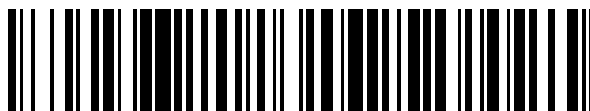


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 876 124**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2015** **E 19220066 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2021** **EP 3669886**

54 Título: **Proteínas morfogenéticas óseas**

30 Prioridad:

10.07.2014 GB 201412290

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

11.11.2021

73 Titular/es:

CAMBRIDGE ENTERPRISE, LTD. (100.0%)
The Old Schools, Trinity Lane
Cambridge Cambridgeshire CB2 1TN, GB

72 Inventor/es:

MORRELL, NICHOLAS W;
LI, WEI y
UPTON, PAUL D

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 876 124 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas morfogenéticas óseas

5 Campo de la invención

La invención se refiere a nuevas variantes de la proteína morfogenética ósea 9 (BMP9) y a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas variantes.

10 Referencia cruzada a la solicitud relacionada

Esta es una solicitud divisional de la solicitud de patente europea núm. 15739658.

Antecedentes de la invención

15 Una enfermedad vascular es un estado patológico de arterias musculares de tamaño grande y mediano y se desencadena por la disfunción de células endoteliales. Las células endoteliales se activan debido a factores como patógenos, partículas de LDL oxidadas y otros estímulos inflamatorios. Esto conduce a cambios en sus características: las células endoteliales empiezan a excretar citocinas y quimiocinas y expresan moléculas de
20 adhesión en su superficie. Esto, a su vez, tiene como resultado el reclutamiento de glóbulos blancos (monocitos y linfocitos), que pueden infiltrarse en la pared de los vasos sanguíneos. La estimulación de la capa de células del músculo liso con citocinas producidas por células endoteliales y por glóbulos blancos reclutados hace que las células del músculo liso proliferen y migren hacia el lumen del vaso sanguíneo. Este proceso provoca un engrosamiento de la pared del vaso, formando una placa que consiste en células proliferativas de músculo liso, macrófagos y varios
25 tipos de linfocitos. Esta placa tiene como resultado la obstrucción del flujo sanguíneo que conduce a la disminución de las cantidades de oxígeno y nutrientes que llegan al órgano diana. En las etapas finales, la placa también puede romperse causando la formación de coágulos y, como resultado, embolias.

30 Una enfermedad respiratoria es un término médico que abarca trastornos patológicos que afectan a los órganos y tejidos que hacen posible el intercambio de gases en los organismos superiores, e incluye trastornos del tracto respiratorio superior, tráquea, bronquios, bronquiolos, alvéolos, pleura y cavidad pleural, y de los nervios y músculos respiratorios. Las enfermedades respiratorias varían desde leves y autolimitantes, tales como el resfriado común, hasta agentes que ponen el peligro la vida como la neumonía bacteriana, la embolia pulmonar y el cáncer de pulmón.

35 La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una enfermedad vascular poco frecuente para la que actualmente no existe cura. La hipertensión arterial pulmonar (HAP) hereditaria e idiopática se caracteriza por el estrechamiento y la obliteración de arterias pulmonares precapilares, derivada de la proliferación y resistencia a la apoptosis de las células del músculo liso, fibroblastos y células endoteliales (Morrell et al (2009) J Am Coll Cardiol 54, S20-31). El
40 aumento resultante de la resistencia vascular pulmonar causa una elevación severa de la presión de la arteria pulmonar, que conduce a la hipertrofia del ventrículo derecho y, en última instancia, a la muerte por insuficiencia cardíaca derecha (Gaine y Rubin (1998) Lancet 352, 719-725).

45 La identificación de mutaciones heterocigóticas de la línea germinal en el gen que codifica el receptor de la proteína morfogenética ósea tipo II (BMPRII) en el año 2000 (Lane et al Nat Genet 26, 81-84 (2000); Deng et al (2000) Am J Hum Genet 67, 737-744) proporcionó una mayor comprensión de la patología de la HAP hereditaria. Estudios posteriores también han identificado mutaciones BMPRII en el 15-40 % de los casos de HAP idiopáticos (Thomson et al (2000) J Med Genet 37, 741-745), así como la reducción de la expresión del BMPRII como una característica de las formas no genéticas de HAP en humanos (Atkinson et al (2002) Circulation 105, 1672-1678) y modelos
50 animales (Long et al (2009) Circulation 119, 566-576).

La evidencia genética también involucra claramente a la célula endotelial como el tipo celular iniciador clave en la HAP. Estudios previos han demostrado que la potencial eliminación del BMPRII en el endotelio es suficiente para inducir HAP en una proporción de ratones (Hong et al (2008) Circulation 118, 722-730) y que el rescate de la
55 señalización endotelial del BMPRII en modelos murinos previene o revierte la hipertensión pulmonar experimental (Reynolds et al (2012) Eur Respir J 39, 329-343; Reynolds et al (2007) Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 292, L1182-1192; Spiekerkoetter et al (2013) J Clin Invest 123, 3600-3613). Más recientemente, se ha demostrado que la mejora selectiva del BMPRII endotelial con BMP9 revierte la hipertensión arterial pulmonar (Long et al (2015) Nature Medicine 21, 777-785). Además, ahora se han notificado mutaciones en el receptor de tipo I, ALK-1 (Trembath et al (2001) N Engl J Med 345, 325-334) y en la proteína accesoria del receptor de tipo III, endoglin (Harrison et al (2003) J Med Genet 40, 865-871), en pacientes con HAP, expresándose ambos casi exclusivamente en el endotelio. A pesar de esta evidencia, la naturaleza precisa de la disfunción endotelial en la patobiología de la HAP y la implicación de la señalización de las BMP en este proceso siguen siendo objeto de debate. Aunque la HAP establecida se caracteriza por la excesiva proliferación clonal de células endoteliales pulmonares (Yeager et al
60 (2001) Circ Res 88, E2-E11) como un componente de daños celulares obstructivos, el inicio de la patología de la enfermedad tanto en humanos (Teichert-Kuliszewski et al (2006) Circ Res 98, 209-217) como en modelos animales

de enfermedad (Wilson et al (1992) Crit Rev Toxicol 22, 307-325; Taraseviciene-Stewart et al (2001) Faseb J 15, 427-438) se ha relacionado con un paradójico aumento de la apoptosis de las células endoteliales. Estudios adicionales han identificado un papel para la pérdida endotelial del BMPR-II en la exacerbación de la permeabilidad vascular y la translocación alterada de leucocitos a través de la pared vascular (Burton et al (2011) Blood 117, 333-341; Burton et al (2011) Blood 118, 4750-4758; Kim et al (2013) Arterioscler Thromb Vasc Biol 33, 1350-1359).

Mientras que ciertos estudios *in vitro* que usan células del músculo liso de la arteria pulmonar (PASMC) han demostrado que concentraciones crecientes de ligando de BMP pueden solventar la pérdida de función asociada a las mutaciones en la vía de señalización de BMP (Yang et al (2008) Circ Res 102, 1212-1221), hasta la fecha, ningún estudio ha suministrado terapéuticamente el ligando de BMP *in vivo* para proporcionar una prueba de concepto para tal enfoque en el tratamiento de la HAP. La complejidad de la familia de señalización BMP, que está compuesta por cuatro receptores de tipo II, cinco receptores de tipo I y más de veinte ligandos de BMP (Miyazono et al (2005) Cytokine Growth Factor Rev 16, 251-263), puede explicar la ausencia de tales estudios. Identificar un ligando apropiado para dirigirse de forma selectiva al endotelio pulmonar presenta un reto significativo. Recientemente, se ha descubierto que el BMPR-II forma un complejo de señalización con ALK-1 y señala específicamente en respuesta a las BMP9 y 10 en células endoteliales microvasculares (David et al (2007) Blood 109, 1953-1961).

El documento WO 2005/113590 describe el uso de antagonistas de BMP10 para el tratamiento de afecciones cardíacas. El documento WO 2013/152213 describe el uso de polipéptidos BMP9 y/o BMP 10 para aumentar los niveles de glóbulos rojos y/o hemoglobina en vertebrados. El documento WO 2006/130022 describe un agonista o antagonista del BMPRII que es útil en la modulación de la foliculogénesis y la tasa de ovulación en hembras de mamíferos. El documento WO 2010/114833 describe composiciones farmacéuticas para tratar enfermedades cardíacas que incluyen una proteína morfogenética ósea. El documento WO 94/26893 describe proteínas BMP-10, procesos para producirlos y su uso en el tratamiento de anomalías óseas y cartilaginosas y en la curación de heridas y la reparación de tejidos correspondiente. Los documentos WO 95/24474 y WO 96/39431 describen el polipéptido BMP-10 humano y el ADN (ARN) que codifica dicho polipéptido que, según se afirma, son útiles para inducir la formación ósea *de novo*. Los documentos WO 93/00432 y WO 95/33830 describen proteínas BMP-9, procesos para producirlos y su uso en el tratamiento de anomalías óseas y cartilaginosas, curación de heridas y la reparación de tejidos correspondiente y en el crecimiento y función hepática. El documento WO 2010/115874 describe métodos para tratar la hipertensión arterial pulmonar mediante la administración de medicamentos dirigidos al eje apelina/APJ. Los documentos WO 2009/114180 y WO 2014/160203 describen inhibidores de molécula pequeña de la señalización de BMP que, según se afirma, son útiles en la modulación del crecimiento celular, diferenciación, y apoptosis y, por consiguiente, pueden ser útiles para tratar enfermedades o trastornos asociados con la señalización de BMP, incluyendo inflamación, enfermedad cardiovascular, enfermedad hematológica, cáncer y afecciones óseas, así como para modular la diferenciación y/o proliferación celular. También se afirma que los inhibidores de molécula pequeña son útiles para reducir los niveles circulantes de ApoB-100 o LDL y para tratar o prevenir la hipercolesterolemia o hiperlipoproteinemia adquirida o congénita; enfermedades, afecciones o síndromes asociados con anomalías en la absorción o en el metabolismo de los lípidos; o enfermedades, afecciones o síndromes causados por la hiperlipidemia.

Por consiguiente, es necesario proporcionar un tratamiento eficaz para las enfermedades vasculares y respiratorias, en particular la hipertensión arterial pulmonar (HAP).

Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido que es una variante de la proteína morfogenética ósea 9 (BMP9) que tiene actividad de señalización de células endoteliales y que carece de actividad osteogénica, en donde la diferencia entre la secuencia de aminoácidos de la variante de BMP9 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 consiste en una sustitución seleccionada del grupo que consiste en F362A, I375A, L379A, S402A, Y416A y Y418A.

De acuerdo con otro aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido que es una variante de la proteína morfogenética ósea 9 (BMP9) como se definen en el presente documento, que tiene actividad de señalización de células endoteliales y que carece de actividad osteogénica.

Los aspectos adicionales y realizaciones de la invención son tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas y se describen a continuación.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Vector y sistema de expresión para pro.BMP9 y pro.BMP10.

Figura 2. Generación de variantes no osteogénicas de la BMP9. A. Dibujo esquemático de la síntesis de la BMP9 y el procesamiento post-traduccion. B-D. Dos variantes de la BMP9 (D366A y D408A) tienen una

actividad de señalización comparable a la del tipo salvaje en células endoteliales en la inducción de la expresión de ID1 e ID2 (B&C), pero carecen de actividad de señalización osteogénica en las células C2C12 (D).

Figura 3. Comparación de la actividad de señalización de células endoteliales y la actividad osteogénica de células C2C12 entre BMP9 y BMP10. A-C: BMP9 y BMP10 tienen una actividad de señalización similar en HMEC-1. Después de la privación de suero, se trataron células HMEC-1 con BMP9 o BMP10 a las concentraciones indicadas. Ocho horas después del tratamiento, se extrajo el ARNm y se midieron los niveles de expresión de ID1, ID2 o BMPR-II mediante PCR cuantitativa. Se usó la microglobulina $\beta 2$ como control y se representaron en gráficos los cambios en veces en relación con las muestras no tratadas. Se muestra la media \pm ESM (error estándar de las medias), N=2; D. De forma similar a BMP9, BMP10 también puede proteger a las hPAEC contra la apoptosis inducida por TNF α -CHX. Los métodos son como los de la figura 3A, N=1; E. BMP9 y BMP10 inhiben la proliferación de células endoteliales en la misma medida. Se trataron hPAEC con BMP9 o BMP10 (ambas de R&D Systems) en EBM2/2 % SFB durante 24 horas. Las células se incubaron con 0,5 μ Ci/pocillo de 3 H-Timidina durante las últimas 6 horas. Después, las células se lisaron y se midió la absorción de 3 H-Timidina mediante conteo de centelleo líquido. N=1 experimento, media \pm ESM de 4 pocillos. F. A diferencia de BMP9, la BMP10 no tiene actividad osteogénica detectable medida como actividad FA en células C2C12. Se trataron células C2C12 con BMP9 o BMP10 a las concentraciones indicadas durante 64 horas. Las células se lisaron en Tritón X-100/PBS al 1% y se midió la actividad FA en el lisado celular usando el sustrato cromogénico de sal disódica de fosfatasa 4-nitrofenil fosfato (Sigma, S0942) y se midió el producto soluble a 405 nm en un lector de placas. En todos los ensayos, tanto la BMP9 como la BMP10 se compraron a R&D Systems. La pro.BMP9 se produjo internamente y su concentración (ligando maduro) se determinó mediante ELISA, usando la BMP9 de R&D Systems como patrón.

Figura 4. La pro.BMP10 generada internamente es completamente activa. A. Dibujo esquemático de la síntesis y el procesamiento post-traduccional de BMP10. B. medio acondicionado que expresa BMP10, transferido por el anticuerpo anti-BMP10 (R&D Systems). C. SDS-PAGE en condiciones no reductoras que muestra la purificación de la pro.BMP10 a partir de una columna de filtración en gel S200. Las identidades del predominio y BMP10 se han verificado mediante transferencia de western y mapeo de péptidos con espectrómetro de masas. D&E. Comparación de la capacidad de señalización de la pro.BMP10 con la de BMP9 y BMP10 (de R&D Systems) en HMEC-1, mediante la monitorización de la fosforilación de Smad1/5/8 y la expresión génica de ID1/2/3. Los métodos son como se muestran en las figuras 3A a C. Las concentraciones de BMP en D. son 0,05, 0,1, 1 y 5 ng/ml y el tiempo de tratamiento es de 1 hora. Se muestra la media \pm ESM, N=2.

Figura 5. Resumen de la mutagénesis mediante alanina en BMP9. Se generaron y probaron veinticuatro variantes de BMP9 tanto en células HMEC-1 para la inducción del gen ID1 como en células C2C12 para la actividad de la fosfatasa alcalina. Todos los resultados se normalizaron con respecto a la BMP9 de tipo salvaje (WT) y se muestra un promedio de tres experimentos. '-' denota las células no tratadas.

Figura 6. Las variantes de BMP pueden inducir la expresión del gen BMPR2 en las hPAEC.

Figura 7. La variante de BMP D408A puede rescatar a las hPAEC de la apoptosis temprana inducida por TNF α /CHX.

Figura 8. BMP9 y BMP10 inhiben la formación de un tubo de células endoteliales de sangre periférica (BOEC) en una matriz de colágeno:fibronectina. (A) Imágenes representativas de tubos de BOEC en geles de colágeno teñidos con DAPI y FITC-ULEX. Las redes se forman cuando están solas en el medio (2 % BBM2 = EBM2 que contiene 2 % SFB). La adición de concentraciones crecientes de BMP9 inhibe la formación de una red de BOEC. (B) Cuantificación de los parámetros de la red de BOEC determinados para 3 experimentos separados que demuestran que la BMP9 inhibe la extensión y la cantidad de tubos, la ramificación y la formación de bucles de una manera dependiente de la concentración. (C) BMP9 y BMP10, que son ligandos, inhiben la formación de tubos de BOEC.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido que es una variante de la proteína morfogenética ósea 9 (BMP9) que tiene actividad de señalización de células endoteliales y que carece de actividad osteogénica, en donde la diferencia entre la secuencia de aminoácidos de la variante de BMP9 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 consiste en una sustitución seleccionada del grupo que consiste en F362A, I375A, L379A, S402A, Y416A y Y418A.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido que es una variante de la proteína morfogenética ósea 9 (BMP9) tal como se define en el presente documento, que tiene actividad de señalización de células endoteliales y que carece de actividad osteogénica.

La presente divulgación está dirigida al uso terapéutico de proteínas morfogenéticas óseas que mantienen la actividad de señalización de las células endoteliales (por ejemplo, como puede demostrarse mediante la inducción

de la expresión de los genes ID1, ID2 y/o BMPR-II) pero que carecen de actividad osteogénica (por ejemplo, como la que puede medirse por la actividad de la fosfatasa alcalina (FA) en la línea celular de mioblastos de ratón C2C12). Por ejemplo, las variantes de BMP9 divulgadas en el presente documento no solo mantienen la actividad de señalización de las células endoteliales sino que, sinérgicamente, están desprovistas de actividad osteogénica. Por consiguiente, las variantes de BMP9 divulgadas en el presente documento representan un agonista más aconsejable que la BMP9 nativa para tratar una enfermedad vascular o una enfermedad respiratoria, en particular la HAP, en virtud de la falta de capacidad para promover la formación de hueso.

En el presente documento las referencias a "BMP10" y "proteína morfogenética ósea 10" se refieren a un polipéptido humano perteneciente a la superfamilia de proteínas TGF- β que está codificado por el gen *BMP10* (que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1) y que tiene la secuencia de 424 aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2, donde los restos de aminoácido 1 a 21 comprenden el péptido señal, los restos de aminoácidos 22 a 316 comprenden el propéptido y los restos de aminoácidos 317 a 424 comprenden la BMP10 madura.

En el presente documento, las referencias a "una variante de BMP9" y a "variante de la proteína morfogenética del hueso 9" se refieren a un polipéptido humano que pertenece a la superfamilia de proteínas TGF- β , que está codificado por el gen *BMP9* (que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3) y que tiene una variante de la secuencia de 429 aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 donde los restos de aminoácidos 1 a 22 comprenden el péptido señal, los restos de aminoácidos 23 a 319 comprenden el propéptido y los restos de aminoácidos 320 a 429 comprenden la BMP9 madura. Para evitar cualquier duda, cabe destacar que dicha variante de la BMP9 debe mantener la actividad de señalización de las células endoteliales pero carece de actividad osteogénica.

Las referencias a "variante" incluyen una modificación genética en la secuencia de BMP9 nativa, no mutante o de tipo salvaje. Entre los ejemplos de tales modificaciones genéticas se incluyen las mutaciones seleccionadas de: sustituciones, deleciones, inserciones y similares.

Las referencias a "que carece de actividad osteogénica" o "carecer de actividad osteogénica", como se usan en el presente documento, se refieren a una variante de BMP9 que comprende una o más mutaciones de la secuencia de la SEQ ID NO: 4 que tienen como resultado la eliminación, minimización y/o supresión de la actividad osteogénica (por ejemplo, que puede medirse por la actividad de la fosfatasa alcalina (FA) en la línea celular de mioblastos de ratón C2C12). Serán variantes ventajosas de BMP9 aquellas que mantengan una señalización endotelial específica (es decir, aquellas que tengan una inducción de ID1 de al menos 0,75 veces en comparación con la BMP9 de tipo salvaje, medida por la expresión del gen ID1 en células HMEC-1) y que tengan un valor menor de actividad osteogénica (es decir, menor de 0,5 veces en comparación con la BMP9 de tipo salvaje, medida por la actividad de la FA en la línea celular de mioblastos de ratón C2C12).

Serán variantes más aconsejables de BMP9 aquellas que mantengan una señalización endotelial específica (es decir, aquellas que tengan una inducción de ID1 de al menos 0,75 veces en comparación con la BMP9 de tipo salvaje, medida por la expresión del gen ID1 en células HMEC-1) y una actividad osteogénica insignificante (es decir, menor de 0,1 veces en comparación con la BMP9 de tipo salvaje, medida por la actividad de la FA en la línea celular de mioblastos de ratón C2C12).

Serán variantes aún más aconsejables de BMP9 aquellas que mantengan una señalización endotelial específica (es decir, aquellas que tengan niveles superiores de inducción de ID1 en comparación con la BMP9 de tipo salvaje, medida por la expresión del gen ID1 en células HMEC-1) y una actividad osteogénica insignificante (es decir, menor de 0,1 veces en comparación con la BMP9 de tipo salvaje, medida por la actividad de la FA en la línea celular de mioblastos de ratón C2C12).

La enfermedad vascular se puede seleccionar de: hipertensión pulmonar; hipertensión arterial pulmonar; telangiectasia hemorrágica hereditaria; aterosclerosis; y síndrome hepatopulmonar.

La enfermedad respiratoria se puede seleccionar de: enfermedades pulmonares obstructivas tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquitis crónica y enfisema; enfermedades vasculares pulmonares tales como edema pulmonar y hemorragia pulmonar; insuficiencia respiratoria y síndrome de dificultad respiratoria, tal como la lesión pulmonar aguda y el síndrome de dificultad respiratoria aguda; y enfermedades pulmonares intersticiales, tales como la fibrosis pulmonar idiopática.

En el presente documento se proporcionan datos que muestran que la BMP10 es tan potente como la BMP9 para inducir la expresión génica de ID1, ID2 y BMPR-II (véanse las figuras 3A a 3C). Asimismo, en el presente documento se ha demostrado que BMP10 exhibe la misma actividad anti-apoptótica que BMP9 en la protección de las hPAEC contra la apoptosis inducida por TNF α -CHX (véase la figura 3D). Sin embargo, de forma crucial, BMP10, a diferencia de BMP9, no indujo ninguna actividad de la FA a la concentración más alta probada (véase la figura 3F).

BMP10 puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

BMP10 puede ser codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1.

Se desvela la forma ligada a prodominio de BMP10 (pro.BMP10). En el presente documento se proporcionan datos que evidencian que el complejo pro.BMP10 es muy estable (véanse las figuras 4B y 4C) y es probable que sea la forma preferente para el tratamiento de enfermedades vasculares y respiratorias, tales como la HAP.

5 La pro.BMP10 puede comprender una secuencia de propéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los restos 22-316 de la SEQ ID NO: 2 unida de forma no covalente a una secuencia de BMP10 madura que tiene la secuencia de aminoácidos de los restos 317-424 de la SEQ ID NO: 2.

10 La pro.BMP10 puede comprender un tetrámero que contiene dos de dichas secuencias de propéptidos y dos de dichas secuencias de BMP10 maduras.

El polipéptido de la invención es una variante de BMP9 que carece de actividad osteogénica.

15 También se desvela un polipéptido que es una variante de la forma ligada al prodominio de BMP9 (pro.BMP9).

La variante de la pro.BMP9 puede comprender una variante de: la secuencia de propéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de los restos 23-319 de la SEQ ID NO: 4 unidos de forma no covalente a una secuencia de BMP9 madura que tiene la secuencia de aminoácidos de los restos 320-429 de la SEQ ID NO: 4.

20 La variante de la pro.BMP9 puede comprender un tetrámero que contiene dos de dichas secuencias de propéptidos y dos de dichas secuencias de BMP9 maduras.

25 La variante de BMP9 desvelada que carece de actividad osteogénica puede comprender un mutante de sustitución, deleción o inserción de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

Un mutante de sustitución de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desvelado en el presente documento puede comprender una o más (es decir, mutantes individuales, dobles, triples, etc.) de las siguientes sustituciones: H326A, D342A, S343A, W344A, I346A, K349A, F362A, D366A, K372A, I375A, L379A, H381A, L382A, K383A, K390A, S402A, L404A, K406A, D408A, V411A, T413A, L414A, Y416A y Y418A.

30 La variante de BMP9 que carece de actividad osteogénica desvelada en el presente documento se puede seleccionar de una de las siguientes variantes de BMP9 de la SEQ ID NO: 4: H326A, D342A, S343A, W344A, I346A, K349A, F362A, D366A, K372A, I375A, L379A, H381A, L382A, K383A, K390A, S402A, L404A, K406A, D408A, V411A, T413A, L414A, Y416A y Y418A.

El mutante de sustitución de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desvelado en el presente documento puede comprender una o más (es decir, mutantes individuales, dobles, triples, etc.) de las siguientes sustituciones: H326A, S343A, K349A, F362A, D366A, I375A, L379A, L382A, K390A, S402A, D408A, Y416A y Y418A.

40 La variante de BMP9 que carece de actividad osteogénica desvelada en el presente documento se puede seleccionar de una de las siguientes variantes de BMP9 de la SEQ ID NO: 4: H326A, S343A, K349A, F362A, D366A, I375A, L379A, L382A, K390A, S402A, D408A, Y416A y Y418A. En el presente documento se proporcionan datos que evidencian que estas secuencias mutantes mantienen el efecto beneficioso de la señalización endotelial específica y que han reducido en gran medida la señalización osteogénica (como evidencia la inducción de al menos 0,75 veces de ID1 y de menos de 0,5 veces de la actividad de la FA cuando se compara con la BMP9 de tipo salvaje en la figura 5).

50 El mutante de sustitución de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 desvelado en el presente documento puede comprender una o más (es decir, mutantes individuales, dobles, triples, etc.) de las siguientes sustituciones: F362A, D366A, I375A, L379A, S402A, D408A, Y416A y Y418A.

55 La variante de BMP9 de la invención que carece de actividad osteogénica se selecciona de una de las siguientes variantes de BMP9 de la SEQ ID NO: 4: F362A, I375A, L379A, S402A, Y416A y Y418A. En el presente documento se proporcionan datos que evidencian que estas secuencias mutantes mantienen el efecto beneficioso de la señalización endotelial específica pero carecen de señalización osteogénica (como evidencia la inducción de ID1 de al menos 0,75 veces y la actividad de FA insignificante (es decir, menor de 0,1 veces) cuando se compara con la BMP9 de tipo salvaje en la figura 5).

60 La variante de BMP9 que carece de actividad osteogénica desvelada en el presente documento se puede seleccionar de una de las siguientes variantes de BMP9 de la SEQ ID NO: 4: D366A o D408A. En el presente documento se proporcionan datos que evidencian que estas secuencias mutantes mantienen el efecto beneficioso de la BMP9 pero no son capaces de iniciar la señalización osteogénica y, por lo tanto, eliminan el riesgo potencial de formación ósea causado por la administración de BMP9 *in vivo* (véanse los resultados que se muestran en la figura 2). En el presente documento también se proporcionan datos que evidencian que estas secuencias tienen una señalización endotelial específica aumentada pero carecen de señalización osteogénica (como lo evidencia una

inducción de ID1 superior a 1 vez y una actividad FA insignificante (es decir, inferior a 0,1 veces) cuando se compara con la BMP9 de tipo salvaje en la figura 5).

La variante de BMP9 que carece de actividad osteogénica desvelada en el presente documento se puede seleccionar de una variante de BMP9 D366A que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 o de una variante de BMP9 D408A que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

Se apreciará que las variantes de BMP9 divulgadas en el presente documento constituyan polipéptidos anteriormente desconocidos que, por lo tanto, forman nuevos aspectos de la invención.

Si bien es posible que el polipéptido activo se administre solo, es preferible presentarlo como una composición farmacéutica (por ejemplo, una formulación). En una realización, dicha composición es una composición farmacéutica estéril.

La invención proporciona además composiciones farmacéuticas, como se define anteriormente, y desvela métodos de fabricación de una composición farmacéutica que comprende (p. ej., en mezcla) al menos un polipéptido de la invención junto con uno o más excipientes aceptables farmacéuticamente y opcionalmente otros agentes terapéuticos o profilácticos.

También se desvela una composición farmacéutica que comprende una variante de BMP9 que carece de actividad osteogénica, para su uso en el tratamiento de una enfermedad vascular o una enfermedad respiratoria.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende las variantes de BMP9 como se definen en el presente documento.

El o los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden seleccionarse de, por ejemplo, transportadores (p.ej., un transportador sólido, líquido o semisólido), adyuvantes, diluyentes, cargas o agentes que proporcionan volumen, agentes de granulación, agentes de recubrimiento, agentes de control de la liberación, agentes aglutinantes, disgregantes, agentes lubricantes, conservantes, antioxidantes, agentes tamponantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, agentes saborizantes, edulcorantes, agentes de enmascaramiento del sabor, estabilizadores o cualquier otro excipiente usado de manera convencional en composiciones farmacéuticas. A continuación se exponen ejemplos de excipientes para varios tipos de composiciones farmacéuticas con mayor detalle.

La expresión "farmacéuticamente aceptable", cuando se usa en el presente documento, se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, humano) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. Cada transportador, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación.

Las composiciones farmacéuticas que contienen los polipéptidos de la invención pueden formularse conforme a técnicas conocidas, véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Company, Easton, PA, USA.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma adecuada para la administración oral, parenteral, tópica, intranasal, intrabronquial, sublingual, oftálmica, ótica, rectal, intravaginal o transdérmica. Cuando las composiciones están destinadas a la administración parenteral, pueden formularse para administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea o para la administración directa en un órgano o tejido diana mediante inyección, perfusión u otros medios de administración. La administración puede ser por inyección en embolada, perfusión a corto plazo o perfusión a largo plazo y puede ser mediante administración pasiva o a través del uso de una bomba de perfusión o de un controlador de jeringa adecuados.

Las formulaciones farmacéuticas adaptadas para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, codisolventes, agentes tensioactivos, mezclas de disolventes orgánicos, agentes complejantes de ciclodextrina, agentes emulsionantes (para formar y estabilizar formulaciones en emulsión), componentes liposomales para formar liposomas, polímeros gelificables para formar geles poliméricos, protectores de liofilización y combinaciones de agentes para, entre otras cosas, estabilizar el principio activo en una forma soluble y hacer que la formulación sea isotónica con la sangre del destinatario. Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral también pueden adoptar la forma de suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y espesantes (R. G. Strickly, Solubilizing Excipients in oral and injectable formulations, Pharmaceutical Research, Vol 21(2)2004, p 201-230).

Se desvela la terapia génica que comprende la variante de BMP9. Por ejemplo, se puede administrar al sujeto humano hospedador un vector que codifica la secuencia de nucleótidos de la variante de BMP9, lo que da lugar a la expresión endógena (tal como la expresión endógena en el hígado) del polipéptido de la variante de BMP9 para su

liberación en la circulación. Se desvela un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de BMP9 para su uso en el tratamiento de una enfermedad vascular o una enfermedad respiratoria.

El vector desvelado en el presente documento puede ser un vector viral. El vector viral se puede seleccionar de: retrovirus, adenovirus, lentivirus, herpes simple, vaccinia y virus adenoasociados.

El vector desvelado en el presente documento puede ser un vector no viral. El uso de vectores no virales tiene una serie de ventajas sobre el uso de vectores virales, tales como la facilidad de producción a gran escala y la baja inmunogenicidad en el hospedador. Algunos ejemplos de métodos de terapia génica no viral incluyen: inyección de ADN desnudo, electroporación, pistola de genes, sonoporación, magnetofección y el uso de oligonucleótidos, lipoplejos, dendrímeros y nanopartículas inorgánicas.

Las formulaciones pueden presentarse en envases de dosis unitarias o multidosis, por ejemplo, ampollas selladas, viales y jeringas precargadas, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que solo requiere la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes de su uso.

La formulación farmacéutica puede prepararse mediante liofilización de un polipéptido de la invención. Liofilización se refiere al procedimiento de secado por congelación de una composición. En el presente documento, por lo tanto, el secado por congelación y la liofilización se usan como sinónimos.

Pueden prepararse soluciones y suspensiones de inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención para inyección parenteral también pueden comprender soluciones estériles acuosas o no acuosas farmacéuticamente aceptables, dispersiones, suspensiones o emulsiones, así como polvos estériles para su reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso.

Los ejemplos de transportadores, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (como el glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de maíz o aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables tal como el oleato de etilo. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de materiales espesantes o de recubrimiento tales como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Las composiciones de la presente invención también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede asegurarse mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También es aconsejable incluir agentes para ajustar la tonicidad tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede producirse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

En una realización particular de la invención, la composición farmacéutica está en una forma adecuada para la administración intravenosa, por ejemplo mediante inyección o perfusión. Para la administración intravenosa, la solución puede dosificarse como tal o puede inyectarse en una bolsa para perfusión (que contiene un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina al 0,9 % o dextrosa al 5 %), antes de la administración.

En otra realización particular, la composición farmacéutica está en una forma adecuada para administración subcutánea (s.c.).

Las formas de dosificación farmacéuticas adecuadas para administración oral incluyen comprimidos (recubiertos o no recubiertos), cápsulas (de cubierta dura o blanda), comprimidos ovalados, píldoras, pastillas para chupar, jarabes, soluciones, polvos, gránulos, elixires y suspensiones, comprimidos sublinguales, obleas o parches tales como parches bucales.

Por consiguiente, las composiciones de comprimidos pueden contener una dosis unitaria del polipéptido activo junto con un diluyente o excipiente inerte tal como azúcar o alcohol de azúcar, p.ej; lactosa, sacarosa, sorbitol o manitol; y/o un diluyente no derivado del azúcar tal como el carbonato de sodio, fosfato de calcio, carbonato de calcio o una celulosa o un derivado de la misma tal como la celulosa microcristalina (MCC), metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y almidones tales como el almidón de maíz. Los comprimidos también pueden contener ingredientes convencionales como agentes aglutinantes y de granulación tales como la polivinilpirrolidona, disgregantes (p.ej., polímeros reticulados hinchables tales como la carboximetilcelulosa reticulada), agentes lubricantes (p.ej., estearatos), conservantes (p.ej., parabenos), antioxidantes (p.ej., BHT), agentes tamponantes (por ejemplo, tampones de fosfato o citrato) y agentes efervescentes tales como mezclas de citrato/bicarbonato. Tales excipientes se conocen bien y no es necesario analizarlos en detalle en el presente documento.

Los comprimidos pueden diseñarse para liberar el medicamento ya sea al entrar en contacto con los fluidos estomacales (comprimidos de liberación inmediata) o para liberarlo de manera controlada (comprimidos de liberación controlada) durante un período de tiempo prolongado o al entrar en contacto con una región específica del tracto gastrointestinal. Las formulaciones de cápsulas pueden ser de la variedad de gelatina dura o de gelatina blanda y pueden contener el componente activo en forma sólida, semisólida o líquida. Las cápsulas de gelatina pueden formarse a partir de gelatina animal o de equivalentes sintéticos o derivados de plantas de la misma.

Las formas de dosificación sólidas (p. ej. comprimidos, cápsulas, etc.) pueden ser recubiertas o no recubiertas. Los recubrimientos pueden actuar como una película protectora (por ejemplo, un polímero, cera o barniz) o como un mecanismo para controlar la liberación del medicamento o con fines estéticos o de identificación. El recubrimiento (p.ej. un polímero de tipo Eudragit™) puede diseñarse para liberar el componente activo en un lugar deseado dentro del tracto gastrointestinal. Por consiguiente, el recubrimiento puede seleccionarse de manera que se degrade bajo ciertas condiciones de pH dentro del tracto gastrointestinal, con lo que el polipéptido se libera selectivamente en el estómago o en el íleon, duodeno, yeyuno o colon.

En lugar de, o además de, un recubrimiento, el medicamento puede presentarse en una matriz sólida que comprende un agente de control de liberación, por ejemplo, un agente que retrasa la liberación que puede estar adaptado para liberar el polipéptido de forma controlada en el tracto gastrointestinal. Como alternativa, el medicamento puede presentarse en un recubrimiento polimérico, p. ej. un recubrimiento polimérico de polimetacrilato, que puede estar adaptado para liberar selectivamente el polipéptido bajo condiciones de acidez o alcalinidad variables en el tracto gastrointestinal. Como alternativa, el material de la matriz o el recubrimiento que retrasa la liberación puede tomar la forma de un polímero erosionable (p. ej. un polímero de anhídrido maleico) que se erosiona de una forma sustancialmente continua a medida que la forma de dosificación pasa a través del tracto gastrointestinal. En otra alternativa, el recubrimiento puede diseñarse para que se desintegre bajo la acción microbiana en el intestino. Como alternativa adicional, el polipéptido activo puede formularse en un sistema de administración que proporciona un control osmótico de la liberación del polipéptido. Pueden prepararse formulaciones de liberación osmótica y otras formulaciones de liberación retardada o de liberación sostenida (por ejemplo, formulaciones basadas en resinas de intercambio iónico) de acuerdo con métodos bien conocidos por los expertos en la materia.

Los polipéptidos de la invención pueden formularse con un excipiente y administrarse en forma de nanopartículas, la mayor área de superficie de las nanopartículas ayuda a su absorción. Además, las nanopartículas ofrecen la posibilidad de una penetración directa en la célula. Se describen sistemas de administración de medicamentos por medio de nanopartículas en "Nanoparticle Technology for Drug Delivery", editado por Ram B Gupta y Uday B. Kompella, Informa Healthcare, ISBN 9781574448573, publicado el 13 de marzo de 2006. También se describen nanopartículas para la administración de medicamentos en J. Control. Release, 2003, 91 (1-2), 167-172, y en Sinha et al., Mol. Cancer Ther. August 1, (2006) 5, 1909.

Las composiciones farmacéuticas comprenden típicamente desde aproximadamente un 1 % (p/p) hasta aproximadamente un 95 % (p/p) de principio activo y desde un 99 % (p/p) hasta un 5 % (p/p) de un excipiente o una combinación de excipientes farmacéuticamente aceptables. Particularmente, las composiciones comprenden desde aproximadamente un 20 % (p/p) hasta aproximadamente un 90 %, % (p/p) de principio activo y desde un 80 % (p/p) hasta un 10 % de un excipiente o combinación de excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas comprenden desde aproximadamente un 1 % hasta aproximadamente un 95 %, particularmente desde aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 90 %, de principio activo. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden estar, por ejemplo, en forma de dosis unitaria, tal como en forma de ampollas, viales, supositorios, jeringas precargadas, grageas, comprimidos o cápsulas.

El excipiente o excipientes farmacéuticamente aceptables pueden seleccionarse de acuerdo con la forma física deseada de la formulación y pueden, por ejemplo, seleccionarse de entre diluyentes (por ejemplo, diluyentes sólidos tales como cargas o agentes que proporcionan volumen; y diluyentes líquidos tales como disolventes y codisolventes), disgregantes, agentes tamponantes, lubricantes, fluidificantes, agentes de control de la liberación (p.ej. polímeros o ceras que retrasan o retardan la liberación), aglutinantes, agentes de granulación, pigmentos, plastificantes, antioxidantes, conservantes, agentes saborizantes, agentes de enmascaramiento del sabor, agentes de ajuste de tonicidad y agentes de recubrimiento.

El experto tendrá la experiencia para seleccionar las cantidades apropiadas de ingredientes para su uso en las formulaciones. Por ejemplo, los comprimidos y cápsulas contienen típicamente un 0-20 % de disgregantes, un 0-5 % de lubricantes, un 0-5 % de fluidificantes y/o un 0-99 % (p/p) de cargas o agentes que proporcionan volumen (dependiendo de la dosis del medicamento). También pueden contener un 0-10 % (p/p) de polímeros aglutinantes, un 0-5 % (p/p) de antioxidantes y un 0-5 % (p/p) de pigmentos. Los comprimidos de liberación lenta podrían contener además un 0-99% (p/p) de polímeros que controlan la liberación (p. ej. retrasándola) (dependiendo de la dosis). Las películas de recubrimiento del comprimido o cápsula contienen típicamente un 0-10 % (p/p) de polímeros, un 0-3 % (p/p) de pigmentos y/o un 0-2 % (p/p) de plastificantes.

Las formulaciones parenterales suelen contener un 0-20 % (p/p) de tampones, un 0-50 % (p/p) de codisolventes y/o un 0-99 % (p/p) de agua para inyección (WFI) (dependiendo de la dosis y de si se va a liofilizar). Las formulaciones para depósitos intramusculares también pueden contener un 0-99 % (p/p) de aceites.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden obtenerse combinando el principio activo con transportadores sólidos, si se desea granulando la mezcla resultante y procesando la mezcla, si se desea o es necesario, después de la adición de los excipientes apropiados, para obtener comprimidos, núcleos de grageas o cápsulas. También es posible que se incorporen en una matriz polimérica o cerosa que permita que los principios activos se difundan o se liberen en cantidades medidas.

Los polipéptidos de la invención también pueden formularse como dispersiones sólidas. Las dispersiones sólidas son fases dispersas de dos o más sólidos extremadamente finas y homogéneas. Las soluciones sólidas (sistemas de dispersión molecular), un tipo de dispersión sólida, son bien conocidas para uso en la tecnología farmacéutica (véase Chiou y Riegelman, J. Pharm. Sci., 60, 1281-1300 (1971)) y son útiles para aumentar las velocidades de disolución y la biodisponibilidad de medicamentos poco solubles en agua.

La invención también proporciona formas de dosificación sólidas que comprenden la solución sólida descrita anteriormente. Las formas de dosificación sólidas incluyen comprimidos, cápsulas, comprimidos masticables y comprimidos dispersables o efervescentes. Los excipientes conocidos pueden mezclarse con la solución sólida para proporcionar la forma de dosificación deseada. Por ejemplo, una cápsula puede contener la solución sólida mezclada con (a) un disgregante y un lubricante, o (b) un disgregante, un lubricante y un tensioactivo. Además, una cápsula puede contener un agente que proporciona volumen, tal como la lactosa o la celulosa microcristalina. Un comprimido puede contener la solución sólida mezclada con al menos un disgregante, un lubricante, un tensioactivo, un agente que proporciona volumen y un agente deslizante. Un comprimido masticable puede contener la solución sólida mezclada con un agente que proporciona volumen, un lubricante y, si se desea, un agente edulcorante adicional (como un edulcorante artificial), y saporíferos adecuados. Las soluciones sólidas también pueden formarse mediante la pulverización de soluciones de un medicamento y un polímero adecuado sobre la superficie de portadores inertes tales como microesferas de azúcar ("non-pareils"). Estas microesferas pueden introducirse posteriormente en cápsulas o comprimirse en comprimidos.

Las formulaciones farmacéuticas pueden presentarse a un paciente en "paquetes para pacientes" que contienen un ciclo completo de tratamiento en un solo paquete, normalmente un blíster. Los paquetes para pacientes tienen una ventaja sobre las recetas tradicionales, donde un farmacéutico divide el suministro de una forma farmacéutica de un paciente desde un suministro a granel, ya que el paciente siempre tiene acceso al prospecto contenido en el paquete del paciente, que normalmente no está en las recetas para los pacientes. Se ha demostrado que la inclusión de un prospecto mejora el cumplimiento de las instrucciones del médico por parte del paciente.

Las composiciones para uso tópico y administración nasal incluyen pomadas, cremas, aerosoles, parches, geles, gotas de líquido e insertos (por ejemplo, insertos intraoculares). Tales composiciones pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos.

Son ejemplos de formulaciones para la administración rectal o intravaginal supositorios vaginales y supositorios que pueden formarse, por ejemplo, a partir de un material moldeable o ceroso que contiene el polipéptido activo. También pueden usarse soluciones del polipéptido activo para la administración rectal.

Las composiciones para la administración por inhalación pueden tomar la forma de composiciones de polvo inhalables o pulverizaciones de líquido o polvo, y pueden administrarse de forma estándar usando dispositivos de inhalación de polvo o dispositivos de dispensación de aerosoles. Tales dispositivos son bien conocidos. Para la administración por inhalación, las formulaciones en polvo típicamente comprenden el polipéptido activo junto con un diluyente en polvo sólido inerte tal como lactosa.

El polipéptido de la invención se presentará generalmente en forma de dosis unitaria y, como tal, contendrá típicamente suficiente polipéptido para proporcionar un nivel deseado de actividad biológica. Por ejemplo, una formulación puede contener de 1 nanogramo a 2 gramos de principio activo, p.ej. de 1 nanogramo a 2 miligramos de principio activo. Dentro de estos intervalos, son sub-intervalos particulares del polipéptido de 0,1 miligramos a 2 gramos de principio activo (más generalmente de 10 miligramos a 1 gramo, p.ej. de 50 miligramos a 500 miligramos), o de 1 microgramo a 20 miligramos (por ejemplo de 1 microgramo a 10 miligramos, p.ej. de 0,1 miligramos a 2 miligramos de principio activo).

Para composiciones orales, una forma de dosis unitaria puede contener de 1 miligramo a 2 gramos, más típicamente de 10 miligramos a 1 gramo, por ejemplo de 50 miligramos a 1 gramo, p.ej. de 100 miligramos a 1 gramo, de polipéptido activo.

El polipéptido activo se administrará a un paciente que lo necesite (por ejemplo un paciente humano o animal) en una cantidad suficiente para lograr el efecto terapéutico deseado.

Esta divulgación también proporciona un método de tratamiento de una enfermedad vascular o respiratoria que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido que es una variante de la proteína morfogenética ósea 9 (BMP9) que carece de actividad osteogénica.

5 Los siguientes estudios ilustran la invención y la divulgación:

Abreviaturas

ActR-IIA(B):	receptor de activina tipo IIA(B);
ALK1, 2, 3, 6:	receptor de activina tipo quinasa 1, 2, 3, 6;
FA:	fosfatasa alcalina;
BMP:	proteína morfogenética ósea;
BMPR-II:	receptor de proteína morfogenética ósea de tipo II
DEC:	dominio extracelular;
SFB:	suero bovino fetal;
HMEC-1:	células endoteliales microvasculares humanas;
hPAEC:	células endoteliales de la arteria pulmonar humana;
CMM:	células madre mesenquimales;
HAP:	hipertensión arterial pulmonar;
pro.BMP9:	BMP9 ligada a prodominio;
pro.BMP10:	BMP10 ligada a prodominio; y
qPCR:	PCR cuantitativa.

10 Materiales y Métodos

Generación de pro.BMP9 y pro.BMP10 recombinantes humanas

15 Se clonó ADNc completo que contenía un marco de lectura abierto de pre-pro-BMP9 en el vector de expresión pCEP4 entre los sitios HindIII y XhoI (véase la figura 1). De forma similar, se clonó el ADNc completo de la pre-pro-BMP10 humana en el vector de expresión pCEP4 entre los sitios XhoI y BamHI (véase la figura 1). Los insertos se verificaron mediante secuenciación de ADN. Se generaron variantes de pro.BMP9 usando el kit de mutagénesis dirigida QuickChange (Stratagene) y todas las mutaciones se verificaron mediante secuenciación de ADN.

20 Se introdujeron plásmidos que contenían pre-pro-BMP9 (o pre-pro-BMP10) mediante transfección de células HEK-EBNA usando polietilenimina en un medio DMEM que contenía un 5% de suero bovino fetal (SBF). Se introdujeron plásmidos que expresaban furina humana mediante transfección conjunta para facilitar el procesamiento de pro-BMP9 y pro-BMP10. Las células se cambiaron al medio CDCHO sin suero al día siguiente y el medio acondicionado se recolectó después de 3-4 días. Las identidades de pro.BMP9 y pro.BMP10 en el medio acondicionado se confirmaron mediante transferencia de western usando anticuerpos anti-BMP9 (MAB3209, R&D Systems), anti-prodominio BMP9 (AF3879, R&D Systems) o anti-BMP10 (MAB2926, R&D Systems), respectivamente.

30 Para purificar pro.BMP10, se cargaron 1-5 litros de medio acondicionado en una columna de Q-Sepharose pre-equilibrada en Tris.HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 50 mM. Las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente de NaCl (50-2000 mM). Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras y las que contenían pro.BMP10 se agruparon y se concentraron antes de cargarlas en una columna de filtración de gel S200. La pro.BMP10 de la columna S200 tenía una pureza superior al 90 % y las identidades del prodominio de BMP10 y de la BMP10 madura se confirmaron además mediante digestión en gel e identificaciones por espectrometría de masas.

35 Ensayos de señalización por PCR cuantitativa (qPCR) y fosforilación Smad1/5/8 en células endoteliales

Para los ensayos de señalización, la concentración de pro.BMP9 se determinó mediante ELISA usando como patrón la BMP9 de R&D; y la concentración de pro.BMP10 se cuantificó por transferencia de western e ImageJ usando la BMP10 de R&D como patrón.

40 Después de la privación de suero, las células HMEC-1 se trataron con ligandos de BMP a concentraciones indicadas. Ocho horas después del tratamiento, ID2 o BMPR-II mediante PCR cuantitativa. Se usó la microglobulina $\beta 2$ como control y se representaron gráficamente los cambios en veces en relación con las muestras no tratadas. Se muestra la media \pm ESM, N=2. Para el ensayo de fosforilación Smad1/5/8, se trataron células HMEC-1 privadas de suero con ligandos de BMP a las concentraciones indicadas durante 1 hora y la señalización se detuvo colocando las placas en hielo seco. Se añadió tampón de lisis (Tris.HCl 125 mM, pH 6,8, SDS 2 % y glicerol 10 %) y se determinó la concentración de proteína en el lisado celular total usando el ensayo de proteínas DC™ (Bio-Rad). Se usaron 25-35 μ g del total de la proteína celular para la inmunotransferencia y se monitorizó la fosforilación de Smad1/5/8 mediante el anticuerpo anti-pSmad1/5/8 (Cell Signaling, N.º de cat. 9516). Como control de carga se usó α -tubulina.

Actividad de la fosfatasa alcalina (FA) en la línea celular de mioblastos de ratón C2C12

Se sembraron células C2C12 a 20000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos en DMEM con un 10 % de SFB. Después de 48 horas, Las células se inactivaron con DMEM que contenía un 0,25 % de SFB durante 16 horas y se trataron con ligandos de BMP a las concentraciones indicadas durante 64 horas. Las células se lisaron en Triton X-100/PBS 1 % y se determinó la concentración total de proteína en el lisado celular usando ensayo de proteínas DC™ (Bio-Rad). La actividad de la FA en el lisado celular se midió usando el sustrato cromogénico de fosfatasa sal disódica de 4-nitrofenil fosfato (Sigma, S0942) y el producto soluble se midió a 405 nm en un lector de placas. En todos los ensayos, Las BMP9 y BMP10 de control se compraron en R&D Systems.

Resultados**Señalización de BMP9 y datos que apoyan su potencial terapéutico en HAP**

BMP9 y BMP10 se identificaron como los ligandos del receptor huérfano ALK1 (David et al (2007) Blood 109(5):1953-1961). En las células endoteliales, inducen un conjunto similar de genes, incluyendo ID1, ID2 y BMPRII. La BMP9 se sintetiza en el hígado (Miller et al (2000) J. Biol. Chem. 275(24):17937-17945; Bidart et al (2012) Cell. Mol. Life Sci. 69(2):313-324), circula a 2-10 ng/ml y es la única BMP confirmada que circula a concentraciones activas (Herrera e Inman (2009) BMC Cell Biol. 10:20; David et al (2008) Circ. Res. 102(8):914-922). La BMP9 es un factor de inactividad vascular, que inhibe la migración de EC, la proliferación y la angiogénesis *in vitro*, promoviendo de este modo la estabilidad vascular (David et al (2008), *supra*).

Obtención por ingeniería genética de variantes de la BMP9 que conservan las propiedades protectoras del endotelio pero que están desprovistas de actividad formadora de hueso

A pesar del potencial para tratar enfermedades cardiovasculares a través de la activación selectiva de receptores endoteliales, BMP9 también puede señalizar en las células madre mesenquimales (CMM) y en los mioblastos C2C12. Entre las 14 BMP probadas, se descubrió que BMP9 tiene la mayor actividad de señalización osteogénica *in vitro* y de formación ósea *in vivo* (Kang et al (2004) Gene Ther. 11(17):1312-1320; Luther et al (2011) Curr. Gene Ther. 11(3):229-240). Tanto el ALK1 como el ALK2 son necesarios para la actividad osteogénica de la BMP9 (Luo et al (2010) J. Biol. Chem. 285(38):29588-29598), pero se desconoce la naturaleza de la interacción de las BMP9 con ALK1 y ALK2 en el contexto de la actividad osteogénica. Aunque ALK2 también se expresa por las células endoteliales vasculares (Upton et al (2008) Mol. Pharmacol. 73(2):539-552), ALK1 es el principal receptor de tipo I que media las respuestas BMP9 en estas células (Upton et al (2009) J. Biol. Chem. 284(23):15794-15804; Scharpfenecker et al (2007) J. Cell Sci. 120(Pt 6):964-972). El requisito del receptor de tipo II para la actividad osteogénica de la BMP9 se ha investigado en CMM. Se ha demostrado que la expresión de mutantes dominantes negativos de los tres receptores BMP de tipo II, BMPRII, ActR-IIA y ActR-IIB, puede inhibir la actividad osteogénica inducida por la BMP9, siendo el mutante negativo ActR-IIB el más potente (Wu et al (2010) Acta biochimica et biophysica Sinica 42(10):699-708).

Los inventores han planteado la hipótesis de que al mutar los sitios de unión de los receptores de tipo I y tipo II en la BMP9, se pueden generar variantes de BMP9 que conserven la unión a ALK1 pero pierdan la unión a ALK2. Es probable que estas variantes de BMP9 retengan la función protectora del endotelio, pero carezcan de actividad osteogénica. Los inventores ya han identificado dos de estas variantes de las BMP9 que mantienen la actividad de señalización en las células endoteliales, como se evidencia por la inducción de la expresión de los genes ID1 e ID2, pero carecen de actividad de señalización osteogénica, evaluada por el ensayo de fosfatasa alcalina en las células C2C12 (figura 2). Es probable que estas variantes de la BMP9 (D366A y D408A) mantengan el efecto beneficioso *in vivo*, dado que tienen una actividad de señalización normal en las células endoteliales, pero no podrán iniciar la señalización osteogénica y, por tanto, eliminan el riesgo potencial de formación ósea mediante la administración de BMP9 *in vivo*.

Mutagénesis mediante alanina en BMP9

Veinticuatro variantes de alanina de BMP9 (H326A, D342A, S343A, W344A, I346A, K349A, F362A, D366A, K372A, I375A, L379A, H381A, L382A, K383A, K390A, S402A, L404A, K406A, D408A, V411A, T413A, L414A, Y416A y Y418A) se generaron y probaron tanto en las células HMEC-1 con respecto a la inducción del gen ID1 como en las células C2C12 con respecto a la actividad de la fosfatasa alcalina. Los resultados de este estudio se resumen en la figura 5, donde se puede ver que trece variantes de BMP9 (H326A, S343A, K349A, F362A, D366A, I375A, L379A, L382A, K390A, S402A, D408A, Y416A y Y418A) se identificaron como variantes que mantenían el efecto beneficioso de la señalización endotelial específica y que tenían una señalización osteogénica reducida en gran medida (como se evidencia por la inducción de ID1 de al menos 0,75 veces y la actividad de la FA menor de 0,5 veces en comparación con la BMP9 de tipo salvaje). Además, los resultados que se muestran en la figura 5 demuestran que ocho variantes de BMP9 (F362A, D366A, I375A, L379A, S402A, D408A, Y416A y Y418A) se identificaron como variantes que mantenían una señalización endotelial específica pero que carecían de señalización osteogénica (como se evidencia por la inducción de ID1 de al menos 0,75 veces y una actividad FA insignificante (es decir, menor de 0,1 veces) en comparación con el tipo salvaje de BMP9). Asimismo, los resultados que se muestran en la figura 5 demuestran que dos variantes de BMP9 (D366A o D408A) aumentaban la señalización endotelial específica

pero carecían de señalización osteogénica (como se evidencia por una inducción de ID1 mayor de 1 vez y una actividad FA insignificante (es decir, menor de 0,1 veces) cuando se comparan con la BMP9 de tipo salvaje).

Validación de las variantes de BMP9 en células endoteliales primarias

Las ocho variantes de BMP9 (F362A, D366A, I375A, L379A, S402A, D408A, Y416A y Y418A) que se identificaron anteriormente como variantes que mantenían la señalización específica del endotelio pero carecían de señalización osteogénica, se validaron de forma adicional en células endoteliales primarias. Se descubrió que todos estos mutantes inducían la expresión del gen BMPR2 en las células endoteliales de la arteria pulmonar humanas (hPAEC, figura 6). Al menos una variante, D408A, ha demostrado ser capaz de rescatar a las PAEC de la apoptosis temprana inducida por el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y la cicloheximida (CHX) (figura 7).

Señalización de BMP10 en el endotelio

BMP10 es indispensable para el desarrollo del corazón (Neuhaus et al (1999) Mech. Dev. 80(2):181-184). Los ratones con BMP10 inactivada mueren en la fase embrionaria debido a un severo deterioro del desarrollo cardíaco (Chen H et al (2004) Development 131(9):2219-2231). BMP10 regula el desarrollo de la pared ventricular cardíaca a través del factor de transcripción Tbx20 (Zhang et al (2011) J. Biol. Chem. 286(42): 36820-36829) y la sobreexpresión de BMP10 en el miocardio interrumpe el crecimiento hipertrófico cardíaco postnatal (Chen et al (2006) J. Biol. Chem. 281(37):27481-27491). En el adulto, BMP10 solo se expresa en la aurícula derecha (Chen et al (2004) supra). Se ha demostrado que la BMP10 circulante media el reposo arterial dependiente del flujo (Laux et al (2013) Development 140(16):3403-3412).

El nivel circulante de la BMP10 es un tema controvertido. Aunque se ha detectado proteína BMP10 en suero humano usando métodos proteómicos (Souza et al (2008) Mol. Endocrinol. 22(12):2689-2702) y puede medirse mediante ELISA (Ricard et al (2012) Blood 119(25):6162-6171), otros estudios que usan ensayos de actividad no pudieron detectar la BMP10 circulante (Bidart et al (2012) y Herrera e Inman (2009), supra). Sin embargo, un informe reciente ha demostrado la actividad de las BMP10 en la circulación (Chen et al (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 110(29): 11887-11892). Tal controversia podría deberse a que la BMP10 circulante se encuentra en estado activo/inactivo, a un procesamiento incompleto, a la inhibición por un factor sérico o a los diferentes ensayos de actividad usados en los informes publicados. El pro-dominio de BMP10 podría desempeñar un papel en esta cuestión. Por ejemplo, se ha notificado que el prodominio de BMP10, a diferencia de otras BMP, puede inhibir la expresión génica inducida por BMP10 en las células C2C12 (Sengle et al (2011) J. Biol. Chem. 286(7):5087-5099). Además, las mediciones de Biacore han demostrado que la BMP10 tiene mayor afinidad por ALK1/BMPR-II que la BMP9 (Townson et al (2012) J. Biol. Chem. 287(33):27313-27325) y la pérdida de la proteína BMPR-II durante el inicio de la HAP tendrá un claro impacto en la señalización de BMP10. Significativamente, en estudios *in vitro* e *in vivo*, BMP10 está desprovista de actividad osteogénica. Por consiguiente, la BMP10 nativa representa un agonista más conveniente que la BMP9 nativa para el tratamiento de la HAP.

Comparación de la actividad de BMP9 y BMP10

Un ensayo de señalización de respuesta a la concentración en células endoteliales microvasculares humanas (HMEC-1) demostró que la BMP10 es tan potente como la BMP9 para inducir la expresión de los genes ID1, ID2 y BMPR-II (figura 3A a 3C). Significativamente, BMP10 muestra la misma actividad antiapoptótica que BMP9 en la protección de las hPAEC contra la apoptosis inducida por TNF α -CHX (figura 3D). Se ha notificado que BMP9 mantiene la estabilidad de la vasculatura mediante la supresión de la proliferación de células endoteliales (David et al (2008) supra). Tanto la BMP9 como la BMP10 reprimen la síntesis de ADN en grados similares, medida como la absorción de ³H-timidina, en las hPAEC (figura 3E). La fosfatasa alcalina (FA) es una enzima clave en la vía osteogénica y puede detectarse actividad de la FA inducida por la BMP9 en células C2C12 con 5 ng/ml de BMP9. Sin embargo, en las mismas condiciones, BMP10 no indujo ninguna actividad de la FA en la concentración más alta probada (20 ng/ml, figura 3F), conforme con el estudio anterior que usa las BMP expresadas por adenovirus en células C2C12 (Kang et al (2004) supra).

Potencial de administración de BMP10 y de BMP10 ligada a prodominio para tratar la HAP y otras enfermedades cardiovasculares

Las BMP se sintetizan como pre-proteínas y el prodominio se escinde tras la secreción (figura 4A). Un informe anterior demostró que el prodominio de BMP10 puede inhibir la actividad de BMP10 y es probable que BMP10 circule en una forma inactiva. Los inventores han generado una gran cantidad de BMP10 ligada a prodominio (pro.BMP10). A diferencia del informe anterior, se descubrió que el prodominio permanece ligado a la BMP10 cuando se produce BMP10 a partir de células de mamíferos y que el complejo pro.BMP10 es muy estable (figura 4B y 4C). Esto indica que es probable que pro.BMP10 sea la forma circulante. Asimismo, los inventores han demostrado en las células HMEC-1 (figura 4D y 4E) y hPAEC que pro.BMP10 tiene actividades comparables a las de BMP9 y BMP10 adquiridas de una fuente comercial (R&D Systems). Dado que el prodominio protege la superficie hidrófoba de BMP10 y por lo tanto estabiliza la forma circulante de la BMP10, es probable que pro.BMP10 sea una forma preferente para la administración *in vivo* para tratar la HAP y otras enfermedades cardiovasculares.

BMP9 y BMP10 inhiben la formación de tubos de células endoteliales de sangre periférica (BOEC) en geles de colágeno

Las células endoteliales de sangre periférica pueden aislarse de la sangre periférica de la mayoría de los individuos y representan un tipo celular altamente proliferativo que es altamente representativo de las células endoteliales humanas. Se ha demostrado que, como las células endoteliales, las BOEC forman estructuras de tipo capilar vacuolizadas en una matriz tridimensional de colágeno:fibronectina. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 8 que no solo demuestra el papel anti-angiogénico de las BMP9 y BMP10, sino que también muestra que la BMP9 además de ser antiproliferativa para las células endoteliales, protege a las células endoteliales de la apoptosis y protege a las células endoteliales de una mayor permeabilidad. La inhibición por la BMP9 es evidente incluso a concentraciones bajas.

Se midieron ID1, ID2 o BMPR-II mediante PCR cuantitativa. Se usó la microglobulina $\beta 2$ como control y se representaron gráficamente los cambios en veces en relación con las muestras no tratadas. Se muestra la media \pm ESM, N=2. Para el ensayo de fosforilación Smad1/5/8, se trataron células HMEC-1 privadas de suero con ligandos de BMP a las concentraciones indicadas durante 1 hora y la señalización se detuvo colocando las placas en hielo seco. Se añadió tampón de lisis (Tris.HCl 125 mM, pH 6,8, SDS 2 % y glicerol 10 %) y se determinó la concentración de proteína en el lisado celular total usando el ensayo de proteínas DC™ (Bio-Rad). Se usaron 25-35 μ g del total de la proteína celular para la inmunotransferencia y se monitorizó la fosforilación de Smad1/5/8 mediante el anticuerpo anti-pSmad1/5/8 (Cell Signaling, N.º de cat. 9516). Como control de carga se usó α -tubulina.

Actividad de la fosfatasa alcalina (FA) en la línea celular de mioblastos de ratón C2C12

Se sembraron células C2C12 a 20000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos en DMEM con un 10 % de SFB. Después de 48 horas, Las células se inactivaron con DMEM que contenía un 0,25 % de SFB durante 16 horas y se trataron con ligandos de BMP a las concentraciones indicadas durante 64 horas. Las células se lisaron en Triton X-100/PBS 1 % y se determinó la concentración total de proteína en el lisado celular usando ensayo de proteínas DC™ (Bio-Rad). La actividad de la FA en el lisado celular se midió usando el sustrato cromogénico de fosfatasa sal disódica de 4-nitrofenil fosfato (Sigma, S0942) y el producto soluble se midió a 405 nm en un lector de placas. En todos los ensayos, Las BMP9 y BMP10 de control se compraron en R&D Systems.

Resultados

Señalización de BMP9 y datos que apoyan su potencial terapéutico en HAP

BMP9 y BMP10 se identificaron como los ligandos del receptor huérfano ALK1 (David et al (2007) Blood 109(5):1953-1961). En las células endoteliales, inducen un conjunto similar de genes, incluyendo ID1, ID2 y BMPRII. La BMP9 se sintetiza en el hígado (Miller et al (2000) J. Biol. Chem. 275(24):17937-17945; Bidart et al (2012) Cell. Mol. Life Sci. 69(2):313-324), circula a 2-10 ng/ml y es la única BMP confirmada que circula a concentraciones activas (Herrera e Inman (2009) BMC Cell Biol. 10:20; David et al (2008) Circ. Res. 102(8):914-922). La BMP9 es un factor de inactividad vascular, que inhibe la migración de EC, la proliferación y la angiogénesis *in vitro*, promoviendo de este modo la estabilidad vascular (David et al (2008), *supra*).

Obtención por ingeniería genética de variantes de la BMP9 que conservan las propiedades protectoras del endotelio pero que están desprovistas de actividad formadora de hueso

A pesar del potencial para tratar enfermedades cardiovasculares a través de la activación selectiva de receptores endoteliales, BMP9 también puede señalizar en las células madre mesenquimales (CMM) y en los mioblastos C2C12. Entre las 14 BMP probadas, se descubrió que BMP9 tiene la mayor actividad de señalización osteogénica *in vitro* y de formación ósea *in vivo* (Kang et al (2004) Gene Ther. 11(17):1312-1320; Luther et al (2011) Curr. Gene Ther. 11(3):229-240). Tanto el ALK1 como el ALK2 son necesarios para la actividad osteogénica de la BMP9 (Luo et al (2010) J. Biol. Chem. 285(38):29588-29598), pero se desconoce la naturaleza de la interacción de las BMP9 con ALK1 y ALK2 en el contexto de la actividad osteogénica. Aunque ALK2 también se expresa por las células endoteliales vasculares (Upton et al (2008) Mol. Pharmacol. 73(2):539-552), ALK1 es el principal receptor de tipo I que media las respuestas BMP9 en estas células (Upton et al (2009) J. Biol. Chem. 284(23):15794-15804; Scharpfenecker et al (2007) J. Cell Sci. 120(Pt 6):964-972). El requisito del receptor de tipo II para la actividad osteogénica de la BMP9 se ha investigado en CMM. Se ha demostrado que la expresión de mutantes dominantes negativos de los tres receptores BMP de tipo II, BMPR-II, ActR-IIA y ActR-IIB, puede inhibir la actividad osteogénica inducida por la BMP9, siendo el mutante negativo ActR-IIB el más potente (Wu et al (2010) Acta biochimica et biophysica Sinica 42(10):699-708).

Los inventores han planteado la hipótesis de que al mutar los sitios de unión de los receptores de tipo I y tipo II en la BMP9, se pueden generar variantes de BMP9 que conserven la unión a ALK1 pero pierdan la unión a ALK2. Es probable que estas variantes de BMP9 retengan la función protectora del endotelio, pero carezcan de actividad osteogénica. Los inventores ya han identificado dos de estas variantes de las BMP9 que mantienen la actividad de señalización en las células endoteliales, como se evidencia por la inducción de la expresión de los genes ID1 e ID2,

pero carecen de actividad de señalización osteogénica, evaluada por el ensayo de fosfatasa alcalina en las células C2C12 (figura 2). Es probable que estas variantes de la BMP9 (D366A y D408A) mantengan el efecto beneficioso *in vivo*, dado que tienen una actividad de señalización normal en las células endoteliales, pero no podrán iniciar la señalización osteogénica y, por tanto, eliminan el riesgo potencial de formación ósea mediante la administración de BMP9 *in vivo*.

Mutagénesis mediante alanina en BMP9

Veinticuatro variantes de alanina de BMP9 (H326A, D342A, S343A, W344A, I346A, K349A, F362A, D366A, K372A, I375A, L379A, H381A, L382A, K383A, K390A, S402A, L404A, K406A, D408A, V411A, T413A, L414A, Y416A y Y418A) se generaron y probaron tanto en las células HMEC-1 con respecto a la inducción del gen ID1 como en las células C2C12 con respecto a la actividad de la fosfatasa alcalina. Los resultados de este estudio se resumen en la figura 5, donde se puede ver que trece variantes de BMP9 (H326A, S343A, K349A, F362A, D366A, I375A, L379A, L382A, K390A, S402A, D408A, Y416A y Y418A) se identificaron como variantes que mantenían el efecto beneficioso de la señalización endotelial específica y que tenían una señalización osteogénica reducida en gran medida (como se evidencia por la inducción de ID1 de al menos 0,75 veces y la actividad de la FA menor de 0,5 veces en comparación con la BMP9 de tipo salvaje). Además, los resultados que se muestran en la figura 5 demuestran que ocho variantes de BMP9 (F362A, D366A, I375A, L379A, S402A, D408A, Y416A y Y418A) se identificaron como variantes que mantenían una señalización endotelial específica pero que carecían de señalización osteogénica (como se evidencia por la inducción de ID1 de al menos 0,75 veces y una actividad FA insignificante (es decir, menor de 0,1 veces) en comparación con el tipo salvaje de BMP9). Asimismo, los resultados que se muestran en la figura 5 demuestran que dos variantes de BMP9 (D366A o D408A) aumentaban la señalización endotelial específica pero carecían de señalización osteogénica (como se evidencia por una inducción de ID1 mayor de 1 vez y una actividad FA insignificante (es decir, menor de 0,1 veces) cuando se comparan con la BMP9 de tipo salvaje).

Validación de las variantes de BMP9 en células endoteliales primarias

Las ocho variantes de BMP9 (F362A, D366A, I375A, L379A, S402A, D408A, Y416A y Y418A) que se identificaron anteriormente como variantes que mantenían la señalización específica del endotelio pero carecían de señalización osteogénica, se validaron de forma adicional en células endoteliales primarias. Se descubrió que todos estos mutantes inducían la expresión del gen BMPR2 en las células endoteliales de la arteria pulmonar humanas (hPAEC, figura 6). Al menos una variante, D408A, ha demostrado ser capaz de rescatar a las PAEC de la apoptosis temprana inducida por el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y la cicloheximida (CHX) (figura 7).

Señalización de BMP10 en el endotelio

BMP10 es indispensable para el desarrollo del corazón (Neuhaus et al (1999) Mech. Dev. 80(2):181-184). Los ratones con BMP10 inactivada mueren en la fase embrionaria debido a un severo deterioro del desarrollo cardíaco (Chen H et al (2004) Development 131(9):2219-2231). BMP10 regula el desarrollo de la pared ventricular cardíaca a través del factor de transcripción Tbx20 (Zhang et al (2011) J. Biol. Chem. 286(42): 36820-36829) y la sobreexpresión de BMP10 en el miocardio interrumpe el crecimiento hipertrófico cardíaco postnatal (Chen et al (2006) J. Biol. Chem. 281(37):27481-27491). En el adulto, BMP10 solo se expresa en la aurícula derecha (Chen et al (2004) supra). Se ha demostrado que la BMP10 circulante media el reposo arterial dependiente del flujo (Laux et al (2013) Development 140(16):3403-3412).

El nivel circulante de la BMP10 es un tema controvertido. Aunque se ha detectado proteína BMP10 en suero humano usando métodos proteómicos (Souza et al (2008) Mol. Endocrinol. 22(12):2689-2702) y puede medirse mediante ELISA (Ricard et al (2012) Blood 119(25):6162-6171), otros estudios que usan ensayos de actividad no pudieron detectar la BMP10 circulante (Bidart et al (2012) y Herrera e Inman (2009), supra). Sin embargo, un informe reciente ha demostrado la actividad de las BMP10 en la circulación (Chen et al (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 110(29): 11887-11892). Tal controversia podría deberse a que la BMP10 circulante se encuentra en estado activo/inactivo, a un procesamiento incompleto, a la inhibición por un factor sérico o a los diferentes ensayos de actividad usados en los informes publicados. El pro-dominio de BMP10 podría desempeñar un papel en esta cuestión. Por ejemplo, se ha notificado que el prodominio de BMP10, a diferencia de otras BMP, puede inhibir la expresión génica inducida por BMP10 en las células C2C12 (Sengle et al (2011) J. Biol. Chem. 286(7):5087-5099). Además, las mediciones de Biacore han demostrado que la BMP10 tiene mayor afinidad por ALK1/BMPR-II que la BMP9 (Townson et al (2012) J. Biol. Chem. 287(33):27313-27325) y la pérdida de la proteína BMPR-II durante el inicio de la HAP tendrá un claro impacto en la señalización de BMP10. Significativamente, en estudios *in vitro* y *in vivo*, BMP10 está desprovista de actividad osteogénica. Por consiguiente, la BMP10 nativa representa un agonista más conveniente que la BMP9 nativa para el tratamiento de la HAP.

Comparación de la actividad de BMP9 y BMP10

Un ensayo de señalización de respuesta a la concentración en células endoteliales microvasculares humanas (HMEC-1) demostró que la BMP10 es tan potente como la BMP9 para inducir la expresión de los genes ID1, ID2 y BMPR-II (figura 3A a 3C). Significativamente, BMP10 muestra la misma actividad antiapoptótica que BMP9 en la

protección de las hPAEC contra la apoptosis inducida por TNF α -CHX (figura 3D). Se ha notificado que BMP9 mantiene la estabilidad de la vasculatura mediante la supresión de la proliferación de células endoteliales (David *et al* (2008) *supra*). Tanto la BMP9 como la BMP10 reprimen la síntesis de ADN en grados similares, medida como la absorción de ^3H -timidina, en las hPAEC (figura 3E). La fosfatasa alcalina (FA) es una enzima clave en la vía osteogénica y puede detectarse actividad de la FA inducida por la BMP9 en células C2C12 con 5 ng/ml de BMP9. Sin embargo, en las mismas condiciones, BMP10 no indujo ninguna actividad de la FA en la concentración más alta probada (20 ng/ml, figura 3F), conforme con el estudio anterior que usa las BMP expresadas por adenovirus en células C2C12 (Kang *et al* (2004) *supra*).

10 **Potencial de administración de BMP10 y de BMP10 ligada a prodominio para tratar la HAP y otras enfermedades cardiovasculares**

Las BMP se sintetizan como pre-proteínas y el prodominio se escinde tras la secreción (figura 4A). Un informe anterior demostró que el prodominio de BMP10 puede inhibir la actividad de BMP10 y es probable que BMP10 circule en una forma inactiva. Los inventores han generado una gran cantidad de BMP10 ligada a prodominio (pro.BMP10). A diferencia del informe anterior, se descubrió que el prodominio permanece ligado a la BMP10 cuando se produce BMP10 a partir de células de mamíferos y que el complejo pro.BMP10 es muy estable (figura 4B y 4C). Esto indica que es probable que pro.BMP10 sea la forma circulante. Asimismo, los inventores han demostrado en las células HMEC-1 (figura 4D y 4E) y hPAEC que pro.BMP10 tiene actividades comparables a las de BMP9 y BMP10 adquiridas de una fuente comercial (R&D Systems). Dado que el prodominio protege la superficie hidrófoba de BMP10 y por lo tanto estabiliza la forma circulante de la BMP10, es probable que pro.BMP10 sea una forma preferente para la administración *in vivo* para tratar la HAP y otras enfermedades cardiovasculares.

25 **BMP9 y BMP10 inhiben la formación de tubos de células endoteliales de sangre periférica (BOEC) en geles de colágeno**

Las células endoteliales de sangre periférica pueden aislarse de la sangre periférica de la mayoría de los individuos y representan un tipo celular altamente proliferativo que es altamente representativo de las células endoteliales humanas. Se ha demostrado que, como las células endoteliales, las BOEC forman estructuras de tipo capilar vacuolizadas en una matriz tridimensional de colágeno:fibronectina. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 8 que no solo demuestra el papel anti-angiogénico de las BMP9 y BMP10, sino que también muestra que la BMP9 además de ser antiproliferativa para las células endoteliales, protege a las células endoteliales de la apoptosis y protege a las células endoteliales de una mayor permeabilidad. La inhibición por la BMP9 es evidente incluso a concentraciones bajas.

35 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Cambridge Enterprise Limited

40 <120> USO TERAPÉUTICO DE PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS

<130> CEL-C-P1753PCT

<150> 1412290.7

45 <151> 10-07-2014

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

50

<210> 1

<211> 1275

<212> ADN

<213> Humano

55

<400> 1

atgggctctc tggctctgac actgtgcgct cttttctgcc tggcagctta cttggtttct	60
ggcagcccca tcatgaacct agagcagctc cctctggaag aagatatgtc cctcttttgt	120
gatgttttct cagagcaaga cgggtgtcgac tttaacacac tgctccagag catgaaggat	180
gagtttctta agacactaaa cctctctgac atccccacgc aggattcagc caagggtggac	240
ccaccagagt acatgttgga actctacaac aaatttgcaa cagatcggac ctccatgccc	300
tctgccaaca tcattaggag tttcaagaat gaagatctgt tttcccagcc ggtcagtttt	360
aatgggctcc gaaaataccc cctcctcttc aatgtgtcca ttcctcacca tgaagaggtc	420
atcatggctg aacttaggct atacacactg gtgcaaaggg atcgtatgat atacgatgga	480
gtagaccgga aaattacat ttttgaagtg ctggagagca aaggggataa tgagggagaa	540
agaaacatgc tggcttttgt gtctggggag atatattgaa ccaacagtga gtgggagact	600
tttgatgtca cagatgccat cagacgttgg caaaagtcag gctcatccac ccaccagctg	660
gaggtccaca ttgagagcaa acacgatgaa gctgaggatg ccagcagtggt acggctagaa	720
atagatacca gtgccagaa taagcataac cctttgtctc tcgtgttttc tgatgaccaa	780
agcagtgaca aggagaggaa ggaggaactg aatgaaatga tttcccatga gcaacttcca	840
gagctggaca acttgggcct ggatagcttt tccagtggac ctggggaaga ggctttgttg	900
cagatgagat caaacatcat ctatgactcc actgcccga tccagaaggaa cgccaaagga	960
aactactgta agaggacccc gctctacatc gacttcaagg agattgggtg ggactcctgg	1020
atcatcgctc cgcctggata cgaagcctat gaatgccgtg gtgtttgtaa ctaccccctg	1080
gcagagcatc tcacaccac aaagcatgca attatccagg ccttgggtcca cctcaagaat	1140
tcccagaaag cttccaaagc ctgctgtgtg cccacaaagc tagagcccat ctccatcctc	1200
tatttagaca aaggcgtcgt cacctacaag tttaaatacg aaggcatggc cgtctccgaa	1260
tgtggctgta gatag	1275

<210> 2
 <211> 424
 <212> PRT
 <213> Humano

<400> 2

Met	Gly	Ser	Leu	Val	Leu	Thr	Leu	Cys	Ala	Leu	Phe	Cys	Leu	Ala	Ala	1	5	10	15
Tyr	Leu	Val	Ser	Gly	Ser	Pro	Ile	Met	Asn	Leu	Glu	Gln	Ser	Pro	Leu	20	25	30	
Glu	Glu	Asp	Met	Ser	Leu	Phe	Gly	Asp	Val	Phe	Ser	Glu	Gln	Asp	Gly	35	40	45	
Val	Asp	Phe	Asn	Thr	Leu	Leu	Gln	Ser	Met	Lys	Asp	Glu	Phe	Leu	Lys	50	55	60	
Thr	Leu	Asn	Leu	Ser	Asp	Ile	Pro	Thr	Gln	Asp	Ser	Ala	Lys	Val	Asp	65	70	75	80
Pro	Pro	Glu	Tyr	Met	Leu	Glu	Leu	Tyr	Asn	Lys	Phe	Ala	Thr	Asp	Arg	85	90	95	
Thr	Ser	Met	Pro	Ser	Ala	Asn	Ile	Ile	Arg	Ser	Phe	Lys	Asn	Glu	Asp	100	105	110	
Leu	Phe	Ser	Gln	Pro	Val	Ser	Phe	Asn	Gly	Leu	Arg	Lys	Tyr	Pro	Leu	115	120	125	
Leu	Phe	Asn	Val	Ser	Ile	Pro	His	His	Glu	Glu	Val	Ile	Met	Ala	Glu	130	135	140	
Leu	Arg	Leu	Tyr	Thr	Leu	Val	Gln	Arg	Asp	Arg	Met	Ile	Tyr	Asp	Gly	145	150	155	160
Val	Asp	Arg	Lys	Ile	Thr	Ile	Phe	Glu	Val	Leu	Glu	Ser	Lys	Gly	Asp	165	170	175	
Asn	Glu	Gly	Glu	Arg	Asn	Met	Leu	Val	Leu	Val	Ser	Gly	Glu	Ile	Tyr	180	185	190	
Gly	Thr	Asn	Ser	Glu	Trp	Glu	Thr	Phe	Asp	Val	Thr	Asp	Ala	Ile	Arg	195	200	205	
Arg	Trp	Gln	Lys	Ser	Gly	Ser	Ser	Thr	His	Gln	Leu	Glu	Val	His	Ile				

210	215	220
Glu Ser Lys His Asp 225	Glu Ala Glu Asp Ala Ser 230 235	Ser Ser Gly Arg Leu Glu 240
Ile Asp Thr Ser Ala Gln Asn Lys His Asn Pro Leu Leu Ile Val Phe 245 250 255		
Ser Asp Asp Gln Ser Ser Asp Lys Glu Arg Lys Glu Glu Leu Asn Glu 260 265 270		
Met Ile Ser His Glu Gln Leu Pro Glu Leu Asp Asn Leu Gly Leu Asp 275 280 285		
Ser Phe Ser Ser Gly Pro Gly Glu Glu Ala Leu Leu Gln Met Arg Ser 290 295 300		
Asn Ile Ile Tyr Asp Ser Thr Ala Arg Ile Arg Arg Asn Ala Lys Gly 305 310 315 320		
Asn Tyr Cys Lys Arg Thr Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Glu Ile Gly 325 330 335		
Trp Asp Ser Trp Ile Ile Ala Pro Pro Gly Tyr Glu Ala Tyr Glu Cys 340 345 350		
Arg Gly Val Cys Asn Tyr Pro Leu Ala Glu His Leu Thr Pro Thr Lys 355 360 365		
His Ala Ile Ile Gln Ala Leu Val His Leu Lys Asn Ser Gln Lys Ala 370 375 380		
Ser Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Glu Pro Ile Ser Ile Leu 385 390 395 400		
Tyr Leu Asp Lys Gly Val Val Thr Tyr Lys Phe Lys Tyr Glu Gly Met 405 410 415		
Ala Val Ser Glu Cys Gly Cys Arg 420		

<210> 3
 <211> 1290
 <212> ADN
 <213> Humano

<400> 3

atgtgtcctg gggcactgtg ggtggccctg cccctgctgt ccctgctggc tggctcccta	60
caggggaagc cactgcagag ctggggacga gggctctgtg ggggaaacgc ccacagccca	120
ctgggggtgc ctggaggtgg gctgcctgag cacaccttca acctgaagat gtttctggag	180
aacgtgaagg tggatttctt gcgcagcctt aaacctgagt gggctccctc gcaggacaaa	240
accaggggtg agccgccgca gtacatgatt gacctgtaca acaggtacac gtccgataag	300
tgcactacgc cagcgtccaa cattgtgcgg agcttcagca tggaaagtgc catctccata	360
actgccacag aggacttccc ctccagaag cacatcttgc tcttcaacat ctccattcct	420
aggcatgagc agatcaccag agctgagctc cgactctatg tctcctgtca aaatcacgtg	480
gacccctctc atgacctgaa aggaagcgtg gtcatttatg atgttctgga tggaacagat	540
gcctgggata gtgctacaga gaccaagacc ttctggtgtt ccaggacat tcaggatgag	600
ggctgggaga ccttggaagt gtccagcgcc gtgaagcgtt gggctccggtc cgactccacc	660
aagagcaaaa ataagctgga agtgactgtg gagagccaca ggaagggtg cgacacgctg	720
gacatcagtg tccccccagg ttccagaaac ctgcccttct ttgttgtctt ctccaatgac	780
cacagcagtg ggaccaagga gaccaggctg gagctgaggg agatgatcag ccatgaacaa	840
gagagcgtgc tcaagaagct gtccaaggac ggctccacag aggcagggtga gagcagtcac	900
gaggaggaca cggatggcca cgtggctgcg gggctgactt tagccaggcg gaaaaggagc	960
gccgggggtg gcagccactg tcaaaagacc tccctgcggg taaacttcga ggacatcggc	1020
tgggacagct ggatcattgc acccaaggag tatgaagcct acgagtgtaa gggcggctgc	1080
ttcttcccct tggctgacga tgtgacgctg acgaaacacg ctatcgtgca gacctggtg	1140
catctcaagt tccccacaaa ggtgggcaag gcctgctgtg tgcccaccaa actgagcccc	1200
atctccgtcc tctacaagga tgacatgggg gtgcccaccc tcaagtacca ttacgagggc	1260
atgagcgtgg cagagtgtgg gtgcaggtag	1290

<210> 4
 <211> 429
 <212> PRT
 <213> Humano

 <400> 4

5

ES 2 876 124 T3

Met Cys Pro Gly Ala Leu Trp Val Ala Leu Pro Leu Leu Ser Leu Leu
1 5 10 15

Ala Gly Ser Leu Gln Gly Lys Pro Leu Gln Ser Trp Gly Arg Gly Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Asn Ala His Ser Pro Leu Gly Val Pro Gly Gly Gly Leu
35 40 45

Pro Glu His Thr Phe Asn Leu Lys Met Phe Leu Glu Asn Val Lys Val

ES 2 876 124 T3

50	55	60
Asp Phe Leu Arg Ser Leu Asn Leu Ser Gly Val Pro Ser Gln Asp Lys 65 70 75 80		
Thr Arg Val Glu Pro Pro Gln Tyr Met Ile Asp Leu Tyr Asn Arg Tyr 85 90 95		
Thr Ser Asp Lys Ser Thr Thr Pro Ala Ser Asn Ile Val Arg Ser Phe 100 105 110		
Ser Met Glu Asp Ala Ile Ser Ile Thr Ala Thr Glu Asp Phe Pro Phe 115 120 125		
Gln Lys His Ile Leu Leu Phe Asn Ile Ser Ile Pro Arg His Glu Gln 130 135 140		
Ile Thr Arg Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Val Ser Cys Gln Asn His Val 145 150 155 160		
Asp Pro Ser His Asp Leu Lys Gly Ser Val Val Ile Tyr Asp Val Leu 165 170 175		
Asp Gly Thr Asp Ala Trp Asp Ser Ala Thr Glu Thr Lys Thr Phe Leu 180 185 190		
Val Ser Gln Asp Ile Gln Asp Glu Gly Trp Glu Thr Leu Glu Val Ser 195 200 205		
Ser Ala Val Lys Arg Trp Val Arg Ser Asp Ser Thr Lys Ser Lys Asn 210 215 220		
Lys Leu Glu Val Thr Val Glu Ser His Arg Lys Gly Cys Asp Thr Leu 225 230 235 240		
Asp Ile Ser Val Pro Pro Gly Ser Arg Asn Leu Pro Phe Phe Val Val 245 250 255		
Phe Ser Asn Asp His Ser Ser Gly Thr Lys Glu Thr Arg Leu Glu Leu 260 265 270		
Arg Glu Met Ile Ser His Glu Gln Glu Ser Val Leu Lys Lys Leu Ser 275 280 285		
Lys Asp Gly Ser Thr Glu Ala Gly Glu Ser Ser His Glu Glu Asp Thr 290 295 300		

Asp Gly His Val Ala Ala Gly Ser Thr Leu Ala Arg Arg Lys Arg Ser
305 310 315 320

Ala Gly Ala Gly Ser His Cys Gln Lys Thr Ser Leu Arg Val Asn Phe
325 330 335

Glu Asp Ile Gly Trp Asp Ser Trp Ile Ile Ala Pro Lys Glu Tyr Glu
340 345 350

Ala Tyr Glu Cys Lys Gly Gly Cys Phe Phe Pro Leu Ala Asp Asp Val
355 360 365

Thr Pro Thr Lys His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Lys Phe
370 375 380

Pro Thr Lys Val Gly Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Ser Pro
385 390 395 400

Ile Ser Val Leu Tyr Lys Asp Asp Met Gly Val Pro Thr Leu Lys Tyr
405 410 415

His Tyr Glu Gly Met Ser Val Ala Glu Cys Gly Cys Arg
420 425

<210> 5

<211> 429

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Variante de BMP9 D366A

<400> 5

Met Cys Pro Gly Ala Leu Trp Val Ala Leu Pro Leu Leu Ser Leu Leu
1 5 10 15

Ala Gly Ser Leu Gln Gly Lys Pro Leu Gln Ser Trp Gly Arg Gly Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Asn Ala His Ser Pro Leu Gly Val Pro Gly Gly Gly Leu
35 40 45

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

Asp Phe Leu Arg Ser Leu Asn Leu Ser Gly Val Pro Ser Gln Asp Lys
65 70 75 80

Thr Arg Val Glu Pro Pro Gln Tyr Met Ile Asp Leu Tyr Asn Arg Tyr

				85				90				95					
Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Thr	Thr	Pro	Ala	Ser	Asn	Ile	Val	Arg	Ser	Phe		
100								105				110					
Ser	Met	Glu	Asp	Ala	Ile	Ser	Ile	Thr	Ala	Thr	Glu	Asp	Phe	Pro	Phe		
115								120				125					
Gln	Lys	His	Ile	Leu	Leu	Phe	Asn	Ile	Ser	Ile	Pro	Arg	His	Glu	Gln		
130								135				140					
Ile	Thr	Arg	Ala	Glu	Leu	Arg	Leu	Tyr	Val	Ser	Cys	Gln	Asn	His	Val		
145				150								155				160	
Asp	Pro	Ser	His	Asp	Leu	Lys	Gly	Ser	Val	Val	Ile	Tyr	Asp	Val	Leu		
				165								170				175	
Asp	Gly	Thr	Asp	Ala	Trp	Asp	Ser	Ala	Thr	Glu	Thr	Lys	Thr	Phe	Leu		
				180				185								190	
Val	Ser	Gln	Asp	Ile	Gln	Asp	Glu	Gly	Trp	Glu	Thr	Leu	Glu	Val	Ser		
195								200				205					
Ser	Ala	Val	Lys	Arg	Trp	Val	Arg	Ser	Asp	Ser	Thr	Lys	Ser	Lys	Asn		
210				215								220					
Lys	Leu	Glu	Val	Thr	Val	Glu	Ser	His	Arg	Lys	Gly	Cys	Asp	Thr	Leu		
225				230								235				240	
Asp	Ile	Ser	Val	Pro	Pro	Gly	Ser	Arg	Asn	Leu	Pro	Phe	Phe	Val	Val		
				245				250								255	
Phe	Ser	Asn	Asp	His	Ser	Ser	Gly	Thr	Lys	Glu	Thr	Arg	Leu	Glu	Leu		
				260				265								270	
Arg	Glu	Met	Ile	Ser	His	Glu	Gln	Glu	Ser	Val	Leu	Lys	Lys	Leu	Ser		
275								280				285					
Lys	Asp	Gly	Ser	Thr	Glu	Ala	Gly	Glu	Ser	Ser	His	Glu	Glu	Asp	Thr		
290				295								300					
Asp	Gly	His	Val	Ala	Ala	Gly	Ser	Thr	Leu	Ala	Arg	Arg	Lys	Arg	Ser		
305				310								315				320	
Ala	Gly	Ala	Gly	Ser	His	Cys	Gln	Lys	Thr	Ser	Leu	Arg	Val	Asn	Phe		
				325				330								335	

Glu Asp Ile Gly Trp Asp Ser Trp Ile Ile Ala Pro Lys Glu Tyr Glu
340 345 350

Ala Tyr Glu Cys Lys Gly Gly Cys Phe Phe Pro Leu Ala Ala Asp Val
355 360 365

Thr Pro Thr Lys His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Lys Phe
370 375 380

Pro Thr Lys Val Gly Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Ser Pro
385 390 395 400

Ile Ser Val Leu Tyr Lys Asp Asp Met Gly Val Pro Thr Leu Lys Tyr
405 410 415

His Tyr Glu Gly Met Ser Val Ala Glu Cys Gly Cys Arg
420 425

<210> 6
<211> 429
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Variante de BMP9 D408A

<400> 6

Met Cys Pro Gly Ala Leu Trp Val Ala Leu Pro Leu Leu Ser Leu Leu
1 5 10 15

Ala Gly Ser Leu Gln Gly Lys Pro Leu Gln Ser Trp Gly Arg Gly Ser
20 25 30

Ala Gly Gly Asn Ala His Ser Pro Leu Gly Val Pro Gly Gly Gly Leu
35 40 45

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

Asp Phe Leu Arg Ser Leu Asn Leu Ser Gly Val Pro Ser Gln Asp Lys
65 70 75 80

Thr Arg Val Glu Pro Pro Gln Tyr Met Ile Asp Leu Tyr Asn Arg Tyr
85 90 95

Thr Ser Asp Lys Ser Thr Thr Pro Ala Ser Asn Ile Val Arg Ser Phe
100 105 110

Ser Met Glu Asp Ala Ile Ser Ile Thr Ala Thr Glu Asp Phe Pro Phe

115					120					125					
Gln	Lys	His	Ile	Leu	Leu	Phe	Asn	Ile	Ser	Ile	Pro	Arg	His	Glu	Gln
130					135					140					
Ile	Thr	Arg	Ala	Glu	Leu	Arg	Leu	Tyr	Val	Ser	Cys	Gln	Asn	His	Val
145					150					155					160
Asp	Pro	Ser	His	Asp	Leu	Lys	Gly	Ser	Val	Val	Ile	Tyr	Asp	Val	Leu
				165					170					175	
Asp	Gly	Thr	Asp	Ala	Trp	Asp	Ser	Ala	Thr	Glu	Thr	Lys	Thr	Phe	Leu
			180					185						190	
Val	Ser	Gln	Asp	Ile	Gln	Asp	Glu	Gly	Trp	Glu	Thr	Leu	Glu	Val	Ser
		195					200					205			
Ser	Ala	Val	Lys	Arg	Trp	Val	Arg	Ser	Asp	Ser	Thr	Lys	Ser	Lys	Asn
	210					215					220				
Lys	Leu	Glu	Val	Thr	Val	Glu	Ser	His	Arg	Lys	Gly	Cys	Asp	Thr	Leu
225					230					235					240
Asp	Ile	Ser	Val	Pro	Pro	Gly	Ser	Arg	Asn	Leu	Pro	Phe	Phe	Val	Val
				245					250					255	
Phe	Ser	Asn	Asp	His	Ser	Ser	Gly	Thr	Lys	Glu	Thr	Arg	Leu	Glu	Leu
			260					265					270		
Arg	Glu	Met	Ile	Ser	His	Glu	Gln	Glu	Ser	Val	Leu	Lys	Lys	Leu	Ser
		275					280					285			
Lys	Asp	Gly	Ser	Thr	Glu	Ala	Gly	Glu	Ser	Ser	His	Glu	Glu	Asp	Thr
	290					295					300				
Asp	Gly	His	Val	Ala	Ala	Gly	Ser	Thr	Leu	Ala	Arg	Arg	Lys	Arg	Ser
305					310					315					320
Ala	Gly	Ala	Gly	Ser	His	Cys	Gln	Lys	Thr	Ser	Leu	Arg	Val	Asn	Phe
				325					330					335	
Glu	Asp	Ile	Gly	Trp	Asp	Ser	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Glu	Tyr	Glu
			340					345					350		
Ala	Tyr	Glu	Cys	Lys	Gly	Gly	Cys	Phe	Phe	Pro	Leu	Ala	Asp	Asp	Val
		355					360					365			

Thr Pro Thr Lys His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Lys Phe
 370 375 380

Pro Thr Lys Val Gly Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Ser Pro
 385 390 395 400

Ile Ser Val Leu Tyr Lys Asp Ala Met Gly Val Pro Thr Leu Lys Tyr
 405 410 415

His Tyr Glu Gly Met Ser Val Ala Glu Cys Gly Cys Arg
 420 425

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que es una variante de la proteína morfogenética ósea 9 (BMP9) que tiene actividad de señalización de células endoteliales y que carece de actividad osteogénica, en donde la diferencia entre la secuencia de aminoácidos de la variante de BMP9 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 consiste en una sustitución seleccionada del grupo que consiste en F362A, I375A, L379A, S402A, Y416A y Y418A.
- 10 2. El polipéptido según la reivindicación 1, en donde la diferencia entre la secuencia de aminoácidos de la variante de BMP9 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 consiste en la sustitución F362A.
- 15 3. El polipéptido según la reivindicación 1, en donde la diferencia entre la secuencia de aminoácidos de la variante BMP9 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 consiste en la sustitución I375A.
4. El polipéptido según la reivindicación 1, en donde la diferencia entre la secuencia de aminoácidos de la variante BMP9 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 consiste en la sustitución L379A.
- 20 5. El polipéptido según la reivindicación 1, en donde la diferencia entre la secuencia de aminoácidos de la variante BMP9 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 consiste en la sustitución S402A.
6. El polipéptido según la reivindicación 1, en donde la diferencia entre la secuencia de aminoácidos de la variante BMP9 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 consiste en la sustitución Y416A.
- 25 7. El polipéptido según la reivindicación 1, en donde la diferencia entre la secuencia de aminoácidos de la variante BMP9 y la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 consiste en la sustitución Y418A.
8. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido que es una variante de la proteína morfogenética ósea 9 (BMP9) que tiene actividad de señalización de células endoteliales y que carece de actividad osteogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

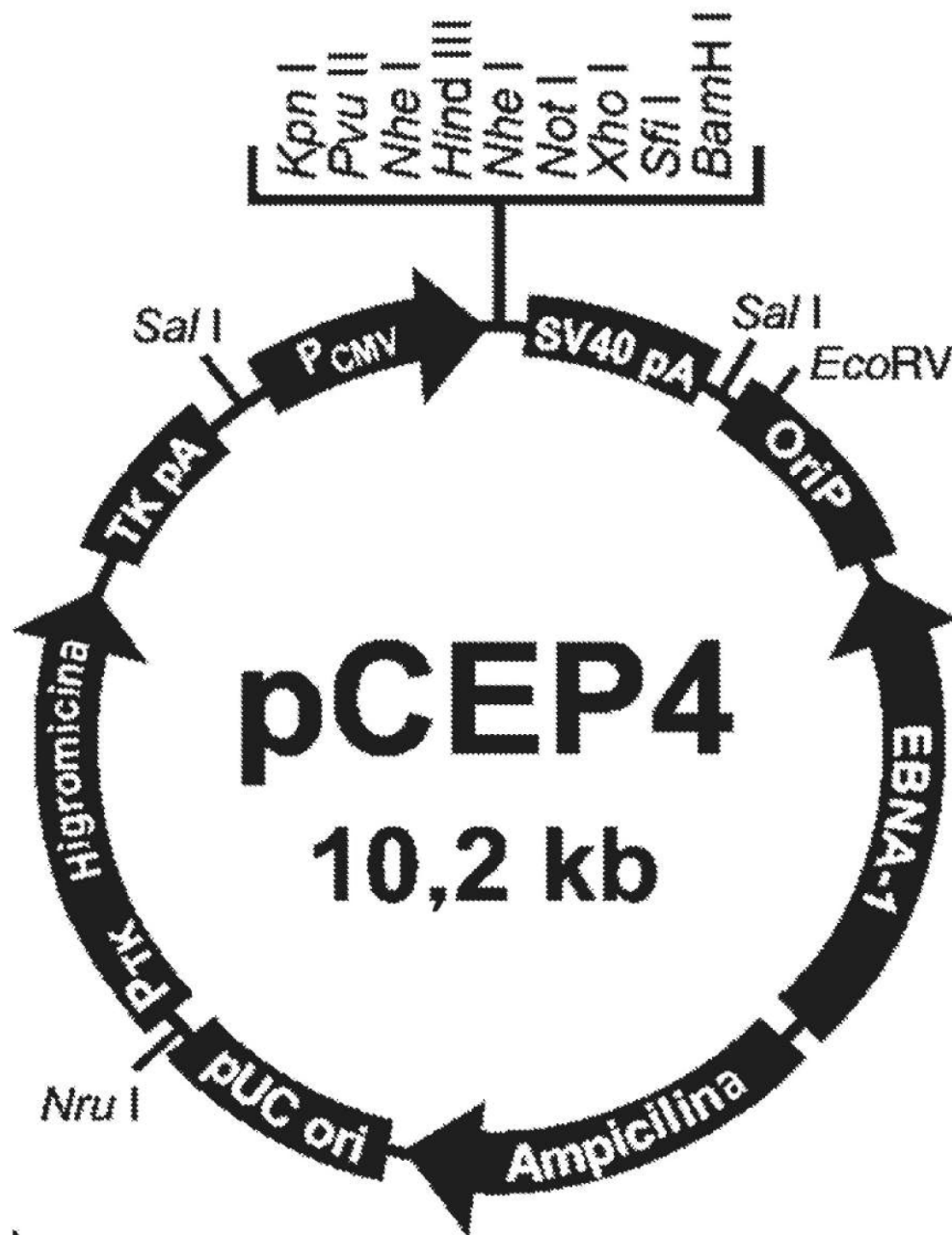
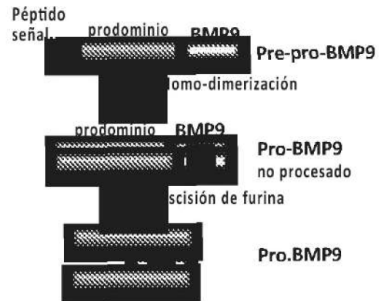
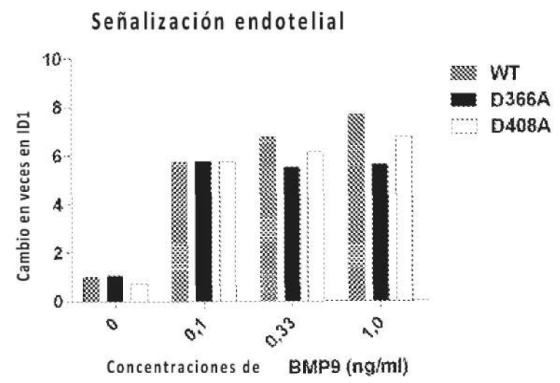


FIGURA 1

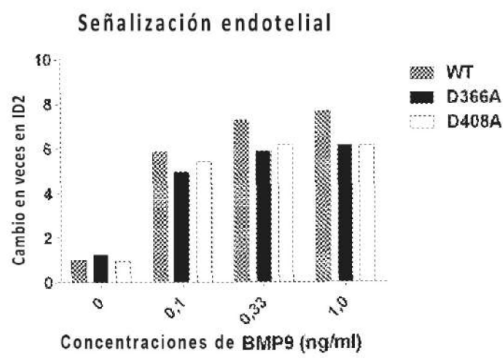
A.



B.



C.



D.

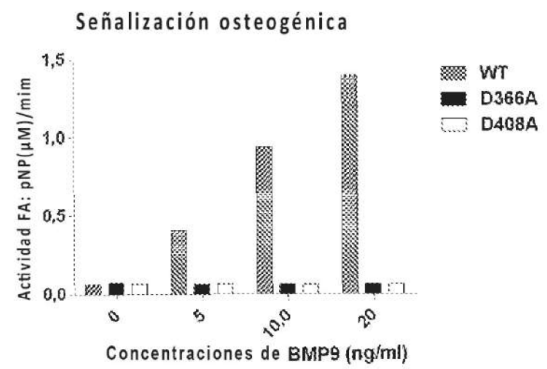


FIGURA 2

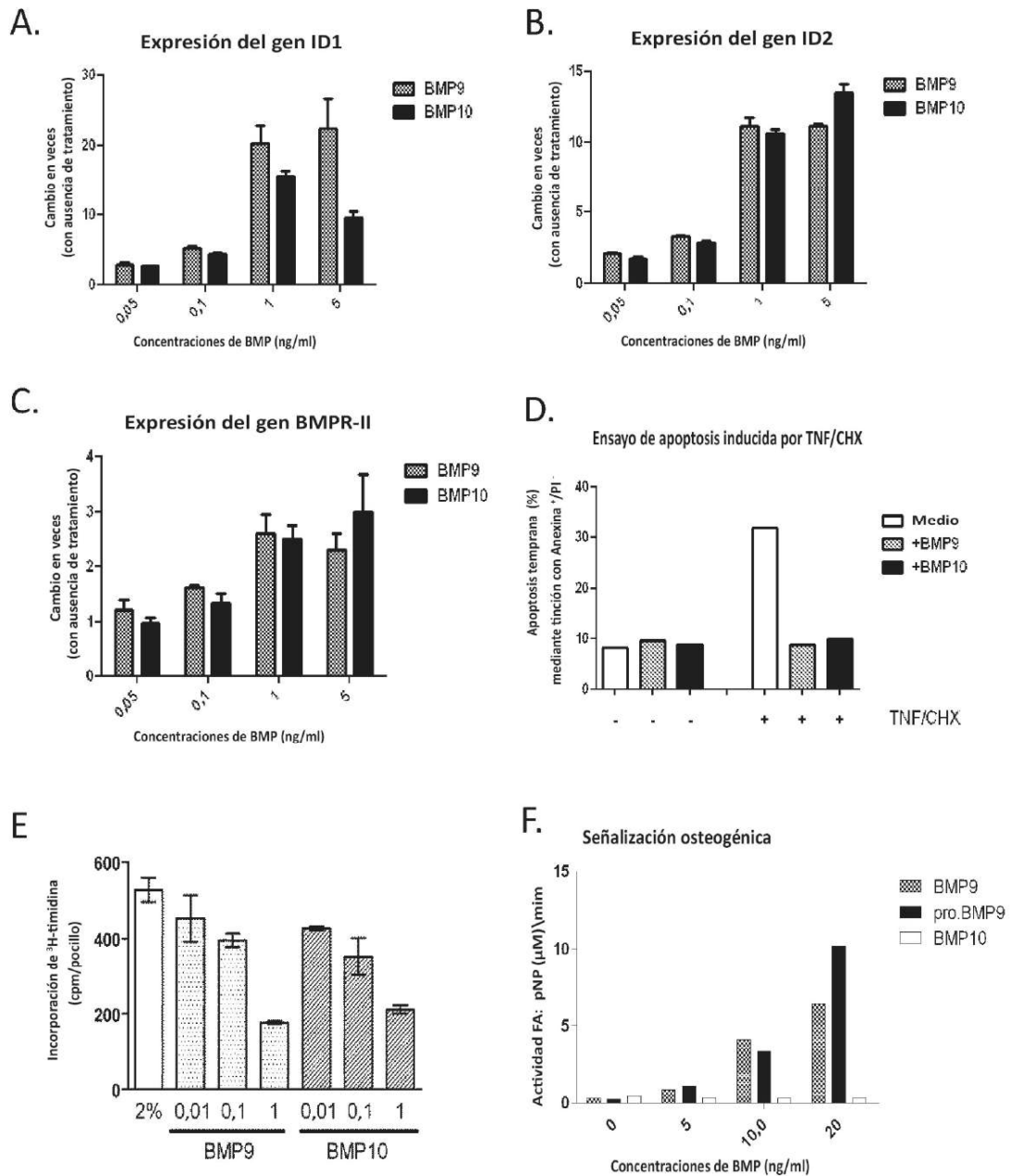


FIGURA 3

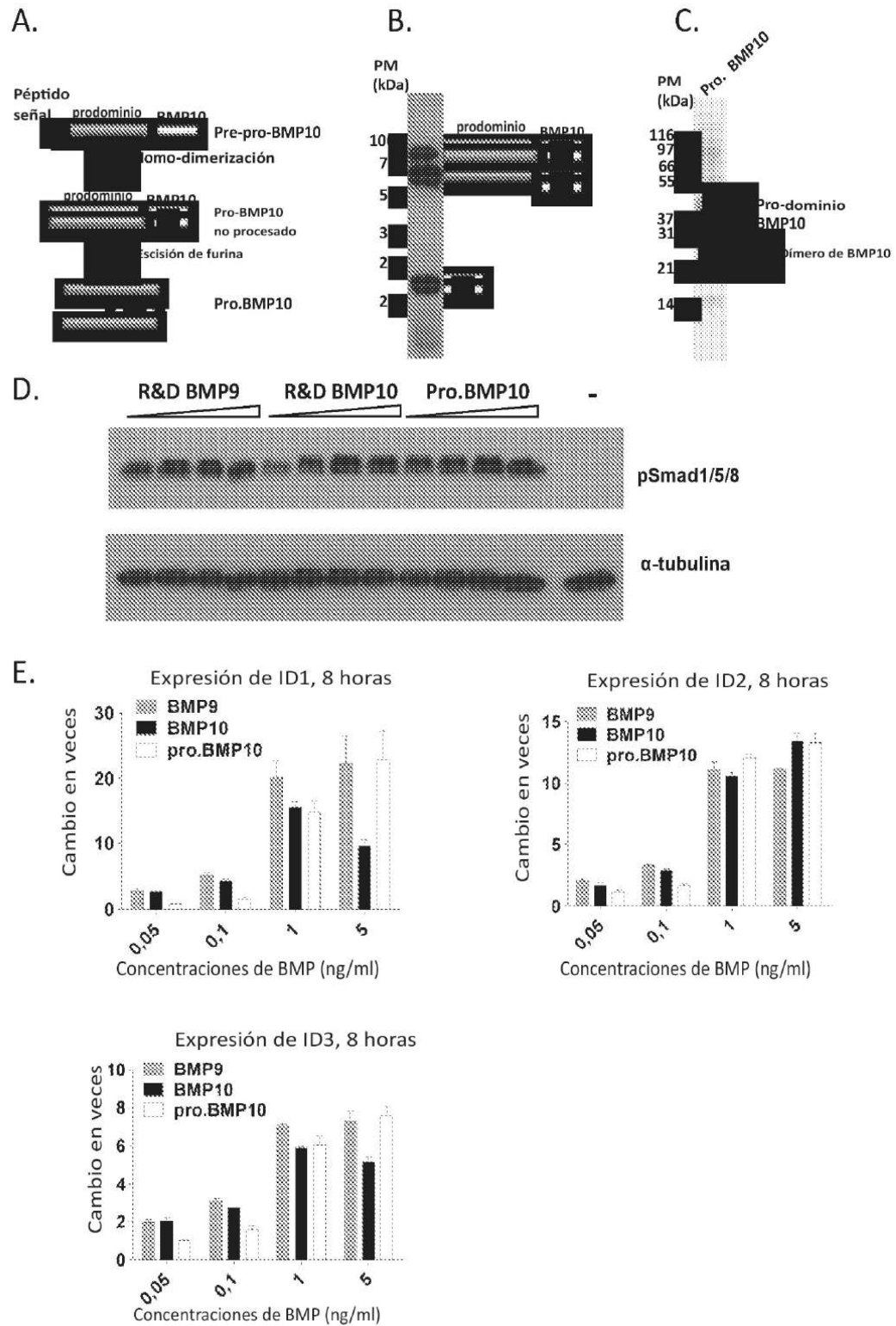


FIGURA 4

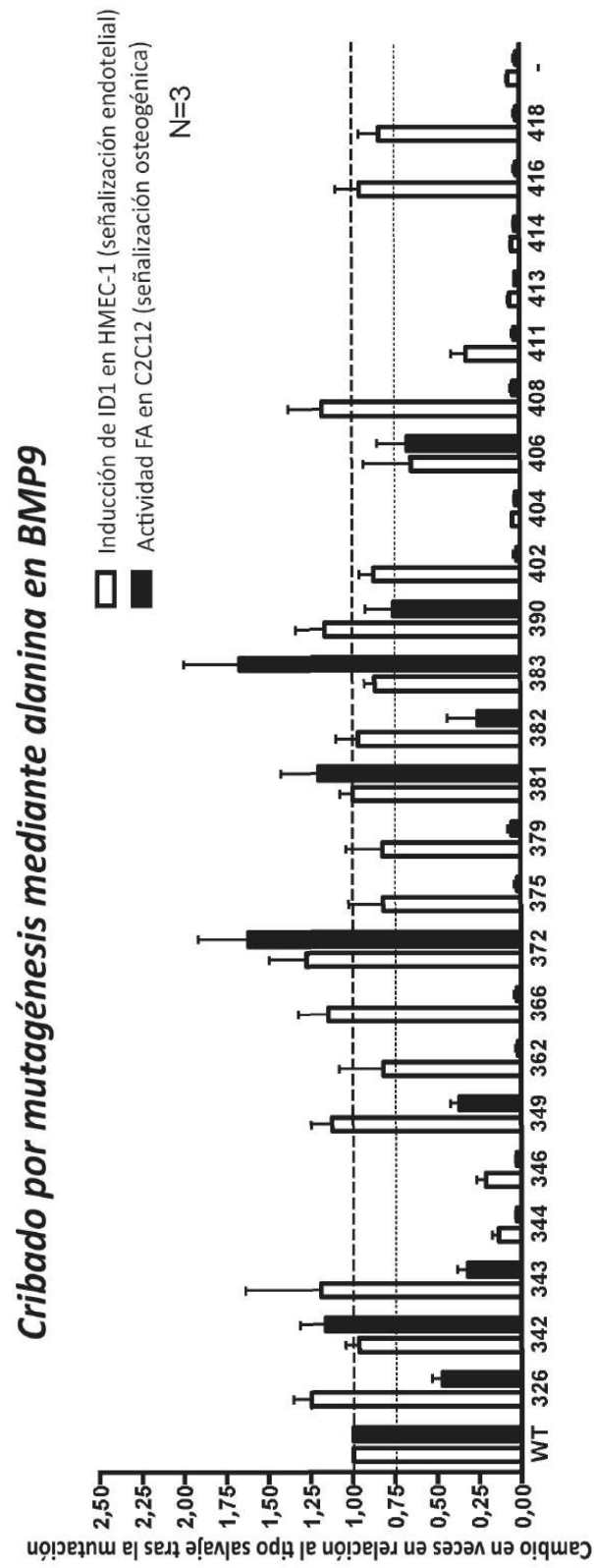


FIGURA 5

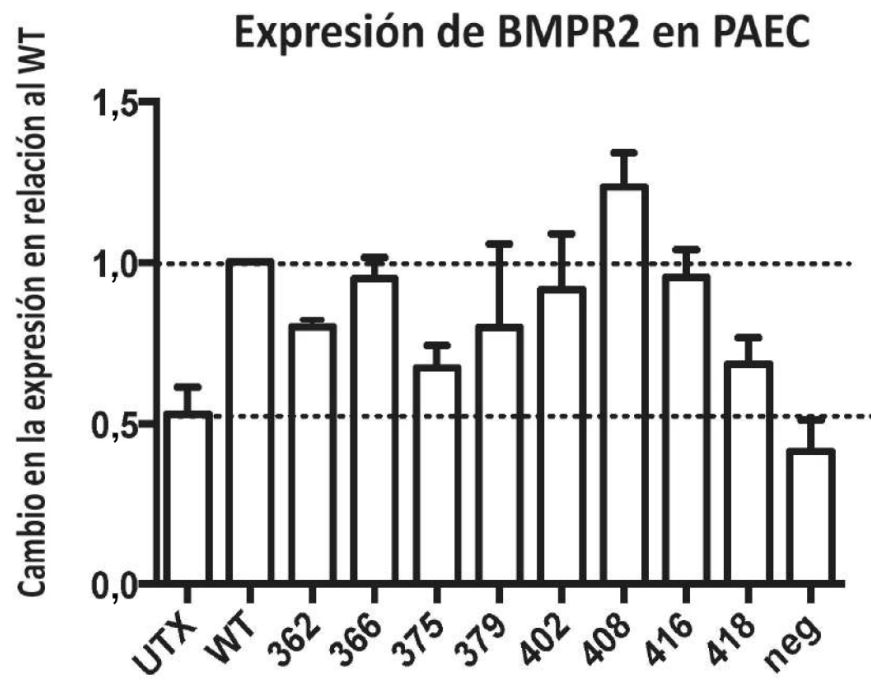


FIGURA 6

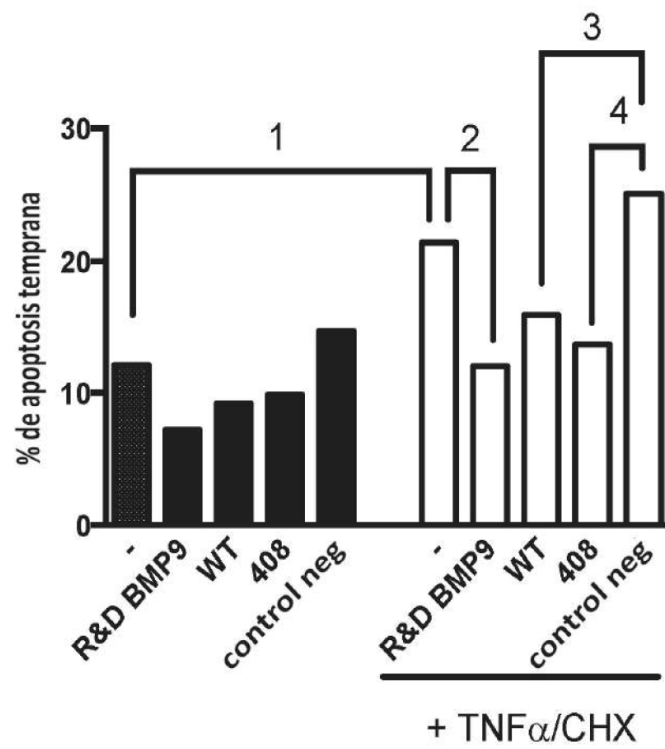


FIGURA 7

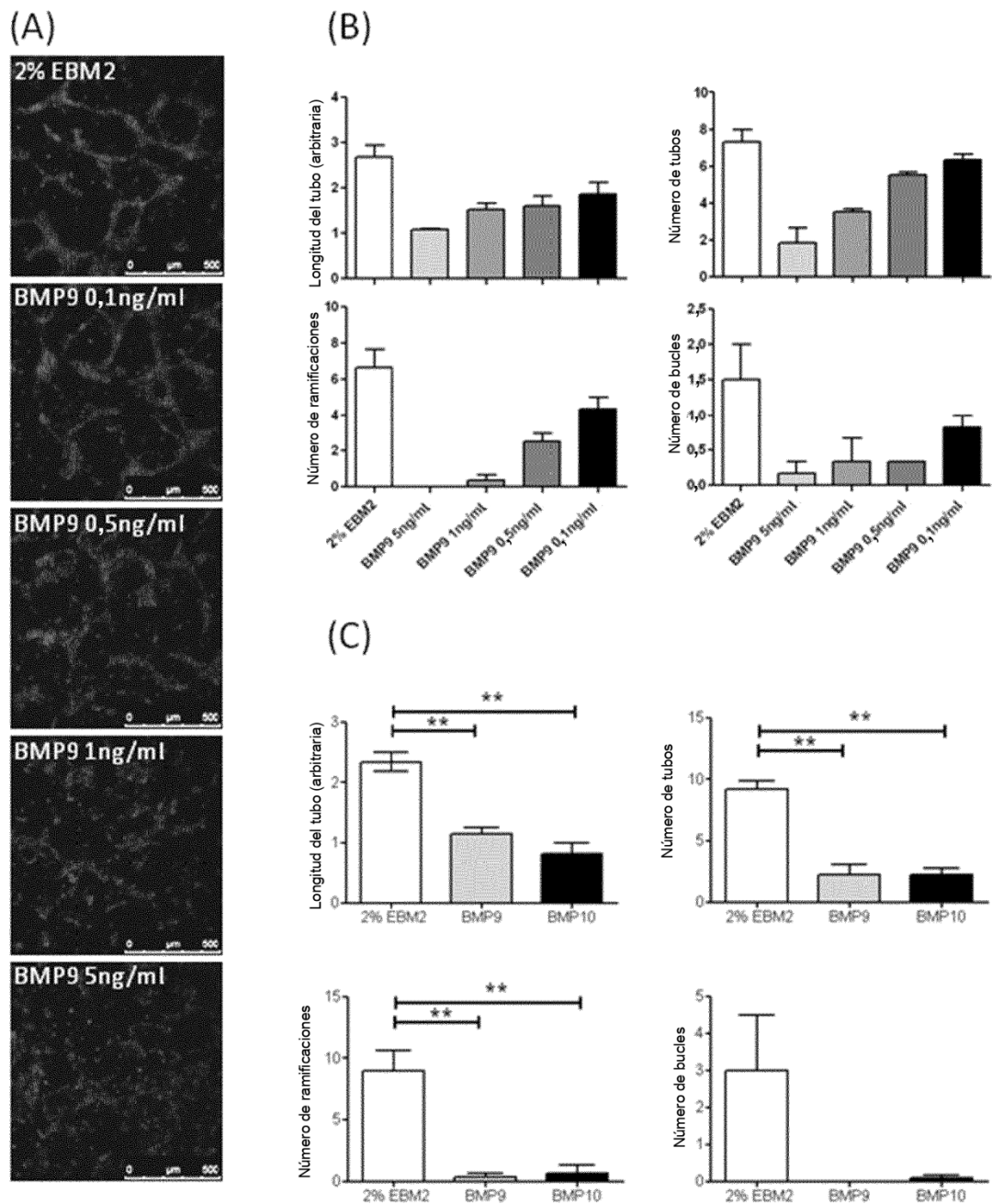


FIGURA 8