



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(51) Int Cl⁷

(11) 320119

C 07 K 14/51, 14/495, 19/00

C 12 N 15/12, 15/62

(13) B1

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19954492	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1994.05.12 PCT/US94/05288
(22)	Inng.dag	1995.11.08	(85)	Videreføringsdag	1995.11.08
(24)	Løpedag	1994.05.12	(30)	Prioritet	1993.05.12, US, 61464
(41)	Alm.tilgj	1995.11.08			
(45)	Meddelt	2005.10.31			
(73)	Innehaver	Genetics Institute LLC, 87 Cambridge Park Drive, Cambridge, MA 02140, US			
(72)	Oppfinner	John M Wozney, 59 Old Bolton Road, Hudson, MA 01749, US Anthony J Celeste, 86 Packard Street, Hudson, MA 01749, US			
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 6963 St Olavs Plass, 0130 OSLO, NO			

(54)	Benevnelse	Benmorfogenetisk protein-11 (BMP-11), DNA-molekyl som koder for dette, samt vektorer og vertceller inneholdende DNA-molekylet og fremgangsmåte for fremstilling av BMP-11.			
(56)	Anførte publikasjoner	EP, 409 472 TRENDS IN GENETICS, VOL. 8, NO. 3, MAR. 1992, SIDE 97-102 US, 5 187 076 WO, A, 91 18098 WO, A, 92 05199 WO, A, 93 00432			
(57)	Sammen drag				

Rensede BMP-11 proteiner og fremgangsmåte for fremstilling av disse er beskrevet. Rekombinante DNA molekyler kodende for BMP-11 proteiner er også beskrevet. Proteinene kan være nyttige for å regulere follikel stimulerende hormon, så som for prevensjon. I tillegg kan proteinene være nyttige for induksjon av ben, brusk og/eller andre bindevev.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en ny familie rensede proteiner betegnet BMP-11, DNA molekyler som koder for disse og fremgangsmåter for oppnåelse derav.

Oppfinnerne har tidligere betegnet BMP-11 proteinene som aktivin WC. BMP-11 proteinene kan være nyttige for å indusere ben og/eller bruskdannelsen og for å oppnå
 5 heling av sår og vevsreparasjon, eller for å øke aktiviteten til andre morfogeniske proteiner. BMP-11 proteinene kan også være nyttige for å regulere produksjonen av follikkel stimulerende hormon, for prevensjon, for å fremme neuronal celleoverlevelse, for å stimulere hematopoiesen og for å undertrykke utviklingen av gonade tumorer.

10 US-PS 4.798.885 beskriver DNA kodende for prepro inhibin α og β kjeder. US-PS 5.071.834 beskriver farmasøytiske sammensetninger av aktivin med to β kjeder formulert i en farmasøytisk akseptabel bærer.

US-PS 5.102.807 beskriver et rensset inhibin protein som undertrykker produksjonen av
 15 FSH uten å undertrykke produksjonen av luteiniserende hormon.

BMP-11 proteinet er et medlem av TGF- β superfamilien av proteiner. TGF- β superfamilien innbefatter familien av proteiner kjent som benmorfogenetiske proteinet (BMP), samt en gruppe proteiner som er betegnet inhibin- β . Som videre beskrevet, når
 20 dimerisert med annen BMP-11 (homodimer) blir BMP-11 proteinet ventet å demonstrere BMP-11 aktivitet, som ytterligere beskrevet heri, og som kan bli målt i henhold til analyser beskrevet i eksemplene heri. Når dimerisert som en heterodimer med inhibin- α proteiner eller med andre inhibin- β proteiner er det ventet at inhibin- β /BMP-11 virker på produksjonen av follikkel stimulerende hormon (FSH), som
 25 ytterligere beskrevet heri. Det er videre ventet at i homodimerisk form eller i heterodimerisk form med et annet medlem av benmorfogenetisk proteinfamilie vil BMP-11 utvise BMP aktivitet, dvs. evnen til å indusere dannelsen av ben, brusk og/eller andre bindevev. Avhengig av miljøet til BMP-11 kan den danne dimerer som vil demonstrere enten aktivin eller inhibin aktivitet, eller ben, brusk og/eller annen
 30 bindevevs-induserende aktivitet. BMP-11 aktiviteten er følgelig definert som evnen til å regulere produksjonen av FSH i analysen beskrevet i eksempel 8 heri, eller evnen til å indusere dannelsen av ben, brusk og/eller annet bindevev i analysene beskrevet i eksemplene 5 til 7 heri.

35 Proteiner betegnet inhibiner og aktiviner blir produsert i gonadene og eksisterer naturlig i follikulærvæsken. Disse proteinene virker på nivået til fremre hypofysekjertel for å inhibere (inhibiner) eller stimulere (aktiviner) frigjøringen av follikkel stimulerende

hormon (FSH) for en oversikt se for eksempel Ying, S.-Y., *Endocr. Rev.*, 9:267-293 (1988) eller Ling, N. et al., *Vitamins and Hormones*, 44:1-46 (Academic Press 1988)]. Dimeriske proteiner bestående av en kjede inhibin α og en kjede inhibin β (β_A eller β_B) blir betegnet inhibiner og er karakterisert ved deres evne til å inhibere frigjøring av

5 follikkelstimulerende hormon (FSH), mens andre dimeriske proteiner bestående av to kjeder inhibin β (β_A eller β_B) blir betegnet aktiviner og er kjennetegnet ved deres evne til å stimulere frigjøring av follikkel stimulerende hormon (FSH) (se for eksempel Ling et al., *Nature*, 321:779-782 (1986) eller Vale et al., *Nature*, 321:776-779 (1986) eller Mason et al., *Nature*, 318:659-663 (1985) eller Forage et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*

10 *USA*, 83:3091-3095 (1986)].

Det er anerkjent at FSH stimulerer utviklingen av egg i ovarier fra pattedyr (Ross et al., i *Textbook of Endocrinology*, ed. Williams, s. 355 (1981) og at omfattende stimulering av ovariene med FSH vil føre til multiple ovulasjoner. FSH er også viktig for testikulær

15 funksjon. BMP-11, i heterodimerer med et medlem av inhibin- α familien, kan være nyttig som et prevensjonsmiddel basert på evnen som inhibinet har til å redusere fertiliteten hos hunnpattedyr og redusere spermatogenesisen hos hannpattedyr. Administrering av tilstrekkelige mengder av inhibiner kan indusere fertiliteten til disse pattedyrene. BMP-11, som en homodimer eller som en heterodimer med andre

20 proteinheter av inhibin- β gruppen, kan være nyttig som et fertilitets induserende terapeutisk middel, basert på evnen som aktivin molekyler har til å stimulere FSH frigjøringen fra cellene i fremre hypofyse. Se for eksempel US-PS 4.798.885. BMP-11 kan også være nyttig for å fremme forløpet av fertiliteten i seksuelt umodne pattedyr, for å øke livsvarig formeringsytelse i husdyr så som kuer, sauer og griser. Det blir

25 videre betraktet at BMP-11 kan være nyttige for å fremme neuronal celleoverlevelse (se for eksempel Schubert et al., *Nature*, 344:868-870 (1990)], modulering av hematopoiesen ved å indusere differensieringen av erytroide celler (se for eksempel Broxmeyer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:9052-9056 (1988) eller Eto et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 142:1095-1103 (1987)], for å undertrykke utviklingen

30 av gonadal tumorer (se for eksempel Matzuk et al., *Nature*, 360:313-319 (1992)] eller for å øke aktiviteten til benmorfogeniske proteiner (se for eksempel Ogawa et al., *J. Biol. Chem.*, 267:14233-14237 (1992)].

BMP-11 proteinet kan bli ytterligere karakterisert ved deres evne til å modulere

35 frigjøringen av follikkel stimulerende hormon (FSH) ved etablering av in vitro bioanalyser ved anvendelse av fremre hypofyseceller fra rotter som beskrevet (se for eksempel Vale et al., *Endocrinology*, 91:562-572 (1972); Ling et al., *Nature*, 321:779-

782 (1986) eller Vale et al., nature, 321:776-779 (1986)]. Det er vurdert at BMP-11 proteinet ifølge oppfinnelsen, når bestående av en homodimer eller en heterodimer med andre inhibin β kjeder, vil utvise stimulerende virkninger på frigjøringen av follikkel stimulerende hormon (FSH) fra fremre hypofyse celler som beskrevet i (Ling et al.,
 5 Nature, 321:779-782 (1986) eller Vale et al., Nature, 321:776-779 (1986)]. Det er videre blitt betraktet at BMP-11 proteinet ifølge oppfinnelsen, når bestående av en heterodimer med inhibin α kjeden, vil inhibere frigjøringen av follikkel stimulerende hormon (FSH) fra fremre hypofyse celler som beskrevet (se for eksempel Vale et al., Endocrinology, 91:562-572 (1972). Avhengig av den bestemte sammensetningen er det følgelig ventet
 10 at BMP-11 proteinet ifølge oppfinnelsen kan ha motsatte virkninger på frigjøringen av follikkelstimulerende hormon (FSH) fra fremre hypofyse.

Aktivin A (den homodimeriske sammensetningen til inhibin β_A) har blitt vist å ha erytropoietisk-stimulerende aktivitet (se for eksempel Eto et al., Biochem. Biophys.
 15 Res. Commun., 142:1095-1103 (1987) og Murata et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85:2434-2438 (1988) og Yu et al., Nature, 330:765-767 (1987)]. Det antas at BMP-11 proteinet ifølge oppfinnelsen har en lignende erytropoietisk-stimulerende aktivitet. Denne aktiviteten til BMP-11 proteinet kan bli ytterligere karakterisert ved evnen som BMP-11 proteinet har til å demonstrere erytropoietin aktivitet i biologisk analyse utført
 20 ved anvendelse av human K-562 cellelinjen som beskrevet av [Lozzio et al., Blood, 45:321-334 (1975) og US-PS 4.071.834).

Strukturene til flere proteinet, betegnet BMP-1 til og med BMP-9, er tidligere blitt bestemt. De unike induserende aktivitetene til disse proteinene, sammen med deres til-
 25 stedevarrelse i ben, tyder på at de er viktige regulatorer av benrepareringsprosesser, og kan være involvert i den normale opprettholdelsen av benvev. BMP-11 proteinet ifølge foreliggende oppfinnelse er relatert til ovennevnte BMP-proteiner, og er ventet å ha felles BMP-aktiviteter så som evnen til å indusere ben, brusk og/eller annet bindevev, så som sene eller ligament, og sårhelingsaktivitetene til BMP. Det er i tillegg ventet at
 30 proteinene ifølge oppfinnelsen kan virke sammen med eller kanskje synergistisk med andre beslektede proteiner og vekstfaktorer. Ytterligere terapeutiske metoder og sammensetninger omfatter følgelig en terapeutisk mengde av minst et BMP-11 protein ifølge oppfinnelsen med en terapeutisk mengde av minst et av andre BMP-proteiner beskrevet i egne patenter og søknader beskrevet nedenfor. Slike kombinasjoner kan
 35 omfatte separate molekyler av BMP proteiner eller hetero molekyler bestående av forskjellige BMP deler. BMP-11 proteinene kan videre bli kombinert med andre midler som er fordelaktige for behandling av ben og/eller bruskdefekter, sår eller vevet som

vurderes. Disse midlene innbefatter forskjellige vekstfaktorer så som epidermal vekstfaktor (EGF), fibroblastvekstfaktor (FGF), blodplateavledet vekstfaktor (BDGF), transformerende vekstfaktorer (TGF- α og TGF- β) og k-fibroblastvekstfaktor (kFGF), parathyroid hormon (PTH), leukemi inhibitorisk faktor (LIF/HILDA/DIA),
 5 insulinlignende vekstfaktorer (IGF-I og IGF-II). Deler av disse midlene kan også bli anvendt i sammensetningene.

Foreliggende oppfinnelse angår således et isolert DNA-molekyl, kjennetegnet ved at det omfatter en DNA-sekvens som koder for et BMP-11-protein som viser BMP-11-
 10 aktivitet, der DNA-sekvensen er valgt fra gruppen bestående av:

- a) nukleotid nr. 375 eller 390 til nr. 704 ifølge SEQ ID NO: 1;
- b) nukleotidene nr. 760 eller 775 til nr. 1086 ifølge SEQ ID NO: 10,
- c) nukleotider kodende for aminosyrene 1 eller 6 til 109 ifølge SEQ ID NO: 2;
- d) nukleotider kodende for aminosyrene 1 eller 6 til 109 ifølge SEQ ID NO: 11
 15 og
- e) mutanter, varianter eller ekvivalente degenerative kodonsekvenser ifølge (a) eller (b), der mutanten, varianten eller den degenerative kodonsekvens koder for et protein som har tilsvarende biologisk aktivitet som BMP-11 kodet av sekvensene i a) og b).

20 Bovin BMP-11 DNA sekvens (SEQ ID NO: 1) og aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 2) og human BMP-11 DNA sekvens (SEQ ID NO: 10) og aminosyresekvensen (SEQ ID NO: 11) er angitt i sekvenslisten heri. Aktivinproteinene har evne til å regulere produksjonen av follikkelstimulerende hormon (FSH) og BMP-11 kan følgelig være
 25 nyttig som et befruktningshindrende middel eller et fertilitetsinduserende terapeutisk middel. I homodimerisk form eller i heterodimerer med proteiner av inhibin- β gruppen er renset BMP-11 proteinet ventet å demonstrere aktivin aktivitet, og kan bli anvendt for å stimulere FSH. Det er i tillegg ventet at renset BMP-11 protein kan være nyttig for induksjon av ben, brusk og/eller annet bindevev.

30 Bovin BMP-11 kan bli produsert ved dyrking av en celle transformert med en DNA sekvens omfattende nukleotid nr. 375 til nukleotid nr. 704 som vist i SESEQ ID NO: 1 og isolering og rensing fra kulturmediet et protein karakterisert ved aminosyresekvensen omfattende aminosyren nr. 1 til nr. 109 som vist i SEQ ID NO: 2 vesentlig fri for andre
 35 proteinholdige materialer som det blir produsert sammen med.

Foreliggende oppfinnelse angår således videre en vertscelle, kjennetegnet ved at den er

Humán BMP-11 er ventet å være homolog med bovin BMP-11. Oppfinnelsen innbefatter følgende fremgangsmåter for oppnåelse av DNA-sekvenser kodende for human BMP-11, DNA-sekvenser oppnådd ifølge disse fremgangsmåtene og det humane proteinet som blir kodet av disse DNA sekvensene. Denne fremgangsmåten beskriver
5 anvendelse av den bovine BMP-11 nukleotidsekvensen eller delene derav for å konstruere prober for å screene biblioteker for det humane genet eller fragmentene derav ved anvendelse av standardteknikker. En DNA sekvens kodende for en del av humant BMP-11 protein (SEQ ID NO: 3) og tilsvarende aminosyresekvens (SEQ ID
10 NO: 4) er angitt i sekvenslisten.

Disse sekvensene kan også bli anvendt for å konstruere prober for å oppnå det fullstendige humane BMP-11 genet ved hjelp av standardteknikker. Human BMP-11 kan bli produsert ved dyrking av en celle transformert med BMP-11 DNA sekvensen og
15 isolering og rensing av BMP-11 fra dyrkningsmediet. Det rensede uttrykte proteinet er vesentlig fri for andre proteinholdige materialer som det blir produsert sammen med, samt fra andre kontaminerende stoffer.

Foreliggende oppfinnelse angår videre rensset benmorfogenisk protein-11 (BMP-11) polypeptid, kjennetegnet ved at det omfatter aminosyresekvensen fra aminosyre nr. 1 til
20 nr. 109 som angitt i SEQ ID NO: 2.

Foreliggende oppfinnelse angår videre rensset benmorfogenisk protein-11 (BMP-11) polypeptid, kjennetegnet ved at det omfatter aminosyresekvensen fra aminosyre nr. 1 til
25 nr. 109 som angitt i SEQ ID NO: 11.

Foreliggende oppfinnelse angår videre rensset BMP-11 polypeptid, kjennetegnet ved at nevnte polypeptid er en dimer hvor hver subenhet omfatter aminosyresekvensen fra aminosyre nr. 1 til nr. 109 ifølge SEQ ID NO: 11.

30 Foreliggende oppfinnelse angår videre rensset benmorfogenisk protein-11 (BMP-11) polypeptid ifølge oppfinnelsen, kjennetegnet ved at nevnte polypeptid er en dimer som omfatter to subenheter, hvori en subenhet omfatter aminosyresekvensen fra aminosyre nr. 1 til aminosyre nr. 109 ifølge SEQ ID NO: 11, og en subenhet som omfatter en
35 aminosyresekvens fra et benmorfogenisk protein valgt fra gruppen bestående av BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9 og BMP-10.

Det isolerte rensede proteinet blir betraktet å demonstrere evnen til å regulere produksjonen av FSH. Proteinene ifølge oppfinnelsen kan bli ytterligere karakterisert ved evnen til å regulere produksjonen av follikkel stimulerende hormon (FSH) for å etablere in vitro bioanalyser ved anvendelse av fremre hypofyse celler fra rotter. BMP-11 proteinene kan også bli karakterisert ved evnen til å indusere dannelsen av ben, brusk og/eller annet bindevev, for eksempel i rotteben dannelses analysen beskrevet nedenfor.

Farmasøytiske sammensetninger inneholdende en terapeutisk effektiv mengde av et BMP-11 protein i en farmasøytisk akseptabel bærer kan frembringes. BMP-11 sammensetningene kan være nyttige for regulering av follikkel stimulerende hormon og kan være nyttig i befruktningshindrende midler. Sammensetningene kan videre innbefatte minst et annet terapeutisk nyttig middel så som BMP-proteinene BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6 og BMP-7, beskrevet blant annet i US-PS 5.108.922; 5.013.649; 5.116.738; 5.106.748; 5.187.076; og 5.141.905; BMP-8 beskrevet i PCT-publikasjonen WO91/18098; og BMP-9, beskrevet i PCT-publikasjonen WO93/00432, og BMP-10, beskrevet i inngitte patentsøknad serienr. 08/061.695, inngitt mai 12, 1993. BMP-11 sammensetningene kan også være nyttige for et antall anvendelser som involverer regulering av produksjonen av follikkelstimulerende hormon, inkludert befruktningshindrende middel. Disse fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen omfatter administrering til en pasient som trenger slik behandling, en effektiv mengde BMP-11. Sammensetningene kan omfatte, i tillegg til et BMP-11 protein, andre medlemmer av inhibin- β gruppen av proteiner eller inhibin- α proteiner, samt andre terapeutiske nyttige midler inkludert vekstfaktorer så som epidermal vekstfaktor (EGF), fibroblastvekstfaktor (FGF), transformerende vekstfaktor (TGF- α og TGF- β) og insulinlignende vekstfaktor (IGF).

BMP-11 sammensetningene kan også være nyttige for behandling av et antall ben og/eller brusk mangler, periodontal sykdom og forskjellige typer av sår. Disse fremgangsmåtene omfatter administrering til en pasient som trenger slik ben og/eller bruskdannelse, sårheling eller vevsreparering, en effektiv mengde av et BMP-11 protein. Disse fremgangsmåtene kan også innbefatte administrering av et protein ifølge oppfinnelsen sammen med minst et av de nye BMP proteinene beskrevet i inngitte patenter og søknader beskrevet ovenfor. I tillegg kan disse fremgangsmåtene også omfatte administrering av et BMP-11 protein med andre vekstfaktorer som innbefatter EGF, FGF, TGF- α , TGF- β og IGF.

Et ytterligere aspekt av oppfinnelsen er DNA sekvenser kodende for ekspresjon av et

BMP-11 protein. Slike sekvenser omfatter sekvensen av nukleotidene i en 5' til 3' retning illustrert i SEQ ID NO: 1 eller DNA sekvenser som hybridiserer under stringente betingelser med DNA sekvensen ifølge SEQ ID NO: 1 og som koder for et protein med BMP-11 aktivitet. Til slutt er mutanter eller andre variasjoner av sekvensene til SEQ ID NO: 1, enten slike nukleotidforandringer resulterer i forandringer i peptidsekvensen eller ikke, innbefattet i foreliggende oppfinnelse.

Et ytterligere aspekt av oppfinnelsen er DNA sekvenser kodende for ekspresjon av et BMP-11 protein. Slike sekvenser innbefatter sekvensen til nukleotidene i en 5' til 3' retning illustrert i SEQ ID NO: 1 eller SEQ ID NO: 10, og DNA sekvenser som, unntatt for degenerasjonen til den genetiske koden, er identiske med DNA sekvensen ifølge SEQ ID NO: 1 eller SEQ ID NO: 10, og koder for proteinet ifølge SEQ ID NO: 2 eller SEQ ID NO: 11. Videre innbefattet i foreliggende oppfinnelse er DNA sekvenser som hybridiserer under stringente betingelser med DNA sekvensen ifølge SEQ ID NO: 1 eller SEQ ID NO: 10 og som koder for et protein med BMP-11 aktivitet. Til slutt omfatter oppfinnelsen mutanter eller andre variasjoner av sekvensene ifølge SEQ ID NO: 1 eller SEQ ID NO: 10, uansett om slike nukleotidforandringer resulterer i forandringer i peptidsekvensen eller ikke, men hvor peptidsekvensen fortsatt har BMP-11 aktivitet.

Et ytterligere aspekt av oppfinnelsen innbefatter vektorer omfattende en DNA sekvens som beskrevet ovenfor i operativ assosiasjon med en ekspresjonskontrollsekvens.

Disse vektorene kan bli anvendt i en ny fremgangsmåte for fremstilling av et BMP-11 protein ifølge oppfinnelsen hvor en cellelinje transformert med en DNA sekvens kodende for et BMP-11 protein i operativ assosiasjon med en ekspresjonskontrollsekvens derav blir dyrket i et egnet dyrkningsmedium og et BMP-11 protein blir isolert og rensset derfra. Denne fremgangsmåten kan anvende et antall kjente celler både prokaryot og eukaryot som vertsceller for ekspresjon av polypeptidet.

Et ytterligere aspekt av oppfinnelsen innbefatter fremgangsmåte for fremstilling av et rensset benmorfogenisk protein-11 (BMP-11) protein, kjennetegnet ved at den omfatter følgende trinn:

- (a) dyrking av en vertscelle ifølge oppfinnelsen og
- (b) isolering og rensing av nevnte BMP-11 protein fra dyrkningsmediet.

Andre aspekter og fordeler ifølge foreliggende oppfinnelse vil fremkomme ved vurdering av den følgende detaljerte beskrivelsen og foretrukne utførelsesformer.

Beskrivelse av sekvensene

- 5 SEQ ID NO: 1 er en delnukleotidsekvens av bovin BMP-11 kodende for moden bovin BMP-11 polypeptid.

SEQ ID NO: 2 er aminosyresekvensen til et delpropeptid og fullstendig moden bovin BMP-11 polypeptid kodet av SEQ ID NO: 1.

10

SEQ ID NO: 3 er en delnukleotidsekvens av human BMP-11.

SEQ ID NO: 4 er en delaminosyresekvens for humant BMP-11 polypeptid kodet av SEQ ID NO: 3.

15

SEQ ID NO: 5 og 6 er primere for bovin BMP-11 anvendt for å isolere human BMP-11 eller andre BMP-11 proteiner.

20

SEQ ID NO: 7 er en DNA sekvens som blir skutt inn i pMT2 CXM for å tilføre et XhoI gjenkjenningssete nær SV40 replikasjonsorigo.

SEQ ID NO: 8 er en DNA sekvens skutt inn i pMT21 for å innskyte et XhoI gjenkjenningssete oppstrøms fra DHFR genet.

25

SEQ ID NO: 9 er en DNA sekvens som omfatter en del av EMC virus ledersekvensen.

SEQ ID NO: 10 er en DNA sekvens kodende for et delpropeptid og fullstendig modent humant BMP-11 protein.

30

SEQ ID NO: 11 er aminosyresekvensen til et delpropeptid og fullstendig modent humant BMP-11 protein kodet av SEQ ID NO: 10.

BMP-11

- 35 Bovin BMP-11 nukleotidsekvens (SEQ ID NO: 1) og kodet aminosyresekvens (SEQ ID NO: 2) og human BMP-11 nukleotidsekvens (SEQ ID NO: 10) og kodet aminosyresekvens (SEQ ID NO: 11) er angitt i sekvenslisten heri. Rensede bovine BMP-11 proteiner ifølge foreliggende oppfinnelse blir produsert ved dyrking av en

vertscelle transformert med en DNA-sekvens omfattende DNA kodende sekvens ifølge SEQ ID NO: 1 fra nukleotid nr. 375 til nr. 704 eller den DNA kodende sekvensen til SEQ ID NO: 10 fra nukleotid nr. 760 til nr. 1086 og isolering og rensing fra dyrkningsmediet et protein som inneholder aminosyresekvensen eller en vesentlig homolog sekvens som representert ved aminosyrene nr. 1 til nr. 109 ifølge SEQ ID NO: 2 eller aminosyrene 1 til 109 ifølge SEQ ID NO: 11. For produksjon av BMP-11 proteiner i pattedyrceller omfatter DNA sekvensen videre et egnet propeptid koblet i ramme med ovennevnte DNA kodende sekvenser for BMP-11. Propeptidet kan være det native propeptidet ifølge BMP-11 eller et propeptid fra et annet medlem av TGF- β superfamilien.

Human BMP-11 sekvens ifølge foreliggende oppfinnelse blir oppnådd ved anvendelse av hele eller fragmenter av bovin BMP-11 DNA sekvens eller del human BMP-11 sekvens ifølge SEQ ID NO: 3 som en probe. Human BMP-11 DNA sekvens omfatter følgelig DNA sekvensen ifølge nukleotidene nr. 28 til nr. 185 ifølge SEQ ID NO: 3. Humant BMP-11 protein omfatter aminosyresekvensen ifølge aminosyrene nr. 1 til nr. 52 ifølge SEQ ID NO: 4.

Det er ventet at BMP-11, uttrykt fra pattedyrcellene så som CHO celler, eksisterer som en heterogen populasjon av aktive arter av BMP-11 proteiner med varierende N-terminale ender. Det er ventet at aktive arter vil omfatte en aminosyresekvens begynnende minst med cysteinresidiet ved aminosyre nr. 6 ifølge SEQ ID NO: 1 eller SEQ ID NO: 10, eller videre i den N-terminale retningen. Det er følgelig ventet at DNA-sekvensene kodende for aktive BMP-11 proteiner vil omfatte nukleotidene nr. 375 eller nr. 390 til 701 ifølge SEQ ID NO: 3 eller nukleotidene nr. 760 eller nr. 775 til nr. 1086 ifølge SEQ ID NO: 10, og kan omfatte ytterligere nukleotidsekvens i 5' retningen ifølge SEQ ID NO: 1 eller SEQ ID NO: 10.

Den N-terminale enden av human BMP-11 er blitt bestemt eksperimentelt ved ekspresjon i *E. coli* som følger: [M]NLGLDXDEHSSE, hvor X angir et aminosyreresidie uten et klart signal som er i samsvar med en beliggenhet av cystein ved N-posisjon. Det er følgelig ventet at denne arten av BMP-11 vil ha en N-terminal ende ved aminosyre nr. 1 ifølge SEQ ID NO: 1 eller SEQ ID NO: 10 og DNA sekvenser kodende for disse formene vil omfatte nukleotidene nr. 375 til nr. 701 ifølge SEQ ID NO: 1 (bovin) eller nukleotidene nr. 760 til 1086 ifølge SEQ ID NO: 10 (human). Den tilsynelatende molekylvekten til human BMP-11 monomer ble bestemt ifølge SDS-PAGE å være omtrent 12 kD. Humant BMP-11 protein eksisterer som en klar, fargeløs

oppløsning i 0,1% trifluoreddiksyre.

BMP-11 proteiner isolert fra kulturmediet blir renset ved isolering av disse fra andre proteinholdige materialer som de blir koproduisert fra og fra andre tilstedeværende kontaminanter.

BMP-11 proteinene kan bli karakterisert ved evnen til å regulere produksjonen av FSH. BMP-11 proteinene kan ytterligere bli karakterisert ved evnen til å modulere frigjøringen av follikkelstimulerende hormon (FSH) i etablerte in vitro bioanalyser ved anvendelse av fremre hypofyseceller fra rotter som beskrevet (se for eksempel Vale et al., Endocrinology, 91:562-572 (1972); Ling et al., Nature, 321:779-782 (1986) eller Vale et al., Nature, 321:776-779 (1986)). BMP-11 proteiner kan også bli karakterisert ved evnen til å indusere dannelsen av ben, brusk og/eller bindevev. En slik vevs-induserende aktivitet til BMP-11 kan ytterligere bli karakterisert ved evnen til å indusere dannelse av ben, brusk og/eller annet bindevev i analyser beskrevet i eksemplene nedenfor.

BMP-11 proteinene angitt heri innbefatter også faktorer som blir kodet av sekvensene som ligner de til SEQ ID NO: 1 eller SEQ ID NO: 10, som hvor modifikasjoner er naturlig tilveiebrakt (for eksempel alleliske variasjoner i nukleotidsekvensen som kan resultere i aminosyreforandringer i polypeptider) eller med hensikt utførte omkonstrueringer. For eksempel kan syntetiske polypeptider fullstendig eller delvis duplikere kontinuerlige sekvenser av aminosyresidene ifølge SEQ ID NO: 2 eller SEQ ID NO: 11. Disse sekvensene kan i kraft av felles primær, sekundær eller tertiær strukturelle eller konformasjonsmessige karaktertrekk med inhibin- β polypeptider ifølge SEQ ID NO: 2 eller SEQ ID NO: 1 ha BMP-11 aktivitet felles. De kan følgelig bli anvendt som biologiske aktive substituenten for naturlig-forekommende BMP-11 polypeptider i terapeutiske formål.

Andre spesifikke mutasjoner av sekvensene ifølge BMP-11 proteinene beskrevet heri innbefatter modifikasjoner av glykosyleringssetene. Disse modifikasjonene kan innbefatte O-koblede eller N-koblede glykosyleringsseter. Fravær av glykosylering eller bare delglykosylering resulterer fra aminosyresubstitusjon eller delesjon ved asparagin-koblede glykosyleringsgjenkjenningsseter. Asparagin-koblede glykosyleringsgjenkjenningsseter omfatter tripeptidsekvenser som er spesifikt gjenkjent av hensiktsmessige cellulære glykosyleringsenzymene. Disse tripeptidsekvensene er enten asparagin-X-treonin eller asparagin-X-serin, hvor X vanligvis er en hvilken som helst

aminosyre. En forskjell med aminosyresubstitusjoner eller delesjoner av et glykosyleringsgjenkjenningssete (og/eller aminosyredelesjon ved andre posisjon) resulterer i ikke-glykosylering ved den modifiserte tripeptidsekvensen. Ekspresjon av BMP-11 proteinet i bakterielle celler resulterer i ikke-glykosylert protein uten å endre glykosyleringsgjenkjenningsssetene.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også nye DNA sekvenser frie for assosiasjon med DNA sekvenser kodende for andre proteinholdige materialer og kodende for ekspresjon av BMP-11 proteiner. Disse DNA sekvensene innbefatter de som er angitt i SEQ ID NO: 1 eller SEQ ID NO: 10 i en 5' til 3' retning og sekvenser som hybridiserer dertil under stringente hybridiseringsbetingelser, for eksempel 0,1X SSC, 0.1% SDS ved 65°C (se Maniatis et al., Molecular Cloning (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory (1982), s. 387 til 389) og som koder for et protein med BMP-11 aktivitet. Disse DNA sekvensene innbefatter også de som omfatter DNA sekvensen ifølge SEQ ID NO: 3 og de som hybridiserer dertil under stringente hybridiseringsbetingelser og som koder for et protein med BMP-11 aktivitet.

DNA sekvenser som koder for BMP-11 proteiner som blir kodet av sekvensene ifølge SEQ ID NO: 1 eller SEQ ID NO: 10, men som har annen kodonsekvens på grunn av degenerasjonen til den genetiske koden eller alleliske variasjoner (naturlig-forekommende baseforandringer i artspopulasjonen som kan resultere i aminosyreforandring) og så koder for nye faktorer beskrevet heri. Variasjoner i DNA sekvensene til SEQ ID NO: 1 eller SEQ ID NO: 10 som er forårsaket av punktmutasjoner eller ved induserte modifikasjoner (inkludert innskudd, delesjon og substitusjon) for å fremme aktiviteten, halveringstiden eller produksjonen av polypeptidene som blir kodet er også innbefattet i oppfinnelsen.

Et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse omfatter en ny fremgangsmåte for produksjon av BMP-11 proteiner. Fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse innbefatter dyrking av en egnet cellelinje som er blitt transformert med en DNA sekvens kodende for et BMP-11 protein ifølge oppfinnelsen under kontroll av kjente regulatoriske sekvenser. Transformerte vertsceller blir dyrket og BMP-11 proteinene isolert og renses fra dyrkningsmediet. De rensede proteinene er vesentlig fri for andre proteiner som de blir produsert sammen med samt fra andre kontaminanter.

Egnede celler eller cellelinjer kan være pattedyrceller, så som kinesisk hamster ovarieceller (CHO). Valg av egnede pattedyrvertsceller og fremgangsmåter for

transformasjon, dyrkning, amplifikasjon, screening, produktproduksjon og rensing er kjent innenfor fagområdet. Se for eksempel Gething og Sambrook, *Nature*, 293:620-625 (1981), eller alternativt Kaufman et al, *Mol. Cell. Biol.*, 5(7):1750-1759 (1985) eller Howley et al, US-PS 4.419.446. En annen egnet pattedyrcellelinje som er beskrevet i de
 5 vedlagte eksemplene er ape COS-1 cellelinjen. Pattedyrcelle CV-1 kan også være egnet.

Bakterielle celler kan også være egnede verter. For eksempel de forskjellige stammene av *E. coli* (for eksempel HB101, MC1061) er velkjente som vertsceller innen bioteknologiområdet. Forskjellige stammer av *B. subtilis*, *Pseudomonas*, andre bacilli
 10 og lignende kan også bli anvendt i denne fremgangsmåten.

Mange stammer av gjærceller kjent for fagfolk innenfor dette området kan også være tilgjengelige som vertsceller for ekspresjon av polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse. Hvor ønskelig kan insektsceller bli anvendt som vertsceller i
 15 fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse. Se for eksempel Miller et al., *Genetic Engineering*, 8:277-298 (Plenus Press 1986) og referanser sitert deri.

Et annet aspekt av foreliggende oppfinnelse tilveiebringer vektorer for anvendelse i fremgangsmåten for ekspresjon av disse nye BMP-11 polypeptidene. Vektorene
 20 inneholder fortrinnsvis totale nye DNA sekvenser beskrevet ovenfor som koder for de nye faktorene ifølge oppfinnelsen. Vektorene inneholder i tillegg hensiktsmessige ekspresjonskontrollsekvenser som muliggjør ekspresjon av BMP-11 proteinsekvensene. Alternativt er vektorer som inkorporerer modifiserte sekvenser beskrevet ovenfor også innbefattet i foreliggende oppfinnelse. I tillegg kan sekvenser ifølge SEQ ID NO: 1 eller
 25 SEQ ID NO: 10 eller andre sekvenser kodende for BMP-11 proteiner bli manipulert for å uttrykke moden BMP-11 ved deletering av BMP-11 kodende propeptidsekvenser og erstating av disse med sekvenser kodende for fullstendige propeptider fra andre BMP proteiner, aktivin proteiner eller andre medlemmer av TGF- β superfamilien.

30 Vektorene kan bli anvendt i fremgangsmåten for transformering av cellelinjer og inneholder selekterte regulatoriske sekvenser i operativ assosiasjon med DNA kodende sekvenser ifølge oppfinnelsen som kan lede replikasjonen og ekspresjonen derav i selekterte vertsceller. Regulatoriske sekvenser for slike vektorer er kjent for fagfolk innenfor dette området og kan bli valgt avhengig av vertscellene. Slik seleksjon er
 35 rutinemessig og er ikke del av foreliggende oppfinnelse.

For ekspresjon i pattedyrvertsceller kan vektoren omfatte en kodende sekvens kodende

for et propeptid egnet for sekresjon av proteiner fra vertscellen koblet i riktig leseramme til den kodende sekvensen for modent BMP-11 protein. Egnende propeptidkodende sekvenser kan bli oppnådd fra DNA kodende proteiner fra TGF- β superfamilien av proteiner, for eksempel, inkludert BMP-2 til og med BMP-9. Se for eksempel US-PS 5.168.150 og beskrivelsen er herved innkorporert som referanse, hvor et DNA kodende for en forløper del av et pattedyrprotein forskjellig fra BMP-2 er koblet til DNA kodende for et modent BMP-2 protein. Foreliggende oppfinnelse innbefatter følgende kimære DNA molekyler som omfatter en DNA sekvens kodende for et propeptid fra et medlem av TGF- β superfamilien av proteiner koblet i riktig leseramme til en DNA sekvens kodende for et BMP-11 polypeptid. Betegnelsen "kimære" blir anvendt for å angi av propeptidet har et opphav fra et annet polypeptid enn BMP-11.

Et protein ifølge foreliggende oppfinnelse som regulerer produksjonen av FSH kan anvendes for å øke fertiliteten når uttrykt i en sammensetning som en homodimer eller som en heterodimer med andre proteiner fra inhibin- β familien. Proteinene ifølge foreliggende oppfinnelse kan også være nyttige for befruktningshindring, når uttrykt i en sammensetning som en heterodimer med proteiner fra inhibin- α familien.

Et protein ifølge foreliggende oppfinnelse som induserer brusk og/eller bendannelse i tilfeller hvor ben ikke normalt blir dannet, kan anvendes for leging av benbrudd og bruskmangler i mennesker og andre dyr. Et slikt preparat som anvender et BMP-11 protein kan ha profylaktisk anvendelse for reduksjon av lukkede og åpne brudd og også for forbedret fiksering av kunstige ledd. De novo bendannelse indusert av et osteogent middel bidrar til reparasjon av kongenital, traumeindusert eller onkologisk reseksjonsinduserte craniofaciale defekter og er også nyttig innen kosmetisk plastisk kirurgi. Et BMP-11 protein kan bli anvendt for behandling av periodontal sykdom og i andre prosesser hvor tenner repareres. Slike midler kan tilveiebringe et miljø for å tiltrekke bendannende celler, stimulere veksten av bendannende celler eller indusere differensieringen av forløpere av bendannende celler. BMP-11 polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan også være nyttige for behandling av osteoporose. Forskjellige osteogeniske, bruskinduserende og beninduserende faktorer er blitt beskrevet. Se for eksempel europeiske patentsøknader 148,155 og 169,016 for diskusjoner derav.

Proteinene ifølge oppfinnelsen kan også bli anvendt ved leging av sår og beslektet vevsreparering. Typer av sår innbefatter, men er ikke begrenset til brannsår, innsnitt og sår. (Se for eksempel PCT-publikasjon WO84/01106 for diskusjon av sårheling og beslektet vevsreparasjoner.

Sammensetninger omfattende en terapeutisk effektiv mengde av minst et av BMP-11 proteinene ifølge oppfinnelsen blandet sammen med en farmasøytisk akseptabel bærer eller matrise kan frembringes.

5

En slik sammensetning som omfatter et BMP-11 protein kan også øke neuronal overlevelsen og er derfor nyttig for transplantasjon og behandling av tilstander som omfatter en reduksjon i neuronal overlevelse.

- 10 Det er ventet at BMP-11 proteinene ifølge oppfinnelsen kan virke med eller kanskje synergistisk med andre beslektede proteiner og vekstfaktorer. Ytterligere terapeutiske metoder og sammensetninger ifølge oppfinnelsen omfatter derfor en terapeutisk mengde av minst et BMP-11 protein ifølge oppfinnelsen med en terapeutisk mengde av minst et av BMP-proteinene eller andre vekstfaktorer beskrevet i inngitte patenter og
- 15 beskrivelser beskrevet ovenfor. Slike kombinasjoner kan omfatte separate molekyler eller heteromolekyler bestående av forskjellige deler. En metode og sammensetning nyttig ved anvendelse av peptidet ifølge oppfinnelsen kan for eksempel omfatte en disulfid koblet dimer omfattende en BMP-11 proteinsubenhhet og en subenhhet fra et inhibin- α protein, et inhibin- β protein eller et BMP-protein, så som BMP-1 til og med
- 20 BMP-10. Midlene som er nyttige med BMP-11 kan innbefatte forskjellige vekstfaktorer så som epidermal vekstfaktor (EGF), blodplate avledet vekstfaktor (PDGF), transformerende vekstfaktorer (TGF- α og TGF- β) og insulin-lignende vekstfaktor (IGF). Ytterligere terapeutiske metoder og sammensetninger omfatter en terapeutisk mengde av minst et BMP-11 protein ifølge oppfinnelsen med en terapeutisk mengde av
- 25 minst et av BMP proteinene beskrevet i inngitte patenter og søknader beskrevet ovenfor. Slike sammensetninger kan omfatte separate molekyler av BMP proteiner eller heteromolekyler bestående av forskjellige BMP deler. For eksempel kan en fremgangsmåte og sammensetning omfatte en disulfidkoblet dimer omfattende en BMP-11 proteinsubenhhet og en subenhhet fra en av "BMP" proteinene beskrevet ovenfor. Foreliggende
- 30 oppfinnelse omfatter følgelig et rensset BMP-11 polypeptid som er en heterodimer hvor en subenhhet omfatter minst aminosyresekvensen fra aminosyre nr. 1 til aminosyre nr. 109 ifølge SEQ ID NO: 2 eller SEQ ID NO: 11, og en subenhhet omfatter en aminosyresekvens for et benmorfogenisk protein valgt fra gruppen bestående av BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8 og BMP-9. En ytterligere
- 35 utførelsesform kan omfatte en heterodimer med BMP-11 deler. Videre kan BMP-11 proteiner bli kombinert med andre midler som er fordelaktige for behandling av ben og/eller brusk defekt, sår eller vevet. Disse midlene innbefatter forskjellige

vekstfaktorer så som epidermal vekstfaktor (EGF), fibroblast vekstfaktor (FGF), blodplate avledet vekstfaktor (PDGF), transformerende vekstfaktorer (TGF- α og TGF- β) og k-fibroblastvekstfaktor (kFGF), paratyroidhormon (PTH), leukemi inhibitorisk faktor (LIF/HILDA/DIA), insulin-lignende vekstfaktorer (IGF-I og IGF-II). Deler av disse midlene kan også bli anvendt i sammensetningene.

BMP-11 proteinene ifølge foreliggende oppfinnelse kan også bli anvendt i sammensetninger kombinert med benmorfogeniske proteiner. Se for eksempel Ogawa et al., WO 92/14481 (1992); Ogawa et al., J. Biol. Chem., 267:14233-14237 (1992).

Benmorfogeniske proteiner som er nyttige i slike sammensetninger innbefatter BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6 og BMP-7, beskrevet blant annet i US-PS 5.108.922; 5.013.649; 5.116.738; 5.106.748; 5.187.076; og 5.141.905; BMP-8, beskrevet i PCT-publikasjon WO91/18098; og BMP-9, beskrevet i PCT-publikasjon WO93/00432; og BMP-10 beskrevet i inngitte patentsøknad med serienr. 08/061.695, inngitt mai 12, 1993.

Preparering og formulering av slike fysiologiske akseptable proteinsammensetninger, med hensyn på pH, isotonisitet, stabilitet og lignende, hører inn under det som er kjent innenfor dette fagområdet. Terapeutiske sammensetninger er også verdifulle for veterinær applikasjoner på grunn av mangel på arts-spesifisitet i BMP-TGF proteinene. Spesielt husdyr og fullblodshester i tillegg til mennesker er ønskede pasienter for slik behandling med BMP-11 ifølge foreliggende oppfinnelse.

Den terapeutiske metoden innbefatter administrering av sammensetningen topisk, systemisk eller lokalt som et implantat eller en innretning. Når administrert er den terapeutiske sammensetningen som anvendes selvfølgelig i en pyrogenfri fysiologisk akseptabel form. Sammensetningen kan videre om ønskelig bli innkapslet eller initiert i en viskøs form for levering til stede med ben, brusk eller vevsskade. Topisk administrering kan være egnet for leging av sår og reparering av vev. Terapeutiske nyttige midler som er forskjellige fra BMP-11 proteinene som også eventuelt kan bli innbefattet i sammensetningen som beskrevet ovenfor kan alternativt eller i tillegg bli administrert samtidig eller sekvensielt med BMP-11 sammensetningen.

For ben, brusk eller annen bindevevsdannelse innbefatter sammensetningen en matrise med evne til å avlevere BMP-11 eller andre BMP-proteiner til stedet med vevsskade som trenger reparasjon og som tilveiebringer en struktur for utvikling av ben og brusk og med optimal evne til å bli resorbert inn i kroppen. Matrisen kan tilveiebringe sakte

frigjøring av BMP-11 og/eller annet beninduserende protein samt riktig presentasjon og hensiktsmessig miljø for cellulær infiltrering. Slike matriser kan bli dannet av materialer som for tiden blir anvendt i andre anvendelser innen implantert medisin.

- 5 Valg av matrisematerialet er basert på biokompatibilitet, biodegraderbarhet, mekaniske egenskaper, kosmetisk utseende og grenseflate egenskaper. Den bestemte anvendelsen av BMP-11 sammensetningene vil definere den hensiktsmessige formuleringen. Potensielle matriser for sammensetningene kan være biodegraderbare og kjemisk definert kalsiumsulfat, trikalsiumfosfat, hydroksyapatit, polymelkesyre og poly-
10 anhydrider. Andre potensielle materialer er biodegraderbare og biologisk vel definerte, så som ben, sene eller dermalt collagen. Ytterligere matriser består av rene proteiner eller ekstracellulære matrisekomponenter. Andre potensielle matriser er ikke-biodegraderbare og kjemisk definerte, så som sintret hydroksyapatit, bioglass, aluminater, eller andre keramiske stoffer. Matriser kan bestå av kombinasjoner av
15 hvilke som helst av de ovennevnte typene av materialer, så som polymelkesyre og hydroksyapatit eller kollagen og trikalsiumfosfat. Biokjeramiske midler kan bli endret i sammensetning, så som i kalsium-aluminat-fosfat og prosessering for å endre porestørrelse, partikkelstørrelse, partikkelform og biodegraderbarhet.
- 20 Forløpet kan bli registrert ved periodisk vurdering av benvekst og/eller reparasjon. Forløpet kan bli registrert for eksempel ved røntgenstråler, histomorfometriske bestemmelser og tetracyklinmerking.

- 25 Doseringsregimet vil bli bestemt av behandlende lege som betrakter de forskjellige faktorene som modifierer virkningen av BMP-11 proteinet, for eksempel pasientens alder, kjønn og diett, infeksjonssalvorligheten, administreringstiden og andre kliniske faktorer. Doseringen kan variere med type BMP-protein eller vekstfaktor til stede i sammensetningen. Doseringen kan også variere med type av matrise som blir anvendt.

- 30 De følgende eksemplene illustrerer utførelse av oppfinnelsen når det gjelder å isolere og karakterisere bovint BMP-11 protein og anvendelse derav for å isolere humane og andre BMP-11 proteiner for oppnåelse av humane proteiner og uttrykking av proteinene via rekombinante teknikker.

EKSEMPEL 1**Bovin BMP-11**

800.000 rekombinanter av et bovint genomisk bibliotek konstruert i vektor λ EMBL3 blir sådd ut i en tetthet på 8.000 rekombinante bakteriofag plakk pr skål på 100 skåler.

- 5 Duplikate nitrocellulose replika av rekombinante bakteriofag plakk blir dannet ut fra disse skålene og amplifisert. Et fragment av humant BMP-7 DNA tilsvarende nukleotidene nr. 1081 til nr. 1403 (figur 4, US-PS 5.141.905) blir ^{32}P -merket ved den tilfeldige primingsprosedyren til Feinberg et al. (Anal. Biochem. 132:6-13 (1983)) og hybridisert til et sett av filtre i standard hybridiseringsbuffer (SHB) (5x SSC, 0.170
- 10 SDS, 5x Denhardts, 100 $\mu\text{g/ml}$ laksesperm DNA) ved 60°C i 2-3 dager. Filtrene blir vasket under reduserte stringente betingelser (4X SSC, 0.1% SDS ved 60°C). Mange positivt hybridiserende rekombinanter blir registrert. 52 positivt hybridiserende rekombinante bakteriofag plakk blir selektert og på ny sådd ut for sekundære. Duplikate nitrocellulose replika av rekombinante plakk blir dannet ut fra disse 52
- 15 sekundære skålene og amplifisert. Et sett av nitrocellulosefiltrene blir hybridisert til den humane BMP-7 DNA proben som beskrevet ovenfor og vasket under samme reduserte stringente betingelser. Det andre settet av filtrene blir hybridisert til en blandet BMP-5, BMP-6 og BMP-7 probe i SHB ved 65°C over natt og vasket med 0,1X SSC, 0.1% SDS ved 65°C (stringent hybridiserings- og vaskebetingelser). Den blandede proben består
- 20 av relativt like mengder av ^{33}P -merkede DNA fragmenter omfattende nukleotidene nr. 1452 til nr. 2060 (figur 4, US-PS 5.106.748) av human BMP-5 sekvensen, nukleotidene nr. 1395 til nr. 1698 (figur 4, US-PS 5.187.076) av human BMP-6 sekvens, og nukleotidene nr. 1081 til nr. 1403 (figur 4, US-PS 5.141.905) av human BMP-7 sekvens. BMP-5, BMP-6 og BMP-7 DNA fragmentene blir ^{32}P -merket ved tilfeldig
- 25 primingsprosedyre og et likt antall tellinger pr. minutt (cpm) av hver probe blir kombinert og tilsatt til SHB inneholdende det andre settet av nitrocellulose filterreplika av 52 sekundære skåler. 14 rekombinanter som hybridiserte positivt til den humane BMP-7 proben under reduserte stringent betingelser og utviste svak eller ingen hybridisering til den blandede BMP-5/6/7 proben under høye stringente betingelser og blir
- 30 selektert for ytterligere analyser. Alle 14 rekombinantene som utviser disse hybridiseringskaraktertrekkene blir plakk rensset og bakteriofag DNA blir dannet fra hver. Den positivt hybridiserende regionen til en av de 14 rekombinantene utviste karakterene for hybridisering beskrevet ovenfor, betegnet $\lambda 7r-30$, og er lokalisert til et 0.5 kb SacI restriksjonsfragment. Dette fragmentet blir subklonet inn i en plasmidvektor
- 35 (pGEM-3) og DNA sekvensanalyser blir utført. Del DNA sekvensen (SEQ ID NO: 1) og utledet aminosyresekvens (SEQ ID NO: 2) til klon $\lambda 7r-30$ er vist i sekvenslistene.

Bakteriofag λ 7r-30 er blitt deponert til ATCC april 7, 1993 og gitt aksjonsnummer ATCC 75439. Denne deponeringen oppfyller kravene ifølge "Budapest Treaty of the International Recognition of the Deposit of Microorganisms and the Purpose of Patent Procedures and regulations thereunder".

5

Denne λ 7r-30 klonen koder for minst en del av bovint BMP-11 protein ifølge foreliggende oppfinnelse. Nukleotidsekvensen til klon λ 7r-30 inneholder en åpen leseramme på 456 nukleotider nr. 246-701 ifølge SEQ ID NO: 1. Nukleotidsekvensen til nr. 234 til nr. 701 ifølge SEQ ID NO: 1 definerer en åpen leseramme på 378 nukleotider
 10 kodende for minst 126 aminosyrer ved den C-terminale delen av et bovint BMP-11 protein bestemt ved oppstilling overfor andre BMP-proteiner og andre proteiner innenfor TGF- β familien. Nukleotidsekvensen nr. 246 til nr. 323 definerer en åpen leseramme som er kontinuerlig med sekvensen som koder for det antatte 126 aminosyre BMP-11 peptidet, men en redusert grad av aminosyreidentitet til peptidet utledet fra
 15 denne regionen av DNA sekvensen (nr. 246 til nr. 323) overfor andre BMP proteiner og andre proteiner fra TGF- β familien og tilstedeværelse av multiple potensielle spleiseakseptor konsensus sekvenser gjør det vanskelig ådefinere 5' grensen til dette eksonet i det bovine BMP-11 genet. Tilstedeværelse av et i ramme toppkodon ved nukleotidposisjonene nr. 243 til nr. 245 indikerer at nukleotidsekvensen til klon λ 7r-30
 20 inneholder minst en ekson/intron grense til det bovine BMP-11 genet.

Basert på kunnskapen om andre proteiner innenfor TGF- β familien antas det at BMP-11 forløperpolypeptidet vil bli spaltet ved den flerbasiske sekvensen ARG-SER-ARG-ARG i samsvar med en foreslått konsensusproteolytisk prosesseringssekvens ARG-X-X-
 25 ARG. Spaltning av BMP-11 forløperpolypeptidet er ventet å danne et 109 aminosyre modent peptid begynnende med aminosyre ASN i posisjon nr. 1. Prosessering av BMP-11 til den modne formen antas å involvere dimerisering og fjerning av den N-terminale regionen på en måte som er analog med prosessering av beslektet protein TGF- β (Gentry et al., Molec. & Cell. Biol., 8:4162 (1988); Derynck et al., Nature,
 30 316:701(1985)).

Modne aktive former av BMP-11 omfatter en homodimer med to polypeptidsubenheter, i det hver subenhet omfatter aminosyrene nr. 1 til nr. 109 med en antatt molekylvekt på omtrent 12.000 dalton. Ytterligere aktive arter er vurdert omfattende aminosyrene nr. 6
 35 til nr. 109 for derved å innbefatte det første konserverte cysteinresidiet. Som med andre medlemmer av TGF- β familien av proteiner utviser den karboksy-terminale regionen til BMP-11 proteinet høyere sekvens konservering enn den mer amino-terminale delen.

Prosent aminosyre identitet til BMP-11 proteinet i den cystein-rike C-terminale domenen (aminosyrene nr. 6 til nr. 109) med tilsvarende region i andre proteiner innenfor TGF- β familien er som følger: BMP-2, 39%; BMP-3, 37%; BMP-4, 37%; BMP-5, 42%; BMP-6, 45%; BMP-7, 42%; BMP-8, 39%; BMP-9, 40%; Vg1, 39%;
 5 GDF-1, 34%; TGF- β 1, 36%; TGF- β 2, 38%; TGF- β 3, 38%; inhibin β (B), 41%; inhibin β (A), 39%.

EKSEMPEL 2

10 Human BMP-11

Bovine og humane BMP-11 gener antas å være signifikant homologe og derfor blir den bovine kodende sekvensen eller en del derav anvendt som en probe for å screene et humant genomisk bibliotek eller som en probe for å identifisere en human cellelinje eller et vev som syntetiserer det analoge humane proteinet. Et humant genomisk
 15 bibliotek, så som Stratagene katalog nr. 944201, kan bli screenet med en slik probe og presumptive positive isolert og DNA sekvensen kan bli oppnådd. Bevis for at denne rekombinante koder for en del av human BMP-11 er basert på bovint/humant protein og genstruktur homologier.

20 Når et rekombinant bakteriofag inneholdende DNA kodende for en del av det humane BMP-11 molekylet blir oppnådd kan den humane kodende sekvensen bli anvendt som en probe for å identifisere en human cellelinje eller et vev som syntetiserer BMP-11 mRNA. Alternativt kan den bovine BMP-11 kodende sekvensen bli anvendt som en probe for å identifisere en slik human cellelinje eller et vev. RNA blir ekstrahert fra en
 25 selektert celle eller en vevskilde og enten elektroforet på en formaldehydagarosegel og overført til nitrocellulose, eller omsatt med formaldehyd og direkte applisert på nitrocellulosen. Nitrocellulosen blir deretter hybridisert på en probe avledet fra en kodende sekvens til bovin eller human BMP-11. Alternativt blir den bovine BMP-11 kodende sekvensen anvendt for å konstruere oligonukleotidprimere som spesifikt vil
 30 amplifisere en del av den BMP-11 kodende sekvensen beliggende i regionen som er lokalisert mellom primerne anvendt for å utføre den spesifikke amplifikasjonsreaksjonen. Det blir antatt at bovine og humane BMP-11 sekvenser vil muliggjøre spesifikk amplifisering av tilsvarende humane BMP-11 kodende sekvenser fra mRNA, cDNA eller genomiske DNA templat. Når en positiv kilde er blitt
 35 identifisert ifølge en av de ovennevnte metodene blir mRNA selektert ved oligo (dT) cellulose kromatografi og cDNA blir syntetisert og klonet i λ gt10 eller λ bakteriofag vektorer kjent for fagfolk innenfor dette området (dvs. λ ZAP) ifølge kjente teknikker

(Toole et al., supra). Det er også mulig å utføre oligonukleotidprimer rettet
 amplifikasjonsreaksjon beskrevet ovenfor direkte på et på forhånd etablert humant
 cDNA eller genomisk bibliotek som er blitt klonet inn i en λ bakteriofag vektor. I slike
 tilfeller vil et bibliotek som gir et spesifikt amplifisert DNA produkt kodende for en del
 5 av humant BMP-11 protein bli screenet direkte ved anvendelse av fragmentet av
 amplifisert BMP-11 kodende DNA som en probe.

Oligonukleotidprimerene konstruert på grunnlag av DNA sekvensen til bovin BMP-11
 genomisk klon λ 7r-30 antas å muliggjøre spesifikk amplifikasjon av humane BMP-11
 10 kodende sekvenser. Følgende oligonukleotidprimer er konstruert på grunnlag av
 nukleotidene nr. 501 til nr. 521 til DNA sekvensen angitt i SEQ ID NO: 1 og syntetisert
 på en automatisert DNA syntesemaskin.

Primer C: TAGTCTAGATGTCTCCGGCCAGTGCGAGTAC

15 De første ni nukleotidene til primer C (understreket) omfatter gjenkjenningssekvensen
 for restriksjonsendonuklease XbaI som kan bli anvendt for å lette manipuleringen av en
 spesifikt amplifisert DNA sekvens kodende for BMP-11 proteinet ifølge oppfinnelsen
 og er følgelig ikke avledet fra DNA sekvensen presentert i SEQ ID NO: 1.

20 Følgende oligonukleotidprimer er konstruert på grunnlag av nukleotidene nr. 701 til nr.
 678 ifølge DNA sekvensen angitt i SEQ ID NO: 1 og syntetisert på en automatisert
 DNA syntesemaskin:

primer D: TGCGGATCCGGAGCAGCCACAGCGATGGAC

25 De første ni nukleotidene til primer D (understreket) omfatter gjenkjenningssekvensen
 for restriksjonsendonukleasen BamHI som kan bli anvendt for å lette manipuleringen av
 en spesifikt amplifisert DNA sekvens kodende for BMP-11 proteinet ifølge
 oppfinnelsen og er følgelig ikke avledet fra DNA-sekvensen til stede i SEQ ID NO: 1.

30 Standardnukleotidsymboler i ovennevnte identifiserte primere er som følger: A,
 adenosin; C, cytosin, G, guanin; og t, thymin.

Primerne C og D identifisert ovenfor blir anvendt som primere for å muliggjøre
 amplifikasjon av et spesifikt nukleotid fra human genomisk DNA.

35 Amplifikasjonsreaksjonen blir utført som følger:
 human genomisk DNA (kilde: perifere blodlymfocytter) blir denaturert ved 100°C i 5
 minutter og deretter avkjølt på is før tilsetning til en reaksjonsblanding inneholdende

200 µm av hver av deoksynukleotidfosfatene (dATP, dGTP, dCTP og dTTP) 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 1.25 enheter Taq DNA polymerase, 100 pM oligonukleotidprimer C og 100 pM oligonukleotidprimer D. Denne reaksjonsblanding blir deretter utsatt for termisk cyklisering på følgende måte:

5 3 minutter ved 94°C, 1 minutt ved 50°C, 1 minutt ved 72°C i en syklus, deretter 1 minutt ved 94°C, 1 minutt ved 50°C, 1 minutt ved 72°C i 39 sykluser.

DNA som blir spesifikt amplifisert ifølge denne reaksjonen blir separert fra oligonukleotidprimerene C og D i overskudd anvendt for å initiere amplifikasjonen ved

10 anvendelse av en DNA rensningsharpiks basert på protokollen under betingelsene foreslått av forhandleren. Det resulterende DNA produktet blir spaltet med restriksjonsendonukleasene XbaI og BamHI, fenolekstrahert og kloroformekstrahert. Bufferskift og fjerning av små DNA fragmenter som er et resultat av XbaI/BamHI restriksjonsspaltningen blir oppnådd ved fortynning av det spaltede DNA produktet i 10

15 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA etterfulgt av sentrifugering gjennom en centricon 30 mikrokonsentrator (W.R. Grace & Co., Beverly, Ma.; produkt nr. 4209). Det resulterende XbaI/BamHI spaltede amplifiserte DNA produktet blir subklonet inn i en plasmidvektor (pBluescript) mellom XbaI og BamHI restriksjonssetene til polylinkerregionen. DNA sekvensanalyser av de resulterende subklonene indikerer at

20 det spesifikt amplifiserte DNA sekvensproduktet koder for en del av det humane BMP-11 proteinet ifølge denne oppfinnelsen. DNA sekvensen (SEQ ID NO: 3) og avledet aminosyresekvens (SEQ ID NO: 4) til dette spesifikt amplifiserte DNA fragmentet er angitt i sekvenslistene.

25 Nukleotidene nr. 1 til nr. 27 ifølge denne sekvensen omfatter en del av nukleotidprimer C og nukleotidene nr. 186 til nr. 213 omfattende en del av oligonukleotidprimer D anvendt for å utføre den spesifikke amplifikasjonsreaksjonen. På grunn av funksjonen til oligonukleotidprimerene C og D (konstruert på grunnlag av den bovine BMP-11 DNA sekvensen) når det gjelder å initiere amplifikasjonsreaksjonen så behøver det ikke å

30 tilsvare nøyaktig til den virkelige sekvensen som koder for et humant BMP-11 og blir derfor ikke translatert i ovennevnte aminosyresekvens derivasjon. DNA sekvensen fra nukleotid nr. 28 til nr. 185 ifølge SEQ ID NO: 3, eller deler derav, spesifikt amplifisert fra humant genomisk DNA templat kan bli anvendt som en probe for å identifisere ytterligere humane BMP-11 kodende sekvenser fra humane genomiske eller humane

35 cDNA bibliotek ved standardhybridiserings-/screeningsteknikker kjent for fagfolk innenfor dette området.

1.200.000 rekombinanter av et humant føtalt hjerne cDNA bibliotek (Stratagene katalog nr. 936206) konstruert i vektor λ ZAPII blir sådd ut i en tetthet på 24.000 rekombinante bakteriofag plakk pr. skål på 50 skåler. Duplikat nitrocellulose replikaer av rekombinante bakteriofag plakk blir dannet ut fra disse skålene. En oligonukleotidprobe konstruert på grunnlag av nukleotidene nr. 53 - nr. 82 ifølge SEQ ID NO: 3 blir syntetisert på en automatisert DNA syntesemaskin. Denne oligonukleotidproben blir radioaktivt merket med ^{32}P -ATP og blir hybridisert til begge sett av duplikat nitrocellulose replikat i SHB ved 65°C. Ni positivt hybridiserende rekombinanter blir registrert. En av de positivt hybridiserende rekombinantene, betegnet λ FB30.5 blir plakk renset. Bakteriofag plate blandinger av renset λ FB30.5 cDNA klon blir dannet og bakteriofag DNA isolert. Et bakterielt plasmid betegnet FB30.5 dannet ved in vivo utspaltningsprotokollen beskrevet av forhandleren (Stratagene) og inneholdende hele innskuddet av λ FB30.5 bakteriofag cDNA klonen, er blitt deponert til ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland USA under kravene ifølge Budapest avtalen og betegnet ATCC nr. _____. En del av DNA sekvensen til klon FB30.5 er angitt i SEQ ID NO: 10.

En million rekombinanter av et humant genomisk bibliotek (Stratagene katalog nr. 944201) konstruert i vektor λ FIX blir sådd ut i en tetthet på 20.000 rekombinante bakteriofag plakk pr. skål på 50 skåler. Duplikate nitrocellulose replikaer av rekombinante bakteriofag plakk blir dannet ut fra disse skålene. En oligonukleotidprobe konstruert på grunnlag av nukleotidene nr. 57 - nr. 86 ifølge SEQ ID NO: 10, med unntagelse av en uoverlagt substitusjon av CAC for GCG ved nukleotidene nr. 59-nr. 61 ifølge SEQ ID NO: 10, blir syntetisert på en automatisert DNA syntese maskin. Denne oligonukleotidproben blir radioaktivt merket med $\lambda^{32}\text{P}$ -ATP og blir hybridisert til begge sett av duplikate nitrocellulose replikaer i SHB ved 65°C. Fem positivt hybridiserende rekombinanter blir registrert. En av de positivt hybridiserende rekombinantene, betegnet 30GEN.4, blir plakkrenset. Bakteriofagskålblandingene av renset 30GEN.4 genomisk klon blir dannet og bakteriofag DNA blir isolert. En bakteriofag blanding av denne genomiske klonen er blitt deponert til ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, USA under kravene ifølge Budapest avtalen og betegnet ATCC nr. _____. En del av DNA sekvensen til klon 30GEN.4 er angitt i SEQ ID NO: 10. En del av DNA sekvensen til genomisk klon 30GEN.4 ble bestemt å være identisk med en del av DNA sekvensen til cDNA klon FB30.5. Graden av denne overlappingen (nukleotidene nr. 1 - nr. 198) ifølge SEQ ID NO: 10 ble anvendt som et grunnlag for å oppstille deler av den kodende sekvensen til BMP-10 proteinet. Den genomiske klonen 30GEN.4 er ventet å inneholde ytterligere 5' kodende sekvenser til

det humane BMP-11 proteinet som er ventet å kode for det gjenværende av BMP-11 forløper polypeptidet, inkludert initiatoren methionin. Delsekvensen til human BMP-11 er presentert i SEQ ID NO: 10 og det er å bemerke at nukleotidene nr. 1 - 198 er blitt bestemt å være til stede i både 30GEN.4 genomisk klon og FB30.5 cDNA klonen, mens

5 nukleotidene nr. 199-nr.1270 kommer i sin helhet fra cDNA klonen FB30.5. SEQ ID NO: 10 tyder på et humant BMP-11 forløperprotein med minst 362 aminosyrer. Basert på kunnskapen av andre BMP og andre proteiner innenfor TGF- β familien antas det at forløperpolypeptider vil bli spaltet ved den flerbasiske sekvensen ARG-SER-ARG-ARG (aminosyrene nr. 4 til og med nr. -1 ifølge SEQ ID NO: 11) i samsvar med den

10 foreslåtte konsensus proteolytiske prosesseringssekvensen ARG-X-X-ARG. Spaltning av det humane BMP-11 forløper polypeptidet ved denne beliggenheten vil danne et 109 aminosyremodent peptid begynnende ved aminosyren ASN i posisjon nr. 1 ifølge SEQ ID NO: 11. Prosessering av human BMP-11 til moden form er ventet å involvere dimerisering og fjerning av den N-terminale regionen på en måte som er analog med

15 prosessering av beslektet protein TGF- β [L.E. Gentry, et al. Molec. & Cell. Biol. 8:4162 (1988); R. Derynck, et al., Nature 316:701 (1985). Det blir betraktet at modne aktive arter av human BMP-11 omfatter en homodimer med to polypeptidsubenheter, i det hver subenhet omfatter aminosyrene nr. 1- nr. 108 ifølge SEQ ID NO: 11 med en antatt molekylvekt på 12.000 dalton. Ytterligere aktive arter blir betraktet og omfatter

20 aminosyrene nr. 7 - nr. 108 ifølge SEQ ID NO: 11 og dermed innbefatter det første konserverte cysteinresidiet. Heterodimeriske molekyler omfattende en enhet av BMP-11 og en annen enhet av et annet medlem av BMP/TGF- β superfamilien er også betraktet.

25 **EKSEMPEL 3**

Ekspresjon av BMP-11

For å produsere bovine, humane eller andre pattedyr BMP-11 proteiner blir DNA som koder for disse overført til en hensiktsmessig ekspresjonsvektor og ført inn i pattedyrceller eller andre foretrukne eukaryote eller prokaryote verter ved hjelp av

30 konvensjonelle genetiske omkonstruerings teknikker. Det foretrukne ekspresjonssystemet for biologisk aktiv rekombinant human BMP-11 er stabilt transformerende pattedyrceller.

Fagfolk innenfor dette området kan konstruere pattedyr ekspresjonsvektorer ved

35 anvendelse av sekvensen ifølge SEQ ID NO: 1 eller SEQ ID NO: 10, eller andre DNA sekvenser kodende for BMP-11 proteinet eller andre modifiserte sekvenser og kjente vektorer, så som pCD [Okayama et al., Mol. Cell. Biol., 2:161-170 (1982)], pJL3, pJL4

[Gough et al., EMBO J., 4:645-653 (1985)] og pMT2 CXM.

Pattedyrekspresjonsvektoren pMT2 CXM er et derivat av p91023(b) (Wong et al., Science 228:810-815, 1985) som er forskjellig fra sistnevnte fordi det inneholder
 5 ampicillin resistensgenet i stedet for tetracyclinresistensgenet og inneholder videre et XHOI sete for innskudd av cDNA klonene. De funksjonelle elementene til pMT2 CXM er blitt beskrevet (Kaufman, R.J., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:689-693) og innbefatter adenovirus VA gener, SV40 replikasjonsorigo inkludert 72 bp enhanceren, adenovirus major late promoteren inkludert et 5' spleisesete og hovedmengden av
 10 adenovirus tripartit ledersekvensen til stede på adenovirus late mRNA, et 3' spleise akseptorsete, et DHFR innskudd, SV40 early polyadenyleringssete (SV40) og pBR322 sekvenser nødvendig for propagering i E. coli.

Plasmid pMT2 CXM blir oppnådd ved EcoRI spaltning av pMT2-VWF som er blitt
 15 deponert til American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD (USA) under aksjonsnummer ATCC 67122. EcoRI spaltningen spalter ut cDNA innskuddet til stede i pMT2-VWF og gir pMT2 i lineær form som kan bli ligert og anvendt for å transformere E. coli HB 101 eller DH-5 for ampicillin resistens. Plasmid pMT2 DNA kan bli dannet ved hjelp av konvensjonelle metoder. pMT2 CXM blir deretter konstruert
 20 ved anvendelse av loopout/mutagenese [Morinaga, et al., Biotechnology 84: 636 (1984). Dette fjerner basene 1075 til 1145 i forhold til HindIII setet nær SV40 replikasjonsorigo og forsterker sekvensene til pMT2. I tillegg blir følgende sekvens innskutt:

5' PO-CATGGGCAGCTCGAG-3'

ved nukleotid 1145. Denne sekvensen inneholder gjenkjenningssetet for
 25 restriksjonsendonuklease Xho I. Et derivat av pMT2 CXM, betegnet pMT23, inneholder gjenkjenningssetet for restriksjonsendonukleasene PstI, ECO RI, Sall og XhoI. Plasmid pMT2 CXM og pMT23 DNA kan bli dannet ved hjelp av konvensjonelle metoder.

pEMC2B1 avledet fra pMT21 kan også være egnet for utførelse av oppfinnelsen.
 30 pMT21 er avledet fra pMT2 som er avledet fra pMT2-VWF. Som beskrevet ovenfor spalter EcoRI spaltning cDNA innskuddet til stede i pMT-VWF og i pMT2 i lineær form som kan bli ligert og anvendt for å transformere E. coli HB 101 eller DH-5 til ampicillin resistens. Plasmid pMT2 DNA kan bli dannet ved hjelp av konvensjonelle metoder.

35

pMT21 er avledet fra pMT2 ved følgende to modifikasjoner. For det første blir 76 bp til den 5' utranslaterte regionen til DHFR cDNA inkludert et område med 19 G residier fra

G/C halen for cDNA kloning valgt. I denne prosessen blir et XhoI sete skutt inn for å oppnå følgende sekvens rett oppstrøms fra DHFR:

5' -CTGCAGGCGAGCCTGAATTCCTCGACCATCATG-3'

PstI Eco RI XhoI

- 5 For det andre blir et unikt ClaI sete innført ved spaltning med EcoRV og XbaI, behandling med Klenow fragment av DNA polymerase I og ligering til en ClaI linker (CATCGATG). Dette deleterer et 250 bp segment fra adenovirus assosiert RNA (VAI) regionen, men interfererer ikke med VAI RNA genekspressjonen eller funksjonen. pMT21 blir spaltet med EcoRI og XhoI og anvendt for å oppnå vektoren pEMC2B1.

10

En del av EMCV lederen blir oppnådd fra pMT2-ECAT1 [S.K. Jung, et al. J. Virol. 63: 1651-1660 (1989)] ved spaltning med EcoRI og PstI og resulterer i et 2752 bp fragment. Dette fragmentet blir spaltet med TaqI og tilveiebringer et Eco RI-TaqI fragment på 508 bp som blir renset ved elektroforese på lavtsmeltende agarosegel. En 68 bp adapter og

15 komplementær tråd derav blir syntetisert med en 5' TaqI overhengende ende og en 3' XhoI overhengende ende som har følgende sekvens:

5'-CGAGGTTAAAAACGTCTAGGCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTT

TaqI

20

GAAAAACACGATTGC-3'

XhoI

- Denne sekvensen tilsvare EMC virus ledersekvensen fra nukleotid 763 til 827. Den forandrer også ATG ved posisjon 10 innenfor EMC viruslederen til en ATT og blir
- 25 etterfulgt av et XhoI sete. En treveislisering av pMT21 Eco RI-XhoI fragmentet, EMC virus EcoRI-TaqI fragmentet og 68 bp oligonukleotid adapter TaqI-XhoI adapteren som resulterer i vektoren pEMC2B1.

- Denne vektoren inneholder SV40 replikasjonsorigo og enhancer, adenovirus major late promoter, et cDNA kopi av det meste av adenovirus tripartitledersekvensen, en liten hybridintervenierende sekvens, et SV40 polyadenyleringssignal og adenovirus VA I genet, DHFR og β -laktamase markører og en EMC sekvens, i hensiktsmessig forhold for å lede ekspresjon i høyt nivå av ønsket cDNA i pattedyrceller.

- 35 Konstruksjon av vektorer kan innbefatte modifikasjon av BMP-11 DNA sekvensene. Blant annet kan BMP-11 cDNA bli modifisert ved fjerning av ikke-kodende nukleotider på 5' og 3' endene av den kodende regionen. Deleterte ikke-kodende nukleotider kan bli

erstattet med andre sekvenser kjent for å være fordelaktige for ekspresjon. Disse vektorene blir transformert inn i hensiktsmessige vertsceller for ekspresjon av BMP-11 proteinene. I tillegg kan sekvensen til SEQ ID NO: 1 eller SEQ ID NO: 10 eller andre sekvenser kodende for BMP-11 proteiner bli manipulert for å uttrykke moden BMP-11 ved deletering av BMP-11 kodende propeptidsekvenser og erstatning av disse med sekvenser som koder for fullstendige propeptider av andre BMP proteiner, aktivin proteiner eller andre medlemmer av TGF- β superfamilien.

Fagfolk innenfor dette området kan manipulere sekvensene til SEQ ID NO: 1 eller SEQ ID NO: 10 ved å eliminere eller erstatte pattedyrregulatoriske sekvenser som flankerer den kodende sekvensen med bakterielle sekvenser for å danne bakterielle vektorer for intracellulær eller ekstracellulær ekspresjon av bakterielle celler. For eksempel kan de kodende sekvensene bli ytterligere manipulert (for eksempel ligert til andre kjente linkere eller modifisert ved deletering av ikke-kodende sekvenser derfra eller endring av nukleotidene deri ved hjelp av kjente teknikker). Modifisert BMP-11 kodende sekvens kan deretter bli skutt inn i en kjent bakteriell vektor ved anvendelse av prosedyrer som beskrevet i T. Taniguchi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5230-5233 (1980). Denne eksempelvis bakterielle vektoren kan deretter bli transformert inn i bakterielle vertsceller og et BMP-11 protein kan derved bli uttrykt. En oversikt over en strategi for produksjon av ekstracellulær ekspresjon av BMP-11 proteiner i bakterielle celler er angitt i for eksempel europeisk patentsøknad EPA 177.343.

Lignende manipuleringer kan bli utført for konstruksjon av en insektvektor (se for eksempel prosedyrene beskrevet i publisert europeisk patentsøknad 155.476) for ekspresjon i insektceller. En gjærvektor kan også bli konstruert ved anvendelse av regulatoriske sekvenser fra gjær for intracellulær eller ekstracellulær ekspresjon av faktorene ifølge foreliggende oppfinnelse av gjærcellene. (Se for eksempel prosedyrene beskrevet i publisert PCT søknad WO86/00639 og europeisk patentsøknad EPA 123.289).

En fremgangsmåte for produksjon av høye nivåer av et BMP-11 protein ifølge oppfinnelsen i pattedyrceller kan innbefatte konstruksjon av celler inneholdende multiple kopier av det heterologe BMP-11 genet. Det heterologe genet er koblet til en amplifiserbar markør, for eksempel dihydrofolat reduktase (DHFR) gen hvor celler inneholdende økte genkopier kan bli valgt for propagering ved økende konsentrasjoner av methotrexat (MTX) ifølge prosedyrene til Kaufman og Sharp, J. Mol. Biol., 159:601-629 (1982). Denne metoden kan bli anvendt ved et antall forskjellige celletyper.

For eksempel kan et plasmid inneholdende en DNA sekvens for et BMP-11 ifølge oppfinnelsen i operativ assosiasjon med andre plasmidsekvenser muliggjøre ekspresjon derav og DHFR ekspresjonsplasmidet pAdA26SV(A)3 [Kaufman and Sharp, Mol. Cell. Biol., 2:1304 (1982)] kan bli samtidig innført i DHFR-manglende CHO celler DUKX-BII ved hjelp av forskjellige metoder inkludert kalsiumfosfat kopresipitering og transfeksjon, elektroporasjon eller protoplastfusjon. DHFR uttrykkende transformanter blir valgt for vekst i alfa medium med dialysert føtalt kalveserum og deretter selektert for amplifikasjon ved vekst i økende konsentrasjoner av MTX (for eksempel sekvensielle trinn i 0.02, 0.2, 1.0 og 5 μ m MTX) som beskrevet i Kaufman et al., Mol Cell Biol., 5:1750 (1983). Transformanter blir klonet og biologisk aktiv BMP-11 ekspresjon blir registrert ved hjelp av en eller flere BMP-11 aktivitetsanalyser beskrevet i eksemplene 5 til 8 nedenfor. BMP-11 ekspresjonen bør øke med økende nivåer av MTX resistens. BMP-11 polypeptider blir karakterisert ved anvendelse av standardteknikker som er kjent innenfor fagområdet så som pulsmerking med (35S) methionin eller cystein og polyakrylamidgelelektroforese. Lignende prosedyrer kan bli utført for å produsere andre beslektede BMP-11 proteiner.

20 **EKSEMPEL 4**

Biologisk aktivitet til uttrykt BMP-11

For å måle den biologiske aktiviteten til uttrykte BMP-11 proteiner oppnådd i eksempel 3 ovenfor blir proteinene isolert fra cellekulturen og renses ved isolering av BMP-11 proteinene fra andre proteinholdige materialer som de blir produsert sammen med samt fra andre kontaminanter. Det rensede proteinet kan bli analysert i henhold til analyser for BMP-11 aktiviteten beskrevet i eksemplene 5 til 8 nedenfor.

EKSEMPEL 5

30 WO-20 bioanalyser

A. Beskrivelse av W-20 celler

Anvendelse av W-20 benmargsstromaceller som en indikatorcellelinje er basert på omdanningen av disse cellene til osteoblast-lignende celler etter behandling med et BMP protein [Thies et al, Journal of Bone and Mineral Research, 5:304 (1990); and Thies et al. Endocrinology, 130:1318 (1992)]. W-20 celler er en klonal benmargsstromacellelinje avledet fra voksne mus av forskere i laboratoriet til Dr. D. Nathan, Children's Hospital, Boston, MA. Behandling av W-20 celler med visse BMP

proteiner resulterer i (1) øket alkalisk fosfatase produksjon, (2) induksjon av PTH stimulert cAMP og (3) induksjon av osteokalsinsyntesen til disse cellene. I det (1) og (2) representerer karaktertrekk som er assosiert med osteoblastfenotypen er evnen til å syntetisere osteokalsin en fenotypisk egenskap som bare fremkommer av modne osteoblaster. Frem til nå har vi observert omdanning av W-20 stromal celler til osteoblast-
 5 lignende celler og er ved behandling med BMP. På denne måten korrelerer in vitro aktivitetene utvist av BMP behandlede WO-20 celler med in vivo bendannende aktivitet kjent for BMP.

- 10 Nedenfor er to in vitro analyser nyttige for sammenligning av BMP aktivitetene til nye osteoinduktive molekyler beskrevet.

B. W-20 alkalisk fosfatase analyseprotokoll

- W-20 cellene blir sådd ut i 96 brønn vevskulturskåler i en tetthet på 10.000 celler pr.
 15 brønn i 200 µl medium (DME) med 10% varmeinaktivert føtalt kalveserum, 2 mM glutamin og 100 enheter/ml penicillin + 100 µg/ml streptomycin. Cellene blir koblet over natt i en 95% luft, 5% CO₂ inkubator ved 37°C.

- 200 µl medium blir fjernet fra hver brønn med en multikanal pipette og erstattet med et
 20 likt volum av testprøver levert i DME med 10% varme inaktivert føtalt kalveserum, 2 mM glutamin og 1% penicillin-streptomycin. Testforbindelsene blir analysert i triplikat.

- Testprøvene og standardene blir gitt en 24 timer inkubasjonsperiode med W-20 indikator cellene. Etter 24 timer blir platene fjernet fra 37°C inkubatoren og testmediet
 25 blir fjernet fra cellene.

W-20 cellelagene blir vasket tre ganger med 200 µl pr. brønn kalsium/magnesium fri fosfatbufret saltvann og disse vaskingene blir fjernet.

- 30 50 µl glass destillert vann blir tilsatt til hver brønn og analyseskålene blir deretter plassert på et tørris/etanolbad for hurtig frysing. Når frosset blir analyseplatene fjernet fra tørris/etanolbadet og tint ved 37°C. Dette trinnet blir gjentatt ytterligere to ganger i totalt 3 fryse-tine prosedyrer. Når fullført er den membranbundne alkalisk fosfatasen tilgjengelig for måling.

35

50 µl analyseblanding (50 mM glycine, 0.05% Triton X-100, 4 mM MgCl₂, 5 mM p-nitrofenolfosfat, pH = 10.3) blir tilsatt til hver analysebrønn og analyseplatene blir

deretter inkubert i 30 minutter ved 37°C i et ristevannbad ved 60 rist pr. minutt.
Ved slutten av 30 minutters inkubasjon blir reaksjonen stoppet ved tilsetning av 100 µl 0.2 N NaOH til hver brønn og plassering av analyseskålene på is.

- 5 Spektrofotometrisk absorbans for hver brønn blir avlest ved en bølgelengde på 405 nanometer. Disse verdiene blir deretter sammenlignet med kjente standarder for å tilveiebringe en beregning av den alkaliske fosfatase aktiviteten i hver prøve. Ved anvendelse av kjente mengder av p-nitrofenolfosfat, blir absorbansverdiene beregnet. Dette er vist i tabell I.

10

TABELL I

15

20

Absorbanseverdier for kjente standarder av P-nitrofenol fosfat	
P-nitrofenolfosfat µmol	Gj.snitt absorbanse (405 nm)
0.000	0
0.006	0.261 +/- .024
0.012	0.521 +/- .031
0.018	0.797 +/- .063
0.024	1.074 +/- .061
0.030	1.305 +/- .083

25

Absorbansverdiene for kjente mengder av BMP kan bli bestemt og omdannet til µmol p-nitrofenolfosfat spaltet pr. enhet tid som vist i tabell II.

TABELL II

Alkaliske fosfatase verdier for W-20 celler behandlet med BMP-2		
BMP-2 konsentrasjon ng/ml	Absorbanse avlesning 405 nmeter	µmol substrat pr. time
0	0.645	0.024
1.56	0.696	0.026
3.12	0.765	0.029
6.25	0.923	0.036
12.50	1.121	0.044
25.0	1.457	0.058
50.0	1.662	0.067
100.0	1.977	0.080

15

Disse verdiene blir deretter anvendt for å sammenligne aktivitetene til kjente mengder av BMP-11 til BMP-2.

C. Osteocalcin RIA protokoll

20 W-20 cellene blir sådd ut ved 10^6 celler pr. brønn i 24 brønn vevskulturskåler i 2 ml DME inneholdende 10% varmeinaktivert føtalt kalveserum, 2 mM glutamin. Cellene blir tilkoblet over natt i en atmosfære bestående av 95% luft, 5% CO₂ ved 37°C.

25 Neste dag blir mediet skiftet til DME inneholdende 10% føtalt kalveserum, 2 mM glutamin og testforbindelsen i et totalvolum på 2 ml. Hver testforbindelse blir administrert til triplikate brønner. Testforbindelsene blir inkubert med W-20 cellene i totalt 96 timer med erstatning ved 48 timer med samme testmedier.

30 Etter 96 timer blir 50 µl av testmediet fjernet fra hver brønn og analysert for osteokalsinproduksjon ved anvendelse av en radioimmunoanalyse for museosteokalsin. Detaljer angående analysen er beskrevet i settet fremstilt av Biomedical Technologies Inc., 378 Page Street, Stoughton, MA 02072. Reagenser for analysene finnes som produktnummerene BT-431 (muse osteokalsin standard), BT-432 (geite anti-mus osteokalsin), BT-431R (iodinert museosteokalsin), BT-415 (normalt geiteserum) og BT-414 (esel anti geit IgG). RIA for osteokalsin syntetisert av W-20 cellene i respons til BMP behandling blir utført som beskrevet i protokollen gitt av forhandlerne.

Verdiene oppnådd for testprøvene blir sammenlignet med verdier for kjente standarder av museosteokalsin og mengden av osteokalsin produsert av W-20 cellene i respons til eksponering med kjente mengder BMP-2. Verdier for BMP-2 induisert osteokalsinsyntese ved W-20 cellene er vist i tabell III.

TABELL III

Osteokalsin syntesen til W-20 cellene	
BMP-2 konsentrasjon ng/ml	Osteokalsin syntese ng/brønn
0	0.8
2	0.9
4	0.8
8	2.2
16	2.7
31	3.2
62	5.1
125	6.5
250	8.2
500	9.4
1000	10.0

EKSEMPEL 6

Rosen-modifisert Sampath-Reddi analyse

- En modifisert versjon av rotteben dannelses analysen beskrevet i Sampath og Reddi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:6591-6595 (1983) blir anvendt for å vurdere ben, brusk og/eller andre bindevevsindusert aktivitet til BMP-11 proteiner. Denne modifiserte analysen er her betegnet Rosen-modifisert Sampath-Reddi analyse. Etanol presipiteringstrinnet uifølge Sampath-Reddi prosedyren blir erstattet med dialysering (dersom sammensetningen er en oppløsning) eller diafiltrering (dersom sammensetninger er en suspensjon) av fraksjonene som skal bli analysert mot vann. Oppløsningen eller suspensjonen blir deretter ekvilibret til 0.1% TFA. Den resulterende oppløsningen blir tilsatt til 20 mg rottematrise. En uriktig rottematriseprøve som ikke er behandlet med protein virker som kontroll. Dette materialet blir frosset og lyofilisert og det resulterende pulveret blir innesluttet i nr. 5 gelatinkapsler. Kapslene blir implantert subkutan i abdominal halsområdet til 21-49 dager gamle hann Long Evans rotter. Implantatene blir fjernet etter 7-14 dager. Halvparten av hvert implantat blir anvendt for

alkalisk fosfataseanalyse (se Reddi et al, Proc. Natl. Acad. Sci., 69:1601 (1972)).

Den andre halvparten av hvert implantat blir fiksert og prosessert for histologiske analyser. 1 µm glykolmetakrylat deler blir farget med Von Kossa og syrefuscin for å registrere mengden av indusert ben og brusk dannelse til stede i hvert implantat.

Betegnelsene +1 til og med +5 representerer området til hver histologiske del av et implantat okkupert av nye ben og/eller bruskceller og matrise. En registrering på +5 indikerer at mer enn 50% av implantatet er nytt ben og/eller brusk produsert som et direkte resultat av protein i implantatet. En registrering på +4, +3, +2 og +1 indikerer at mer enn 40%, 30%, 20% og 10% av implantatet inneholder nytt brusk og/eller ben.

BMP-11 proteinene ifølge oppfinnelsen kan bli vurdert for aktivitet i denne analysen.

EKSEMPEL 7

Biologisk aktivitet til uttrykt BMP-11

For å måle den biologiske aktiviteten til uttrykte BMP-11 proteinet oppnådd i eksempel 3 ovenfor blir proteinene isolert fra cellekulturen og rensset ved isolering av BMP-11 proteinene fra andre proteinholdige materialer som de blir produsert sammen med samt fra andre kontaminanter. Rensset protein kan bli vurdert i henhold til rottebendannelsesanalysen beskrevet i eksempel 6.

Rensingen blir utført ved anvendelse av standardteknikker som er kjent for fagfolk innenfor dette området.

Proteinanalyser blir utført ved anvendelse av standardteknikker så som SDS-PAGE akrylamid (Laemmli, Nature 227:680 (1970)) farget med sølv (Oakley, et al. Anal. Biochem. 105:361 (1980)) og ved immunoblot (Towbin, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350 (1979)).

Foregående beskrivelser angir foretrukne utførelsesformer ifølge oppfinnelsen. Mange modifikasjoner og variasjoner ved utførelse derav fremkommer for fagfolk innenfor dette området ved å betrakte disse beskrivelsene. Disse modifikasjonene og variasjonene er innbefattet i kravene.

EKSEMPEL 8**Forsek for å bestemme aktivitet til BMP-11**

Rensingen blir utført ved anvendelse av standardteknikker kjent for fagfolk innenfor dette området. Det er blitt vurdert som med andre proteiner av TGF- β superfamilien at
 5 rensingen kan innbefatte anvendelse av heparin sepharose.

Proteinanalysen blir utført ved anvendelse av standardteknikker så som SDS-PAGE
 akrylamid (Laemmli, Nature 227:680 (1970)) farvet med sølv (Oakley, et al. Anal.
 Biochem. 105:361 (1980)) og ved immunoblot (Towbin, et al. Proc. Natl. Acad. Sci.
 10 USA 76:4350 (1979))-

BMP-11 proteinene kan bli ytterligere karakterisert ved deres evne til å modulere
 frigjøringen av follikkelstimulerende hormon (FSH) ved etablering av in vitro
 bioanalyser ved anvendelse av rottefremre hypofyseceller som beskrevet i for eksempel
 15 Vale et al, Endocrinology, 91:562-572 (1972); Ling et al., Nature, 321:779-782 (1986)
 eller Vale et al., Nature, 321:776-779 (1986), og disse beskrivelsene er inkorporert heri
 som referanse.

Alternativt kan BMP-11 bli karakterisert ved deres evne til å stimulere erythropoietin
 20 aktiviteten i human K-562 celledinje som beskrevet av Lozzio et al., Blood, 45:321-334
 (1975) og US-PS 5.071.834 i kolonne 15 som også er inkorporert heri som referanse.

I tillegg kan BMP-11 bli karakterisert ved deres aktivitet i celleoverlevelsesanalyser
 som beskrevet i Schubert, Nature, 344:868-870 (1990), og beskrivelsen er inkorporert
 25 heri som referanse.

SEKVENSLISTE

(1) GENERELL INFORMASJON:

(i) APPLICANT:

(A) NAME: GENETICS INSTITUTE, INC.
 (B) STREET: 87 CambridgePark Drive
 (C) CITY: Cambridge
 (D) STATE: Massachusetts
 (E) COUNTRY: USA
 (F) POSTAL CODE (ZIP): 02140
 (G) TELEPHONE: 617 876-1170
 (H) TELEFAX: 617-876-5851

(ii) TITLE OF INVENTION: BMP-11 COMPOSITIONS

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 11

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
 (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 789 basepar
 (B) TYPE: nukleinsyre
 (C) TRÅDTYPE: dobbel
 (D) TOPOLOGI: linear

(ii) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

(iv) OPPRINNELIG KILDE:

(A) ORGANISME: Bos Taurus
 (B) STAMME: bovin aktivin WC

(1x) TREKK:

(A) NAME/KEY: CDS
 (B) LOCATION: 324..704

(1x) TREKK:

(A) NAME/KEY: misc_feature
 (B) LOCATION: 322..323
 (D) OTHER INFORMATION: /note="putative 3' end of intron"

(1x) TREKK:

(A) NAME/KEY: mat_peptide
 (B) LOCATION: 375..701

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 1:

AAACTGTATT TTGGCGTGAA GGTGTGAGTT AATAGATTCA CCGGACAACA AAGATGGGCT	60
GTGTTGAGA CCTTGGGCCA AGGGGCTGAT GAGGCTCAGG TTGCCAAGAG AGAGAGAATT	120
AGGGAAGCTG AGTTTAGGGA GACATGGCTA GCTGGCAAGA AAGTGGGTA GAAAACAGGG	180
GTGGGGAGG GGAGCACTGG AGAAGCTCAG AATCACTTG GTCTCTGTTT TCCTGCCCTT	240
ACTGAGGGGC AGGTGAGAAG AAACAGGGAG TAGGAGCTCC TCGAGGCTCT ATTACATCTC	300

35

	TTTCTCCTCT CCCTCACCCC CAG CAT CCT TTT ATG GAG CTT CGA GTC CTA	350
	His Pro Phe Met Glu Leu Arg Val Leu	
	-17 -15 -10	
	GAG AAC ACA AAA CGG TCC CGG CGG AAC CTG GGC CTG GAC TGC GAT GAA	398
	Glu Asn Thr Lys Arg Ser Arg Arg Asn Leu Gly Leu Asp Cys Asp Glu	
	-5 1 5	
5	CAT TCA AGT GAG TCC CGC TGT TGC CGC TAC CCC CTC ACT GTG GAC TTT	446
	His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe	
	10 15 20	
	GAG GCT TTT GGC TGG GAC TGG ATC ATC GCT CCT AAA CGC TAC AAG GCC	494
	Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala	
	25 30 35 40	
10	AAC TAC TGC TCC GGC CAG TGC GAG TAC ATG TTT ATG CAA AAG TAT CGG	542
	Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu Tyr Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro	
	45 50 55	
	CAC ACC CAC TTG GTG CAA CAG GCT AAC CCA AGA GGC TCT GCG GGG CCC	590
	His Thr His Leu Val Gln Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro	
	60 65 70	
	TGC TGC ACA CCC ACC AAG ATG TCC CCA ATC AAC ATG CTC TAC TTC AAT	638
	Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn	
	75 80 85	
15	GAC AAG CAG CAG ATT ATC TAC GGC AAG ATC CCT GGC ATG GTG GTG GAT	686
	Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Gly Met Val Val Asp	
	90 95 100	
	CGC TGT GGC TGC TCC TAAGGTGGGG GACAGCGGAT GCCTCCCCAA CAGACCCTGC	741
	Arg Cys Gly Cys Ser	
	105 110	
20	CCCTAGACTC CCCCAGCCCT GACCCCTGTC TCCCGGCCCC TAGAGCTC	789

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 2:

(1) SEKVENSKARAKTERTREKK:

- (A) LENGDE: 126 aminosyrer
- (B) TYPE: aminosyre
- (D) TOPOLOGI: linear

(11) MOLEKYLTYP: protein

(x1) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 2:

30	His Pro Phe Met Glu Leu Arg Val Leu Glu Asn Thr Lys Arg Ser Arg
	-17 -15 -10 -5
	Arg Asn Leu Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys
	1 5 10 15
	Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp
	20 25 30
	Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys
	35 40 45
35	Glu Tyr Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln
	50 55 60
	Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met

65					70	36							75		
Ser	Pro	Ile	Asn	Met	Leu	Tyr	Phe	Asn	Asp	Lys	Gln	Gln	Ile	Ile	Tyr
80					85					90					95
Gly	Lys	Ile	Pro	Gly	Met	Val	Val	Asp	Arg	Cys	Gly	Cys	Ser		
				100					105						

Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala Asn
 1 5 10 15
 Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro
 20 25 30
 Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Lys
 35 40 45
 Ile Pro Gly Met
 50

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 5:

- (1) SEKVENSKARAKTERTREKK:
 (A) LENGDE: 30 basepar
 (B) TYPE: nukleinsyre
 (C) TRÅDTYPE: enkel
 (D) TOPOLOGI: lineær
- (ii) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)
- (vi) ORIGINAL KILDE:
 (A) ORGANISME: primer C til bovin activin WC
- (ix) TREKK:
 (A) NAME/KEY: misc_feature
 (B) LOCATION: 1..9
 (D) OTHER INFORMATION: /note= "Restriction site for XbaI"

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE FOR SEQ ID NO: 5:

TAGTCTAGAT GCTCCGGCCA GTGCGAGTAC 30

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 6:

- (1) SEKVENSKARAKTERTREKK:
 (A) LENGDE: 30 basepar
 (B) TYPE: nukleinsyre
 (C) TRÅDTYPE: enkel
 (D) TOPOLOGI: lineær
- (ii) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)
- (vi) OPPRINNELIGE KILDE:
 (A) ORGANISME: primer D til bovin activin WC
- (ix) TREKK:
 (A) NAME/KEY: misc_feature
 (B) LOCATION: 1..9
 (D) OTHER INFORMATION: /note="Restriction site for BamHI"

(xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 6:

TGCGGATCCG GAGCAGCCAC AGCGATCCAC 30

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 7:

(1) SEKVENNS KARAKTERTREKK:

- (A) LENGDE: 15 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅDTYPE: enkel
- (D) TOPOLOGI: linear

(11) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

(v1) OPPRINNELIG KILDE:

- (A) ORGANISME: DNA innskudd inn i pMT2 CXM

(x1) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 7:

CATGGGCAGC TCGAG

15

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 8:

(1) SEKVENNS KARAKTERTREKK:

- (A) LENGDE: 34 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRÅDTYPE: enkel
- (D) TOPOLOGI: linear

(11) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

(v1) OPPRINNELIG KILDE:

- (A) ORGANISME: DNA innskudd inn i pMT21

(1x) TREKK:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 1..6
- (D) OTHER INFORMATION: /note? "Pst restriction site"

(1x) TREKK:

- (A) NAME/KEY: misc_feature
- (B) LOCATION: 15..26
- (D) OTHER INFORMATION: /note= "Eco RI and XhoI restriction sites"

(x1) SEKVENNS BESKRIVELSE: SEQ ID NO: 8:

CTGCAGGCGA GCCTGAATTC CTCGAGCCAT CATG

34

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 9:

(1) SEKVENNS KARAKTERTREKK:

- (A) LENGDE: 68 basepar
- (B) TYPE: nukleinsyre
- (C) TRPDTYPE: enkel
- (D) TOPOLOGI: linear

(11) MOLEKYLTTYPE: DNA (genomisk)

(v1) OPPRINNELIG KILDE:

(A) ORGANISME: del av EMC virus ledersekvensen

(x) PUBLIKASJONSINFORMASJON:

(A) AUTHORS: Jung, S K

(C) JOURNAL: J. Virol

(D) VOLUME: 63

(F) PAGES: 1651-1660

(G) DATE: 1989

(x1) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 9:

CGAGGTAAA AAACGTCTAG GCCCCCCGAA CCACGGGGAC GTGGTTTTC TTTGAAAAC 60
 ACGATTGC 68

(2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 10:

(1) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 1270 basepar

(B) TYPE: nukleinsyre

(C) TRÅDTYPE: enkel

(D) TOPOLOGI: linear

(11) MOLEKYLTYP: DNA (genomisk)

(v1) ORIGINAL KILDE:

(A) ORGANISME: human BMP-11

(v11) IMMEDIATE SOURCE:

(B) KLON: FB30.5

(1x) TREKK:

(A) NAME/KEY: CDS

(B) LOCATION: 1..1086

(1x) TREKK:

(A) NAME/KEY: mat peptide

(B) LOCATION: 760..1086

(x1) SEKVENSBESKRIVELSE FOR SEQ ID NO: 10:

	GAG CGC TCC AGC CGG CCA GCC CCG TCC GTG GCG CCC GAG CCG GAC GGC	48
	Glu Arg Ser Ser Arg Pro Ala Pro Ser Val Ala Pro Glu Pro Asp Gly	
	-253 -250 -245 -240	
5	TGC CCC GTG TGC GTT TGG CCG CAG CAC AGC CGC GAG CTG CGC CTA GAG	96
	Cys Pro Val Cys Val Trp Arg Gln His Ser Arg Glu Leu Arg Leu Glu	
	-235 -230 -225	
	AGC ATC AAG TCG CAG ATC TTG AGC AAA CTG CCG CTC AAG GAG GCG CCC	144
	Ser Ile Lys Ser Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Lys Glu Ala Pro	
	-220 -215 -210	
10	AAC ATC AGC CGC GAG GTG GTG AAG CAG CTG CTG CCC AAG GCG CCG CCG	192
	Asn Ile Ser Arg Glu Val Val Lys Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro	
	-205 -200 -195 -190	
	CTG CAG CAG ATC CTG GAC CTA CAC GAC TTC CAG GGC GAC GCG CTG CAG	240
	Leu Gln Gln Ile Leu Asp Leu His Asp Phe Gln Gly Asp Ala Leu Gln	
	-185 -180 -175	
	CCC GAG GAC TTC CTG GAG GAG GAC GAG TAC CAC GCC ACC ACC GAG ACC	288
	Pro Glu Asp Phe Leu Glu Glu Asp Glu Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr	
	-170 -165 -160	
15	GTC ATT AGC ATG GCC CAG GAG ACG GAC CCA GCA GTA CAG ACA GAT GGC	336
	Val Ile Ser Met Ala Gln Glu Thr Asp Pro Ala Val Gln Thr Asp Gly	
	-155 -150 -145	
	AGC CCT CTC TGC TGC CAT TTT CAC TTC AGC CCC AAG GTG ATG TTC ACA	384
	Ser Pro Leu Cys Cys His Phe His Ser Pro Lys Val Met Phe Thr	
	-140 -135 -130	
20	AAG GTA CTG AAG GCC CAG CTG TGG GTG TAC CTA CCG CCT GTA CCC CGC	432
	Lys Val Leu Lys Ala Gln Leu Trp Val Tyr Leu Arg Pro Val Pro Arg	
	-125 -120 -115 -110	
	CCA GCC ACA GTC TAC CTG CAG ATC TTG CGA CTA AAA CCC CTA ACT GGC	480
	Pro Ala Thr Val Tyr Leu Gln Ile Leu Arg Leu Lys Pro Leu Thr Gly	
	-105 -100 -95	
25	GAA GGG ACC GCA GGG GGA GGG GGC GGA GGC CCG CGT CAC ATC CGT ATC	528
	Glu Gly Thr Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Arg His Ile Arg Ile	
	-90 -85 -80	
	CGC TCA CTG AAG ATT GAG CTG CAC TCA CGC TCA GGC CAT TGG CAG AGC	576
	Arg Ser Leu Lys Ile Glu Leu His Ser Arg Ser Gly His Trp Gln Ser	
	-75 -70 -65	
30	ATC GAC TTC AAG CAA GTG CTA CAC AGC TGG TTC CGC CAG CCA CAG AGC	624
	Ile Asp Phe Lys Gln Val Leu His Ser Trp Phe Arg Gln Pro Gln Ser	
	-60 -55 -50	
	AAC TGG GGC ATC GAG ATC AAC GCC TTT GAT CCC AGT GGC ACA GAC CTG	672
	Asn Trp Gly Ile Glu Ile Asn Ala Phe Asp Pro Ser Gly Thr Asp Leu	
	-45 -40 -35 -30	
35	GCT GTC ACC TCC CTG GGG CCG GGA GCC GAG GGG CTG CAT CCA TTC ATG	720
	Ala Val Thr Ser Leu Gly Pro Gly Ala Glu Gly Leu His Pro Phe Met	
	-25 -20 -15	

5	GAG CTT CGA GTC CTA GAG AAC ACA AAA CGT TCC CGG CGG AAC CTG GGT Glu Leu Arg Val Leu Glu Asn Thr Lys Arg Ser Arg Arg Asn Leu Gly -10 -5 1	768
	CTG GAC TGC GAC GAG CAC TCA AGC GAG TCC CGC TGC TCC CGA TAT CCC Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro 5 10 15	816
10	CTC ACA GTG GAC TTT GAG GCT TTC GGC TGG GAC TGG ATC ATC GCA CCT Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro 20 25 30 35	864
	AAG CGC TAC AAG GCC AAC TAC TGC TCC GGC CAG TGC GAG TAC ATG TTC Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu Tyr Met Phe 40 45 50	912
15	ATG CAA AAA TAT CCG CAT ACC CAT TTG GTG CAG CAG GCC AAT CCA AGA Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala Asn Pro Arg 55 60 65	960
	GGC TCT GCT GGG CCC TGT TGT ACC CCC ACC AAG ATG TCC CCA ATC AAC Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn 70 75 80	1008
20	ATG CTC TAC TTC AAT GAC AAG CAG CAG ATT ATC TAC GGC AAG ATC CCT Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro 85 90 95	1056
	GGC ATG GTG GTG GAT CCG TGT GGC TGC TCT TAAGGTGGGG GATAGAGGAT Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser 100 105	1106
25	GCCTCCCCCA CAGACCTAC CCCAAGACCC CTAGCCCTGC CCCCATCCCC CCAAGCCCTA GAGCTCCCTC CACTCTTCCC GCGAACATCA CACCGTTCCC CGACCAAGCC GTGTGCAATA CAACAGAGGG AGGCAGGTGG GAATTGAGGG TGAGGGGTTT GGGG	1166 1226 1270

30 (2) INFORMASJON FOR SEQ ID NO: 11:

(1) SEKVENSKARAKTERTREKK:

(A) LENGDE: 320 aminosyrer

(B) TYPE: aminosyre

(D) TOPOLOGI: linear

35 (11) MOLEKYLTYP: protein

(x1) SEKVENNS BESKRIVELSE: SEQ ID NO: 11:

Glu Arg Ser Ser Arg Pro Ala Pro Ser Val Ala Pro Glu Pro Asp Gly
 -253 -250 -245 -240
 Cys Pro Val Cys Val Trp Arg Gln His Ser Arg Glu Leu Arg Leu Glu
 -235 -230 -225
 Ser Ile Lys Ser Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Lys Glu Ala Pro
 -220 -215 -210
 Asn Ile Ser Arg Glu Val Val Lys Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro
 -205 -200 -195 -190
 Leu Gln Gln Ile Leu Asp Leu His Asp Phe Gln Gly Asp Ala Leu Gln
 -185 -180 -175
 Pro Glu Asp Phe Leu Glu Glu Asp Glu Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr
 -170 -165 -160
 Val Ile Ser Met Ala Gln Glu Thr Asp Pro Ala Val Gln Thr Asp Gly
 -155 -150 -145
 Ser Pro Leu Cys Cys His Phe His Phe Ser Pro Lys Val Met Phe Thr
 -140 -135 -130
 Lys Val Leu Lys Ala Gln Leu Trp Val Tyr Leu Arg Pro Val Pro Arg
 -125 -120 -115 -110
 Pro Ala Thr Val Tyr Leu Gln Ile Leu Arg Leu Lys Pro Leu Thr Gly
 -105 -100 -95
 Glu Gly Thr Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Arg His Ile Arg Ile
 -90 -85 -80
 Arg Ser Leu Lys Ile Glu Leu His Ser Arg Ser Gly His Trp Gln Ser
 -75 -70 -65
 Ile Asp Phe Lys Gln Val Leu His Ser Trp Phe Arg Gln Pro Gln Ser
 -60 -55 -50
 Asn Trp Gly Ile Glu Ile Asn Ala Phe Asp Pro Ser Gly Thr Asp Leu
 -45 -40 -35 -30
 Ala Val Thr Ser Leu Gly Pro Gly Ala Glu Gly Leu His Pro Phe Met
 -25 -20 -15
 Glu Leu Arg Val Leu Glu Asn Thr Lys Arg Ser Arg Arg Asn Leu Gly
 -10 -5 1
 Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro
 5 10 15
 Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro
 20 25 30 35
 Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu Tyr Met Phe
 40 45 50
 Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala Asn Pro Arg
 55 60 65
 Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn
 70 75 80
 Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro
 85 90 95
 Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
 100 105

Patentkrav

1.

5 Isolert DNA-molekyl, karakterisert ved at det omfatter en DNA sekvens som koder for et BMP-11-protein som viser BMP-11-aktivitet, der DNA-sekvensen er valgt fra gruppen bestående av:

- (a) nukleotid nr. 375 eller 390 til nr. 704 ifølge SEQ ID NO: 1;
- (b) nukleotidene nr. 760 eller 775 til nr. 1086 ifølge SEQ ID NO: 10,
- 10 (c) nukleotider kodende for aminosyrene 1 eller 6 til 109 ifølge SEQ ID NO: 2;
- (d) nukleotider kodende for aminosyrene 1 eller 6 til 109 ifølge SEQ ID NO: 11 og
- (e) mutanter, varianter eller ekvivalente degenerative kodonsekvenser ifølge (a) eller (b), der mutanten, varianten eller den degenerative kodonsekvens
- 15 koder for et protein som har tilsvarende biologisk aktivitet som BMP-11 kodet av sekvensene i a) og b).

2.

Vertscelle, karakterisert ved at den er transformert med DNA sekvensen
20 ifølge krav 1.

3.

Vektor, karakterisert ved at den omfatter et DNA molekyl ifølge krav 1 i operativ assosiasjon med en ekspresjonskontrollsekvens derav.

25

4.

Vertscelle, karakterisert ved at den er transformert med vektoren ifølge krav 3.

30

5.

Isolert DNA molekyl ifølge krav 1, karakterisert ved at det omfatter en DNA sekvens valgt fra gruppen bestående av nukleotidene nr. 375 til nr. 704 ifølge SEQ ID NO: 1 og nukleotidene nr. 760 til nr. 1086 ifølge SEQ ID NO: 10.

35

6.

Vektor, karakterisert ved at den omfatter et DNA molekyl ifølge krav 5 i operativ assosiasjon med en ekspresjonskontrollsekvens derav.

7.

Vertscelle, karakterisert ved at den er transformert med vektoren ifølge krav

6.

8.

Frengangsmåte for fremstilling av et rensset benmorfogenisk protein-11 (BMP-11) protein, karakterisert ved at den omfatter følgende trinn:

(a) dyrking av en vertscelle ifølge krav 2 eller 4 og

(b) isolering og rensing av nevnte BMP-11 protein fra dyrkningsmediet.

9.

Frengangsmåte ifølge krav 8, karakterisert ved at nevnte vertscelle blir transformert med et DNA molekyl som omfatter en DNA kodende sekvens valgt fra gruppen bestående av:

(a) nukleotid nr. 375 til nr. 704 ifølge SEQ ID NO: 1;

(b) nukleotid nr. 760 til nr. 1086 ifølge SEQ ID NO: 10 og

(c) naturlig forekommende allele sekvenser og ekvivalente degenerative kodonsekvenser ifølge (a) og (b).

10.

Frengangsmåte ifølge krav 9, karakterisert ved at nevnte vertscelle er en pattedyrcelle og DNA molekylet er en DNA sekvens ifølge krav 1.

11.

Renset benmorfogenisk protein-11 (BMP-11) polypeptid, karakterisert ved at det omfatter aminosyresekvensen fra aminosyre nr. 1 til nr. 109 som angitt i SEQ ID NO: 2.

12.

Renset benmorfogenisk protein-11 (BMP-11) polypeptid, karakterisert ved at det omfatter aminosyresekvensen fra aminosyre nr. 1 til nr. 109 som angitt i SEQ ID NO: 11.

13.

Renset BMP-11 polypeptid ifølge krav 12, karakterisert ved at nevnte polypeptid er en dimer hvor hver subenhet omfatter aminosyresekvensen fra aminosyre

nr. 1 til nr. 109 ifølge SEQ ID NO: 11.

14.

Renset benmorfogenisk protein-11 (BMP-11) polypeptid ifølge krav 12,

- 5 karakterisert ved at nevnte polypeptid er en dimer som omfatter to subenheter, hvori en subenhet omfatter aminosyresekvensen fra aminosyre nr. 1 til aminosyre nr. 109 ifølge SEQ ID NO: 11, og en subenhet som omfatter en aminosyresekvens fra et benmorfogenisk protein valgt fra gruppen bestående av BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9 og BMP-10.

10

15.

DNA-sekvens ifølge krav 1, karakterisert ved at nevnte DNA-sekvenser er tilkople, i riktig leseramme, en DNA-sekvens som koder for et propeptid fra et medlem av TGF- β -superfamilien av proteiner.

15

16.

Polypeptid, karakterisert ved at det omfatter BMP-11-proteinet ifølge krav 11 eller 12 i dimer form med et inhibin- α -protein.

20

17.

Polypeptid, karakterisert ved at det omfatter BMP-11-proteinet ifølge krav 11 eller 12 i dimer form med et inhibin- β -protein.