

USO TERAPEUTICO DI PROTEINE MORFOGENETICHE OSSEE

RIASSUNTO

L'invenzione riguarda un polipeptide, scelto tra proteina morfogenetica ossea 10 (BMP-10) o una variante della proteina morfogenetica ossea 9 (BMP9) priva di attività osteogenetica, per l'uso nella cura di una malattia vascolare o di una malattia respiratoria. L'invenzione riguarda anche nuove varianti di BMP9 e composizioni farmacologiche che comprendono detti polipeptidi.

DESCRIZIONE

SETTORE DELL'INVENZIONE

L'invenzione riguarda un polipeptide che è una variante della proteina morfogenetica ossea 9 (BMP9), priva di attività osteogenetica, per l'uso nella cura di una malattia vascolare o di una malattia respiratoria. L'invenzione riguarda anche nuove varianti di BMP9 e composizioni farmacologiche che comprendono detti polipeptidi.

AMBITO DELL'INVENZIONE

La malattia vascolare è uno stato patologico delle arterie muscolari di grandi e medie dimensioni e viene innescata da una disfunzione delle cellule endoteliali. A causa di fattori, quali agenti patogeni, particelle di LDL ossidate e altri stimoli infiammatori, le cellule endoteliali si attivano. Ciò porta a cambiamenti nelle loro caratteristiche: le cellule endoteliali iniziano a espellere citochine e chemochine e ad esprimere molecole di adesione sulla loro superficie. Questo provoca, a sua volta, il reclutamento di globuli bianchi (monociti e linfociti) che possono infiltrarsi nella parete dei vasi sanguigni. La stimolazione dello strato di cellule muscolari lisce con le citochine prodotte dalle cellule endoteliali e dai globuli bianchi reclutati provoca la proliferazione



e la migrazione delle cellule muscolari lisce verso il lume dei vasi sanguigni. Questo processo provoca l'ispessimento della parete del vaso, formando una placca, costituita da cellule muscolari lisce, macrofagi e vari tipi di linfociti proliferanti. Questa placca causa un flusso sanguigno ostruito che determina una diminuzione della quantità di ossigeno e sostanze nutritive che raggiunge l'organo bersaglio. Nelle fasi finali, la placca può anche rompersi, causando la formazione di coaguli e, di conseguenza, un ictus.

Malattia respiratoria è un termine medico che comprende condizioni patologiche che interessano gli organi e i tessuti che rendono possibile lo scambio di gas negli organismi superiori, e comprende condizioni del tratto respiratorio superiore, trachea, bronchi, bronchioli, alveoli, pleura e cavità pleurica, e di nervi e muscoli della respirazione. Le malattie respiratorie vanno da lievi e auto-limitanti, come il comune raffreddore, a entità potenzialmente letali, quali polmonite batterica, embolia polmonare e cancro ai polmoni.

L'ipertensione arteriosa polmonare (PAH) è una malattia vascolare rara, per la quale attualmente non esiste una cura. L'ipertensione arteriosa polmonare (PAH) ereditaria e idiopatica sono caratterizzate da restringimento e dell'obliterazione delle arterie polmonari precapillari, secondari alla proliferazione e alla resistenza all'apoptosi delle cellule muscolari lisce, dei fibroblasti e delle cellule endoteliali (Morrell *et al.* (2009) *J Am Coll Cardiol* 54, S20-31). Il conseguente aumento della resistenza vascolare polmonare provoca un grave aumento della pressione arteriosa polmonare, determinando l'ipertrofia ventricolare destra e, infine la morte per insufficienza cardiaca destra (Gaine e Rubin (1998) *Lancet* 352, 719-725).

Nel 2000, l'identificazione delle mutazioni germinali eterozigoti nel gene che codifica per il recettore della proteina morfogenetica ossea di tipo II (BMPRII) (Lane *et al.* *Nat Genet* 26, 81-84 (2000); Deng *et al.* (2000) *Am J Hum Genet* 67, 737-744) ha fornito importanti spunti sulla patobiologia della PAH ereditaria. Studi successivi hanno identificato anche delle mutazioni di BMPRII nel 15-40% dei casi di PAH idiopatica (Thomson *et al.* (2000) *J Med Genet* 37, 741-745),

nonché un'espressione ridotta di BMPR-II come caratteristiche di forme non genetiche di PAH in esseri umani (Atkinson *et al.* (2002) *Circulation* 105, 1672-1678) e in modelli animali (Long *et al.* (2009) *Circulation* 119, 566-576).

L'evidenza genetica coinvolge anche fortemente la cellula endoteliale come tipo di cellula chiave di avvio nella PAH. Studi precedenti hanno dimostrato che la delezione condizionale di BMPR-II nell'endotelio è sufficiente ad indurre la PAH in una proporzione di topi (Hong *et al.* (2008) *Circulation* 118, 722-730) e che il recupero della segnalazione endoteliale di BMPR-II nei modelli di roditori impedisce o fa regredire l'ipertensione polmonare sperimentale (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). Più recentemente, è stato dimostrato che il potenziamento selettivo di BMPR-II endoteliale con BMP9 fa regredire l'ipertensione arteriosa polmonare (Long *et al.* (2015) *Nature Medicine* 21, 777-785). Inoltre, sono state ad oggi riportate mutazioni nel recettore di tipo I, ALK-1 (Trembath *et al.* (2001) *N Engl J Med* 345, 325-334) e nella proteina accessoria del recettore di tipo III, endogлина (Harrison *et al.* (2003) *J Med Genet* 40, 865-871), in pazienti con PAH, entrambi i quali sono espressi quasi esclusivamente sull'endotelio. Nonostante questa prova, la natura precisa della disfunzione endoteliale nella patobiologia della PAH e il coinvolgimento della segnalazione BMP in questo processo rimangono punti controversi. Sebbene la PAH consolidata sia caratterizzata dall'eccessiva proliferazione clonale di cellule endoteliali polmonari (Yeager *et al.* (2001) *Circ Res* 88, E2-E11) come componente di lesioni cellulari ostruttive, l'avvio della patologia della malattia sia negli esseri umani (Teichert-Kuliszewska *et al.* (2006) *Circ Res* 98, 209-217) che nei modelli animali di malattia (Wilson *et al.* (1992) *Crit Rev Toxicol* 22, 307-325; Taraseviciene-Stewart *et al.* (2001) *Faseb J* 15, 427-438) è stato collegato a un aumento paradossale di apoptosi delle cellule endoteliali. Ulteriori studi hanno identificato un ruolo per la perdita di BMPR-II endoteliale nell'esacerbazione della permeabilità vascolare e nella traslocazione alterata dei leucociti



attraverso la parete vascolare (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).

Sebbene studi *in vitro* usando cellule muscolari lisce dell'arteria polmonare (PASMC) abbiano dimostrato che concentrazioni crescenti di legante di BMP possono superare la perdita di funzione associata alle mutazioni nella via di segnalazione di BMP (Yang *et al.* (2008) Circ Res 102, 1212-1221), ad oggi nessuno studio ha somministrato terapeuticamente un legante di BMP *in vivo* per fornire una prova di fattibilità per una tale metodologia nella cura della PAH. La complessità della famiglia di segnalazione delle BMP, che comprende quattro recettori di tipo II, cinque recettori di tipo I e oltre venti leganti di BMP (Miyazono *et al.* (2005) Cytokine Growth Factor Rev 16, 251-263), può spiegare l'assenza di tali studi. Identificare un legante appropriato per bersagliare selettivamente l'endotelio polmonare rappresenta una sfida non indifferente. Recentemente, è stato scoperto che BMPRII forma un complesso di segnalazione con ALK-1 e segnala specificamente in risposta a BMP9 e 10 nelle cellule endoteliali microvascolari (David *et al.* (2007) Blood 109, 1953-1961).

WO 2005/113 590 descrive l'uso di antagonisti di BMP10 per la cura di disturbi cardiaci. WO 2013/152213 descrive l'uso dei polipeptidi BMP9 e/o BMP10 per aumentare i livelli di globuli rossi e/o di emoglobina nei vertebrati. WO 2006/130022 descrive un agonista o antagonista di BMPRII, utile nella modulazione della follicologenesi e del tasso di ovulazione nei mammiferi femminili. WO 2010/114833 descrive composizioni farmacologiche comprendenti una proteina morfogenetica ossea per curare malattie cardiache. WO 94/26893 descrive le proteine BMP-10, i processi per produrle e il loro uso nella cura di difetti ossei e cartilaginei e nella guarigione di ferite e relativa riparazione di tessuti. WO 95/24474 e WO 96/39431 descrivono il polipeptide BMP-10 umano e il DNA (RNA) che codifica per tale polipeptide, che si ritiene siano utili nell'indurre la formazione ossea *de novo*. WO 93/00 432 e WO 95/33 830 descrivono le proteine BMP-9, i processi per produrle e il loro uso nella cura di difetti ossei e cartilaginei, nella guarigione delle



ferite e nella riparazione dei relativi tessuti e nella crescita e funzione epatica. WO 2010/115 874 descrive metodi per curare l'ipertensione arteriosa polmonare, somministrando farmaci che bersagliano apelin/APJ. WO 2009/114 180 e WO 2014/160 203 descrivono inibitori a molecole piccole di segnalazione di BMP che si afferma siano utili in modulazione della crescita, differenziazione, proliferazione e apoptosi cellulare e che quindi possono essere utili per la cura di malattie o condizioni associate alla segnalazione di BMP, tra cui infiammazione, malattia cardiovascolare, malattia ematologica, cancro e disturbi ossei, nonché per modulare la differenziazione e/o proliferazione cellulare. Si ritiene che gli inibitori a molecole piccole siano inoltre utili per ridurre i livelli circolanti di ApoB-100 o LDL e nella cura o nella prevenzione di ipercolesterolemia o iperlipoproteinemia acquisite o congenite; malattie, disturbi o sindromi associate a difetti nell'assorbimento lipidico o nel metabolismo; o malattie, disturbi o sindromi causate da iperlipidemia.

Vi è pertanto la necessità di fornire una cura efficace per le malattie vascolari e respiratorie, in particolare per l'ipertensione arteriosa polmonare (PAH).

DESCRIZIONE SOMMARIA DELL'INVENZIONE

Secondo un primo aspetto dell'invenzione, viene fornito un polipeptide, scelto tra una variante della proteina morfogenetica ossea 9 (BMP9), priva di attività osteogenetica e una forma di BMP9 legata a prodominio (pro.BMP9), per l'uso nella cura di una malattia vascolare o di una malattia respiratoria.

Ulteriori aspetti e caratteristiche dell'invenzione sono indicati nelle rivendicazioni allegate e descritti più avanti.

Secondo un ulteriore aspetto dell'invenzione, viene fornita una variante di BMP9, con la sequenza amminoacidica dell'ID SEQ n. 5.

Secondo un ulteriore aspetto dell'invenzione, viene fornita una variante di BMP9, con la sequenza amminoacidica dell'ID SEQ n. 6.



Secondo un ulteriore aspetto dell'invenzione, viene fornita una composizione farmacologica comprendente le varianti di BMP9 come qui definita.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

Figura 1. Vettore di espressione e sistema per pro.BMP9 e pro.BMP10.

Figura 2. Generazione di varianti non osteogenetiche di BMP9. A. Disegno schematico della sintesi di BMP9 e della lavorazione post-traslazionale. B-D. Due varianti di BMP9 (D366A e D408A) hanno un'attività di segnalazione confrontabile con il tipo selvatico nell'indurre l'espressione di ID1 e ID2 (B&C) nelle cellule endoteliali, ma sono prive di attività di segnalazione osteogenetica nelle cellule C2C12 (D).

Figura 3. Confronto dell'attività di segnalazione delle cellule endoteliali e dell'attività osteogenetica delle cellule C2C12 tra BMP9 e BMP10. A-C: BMP9 e BMP10 hanno attività di segnalazione. HMEC-1 simile. Dopo la privazione di siero, le cellule HMEC-1 vennero trattate con BMP9 o BMP10 alle concentrazioni indicate. 8 ore dopo il trattamento, è stato estratto l'mRNA e sono stati misurati i livelli di espressione di ID1, ID2 o BMPR-II mediante PCR quantitativa. È stata utilizzata β 2-microglobulina come controllo e sono stati tracciati i fold change relativi ai campioni non trattati. Viene mostrato il valore medio \pm SEM, N = 2; D. Similmente a BMP9, anche BMP10 può proteggere le hPAEC dall'apoptosi indotta da $\text{TNF}\alpha$ -CHX. I metodi sono come in Fig. 3A, N = 1; E. BMP9 e BMP10 inibiscono in misura simile la proliferazione delle cellule endoteliali. Le HPAEC sono state trattate con BMP9 o BMP10 (entrambi R&D Systems) in EBM2/FBS 2% per 24 ore. Le cellule sono state incubate con ^3H -timidina 0,5 μCi /pozzetto per le ultime 6 ore. Le cellule sono state poi lisate ed è stato misurato l'assorbimento di ^3H -timidina mediante conteggio a scintillazione liquida. esperimento N = 1, media \pm SEM di 4 pozzetti. F. A differenza di BMP9, BMP10 non ha attività osteogenetica rivelabile, misurata come attività di ALP nelle cellule C2C12. Le cellule C2C12 sono state trattate con BMP9 o BMP10 alle concentrazioni indicate per 64 ore. Le cellule sono state lisate con Triton X-100/PBS 1% ed è stata misurata l'attività di ALP nel lisato



cellulare, usando il sale disodico di 4-nitrofenil fosfato su substrato cromogenico di fosfatasi (Sigma, S0942) ed è stato misurato il prodotto solubile a 405 nm su un lettore di piastre. In tutti i saggi, sia BMP9 che BMP10 sono stati acquistati da R&D Systems. Pro.BMP9 è stata prodotta internamente e la sua concentrazione (legante maturo) è stata determinata mediante ELISA, utilizzando BMP9 della R&D Systems come riferimento.

Figura 4. Pro.BMP10 generata internamente è completamente attiva. A. Disegno schematico della sintesi di BMP10 e della lavorazione post-traduzionale. B. BMP10 che esprime un mezzo condizionato, tracciato mediante anticorpo anti-BMP10 (R&D Systems). C. SDS-PAGE non riducente che mostra la purificazione di pro.BMP10 da una colonna di filtrazione su gel S200. Le identità di prodominio e BMP10 sono state verificate mediante immunofissazione e mappatura dei peptidi con specifiche di massa. D e E. Confronto della capacità di segnalazione di pro.BMP10 con BMP9 e BMP10 (della R&D Systems) in HMEC-1, seguendo la fosforilazione di Smad1/5/8 e l'espressione genica di ID1/2/3. I metodi sono come nelle Figg. da 3A fino a C. Le concentrazioni di BMP in D. sono 0,05, 0,1, 1, 5 ng/ml e il tempo di trattamento è 1 ora. Viene mostrata la media \pm SEM, N = 2.

Figura 5. Riassunto di mutagenesi di scansione in alanina di BMP9. Sono state generate ventiquattro varianti di BMP9 e sono state sottoposte a prova sia in cellule HMEC-1 per l'induzione di gene ID1 che in cellule C2C12 per l'attività della fosfatasi alcalina. Tutti i risultati sono stati normalizzati a BMP9 di tipo selvatico (WT) e vengono mostrate le medie di tre esperimenti. '-' indica cellule non trattate.

Figura 6. Le varianti di BMP possono indurre l'espressione genica di BMPR2 in hPAEC.

Figura 7. La variante di BMP D408A può recuperare l'apoptosi iniziale indotta da TNF α /CHX nelle hPAEC.

Figura 8. BMP9 e BMP10 inibiscono la formazione in provetta di cellule endoteliali vascolari periferiche (BOEC) in una matrice di collagene:fibronectina. (A) Immagini rappresentative delle



provette di BOEC in gel di collagene, colorate con DAPI e FITC-ULEX. Le reti si formano nel mezzo da solo (BBM2 2% = EBM2 contenente FBS il 2%). L'aggiunta di concentrazioni crescenti di BMP9 inibisce la formazione di reti di BOEC. (B) Quantificazione dei parametri delle reti di BOEC determinati per 3 esperimenti separati che dimostrano che BMP9 inibisce in provetta la lunghezza e il numero, la ramificazione e la formazione di anse in modo dipendente dalla concentrazione. (C) BMP9 e BMP10 di entrambi i quali i leganti inibiscono la formazione di BOEC in provetta.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Secondo un primo aspetto dell'invenzione, viene fornito un polipeptide, scelto tra una variante della proteina morfogenetica ossea 9 (BMP9) priva di attività osteogenetica e una forma di BMP9 legata a prodominio (pro.BMP9), per l'uso nella cura di una malattia vascolare o malattia respiratoria.

La presente descrizione è rivolta all'uso terapeutico di proteine morfogenetiche ossee che mantengono l'attività di segnalazione delle cellule endoteliali (p.es., come può essere testimoniato dall'induzione dell'espressione genica di ID1, ID2 e/o BMPR-II), ma che sono prive di attività osteogenetica (p.es. come si può misurare mediante l'attività della fosfatasi alcalina (ALP) nella linea cellulare di mioblasti di topo C2C12). Ad esempio, le varianti di BMP10 e BMP9 qui descritte non solo mantengono l'attività di segnalazione delle cellule endoteliali, ma sono sinergicamente prive di attività osteogenetica. Pertanto, le BMP10 native e le varianti di BMP9 qui descritte rappresentano un agonista più desiderabile rispetto alle BMP9 native per curare una malattia vascolare o una malattia respiratoria, in particolare PAH, in virtù della mancanza di capacità di promozione della formazione ossea.

I riferimenti nel presente documento a "BMP10" e "proteina morfogenetica ossea 10" si riferiscono a un polipeptide umano, appartenente alla superfamiglia TGF- β di proteine, codificata dal gene *BMP10* (avente la sequenza mostrata nell'ID SEQ n. 1) e che ha la sequenza da 424 amminoacidi mostrata nell'ID SEQ n. 2 in cui i residui di amminoacidi da 1 a 21 comprendono il



peptide segnale, i residui di amminoacidi da 22 a 316 comprendono il propeptide e i residui di amminoacidi da 317 a 424 comprendono la BMP10 matura.

I riferimenti nel presente documento a "una variante di BMP9" e "variante della proteina morfogenetica ossea 9" si riferiscono a un polipeptide umano, appartenente alla superfamiglia TGF- β di proteine, codificata dal gene *BMP9* (avente la sequenza mostrata nell'ID SEQ n. 3) e che ha una variante della sequenza da 429 amminoacidi mostrata nell'ID SEQ n. 4, in cui i residui di amminoacidi da 1 a 22 comprendono il peptide segnale, i residui di amminoacidi da 23 a 319 comprendono il propeptide e i residui di amminoacidi da 320 a 429 comprendono la BMP9 matura. A scanso di equivoci, va sottolineato che tale variante di BMP9 deve mantenere l'attività di segnalazione delle cellule endoteliali, ma è priva di attività osteogenetica.

I riferimenti a "variante" comprendono una variazione genetica nella sequenza nativa, non mutante o di tipo selvatico di BMP9. Esempi di tali variazioni genetiche comprendono mutazioni scelte tra: sostituzioni, delezioni, inserzioni e simili.

I riferimenti a "mancanza di attività osteogenetica" o "è priva di attività osteogenetica", nel senso qui utilizzato, si riferiscono a una variante di BMP9, comprendente una o più mutazioni della sequenza dell'ID SEQ n. 4 che si traducono in eliminazione, minimizzazione e/o soppressione dell'attività osteogenetica (p.es. che può essere misurata mediante l'attività della fosfatasi alcalina (ALP) nella linea cellulare di mioblasti di topo C2C12). Varianti di BMP9 vantaggiose saranno quelle che mantengono la segnalazione endoteliale specifica (ossia quelle che hanno un'induzione di ID1 di almeno 0,75 volte quella della BMP9 di tipo selvatico, misurata mediante espressione genica di ID1 in cellule HMEC-1) e che hanno un valore inferiore di attività osteogenetica (ossia meno di 0,5 volte quella della BMP9 di tipo selvatico, misurata mediante l'attività di ALP nella linea cellulare di mioblasti di topo C2C12).

Saranno più desiderabili le varianti di BMP9 che mantengono la segnalazione endoteliale specifica (ossia quelle che hanno un'induzione di ID1 di almeno 0,75 volte quella della BMP9 di



tipo selvatico, misurata mediante l'espressione genica di ID1 in cellule HMEC-1) e un'attività osteogenetica trascurabile (ossia meno di 0,1 volte quella della BMP9 di tipo selvatico, misurata mediante l'attività di ALP nella linea cellulare di mioblasti di topo C2C12).

Le varianti di BMP9 più desiderabili saranno quelle che hanno una segnalazione endoteliale specifica aumentata (ossia quelle che hanno livelli più elevati di induzione di ID1 rispetto alla BMP9 di tipo selvatico, misurata mediante l'espressione genica di ID1 in cellule HMEC-1) e un'attività osteogenetica trascurabile (ossia meno di 0,1 volte quella della BMP9 di tipo selvatico, misurata mediante l'attività di ALP nella linea cellulare di mioblasti di topo C2C12).

In una forma di esecuzione, la malattia vascolare è scelta tra: ipertensione polmonare; ipertensione arteriosa polmonare; teleangectasia emorragica ereditaria; aterosclerosi; e sindrome epatopolmonare.

In un'ulteriore forma di esecuzione, la malattia vascolare è scelta tra: ipertensione polmonare; ipertensione arteriosa polmonare; teleangectasia emorragica ereditaria; e sindrome epatopolmonare.

In un'ulteriore forma di esecuzione, la malattia vascolare è scelta tra ipertensione arteriosa polmonare.

In una forma di esecuzione, la malattia respiratoria è scelta tra: malattie polmonari ostruttive quali broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), bronchite cronica ed enfisema; malattie vascolari polmonari quali edema polmonare ed emorragia polmonare; insufficienza respiratoria e sindrome da stress respiratorio, quali danno polmonare acuto e sindrome da stress respiratorio acuto; e malattie polmonari interstiziali, quali fibrosi polmonare idiopatica.

In questa descrizione, il polipeptide può essere BMP10. Questa descrizione fornisce BMP10 per l'uso nella cura di una malattia vascolare o di una malattia respiratoria. Vengono qui forniti dati che dimostrano che BMP10 è potente quanto BMP9 nell'indurre l'espressione genica di ID1, ID2 e BMPRII (v. Figg. da 3A a 3C). Inoltre, è stato qui dimostrato che BMP10 mostra la stessa



attività anti-apoptotica di BMP9 nel proteggere le hPAEC dall'apoptosi indotta da $TNF\alpha$ -CHX (v. Fig. 3D). Soprattutto, tuttavia, BMP10 non ha indotto alcuna attività di ALP alla massima concentrazione provata (v. Fig. 3F), a differenza di BMP9.

BMP10 può comprendere la sequenza amminoacidica dell'ID SEQ n. 2.

Il polipeptide di questa descrizione può essere BMP10 codificato dalla sequenza nucleotidica dell'ID SEQ n. 1.

Il polipeptide di questa descrizione può essere la forma di BMP10 legata a prodominio (pro.BMP10). Vengono qui forniti dati che mostrano che il complesso pro.BMP10 è molto stabile (v. Figg. 4B e 4C) ed è probabilmente la forma preferita per la cura di malattie vascolari e respiratorie, quali la PAH.

La pro.BMP10 di questa descrizione può comprendere una sequenza di propeptidi, avente la sequenza amminoacidica dei residui 22-316 dell'ID SEQ n. 2, legata in modo non covalente ad una sequenza di BMP10 matura, avente la sequenza amminoacidica dei residui 317-424 dell'ID SEQ n. 2.

La pro.BMP10 di questa descrizione può comprendere un tetramero che contiene due di dette sequenze di propeptidi e due di dette sequenze di BMP10 matura.

In una forma di esecuzione, il polipeptide è una variante di BMP9 priva di attività osteogenetica. Pertanto, secondo un ulteriore aspetto dell'invenzione, viene fornita una variante di BMP9 priva di attività osteogenetica, per l'uso nella cura di una malattia vascolare o respiratoria.

In un'ulteriore forma di esecuzione, il polipeptide è una variante della forma di BMP9 legata a prodominio (pro.BMP9).

In un'ulteriore forma di esecuzione, la variante di pro.BMP9 comprende una variante de: la sequenza di propeptidi avente la sequenza amminoacidica dei residui 23-319 dell'ID SEQ n. 4, legata in modo non covalente ad una sequenza di BMP9 matura, avente la sequenza amminoacidica dei residui 320-429 dell'ID SEQ n. 4.



In un'ulteriore forma di esecuzione, la variante di pro.BMP9 comprende un tetramero che contiene due di dette sequenze di propeptidi e due di dette sequenze di BMP9 matura.

In una forma di esecuzione, la variante di BMP9 priva di attività osteogenetica comprende un mutante di sostituzione, delezione o inserzione della sequenza amminoacidica dell'ID SEQ n. 4.

In un'ulteriore forma di esecuzione, la variante di BMP9 priva di attività osteogenetica comprende un mutante di sostituzione della sequenza amminoacidica dell'ID SEQ n. 4.

In un'ulteriore forma di esecuzione, il mutante di sostituzione della sequenza amminoacidica dell'ID SEQ n. 4 comprende una o più (ossia mutanti singoli, doppi, tripli, ecc.) delle seguenti sostituzioni: H326A, D342A, S343A, W344A, I346A, K349A, F362A, D366A, K372A, I375A, L379A, H381A, L382A, K383A, K390A, S402A, L404A, K406A, D408A, V411A, T413A, L414A, Y416A e Y416A.

In un'ulteriore forma di esecuzione, la variante di BMP9 priva di attività osteogenetica è scelta tra una delle seguenti varianti di BMP9 dell'ID SEQ n. 4: H326A, D342A, S343A, W344A, I346A, K349A, F362A, D366A, K372A, I375A, L379A, H381A, L382A, K383A, K390A, S402A, L404A, K406A, D408A, V411A, T413A, L414A, Y416A e Y418A.

In un'ulteriore forma di esecuzione, il mutante di sostituzione della sequenza amminoacidica dell'ID SEQ n. 4 comprende una o più (ossia mutanti singoli, doppi, tripli, ecc.) delle seguenti sostituzioni: H326A, S343A, K349A, F362A, D366A, I375A, L379A, L382A, K390A, S402A, D408A, Y416A e Y418A.

In un'ulteriore forma di esecuzione, la variante di BMP9 priva di attività osteogenetica è scelta tra una delle seguenti varianti di BMP9 dell'ID SEQ n. 4: H326A, S343A, K349A, F362A, D366A, I375A, L379A, L382A, K390A, S402A, D408A, Y416A e Y418A. Vengono qui forniti dati che dimostrano che queste sequenze mutanti mantengono l'effetto benefico della segnalazione endoteliale specifica e hanno una segnalazione osteogenetica notevolmente ridotta (come



testimoniato da un'induzione di ID1 di almeno 0,75 volte e un'attività di ALP di meno di 0,5 volte, quella della BMP9 di tipo selvatico in Fig. 5).

In un'ulteriore forma di esecuzione, il mutante di sostituzione della sequenza amminoacidica dell'ID SEQ n. 4 comprende una o più (ossia mutanti singoli, doppi, tripli, ecc.) delle seguenti sostituzioni: F362A, D366A, I375A, L379A, S402A, D408A, Y416A e Y418A.

In un'ulteriore forma di esecuzione, la variante di BMP9 priva di attività osteogenetica è scelta tra una delle seguenti varianti di BMP9 dell'ID SEQ n. 4: F362A, D366A, I375A, L379A, S402A, D408A, Y416A e Y418A. Vengono qui forniti dati che dimostrano che queste sequenze mutanti mantengono l'effetto benefico della segnalazione endoteliale specifica, ma sono prive di segnalazione osteogenetica (come testimoniato da un'induzione di ID1 di almeno 0,75 volte quella della BMP9 di tipo selvatico in Fig. 5, e un'attività di ALP trascurabile (ossia meno di 0,1 volte))

In un'ulteriore forma di esecuzione, il mutante di sostituzione della sequenza amminoacidica dell'ID SEQ n. 4 comprende una o entrambe (ossia un mutante singolo o doppio) le seguenti sostituzioni: D366A o D408A.

In un'ulteriore forma di esecuzione, la variante di BMP9 priva di attività osteogenetica è scelta tra una delle seguenti varianti di BMP9 dell'ID SEQ n. 4: D366A o D408A. Vengono qui forniti dati che dimostrano che queste sequenze mutanti mantengono l'effetto benefico di BMP9, ma non sono in grado di avviare la segnalazione osteogenetica e quindi rimuovono il potenziale rischio di formazione ossea mediante somministrazione di BMP9 *in vivo* (v. i risultati mostrati in Fig. 2). Vengono qui forniti anche dati che dimostrano che queste sequenze mutanti hanno una segnalazione endoteliale specifica aumentata, ma sono prive di segnalazione osteogenetica (come testimoniato da un'induzione di ID1 di più di 1 volta quella della BMP9 di tipo selvatico in Fig. 5, e un'attività di ALP trascurabile (ossia inferiore a 0,1 volte)).

In un'ulteriore forma di esecuzione, la variante di BMP9 priva di attività osteogenetica è scelta tra una variante D408A di BMP9 dell'ID SEQ n. 4. Vengono qui forniti dati che dimostrano



che questa sequenza mutante ha dimostrato di essere in grado di recuperare l'apoptosi iniziale di PAEC indotta da fattore di necrosi tumorale α (TNF α) e cicloesimide (CHX) (v. risultati mostrati in Fig. 7).

In un'ulteriore forma di esecuzione, la variante di BMP9 priva di attività osteogenetica è scelta tra una variante D366A di BMP9 che comprende la sequenza amminoacidica dell'ID SEQ n. 5 o una variante D408A di BMP9 che comprende la sequenza amminoacidica dell'ID SEQ n. 6.

Si comprenderà che le varianti di BMP9 qui descritte costituiscono polipeptidi precedentemente sconosciuti che formano quindi aspetti nuovi dell'invenzione. Pertanto, secondo un ulteriore aspetto dell'invenzione, viene fornita una variante di BMP9 comprendente la sequenza amminoacidica dell'ID SEQ n. 5. Secondo un ulteriore aspetto dell'invenzione, viene fornita una variante di BMP9, comprendente la sequenza amminoacidica dell'ID SEQ n. 6.

Sebbene sia possibile somministrare il polipeptide attivo da solo, è preferibile presentarlo come composizione farmacologica (p.es. formulazione). In una forma di esecuzione, questa è una composizione farmacologica sterile.

L'invenzione fornisce inoltre composizioni farmacologiche, come sopra definito, e metodi per realizzare una composizione farmacologica comprendendo (p.es. miscelando) almeno un polipeptide dell'invenzione, insieme a uno o più eccipienti farmacologicamente accettabili e, facoltativamente, altri agenti terapeutici o profilattici.

Pertanto, secondo un ulteriore aspetto dell'invenzione, viene fornita una composizione farmacologica, comprendente una variante di BMP9 priva di attività osteogenetica, per l'uso nella cura di una malattia vascolare o di una malattia respiratoria.

Secondo un ulteriore aspetto dell'invenzione, viene fornita una composizione farmacologica comprendente le varianti di BMP9 qui definite, quali la variante D366A di BMP9, comprendente la sequenza amminoacidica dell'ID SEQ n. 5 o la variante D408A di BMP9, comprendente la sequenza amminoacidica dell'ID SEQ n. 6.



L'eccipiente (o eccipienti) farmacologicamente accettabile può essere scelto, ad esempio, tra veicoli (p.es. un veicolo solido, liquido o semisolido), co-adiuvanti, diluenti, riempitivi o agenti di carica, agenti granulanti, agenti di rivestimento, agenti di controllo del rilascio, agenti leganti, disintegranti, agenti lubrificanti, conservanti, antiossidanti, agenti tampone, agenti di sospensione, addensanti, agenti aromatizzanti, dolcificanti, agenti mascheranti il gusto, stabilizzanti o qualsiasi altro eccipiente, utilizzato convenzionalmente nelle composizioni farmacologiche. Esempi di eccipienti per vari tipi di composizioni farmacologiche sono descritti più dettagliatamente nel seguito.

Il termine "farmacologicamente accettabile", nel senso qui utilizzato, riguarda composti, materiali, composizioni e/o forme di dosaggio che sono, nell'ambito di un valido parere medico, adatti per l'uso a contatto con i tessuti di un soggetto (p.es. un essere umano) senza tossicità, irritazione, risposta allergica eccessive o altri problemi o complicanze, commisurati di un ragionevole rapporto rischio/beneficio. Ciascun veicolo, eccipiente, ecc. deve anche essere "accettabile" nel senso di essere compatibile con gli altri ingredienti della formulazione.

Le composizioni farmacologiche contenenti i polipeptidi della descrizione possono essere formulate secondo tecniche note, vedi ad esempio Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA.

Le composizioni farmacologiche possono essere in qualsiasi forma adatta per la somministrazione orale, parenterale, topica, intranasale, intrabronchiale, sublinguale, oftalmica, otica, rettale, intravaginale o transdermica. Laddove le composizioni siano destinate alla somministrazione parenterale, esse possono essere formulate per la somministrazione endovenosa, intramuscolare, intraperitoneale, sottocutanea o per il rilascio diretto in un organo o tessuto bersaglio mediante iniezione, infusione o altri mezzi di destinazione. L'immissione può avvenire mediante iniezione in bolo, infusione a breve termine o infusione a lungo termine e può avvenire tramite immissione passiva o mediante l'utilizzo di una pompa per infusione o di una



siringa temporizzata adatte.

Le formulazioni farmacologiche adatte per la somministrazione parenterale comprendono soluzioni iniettabili sterili acquose e non acquose che possono contenere antiossidanti, tamponi, batteriostati, cosolventi, agenti tensioattivi, miscele di solventi organici, agenti di complessazione della ciclodestrina, agenti emulsionanti (per formare e stabilizzare formulazioni di emulsioni), componenti liposomiali per formare liposomi, polimeri gelificabili per formare gel polimerici, protettori di liofilizzazione e combinazioni di agenti per, tra le altre cose, stabilizzare il principio attivo in forma solubile e per rendere la formulazione isotonica con il sangue del destinatario previsto. Le formulazioni farmacologiche per la somministrazione parenterale possono assumere anche la forma di sospensioni sterili acquose e non acquose che possono comprendere agenti di sospensione e agenti addensanti (RG Strickly, Solubilizing Excipients in oral and injectable formulations, Pharmaceutical Research, Vol 21 (2) 2004, pagg. 201-230).

Si comprenderà che rientra nell'ambito dell'invenzione la terapia genica che comprende la variante di BMP9. Ad esempio, un vettore che codifichi per la sequenza nucleotidica della variante di BMP9 viene somministrato al soggetto umano ospite, dando come risultato un'espressione endogena (quale un'espressione endogena nel fegato) del polipeptide variante di BMP9 da rilasciare nella circolazione. Pertanto, secondo un ulteriore aspetto dell'invenzione, viene fornito un vettore comprendente una sequenza nucleotidica che codifica per una variante di BMP9, per l'uso nella cura di una malattia vascolare o di una malattia respiratoria. In questa descrizione, il vettore può comprendere la sequenza nucleotidica dell'ID SEQ n. 1.

In una forma di esecuzione, il vettore è un vettore virale. In un'ulteriore forma di esecuzione, il vettore virale è scelto tra: retrovirus, adenovirus, lentivirus, herpes simplex, vaccinia e virus adeno-associati. In un'ulteriore forma di esecuzione, il vettore virale è un virus adeno-associato.

In una forma di esecuzione alternativa, il vettore è un vettore non virale. L'uso di vettori



non virali presenta numerosi vantaggi rispetto all'uso di vettori virali, quali facilità di produzione su larga scala e bassa immunogenicità nell'ospite. Esempi di metodi di terapia genica non virale comprendono: iniezione di DNA nudo, elettroporazione, cannone genetico, sonoporazione, magnetofezione e l'uso di oligonucleotidi, lipoplessi, dendrimeri e nanoparticelle inorganiche.

Le formulazioni possono essere presentate in contenitori monodose o multidose, ad esempio ampolle sigillate, fiale e siringhe preriempite, e possono essere conservate in condizione crioessiccata (liofilizzata) che richiede solo l'aggiunta del veicolo liquido sterile, ad esempio acqua per le iniezioni, immediatamente prima dell'uso.

La formulazione farmacologica può essere preparata liofilizzando un polipeptide dell'invenzione. La liofilizzazione riguarda la procedura di crioessiccazione di una composizione. Pertanto, crioessiccazione e liofilizzazione sono qui utilizzati come sinonimi.

Si possono preparare soluzioni e sospensioni iniettabili estemporanee da polveri sterili, granuli e compresse.

Le composizioni farmacologiche della presente invenzione per l'iniezione parenterale possono comprendere anche soluzioni, dispersioni, sospensioni o emulsioni acquose o non acquose, sterili farmacologicamente accettabili, nonché polveri sterili per la ricostituzione appena prima dell'uso in soluzioni o dispersioni iniettabili sterili.

Esempi di supporti, diluenti, solventi o veicoli adatti, acquosi e non acquosi comprendono acqua, etanolo, polioli (quali glicerolo, glicole propilenico, polietilenglicole e simili), carbossimetilcellulosa e loro miscele adatte, oli vegetali (quali olio di girasole, olio di cartamo, olio di mais od olio di oliva) ed esteri organici iniettabili, quali etil oleato. Si può mantenere una fluidità adeguata, ad esempio mediante l'uso di materiali addensanti o di rivestimento, quali lecitina, mantenendo le necessarie dimensioni delle particelle, in caso di dispersioni e mediante l'uso di tensioattivi.

Le composizioni della presente descrizione possono contenere anche co-adiuvanti quali



conservanti, agenti bagnanti, agenti emulsionanti e agenti disperdenti. La prevenzione dell'azione dei microrganismi può essere garantita dall'inclusione di vari agenti antibatterici e antifungini, ad esempio parabeni, clorobutanolo, fenolo, acido sorbico e simili. Può anche essere desiderabile introdurre agenti per regolare la tonicità, quali zuccheri, cloruro di sodio e simili. Si può determinare un assorbimento prolungato della forma farmacologica iniettabile, introducendo agenti che ritardano l'assorbimento, quali alluminio monostearato e gelatina.

In una particolare forma di esecuzione dell'invenzione, la composizione farmacologica è in una forma adatta per la somministrazione e.v. ad esempio mediante iniezione o infusione. Per la somministrazione endovenosa, la soluzione può essere dosata così com'è, oppure può essere iniettata in una sacca per infusione (contenente un eccipiente farmacologicamente accettabile, quale soluzione salina allo 0,9% o destrosio al 5%), prima della somministrazione.

In un'altra forma di esecuzione specifica, la composizione farmacologica è in forma adatta alla somministrazione sottocutanea (s.c.).

Le forme di dosaggio farmacologico adatte per la somministrazione orale comprendono compresse (rivestite o non rivestite), capsule (a guscio duro o morbido), pillole, pasticche, confetti, sciroppi, soluzioni, polveri, granuli, elisir e sospensioni, compresse sublinguali, cialde o cerotti, quali i cerotti buccali.

Pertanto, le composizioni di compresse possono contenere un dosaggio unitario di polipeptide attivo, insieme a un diluente o veicolo inerte, quale zucchero o alcool di zucchero, p.es. lattosio, saccarosio, sorbitolo o mannitolo; e/o un diluente non derivato dallo zucchero, quale carbonato di sodio, fosfato di calcio, carbonato di calcio o una cellulosa o suo derivato, quale cellulosa microcristallina (MCC), metilcellulosa, etilcellulosa, idrossipropilmetil cellulosa, e amidi, quali amido di mais. Le compresse possono contenere anche ingredienti ordinari, quali agenti leganti e granulanti, quali polivinilpirrolidone, disintegranti (p.es. polimeri reticolati rigonfiabili, quali carbossimetilcellulosa reticolata), agenti lubrificanti (p.es. stearati), conservanti (p.es.

parabeni), antiossidanti (p.es. BHT), agenti tampone (p.es. tamponi fosfato o citrato) e agenti effervescenti, quali miscele citrato/bicarbonato. Tali eccipienti sono ben noti e non c'è bisogno che vengano qui discussi in dettaglio.

Le compresse possono essere progettate per rilasciare il farmaco a contatto con i fluidi dello stomaco (compresse a rilascio immediato) o per rilasciarlo in modo controllato (compresse a rilascio controllato), per un periodo di tempo prolungato o con una regione specifica del tratto gastrointestinale.

Le formulazioni di capsule possono essere della varietà a gelatina dura o a gelatina morbida e possono contenere il principio attivo in forma solida, semisolida o liquida. Le capsule di gelatina possono essere fatte di gelatina animale o di suoi equivalenti sintetici o derivati da piante.

Le forme di dosaggio solide (p.es. compresse, capsule ecc.) possono essere rivestite o non rivestite. I rivestimenti possono agire da pellicola protettiva (p.es. un polimero, cera o vernice) o come meccanismo per controllare il rilascio del farmaco, o a scopi estetici o di identificazione. Il rivestimento (p.es. un polimero di tipo Eudragit™) può essere progettato per rilasciare il principio attivo in corrispondenza di una desiderata posizione all'interno del tratto gastrointestinale. Pertanto, il rivestimento può essere selezionato in modo da degradarsi in determinate condizioni di pH all'interno del tratto gastrointestinale, liberando così in modo selettivo il polipeptide nello stomaco o nell'ileo, duodeno, digiuno o colon.

Invece di o in aggiunta a un rivestimento, il farmaco può presentarsi in una matrice solida, comprendente un agente di controllo del rilascio, ad esempio un agente ritardante il rilascio, che può essere adattato per rilasciare il polipeptide in modo controllato nel tratto gastrointestinale. In alternativa, il farmaco può presentarsi in un rivestimento polimerico, p.es. un rivestimento polimerico di polimetacrilato, che può essere adattato per rilasciare il polipeptide in modo selettivo in condizioni di acidità o alcalinità variabili nel tratto gastrointestinale. In alternativa, il materiale della matrice o il rivestimento ritardante il rilascio può assumere la forma di un polimero erodibile



(p.es. un polimero di anidride maleica) che viene eroso sostanzialmente in modo continuo mentre la forma di dosaggio passa attraverso il tratto gastrointestinale. In un'altra alternativa, il rivestimento può essere progettato per disintegrarsi sotto l'azione microbica nell'intestino. Come ulteriore alternativa, il polipeptide attivo può essere formulato in un sistema di rilascio che fornisce il controllo osmotico del rilascio del polipeptide. Le formulazioni a rilascio osmotico e altro rilascio ritardato o a rilascio prolungato (p.es. formulazioni basate su resine a scambio ionico) possono essere preparate secondo metodi ben noti agli esperti della tecnica.

I polipeptidi della descrizione possono essere formulati con un veicolo e somministrati sotto forma di nanoparticelle, la superficie aumentata delle nanoparticelle favorendone l'assorbimento. Inoltre, le nanoparticelle offrono la possibilità di una penetrazione diretta nella cellula. I sistemi di rilascio di farmaco in nanoparticelle sono descritti in "Nanoparticle Technology for Drug Delivery", a cura di Ram B Gupta e Uday B. Kompella, Informa Healthcare, ISBN 9781574448573, pubblicato il 13 marzo 2006. Le nanoparticelle per il rilascio di farmaci sono anche descritte in J. Control. Release, 2003, 91 (1-2), 167-172, e in Sinha *et al.*, Mol. Cancer Ther. 1 agosto (2006) 5, 1909.

Le composizioni farmacologiche comprendono tipicamente da circa l'1% (p/p) a circa il 95% (p/p) di principio attivo e dal 99% (p/p) al 5% (p/p) di un eccipiente o combinazione di eccipienti farmacologicamente accettabile. In particolare, le composizioni comprendono da circa il 20% (p/p) a circa il 90% (p/p) di principio attivo e dall'80% (p/p) al 10% di un eccipiente o combinazione di eccipienti farmacologicamente accettabile. Le composizioni farmacologiche comprendono da circa l'1% a circa il 95% di principio attivo, in particolare da circa il 20% a circa il 90%. Le composizioni farmacologiche secondo l'invenzione possono essere ad esempio sotto forma di dose unitaria, quale sotto forma di ampolle, flaconcini, supposte, siringhe preriempite, confetti, compresse o capsule.

L'eccipiente (o eccipienti) farmacologicamente accettabile può essere selezionato in base



alla forma fisica desiderata della formulazione e può, ad esempio, essere scelto tra diluenti (p.es. diluenti solidi, quali riempitivi o agenti di carica; e diluenti liquidi, quali solventi e cosolventi), disintegranti, agenti tampone, lubrificanti, fluidificanti, agenti di controllo del rilascio (p.es. polimeri o cere rallentanti o ritardanti il rilascio), leganti, agenti granulanti, pigmenti, plastificanti, antiossidanti, conservanti, agenti aromatizzanti, agenti mascheranti il gusto, agenti di regolazione della tonicità e agenti di rivestimento.

L'esperto avrà le competenze per selezionare le quantità appropriate di ingredienti da utilizzare nelle formulazioni. Ad esempio, compresse e capsule contengono tipicamente lo 0-20% di disintegranti, lo 0-5% di lubrificanti, lo 0-5% di fluidificanti e/o lo 0-99% (p/p) di riempitivi o agenti di carica (a seconda della dose di farmaco). Possono contenere anche lo 0-10% (p/p) di leganti polimerici, lo 0-5% (p/p) di antiossidanti, lo 0-5% (p/p) di pigmenti. Le compresse a rilascio lento conterranno inoltre lo 0-99% (p/p) di polimeri che controllano il rilascio (p.es. ritardando) (a seconda della dose). I rivestimenti di pellicola della compressa o della capsula contengono tipicamente lo 0-10% (p/p) di polimeri, lo 0-3% (p/p) di pigmenti e/o lo 0-2% (p/p) di plastificanti.

Le formulazioni parenterali contengono tipicamente lo 0-20% (p/p) di tampone, lo 0-50% (p/p) di cosolventi e/o lo 0-99% (p/p) di Acqua Per Iniezione (WFI) (a seconda della dose e se crioessiccato). Le formulazioni per depositi intramuscolari possono contenere anche lo 0-99% (p/p) di oli.

Le composizioni farmacologiche per somministrazione orale possono essere ottenute combinando il principio attivo con veicoli solidi, se desiderato granulando una miscela risultante e trasformando la miscela in compresse, anime di confetti o capsule, se desiderato o necessario, dopo l'aggiunta di eccipienti appropriati. È anche possibile incorporarli in una matrice polimerica o cerosa che consente ai principi attivi di diffondersi o di essere rilasciati in quantità misurate.

I polipeptidi dell'invenzione possono essere formulati anche come dispersioni solide. Le



dispersioni solide sono fasi disperse omogenee, estremamente fini, di due o più solidi. Le soluzioni solide (sistemi a dispersione molecolare), un tipo di dispersione solida, sono ben note per l'uso nella tecnologia farmacologica (v. (Chiou e Riegelman, J. Pharm. Sci., 60, 1281-1300 (1971)) e sono utili per aumentare i tassi di dissoluzione e aumentare la biodisponibilità di farmaci scarsamente solubili in acqua.

Questa descrizione descrive anche forme di dosaggio solide, comprendenti la soluzione solida sopra descritta. Le forme di dosaggio solide comprendono compresse, capsule, compresse masticabili e compresse disperdibili o effervescenti. Con la soluzione solida si possono miscelare eccipienti noti, per fornire la forma di dosaggio desiderata. Ad esempio, una capsula può contenere la soluzione solida miscelata con (a) un disintegrante e un lubrificante, oppure (b) un disintegrante, un lubrificante e un tensioattivo. Inoltre, una capsula può contenere un agente di carica, quale lattosio o cellulosa microcristallina. Una compressa può contenere la soluzione solida, miscelata con almeno un disintegrante, un lubrificante, un tensioattivo, un agente di carica e un agente di scorrevolezza. Una compressa masticabile può contenere la soluzione solida miscelata con un agente di carica, un lubrificante e, se desiderato, un agente edulcorante aggiuntivo (quale un edulcorante artificiale) e aromi adatti. Si possono formare soluzioni solide anche spruzzando soluzioni di farmaco e un polimero adatto sulla superficie di veicoli inerti, quali perle di zucchero ("non-pareils"). Queste perle possono successivamente essere usate per riempire delle capsule oppure si possono comprimere per fare delle compresse.

Le formulazioni farmacologiche possono essere presentate a un paziente in "confezioni per pazienti", contenenti un intero ciclo di cura in un'unica confezione, generalmente un blister. Le confezioni per pazienti hanno un vantaggio rispetto alle prescrizioni tradizionali, in cui un farmacista divide la fornitura di un farmaco per un paziente da una fornitura di massa, in quanto il paziente ha sempre accesso al foglietto illustrativo contenuto nella confezione per pazienti, che normalmente non c'è nelle prescrizioni per pazienti. È stato dimostrato che l'inclusione di un

foglietto illustrativo migliora il rispetto delle istruzioni del medico da parte dei pazienti.

Le composizioni per uso topico e per somministrazione nasale comprendono pomate, creme, spruzzini, cerotti, gel, gocce liquide e inserti (p.es. inserti intraoculari). Tali composizioni possono essere formulate secondo metodi noti.

Esempi di formulazioni per la somministrazione rettale o intravaginale comprendono pessari e supposte che possono essere fatti, ad esempio, di un materiale modellabile o ceroso sagomato, contenente il polipeptide attivo. Si possono usare soluzioni del polipeptide attivo anche per la somministrazione rettale.

Le composizioni per somministrazione mediante inalazione possono assumere la forma di composizioni di polvere inalabile o spruzzini liquidi o in polvere e possono essere somministrate in forma ordinaria, utilizzando dispositivi per inalazione di polveri o dispositivi di erogazione di aerosol. Tali dispositivi sono ben noti. Per la somministrazione mediante inalazione, le formulazioni in polvere comprendono tipicamente il polipeptide attivo insieme a un diluente in polvere solido inerte, quale lattosio.

I polipeptidi della descrizione saranno generalmente presentati sotto forma di dosaggio unitario e, come tali, conterranno tipicamente polipeptide sufficiente a fornire un livello desiderato di attività biologica. Ad esempio, una formulazione può contenere da 1 nanogrammo a 2 grammi di principio attivo, p.es. da 1 nanogrammo a 2 milligrammi di principio attivo. All'interno di questi intervalli, sotto intervalli particolari di polipeptide sono da 0,1 milligrammi a 2 grammi di principio attivo (più abitualmente da 10 milligrammi a 1 grammo, p.es. da 50 milligrammi a 500 milligrammi), o da 1 microgrammo a 20 milligrammi (p.es. da 1 microgrammo a 10 milligrammi di principio attivo, p.es. da 0,1 milligrammi a 2 milligrammi di principio attivo).

Per le composizioni orali, una forma di dosaggio unitario può contenere da 1 milligrammo a 2 grammi di polipeptide attivo, più tipicamente da 10 milligrammi a 1 grammo, ad esempio da 50 milligrammi a 1 grammo, p.es. da 100 milligrammi a 1 grammo.

Il polipeptide attivo verrà somministrato a un paziente che ne ha bisogno (p.es. un paziente umano o animale) in una quantità sufficiente per ottenere l'effetto terapeutico desiderato. Questa descrizione fornisce anche un metodo per curare una malattia vascolare o una malattia respiratoria che comprende di somministrare a un soggetto che ne ha bisogno una quantità terapeuticamente efficace di un polipeptide scelto tra proteina morfogenetica ossea 10 (BMP10) o una variante di proteina morfogenetica ossea 9 (BMP9) priva di attività osteogenetica.

I seguenti studi illustrano l'invenzione e la descrizione:

Abbreviazioni

ActR-IIA (B):	recettore di activina di tipo IIA(B);
ALK1, 2, 3, 6:	chinasi 1, 2, 3, 6 tipo recettore di activina;
ALP:	fosfatasi alcalina;
BMP:	proteina morfogenetica ossea;
BMPR-II:	recettore di tipo II di proteina morfogenetica ossea;
ECD:	dominio extracellulare;
FBS:	siero bovino fetale;
HMEC-1:	cellule endoteliali microvascolari umane;
hPAEC:	cellule endoteliali dell'arteria polmonare umane;
MSC:	cellule staminali mesenchimali;
PAH:	ipertensione arteriosa polmonare;
pro.BMP9:	BMP9 legata a prodominio;
pro.BMP10:	BMP10 legata a prodominio; e
qPCR:	PCR quantitativa.

Materiali e Metodi

Generare pro.BMP9 e pro.BMP10 ricombinanti umane

È stato clonato cDNA a lunghezza intera contenente una cornice di lettura aperta di pre-



pro-BMP9 umana nel vettore di espressione pCEP4 tra i siti HindIII e XhoI (v. Fig. 1). Analogamente, è stato clonato cDNA a lunghezza intera di pre-pro-BMP10 umana nel vettore di espressione pCEP4 tra i siti XhoI e BamHI (v. Fig. 1). Gli inserti vennero verificati mediante sequenziamento del DNA. Vennero generate le varianti di Pro.BMP9 utilizzando il corredo QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) e tutte le mutazioni vennero verificate mediante sequenziamento del DNA.

Vennero trasfettati plasmidi contenenti pre-pro-BMP9 (o pre-pro-BMP10) in cellule HEK-EBNA, usando polietilenimina in mezzo DMEM contenente siero bovino fetale (FBS) al 5%. I plasmidi che esprimevano la furina umana vennero co-trasfettati per facilitare l'elaborazione di pro-BMP9 e pro-BMP10. Le cellule si trasformarono in mezzo CDCHO senza siero il giorno seguente e i mezzi condizionati vennero raccolti dopo 3-4 giorni. Le identità di pro.BMP9 e pro.BMP10 nei mezzi condizionati vennero confermate mediante immunofissazione, utilizzando rispettivamente anti-BMP9 (MAB3209, R&D Systems), prodominio di anti-BMP9 (AF3879, R&D Systems) o anticorpi anti-BMP10 (MAB2926, R&D Systems).

Per purificare la pro.BMP10, vennero caricati 1-5 litri di mezzi condizionati su una colonna di Q-Sefarosio pre-equilibrata in Tris.HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 50 mM. Le proteine legate vennero eluite con un gradiente di NaCl (50-2000 mM). Vennero analizzate le frazioni mediante una SDS-PAGE non riducente e quelle contenenti pro.BMP10 vennero raggruppate e concentrate prima di caricarle su una colonna di filtrazione su gel S200. La pro.BMP10 dalla colonna S200 era pura per oltre il 90% e le identità del prodominio di BMP10 e della BMP10 matura vennero ulteriormente confermate mediante digestione in gel e identificazioni spettrometriche di massa.

Saggi di segnalazione mediante PCR quantitativa (qPCR) e fosforilazione di Smad 1/5/8 in cellule endoteliali

Per i saggi di segnalazione, è stata determinata mediante ELISA la concentrazione di pro.BMP9, utilizzando BMP9 della R&D come riferimenti; e la concentrazione di pro.BMP10 è stata

quantificata mediante immunofissazione e ImageJ, usando BMP10 della R&D come riferimenti.

Dopo privazione di siero, le cellule HMEC-1 vennero trattate con leganti di BMP a concentrazioni indicate. 8 ore dopo il trattamento, venne estratto l'mRNA e vennero misurati mediante PCR quantitativa i livelli di espressione di ID1, ID2 o BMPR-II. Venne utilizzata β 2-microglobulina come controllo e vennero tracciati i fold change relativi ai campioni non trattati. Viene mostrato il valore medio \pm SEM, N = 2; Per il saggio di fosforilazione di Smad 1/5/8, vennero trattate cellule HMEC-1 private di siero con leganti di BMP a concentrazioni indicate per 1 ora e la segnalazione venne fermata, collocando i piatti su ghiaccio secco. Venne aggiunto tampone di lisi (Tris.HCl 125 mM, pH 6,8, SDS al 2% e glicerolo al 10%) e venne determinata la concentrazione proteica nel lisato cellulare totale, usando DC™ protein Assay (Bio-Rad). Vennero usati 25-35 μ g delle proteine cellulari totali per l'immunomanbiatina e venne sorvegliata la fosforilazione di Smad1/5/8 con anticorpo anti-pSmad1/5/8 (Cell Signaling, Cat n. 9516). Venne usata α -tubulina come controllo di caricamento.

Attività di fosfatasi alcalina (ALP) in linea cellulare di mioblasti di topo C2C12

Vennero seminate cellule C2C12 in una piastra a 24 pozzetti a 20.000 cellule/pozzetto in DMEM con FBS al 10%. Dopo 48 ore, le cellule vennero sospese per 16 ore con DMEM contenente FBS allo 0,25% e vennero trattate con leganti di BMP a concentrazioni indicate per 64 ore. Le cellule vennero lisate in Triton X-100/PBS 1% e venne determinata la concentrazione proteica totale nel lisato cellulare, utilizzando DC™ protein Assay (Bio-Rad). Venne misurata l'attività di ALP nel lisato cellulare, usando il sale disodico 4-nitrofenil fosfato su substrato cromogenico di fosfatasi (Sigma, S0942) e venne misurato il prodotto solubile a 405 nm su un lettore di piastre. In tutti i saggi, le BMP9 e BMP10 di controllo vennero acquistate dalla R&D Systems.

Risultati

Segnalazione di BMP9 e dati a supporto del suo potenziale terapeutico nella PAH

BMP9 e BMP10 vennero identificate come leganti per il recettore orfano ALK1 (David *et al.*



(2007) Blood 109(5): 1953-1961). Nelle cellule endoteliali inducono un insieme simile di geni, tra cui ID1, ID2 e BMPRII. BMP9 viene sintetizzata nel fegato (Miller *et al.* (2000) J. Biol. Chem. 275 (24): 17937-17945; Bidart *et al.* (2012) Cell. Mol. Life Sci. 69 (2): 313-324), circola a 2-10 ng/ml ed è l'unica BMP confermata che circola a concentrazioni attive (Herrera and Inman (2009) BMC Cell Biol. 10:20; David *et al.* (2008) Circ. Res. 102 (8): 914- 922). BMP9 è un fattore di quiescenza vascolare che inibisce la migrazione, la proliferazione e l'angiogenesi delle EC *in vitro*, promuovendo così la stabilità vascolare (David *et al.* (2008), *supra*).

Ingegnerizzazione delle varianti di BMP9 che mantengono le proprietà protettive endoteliali, ma sono prive di attività di formazione ossea

Nonostante il potenziale per curare malattie cardiovascolari attraverso l'attivazione selettiva dei recettori endoteliali, BMP9 può anche segnalare nelle cellule staminali mesenchimali (MSC) e nei mioblasti di C2C12. Tra le 14 BMP provate, BMP9 ha mostrato la più alta attività di segnalazione osteogenetica *in vitro* e attività di formazione ossea *in vivo* (Kang *et al.* (2004) Gene Ther.11 (17): 1312-1320; Luther *et al.* (2011) Curr. Gene Ther.11 (3): 229-240). Sia ALK1 che ALK2 sono necessarie per l'attività osteogenetica di BMP9 (Luo *et al.* (2010) J. Biol. Chem. 285 (38): 29588-29598), ma la natura dell'interazione di BMP9 con ALK1 e ALK2 nel contesto dell'attività osteogenetica non è nota. Sebbene ALK2 sia espressa anche dalle cellule endoteliali vascolari (Upton *et al.* (2008) Mol. Pharmacol. 73 (2): 539-552), ALK1 è il principale recettore di tipo I che media le risposte di BMP9 in queste cellule (Upton *et al.* (2009) J. Biol. Chem. 284 (23): 15794-15804; Scharpfenecker *et al.* (2007) J. Cell Sci.120 (Pt 6): 964-972). È stato studiato il requisito del recettore di tipo II per l'attività osteogenetica di BMP9 in MSC. È stato dimostrato che l'espressione di mutanti negativi dominanti di tutti e tre i recettori di BMP di tipo II, BMPRII, ActR-IIA e ActR-IIB, può inibire l'attività osteogenetica indotta da BMP9, e che ActR-IIB negativo dominante è il più potente (Wu *et al.* (2010) Acta biochimica et biofisica Sinica 42 (10): 699-708).

Gli inventori hanno ipotizzato che, mutando i siti di legame dei recettori di tipo I e di tipo



II su BMP9, si possano generare varianti di BMP9 che mantengono il legame di ALK1, ma perdono il legame di ALK2. È probabile che tali varianti di BMP9 mantengano la funzione protettiva endoteliale, ma siano prive di attività osteogenetica. Gli inventori hanno già identificato due di tali varianti di BMP9 che mantengono attività di segnalazione delle cellule endoteliali, come testimoniato dall'induzione di espressione genica di ID1 e ID2, ma sono prive di attività di segnalazione osteogenetica, valutata con saggio della fosfatasi alcalina nelle cellule C2C12 (Fig. 2). È probabile che queste varianti di BMP9 (D366A e D408A) mantengano l'effetto benefico *in vivo*, dal momento che hanno un'attività di segnalazione normale nelle cellule endoteliali, ma non saranno in grado di avviare la segnalazione osteogenetica e quindi rimuovono il rischio potenziale di formazione ossea mediante somministrazione di BMP9 *in vivo*.

Mutagenesi di scansione in alanina di BMP9

Vennero generate ventiquattro varianti alanina di BMP9 (H326A, D342A, S343A, W344A, I346A, K349A, F362A, D366A, K372A, I375A, L379A, H381A, L382A, K383A, K390A, S402A, L404A, K406A, D408A, V411A, T413A, L414A, Y416A e Y418A) e vennero sottoposte a prova sia in cellule HMEC-1 per l'induzione genica di ID1 che in cellule C2C12 per l'attività della fosfatasi alcalina. I risultati di questo studio sono riassunti nella Fig. 5, dove si può vedere che sono state identificate tredici varianti di BMP9 (H326A, S343A, K349A, F362A, D366A, I375A, L379A, L382A, K390A, S402A, D408A, Y416A e Y418A) che mantengono l'effetto benefico della segnalazione endoteliale specifica e hanno una segnalazione osteogenetica notevolmente ridotta (come testimoniato da un'induzione di ID1 di almeno 0,75 volte e attività di ALP di meno di 0,5 volte quella di BMP9 di tipo selvatico). Inoltre, i risultati mostrati in Fig. 5 dimostrano che furono identificate otto varianti di BMP9 (F362A, D366A, I375A, L379A, S402A, D408A, Y416A e Y418A) che mantengono una segnalazione endoteliale specifica, ma sono prive di segnalazione osteogenetica (come testimoniato da un'induzione di ID1 di almeno 0,75 volte e attività di ALP trascurabile (ossia inferiore a 0,1 volte) rispetto a BMP9 di tipo selvatico). Inoltre, i risultati



mostrati in Fig. 5 dimostrano che due varianti di BMP9 (D366A o D408A) hanno aumentato la segnalazione endoteliale specifica, ma sono prive di segnalazione osteogenetica (come testimoniato da un'induzione di ID1 maggiore di 1 volta e attività di ALP trascurabile (ossia inferiore a 0,1 volte) rispetto a BMP9 di tipo selvatico).

Convalida delle varianti di BMP9 in cellule endoteliali primarie

Le otto varianti di BMP9 (F362A, D366A, I375A, L379A, S402A, D408A, Y416A e Y418A) che vennero identificate sopra come mantenenti la segnalazione endoteliale specifica, ma prive di segnalazione osteogenetica, vennero ulteriormente convalidate in cellule endoteliali primarie. Si è scoperto che tutti questi mutanti inducono espressione genica di BMPR2 nelle cellule endoteliali arteriose polmonari umane (hPAEC, Fig. 6). Almeno una variante, D408A, ha dimostrato di essere in grado di recuperare l'apoptosi precoce di PAEC, indotta da un fattore di necrosi tumorale α (TNF α) e cicloesimide (CHX) (Fig. 7).

Segnalazione di BMP10 nell'endotelio (esempio illustrativo)

BMP10 è indispensabile per lo sviluppo del cuore (Neuhaus *et al.* (1999) *Mech. Dev.* 80 (2): 181-184). I topi null per BMP10 sono letali per l'embrione a causa di uno sviluppo cardiaco gravemente compromesso (Chen H *et al.* (2004) *Development* 131 (9): 2219-2231). BMP10 regola lo sviluppo della parete ventricolare cardiaca attraverso il fattore di trascrizione Tbx20 (Zhang *et al.* (2011) *J. Biol. Chem.* 286 (42): 36820-36829) e la sovraespressione di BMP10 nel miocardio interrompe la crescita cardiaca ipertrofica postnatale (Chen *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.* 281 (37): 27481-27491). Nell'adulto, BMP10 è espressa solo nell'atrio destro (Chen *et al.* (2004) *supra*). È stato dimostrato che la BMP10 circolante media la quiescenza arteriosa dipendente dal flusso (Laux *et al.* (2013) *Development* 140 (16): 3403-3412).

Il livello circolante di BMP10 è controverso. Mentre la proteina BMP10 è stata rivelata nei sieri umani usando approcci proteomici (Souza *et al.* (2008) *Mol. Endocrinol.* 22 (12): 2689-2702) e può essere misurata mediante ELISA (Ricard *et al.* (2012) *Blood* 119 (25) : 6162-6171), altri



studi che utilizzano saggi di attività non sono stati in grado di rivelare la BMP10 circolante (Bidart *et al.* (2012) e Herrera e Inman (2009), *supra*). Tuttavia, un recente rapporto ha dimostrato l'attività di BMP10 in circolazione (Chen *et al.* (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110 (29): 11887-11892). Tale controversia potrebbe essere dovuta al fatto che la BMP10 circolante sia in stati attivi/inattivi, ad una elaborazione incompleta, a inibizione da parte di un fattore sierico, o ai saggi di attività diversi utilizzati nei rapporti pubblicati. Il prodominio di BMP10 potrebbe svolgere un ruolo in questo. Ad esempio, è stato riportato che il prodominio di BMP10, a differenza di altre BMP, può inibire l'espressione genica indotta da BMP10 nelle cellule C2C12 (Sengle *et al.* (2011) J. Biol. Chem. 286 (7): 5087-5099). Inoltre, le misurazioni di Biacore hanno dimostrato che BMP10 ha un'affinità maggiore per ALK1/BMPRII rispetto a BMP9 (Townson *et al.* (2012) J. Biol. Chem. 287 (33): 27313-27325) e che la perdita della proteina BMPRII durante l'insorgenza di PAH avrà chiaramente un impatto sulla segnalazione di BMP10. È importante sottolineare che, in studi *in vitro* e *in vivo*, BMP10 è priva di attività osteogenetica. Pertanto, la BMP10 nativa rappresenta un agonista più desiderabile rispetto alla BMP9 nativa, per curare la PAH.

Confronto tra l'attività di BMP9 e di BMP10

Un saggio di segnalazione concentrazione-risposta in cellule endoteliali microvascolari umane (HMEC-1) ha mostrato che BMP10 è potente quanto BMP9 nell'indurre l'espressione genica di ID1, ID2 e BMPRII (Figg. da 3A a 3C). È importante sottolineare che BMP10 mostra la stessa attività anti-apoptotica di BMP9 nella protezione delle hPAEC dall'apoptosi indotta da TNF α -CHX (Fig. 3D). È stato riportato che BMP9 mantiene la stabilità del sistema vascolare, sopprimendo la proliferazione delle cellule endoteliali (David *et al.* (2008) *supra*). Sia BMP9 che BMP10 reprimono in misura simile la sintesi del DNA, misurata come assorbimento di ^3H -timidina, nelle hPAEC (Fig. 3E). La fosfatasi alcalina (ALP) è un enzima chiave nel percorso osteogenetico e l'attività di ALP indotta da BMP9 può essere rivelata nelle cellule C2C12 a 5 ng/ml di BMP9. Tuttavia, in identiche condizioni, BMP10 non ha indotto alcuna attività di ALP alla massima concentrazione provata (20



ng/ml, Fig. 3F), in linea con lo studio precedente che utilizzava le BMP espresse da adenovirus in cellule C2C12 (Kang *et al.* (2004) *supra*).

Potenziale di somministrazione di BMP10 e BMP10 legata a prodominio per curare PAH e altre malattie cardiovascolari (esempio illustrativo)

Vengono sintetizzate BMP come pre-pro-proteine e viene scisso il prodominio su secrezione (Fig. 4A). Un rapporto precedente aveva mostrato che il prodominio di BMP10 poteva inibire l'attività di BMP10 e che era probabile che BMP10 circolasse in una forma inattiva. Gli inventori hanno generato una grande quantità di BMP10 legata a prodominio (pro.BMP10). Contrariamente al rapporto precedente, è stato scoperto che il prodominio rimane legato a BMP10 quando BMP10 venne prodotta da cellule di mammiferi e che il complesso pro.BMP10 è molto stabile (Figg. 4B e 4C). Ciò indica che è probabile che pro.BMP10 sia la forma circolante. Inoltre, gli inventori hanno dimostrato in cellule HMEC-1 (Figg. 4D e 4E) e hPAEC che pro.BMP10 ha attività comparabili a BMP9 e BMP10 acquistate da una fonte commerciale (R&D Systems). Dal momento che il prodominio protegge la superficie idrofobica di BMP10 e quindi stabilizza la forma circolante di BMP10, è probabile che pro.BMP10 sia una forma preferita per la somministrazione *in vivo* per curare la PAH e altre malattie cardiovascolari.

BMP9 e BMP10 inibiscono la formazione in provetta di cellule endoteliali vascolari periferiche (BOEC) in gel di collagene

Le cellule endoteliali vascolari periferiche possono essere isolate dal sangue periferico della maggior parte degli individui e rappresentano un tipo di cellula fortemente proliferativo, che è fortemente rappresentativo delle cellule endoteliali umane. È stato dimostrato che, come le cellule endoteliali, le BOEC formano strutture vacuolizzate tipo capillari in un collagene tridimensionale: matrice di fibronectina. I risultati di questa analisi sono mostrati nella Fig. 8 che non solo dimostra il ruolo anti-angiogenico di BMP9 e BMP10, ma dimostra anche che BMP9 oltre ad essere antiproliferativa per le cellule endoteliali, protegge le cellule endoteliali dall'apoptosi e protegge le



cellule endoteliali da una permeabilità aumentata. L'inibizione da parte di BMP9 è evidente anche a concentrazioni basse.

<110> Cambridge Enterprise Limited

<120> USO TERAPEUTICO DI PROTEINE MORFOGENETICHE OSSEE

<130> CEL-C-P1753PCT

<150> 1412290.7

<151> 2014-07-10

<160> 6

<170> Versione patentIn 3.5

<210> 1

<211> 1275

<212> DNA

<213> Umano

<400> 1

```

atgggctctc tggctctgac actgtgcgct cttttctgcc tggcagctta cttggtttct      60
ggcagcccca tcatgaacct agagcagtct cctctggaag aagatatgtc cctctttggg      120
gatgttttct cagagcaaga cgggtgtcgac tttaacacac tgctccagag catgaaggat      180
gagtttctta agacactaaa cctctctgac atccccacgc aggattcagc caaggtggac      240
ccaccagagt acatgttgga actctacaac aaatttgcaa cagatcggac ctccatgccc      300
tctgccaaca tcattaggag tttcaagaat gaagatctgt tttcccagcc ggtcagtttt      360
aatgggctcc gaaaataccc cctcctcttc aatgtgtcca ttcctacca tgaagaggtc      420
atcatggctg aacttaggct atacacactg gtgcaaaggg atcgtatgat atacgatgga      480
gtagaccgga aaattaccat ttttgaagtg ctggagagca aaggggataa tgagggagaa      540
agaaacatgc tggctttggg gtctggggag atatatggaa ccaacagtga gtgggagact      600
tttgatgtca cagatgccat cagacgttgg caaaagtcag gtcctccac ccaccagctg      660
    
```



FUMERO - Studio Consulenza Brevetti

```
gaggtccaca ttgagagcaa acacgatgaa gctgaggatg ccagcagtgg acggctagaa      720
atagatacca gtgccagaa taagcataac ctttgctca tcgtgttttc tgatgaccaa      780
agcagtgaca aggagaggaa ggaggaactg aatgaaatga tttcccatga gcaacttcca      840
gagctggaca acttgggcct ggatagcttt tccagtggac ctggggaaga ggctttgttg      900
cagatgagat caaacatcat ctatgactcc actgcccga tcaagaaggaa cgccaaagga      960
aactactgta agaggacccc gctctacatc gacttcaagg agattgggtg ggactcctgg     1020
atcatogctc cgcttgata cgaagcctat gaatgccgtg gtgtttgtaa ctaccccctg     1080
gcagagcatc tcacaccac aaagcatgca attatccagc ccttgggtcca cctcaagaat     1140
tccagaaag cttccaaagc ctgctgtgtg cccacaaagc tagagcccat ctccatcctc     1200
tatttagaca aaggcgtcgt cacctacaag tttaaatagc aaggcatggc cgtctccgaa     1260
```

<210> 2

<211> 424

<212> **PRT**

<213> Umano

<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
```

FUMERO - Studio Consulenza Brevetti

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 Glu Ala Glu Asp Ala Ser Ser Gly Arg Leu Glu
225 230 235 240

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> **DNA**

<213> Umano

<400> 3

atgtgtcctg gggcactgtg ggtggccctg ccctgctgt cctgctggc tggctccta

caggggaagc cactgcagag ctggggacga gggctgctg ggggaaacgc ccacagccca	120
ctgggggtgc ctggaggtgg gctgcctgag cacaccttca acctgaagat gtttctggag	180
aacgtgaag tggatttctt ggcagcctt aacctgagt gggtccttc gcaggacaaa	240
accaggtgg agccgccga gtacatgatt gacctgtaca acaggtacac gtccgataag	300
tcgactacgc cagcgtccaa cattgtgagg agcttcagca tggaagatgc catctccata	360
actgccacag aggacttccc cttccagaag cacatcttgc tcttcaacat ctccattcct	420

```

aggcatgagc agatcaccag agctgagctc cgactctatg tctcctgtca aatcacgtg      480
gacccctctc atgacctgaa aggaagcgtg gtcatttatg atgttctgga tggaacagat      540
gcctgggata gtgctacaga gaccaagacc ttcttggtgt cccaggacat tcaggatgag      600
ggctgggaga ccttggaagt gtccagcgcc gtgaagcgtc ggggccggtc cgactccacc      660
aagagcaaaa ataagctgga agtgactgtg gagagccaca ggaagggctg cgacacgctg      720
gacatcagtg tccccccagc ttccagaaac ctgcccttct ttgttgtctt ctccaatgac      780
cacagcagtg ggaccaagga gaccaggctg gagctgaggg agatgatcag ccatgaacaa      840
gagagcgtgc tcaagaagct gtccaaggac ggctccacag aggcaggtga gagcagtcac      900
gaggaggaca cggatggcca cgtggctgcg gggctcgactt tagccaggcg gaaaaggagc      960
gccggggctg gcagccactg tcaaaagacc tcctgcggg taaacttca ggacatcggc     1020
tgggacagct ggatcattgc acccaaggag tatgaagcct acgagtgtaa gggcggctgc     1080
ttcttcccct tggctgacga tgtgacgccg acgaaacacg ctatcgtgca gaccctggtg     1140
catctcaagt tccccacaaa ggtgggcaag gcctgctgtg tgcccaccaa actgagcccc     1200
atctccgtcc tctacaagga tgacatgggg gtgccacccc tcaagtacca ttacgagggc     1260
atgagcgtgg cagagtgtgg gtgcaggtag                                     1290
    
```

<210> 4

<211> 429

<212> **PRT**

<213> Umano

<400> 4

```

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
    
```




FUMERO - Studio Consulenza Brevetti

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> Artificiale

<220>

<223> Variante di BMP9 di 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

FUMERO - Studio Consulenza Brevetti

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> Artificiale

<220>

<223> Variante di BMP9 di D408A

<400> 6

FUMERO - Studio Consulenza Brevetti

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

FUMERO - Studio Consulenza Brevetti

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

RIVENDICAZIONI

1) Polipeptide scelto tra una variante della proteina morfogenetica ossea 9 (BMP9) priva di attività osteogenetica e una variante di BMP9 legata a prodominio (pro.BMP9) priva di attività osteogenetica per l'uso nella cura di una malattia vascolare o di una malattia respiratoria.

2) Polipeptide per l'uso come in 1, in cui la malattia vascolare è scelta tra: ipertensione polmonare; ipertensione arteriosa polmonare; teleangectasia emorragica ereditaria; aterosclerosi; e sindrome epatopolmonare.

3) Polipeptide per l'uso come in 1 o in 2, che comprende la cura di una malattia vascolare scelta tra ipertensione arteriosa polmonare.

4) Polipeptide per l'uso come in 1, in cui la malattia respiratoria è scelta tra: malattie polmonari ostruttive, quali broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), bronchite cronica ed enfisema; malattie vascolari polmonari, quali edema polmonare ed emorragia polmonare; insufficienza respiratoria e sindrome da stress respiratorio, quali danno polmonare acuto e sindrome da stress respiratorio acuto; e malattie polmonari interstiziali, quali fibrosi polmonare idiopatica.

5) Polipeptide per l'uso come in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui il polipeptide è la variante di BMP9.

6) Polipeptide per l'uso come in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui il polipeptide è la variante di pro.BMP9.

7) Polipeptide per l'uso come in 6, in cui la variante di pro.BMP9 comprende una variante de: la sequenza di propeptidi avente la sequenza amminoacidica dei residui 23-319 dell'ID SEQ n. 4, legata in modo non covalente ad una sequenza di BMP9 matura avente la sequenza amminoacidica dei residui 320-429 dell'ID SEQ n. 4.

8) Polipeptide per l'uso come in 7, in cui la variante di pro.BMP9 comprende un tetramero



contenente due di dette sequenze di propeptidi e due di dette sequenze di BMP9 matura.

9) Polipeptide per l'uso come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la variante di BMP9 o la variante di pro.BMP9 comprendono un mutante di sostituzione, delezione o inserimento della sequenza amminoacidica dell'ID SEQ n. 4, ad esempio un mutante di sostituzione della sequenza amminoacidica dell'ID SEQ n. 4.

10) Polipeptide per l'uso come in 9, in cui il mutante di sostituzione della sequenza amminoacidica dell'ID SEQ n. 4 comprende una o più, quale una o due, delle seguenti sostituzioni: F362A, D366A, I375A, L379A, S402A, D408A, Y416A e Y418A.

11) Variante di BMP9, comprendente la sequenza amminoacidica dell'ID SEQ n. 5 o la sequenza amminoacidica dell'ID SEQ n. 6.

12) Composizione farmacologica comprendente la variante di BMP9 della rivendicazione 11.

13) Vettore comprendente una sequenza nucleotidica codificante per una variante di BMP9 priva di attività osteogenetica o una variante di pro.BMP9 priva di attività osteogenetica, per l'uso nella cura di una malattia vascolare o malattia respiratoria.

14) Vettore per l'uso come in 13, in cui il vettore è un vettore virale, quale un vettore virale scelto tra un: retrovirus, adenovirus, lentivirus, herpes simplex, vaccinia e virus adeno-associati, in particolare un virus adeno-associato.

“Per traduzione conforme del testo del brevetto europeo

N° 3 166 628”

(cd)

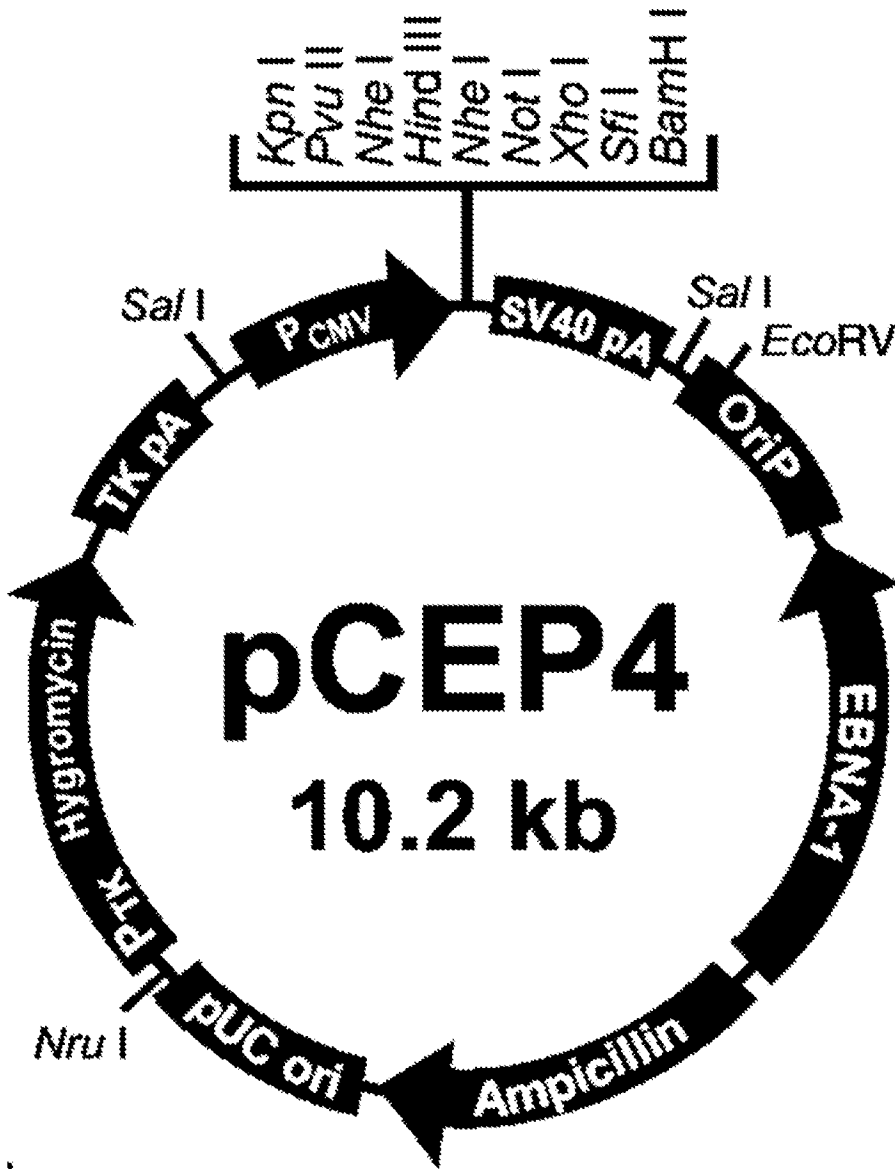


FIGURA 1

Franco

2/7

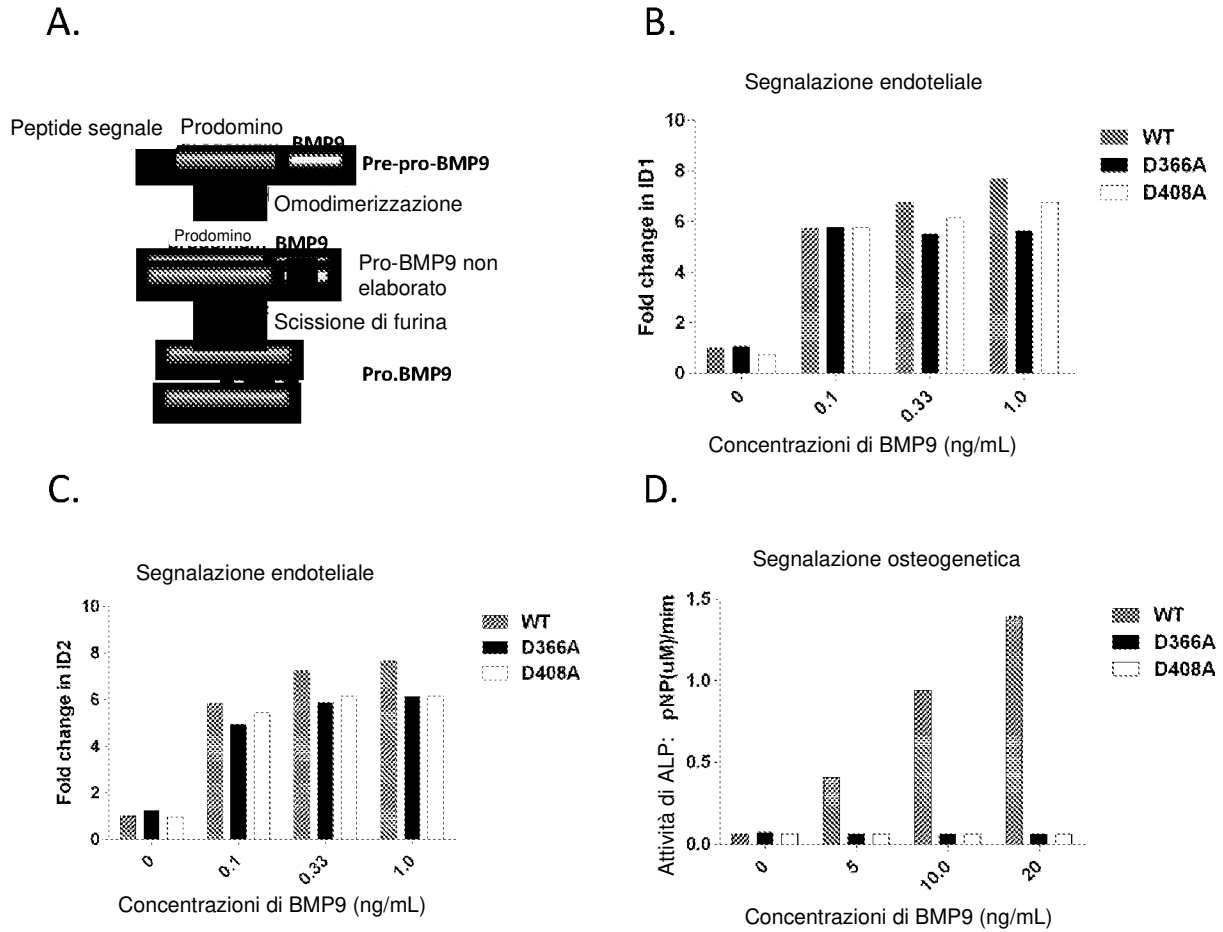


FIGURA 2

Frankfort

3/7

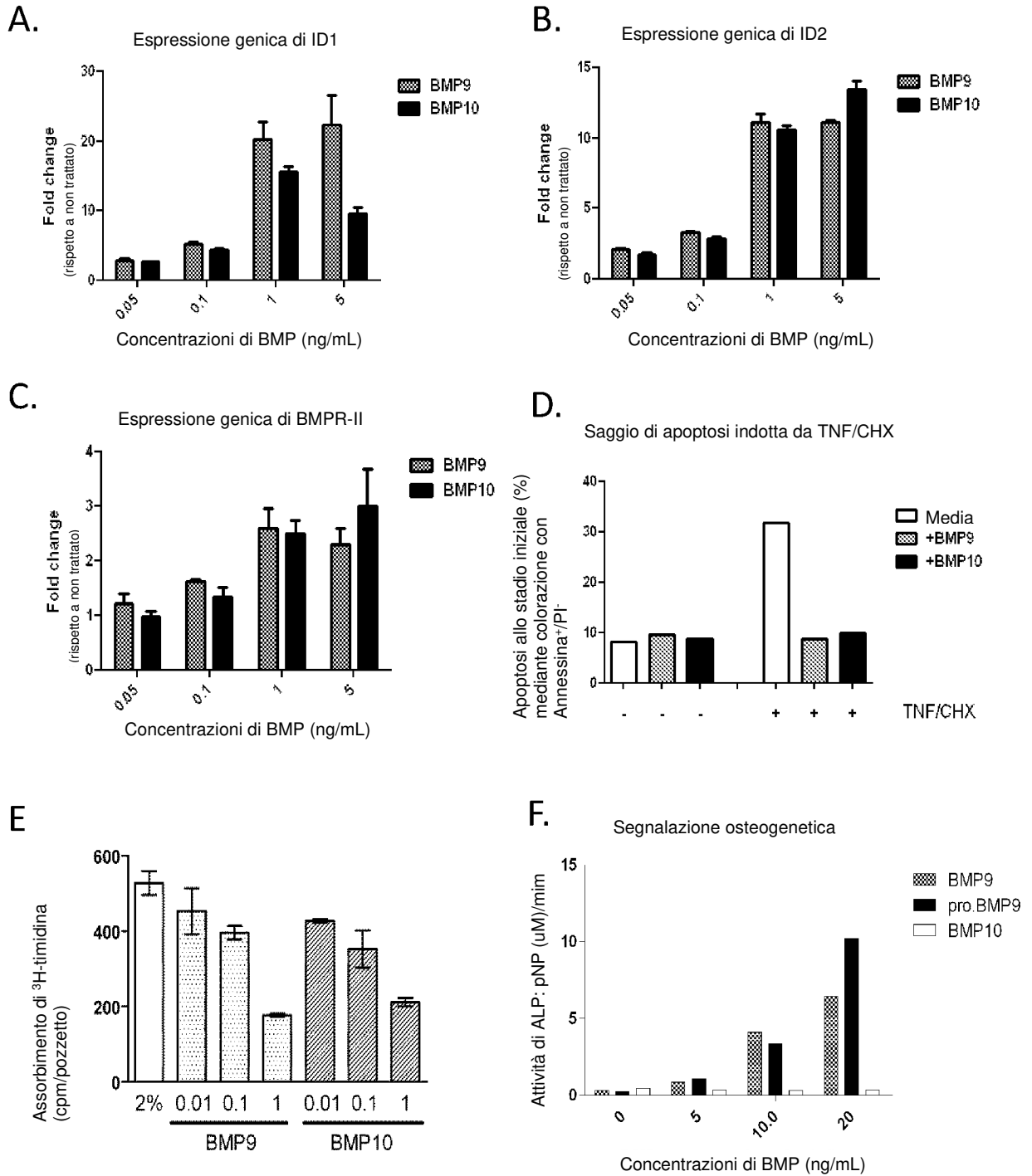


FIGURA 3

Frankfort

4/7

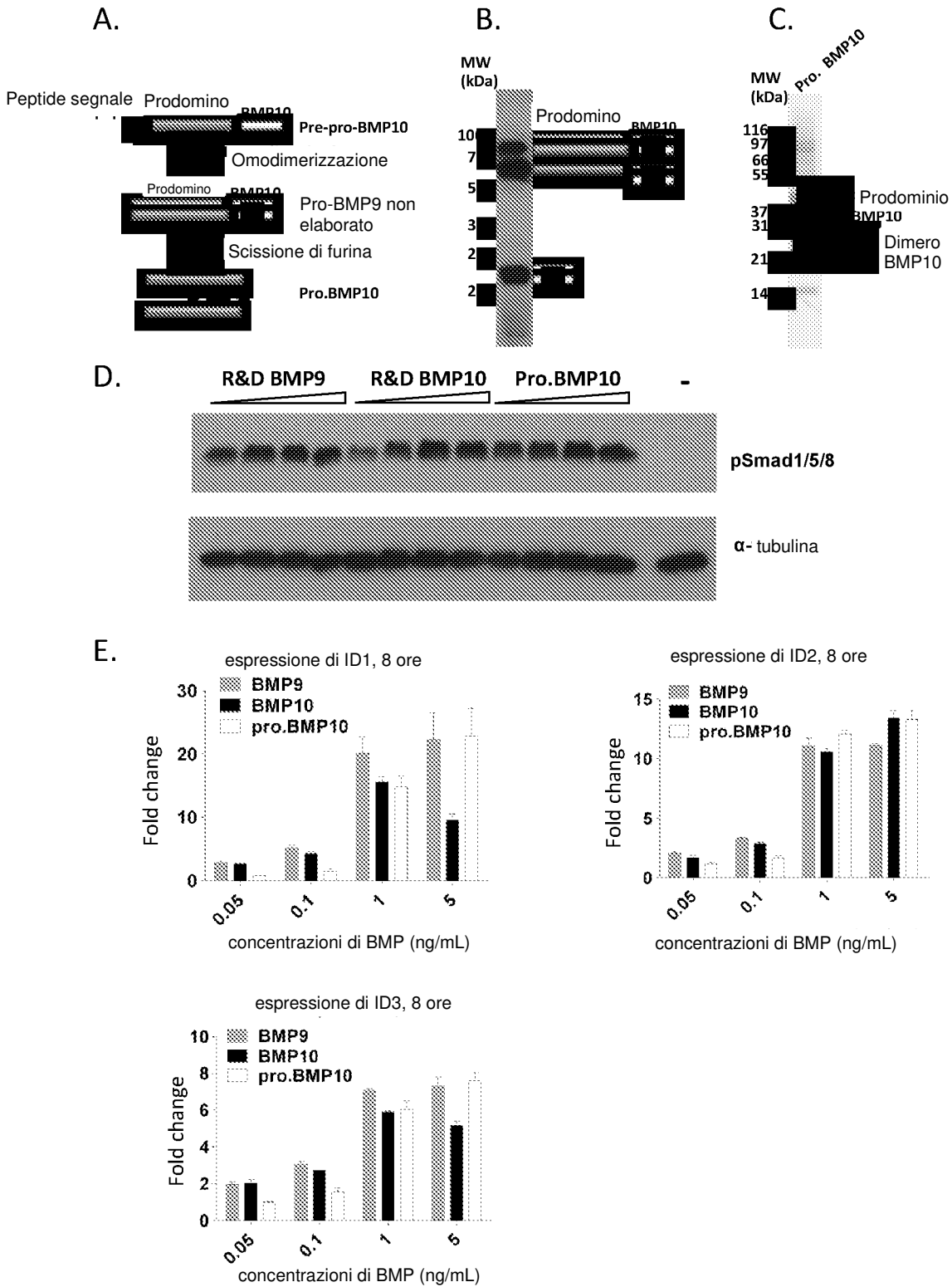


FIGURA 4

Frankfurt

5/7

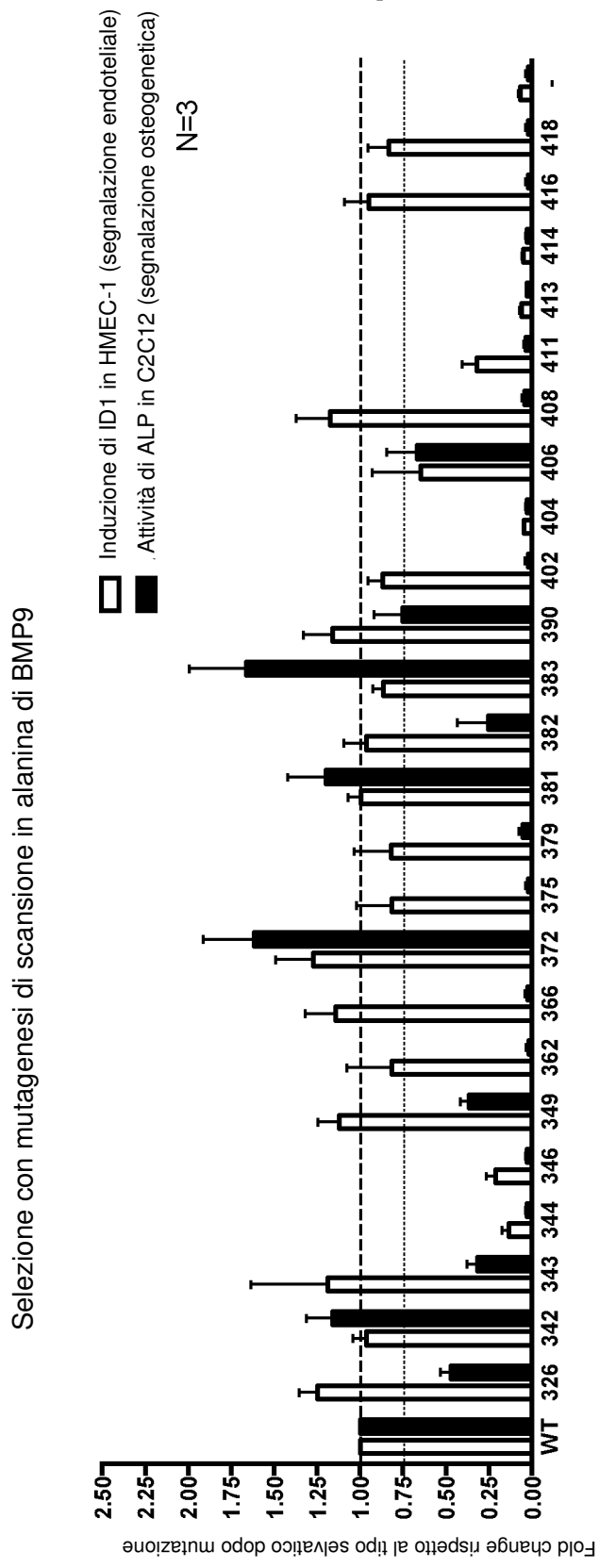


FIGURA 5

Frankfurt

6/7

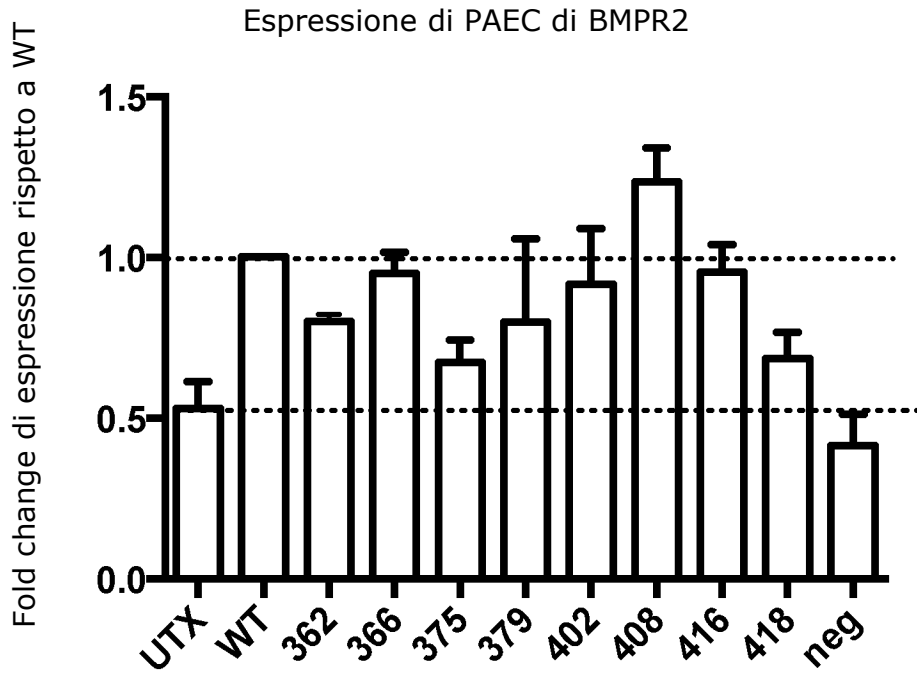


FIGURA 6

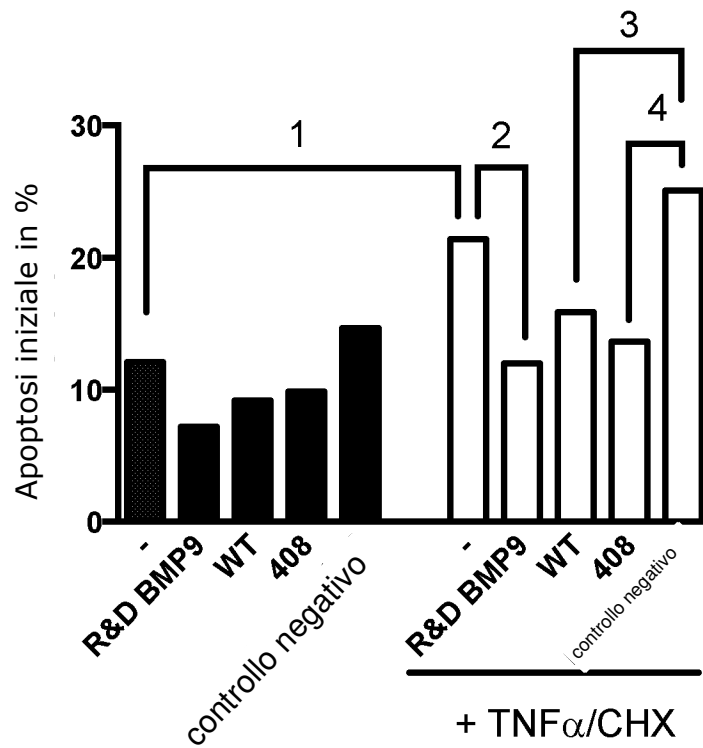


FIGURA 7

Frankfurt

7/7

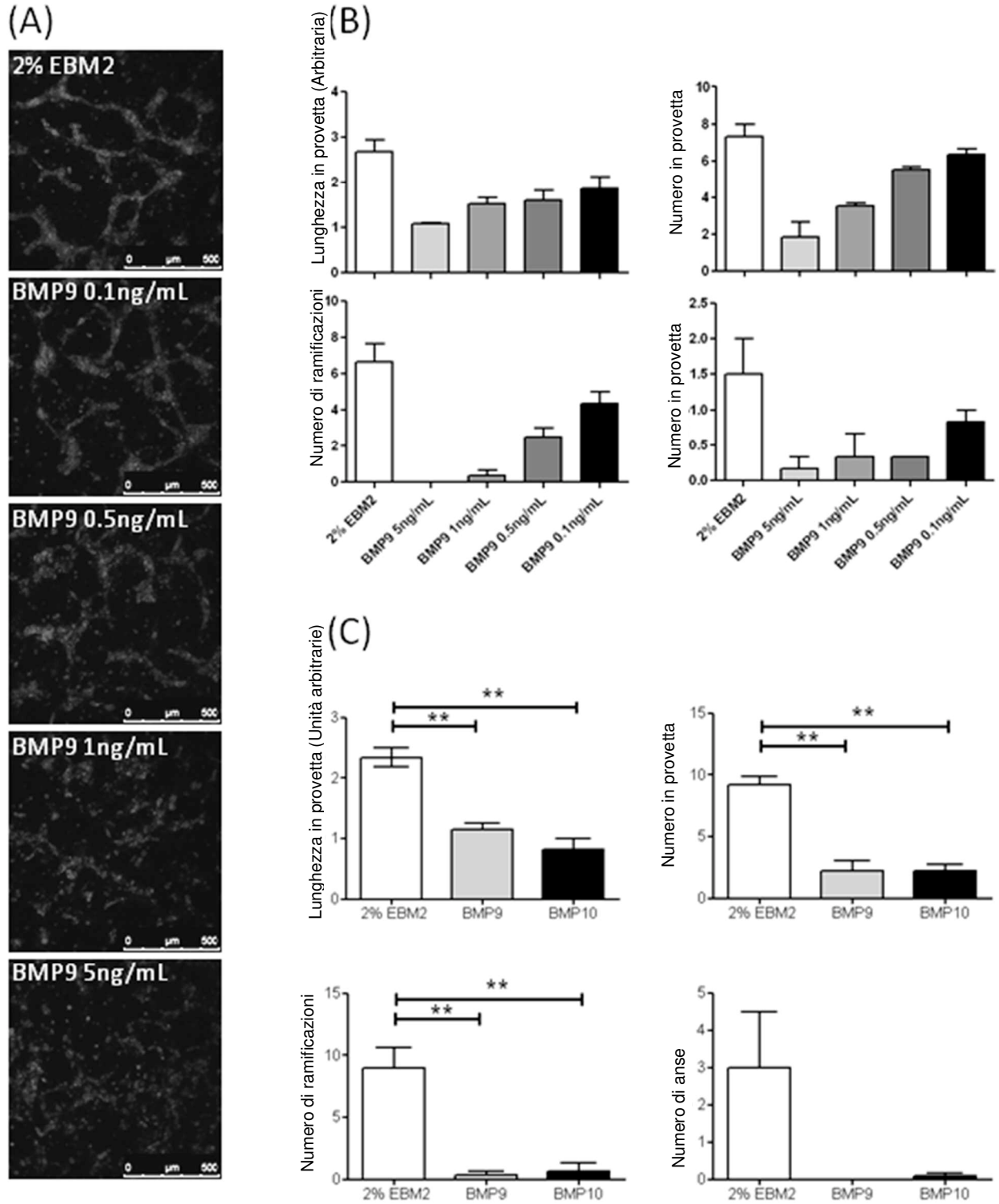


FIGURA 8