



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 282 163**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/51 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00992674 .2**
86 Fecha de presentación : **07.12.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1334365**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.08.2003**

54 Título: **Métodos de escrutinio de miméticos de morfogenética ósea.**

30 Prioridad: **06.11.2000 US 246231 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

73 Titular/es: **Thrasos, Inc.**
95 Sawyer Road, Suite 130
Waltham, Massachusetts 02453, US

72 Inventor/es: **Bosukonda, Dattatreymurty**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 282 163 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

Métodos de escrutinio de miméticos de morfogenética ósea.

5 **Antecedentes de la invención**

La familia de la proteína morfogenética ósea (BMP) es un grupo conservado de moléculas de señalización dentro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Esta superfamilia de factor de crecimiento media interacciones celulares y diferenciación de tejido durante el desarrollo. La BMP-7, un miembro de esta superfamilia, es una glucoproteína homodimérica con la capacidad de inducir la formación de cartílago y hueso *in vivo* y de potenciar la recuperación de apoplejía. Por lo tanto, la BMP-7 tiene un amplio intervalo de aplicaciones en el campo médico, incluyendo el tratamiento de osteoporosis, enfermedad de Paget y otras enfermedades óseas metabólicas, lesión neural, osteodistrofia renal e isquemia cardíaca.

A pesar del gran potencial de la BMP-7 como agente terapéutico, su uso como fármaco está dificultado por una serie de problemas. Por ejemplo, el dominio maduro de la proteína morfogenética ósea (BMP) entera es una molécula grande (aproximadamente 250 aminoácidos) y posee problemas de solubilidad a pH fisiológico debido a su alta hidrofobicidad. La BMP entera no puede cruzar la barrera hematoencefálica, y la proteína requiere vías de administración selectivas. En el caso de administraciones sistémicas, la carga inicial de proteína BMP tiene efectos secundarios indeseables a concentraciones terapéuticas. Existe la tendencia de que el dominio maduro de BMP a dosis intravenosas altas forme un callo óseo en el sitio de inyección.

En consecuencia, existe la necesidad de identificar nuevos compuestos que retengan la actividad de BMP-7 pero que superen estos inconvenientes. Se necesitan también ensayos para identificar dichos compuestos.

25 **Sumario de la invención**

Se ha encontrado ahora que la proteína morfogenética ósea se une a fragmentos de su receptor que consisten en sólo el dominio extracelular. Por ejemplo, el dominio extracelular de *daf-4*, un receptor de proteína morfogenética ósea de *C. elegans*, se une fácilmente a proteínas morfogenéticas óseas tales como BMP-2, BMP-4 y BMP-7. Basándose en este descubrimiento, se dan a conocer métodos para identificar un agente que modula la actividad de una proteína morfogenética ósea.

Se combinan un ligando de receptor de proteína morfogenética ósea, un receptor de proteína morfogenética ósea y un agente para ensayar en condiciones adecuadas para la unión del ligando proteína morfogenética ósea al receptor de proteína morfogenética ósea. Se determina después la extensión de la unión del ligando al receptor. Se compara la extensión de la unión ligando/receptor en presencia del agente de ensayo con la extensión de la unión en ausencia del agente que se va a ensayar en condiciones adecuadas para la unión del ligando al receptor de la proteína morfogenética ósea. Una diferencia en la extensión de la unión determinada indica que el agente modula la actividad de la proteína morfogenética ósea 7. Los agentes identificados mediante este método pueden evaluarse adicionalmente en ensayos *in vivo* e *in vitro* de actividad morfogenética ósea. Se describen también métodos que utilizan el receptor *daf-4*.

Se da a conocer también el uso de los agentes identificados como miméticos de proteína morfogenética ósea. La invención proporciona agentes identificados mediante los métodos descritos anteriormente, así como composiciones que comprenden los agentes y métodos de tratamiento de un sujeto utilizando los agentes o composiciones. Se contempla también un ensayo de alto rendimiento para identificar agentes que modulan la unión de ligando BMP al receptor de BMP.

Los métodos de la invención proporcionan un medio sencillo, rápido y conveniente para identificar potenciales agentes terapéuticos similares a BMP que carecen de los problemas asociados a la molécula de BMP completa. Los métodos pueden configurarse en forma de un ensayo de alto rendimiento que permite el examen de actividad morfogenética ósea en numerosos compuestos y bibliotecas de compuestos. Por tanto, los métodos de la invención facilitan la identificación y el desarrollo de miméticos morfogenéticos óseos novedosos para diversas aplicaciones médicas.

55 **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 es la secuencia de aminoácidos de fragmentos de proteína extracelular *daf-4*, SEC ID N°1 y SEC ID N° 2. La SEC ID N° 1 incluye porciones adicionales en las terminaciones N y C.

La Fig. 2 es una tabla que representa los resultados de las actividades de péptido de BMP en el ensayo descrito en el ejemplo 6.

La Fig. 3 es una descripción gráfica de los efectos relacionados con la dosis del péptido F1-2 de BMP (SEC ID N° 4) sobre la actividad fosfatasa alcalina basal e inducida por BMP-7 en el ensayo basado en células ROS.

La Fig. 4 es una descripción gráfica de los efectos relacionados con la dosis de péptidos BMP y BMP no marcada sobre la unión de BMP radioyoda a membranas plasmáticas de células ROS.

La Fig. 5 es una gráfica del efecto relacionado con la dosis del agente de ensayo H2C de BMP (SEC ID N° 6) sobre la actividad fosfatasa alcalina basal e inducida por BMP en el ensayo basado en células ROS.

La Fig. 6 es una descripción gráfica de los efectos relacionados con la dosis del agente de ensayo F2-2 de BMP (SEC ID N° 7) sobre la actividad fosfatasa alcalina basal e inducida por BMP en el ensayo basado en células ROS.

La Fig. 7 es una descripción gráfica de los efectos relacionados con la dosis del agente de ensayo F2-2 de BMP (SEC ID N° 7) y de BMP no marcada sobre la unión de BMP radioyodada a membranas plasmáticas de células ROS.

La Fig. 8 es una descripción gráfica del efecto relacionado con la dosis del agente de ensayo F2-3 de BMP (SEC ID N° 9) y de BMP no marcada sobre la unión de BMP radioyodada a receptores unidos a membrana plasmática de células ROS.

La Fig. 9 es una descripción gráfica del efecto de la dosis del agente de ensayo de BMP (SEC ID N° 9) sobre la actividad fosfatasa alcalina basal e inducida por BMP en un bioensayo de células ROS.

La Fig. 10 es un perfil de HPLC del DEC purificado de receptor *daf-4* después de cromatografía en fase inversa en una columna C18.

La Fig. 11 es una descripción gráfica de la afinidad del DEC del receptor *daf-4* por BMP mediante análisis de Scatchard.

La Fig. 12 es una descripción gráfica que demuestra que F2-3 (SEC ID N° 9) se une al DEC de *daf-4* mediante un ensayo en fase sólida rápido.

Los anteriores y otros objetos, rasgos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción más particular de realizaciones preferidas de la invención, como se ilustra en los dibujos adjuntos en los que los números de referencia similares designan las mismas partes a lo largo de las diferentes vistas. Los dibujos no son necesariamente escalables, destacándose en cambio como ilustración de los principios de la invención.

Descripción detallada de la invención

La invención está basada en proteínas morfogenéticas óseas, especialmente BMP-7, y en la interacción de estas moléculas con su receptor, particularmente con la porción extracelular del receptor, y más particularmente el receptor *daf-4* de *C. elegans* y su dominio extracelular (DEC).

Los compuestos que potencian la actividad de BMP-7, por ejemplo un péptido que tiene las secuencias de aminoácidos (agonistas) SEC ID N° 7 y 9, pueden utilizarse para tratar sujetos en los que la actividad de BMP-7 proporciona un efecto terapéutico útil. Por ejemplo, dichos compuestos estimulan la formación de hueso nuevo y podrían utilizarse por lo tanto para tratar osteoporosis. La BMP-7 se ha mostrado también que estimula la ramificación de árboles dendríticos de neuronas y potencia la remodelación funcional de los tejidos neurales restantes después de isquemia neural tal como apoplejía cuando se utiliza dentro de una ventana de tiempo terapéutica. La BMP-7 puede utilizarse también potencialmente para promover la recuperación de isquemia renal inducida por fármacos y los efectos de la sobredosis de proteína. Existen también evidencias de que la BMP-7 puede mejorar los efectos de lesión isquémica de miocardio aguda y lesión por reperfusión y prevenir la reestenosis después de angioplastia. La BMP-7 puede ser útil en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, por ejemplo, cáncer de próstata y adenomas de pituitaria, y en el tratamiento de trastornos reproductivos femeninos al potenciar la expresión de FSH β (subunidad β de la hormona estimulante de folículo). Además, se ha mostrado que la BMP-7 puede mejorar los efectos de lesión inflamatoria en el colon inducida químicamente.

Los compuestos que bloquean la actividad de BMP-7 (“antagonistas de BMP-7”), por ejemplo, péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos (agonistas) SEC ID N° 3, 4, 5, 6 y 10, pueden utilizarse para tratar sujetos en los que una reducción de la actividad de BMP-7 puede proporcionar un efecto terapéutico útil. Los ejemplos incluyen sujetos con anomalías pituitarias y otras endocrinopatías. Se incluyen también sujetos necesitados de tratamiento con agentes antiangiogénicos (por ejemplo, paciente de cáncer) o agentes antiarterioscleróticos y sujetos que requieren la prevención de la reestenosis (por ejemplo, pacientes después de angioplastia).

Los métodos de esta invención detectan compuestos que bloquean la unión entre ligando proteína morfogenética ósea y receptor morfogenético óseo. Por lo tanto, detectan tanto agonistas como antagonistas. Los agonistas y antagonistas son agentes que “modulan” la actividad de BMP. La actividad estimulante puede diferenciarse de la actividad inhibidora mediante ensayos adicionales, ensayos funcionales *in vitro* o ensayos *in vivo*. Además, si se encuentra que un agente es activo en un ensayo de la presente invención, el agente puede ensayarse en los otros ensayos para evaluar adicionalmente la actividad morfogenética ósea, tales como los ensayos de los ejemplos 4, 5 y 6. Estos otros ensayos pueden ser útiles para seleccionar adicionalmente los agentes más deseables que poseen una cierta actividad morfogenética ósea. Otros ensayos incluyen, pero sin limitación, evaluar la capacidad del agente de restaurar un defecto óseo segmentario diafisario grande en un modelo de conejo (Cook *et al.*, *J. Bone and Joint Surg.*, 76-A, 827-838, 1994); evaluar el efecto neuroprotector del agente en un modelo de rata de hipoxia/isquemia cerebral (Perides *et al.*, *Neuroscience Letters*, 187: 21-24 (1995)); evaluar la capacidad del agente de prevenir el daño debido a lesión por

isquemia/reperfusión en un modelo de rata (Vukicevic *et al.*, *J. Clin. Invest.* 102: 202-214, 1998); evaluar la actividad supresora de tumor (Wand *et al.*, n° de resumen 30, “International Conference of Bone Morphogenetic Proteins”, Lago Tahoe, CA (2000)) del agente en un modelo de rata macho de implantes de tumor de próstata (Thalman *et al.*, *Prostate*, vol. 44, 91-103 (2000)). También los agentes pueden ensayarse adicionalmente examinando las acciones antiisquémica y protectora endotelial de agentes morfogenéticos óseos identificados en un modelo de rata de isquemia de miocardio inducida por ligamiento de arteria coronaria (Lefer *et al.*, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 24: 585-593 (1992)) y evaluando los efectos sistémicos en la prevención de la osteoporosis en ancianos en un modelo de rata hembra ovariectomizada (Hurtajada-Molleni *et al.*, *J. of Endocrinology* 165: 663-668 (2000)).

El término “ligando proteína morfogenética ósea” puede abarcar un péptido, molécula, proteína u otra entidad que se una al receptor de proteína morfogenética ósea. Las “proteínas morfogenéticas óseas” preferidas son proteínas de tipo silvestre incluyendo, pero sin limitación, proteína morfogenética ósea 2, proteína morfogenética ósea 4, proteína morfogenética ósea 5, proteína morfogenética ósea 6, proteína morfogenética ósea 7, activina y otros factores de crecimiento de la superfamilia de TGF- β o agentes que son estructural o funcionalmente equivalentes. Se pretende que otros agentes tales como fragmentos que se unen al receptor de BMP, tales como los agentes de ensayo descritos por las SEC ID N° 3, 4, 5, 6, 7, 9 y 10, estén abarcados por el término “ligando proteína morfogenética ósea” como se utiliza en la presente memoria.

La acción de la proteína morfogenética ósea utiliza un sistema de señalización de serina-treonina que implica dos tipos de receptores. El receptor de tipo I está implicado en la transducción de señal y el receptor de tipo II reconoce al ligando BMP. El modelo actual de activación de receptor implica la unión de BMP a receptor de tipo II, lo que causa que ambas moléculas experimenten cambios conformacionales que producen un complejo ligando-receptor, que es capaz después de unirse con dos monómeros de receptor de tipo I. Después de la oligomerización y activación, el receptor de tipo II fosforila de forma cruzada el receptor de tipo I para iniciar la transducción de señal y la cascada de eventos intracelulares que conduce a la reactividad de la célula diana.

Como se utiliza en la presente memoria, el receptor es una proteína que se une a proteína morfogenética ósea y puede transmitir una señal al núcleo de una célula como resultado de dicha unión, o un fragmento de la proteína que retiene actividad morfogenética ósea, por ejemplo, el dominio extracelular de la proteína. Preferiblemente, el receptor es un receptor de tipo II, o una porción de un receptor de tipo II que se une a BMP, tal como el dominio extracelular de un receptor de tipo II. El dominio extracelular (DEC) de BMP es la porción del receptor que está fuera de la membrana plasmática y se une a BMP. Opcionalmente, el DEC puede incluir aminoácidos adicionales en la terminación C o N que no están en la secuencia de tipo silvestre y que no afectan a la función, tales como una cadena de polihistidina. En una realización preferida, se utiliza el DEC de *daf-4* en el método de la presente invención para facilitar la purificación. Por ejemplo, el DEC de *daf-4* puede tener la secuencia de aminoácidos identificada por la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2. El receptor puede tener más de un 90% de homología con *daf-4*, o más preferiblemente más de un 95% de homología con *daf-4* o un fragmento del mismo que comprende el DEC.

En otra realización, la invención es un método para identificar un agente que modula la actividad de la proteína morfogenética ósea 7. Se combinan un ligando de receptor de proteína morfogenética ósea, el dominio extracelular de una proteína morfogenética ósea, preferiblemente el receptor *daf-4*, y un agente para ensayar en condiciones adecuadas para la unión del ligando al dominio extracelular del receptor *daf-*, y se determina la extensión de la unión del ligando al dominio extracelular del receptor *daf-4*; y se compara la extensión de la unión en ausencia del agente para ensayar en condiciones adecuadas para la unión del ligando al dominio extracelular del receptor *daf-4*, en el que una diferencia en la extensión de la unión determinada en presencia del agente de ensayo con la unión determinada en ausencia del agente de ensayo indica que el agente modula la actividad de la proteína morfogenética ósea 7. En los agentes identificados, puede evaluarse adicionalmente la actividad morfogenética ósea en otros ensayos *in vitro* o *in vivo* para evaluar la actividad de proteína morfogenética ósea.

En una realización adicional, la proteína morfogenética ósea está marcada, preferiblemente con un radioisótopo.

En otra realización, el receptor es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2.

En aún otra realización, la invención es un análogo polipeptídico de *daf-4*, en la que el análogo comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2. El polipéptido se une a una proteína morfogenética ósea pero no se une a receptores de tipo I y/o no desencadena la transducción de señal. En aún otra invención, el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2.

Otra realización de la presente invención es un agente identificado mediante los métodos dados a conocer. Los ejemplos incluyen polipéptidos que tienen las secuencias de aminoácidos SEC ID N° 3, 4, 5, 6, 7, 9 y 10, y sales fisiológicas de los mismos.

Otra realización de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un agente identificado mediante los métodos de esta invención, incluyendo polipéptidos representados por las SEC ID N° 3, 4, 5, 6, 7, 9 y 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

ES 2 282 163 T3

Es aún otra realización un método para tratar un sujeto con osteoporosis, enfermedad ósea metabólica, enfermedad de Paget, apoplejía neurológica, insuficiencia renal, isquemia cardíaca, cáncer, infertilidad, anomalías de pituitaria y otras endocrinopatías, enfermedad intestinal inflamatoria, mediante la administración de una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o el agente, concretamente un agente que potencia la actividad de BMP, tal como un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 7 ó 9, al sujeto. Se incluyen también métodos para tratar sujetos necesitados de tratamiento con agentes antiangiogénicos (por ejemplo, paciente de cáncer) o agentes antiarterioscleróticos y sujetos que requieran la prevención de reestenosis (por ejemplo, pacientes después de angioplastia), mediante la administración de un agente que bloquea la actividad BMP, tal como un polipéptido que tiene las secuencias de aminoácidos SEC ID N° 3, 4, 5, 6 ó 10.

En aún otra realización adicional, la invención es un ensayo de examen de alto rendimiento para identificar un agente que modula la actividad de la proteína morfogenética ósea 7. Se combinan la proteína morfogenética ósea 7 radiomarcada, el dominio extracelular de *daf-4* y un agente de ensayo en condiciones adecuadas para la unión de la proteína morfogenética ósea 7 al dominio extracelular de *daf-4*. Se determina la extensión de la unión de la proteína morfogenética ósea 7 al dominio extracelular de *daf-4* y se compara la extensión de la unión determinada en ausencia del agente de ensayo en condiciones adecuadas para la unión de la proteína morfogenética 7 al dominio extracelular del receptor *daf-4*. Una diferencia en la extensión de la unión indica que el agente modula la actividad de la proteína morfogenética ósea 7. Preferiblemente, el DEC se acopla a una fase sólida tal como una membrana de PVDF. El receptor inmovilizado caracteriza un receptor o ligando que se acopla con una fase sólida mediante una interacción, típicamente una reacción química, por ejemplo la interacción hidrófoba del receptor con la membrana de PVDF.

En un experimento típico, se realiza un control simultánea o escalonadamente. El control determina la extensión de la unión en ausencia del compuesto de ensayo, concretamente, omitiendo el compuesto de ensayo o reemplazándolo por un compuesto de control para determinar la unión no específica. Por ejemplo, un compuesto de control para los péptidos activos identificados en los ejemplos fue un péptido consistente en la secuencia de aminoácidos en orden inverso, identificada en la Fig.2 por no tener actividad en los ejemplos 1, 2 ó 3. El término “extensión de la unión” es la cantidad de actividad obtenida al cuantificar la unión midiendo, por ejemplo, un agente radiomarcado o colorimétrico (por ejemplo, tinte) u otro método estándar utilizado en la técnica.

Los métodos de la invención pueden diseñarse como ensayos competitivos estándar bien conocidos en la técnica. El receptor de BMP puede acoplarse a o inmovilizarse en una fase sólida (por ejemplo, filtro, membrana tal como PVDF, celulosa o nitrocelulosa), plástico (por ejemplo, placa de microvaloración, tira reactiva), vidrio (por ejemplo, portaobjetos), perla (por ejemplo, perlas de látex), partícula, resina orgánica u otra fase sólida orgánica o no orgánica) o un fluido (por ejemplo, tampón TRIS o tampón fosfato). El acoplamiento de la BMP o receptor a la fase sólida o fluida puede conseguirse mediante métodos estándar incluyendo, por ejemplo, secado con aire o reacción química. La unión del receptor al ligando puede optimizarse variando otras condiciones tales como pH (fisiológico), temperatura (4°C a 37°C), tampón, tiempo de incubación y concentración. Las condiciones adecuadas son pH y temperatura fisiológicos, utilizando tampón HEPES 50 mM.

Los péptidos identificados en los ejemplos por tener actividad morfogenética ósea pueden poseer un grupo funcional suficientemente ácido, suficientemente básico o ambos, y reaccionar en consecuencia con cualquiera de una serie de bases inorgánicas y ácidos inorgánicos y orgánicos, formando una sal. Los ácidos empleados habitualmente para formar sales de adición de ácido son ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido p-bromofenilsulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético y similares.

Las sales de adición de base incluyen aquellas derivadas de bases inorgánicas tales como hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos de amonio o metales alcalinos o alcalinotérreos y similares. Dichas bases útiles en la preparación de las sales de esta invención incluyen por tanto hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, carbonato de potasio y similares.

Una “cantidad eficaz” de los péptidos de la presente invención es la cantidad de péptido que da como resultado un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado mientras que no causa efectos secundarios inaceptables cuando se administra a un sujeto que tiene una de las enfermedades o afecciones anteriormente citadas. Un “efecto terapéutico deseado” incluye uno o más de los siguientes: 1) una mejora del(de los) síntoma(s) asociado(s) a la enfermedad o afección; 2) un retardo en el inicio de los síntomas asociados a la enfermedad o afección; 3) una longevidad aumentada en comparación con la ausencia de tratamiento; y 4) una mayor calidad de vida en comparación con la ausencia de tratamiento.

Una “cantidad eficaz” del péptido administrado a un sujeto dependerá también del tipo y la gravedad de la enfermedad y de las características del sujeto, tales como salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a fármacos. El experto en la técnica podrá determinar las dosificaciones apropiadas dependiendo de estos y otros factores. Típicamente, una cantidad eficaz de un péptido de la invención puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg al día a aproximadamente 1.000 mg al día para un adulto. Preferiblemente, la dosificación está en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg al día a aproximadamente 100 mg al día, más preferiblemente de aproximadamente 1,0 mg/día a aproximadamente 10 mg/día.

ES 2 282 163 T3

Los péptidos de la presente invención pueden administrarse, por ejemplo, por vía oral, mediante administración nasal, inhalación o por vía parenteral. La administración parenteral puede incluir, por ejemplo, administración sistémica tal como mediante inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea o intraperitoneal. Los péptidos pueden administrarse al sujeto junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutico aceptable como parte de una composición farmacéutica para tratar las enfermedades discutidas anteriormente. Los vehículos farmacéuticos adecuados pueden contener ingredientes inertes que no interaccionan con el péptido o derivado peptídico. Pueden emplearse técnicas de formulación farmacéutica estándares tales como las descritas en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Company, Easton, PA. Los vehículos farmacéuticos adecuados para administración parenteral incluyen, por ejemplo, agua estéril, solución salina fisiológica, solución salina bacteriostática (solución salina que contiene aproximadamente 0,9 mg/ml de alcohol bencílico), solución salina tamponada con fosfato, solución de Hank, lactato de Ringer y similares. Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, trehalosa, sorbitol y manitol.

Un "sujeto" es un mamífero, preferiblemente un ser humano, pero puede ser también un animal, por ejemplo, animales domésticos (por ejemplo, perros, gatos y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, conejillos de indias y similares).

Ejemplos

20 Péptidos

La negrita indica que estos restos de cisteína están implicados en un enlace disulfuro.

25 **F1-1(CELYVSFRDLGWQDWIAPGYAAYC , SEC LD NO.3)**

F1-2 (CFRDLGWQDWIAPC, SEQ LD NO.4)

30 **H-1 (CAFPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKC SEC ID NO 5.)**

H-2C(CCFINPETVCC , SEC LD NO.6)

35 **F2-2 (CYFDDSSNVIC SEC LD NO.7)**

F2-2C (CIVNSSDDDFYC SEC LD NO.8)

40 **F2-3 (CYFDDSSNVICKKYRS , SEC LD NO.9)**

F2-1 (CLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVC, SEC ID NO.

10)

45 Ejemplo 1

Ensayo de receptor de radioligando

Se determinaron las actividades de unión a receptor de diversos ligandos BMP (New York Public Health Labs., Albany, NY) mediante un ensayo isotérmico de unión por desplazamiento del equilibrio utilizando una fracción de membrana plasmática enriquecida en receptor de BMP-7 de células ROS (ATCC 17-2.8) y BMP-7 marcada con ¹²⁵I (NEN, Billerica, MA) como ligando. Se radiyodó BMP-7 purificada a una actividad específica de 70-78 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ mediante un procedimiento modificado del método de lactoperoxidasa (Schneyer, A.L., *et al.*, *Endocrinology* 119, 1446-1453 (1986)). La capacidad de unión porcentual de BMP-7 radiyodada a receptor en exceso es de 30-37%. Los receptores de células ROS se obtienen mediante un procedimiento descrito anteriormente (Dattatreymurty, B., *et al.*, (1986), *J. Biol. Chem.* 261). Estas preparaciones contienen una sola clase de sitios de unión a BMP-7 con una afinidad (K_d) de $4,38 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ y una capacidad media de unión a BMP-7 de 3,6 pmol/mg de proteína. En un ensayo típico, se incubaron cantidades fijas de solución de BMP-7 marcada con ¹²⁵I (~80.000 cpm) con una cantidad fija de fracción de membrana plasmática enriquecida en receptor en presencia (5 μg para unión no específica) o ausencia de BMP-7 no marcada en exceso (para la unión total). Se generaron curvas de desplazamiento con concentraciones crecientes de preparación patrón de BMP-7 (5-2.000 ng). Se llevaron a cabo las incubaciones de ensayo en un volumen de reacción de 300 μl con agitación durante 22 horas a 4°C. Se separaron la BMP-7 marcada con ¹²⁵I unida y no unida mediante centrifugación (30.500 x g, 30 minutos). Se aspiraron los sobrenadantes y se lavaron los sedimentos antes de contar en un contador gamma (Packard Instr. Downers Grove, IL). Se calculó la concentración de agente de ensayo necesaria para proporcionar un 50% de inhibición de la unión específica total de BMP-7 marcada con ¹²⁵I (DE_{50}) a partir de datos de competición.

Ejemplo 2

Técnica de transferencia de ligando basada en receptor de tipo II

5 Se desarrolló un método novedoso de transferencia de ligando para caracterizar la unión de BMP-7 y agente de ensayo al receptor de células ROS. Se analizaron los agentes de ensayo mediante este método para determinar su capacidad de interaccionar con receptor de tipo II basándose en su capacidad de inhibir la unión de BMP-7 marcada con ^{125}I al receptor. En un experimento típico, se trató fracción de membrana plasmática de células ROS enriquecida en receptor con SDS (concentración final 1,6% p/v) en presencia de 17% de glicerol sobre hielo, como se describe anteriormente (Dattatreymurty, B. y Reichert Jr., L.E. (1992) *Endocrinology* 131, 2437-2445), y se sometió a PAGE-SDS en condiciones no reductoras y sin calentamiento previo de las muestras, según el procedimiento de Laemmli (Laemmli, U.K. (1970), *Nature* 227, 680-685). Se sometieron a electroforesis las muestras de receptor a 35 mA y 4°C en geles separadores de acrilamida en gradiente (5-8% ó 5-10% p/v). Se utilizaron como patrones marcadores preñidos de pesos moleculares conocidos. Después de la PAGE-SDS, se transfirieron las proteínas resueltas de los geles de acrilamida a membranas de PVDF (membranas de transferencia Immobilon-P) utilizando una 2005 Transphor Unit de Pharmacia-LKB a corriente constante (0,2 A) y 4°C durante 16 h. Se llevó a cabo la transferencia de ligando del modo siguiente. Brevemente, se incubaron los carriles de muestra con tampón de bloqueo (3% de BSA en tampón HEPES 50 mM, pH 7,4) durante una noche en frío (4°C) y se incubaron adicionalmente en tampón HEPES 50 mM, pH 7,4, que contenía 0,5% de BSA, MgCl_2 10 mM, CaCl_2 1 mM y BMP-7 marcada con ^{125}I (400.000 cpm/ml) en ausencia o presencia de BMP-7 no marcada en exceso. Los carriles que contenían receptor se incubaron también con BMP-7 marcada con ^{125}I en presencia de agentes de ensayo para determinar las propiedades de unión a receptor de los agentes de ensayo. Se aclararon las transferencias tres veces con tampón HEPES 50 mM, pH 7,4, que contenía MgCl_2 5 mM, se secaron con aire y se sometieron a autorradiografía. Los resultados indican la actividad de unión a receptor del agente de ensayo determinada mediante su capacidad de inhibir la unión de BMP-7 radiomarcada a receptor de BMP de tipo II de células ROS.

Ejemplo 3

Bioensayos in vitro

30 *Ensayos de fosfatasa alcalina basados en células ROS*

Se analizaron BMP-7 y agentes de ensayo que se unen a receptores de BMP-7 mediante bioensayo *in vitro*. Este ensayo define el papel de estos agentes de ensayo en el sitio de unión a receptor. Se cree que algunos de los agentes de ensayo pueden interaccionar eficazmente con receptores e inhibir la reactividad de células diana inducida por BMP-7, actuando por tanto como antagonistas funcionales. Como alternativa, estos agentes pueden imitar las funciones de BMP-7 induciendo la actividad fosfatasa alcalina en células ROS, actuando por tanto como agonistas funcionales. Un procedimiento de ensayo como se describe por Maliakal, J.C., *et al.*, *Growth Factors* 11, 227-234 (1994) determinó las actividades biológicas de péptidos de BMP-7. En un experimento típico, se sembraron células de osteosarcoma de rata (17/2,8) en placas de 96 pocillos ($3,0 \times 10^4$ células/pocillo) y se incubaron durante una noche a 37°C en incubador con 5-6% de CO_2 . Al día siguiente, se examinaron las placas para asegurarse de que las células están sanas y confluentes. Se trataron las células con concentraciones crecientes de patrón de BMP-7 (1-10.000 ng/ml) o agentes de ensayo (0,02-200 μM) o concentraciones apropiadas de agente de ensayo solo o con patrón de BMP-7 preparado en medio que contiene 1% de FBS, y se incubaron durante 2 días a 37°C en un incubador con 5-6% de CO_2 . Se determinó el contenido celular de actividad fosfatasa alcalina mediante el método de Reddi, A.H. y Huggins, C.B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1601-1605 (1972). Se llevaron a cabo rutinariamente estimaciones enzimáticas en placas de 96 pocillos. Después de la eliminación del medio de cultivo, se lavaron las células con PBS precalentado (150 μl) y se incubaron adicionalmente en 100 μl de Triton X-100 al 1% precalentado durante 30 minutos a 37°C. Se centrifugaron las placas durante 10 minutos a velocidad máxima, y se ensayó en las muestras recuperadas (cada una de 15 μl) la actividad enzimática añadiendo 90 μl de fosfato de p-nitrofenilo (Sigma, St. Louis, MO) como sustrato en tampón de glicina-NaOH 0,05 M, pH 9,3, e incubando durante 20 minutos a 37°C. Se detuvo la reacción añadiendo 75 μl de NaOH 0,2 N/pocillo y se mide la absorbancia a 405/490 nm en un lector de placas Dynatech MR 700 (Dynatech Laboratories, R.U.). Se expresan los resultados como la concentración de inhibidor peptídico/molécula pequeña (con actividad antagonista) necesaria para proporcionar un 50% de inhibición de la respuesta máxima al patrón de BMP-7. Las actividades de los agentes de ensayo que estimulan la reactividad celular (con actividad agonista) se expresan respecto al patrón de BMP-7.

Resultados

60 *Perfiles de actividad de agentes de ensayo de BMP*

F1-1 (SEC ID N° 3) tiene extremos ciclados. Cuando se incubaron células ROS con concentraciones crecientes de este péptido (2 a 260 μM) junto con BMP-7 (1,33 nM), el péptido se comportó como un antagonista e inhibió la reactividad celular inducida por BMP-7 de manera dependiente de la dosis. Se observó una inhibición de un 50% de la reactividad celular ante BMP-7 a una concentración de péptido de 20 μM . El F1-1 solo era eficaz sólo a la mayor concentración (52-260 μM) para inhibir la reactividad celular basal (Fig. 2).

ES 2 282 163 T3

El péptido F1-2 (SEC ID N° 4) es un péptido F1-1 de 15 restos que está ciclado en los extremos. En el bioensayo basado en células ROS, el péptido se comportó de forma similar a F1-1, inhibiendo débilmente la reactividad celular basal. Cuando se ensayó el péptido junto con BMP-7, se comportó como un antagonista e inhibió la reactividad celular ante BMP-7 de manera dependiente de la dosis (Fig. 3). Se observó un 50% de inhibición de la reactividad celular ante BMP-7 a una concentración de péptido de 10 μM . Cuando se ensayó este péptido en un ensayo de receptor de radioligando, requirió concentraciones relativamente mayores (179 μM) para inhibir la unión de BMP-7 marcada con ^{125}I al receptor, mostrando por tanto una actividad relativamente débil en el ensayo (Fig. 4).

Péptidos Heal: El péptido H-1 (SEC ID N° 5) está ciclado. En el bioensayo basado en células ROS, este péptido se comportó como un antagonista débil, ya que requirió concentraciones relativamente altas (44-220 μM) para inhibir la respuesta celular inducida por BMP-7. El péptido solo fue eficaz sólo a muy altas concentraciones para inhibir la actividad fosfatasa alcalina basal de las células ROS (Fig. 2).

El péptido H-2C (SEC ID N° 6) está ciclado. En el ensayo de receptor de radioligando, este péptido a una concentración de 8 μM potenció la unión de BMP-7 marcada con ^{125}I al receptor (Fig. 4). Sin embargo, en el bioensayo basado en células ROS, el péptido se comportó como un antagonista que inhibía la respuesta celular basal así como la inducida por BMP-7. Se observó un 50% de inhibición de la reactividad celular ante BMP-7 a una concentración de péptido de 5 μM (Fig. 5).

El péptido F2-1 (SEC ID N° 10) está ciclado. En el bioensayo basado en células ROS, este péptido inhibió eficazmente tanto la reactividad celular basal como la inducida por BMP-7 de manera dependiente de la dosis. El péptido, a una concentración de 8 μM , inhibió la respuesta celular inducida por BMP-7 en un 50% (Fig. 2).

El péptido F2-2 (SEC ID N° 7) contiene 9 restos y sus extremos están ciclados. En el bioensayo basado en células ROS, el péptido se comportó como un agonista débil a concentraciones menores (0,6-60 μM), ya que potenció ligeramente (20%) la reactividad celular inducida por BMP-7 (Fig. 6). Sin embargo, a mayores concentraciones, el péptido inhibió la reactividad ante BMP-7. Cuando se ensayó este péptido en un ensayo de receptor de radioligando, inhibió eficazmente la unión de BMP-7 unida a ^{125}I de manera dependiente de la dosis, con una DE_{50} de 1 μM (Fig. 7).

El péptido F2-2c (SEC ID N° 8) sirvió como péptido control en el ensayo. Este es un péptido ciclado que tiene 9 restos idénticos a los del péptido F2-2, pero en orden inverso. En el ensayo de receptor de radioligando, este péptido era inactivo. Además, el péptido no tiene efecto sobre la reactividad basal ni inducida por BMP-7 de células ROS.

El péptido F2-3 (SEC ID N° 9) contiene 16 restos que son idénticos a los de F2-2 y una extensión C-terminal de 5 restos. El péptido se cicla en un bucle de 11 restos mediante un reemplazo interno de Cys más una Cys N-terminal. Contiene dos cargas negativas en el dedo 2 del bucle y tres cargas positivas en la terminación C de la punta. En el ensayo de receptor de radioligando, el péptido proporcionó una inhibición relacionada con la dosis de la unión de BMP-7 marcada con ^{125}I al receptor, con una DE_{50} de 10 μM (Fig. 8). Además, las pendientes calculadas de las curvas de respuesta a la dosis para el péptido y una preparación de referencia de BMP-7 no marcada fueron similares, sugiriendo que las curvas de respuesta a la dosis eran paralelas. En el bioensayo basado en células ROS, el péptido no tuvo un efecto significativo sobre la reactividad celular basal, pero se comportó de manera agonista en presencia de una concentración submáxima de BMP-7 (1,33 nM). De forma interesante, el péptido era extremadamente eficaz a bajas concentraciones (0,01-1 μM), a las que potenciaba significativamente la actividad fosfatasa alcalina celular inducida por BMP-7 (Fig. 9). Para concentraciones de péptido tan bajas como 0,01, 0,1 y 1 μM , los aumentos porcentuales en la respuesta a BMP-7 observados (respecto a la ausencia de péptido) fueron de 53% ($p < 0,001$), 54% ($p = 0,007$) y 48% ($p = 0,01$), respectivamente.

Ejemplo 4

50 *Ensayo de crecimiento dendrítico en neuronas simpáticas en rata*

Este ensayo está basado en la capacidad de la BMP-7 de inducir específicamente el crecimiento dendrítico en neuronas simpáticas de rata perinatal. Se estableció el ensayo como se describe en Lein P. *et al.*, *Neuron*. 15(3), 597-605 (1985). Brevemente, se disociaron neuronas simpáticas de los ganglios cervicales superiores de ratas perinatales (fetos de rata Holtzman de 20-21 días de embarazo) según el método de Higgins, D., Lein P., Osterhout, D. y Johnson M.I. (1991) en "Culturing Nerve Cells", G. Bonker y K. Goslin, eds. (Cambridge Mass: MIT Press) pág. 177-205. Se sembraron después las células a baja densidad (~ 10 células/ mm^2) sobre cubreobjetos recubiertos con polilisina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se mantuvieron en un medio libre de suero que contenía beta-NGF (100 ng/ml). Se eliminaron las células no neuronales mediante tratamiento con un agente antimitótico (citosina-beta-D-arabompirampsoda 1 μM) los días 2 y 3. Se dejaron pasar después uno a dos días para recuperación antes de empezar el tratamiento experimental. Al inicio del día 5, se suplementó continuamente el medio de cultivo con BMP-7 (50 ng/ml) o concentraciones variables de agente de ensayo o BMP-7 y agente de ensayo durante 5 días, y después se inmunotizó con un anticuerpo específico de dendrita (SM132, y anticuerpo para formas no fosforiladas de las subunidades neurofilamentosas M y H, Sternberger Monoclonals, Inc.) Se analizó la morfología celular mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados se presentaron como el número de dendritas por célula. Las neuronas en los cultivos de control tienen típicamente sólo 1 proceso, un axón largo, mientras que las neuronas expuestas a BMP-7 son multipolares, teniendo varias dendritas ahusadas y un axón.

Ejemplo 5

Bioensayo in vivo

5 Ensayo de implantación subcutánea en roedores: Este ensayo está basado en la capacidad de la BMP-7 de inducir la formación ósea en rata. Se siguió un procedimiento como se describe anteriormente con detalle en Sampath T.K. *et al.* (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 20352-20362 para determinar el efecto *in vivo* de los agentes de ensayo que mostraron actividad en ensayos *in vitro* como los descritos anteriormente. Brevemente, se añadieron 1,2 mg de matriz ósea bovina (vehículo de colágeno) a BMP-7 o péptido de ensayo o molécula pequeña o BMP-7 y péptido de ensayo en 200 μ l de acetronitrilo al 50%, 0,15 control. Se utilizaron un mínimo de 6 animales por grupo. Se designó el día de la implantación como día 0 del ensayo. Se retiraron los implantes el día 14 para evaluación. Se monitorizó la actividad de formación ósea en los implantes mediante el contenido de calcio esencialmente como se describe por Reddi, A.H. y Huggins, C.B. (1972) *PNAS USA* 69, 1601-1605. Para histología, se fijaron los implantes en solución de Bouin, se embebieron en medio plástico JB4, se cortaron en secciones de 1 μ m y se tiñeron con azul de toluidina. Se expresó la actividad de formación ósea específica como la cantidad de péptido de ensayo/molécula pequeña necesaria para exhibir la actividad de formación ósea semimáxima. La BMP-7 indujo la formación ósea para el día 14 (datos no mostrados).

Ejemplo 6

20 *Ensayo de examen de alto rendimiento (HTS) basado en receptor de tipo II*

Preparación de DEC de receptor de tipo II: Se utilizó en este ensayo dominio extracelular (DEC) altamente purificado del receptor de tipo II *daf-4*. Se clonó el DEC del receptor *daf-4* y se construyeron vectores (vectores de expresión pCMV5, secuencia *daf-4*, incluyendo el sitio de inicio consenso de mamíferos y el marcaje de secuencia de hexahistidina) para la expresión de esta molécula en células de mamífero. En este constructo, el DEC se ha ligado a un marcaje de secuencia de hexahistidina para la purificación y detección posteriores. Se ha utilizado la línea PJ511.9.8 de células CHO DHFR(-) transfectada para la expresión de *daf-4* como se representa a continuación. Este método de clonación puede utilizarse también con otras proteínas morfogenéticas óseas.

30 *Producción de cultivo celular de *daf4* en grandes cantidades (3,5 l/semana):* Se ha establecido un banco celular de este clon, y se utiliza un vial de células de este banco para establecer una serie de ampliación a escala para eventual sembrado de microvehículo. Se hace una ampliación a escala inicial en matraces T de 150 cm² seguida de expansión celular en botellas rotativas de 850 cm². Se dejaron reposar las células recogidas en perlas de microvehículo Cytodex y se continúa la fase de crecimiento de las células en una instalación de biorreactor 7L controlado, hasta que la observación microscópica indica que la confluencia de las perlas es mayor de 80%. Durante la fase de crecimiento, se realizaron cambios de medio cada 4 ó 5 días. Después de la fase de crecimiento, se hicieron cambios de medio adicionales utilizando formulaciones basales o medios que contienen suero reducido y el inhibidor de proteasa aprotinina alternados, para facilitar la producción de proteína en un medio más adecuado para la posterior purificación de proteína. Se realizaron los cambios de medio y posteriores recogidas de medio acondicionado cada 4-7 días, dependiendo de la calidad y cantidad del producto. Se clarifican las recogidas de medio acondicionado mediante centrifugación seguida de filtración a través de una membrana (0,2 μ m). Los sistemas de microvehículo utilizados de esta manera han durado más de un mes desde el inicio, y han suministrado más de 30 litros de medio acondicionado.

45 *Purificación de DEC de *daf-4*:* Se desarrolló un protocolo de purificación para procesar grandes volúmenes de medio acondicionado (3,5 l/semana). El procedimiento implica el aislamiento inicial de DEC de *daf-4* utilizando la columna de afinidad de metal inmovilizado Talon (Pharmacia Tech.). Como la proteína DEC de *daf-4* está ligada a una secuencia hexa-His, la proteína se une a la columna de afinidad de metal y posteriormente se eluye con tampón que contiene ácido imidazoico (120 mM). Se purificaron adicionalmente las fracciones combinadas de la columna de afinidad de metal mediante cromatografía de filtración en gel en columna Sephacryl S-200, eliminando los componentes contaminantes de peso molecular muy alto. La proteína activa eluida de la columna Sephacryl se purificó mediante HPLC en fase inversa utilizando una columna C18 con un gradiente lineal de 20 a 90% de acetronitrilo y 0,075% de TFA. Es un rendimiento estimado del DEC de *daf-4* altamente purificado de cada lote de 3,5 l de medio acondicionado de aproximadamente 1,5 a 2 mg. Se analizó la preparación purificada mediante HPLC en fase inversa. El perfil cromatográfico de la preparación mostró un solo pico. Se desarrolló una técnica de transferencia de ligando novedosa para evaluar la unión de BMP-7 al DEC de *daf-4* purificado. Tras la transferencia de ligando con BMP-7 marcada con ¹²⁵I, el ligando se unió eficazmente a DEC de *daf-4* y se identificaron dos bandas de migración cercanas. El DEC de *daf-4* está fuertemente glicosilado, y las diferencias en la composición de carbohidratos de sus componentes pueden contribuir a la heterogeneidad observada de las preparaciones de DEC de *daf-4*. Además, la unión de BMP-7 marcada con ¹²⁵I a *daf-4* observada se inhibió mediante la BMP-7 no marcada en exceso, indicando el alto grado de especificidad con el que el DEC de *daf-4* se une a la BMP-7. El análisis de Scatchard de los datos cuantitativos de unión de BMP-7 indicaron que el DEC de *daf-4* contiene una sola clase de sitios de unión de alta afinidad por BMP-7, con una constante de asociación (K_a) de $2,96 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ y una capacidad de unión de 0,51 pM por 750 ng de *daf-4*.

65 *Procedimiento de ensayo de HST:* Se determinó la actividad de unión de BMP-7 mediante un ensayo en fase sólida rápido utilizando BMP-7 marcada con ¹²⁵I como ligando y DEC de *daf-4* altamente purificado como receptor de tipo II. En un ensayo típico, se disolvió $\sim 1 \mu\text{g}$ de DEC del receptor *daf-4* (R) en 20 μ l de PBSA 50 mM, pH 7,4, y se inmovilizó sobre membranas de PVDF (Immobilon-P) utilizando un aparato de transferencia en ranura (VacuSlot-VS). Un anticuerpo policlonal anti-BMP-7 inmovilizado de forma similar (Ab diluido) ha servido como control positivo,

ES 2 282 163 T3

mientras que albúmina de suero bovino (libre de globulina) y DEC de receptor no relacionado han servido como controles negativos en este ensayo. Se incuban las membranas que contienen receptor en tampón HEPES 50 mM, pH 7,4, que contiene 3% de albúmina de suero bovino (BSA) durante 14 h en frío (4°C) para bloquear el exceso de sitios de unión de proteína sobre la membrana. Se reemplaza el tampón de bloqueo por HEPES 50 mM, pH 7,4, que contiene 0,5% de BSA, MgCl₂ 10 mM y CaCl₂ 1 mM. Se incuban adicionalmente las membranas que contienen receptor con BMP-7 marcada con ¹²⁵I (~400.000 cpm/ml) en ausencia (unión total) o presencia (NSB) de BMP-7 no marcada en exceso o concentraciones crecientes de BMP-7 o péptido/molécula pequeña de ensayo durante 18 h con agitación lenta a temperatura ambiente. Finalmente, se lavan las membranas cuatro veces con tampón HEPES 50 mM, pH 7,4, que contiene MgCl₂ 5 mM y CaCl₂ 1 mM, se secan con aire y se mantienen para autorradiografía durante una noche o se puncionan para contar los segmentos de membrana que contienen muestra en un contador auto-gamma. Se calculará la concentración de agente/molécula de ensayo necesaria para proporcionar un 50% de inhibición de la unión específica total de BMP-7 marcada con ¹²⁵I (DE₅₀) a partir de datos de competición. Los resultados indicaron que tanto la BMP-7 no marcada como el péptido de BMP-7 (F2-3, SEC ID N° 9) inhibieron eficazmente (78% y 75%, respectivamente) la unión de BMP-7 marcada con ¹²⁵I al DEC del receptor *daf-4*.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un agente que modula la actividad de la proteína morfogenética ósea 7, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) combinar un ligando de receptor de proteína morfogenética ósea, un receptor de tipo II de proteína morfogenética ósea y un agente para ensayar en condiciones adecuadas para la unión del ligando al receptor, y determinar la extensión de la unión del ligando al receptor; y

(b) comparar la extensión de la unión determinada en la etapa (a) con la extensión de la unión en ausencia del agente para ensayar en condiciones adecuadas para la unión del ligando al receptor,

en el que una diferencia en la extensión de la unión determinada en la etapa (a) con la unión determinada en la etapa (b) indica que el agente modula la actividad de la proteína morfogenética ósea 7.

2. Un método según la reivindicación 1, en el que el ligando está marcado, por ejemplo, con un radioisótopo.

3. Un método según la reivindicación 1, en el que la proteína morfogenética ósea se selecciona del grupo constituido por proteína morfogenética ósea 2, proteína morfogenética ósea 4, proteína morfogenética ósea 5, proteína morfogenética ósea 6, activina y proteína morfogenética ósea 7.

4. Un método según la reivindicación 1, en el que el receptor es *daf-4*.

5. Un método para identificar un agente que modula la actividad de la proteína morfogenética ósea 7, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) combinar un ligando de receptor de proteína morfogenética ósea, el dominio extracelular de un receptor de tipo II de proteína morfogenética ósea y un agente para ensayar en condiciones adecuadas para la unión del ligando al dominio extracelular del receptor, y determinar la extensión de la unión del ligando al dominio extracelular del receptor; y

(b) comparar la extensión de la unión determinada en la etapa (a) con la extensión de la actividad en ausencia del agente para ensayar en condiciones adecuadas para la unión de la proteína morfogenética ósea al dominio extracelular del receptor,

en el que una diferencia en la extensión de la unión determinada en la etapa (a) con la unión determinada en la etapa (b) indica que el agente modula la actividad de la proteína morfogenética ósea 7.

6. Un método para identificar un agente que modula la actividad de la proteína morfogenética 7, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) combinar un ligando de receptor de proteína morfogenética ósea, el dominio extracelular del receptor *daf-4* y un agente para ensayar en condiciones adecuadas para la unión del ligando al dominio extracelular del receptor *daf-4*, y determinar la extensión de la unión del ligando al dominio extracelular del receptor *daf-4*; y

(b) comparar la extensión de la unión determinada en la etapa (a) con la extensión de la actividad en ausencia del agente para ensayar en condiciones adecuadas para la unión de la proteína morfogenética ósea al dominio extracelular del receptor *daf-4*,

en el que una diferencia en la extensión de la unión determinada en la etapa (a) con la unión determinada en la etapa (b) indica que el agente modula la actividad de la proteína morfogenética ósea 7.

7. Un método según la reivindicación 6, en el que el ligando está marcado, por ejemplo, con un radioisótopo.

8. Un método según la reivindicación 6, en el que la proteína morfogenética ósea se selecciona del grupo constituido por: proteína morfogenética ósea 2, proteína morfogenética ósea 4, proteína morfogenética ósea 5, proteína morfogenética ósea 6, activina y proteína morfogenética ósea 7.

9. Un método según la reivindicación 7, en el que el receptor comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEC N° ID 1 o SEC ID N° 2.

10. Un método para identificar un agente que modula la actividad de la proteína morfogenética ósea 7 que comprende:

(a) combinar proteína morfogenética ósea 7 radiomarcada, el dominio extracelular de *daf-4* y un agente de ensayo en condiciones adecuadas para la unión de la proteína morfogenética al dominio extracelular de *daf-4*, y determinar la extensión de la unión de la proteína morfogenética ósea 7 al dominio extracelular de *daf-4*; y

ES 2 282 163 T3

(b) comparar la extensión de la unión determinada en (a) con la extensión de la unión en ausencia del agente de ensayo en condiciones adecuadas para la unión de la proteína morfogenética ósea al dominio extracelular del receptor *daf-4*;

5 en el que una diferencia en la extensión de la unión en (a) con la unión determinada en (b) indica que el agente modula la actividad de la proteína morfogenética ósea 7.

11. Un método de la reivindicación 10, en el que el dominio extracelular tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 1 ó 2.

10 12. Un método de la reivindicación 10, en el que el dominio extracelular está inmovilizado sobre un soporte sólido o membrana de PVDF.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

SEC ID N° 1

MNQKGTVRLKALVLI~~CLPLFLIATPVPVAVT~~ EDDRQD
RIESEAAEKEWANTLVSKVAQSN~~GTGTIKVSAPAKPTLRR~~
MDNEEDEVISIECVYYDEMECEKSGDCEITKKTCYSE~~AHL~~
KAVGCLAVFGLPTQ~~REINSTEPYLKVDKPOYKSLGCM~~PYQH
ADSMNCENESSCRQGRSFRGGIGMCCCSTNNC~~NMPDLIEM~~
VNPSLKKDSDNSALLWASTP~~SNMDLES~~LDK SSSRASQPEL
APEDPEDVEHHHHH

SEC ID N° 2

RIESEAAEKEWANTLVSKVAQSN~~GTGTIKVSAPAKPTLRR~~ EDDRQD
MDNEEDEVISIECVYYDEMECEKSGDCEITKKTCYSE~~AHL~~
KAVGCLAVFGLPTQ~~REINSTEPYLKVDKPOYKSLGCM~~PYQH
ADSMNCENESSCRQGRSFRGGIGMCCCSTNNC~~NMPDLIEM~~
VNPSLKKDSDNSALLWASTP~~SNMDLES~~LDK

FIGURA 1

ES 2 282 163 T3

Péptido	Compite con BMP-7 μM	Péptido solo		Péptido y BMP-7 1,3 nM	
		CI ₅₀ de antagonista μM	CE ₅₀ de agonista μM	CI ₅₀ de inhibición de BMP-7 μM	CD ₅₀ de estimu- lación de BMP- 7 μM
F1-1	ND	100	-	20	-
F1-2	180	60	-	10	-
H-1	ND	100	-	200 ⁺	-
H-2N	-	-	-	-	-
H-2C	8*	70	-	5	-
F2-1	ND	40	-	8	-
F2-2	1	-	60	-	0,6
F2-2c	-	-	-	-	-
F2-3	10	-	-	-	0,01

Actividades de péptido. * concentración a la que se potenciaba la unión de BMP-7. + menor concentración a la que se potenciaba la reactividad celular ante BMP-7

FIGURA 2

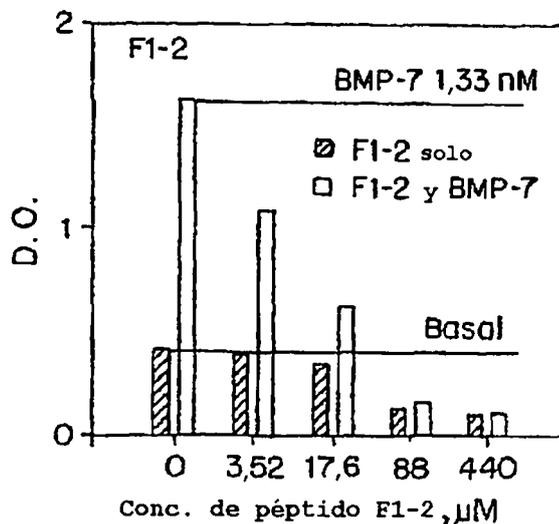


FIG. 3

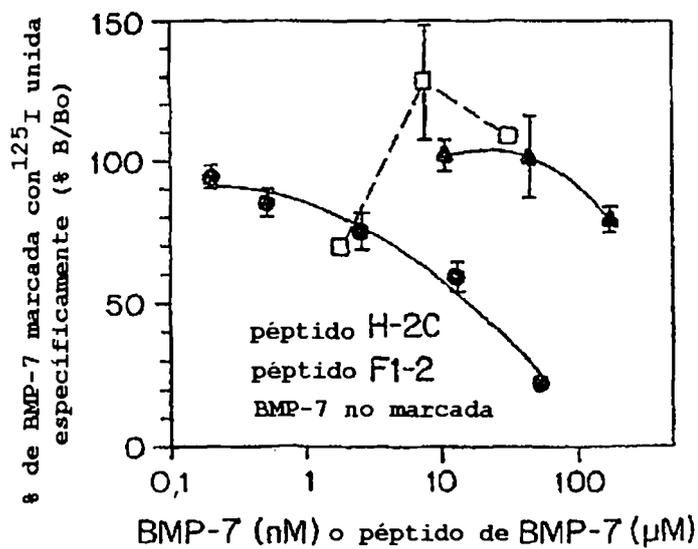


FIG 4

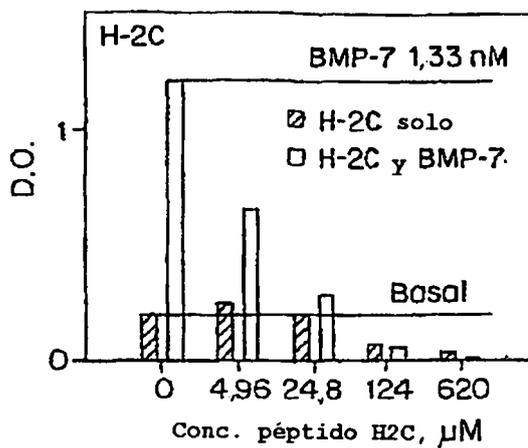


FIG. 5

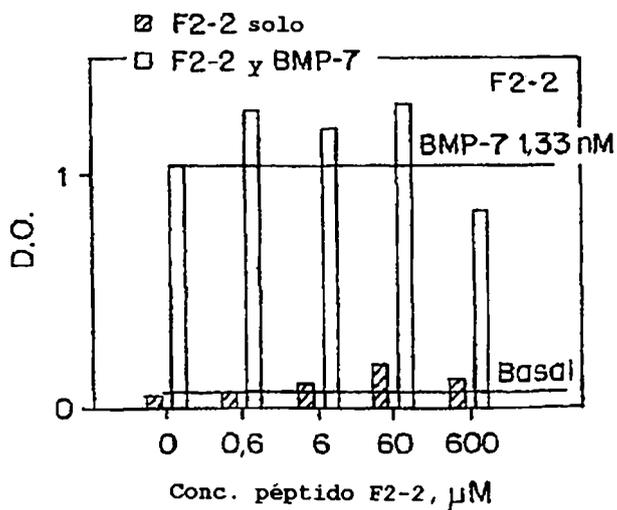


FIG. 6

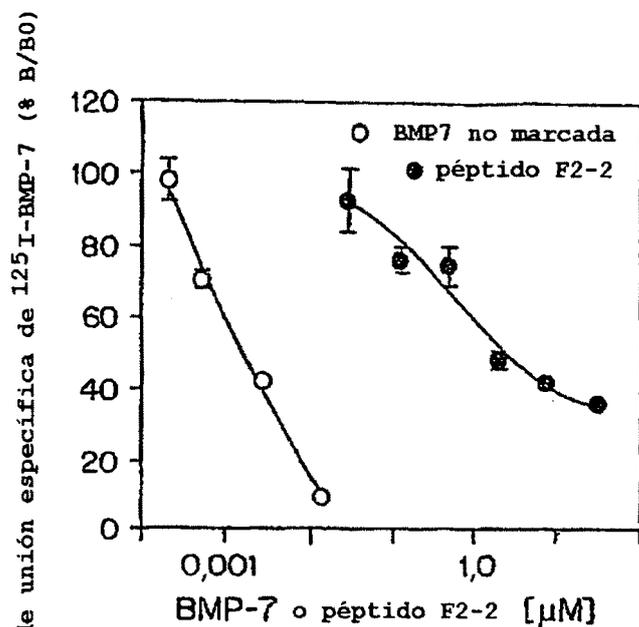


FIG. 7

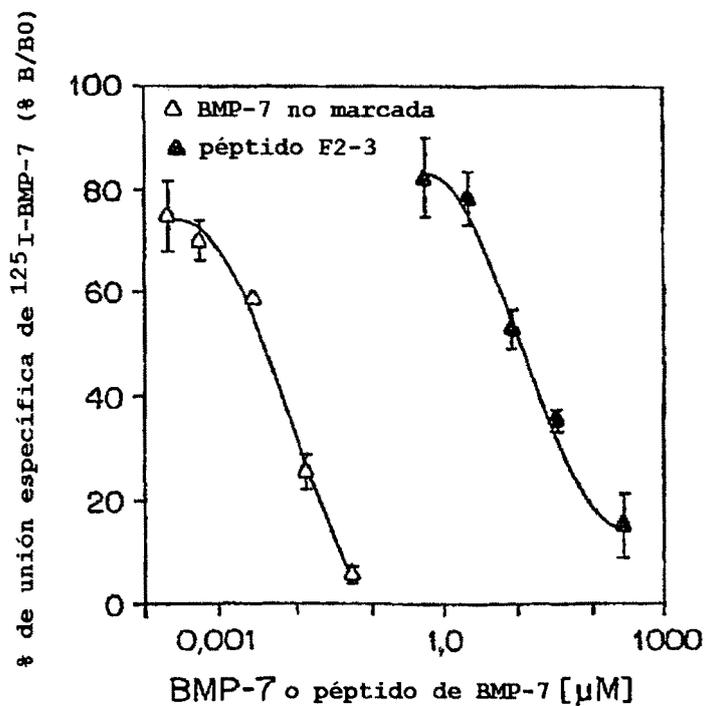


FIG. 8

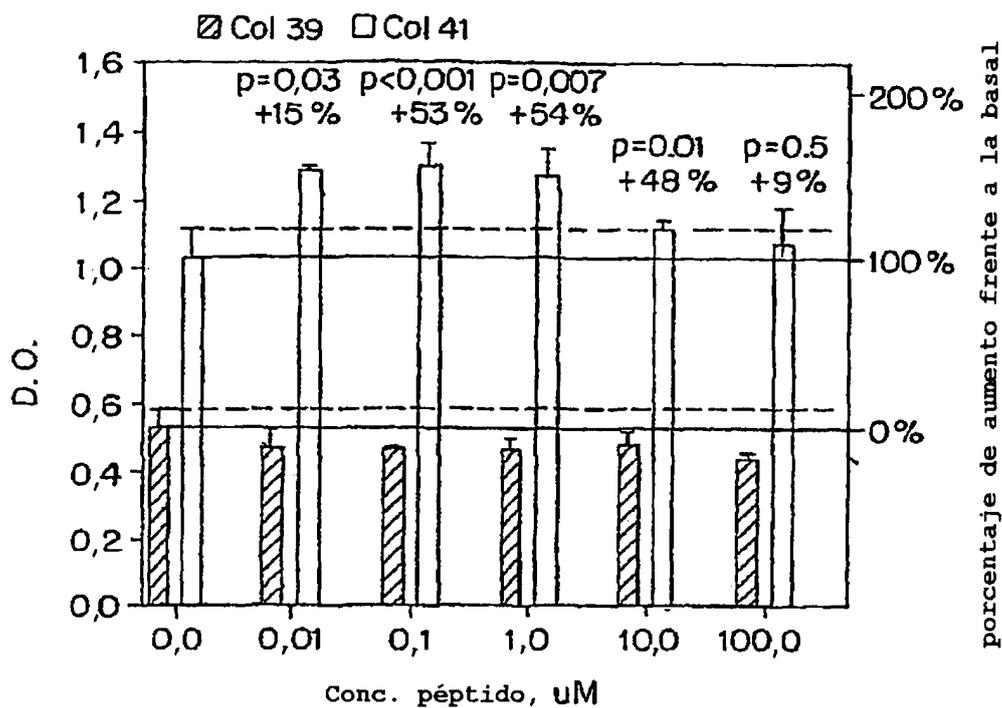


FIG. 9

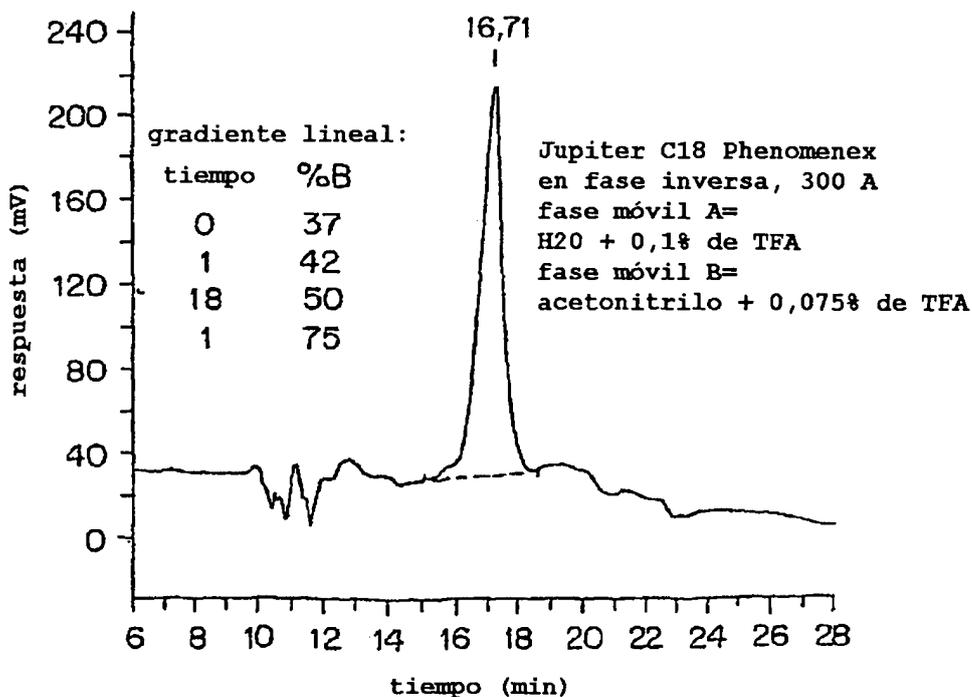


FIG. 10

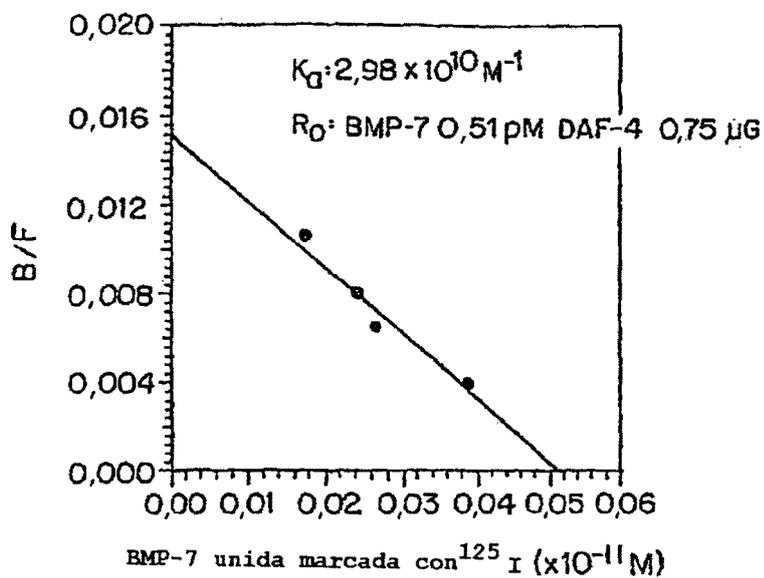


FIG. 11

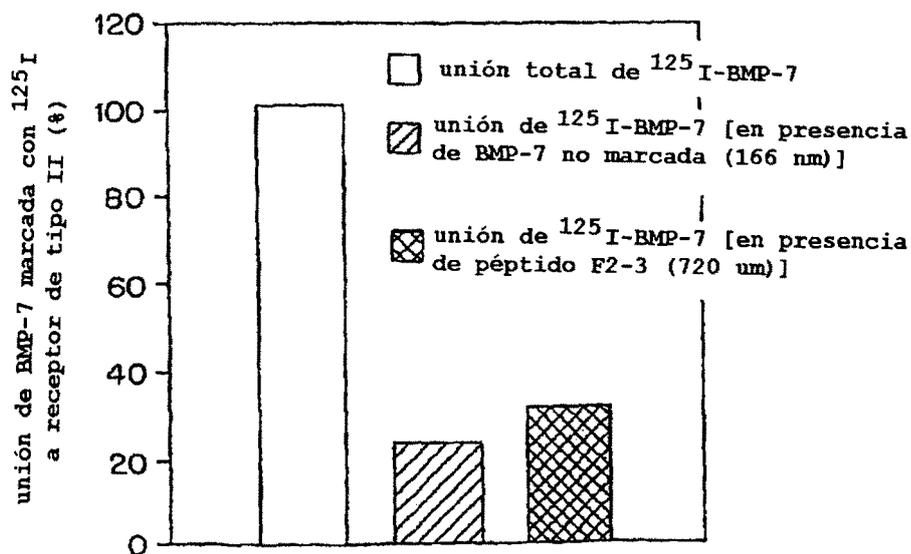


FIG. 12