 1) com alanina, valina ou isoleucina.

14. Anticorpo específico para uma proteína relacionada com o GDF recombinante de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o anticorpo é específico para uma região que cobre aminoácidos correspondentes aos aminoácidos 453-456 do GDF-5 humano do tipo selvagem (SEQ ID NO:1).

15. Uso de uma proteína de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 4, um vetor de expressão de acordo com a reivindicação 5 e/ou uma célula hospedeira de acordo com a reivindicação 6, para a produção de uma composição terapêutica e/ou de diagnóstico para o diagnóstico, prevenção e/ou terapia de doenças associadas aos danos nos ossos e/ou cartilagem ou afectando doenças dos ossos e/ou cartilagem.

16. Uso de uma proteína de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 4, um vetor de expressão de acordo com a reivindicação 5 e/ou uma célula hospedeira de acordo com a reivindicação 6, para a produção de uma

composição terapêutica e/ou de diagnóstico para a promoção da formação de cartilagem e/ou osso e/ou fusão espinal.

17. Uso de uma proteína de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 4, um vetor de expressão de acordo com a reivindicação 5 e/ou uma célula hospedeira de acordo com a reivindicação 6, para a produção de uma composição terapêutica e/ou de diagnóstico para o diagnóstico, prevenção e/ou terapia de tecidos dos vasos sanguíneos danificados ou doentes.
18. Uso de uma proteína de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 4, um vetor de expressão de acordo com a reivindicação 5 e/ou uma célula hospedeira de acordo com a reivindicação 6, para a produção de uma composição terapêutica e/ou de diagnóstico para a indução da angiogénese.

Lisboa, 26 de Abril de 2012

1 NKLPELLTFL DFTYLANLQLE FICTYLGAPE LGQKPGTTRP GLAKAKAKER PPLAKRIVFPRP
61 CGNSYCGGAT NANAKAKGKT QGTQSLTQPK KIEPEKELPPR PGCPSPKPGH PPOTRQATAR
121 TVTPRQICLPG GKAFFKAGGV PESFLKEXAK BPGPFRESPRK PFPFPPPTPH KTMILSLYRTL
181 SDAGKEDGNS SVKLEAGLAK TITSPIDEGQ DSGCPVVRKQ KTVYFDISALE KDGLLGAEKL
241 ILRKEQPSDTA KPAAPGCGRA ACQELSSCPS GCGPASILDV RSVPGQJCGSG WEVPDINWLP
301 KNPFDNSAQLC LELEANERGR AVDILRGLGPD RAANQVHETKA LPLVFTNTTR KDLPPNREIEA
361 RSGQQDKRTVY KTLFSGRKER KAPLATRQGK RPSKSLKABC SRXALVYRFX DNGQDDOMIIA
421 PLEXRAFHCE GLCEFPILRK LEPTNHAVIG TLKNSMDPES TPFPTCCVPTR LSPISILSTD
481 SANHPPVYECY EOMVYVESCCG R

Figura 1

M453 M456 (hGDF-5)

↓ ↓

hGDF-5 : CSEFISLHYNDLQENEGVITAPLEVEVYKCREVDDPEPIRSHLEPTNHAIVIOTLQGSHDGGSTFPGCCVYATRNPISIILYEDAGKNNV : 87

hGDF-7 : CSEFISLHYNDLQENEGVITAPLEVEVYKCREVDDPEPIRSHLEPTNHAIVIOTLQGSHDGGSTFPGCCVYATRNPISIILYEDAGKNNV : 87

hGDF-5 : CSEFISLHYNDLQENEGVITAPLEVEVYKCREVDDPEPIRSHLEPTNHAIVIOTLQGSHDGGSTFPGCCVYATRNPISIILYEDAGKNNV : 87

hGDF-5 : YKQYEDDNVVVEGGCA

hGDF-7 : YKQYEDDNVVVEGGCA

hGDF-5 : YKQYEDDNVVVEGGCA

Figura 2

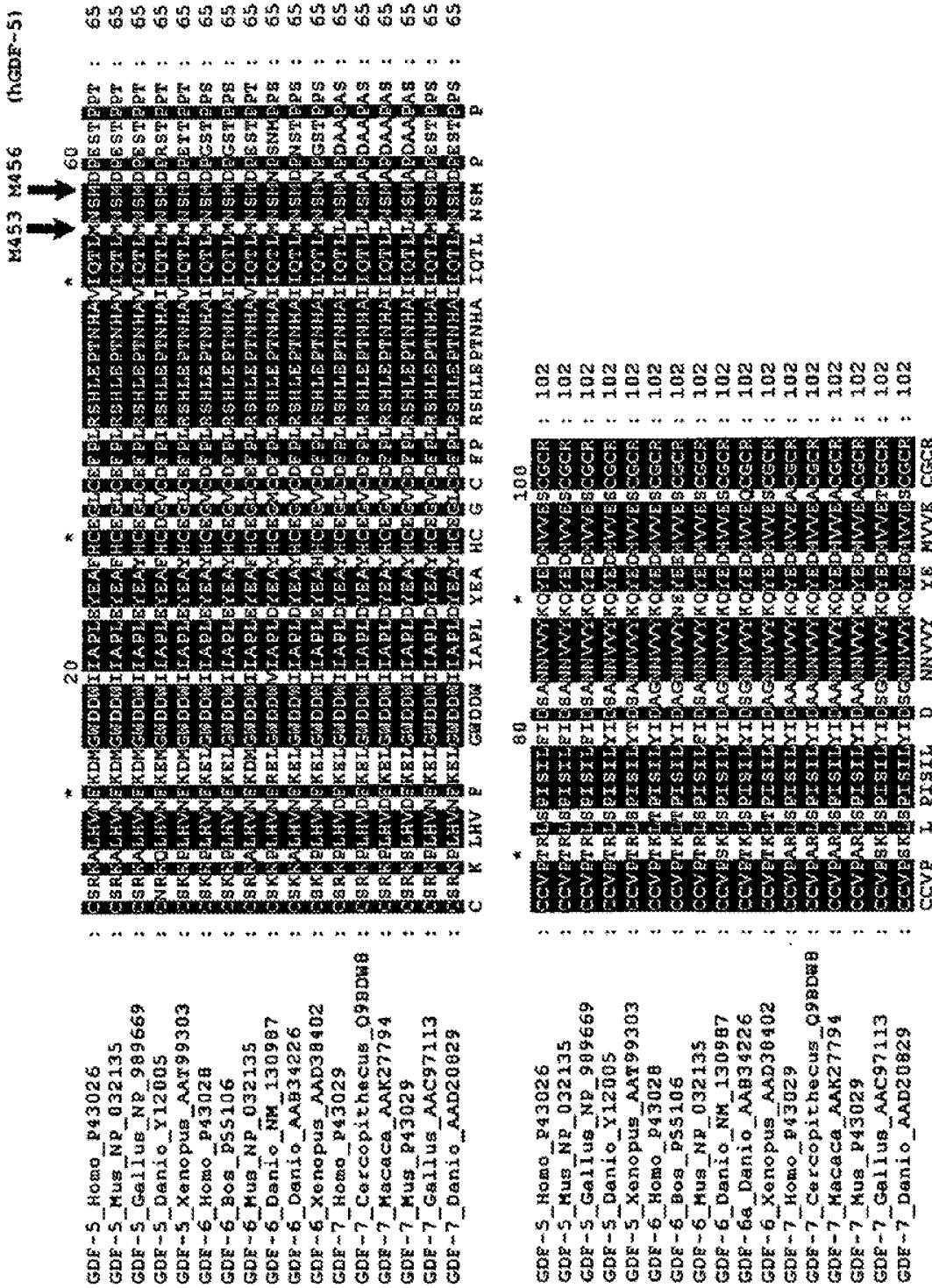


Figura 3

% da Identidade da Sequência com Domínio em Laço de Cistina
do GDF-5 Humano

Sequência	% identidade y	Resíduos Idênticos
GDF-5 Homo	100	102/102
GDF-5 Mus	99	101/102
GDF-5 Gallus	99	101/102
GDF-5 Xenopus	94	96/102
GDF-5 Danio (Contact)	88	90/102
GDF-7 Danio	88	90/102
GDF-6 Mus	86	88/102
GDF-7 Gallus	86	88/102
GDF-6 Danio (Radar)	86	88/102
GDF-6 Homo	85	87/102
GDF-6 Xenopus	84	86/102
GDF-6 Bos	83	85/102
GDF-7 Homo	81	83/102
GDF-7 Cercopithecus	80	82/102
GDF-7 Macaca	80	82/102
GDF-7 Mus	80	82/102
GDF-6 Danio (Dynamo)	79	81/102
BMP-2A	57	58/102
BMP-2B	57	58/102
Vg-1	52	53/102
DPP	52	53/102
BMP-5	52	53/102
BMP-9	51	52/102
BMP-10	51	52/102
BMP-8A	51	51/102
BMP-6	51	52/102
BMP-7	51	52/102
GDF-3	49	50/102
60A	48	49/102
BMP-8B	48	49/102
BMP-3A	47	48/103
GDF-9B	45	46/102
BMP-3B	43	44/103
GDF-8	37	38/102
GDF-12	37	38/104
GDF-11	36	37/102
GDF-9	32	33/102

Figura 4

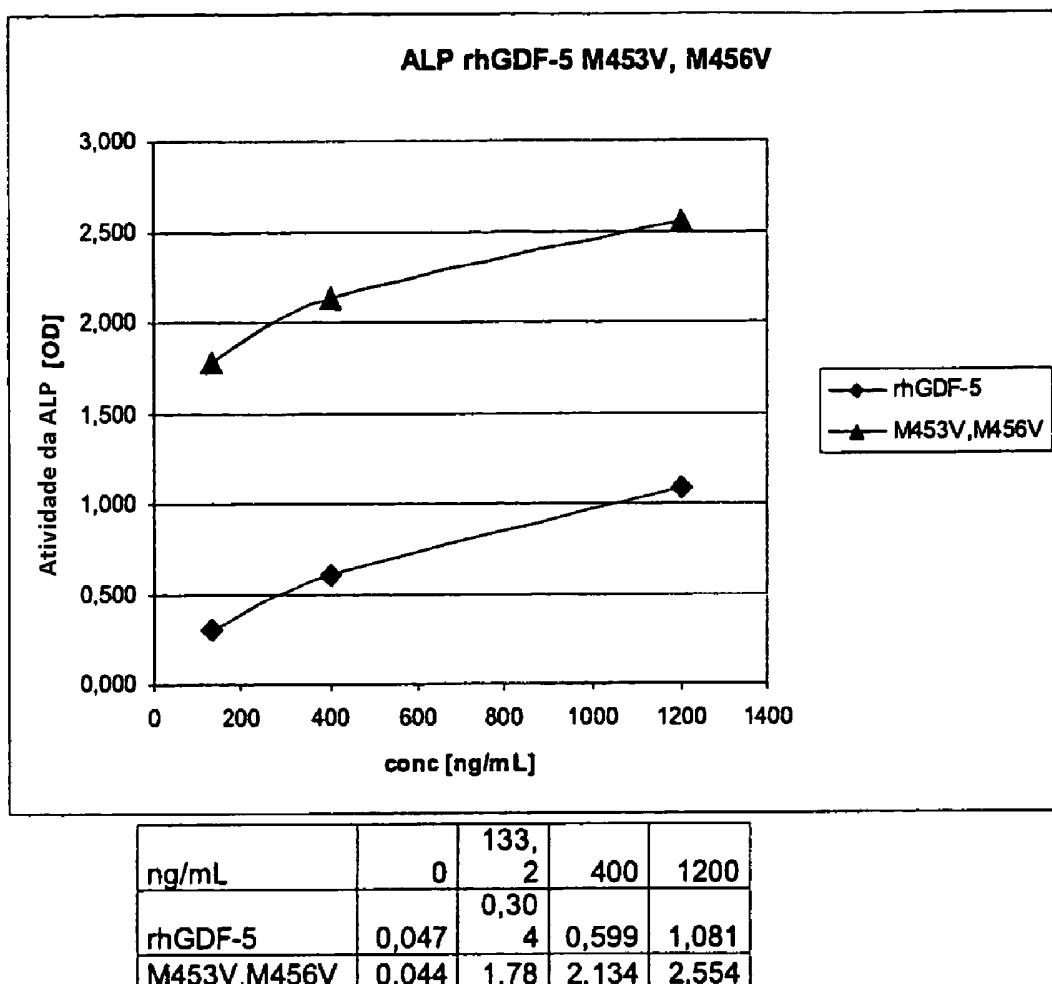
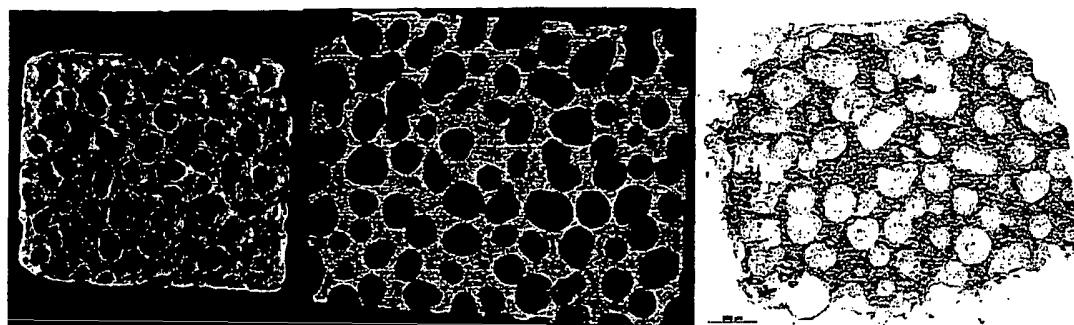
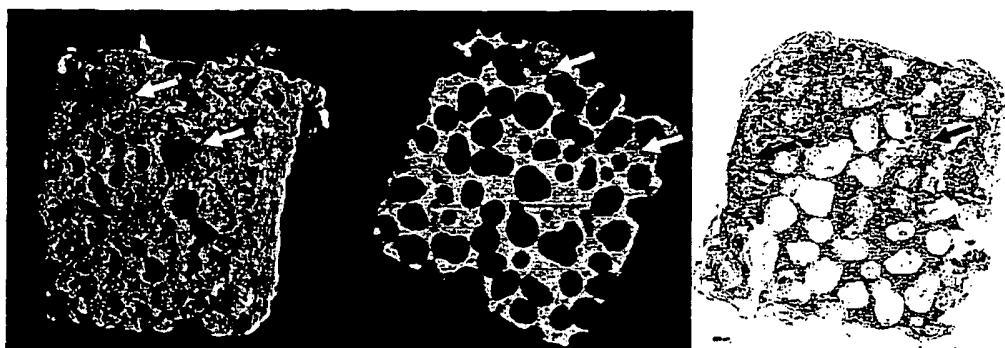


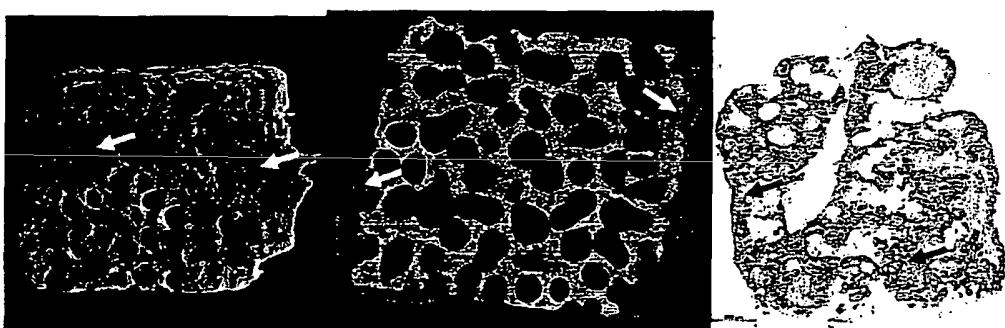
Figura 5



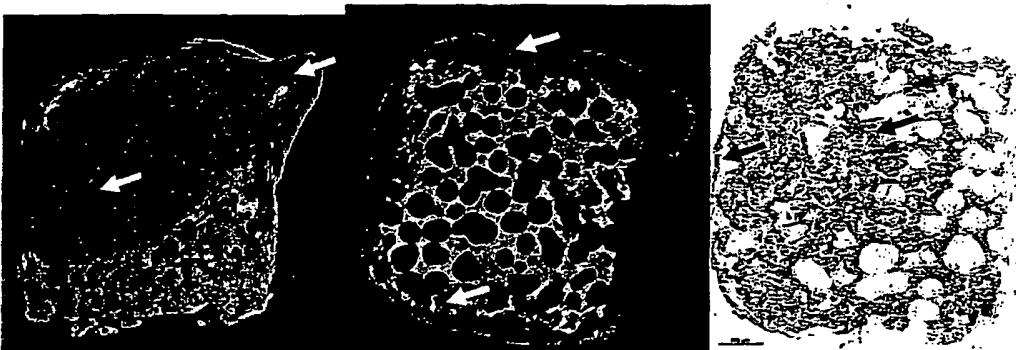
Controlo Negativo



GDF-5 rh (recombinante humano)



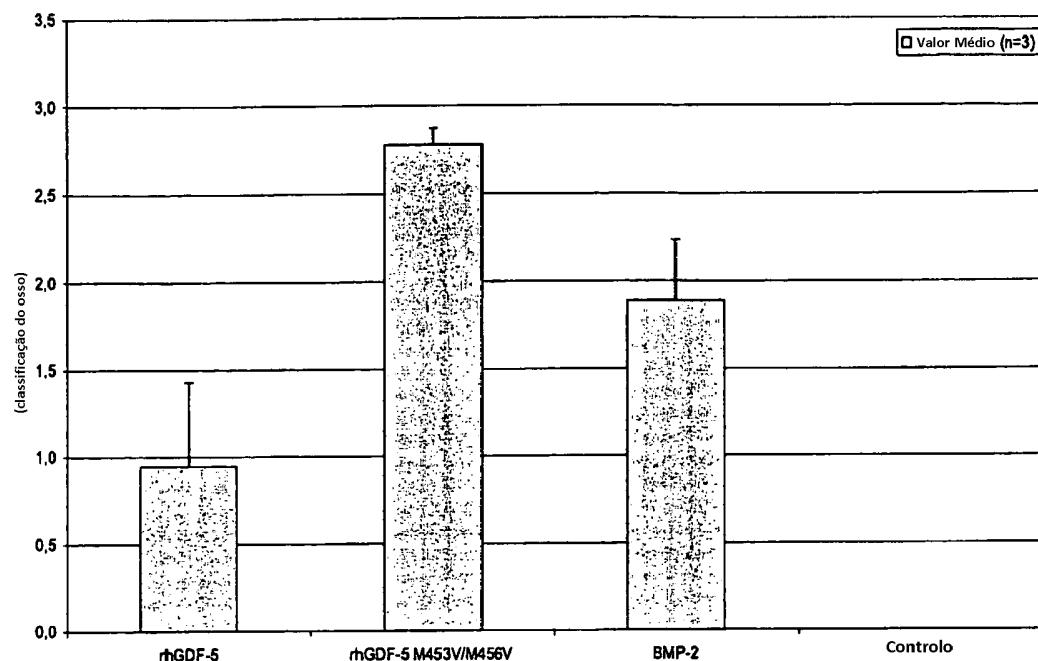
BMP-2 (recombinante humano)



GDF-5 rh (recombinante humano) 453V/M456V

Figura 6

Formação de Osso novo



Quantidade estimada da formação de osso novo nos suportes por utilização da seguinte escala:

sem osso	→ 0
1- 10 % osso	→ 1
10- 50 % osso	→ 2
50-100% osso	→ 3

	rhGDF-5	rhGDF-5 M453V/M456V	BMP-2	Controlo
Valor Médio (n=3)	0,94	2,78	1,89	0
SD	0,48	0,10	0,35	0

Figura 7