(19) **Bundesrepublik Deutschland**
**Deutsches Patent- und Markenamt**

(10) **DE 694 33 530 T2** 2005.01.05

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 698 094 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 530.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/05288**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 917 361.1**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 94/26892**
(86) PCT-Anmeldetag: **12.05.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **24.11.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.02.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **04.02.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.01.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 15/16**
**A61K 38/22**

(30) Unionspriorität:
**61464** **12.05.1993** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:
**Genetics Institute, LLC, Cambridge, Mass., US**

(72) Erfinder:
**CELESTE, J., Anthony, Hudson, US; WOZNEY, M., John, Hudson, US**

(74) Vertreter:
**Reitstötter, Kinzebach & Partner (GbR), 81679 München**

(54) Bezeichnung: **BMP-11 ZUSAMMENSETZUNGEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

### HINTERGRUND DER ERFINDUNG

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft eine neuartige Familie von gereinigten Proteinen mit der Bezeichnung BMP-11, DNA-Moleküle, welche für sie codieren und Verfahren, um sie zu erhalten. Die Erfinder haben die BMP-11 Proteine vorhergehend als Activin WC bezeichnet. Die BMP-11 Proteine können brauchbar sein, um Knochen- und/oder Knorpelbildung herbeizuführen, und bei Wundheilung und Gewebereparatur, oder zum Vermehren der Aktivität von anderen Knochen-morphogenen Proteinen. Die BMP-11 Proteine können auch brauchbar sein, um die Herstellung von Follikel-stimulierendem Hormon zu regulieren, zur Empfängnisverhütung, um neuronales Zellüberleben zu fördern, zum Stimulieren von Hämatopoiese und um die Entwicklung von gonadalen Tumoren zu unterdrücken.

**[0002]** US-Patent 4798885 offenbarte DNA, welche für die Prepro-Inhibin α und β Ketten codiert. US-Patent 5071834 offenbart pharmazeutische Zusammensetzungen von Activin mit zwei $Beta_B$-Ketten, formuliert in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger.

**[0003]** US-Patent 5102807 offenbart ein gereinigtes Inhibinprotein, welches Herstellung von FSH unterdrückt, ohne Herstellung von luteinisierendem Hormon zu unterdrücken.

### ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

**[0004]** BMP-11 Protein ist ein Mitglied der TGF-β Superfamilie von Proteinen. Die TGF-β Superfamilie schließt die Familie von Proteinen ein, welche als Knochen-morphogene Proteine (BMPs) bekannt ist, als auch eine Gruppe von Proteinen, die Inhibin-β genannt wird. Wie hierin weiter erörtert, wird von BMP-11 erwartet, dass es BMP-11 Wirksamkeit zeigt, wenn es mit einem weiteren BMP-11 dimerisiert wird (Homodimer), wie hierin weiter beschrieben, wie gemäß den in den Beispielen hierin beschriebenen Tests gemessen werden kann. wenn es mit Inhibin-α Proteinen oder mit anderen Inhibin-β Proteinen als Heterodimer dimerisiert wird, wird vom Inhibin-β/BMP-11 Heterodimer erwartet, dass es Wirkungen auf die Herstellung von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) zeigt, wie weiter hierin beschrieben. Es wird ferner erwartet, dass BMP-11 in homodimerer Form oder in heterodimerer Form mit einem weiteren Mitglied der Knochen-morphogenen Proteinfamilie BMP-Aktivität aufweisen wird, also die Fähigkeit, die Bildung von Knochen, Knorpel und/oder anderem Bindegewebe herbeizuführen. Somit kann es je nach Umgebung von BMP-11 Dimere bilden, welche entweder Activin- oder Inhibinaktivität, oder Knochen-, Knorpel- und/oder andere Bindegewebe herbeiführende Aktivität zeigen werden. Entsprechend wird BMP-11 Wirksamkeit als Fähigkeit definiert, die Herstellung von FSH in dem bei Beispiel 8 hierin beschriebenen Test zu regulieren, oder die Fähigkeit, die Bildung von Knochen, Knorpel und/oder anderem Bindegewebe in den bei Beispielen 5 bis 7 hierin beschriebenen Tests herbeizuführen.

**[0005]** Proteine mit der Bezeichnung Inhibine und Activine werden in den Gonaden hergestellt und kommen in Follikelflüssigkeit natürlich vor. Diese Proteine wirken auf dem Level der Hypophysenvorderlappen, um die Abgabe von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) zu hemmen (Inhibine) oder zu stimulieren (Activine) [zur Übersicht siehe z. B. Ying, S. -Y., Endocr. Rev., 9: 267–293 (1988) oder Ling, N. et al., Vitamins and Hormones, 44: 1–46 (Academic Press 1988)]. Kurz: dimere Proteine, welche aus einer Kette von Inhibin α und einer Kette von Inhibin-β ($\beta_A$ oder $\beta_B$) bestehen, werden als Inhibine bezeichnet und werden durch ihre Fähigkeit gekennzeichnet, die Abgabe von Follikel-stimulierendem Hormon (FHS) zu hemmen, während andere dimere Proteine, welche aus zwei Ketten von Inhibin-β ($\beta_A$ oder $\beta_B$) bestehen, als Activine bezeichnet werden und durch ihre Fähigkeit gekennzeichnet werden, die Abgabe von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) zu stimulieren [siehe z. B., Ling et al., Nature, 321: 779–782 (1986) oder Vale et al., Nature, 321: 776–779 (1986) oder Mason et al., Nature, 318: 659–663 (1985) oder Forage et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 3091–3095 (1986)].

**[0006]** Es wird erkannt, dass FSH die Entwicklung von Ova in Eierstöcken von Säugern stimuliert (Ross et al., in Textbook of Endocrinology, Hrsg. Williams, p. 355 (1981) und dass übermäßige Stimulation der Eierstöcke mit FSH zu multiplen Ovulationen führen wird. FSH ist ebenfalls bei der Hodenfunktion wichtig. Somit kann BMP-11 in Heterodimeren mit einem Mitglied der Inhibin α Familie als Verhütungsmittel brauchbar sein, basierend auf der Fähigkeit von Inhibinen, Fruchtbarkeit in weiblichen Säugern zu verringern und Spermatogenese in männlichen Säugern zu verringern. Verabreichung von ausreichenden Mengen von weiteren Inhibinen kann Unfruchtbarkeit bei diesen Säugern herbeiführen. BMP-11 kann als Homodimer oder als Heterodimer mit anderen Protein-Untereinheiten der Inhibin-β Gruppe als Fruchtbarkeit herbeiführendes Therapeutikum brauchbar sein, basierend auf der Fähigkeit von Activinmolekülen beim Stimulieren von FSH-Abgabe von Zellen der Hypophysenvorderlappen. Siehe zum Beispiel US-Patent 4798885. BMP-11 kann auch zum Vorrücken des

Beginns von Fruchtbarkeit bei sexuell unreifen Säugern brauchbar sein, um so die reproduktive Leistung der Lebenszeit von Haustieren wie Kühen, Schafen und Schweinen zu erhöhen. Es wird ferner erwogen, dass BMP-11 beim Fördern von neuronalem Zellüberleben [siehe z. B. Schubert et al., Nature, 344: 868–870 (1990)], Modulieren von Hämatopoiese durch Herbeiführen der Differentiation von Erythroidzellen [siehe z. B., Broxmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 9052–9056 (1988) oder Eto et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 142: 1095–1103 (1987)], zum Unterdrücken der Entwicklung von gonadalen Tumoren [siehe z. B. Matzuk et al., Nature, 360: 313–319 (1992)] oder zum Erhöhen der Aktivität von Knochen-morphogenen Proteinen [siehe z. B., Ogawa et al., J. Biol. Chem., 267: 14233–14237 (1992)] brauchbar sein kann.

**[0007]** BMP-11 Proteine können ferner durch ihre Fähigkeit gekennzeichnet werden, die Abgabe von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) in etablierten in vitro Biotests unter Verwendung von Hypophysenvorderlappenzellen von Ratten wie beschrieben zu modulieren [siehe z. B. Vale et al., Endocrinology, 91: 562–572 (1972); Ling et al., Nature, 321: 779–782 (1986) oder Vale et al., Nature, 321: 776–779 (1986)]. Es wird erwogen, dass das BMP-11 Protein der Erfindung, wenn es als Homodimer oder Heterodimer mit anderen Inhibin-β Ketten zusammengesetzt ist, stimulierende Wirkungen auf die Abgabe von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) von Hypophysenvorderlappen wie beschrieben aufweisen wird [Ling et al., Nature, 321: 779–782 (1986) oder Vale et al., Nature, 321: 776–779 (1986)]. Zusätzlich wird erwogen, dass das BMP-11 Protein der Erfindung, wenn es als Heterodimer mit der Inhibin-α Kette konstruiert ist, die Abgabe von Follikelstimulierendem Hormon (FSH) von Hypophysenvorderlappenzellen wie beschrieben hemmen wird [siehe z. B., Vale et al., Endocrinology, 91: 562–572 (1972). Daher wird je nach spezieller Zusammensetzung erwartet, dass das BMP-11 Protein der Erfindung kontrastierende und gegensätzliche Wirkungen auf die Abgabe von Follikelstimulierendem Hormon (FSH) von dem Hypophysenvorderlappen haben kann.

**[0008]** Von Activin A (der homodimeren Zusammensetzung von Inhibin-$\beta_A$) ist gezeigt worden, dass es erythropoietisch-stimulierende Aktivität hat [siehe z. B., Eto et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 142: 1095–1103 (1987) und Murata et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2434–2438 (1988) und Yu et al., Nature, 330: 765–767 (1987)]. Es wird erwogen, dass das BMP-11 Protein der Erfindung eine ähnliche erythropoietisch-stimulierende Aktivität hat. Diese Wirksamkeit des BMP-11 Proteins kann ferner durch die Fähigkeit des BMP-11 Proteins gekennzeichnet werden, Erythropoietin-Aktivität in dem biologischen Test zu zeigen, welcher unter Verwendung der humanen K-562 Zelllinie durchgeführt wird, wie beschrieben durch [Lozzio et al., Blood, 45: 321–334 (1975) und US-Pat. Nr. 5071834].

**[0009]** Die Strukturen von mehreren Proteinen mit der Bezeichnung BMP-1 bis BMP-9 sind vorhergehend veranschaulicht worden. Die einzigartigen induktiven Aktivitäten dieser Proteine legen zusammen mit ihrem Vorkommen in Knochen nahe, dass sie wichtige Regulatoren von Knochenreparaturverfahren sind und in der normalen Aufrechterhaltung von Knochengewebe einbezogen sein können. Das BMP-11 Protein der vorliegenden Erfindung ist mit den obigen BMP-Proteinen verwandt und es wird erwartet, dass es BMP-Wirksamkeiten wie die Fähigkeit, Knochen, Knorpel und/oder anderes Bindegewebe wie Sehne oder Ligament herbeizuführen und Wundheilungswirksamkeiten der BMPs teilt. Zusätzlich wird erwartet, dass die Proteine der Erfindung gemeinsam oder vielleicht synergetisch mit anderen verwandten Proteinen und Wachstumsfaktoren wirken können. Weitere therapeutische Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung umfassen somit eine therapeutische Menge von mindestens einem BMP-11 Protein der Erfindung mit einer therapeutischen Menge von mindestens einem der anderen BMP-Proteine, welche in unten beschriebenen, gemeinsam besessenen Patenten und Anmeldungen offenbart. Solche Kombinationen können separate Moleküle der BMP-Proteine umfassen oder Heteromoleküle, welche aus unterschiedlichen BMP-Komponenten bestehen. Ferner können BMP-11 Proteine mit anderen Wirkstoffen kombiniert werden, welche der Behandlung von Knochen und/oder Knorpeldefekt, Wunden oder fraglichem Gewebe zuträglich sind. Diese Wirkstoffe können verschiedene Wachstumsfaktoren einschließen, wie epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), Plättchen-hergeleiteten Wachstumsfaktor (PDGF), transformierende Wachstumsfaktoren (TGF-α und TGF-β) und k-Fibroblastenwachstumsfaktor (kFFF), Parathormon (PTH), Leukämie-hemmenden Faktor (LIF/HILDA/DIA), insulinähnliche Wachstumsfaktoren (IGF-I und IGF-II). Anteile dieser Wirkstoffe können auch in Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

**[0010]** Die bovine BMP-11 DNA-Sequenz (SEQ ID Nr. 1) und Aminosäuresequenz (SEQ ID Nr. 2) und humane BMP-11 DNA-Sequenz (SEQ ID Nr. 10) und Aminosäuresequenz (SEQ ID Nr. 11) werden in den Sequenzprotokollen hierin dargestellt. Activinproteine sind in der Lage, die Herstellung von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) zu steuern, und somit kann BMP-11 als Empfängnisverhütungsmittel oder Fruchtbarkeit herbeiführendes Therapeutikum brauchbar sein. In homodimerer Form oder in Heterodimeren mit Proteinen der Inhibin-β Gruppe wird von gereinigtem BMP-11 Protein erwartet, dass es Activinaktivität zeigt und kann verwendet werden, um FSH zu stimulieren. Zusätzlich wird erwartet, dass das gereinigte BMP-11 Protein für die Herbei-

führung von Knochen, Knorpel und/oder anderem Bindegewebe brauchbar sein kann.

**[0011]** Bovines BMP-11 kann durch Kultivieren einer mit einer DNA-Sequenz transformierten Zelle hergestellt werden, welche Nucleotid #375 bis Nucleotid #704 umfasst, wie in SEQ ID Nr. 1 gezeigt, und Gewinnen und Reinigen eines Proteins aus dem Kulturmedium, welches durch die Aminosäuresequenz gekennzeichnet ist, welche Aminosäure #1 bis #109 umfasst, wie in SEQ ID Nr. 2 gezeigt, im Wesentlichen frei von anderen proteinartigen Substanzen, mit welchen es zusammen hergestellt wird.

**[0012]** Von humanem BMP-11 wird erwartet, dass es mit bovinem BMP-11 homolog ist. Die Erfindung schließt daher Verfahren zum Erhalten der DNA-Sequenzen ein, welche für humanes BMP-11 codieren, die durch diese Verfahren erhaltenen DNA-Sequenzen und das humane Protein, welches durch diese DNA-Sequenzen codiert wird. Dieses Verfahren bringt Nutzen der bovinen BMP-11 Nucleotidsequenz oder Teile davon mit sich, um Sonden zu entwerfen, um Bibliotheken bezüglich des humanen Gens oder Fragmenten davon unter Verwendung von Standardtechniken zu screenen. Eine DNA-Sequenz, welche für einen Teil des humanen BMP-11 Proteins codiert (SEQ ID Nr. 3) und die entsprechende Aminosäuresequenz (SEQ ID Nr. 4) werden im Sequenzprotokoll dargestellt. Diese Sequenzen können auch verwendet werden, um Sonden zu entwerfen, um das vollständige humane BMP-11 Gen durch Standardtechniken zu erhalten. Humanes BMP-11 kann durch Kultivieren einer mit der BMP-11 DNA-Sequenz transformierten Zelle und Gewinnen und Reinigen von BMP-11 aus dem Kulturmedium hergestellt werden. Das gereinigte exprimierte Protein ist im Wesentlichen frei von anderen proteinartigen Materialien, mit weichen es zusammen hergestellt wird, als auch von anderen Verunreinigungen.

**[0013]** Vom gewonnenen, gereinigten Protein wird erwogen, dass es die Fähigkeit zeigt, die Herstellung von FSH zu regulieren. Die Proteine der Erfindung können ferner durch ihre Fähigkeit gekennzeichnet werden, die Herstellung von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) in etablierten in vitro Biotests unter Verwendung von Zellen von Hypophysenvorderlappen von Ratten zu stimulieren. BMP-11 Proteine können auch durch die Fähigkeit gekennzeichnet werden, die Bildung von Knochen, Knorpel und/oder anderem Bindegewebe zum Beispiel in dem unten beschriebenen Rattenknochenbildungstest herbeizuführen.

**[0014]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung sieht pharmazeutische Zusammensetzungen vor, welche eine therapeutisch wirksame Menge eines BMP-11 Proteins in einem pharmazeutisch annehmbaren Vehikel oder Träger enthalten. BMP-11 Zusammensetzungen dieser Erfindung können zur Regulierung von Follikel-stimulierendem Hormon brauchbar sein und können bei der Empfängnisverhütung brauchbar sein. Zusammensetzungen dieser Erfindung können ferner mindestens einen anderen therapeutisch brauchbaren Wirkstoff enthalten, wie die BMP-Proteine BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6 und BMP-7, welche zum Beispiel in den US-Patenten 5108922; 5013649; 5116738; 5106748; 5187076 und 5141905 offenbart werden; BMP-8, welches in PCT-Veröffentlichung WO91/18098 offenbart wird; und BMP-9, welches in PCT-Veröffentlichung WO93/00432 offenbart wird, und BMP-10, welches in der gleichzeitig anhängigen Patentanmeldung mit der Seriennummer 08/061695, eingereicht am 12. Mai 1993, offenbart wird. Die BMP-11 Zusammensetzungen können auch für eine Anzahl an Verwendungen brauchbar sein, welche Regulierung der Herstellung von Follikel-stimulierendem Hormon einbeziehen, einschließlich Empfängnisverhütung. Diese Verfahren gemäß der Erfindung bringen Verabreichen einer wirksamen Menge an BMP-11 an einen Patienten mit sich, der solch eine Behandlung braucht.

**[0015]** Die Zusammensetzungen der Erfindung können zusätzlich zu einem BMP-11 Protein andere Mitglieder der Inhibin-β Gruppe von Proteinen oder Inhibin-α Proteine umfassen, als auch andere therapeutisch brauchbare Wirkstoffe, einschließlich Wachstumsfaktoren wie epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), transformierenden Wachstumsfaktor (TGF-α und TGF-β) und insulinähnlichen Wachstumsfaktor (IGF).

**[0016]** Die BMP-11 Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können auch zum Behandeln einer Anzahl an Knochen- und/oder Knorpeldefekten, Periodontalerkrankung und verschiedenen Wundarten brauchbar sein. Diese Verfahren gemäß der Erfindung bringen Verabreichen einer wirksamen Menge eines BMP-11 Proteins an einen Patienten mit sich, der solche Knochen- und/oder Knorpelbildung, Wundheilung oder Gewebereparatur benötigt. Diese Verfahren können auch die Verabreichung eines Proteins der Erfindung zusammen mit mindestens einem der neuartigen BMP-Proteine mit sich bringen, welche in den oben beschriebenen, gleichzeitig besessenen Patenten und Anmeldungen offenbart werden. Zusätzlich können diese Verfahren ebenfalls die Verabreichung eines BMP-11 Proteins mit anderen Wachstumsfaktoren, einschließlich EGF, FGF, TGF-α, TGF-β und IGF einschließen.

**[0017]** Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung sind DNA-Sequenzen, welche für Expression eines BMP-11 Proteins codieren. Solche Sequenzen schließen die Sequenz von Nucleotiden in einer 5' zu 3' Richtung, veranschaulicht in SEQ ID NR. 1, oder DNA-Sequenzen ein, welche unter stringenten Bedingungen mit der DNA-Sequenz von SEQ ID Nr. 1 hybridisieren und für ein Protein mit BMP-11 Wirksamkeit codieren. Schließlich sind Allelen oder andere Variationen der Sequenzen von SEQ ID Nr. 1, ob solche Nucleotidveränderungen Veränderungen in der Peptidsequenz ergeben oder nicht, ebenfalls in der vorliegenden Erfindung eingeschlossen.

**[0018]** Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung sind DNA-Sequenzen, welche für Expression eines BMP-11 Proteins codieren. Solche Sequenzen schließen die Sequenz von Nucleotiden in einer 5' bis 3' Richtung, veranschaulicht in SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 10 ein, und DNA-Sequenzen, welche bis auf die Degeneration des genetischen Codes mit der DNA-Sequenz von SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 10 identisch sind und für das Protein von SEQ ID Nr. 2 oder SEQ ID Nr. 11 codieren. Ferner sind in der vorliegenden Erfindung DNA-Sequenzen eingeschlossen, welche unter stringenten Bedingungen mit der DNA-Sequenz von SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 10 hybridisieren und für ein Protein mit BMP-11 Wirksamkeit codieren. Schließlich sind Allelen oder andere Variationen der Sequenzen von SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 10, ob solche Nucleotidveränderungen Veränderungen in der Peptidsequenz ergeben oder nicht, aber wo die Peptidsequenz noch BMP-11 Wirksamkeit hat, ebenfalls in der vorliegenden Erfindung eingeschlossen.

**[0019]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung schließt Vektoren ein, welche eine DNA-Sequenz wie oben beschrieben in operativer Assoziation mit einer Expressions-Kontrollsequenz dafür umfassen.

**[0020]** Diese Vektoren können in einem neuartigen Verfahren zum Herstellen eines BMP-11 Proteins der Erfindung eingesetzt werden, bei welchem eine Zelllinie, transformiert mit einer DNA-Sequenz, welche für ein BMP-11 Protein codiert, in operativer Assoziation mit einer Expressions-Kontrollsequenz dafür in einem geeigneten Kulturmedium kultiviert wird und ein BMP-11 Protein daraus gewonnen und gereinigt wird. Dieses Verfahren kann eine Anzahl an gut bekannten Zellen, sowohl prokaryontische, als auch eukaryontische, als Wirtszellen zur Expression des Polypeptids einsetzen.

**[0021]** Die vorliegende Erfindung schließt ebenfalls die Verwendung der DNA-Sequenzen und Vektoren der Erfindung in Gentherapieanwendungen ein. In solch einer Verwendung können die Vektoren in die Zellen eines Patienten in vitro transfiziert werden und die Zellen können wieder in einen Patienten eingeführt werden. Alternativ können die Vektoren in vivo durch gezielte Transfektion in einen Patienten eingeführt werden.

**[0022]** Weitere Aspekte und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden bei Erwägung der folgenden detaillierten Beschreibung und bevorzugten Ausführungsformen davon offensichtlich sein.

## Beschreibung der Sequenzen

**[0023]** SEQ ID Nr. 1 ist eine partielle Nucleotidsequenz des bovinen BMP-11, welche für das reife bovine BMP-11 Polypeptid codiert.

**[0024]** SEQ ID Nr. 2 ist die Aminosäuresequenz eines partiellen Propeptids und des vollständigen reifen, bovinen BMP-11 Polypeptids, codiert durch SEQ ID Nr. 1.

**[0025]** SEQ ID Nr. 3 ist eine partielle Nucleotidsequenz von humanem BMP-11.

**[0026]** SEQ ID Nr. 4 ist eine partielle Aminosäuresequenz für humanes BMP-11 Polypeptid, codiert durch SEQ ID Nr. 3.

**[0027]** SEQ ID Nr. 5 und 6 sind Primer zu bovinem BMP-11, welche verwendet werden, um das humane BMP-11 oder andere BMP-11 Proteine zu isolieren.

**[0028]** SEQ ID Nr. 7 ist eine DNA-Sequenz, die in pMT2 CXM insertiert wird, um eine XhoI-Erkennungsstelle nahe dem SV40 Replikationsursprung hinzuzufügen.

**[0029]** SEQ ID Nr. 8 ist eine DNA-Sequenz, welche in pMT21 insertiert wird, um eine XhoI-Erkennungsstelle oberhalb des DHFR-Gens zu insertieren.

**[0030]** SEQ ID Nr. 9 ist eine DNA-Sequenz, welche einen Teil der EMC Virusleitsequenz umfasst.

**[0031]** SEQ ID Nr. 10 ist eine DNA-Sequenz, welche für ein partielles Propeptid und das vollständige humane BMP-11 Protein codiert.

**[0032]** SEQ ID Nr. 11 ist die Aminosäuresequenz eines partiellen Propeptids und des vollständigen reifen humanen BMP-11 Proteins, codiert durch SEQ ID Nr. 10.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung BMP-11

**[0033]** Die bovine BMP-11 Nucleotidsequenz (SEQ ID Nr. 1) und codierte Aminosäuresequenz (SEQ ID Nr. 2) und humane BMP-11 Nucleotidsequenz (SEQ ID Nr. 10) und codierte Aminosäuresequenz (SEQ ID Nr. 11) werden in den Sequenzprotokollen hierin dargestellt. Gereinigte bovine BMP-11 Proteine der vorliegenden Erfindung werden durch Kultivieren einer Wirtszelle, transformiert mit einer DNA-Sequenz, welche die DNA-Codierungssequenz von SEQ ID Nr. 1 von Nucleotid #375 bis #704 oder die DNA-Codierungssequenz von SEQ ID Nr. 10 von Nucleotid #760 bis #1086 umfasst und Gewinnen und Reinigen eines Proteins aus dem Kulturmedium, welches die Aminosäuresequenz oder eine im Wesentlichen homologe Sequenz enthält, wie durch Aminosäuren #1 bis #109 von SEQ ID Nr. 2 oder Aminosäuren 1 bis 109 von SEQ ID Nr. 11 dargestellt. Zur Herstellung von BMP-11 Proteinen in Säugetierzellen umfasst die DNA-Sequenz ferner ein geeignetes Propeptid, verbunden im Rahmen mit den obigen DNA-Codierungssequenzen für BMP-11. Das Propeptid kann das native Propeptid von BMP-11 sein, oder ein Propeptid von einem anderen Mitglied der TGF-β Superfamilie.

**[0034]** Die humane BMP-11 Sequenz der vorliegenden Erfindung wird unter Verwendung der ganzen oder Fragmenten der bovinen BMP-11 DNA-Sequenz oder der partiellen humanen BMP-11 Sequenz von SEQ ID Nr. 3 als Sonde erhalten. Somit umfasst die humane BMP-11 DNA-Sequenz die DNA-Sequenz von Nucleotiden #28 bis #185 von SEQ ID Nr. 3. Das humane BMP-11 Protein umfasst die Aminosäuresequenz von Aminosäuren #1 bis #52 von SEQ ID Nr. 4.

**[0035]** Es wird erwartet, dass BMP-11, wie durch Säugetierzellen wie CHO-Zellen exprimiert, als heterogene Population von aktiven Arten von BMP-11 Protein mit variierenden N-Termini vorkommt. Es wird erwartet, dass aktive Arten eine Aminosäuresequenz umfassen werden, welche mindestens mit dem Cysteinrest an Aminosäure #6 von SEQ ID Nr. 2 oder SEQ ID Nr. 11 beginnt, oder weiter in der N-terminalen Richtung. Somit wird erwartet, dass DNA-Sequenzen, welche für aktive BMP-11 Proteine codieren, Nucleotide #375 oder #390 bis 701 von SEQ ID Nr. 1 oder Nucleotide #760 oder #775 bis #1086 von SEQ ID Nr. 10 umfassen werden und zusätzlich Nucleotidsequenz in der 5'-Richtung von SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 10 umfassen können.

**[0036]** Der N-Terminus von humanem BMP-11 ist experimentell durch Expression in E. coli wie folgt bestimmt worden: [M]NLGLDXDEHSSE, worin X einen Aminosäurerest ohne klares Signal kennzeichnet, welcher mit einer Stelle von Cystein an der Position konsistent ist. Somit wird erwartet, dass diese Arten von BMP-11 einen N-Terminus an Aminosäure #1 von SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 10 haben werden und DNA-Sequenzen, welche für diese Arten codieren, werden Nucleotide #375 bis #701 von SEQ ID Nr. 1 (bovin) oder Nucleotide #760 bis 1086 von SEQ ID Nr. 10 (human) umfassen. Das scheinbare Molekulargewicht von humanem BMP-11 Monomer wurde durch SDS-PAGE als etwa 12 kd bestimmt. Das humane BMP-11 Protein existiert als klare, farblose Lösung in 0,1% Trifluoressigsäure.

**[0037]** Die BMP-11 Proteine, welche aus dem Kulturmedium gewonnen werden, werden gereinigt, indem man sie von anderen proteinartigen Substanzen isoliert, mit weichen sie zusammen hergestellt werden, und von anderen vorhandenen Verunreinigungen.

**[0038]** BMP-11 Proteine können durch die Fähigkeit gekennzeichnet werden, die Herstellung von FSH zu regulieren. BMP-11 Proteine können ferner durch die Fähigkeit gekennzeichnet werden, die Abgabe von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) in etablierten in vitro Biotests unter Verwendung von Hypophysenvorderlappenzellen von Ratten zu modulieren, wie beschrieben [siehe z. B. Vale et al., Endocrinology, 91: 562–572 (1972); Ling et al., Nature, 321: 779–782 (1986) oder Vale et al., Nature, 321: 776–779 (1986)]].

**[0039]** BMP-11 Proteine können auch durch die Fähigkeit gekennzeichnet werden, die Bildung von Knochen, Knorpel und/oder anderem Bindegewebe herbeizuführen. Solche Gewebe-herbeiführende Wirksamkeit von BMP-11 kann ferner durch die Fähigkeit gekennzeichnet werden, die Bildung von Knochen, Knorpel und/oder anderem Bindegewebe in den unten in den Beispielen beschriebenen Tests herbeizuführen.

**[0040]** Die hierin vorgesehenen BMP-11 Proteine schließen auch Faktoren ein, welche durch die Sequenzen codiert werden, die jenen von SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 10 ähnlich sind, aber worin Modifikationen natür-

lich vorgesehen (z. B. Allelen-Variationen in den Nucleotidsequenzen, welche Aminosäureveränderungen im Polypeptid ergeben können) oder absichtlich konstruiert werden. Zum Beispiel können synthetische Polypeptide ganz oder teilweise kontinuierliche Sequenzen der Aminosäurereste von SEQ ID Nr. 2 oder SEQ ID Nr. 11 duplizieren. Diese Sequenzen können durch Teilen von primären, sekundären oder tertiären strukturellen und gestalterischen Merkmalen mit Inhibin-β Polypeptiden von SEQ ID Nr. 2 oder SEQ ID Nr. 11 damit gemeinsame BMP-11 Wirksamkeit besitzen. Somit können sie als biologisch wirksame Substitute für natürlich vorkommende BMP-11 Polypeptide in therapeutischen Verfahren eingesetzt werden.

**[0041]** Andere spezifische Mutationen der hierin beschriebenen Sequenzen von BMP-11 Proteinen beziehen Modifikationen von Glykosylierungsstellen ein. Diese Modifikationen können O-gebundene oder N-gebundene Glykosylierungsstellen einbeziehen. Zum Beispiel ergibt sich die Abwesenheit von Glykosylierung oder nur teilweiser Glykosylierung aus Aminosäuresubstitution oder Deletion an Asparagin-gebundenen Glykosylierungs-Erkennungsstellen. Die Asparagin-gebundenen Glykosylierungs-Erkennungsstellen umfassen Tripeptid-Sequenzen, welche durch passende zelluläre Glykosylierungsenzyme spezifisch erkannt werden. Diese Tripeptid-Sequenzen sind entweder Asparagin-X-Threonin oder Asparagin-X-Serin, wobei X üblicherweise jede Aminosäure ist. Eine Vielzahl an Aminosäuresubstitutionen oder Deletionen an einer oder beiden der ersten oder dritten Aminosäurepositionen einer Glykosylierungs-Erkennungsstelle (und/oder Aminosäuredeletion an der zweiten Position) ergibt Nicht-Glykosylierung an der modifizierten Tripeptid-Sequenz. Zusätzlich ergibt Expression des BMP-11 Proteins in bakteriellen Zellen nicht-glykosyliertes Protein ohne Verändern der Glykosylierungs-Erkennungsstellen.

**[0042]** Die vorliegende Erfindung umfasst ebenfalls die neuartigen DNA-Sequenzen, welche frei von Assoziation mit DNA-Sequenzen für andere proteinartige Substanzen codieren, und für Expression von BMP-11 Proteinen codieren. Diese DNA-Sequenzen schließen jene ein, welche in SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 10 in einer 5' zu 3' Richtung dargestellt werden und jene Sequenzen, welche unter stringenten Hybridisierungsbedingungen dazu hybridisieren, zum Beispiel 0,1X SSC, 0,1% SDS bei 65°C [siehe Maniatis et al., Molecular Clonina (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory (1982), Seiten 387 bis 389] und für ein Protein mit BMP-11 Wirksamkeit codieren. Diese DNA-Sequenzen schließen auch jene ein, welche die DNA-Sequenz von SEQ ID Nr. 3 umfassen und jene, welche unter stringenten Hybridisierungsbedingungen dazu hybridisieren und für ein Protein mit BMP-11 Wirksamkeit codieren.

**[0043]** Auf ähnliche Weise codieren DNA-Sequenzen, welche für BMP-11 Proteine codieren, codiert durch die Sequenzen von SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 10, aber welche sich in der Codonsequenz aufgrund von Degenerationen des genetischen Codes oder Allelen-Variationen (natürlich auftretende Basen-Veränderungen in der Artenpopulation, welche Aminosäureveränderungen ergeben können oder auch nicht) unterscheiden, ebenfalls für die hierin beschriebenen neuartigen Faktoren. Variationen in den DNA-Sequenzen von SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 10, welche durch Punktmutationen verursacht werden oder durch Mutationen (einschließlich Insertion, Deletion und Substitution) herbeigeführt werden, um die Aktivität, Halbwertszeit oder Herstellung der Polypeptide, für die codiert wird, zu verstärken, werden ebenfalls in der Erfindung umfasst.

**[0044]** Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung sieht ein neuartiges Verfahren zum Herstellen von BMP-11 Proteinen vor. Das Verfahren der vorliegenden Erfindung bezieht Kultivieren einer geeigneten Zelllinie ein, welche mit einer DNA-Sequenz transformiert worden ist, welche für ein humanes SDF-5 Protein der Erfindung codiert, unter der Kontrolle von bekannten regulatorischen Sequenzen. Die transformierten Wirtszellen werden kultiviert und die BMP-11 Proteine werden gewonnen und von dem Kulturmedium gereinigt. Die gereinigten Proteine sind im Wesentlichen frei von anderen Proteinen, mit welchen sie zusammen hergestellt werden, als auch von anderen Verunreinigungen.

**[0045]** Geeignete Zellen oder Zelllinien können Säugetierzellen, wie Eierstockzellen von Chinesischen Hamstern (CHO) sein. Die Wahl von geeigneten Säugetier-Wirtszellen und Verfahren zur Transformation, Kultur, Amplifikation, Screening, Produktherstellung und Reinigung sind nach Stand der Technik bekannt. Siehe z. B. Gething und Sambrook, Nature, 293: 620–625 (1981) oder alternativ Kaufman et al., Mol. Cell. Biol., 5(7): 1750–1759 (1985) oder Howley et al., US-Patent 4419446. Eine andere geeignete Säugetier-Zelllinie, welche in den begleitenden Beispielen beschrieben wird, ist die Affen COS-1 Zelllinie. Die Säugetierzelle CV-1 kann ebenfalls geeignet sein.

**[0046]** Bakterielle Zellen können ebenfalls geeignete Wirte sein. Zum Beispiel sind die verschiedenen Stämme von E. coli (z. B. HB101, MC1061) als Wirtszellen im Bereich der Biotechnologie gut bekannt. Verschiedene Stämme von B. subtilis, Pseudomonas, anderen Bazillen und Ähnlichem können ebenfalls in diesem Verfahren eingesetzt werden.

**[0047]** Viele Stämme von Hefezellen, welche den Fachleuten bekannt sind, können ebenfalls als Wirtszellen zur Expression der Polypeptide der vorliegenden Erfindung verfügbar sein. Zusätzlich können, wo gewünscht, Insektenzellen als Wirtszellen in dem Verfahren der vorliegenden Erfindung genutzt werden. Siehe z. B. Miller et al., Genetic Engineering, 8: 277–298 (Plenum Press 1986) und darin zitierte Verweise.

**[0048]** Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung sieht Vektoren zur Verwendung in dem Expressionsverfahren dieser neuartigen BMP-11 Polypeptide vor. Vorzugsweise enthalten die Vektoren die vollen, oben beschriebenen, neuartigen DNA-Sequenzen, welche für die neuartigen Faktoren der Erfindung codieren. Zusätzlich enthalten die Vektoren passende Expressionskontrollsequenzen, welche Expression der BMP-11 Proteinsequenzen erlauben. Alternativ sind Vektoren, welche modifizierte Sequenzen wie oben beschrieben einschließen, ebenfalls Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung. Zusätzlich könnten die Sequenz von SEQ ID Nr. 1 oder oder SEQ ID Nr. 10 oder andere Sequenzen, welche für BMP-11 Proteine codieren, manipuliert werden, um ein reifes BMP-11 Protein zu exprimieren, und zwar durch Deletieren von für BMP-11 codierende Propeptid-Sequenzen und ihr Ersetzen durch Sequenzen, welche für die vollständigen Propeptide von anderen BMP-Proteinen, Activinproteinen oder anderen Mitgliedern der TGF-β Superfamilie codieren.

**[0049]** Die Vektoren können in dem Verfahren zum Transformieren von Zelllinien eingesetzt werden und enthalten ausgewählte regulatorische Sequenzen in operativer Assoziation mit den DNA-Codierungssequenzen der Erfindung, welche in der Lage sind, die Replikation und Expression davon in ausgewählten Wirtszellen zu steuern. Regulatorische Sequenzen für solche Vektoren sind den Fachleuten bekannt und können je nach Wirtszelle ausgewählt werden. Solche Selektion ist Routine und bildet keinen Teil der vorliegenden Erfindung.

**[0050]** Zur Expression in Säugetier-Wirtszellen kann der Vektor eine Codierungssequenz umfassen, welche für ein Propeptid codiert, welches zur Sekretion von Proteinen durch die Wirtszelle geeignet ist, gebunden im passenden Leserahmen an die Codierungssequenz für reifes BMP-11 Protein. Geeignete, für Propeptid codierende Sequenzen können aus DNA erhalten werden, welche für Proteine der TGF-β Superfamilie von Proteinen codiert, zum Beispiel einschließlich BMP-2 bis BMP-9. Siehe zum Beispiel US-Patent 5168150, dessen Offenbarung hiermit durch Verweis eingeschlossen ist, in welchem eine DNA, welche für einen Vorläuferteil eines anderen Säugetierproteins als BMP-2 codiert, an die DNA kondensiert wird, welche für ein reifes BMP-2 Protein codiert. Somit schließt die vorliegende Erfindung heterozygote DNA-Moleküle ein, welche eine DNA-Sequenz umfassen, welche für ein Propeptid von einem Mitglied der TGF-β Superfamilie von Proteinen codiert, gebunden im korrekten Leserahmen an eine DNA-Sequenz, welche für ein BMP-11 Polypeptid codiert. Der Begriff „heterozygot" wird verwendet um anzudeuten, dass das Propeptid von einem anderen Polypeptid als BMP-11 stammt.

**[0051]** Ein Protein der vorliegenden Erfindung, welches die Herstellung von FSH reguliert, findet mögliche Anwendung beim Steigern von Fruchtbarkeit, wenn es in einer Zusammensetzung als Homodimer oder als Heterodimer mit anderen Proteinen der Inhibin-β Familie exprimiert wird. Die Proteine der vorliegenden Erfindung können auch zur Empfängnisverhütung brauchbar sein, wenn sie in einer Zusammensetzung als Heterodimer mit Proteinen der Inhibin-α Familie exprimiert werden.

**[0052]** Ein Protein der vorliegenden Erfindung, welches Knorpel und/oder Knochenbildung unter Bedingungen herbeiführt, wo Knochen normalerweise nicht gefunden wird, findet Anwendung beim Heilen von Knochenfrakturen und Knorpeldefekten bei Menschen und anderen Tieren. Solch ein Präparat, welches ein BMP-11 Protein einsetzt, kann prophylaktische Verwendung in geschlossener, als auch in offener Frakturreduktion finden, und auch bei der verbesserten Fixation von künstlichen Gelenken. De novo Knochenbildung, herbeigeführt durch einen osteogenen Wirkstoff, trägt zur Reparatur von kongenitalen, Trauma-induzierten oder durch onkologische Resektion induzierten kranio-facialen Defekten bei und ist auch in der kosmetisch-plastischen Chirurgie brauchbar. Ein BMP-11 Protein kann bei der Behandlung von Periodontalerkrankung und bei anderen zahn-Reparaturverfahren verwendet werden. Solche Wirkstoffe können eine Umgebung vorsehen, um Knochen-bildende Zellen anzuziehen, Wachstum von Knochen-bildenden Zellen zu stimulieren oder Differentiation von Progenitoren von Knochenbildenden Zellen herbeiführen. BMP-11 Polypeptide der Erfindung können auch bei der Behandlung von Osteoporose brauchbar sein. Eine Vielfalt an osteogenen, Knorpel-herbeiführenden und Knochen-herbeiführenden Faktoren ist beschrieben worden. Siehe z. B. EP-Anmeldungen 148155 und 169016 zur Diskussion davon.

**[0053]** Die Proteine der Erfindung können auch bei Wundheilung und verwandter Gewebereparatur verwendet werden. Die Arten von Wunden schließen ein, sind aber nicht beschränkt auf Verbrennungen, Schnitte und Geschwüre. (Siehe z. B. PCT-Veröffentlichung WO84/01106 zur Diskussion von Wundheilung und verwandter Gewebereparatur).

**[0054]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein therapeutisches Verfahren und Zusammensetzung zum Reparieren von Frakturen und anderen Zuständen bezogen auf Knorpel- und/oder Knochendefekten oder Periodontalerkrankungen. Die Erfindung umfasst ferner therapeutische Verfahren und Zusammensetzungen zur Wundheilung und Gewebereparatur. Solche Zusammensetzungen umfassen eine therapeutisch wirksame Menge von mindestens einem der BMP-11 Proteine der Erfindung in Vermischung mit einem pharmazeutisch annehmbaren Vehikel, Träger oder Matrix.

**[0055]** Solch ein Präparat, welches ein BMP-11 Protein einsetzt, kann auch neuronales Überleben erhöhen und daher bei Transplantation und Behandlung von Zuständen brauchbar sein, welche eine Verringerung von neuronalem Überleben aufweisen.

**[0056]** Es wird erwartet, dass die BMP-11 Proteine der Erfindung gemeinsam mit oder vielleicht synergistisch mit anderen verwandten Proteinen und Wachstumsfaktoren wirken können. Weitere therapeutische Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung umfassen daher eine therapeutische Menge von mindestens einem BMP-11 Protein der Erfindung mit einer therapeutischen Menge von mindestens einem der BMP-Proteine oder anderen Wachstumsfaktoren, welche in oben beschriebenen gemeinsam besessenen Patenten und Anmeldungen offenbart werden. Solche Kombinationen können getrennte Moleküle oder Heteromoleküle umfassen, welche aus unterschiedlichen Komponenten bestehen. Zum Beispiel kann ein Verfahren und eine Zusammensetzung der Erfindung ein Disulfid gebundenes Dimer umfassen, welches eine BMP-11 Protein Untereinheit und eine Untereinheit von einem Inhibin-α Protein, einem Inhibin-β Protein oder einem BMP-Protein, wie BMP-1 bis BMP-10 umfasst. Die Wirkstoffe, welche mit BMP-11 brauchbar sind, können verschiedene Wachstumsfaktoren einschließen, wie epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), Plättchen-hergeleiteten Wachstumsfaktor (PDGF), transformierende Wachstumsfaktoren (TGF-α und TGF-β) und insulinähnliche Wachstumsfaktoren (IGF). Weitere therapeutische Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung umfassen eine therapeutische Menge von mindestens einem BMP-11 Protein der Erfindung mit einer therapeutischen Menge von mindestens einem der BMP-Proteine, welche in oben beschriebenen gemeinsam besessenen Patenten und Anmeldungen offenbart werden. Solche Zusammensetzungen können getrennte Moleküle der BMP-Proteine umfassen oder Heteromoleküle, welche aus unterschiedlichen BMP-Komponenten bestehen. Zum Beispiel kann ein Verfahren und eine Zusammensetzung der Erfindung ein Disulfid gebundenes Dimer umfassen, welches eine BMP-11 Protein Untereinheit und eine Untereinheit von einem der oben beschriebenen „BMP"-Proteine umfasst. Somit schließt die vorliegende Erfindung gereinigtes BMP-11 Polypeptid ein, weiches ein Heterodimer ist, wobei eine Untereinheit mindestens die Aminosäuresequenz von Aminosäure #1 bis Aminosäure #109 von SEQ ID Nr. 2 oder SEQ ID Nr. 11 umfasst und eine Untereinheit eine Aminosäuresequenz für ein Knochen-morphogenes Protein umfasst, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8 und BMP-9. Eine weitere Ausführungsform kann ein Heterodimer aus BMP-11 Komponenten umfassen. Ferner können BMP-11 Proteine mit anderen Wirkstoffen kombiniert werden, welche der Behandlung des Knochen- und/oder Knorpeldefekts, Wunde oder fraglichen Gewebes zuträglich sind. Diese Wirkstoffe schließen verschieden Wachstumsfaktoren ein, wie epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), Plättchen-hergeleiteten Wachstumsfaktor (PDGF), transformierende Wachstumsfaktoren (TGF-α und TGF-β) und k-Fibroblastenwachstumsfaktor (kFGF), Parathormon (PTH), Leukämie-hemmenden Faktor (LIF/HILDA/DIA), insulinähnliche Wachstumsfaktoren (IGF-I und IGF-II). Teile dieser Wirkstoffe können ebenfalls in Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

**[0057]** Die BMP-11 Proteine der vorliegenden Erfindung können auch in Zusammensetzungen kombiniert mit Knochen-morphogenen Proteinen verwendet werden. Siehe zum Beispiel Ogawa et al., WO-92/14481 (1992); Ogawa et al., J. Biol. Chem., 267: 14233–14237 (1992). Die Knochen-morphogenen Proteine, welche in solchen Zusammensetzungen brauchbar sind, schließen BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6 und BMP-7, offenbart beispielsweise in US-Patenten 5108922; 5013649; 5116738; 5106748; 5187076 und 5141905; BMP-8, offenbart in PCT-Veröffentlichung WO-91/18098 und BMP-9, offenbart in PCT-Veröffentlichung WO-93/00432; und BMP-10, offenbart in gleichzeitig anhängiger Patentanmeldung Seriennummer 08/061695, eingereicht am 12. Mai 1993, ein.

**[0058]** Die Herstellung und Formulierung solcher physiologisch annehmbarer Proteinzusammensetzungen mit gebührender Berücksichtigung von pH, Isotonie, Stabilität und Ähnlichem ist innerhalb der Fähigkeiten nach Stand der Technik. Die therapeutischen Zusammensetzungen sind gegenwärtig aufgrund des Mangels an Artenspezifität bei BMP- und TGF-Proteinen auch für veterinäre Anwendungen wertvoll. Insbesondere Haustiere und Vollblutpferde sind zusätzlich zu Menschen gewünschte Patienten für solche Behandlung mit BMP-11 der vorliegenden Erfindung.

**[0059]** Das therapeutische Verfahren schließt Verabreichen der Zusammensetzung topisch, systemisch oder örtlich als Implantat oder Vorrichtung ein. Bei der Verabreichung hat die therapeutische Zusammensetzung zur Verwendung in dieser Erfindung selbstverständlich eine Pyrogen-freie, physiologisch annehmbare Form. Ferner kann die Zusammensetzung wünschenswerterweise eingekapselt sein oder in einer viskosen Form zur Abgabe an die Stelle des Knochen-, Knorpel- oder Gewebeschadens injiziert werden. Topische Verabreichung kann für Wundheilung und Gewebereparatur geeignet sein. Andere therapeutisch brauchbare Wirkstoffe als die BMP-11 Proteine, welche ebenfalls gegebenenfalls in die Zusammensetzung wie oben beschrieben eingeschlossen werden können, können alternativ oder zusätzlich, gleichzeitig oder in Folge mit der BMP-11 Zusammensetzung in den Verfahren der Erfindung verabreicht werden.

**[0060]** Bevorzugt für Knochen-, Knorpel- oder andere Bindegewebebildung schließt die Zusammensetzung eine Matrix ein, welche in der Lage ist, BMP-11 oder andere BMP-Proteine an der Stelle des Gewebeschadens abzugeben, welcher der Reparatur bedarf, indem sie eine Struktur für den sich entwickelnden Knochen und Knorpel vorsieht und optimal in der Lage ist, in den Körper resorbiert zu werden. Die Matrix kann langsame Abgabe von BMP-11 und/oder anderem Knochen-induktiven Protein vorsehen, als auch passende Präsentation und angemessene Umgebung für zelluläre Infiltration. Solche Matrizes können aus Materialien gebildet werden, welche gegenwärtig für andere implantierte medizinische Anwendungen in Gebrauch sind.

**[0061]** Die Wahl des Matrixmaterials basiert auf biologischer Kompatibilität, biologischer Abbaubarkeit, mechanischen Eigenschaften, kosmetischer Erscheinung und Interface-Eigenschaften. Die besondere Anwendung der BMP-11 Zusammensetzungen wird die passende Formulierung definieren. Potentielle Matrizes für die Zusammensetzungen können biologisch abbaubar sein und als Calciumsulfat, Tricalciumphosphat, Hydroxyapatit, Polymilchsäure und Polyanhydride chemisch definiert werden. Weitere potentielle Materialien sind biologisch abbaubar und biologisch gut definiert, wie Knochen-, Sehnen- oder Hautkollagen. Weitere Matrizes setzen sich aus reinen Proteinen oder extrazellulären Matrixbestandteilen zusammen. Weitere potentielle Matrizes sind nicht biologisch abbaubar und chemisch definiert, wie gesintertes Hydroxyapatit, Bioglas, Aluminate oder andere Keramiken. Matrizes können aus Kombinationen von jeden der oben erwähnten Materialtypen zusammengesetzt sein, wie Polymilchsäure und Hydroxyapatit oder Kollagen und Tricalciumphosphat. Die biologischen Keramiken können in der Zusammensetzung, wie in Calciumaluminatphosphat und der Verarbeitung verändert werden, um Porengröße, Partikelgröße, Partikelform und biologische Abbaubarkeit zu verändern.

**[0062]** Der Fortschritt kann durch periodische Bewertung von Knochenwachstum und/oder Reparatur überwacht werden. Der Fortschritt kann zum Beispiel unter Verwendung von Röntgenstrahlen, histomorphometrischen Bestimmungen und Tetracyclin-Markierung überwacht werden.

**[0063]** Der Dosierungsplan wird durch den behandelnden Arzt unter Erwägung verschiedener Faktoren bestimmt werden, welche die Wirkung des BMP-11 Proteins modifizieren, z. B. das Alter, Geschlecht und die Diät des Patienten, die Schwere einer Infektion, die Zeit der Verabreichung und weitere klinische Faktoren. Die Dosierung kann mit der Art des in der Zusammensetzung vorhandenen BMP-Proteins oder Wachstumsfaktors variieren. Die Dosierung kann auch mit der Art der verwendeten Matrix variieren.

**[0064]** Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Praxis der vorliegenden Erfindung beim Gewinnen und Kennzeichnen von bovinem BMP-11 Protein und seinen Einsatz, um das humane und andere BMP-11 Proteine zu gewinnen, Erhalten der humanen Proteine und Exprimieren der Proteine durch Rekombinant-Techniken.

Beispiel 1

Bovines BMP-11

**[0065]** 800000 Rekombinanten einer bovinen Genombibliothek, konstruiert im Vektor λEMBL3, werden bei einer Dichte von 8000 rekombinierten Bakteriophagen-Plaques pro Platte auf 100 Platten plattiert. Doppelte Nitrocellulose-Repliken der rekombinierten Bakteriophagen-Plaques werden aus diesen Platten bereitet und amplifiziert. Ein Fragment von humaner BMP-7 DNA entsprechend den Nucleotiden #1081 bis #1403 (**Fig.** 4, US-Patent 5141905) wird durch das willkürliche Priming-Verfahren von Feinberg et al. [Anal. Biochem. 132: 6–13 (1983)] $^{32}$p-markiert und zu einem Filtersatz in Standardhybridisierungspuffer (SHB) (5x SSC, 0,170 SDS, 5x Denhardt's, 100 µg/ml Salmon Sperm DNA) bei 60°C für 2 bis 3 Tage hybridisiert. Die Filter werden unter Bedingungen von verringerter Stringenz (4x SSC, 0,1% SDS bei 60°C) gewaschen. Multiple positiv hybridisierende Rekombinanten werden bemerkt. 52 positiv hybridisierende rekombinierte Bakteriophagen-Plaques werden ausgewählt und wieder für Sekundäre plattiert. Doppelte Nitrocellulose-Repliken der rekombinierten Plaques werden aus diesen 52 sekundären Platten bereitet und amplifiziert. Ein Satz Nitrocellulosefilter wird

zur humanen BMP-7 DNA Sonde hybridisiert, wie oben beschrieben, und unter den gleichen Bedingungen reduzierter Stringenz gewaschen. Der andere Filtersatz wird zu einer gemischten BMP-5, BMP-6 und BMP-7 Sonde in SHB bei 65°C über Nacht hybridisiert und mit 0,1X SSC, 0,1% SDS bei 65°C gewaschen (stringente Hybridisierungs- und Waschbedingungen). Die gemischte Sonde besteht aus relativ gleichen Mengen an $^{32}$p-markierten DNA-Fragmenten, welche Nucleotide #1452 bis #2060 ( **Fig.** 4, US-Patent 5106748) der humanen BMP-5 Sequenz, Nucleotide #1395 bis #1698 (**Fig.** 4, US-Patent 5187076) der humanen BMP-6 Sequenz und Nucleotide #1081 bis #1403 (**Fig.** 4, US-Patent 5141905) der humanen BMP-7 Sequenz umfassen. Die BMP-5, BMP-6 und BMP-7 DNA Fragmente sind durch das willkürliche Priming-Verfahren $^{32}$p-markiert und gleiche Zählzahlen pro Minute (cpms) von jeder Sonde werden vereinigt und zum SHB zugegeben, welches den anderen Satz Nitrocellulosefilter-Repliken der 52 sekundären Platten enthält. 14 Rekombinanten, welche zur humanen BMP-7 Sonde unter den Bedingungen von reduzierter Stringenz positiv hybridisierten und schwache oder keine Hybridisierung zu der gemischten BMP-5/6/7 Sonde unter Bedingungen von hoher Stringenz aufwiesen, werden zur weiteren Analyse ausgewählt. Alle 14 Rekombinanten, welche diese Hybridisierungsmerkmale aufweisen, werden Plaque-gereinigt und aus jeder wird Bakteriophagen-DNA bereitet. Die positiv hybridisierende Region von einem der 14 Rekombinanten, welcher die oben beschriebenen Hybridisierungsmerkmale aufwies, mit der Bezeichnung λ7r-30, wird an ein 0,5 kb SacI Restriktionsfragment lokalisiert. Dieses Fragment wird in einen Plasmidvektor (pGEM-3) subkloniert und DNA-Sequenzanalyse wird durchgeführt. Die Teil-DNA-Sequenz (Sequenz ID Nr. 1) und abgeleitete Aminosäuresequenz (Sequenz ID Nr. 2) von Klon λ7r-30 werden in den Sequenzprotokollen gezeigt.

**[0066]** Der Bakteriophage λ7r-30 ist bei der ATCC am 7. April 1993 hinterlegt worden und erhielt die Eingangsnummer ATCC 75439. Diese Hinterlegung erfüllt die Anforderungen des Budapest Treaty of the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedures und die darunter fallenden Bestimmungen.

**[0067]** Dieser λ7r-30 Klon codiert für mindestens einen Teil des bovinen BMP-11 Proteins der vorliegenden Erfindung. Die Nucleotidsequenz von Klon λ7r-30 enthält einen offenen Leserahmen von 456 Nucleotiden #246-701 von SEQ ID Nr. 1. Die Nucleotidsequenz von #324 bis #701 von SEQ ID Nr. 1 definiert einen offenen Leserahmen von 378 Nucleotiden, welche für mindestens 126 Aminosäuren des C-terminalen Teils eines bovinen BMP-11 Proteins codieren, wie durch Ausrichtung an anderen BMP-Proteinen und anderen Proteinen innerhalb der TGF-β Familie bestimmt. Die Nucleotidsequenz #246 bis #323 definiert einen offenen Leserahmen, welcher an die Sequenz angrenzt, welche für das vorhergesehene 126 Aminosäure BMP-11 Peptid codiert, jedoch macht es ein verringerter Grad an Aminosäureidentität des Peptids, hergeleitet aus dieser Region der DNA-Sequenz (#246 bis #323) zu anderen BMP-Proteinen und anderen Proteinen der TGF-β Familie und die Gegenwart von multiplen potentiellen Spleiß-Akzeptor-Konsenssequenzen schwierig, die 5' Grenze dieses Exons des bovinen BMP-11 Gens zu definieren. Die Gegenwart eines Im-Rahmen Stop-Codons an Nucleotidpositionen #243 bis #245 zeigt an, dass Nucleotidsequenz von Klon λ7r-30 mindestens eine Exon/Intron-Grenze des bovinen BMP-11 Gens enthält.

**[0068]** Basierend auf der Kenntnis über andere Proteine innerhalb der TGF-β Familie wird vorhergesehen, dass das BMP-11 Vorläufer-Polypeptid an der multibasischen Sequenz ARG-SER-ARG-ARG in Übereinstimmung mit einer vorgeschlagenen Konsens-proteolytischen Verarbeitungssequenz von ARG-X-X-ARG gespalten würde. Von Spaltung des BMP-11 Vorläufer-Polypeptids wird erwartet, dass es 109 Aminosäure reifes Peptid erzeugt, beginnend mit der Aminosäure ASN an Position #1. von der Verarbeitung von BMP-11 in die reife Form wird erwartet, dass es Dimerisation und Entfernung der N-terminalen Region auf eine Weise, analog zu Verarbeitung des verwandten Proteins TGF-β einbezieht [Gentry et al., Molec. & Cell. Biol., 8: 4162 (1988); Derynck et al., Nature, 316: 701 (1985)].

**[0069]** Es wird daher erwogen, dass die reife aktive Art von BMP-11 ein Homodimer aus zwei Polypeptid-Untereinheiten umfasst, wobei jede Untereinheit Aminosäuren #1 bis #109 mit einem vorhergesehenen Molekulargewicht von etwa 12000 Daltons umfasst. Weitere aktive Arten werden erwogen, welche Aminosäuren #6 bis #109 umfassen, wobei der erste konservierte Cysteinrest eingeschlossen wird. Wie bei anderen Mitgliedern der TGF-β Familie von Proteinen weist die Carboxy-terminale Region des BMP-11 Proteins größere Sequenzkonservation auf, als der mehr Amino-terminale Teil. Der Prozentsatz an Aminosäure-Identität des BMP-11 Proteins in der Cystein-reichen C-terminalen Domäne (Aminosäuren #6 bis #109) mit der entsprechenden Region von anderen Proteinen innerhalb der TGF-β Familie ist wie folgt: 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%; GDF-1, 34%; TGF-β1, 36%; TGF-β2, 38%; TGF-β3, 38%; Inhibin β(B), 41%; Inhibin β(A), 39%.

Beispiel 2

Humanes BMP-11

**[0070]** Von bovinen und humanen BMP-11 Genen wird angenommen, dass sie signifikant homolog sind, daher wird die bovine Codierungssequenz oder ein Teil davon als Sonde verwendet, um eine humane Genombibliothek zu screenen, oder als Sonde, um eine humane Zelllinie oder Gewebe zu identifizieren, welche das analoge humane Protein synthetisiert. Eine humane Genombibliothek, wie Stratagene Katalog #944201, kann mit solch einer Sonde gescreent und mutmaßlich Positive isoliert und DNA-Sequenz erhalten werden. Der Nachweis, dass dieses Rekombinant für einen Teil des humanen BMP-11 codiert, beruht auf den bovin/human Protein- und Genstrukturhomologien.

**[0071]** Sobald ein rekombinierter Bakteriophage, welcher DNA enthält, welche für einen Teil des humanen BMP-11 Moleküls codiert, erhalten wird, kann die humane Codierungssequenz als Sonde verwendet werden, um eine humane Zelllinie oder Gewebe zu identifizieren, welche BMP-11 mRNA synthetisiert. Alternativ kann die bovine BMP-11 Codierungssequenz als Sonde verwendet werden, um solche humane Zellinie oder Gewebe zu identifizieren. Kurz beschrieben: RNA wird aus einer gewählten Zelle oder Gewebequelle extrahiert und entweder an einem Formaldehyd-Agarosegel Elektrophorese unterworfen und auf Nitrocellulose übertragen, oder mit Formaldehyd umgesetzt und direkt auf Nitrocellulose getüpfelt. Die Nitrocellulose wird dann zu einer Sonde hybridisiert, welche von einer Codierungssequenz des bovinen oder humanen BMP-11 abgeleitet wird. Alternativ wird die bovine BMP-11 Codierungssequenz verwendet, um Oligonucleotid-Primer zu entwerfen, welche spezifisch einen Teil der für BMP-11 codierenden Sequenz amplifizieren werden, welcher sich in der Region befindet, welche sich zwischen den Primern befindet, welche genutzt werden, um die spezifische Amplifizierungsumsetzung durchzuführen. Es wird erwogen, dass bovine und humane BMP-11 Sequenzen es einem ermöglichen würden, entsprechende für humanes BMP-11 codierende Sequenzen aus mRNA, CDNA oder genomischen DNA-Matrizen spezifisch zu amplifizieren. Sobald eine positive Quelle durch eines der oben beschriebenen Verfahren identifiziert worden ist, wird mRNA durch Oligo(dT)-Cellulosechromatographie selektiert und cDNA wird synthetisiert und in λgt10 oder andere λ-Bakteriophagenvektoren kloniert, welche den Fachleuten bekannt sind, (also λZAP) durch etablierte Techniken (Toole et al., supra). Es ist ebenfalls möglich, die oben beschriebene Oligonucleotid-Primer gerichtete Amplifizierungsumsetzung direkt an einer vorher begründeten humanen cDNA oder Genombibliothek durchzuführen, welche in einen λ-Bakteriophagenvektor kloniert worden ist. In solch einem Fall könnte eine Bibliothek, welche spezifisch amplifiziertes DNA-Produkt ergibt, welches für einen Teil von humanem BMP-11 Protein codiert, direkt gescreent werden, unter Nutzung des Fragments von amplifizierter für BMP-11 codierender DNA als Sonde.

**[0072]** Oligonucleotid-Primer, entworfen auf Basis der DNA-Sequenz des bovinen BMP-11 genomischen Klons λ7r-30, erlauben voraussichtlich die spezifische Amplifikation von für humanes BMP-11 codierenden Sequenzen. Der folgende Oligonucleotid-Primer ist auf der Basis von Nucleotiden #501 bis #521 der DNA-Sequenz entworfen worden, welche in SEQ ID Nr. 1 dargestellt wird, und an einem automatisierten DNA-Synthetisator synthetisiert worden.

Primer C: TAGTCTAGATGCTCCGGCCAGTGCGAGTAC

**[0073]** Die ersten neun Nucleotide von Primer C (unterstrichen) umfassen die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuclease XbaI, welche genutzt werden kann, um die Manipulation einer spezifisch amplifizierten DNA-Sequenz zu erleichtern, welche für das BMP-11 Protein der Erfindung codiert, und werden somit nicht von der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten DNA-Sequenz abgeleitet.

**[0074]** Der folgende Oligonucleotid-Primer ist auf der Basis von Nucleotiden #701 bis #678 der DNA-Sequenz entworfen, welche in SEQ ID Nr. 1 dargestellt wird, und an einem automatisierten DNA-Synthetisator synthetisiert worden.

Primer D: TGCGGATCCGGAGCAGCCACAGCGATCCAC

**[0075]** Die ersten neun Nucleotide von Primer D (unterstrichen) umfassen die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuclease BamHI, welche genutzt werden kann, um die Manipulation einer spezifisch amplifizierten DNA-Sequenz zu erleichtern, welche für das BMP-11 Protein der Erfindung codiert, und werden somit nicht von der in SEQ ID Nr. 1 gezeigten DNA-Sequenz abgeleitet.

**[0076]** Die Standardnucleotidsymbole in den oben identifizierten Primern sind wie folgt: A, Adenosin; C, Cy-

tosin; G, Guanin und T, Thymin.

**[0077]** Die oben identifizierten Primer C und D werden als Primer genutzt, um die Amplifikation eines spezifischen Nucleotids von humaner genomer DNA zu erlauben. Die Amplifikationsumsetzung wird wie folgt durchgeführt:

**[0078]** Humane genome DNA (Quelle: Peripherblutlymphozyten) wird bei 100°C für fünf Minuten denaturiert und dann vor Zugabe zu einem Umsetzungsgemisch, welches 200 µM von jedem Deoxynucleotid-triphosphat (dATP, dGTP, dCTP und dTTP), 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,001 Gelatine, 1,25 Einheiten Taq DNA Polymerase, 100 pM Oligonucleotid Primer C und 100 pM Oligonucleotid Primer D enthält, auf Eis gekühlt. Dieses Umsetzungsgemisch wird dann auf folgende Weise thermischer Cyclisierung unterworfen: 3 Minuten bei 94°C; 1 Minute bei 50°C, 1 Minute bei 72°C für einen Zyklus, dann 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei 50° C, 1 Minute bei 72°C für neununddreißig Zyklen.

**[0079]** Die DNA, welche durch diese Umsetzung spezifisch amplifiziert wird, wird von den überschüssigen Oligonucleotid-Primern C und D abgetrennt, welche genutzt werden, um die Amplifikation zu initiieren, und zwar durch die Verwendung eines auf DNA-Reinigungsharz basierenden Protokolls unter den vom Hersteller vorgeschlagenen Bedingungen. Das sich ergebende DNA-Produkt wird mit den Restriktionsendonucleasen XbaI und BamHI verdaut, Phenol-extrahiert, Chloroform-extrahiert. Pufferaustausch und Entfernung von kleinen Fragmenten von DNA, welche sich aus dem XbaI/BaIH Restriktionsverdau ergeben, wird durch Verdünnung des verdauten DNA-Produkts in 10 Mm Tris-HCl pH 8,0, 1 Mm EDTA, gefolgt durch Zentrifugation durch einen Centricon™ 30 Mikrokonzentrierer (W. R. Grace & Co., Beverly, Ma.; Produkt #4209) erreicht. Das sich ergebende XbaI/BamHI verdaute amplifizierte DNA-Produkt wird in einen Plasmidvektor (pBluescript) zwischen den XbaI und BamHI Restriktionsstellen der Polylinkerregion subkloniert. DNA-Sequenzanalyse des sich ergebenden Subklons zeigt an, dass das spezifisch amplifizierte DNA-Sequenzprodukt für einen Teil des humanen BMP-11 Proteins dieser Erfindung codiert. Die DNA-Sequenz (SEQ ID Nr. 3) und abgeleitete Aminosäuresequenz (SEQ ID Nr. 4) dieses spezifisch amplifizierten DNA-Fragments werden im Sequenzprotokoll dargestellt.

**[0080]** Nucleotide #1 bis #27 dieser Sequenz umfassen einen Teil von Oligonucleotid Primer C und Nucleotide #186 bis #213 umfassen einen Teil von Oligonucleotid Primer D, welche genutzt werden, um die spezifische Amplifikationsumsetzung durchzuführen. Aufgrund der Funktion von Oligonucleotid Primern C und D (entworfen auf der Basis von boviner BMP-11 DNA-Sequenz) beim Initiieren der Amplifikationsumsetzung können sie nicht genau mit der tatsächlichen Sequenz korrespondieren, welche für ein humanes BMP-11 codiert, und werden daher nicht in die obige Aminosäuresequenz Ableitung translatiert. Die DNA-Sequenz von Nucleotid #28 bis #185 von SEQ ID Nr. 3 oder Teile davon, welche spezifisch aus der humanen genomischen DNA-Matrize amplifiziert werden, können als Sonde genutzt werden, um zusätzliche humane BMP-11 codierende Sequenzen aus humanen Genom- oder humanen cDNA Bibliotheken durch Standardhybridisierungs-/Screening-Techniken zu identifizieren, weiche den Fachleuten bekannt sind.

**[0081]** Eine Million zweihunderttausend Rekombinanten einer humanen, fötalen Gehirn cDNA-Bibliothek (Stratagene Katalog #936206), konstruiert im Vektor λZAPII, werden bei einer Dichte von 24000 rekombinierten Bakteriophagen-Plaques pro Platte auf 50 Platten plattiert. Doppelte Nitrocellulose-Repliken der rekombinierten Bakteriophagen-Plaques werden aus diesen Platten bereitet. Eine Oligonucleotidsonde, entworfen auf der Basis von Nucleotiden #53–#82 von SEQ ID Nr. 3, wird an einem automatisierten DNA-Synthetisator synthetisiert. Diese Oligonucleotidsonde wird mit $\gamma^{32}$p-ATP radioaktiv markiert und wird zu beiden Sätzen der doppelten Nitrocellulose-Repliken in SHB bei 65°C hybridisiert. Neun positiv hybridisierende Rekombinanten werden bemerkt. Einer der positiv hybridisierenden Rekombinanten mit dem Namen λFB30.5 wird Plaque-gereinigt. Bakteriophagen-Plattenvorräte des gereinigten λFB30.5 cDNA-Klons werden hergestellt und Bakteriophagen-DNA wird isoliert. Ein bakterielles Plasmid mit dem Namen FB30.5, erzeugt durch das in vivo Exzisionsprotokoll, beschrieben durch den Lieferanten (Stratagene) und welches das gesamte Insert des λFB30.5 Bakteriophagen cDNA-Klons enthält, ist bei der ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland USA gemäß den Anforderungen des Budapester Vertrags hinterlegt worden und als ATCC #69619 bezeichnet worden. Ein Teil der DNA-Sequenz von Klon FB30.5 wird in SEQ ID Nr. 10 dargestellt.

**[0082]** Eine Million Rekombinanten einer humanen Genombibliothek (Stratagene Katalog #944201), konstruiert im Vektor λFIX, werden bei einer Dichte von 20000 rekombinierten Bakteriophagen-Plaques pro Platte auf 50 Platten plattiert. Doppelte Nitrocellulose-Repliken dieser rekombinierten Bakteriophagen-Plaques werden aus diesen Platten bereitet. Eine Oligonucleotidsonde, welche auf der Basis von Nucleotiden #57-#86 von SEQ ID Nr. 10 entworfen ist, mit Ausnahme einer versehentlichen Substitution von CAC für GCG an Nucleoti-

den #59-#61 von SEQ ID Nr. 10, wird an einem automatisierten DNA-Synthetisator synthetisiert. Diese Oligonucleotidsonde wird mit $\gamma^{32}$p-ATP radioaktiv markiert und zu beiden Sätzen der doppelten Nitrocelluose-Repliken in SHB bei 65°C hybridisiert. Fünf positiv hybridisierende Rekombinanten werden bemerkt. Einer der positiv hybridisierenden Rekombinanten mit dem Namen 30GEN.4 wird Plaque-gereinigt. Bakteriophagen-Plattenvorräte des gereinigten 30GEN.4 genomischen Klons werden hergestellt und Bakteriophagen-DNA wird isoliert. Ein Bakteriophagenvorrat dieses genomischen Klons ist bei der ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland USA gemäß den Anforderungen des Budapester Vertrags hinterlegt worden und als ATCC #75775 bezeichnet worden. Ein Teil der DNA-Sequenz von Klon 30GEN.4 wird in SEQ ID Nr. 10 dargestellt. Von einem Teil der DNA-Sequenz des genomen Klons 30GEN.4 wurde bestimmt, dass er mit einem Teil der DNA-Sequenz des cDNA-Klons FB30.5 identisch ist. Das Ausmaß dieser Überlappung (Nucleotide #1-#198) von SEQ ID Nr. 10 wurde als Basis verwendet, um die partielle Codierungssequenz des BMP-10 Proteins zu kompilieren. Vom genomischen Klon 30GEN.4 wird erwartet, dass er zusätzliche 5' codierende Sequenzen des humanen BMP-11 Proteins enthält, von welchen erwartet wird, dass sie für den Rest des BMP-11 Vorläufer-Polypeptids codieren, einschließlich dem Initiator Methionin. Die Teilsequenz von humanem BMP-11 wird in SEQ ID Nr. 10 präsentiert und es sollte angemerkt werden, dass von Nucleotiden #1-198 bestimmt worden ist, dass sie in sowohl dem 30GEN.4 genomischen Klon, als auch dem FB30.5 cDNA-Klon vorhanden sind, während Nucleotide #199-#1270 vollständig vom cDNA-Klon FB30.5 abgeleitet werden. SEQ ID Nr. 10 sieht ein humanes BMP-11 Vorläuferprotein aus mindestens 362 Aminosäuren voraus. Basierend auf den Kenntnissen von anderen BMPs und anderen Proteinen innerhalb der TGF-β Familie wird vorausgesagt, dass das Vorläufer-Polypeptid an der multibasischen Sequenz ARG-SER-ARG-ARG (Aminosäuren #-4 bis #-1 von SEQ ID Nr. 11) in Übereinstimmung mit der vorgeschlagenen Konsens-proteolytischen Verarbeitungssequenz ARG-X-X-ARG gespalten würde. Spaltung des humanen BMP-11 Vorläufer-Polypeptids an dieser Stelle würde ein 109 Aminosäure reifes Peptid erzeugen, beginnend mit der Aminosäure ASN an Position #1 von SEQ ID Nr. 11. Von der Verarbeitung von humanem BMP-11 in die reife Form wird erwartet, dass sie Dimerisation und Entfernung der N-terminalen Region auf eine Weise analog zur Verarbeitung des verwandten Proteins TGF-β einbezieht [L. E. Gentry, et al., Molec. & Cell. Biol. 8: 4162 (1988); R. Derynck, et al., Nature 316: 701 (1985). Es wird erwogen, dass die reife aktive Art von humanem BMP-11 ein Homodimer aus zwei Polypeptid-Untereinheiten umfasst, wobei jede Untereinheit Aminosäuren #1-#108 von SEQ ID Nr. 11 umfasst, mit einem vorausgesagten Molekulargewicht von 12000 Daltons. Weitere aktive Arten werden erwogen, welche Aminosäuren #7-#108 von SEQ ID Nr. 11 umfassen und dadurch den ersten erhaltenen Cysteinrest einschließen. Heterodimere Moleküle, welche eine Untereinheit von BMP-11 und eine weitere Untereinheit eines anderen Mitglieds der BMP/TGF-β Superfamilie umfassen, werden ebenfalls erwogen.

Beispiel 3

Expression von BMP-11

**[0083]** Um bovine, humane oder andere Säugetier-BMP-11 Proteine herzustellen, wird die DNA, welche für sie codiert, in einen passenden Expressionsvektor übertragen und in Säugetierzellen oder andere bevorzugte eukaryontische oder prokaryontische Wirte durch herkömmliche gentechnische Verfahren eingeführt. Es wird erwogen, dass das bevorzugte Expressionssystem für biologisch wirksames, rekombiniertes, humanes BMP-11, stabil transformierte Säugetierzellen sein können.

**[0084]** Ein Fachmann kann Säugetier-Expressionsvektoren durch Einsetzen der Sequenz von SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 10 konstruieren, oder anderen DNA-Sequenzen, welche für BMP-11 Proteine codieren, oder anderen modifizierten Sequenzen und bekannten Vektoren, wie pCD [Okayama et al., Mol. Cell Biol., 2: 161–170 (1982)), pJL3, pJL4 [Gough et al., EMBO J., 4: 645–653 (1985)] und pMT2 CXM.

**[0085]** Der Säugetier-Expressionsvektor pMT2 CXM ist ein Derivat von p91023(b) (Wong et al., Science 228: 810–815, 1985), welcher sich vom letzteren dadurch unterscheidet, dass er das Ampicillin-Resistenzgen anstelle des Tetracyclin-Resistenzgens enthält und ferner eine XhoI-Stelle zur Insertion von cDNA-Klonen enthält. Die funktionellen Elemente von pMT2 CXM sind beschrieben worden (Kaufman, R. J., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 689–693) und schließen die Adenovirus VA-Gene, den SV40 Replikationsursprung einschließlich den 72 bp Verstärker, den Adenovirus Major-Late-Promotor, einschließlich einer 5' Spleiß-Stelle und das Meiste der Adeonovirus Tripartite Leitsequenz, welche an Adenovirus Late mRNAs vorhanden ist, eine 3'-Spleiß Akzeptorstelle, ein DHFR-Insert, die SV40 Early Polyadenylierungsstelle (SV40) und pBR322 Sequenzen ein, welche zur Propagierung in E. coli notwendig sind.

**[0086]** Plasmid pMT2 CXM wird durch EcoRI-Verdau von pMT2-VWF erhalten, welcher bei der American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD (USA) unter Eingangsnummer ATCC 67122 hinterlegt worden

ist. EcoRI-Verdau schneidet das cDNA-Insert aus, welches in pMT2-VWF vorhanden ist, was pMT2 in linearer Form ergibt, welches ligiert und verwendet werden kann, um E. coli HB 101 oder DH-5 zu Ampicillinresistenz umzuwandeln. Plasmid pMT2 DNA kann durch herkömmliche Verfahren hergestellt werden. pMT2 CXM wird dann unter Verwendung von Loopout/in Mutagenese [Morinaga et al., Biotechnology 84: 636 (1984)] konstruiert. Dies entfernt Basen 1075 bis 1145 bezüglich der HindIII Stelle nahe dem SV40-Replikationsursprung und Verstärkersequenzen von pMT2. Zusätzlich insertiert es die folgende Sequenz:
5'-PO-CATGGGCAGCTCGAG-3' an Nucleotid 1145. Diese Sequenz enthält die Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuclease XhoI. Ein Derivat von pMT2CXM mit der Bezeichnung pMT23 enthält Erkennungsstellen für die Restriktionsendonucleasen PstI, EcoRI, SalI und XhoI. Plasmid pMT2 CXM und pMT23 DNA kann durch herkömmliche Verfahren hergestellt werden.

**[0087]** pEMC2β1, abgeleitet von pMT21, kann auch in der Praxis der Erfindung brauchbar sein. pMT21 wird von pMT2 abgeleitet, welches von pMT2-VWF abgeleitet wird. Wie oben beschrieben, schneidet EcoRI-Verdau das cDNA-Insert aus, welches in pMT-VWF vorhanden ist, was pMT2 in linearer Form ergibt, welches ligiert und verwendet werden kann, um E. coli HB 101 oder DH-5 zu Ampicillin-Resistenz zu transformieren. Plasmid pMT2 DNA kann durch herkömmliche Verfahren hergestellt werden.

**[0088]** pMT21 wird durch die folgenden zwei Modifikationen von pMT2 abgeleitet. Zuerst wird 76 bp der 5' nicht-translatierten Region der DHFR cDNA einschließlich einer Strecke von 19 G Resten von G/C Tailing für cDNA Klonierung deletiert. In diesem Prozess wird eine XhoI-Stelle insertiert, um die folgende Sequenz direkt oberhalb von DHFR zu erhalten:

```
5'-CTGCAGGCGAGCCTGAATTCCTCGAGCCATCATG-3'
     PstI          EcoRI          XhoI
```

**[0089]** Zweitens wird eine einzigartige ClaI-Stelle durch Verdau mit EcoRV und XbaI, Behandlung mit Klenow-Fragment von DNA-Polymerase I und Ligation an einen ClaI-Linker (CATCGATG) eingeführt.

**[0090]** Dies deletiert ein 250 bp Segment aus der Adenovirus-assoziierten RNA (VAI) Region aber stört nicht VAI RNA Genexpression oder Funktion. pMT21 wird mit EcoRI und XhoI verdaut und verwendet, um den Vektor pEMC2B1 abzuleiten.

**[0091]** Ein Teil des EMCV-Leiters wird aus pMT2-ECATI [S. K. Jung et al., J. Virol 63: 1651–1660 (1989)] durch Verdau mit EcoRI und PstI erhalten, was ein 2752 bp Fragment ergibt. Dieses Fragment wird mit TaqI verdaut, was ein EcoRI-TaqI Fragment von 508 bp ergibt, welches durch Elektrophorese an niedrig schmelzendem Agarosegel gereinigt wird. Ein 68 bp Adapter und sein komplementärer Strang werden mit einem 5' TaqI hervortretenden Ende und einem 3' XhoI hervortretenden Ende synthetisiert, was die folgende Sequenz hat:

```
5'-CGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTT
   TaqI
   GAAAAACACGATTGC-3'
               XhoI
```

**[0092]** Diese Sequenz passt zur EMC-Virus Leitsequenz von Nucleotid 763 bis 827. Sie verändert auch das ATG an Position 10 innerhalb des EMC Virusleiters zu einem ATT und ihr folgt eine XhoI-Stelle. Eine Drei-Wege Ligation des pMT21 EcoRI-XhoI Fragments, des EMC Virus EcoRI-TaqI Fragments und des 68 bp Oligonucleotid-Adapters TaqI-XhoI Adapters ergibt den Vektor pEMC2β1.

**[0093]** Dieser Vektor enthält den SV40 Replikationsursprung und Verstärker, den Adenovirus Major-Late-Promotor, eine cDNA Kopie des Meisten der Adenovirus-Tripartite-Leitsequenz, eine kleine Hybrid-intervenierende Sequenz, ein SV40 Polyadenylierungssignal und das Adenovirus VA I Gen, DHFR und β-Lactamasemarker und eine EMC-Sequenz in passenden Verhältnissen, um die hochgradige Expression der gewünschten cDNA in Säugetierzellen zu steuern.

**[0094]** Die Konstruktion von Vektoren kann Modifikation der BMP-11 DNA-Sequenzen einbeziehen. Zum Beispiel kann BMP-11 cDNA durch Entfernen der nicht-codierenden Nucleotide an den 5' und 3' Enden der Codierungsregion modifiziert werden. Die deletierten nicht-codierenden Nucleotide können durch andere Sequenzen ersetzt werden oder nicht, von welchen bekannt ist, dass sie der Expression zuträglich sind. Diese

Vektoren werden zur Expression von BMP-11 Proteinen in passende Wirtszellen transformiert. Zusätzlich kann die Sequenz von SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 10 oder andere Sequenzen, welche für BMP-11 Proteine codieren, manipuliert werden, um ein reifes BMP-11 Protein zu exprimieren, durch Deletieren von für BMP-11 codierende Propeptidsequenzen und ihr Ersetzen durch Sequenzen, welche für die vollständigen Propeptide von anderen BMP-Proteinen, Activin-Proteinen oder anderen Mitgliedern der TGF-β Superfamilie codieren.

**[0095]** Ein Fachmann kann die Sequenzen von SEQ ID Nr. 1 oder SEQ ID Nr. 10 durch Eliminieren oder Ersetzen der Säugetier-regulatorischen Sequenzen, welche die Codierungssequenz flankieren, mit bakteriellen Sequenzen manipulieren, um bakterielle Vektoren zur intrazellulären oder extrazellulären Expression durch bakterielle Zellen zu erzeugen. Zum Beispiel könnten die Codierungssequenzen weiter manipuliert werden (z. B. ligiert an andere bekannte Linker oder modifiziert durch Deletieren von nicht-codierenden Sequenzen daraus oder Verändern von Nucleotiden darin durch andere bekannte Techniken). Die modifizierte für BMP-11 codierende Sequenz könnte dann in einen bekannten bakteriellen Vektor unter Verwendung von Verfahren insertiert werden, wie in T. Taniguchi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5230–5233 (1980) beschrieben. Dieser exemplarische bakterielle Vektor könnte dann in bakterielle Wirtszellen transformiert werden und dadurch ein BMP-11 Protein exprimieren. Für eine Strategie zum Herstellen extrazellulärer Expression von BMP-11 Proteinen in bakteriellen Zellen siehe z. B. Europäische Patentanmeldung EPA-177343.

**[0096]** Ähnliche Manipulationen können für die Konstruktion eines Insektenvektors [siehe z. B. Verfahren, welche in veröffentlichter Europäischer Patentanmeldung 155476 beschrieben werden] zur Expression in Insektenzellen durchgeführt werden. Ein Hefevektor könnte ebenfalls konstruiert werden, der Regulatorsequenzen von Hefe für intrazelluläre oder extrazelluläre Expression der Faktoren der vorliegenden Erfindung durch Hefezellen einsetzt [siehe z. B. in veröffentlichter PCT-Anmeldung WO-86/00639 und Europäischer Patentanmeldung EPA-123289 beschriebene Verfahren].

**[0097]** Ein Verfahren zum Herstellen von großen Mengen eines BMP-11 Proteins der Erfindung in Säugetierzellen kann die Konstruktion von Zellen einbeziehen, welche multiple Kopien des heterologen BMP-11 Gens enthalten. Das heterologe Gen ist an einen amplifizierbaren Marker gebunden, z. B. das Dihydrofolat-Reduktase (DHFR)-Gen, für welches Zellen, welche erhöhte Genkopien enthalten, zur Propagierung in steigenden Konzentrationen von Methotrexat (MTX) gemäß den Verfahren von Kaufman und Sharp, J. Mol. Biol. 159: 601–692 (1982) selektiert werden können. Diese Herangehensweise kann bei einer Anzahl an unterschiedlichen Zelltypen eingesetzt werden.

**[0098]** Zum Beispiel können ein Plasmid, welches eine DNA-Sequenz für ein BMP-11 Protein der Erfindung in operativer Assoziation mit anderen Plasmidsequenzen enthält, welche Expression davon ermöglichen und das DHFR-Expressionsplasmid pAdA26SV(A)3 [Kaufman und Sharp, Mol. Cell. Biol., 2: 1304 (1982)] in DHFR-defiziente CHO-Zellen, DUKX-BII durch verschiedene Verfahren, einschließlich Calciumphosphat-Co-Ausfällung und Transfektion, Elektroporation oder Protoplastenfusion co-eingeführt werden. DHFR exprimierende Transformanten werden bezüglich Wachstum in Alpha-Medien mit dialysiertem fötalen Rinderserum selektiert und nachfolgend bezüglich Amplifikation durch Wachstum in steigenden Konzentrationen von MTX (z. B. aufeinander folgenden Schritten in 0,02, 0,2, 1,0 und 5 uM MTX) wie in Kaufman et al., Mol. Cell Biol., 5: 1750 (1983) beschrieben selektiert. Die Transformanten werden kloniert und biologisch wirksame BMP-11 Expression wird durch einen oder mehrere der unten in Beispielen 5 bis 8 beschriebenen BMP-11 Wirksamkeitstests überwacht. BMP-11 Expression sollte mit steigenden Graden von MTX-Resistenz steigen. BMP-11 Polypeptide werden unter Verwendung von nach Stand der Technik bekannten Standardtechniken wie Pulsmarkierung mit [35S] Methionin oder Cystein und Polyacrylamidgel-Elektrophorese gekennzeichnet. Ähnlichen Verfahren kann gefolgt werden, um andere verwandte BMP-11 Proteine herzustellen.

## Beispiel 4

## Biologische Aktivität von exprimiertem BMP-11

**[0099]** Um die biologische Aktivität der in Beispiel 3 oben erhaltenen exprimierten BMP-11 Proteine zu messen, werden die Proteine aus der Zellkultur gewonnen und gereinigt, indem man BMP-11 Proteine von anderen proteinartigen Substanzen isoliert, mit welchen sie gemeinsam hergestellt werden, als auch von anderen Verunreinigungen. Das gereinigte Protein kann gemäß den in Beispielen 5 bis 8 unten beschriebenen Tests für BMP-11 Aktivität getestet werden.

Beispiel 5

W-20 Biotest

A. Beschreibung von W-20 Zellen

**[0100]** Verwendung der W-20 Knochenmark-Stromazellen als Indikator-Zelllinie basiert auf der Umwandlung dieser Zellen zu Osteoblast-ähnlichen Zellen nach Behandlung mit einem BMP-Protein [Thies et al., Journal of Bone and Mineral Research, 5: 305 (1990); und Thies et al., Endocrinology, 130: 1318 (1992)]. Speziell sind W-20 Zellen eine klonale Knochenmark-Stromazelllinie, hergeleitet von erwachsenen Mäusen durch Forscher im Labor von Dr. D. Nathan, Children's Hospital, Boston, MA. Behandlung von W-20 Zellen mit bestimmten BMP-Proteinen ergibt (1) erhöhte alkalische Phosphataseproduktion, (2) Herbeiführung von PTH-stimuliertem cAMP und (3) Herbeiführung von Osteocalcinsynthese durch die Zellen. Während (1) und (2) Merkmale in Verbindung mit dem Osteoblast-Phenotyp darstellen, ist die Fähigkeit, Osteocalcin zu synthetisieren, eine phenotypische Eigenschaft, welche nur durch reife Osteoblasten gezeigt wird. Ferner haben wir bis jetzt Umwandlung von W-20 Stromazellen in Osteoblast-ähnlichen Zellen nur bei Behandlung mit BMPS beobachtet. Auf diese Weise korrelieren die in vitro Wirksamkeiten, welche durch BMP behandelte W-20 Zellen gezeigt werden, mit der für BMPs bekannten in vivo Knochenbildungsaktivität.

**[0101]** Unten werden zwei in vitro Tests beschrieben, welche beim Vergleich von BMP-Aktivitäten von neuartigen osteoinduktiven Molekülen brauchbar sind.

B. W-20 alkalische Phosphatase-Testprotokoll

**[0102]** W-20 Zellen werden in Gewebekulturschalen mit 96 Mulden bei einer Dichte von 10000 Zellen pro Mulde in 200 µl Medium (DME mit 10% Hitze-inaktiviertem fötalem Kälberserum, 2 mM Glutamin und 100 Einheiten/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin plattiert.

**[0103]** Die Zellen dürfen über Nacht in einem 95% Luft, 5% $CO_2$ Inkubator bei 37°C anhaften.

**[0104]** Die 200 µl Medium werden mit einem Multikanal-Pipettor aus jeder Mulde entfernt und mit einem gleichen Volumen an Testprobe, geliefert in DME mit 10% Hitze-inaktiviertem Kälberserum, 2 mM Glutamin und 1% Penicillin-Streptomycin ersetzt. Die Testsubstanzen werden dreifach getestet.

**[0105]** Den Testproben und Standards wird ein 24 Stunden Inkubationszeitraum mit den W-20 Indikatorzellen erlaubt. Nach den 24 Stunden werden die Schalen aus dem 37°C Inkubator entfernt und die Testmedien werden von den Zellen entfernt.

**[0106]** Die W-20 Zellschichten werden 3 Mal mit 200 µl pro Mulde an Calcium/Magnesium-freier, Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung gewaschen und diese Wäschen werden verworfen.

**[0107]** 50 µl Glas-destilliertes Wasser werden zu jeder Mulde zugegeben und die Testschalen werden dann in ein Trockeneis/Ethanolbad zum Blitzgefrieren platziert. Sobald gefroren werden die Schalen aus dem Trockeneis/Ethanolbad entfernt und bei 37°C aufgetaut. Dieser Schritt wird 2 weitere Male für insgesamt 3 Frost-Tau-Verfahren wiederholt. Sobald vollständig, ist die Membran-gebundene alkalische Phosphatase für Messung verfügbar.

**[0108]** 50 µl Testgemisch (50 mM Glycin, 0,05 Triton x-100, 4 mM $MgCl_2$, 5 mM p-Nitrophenol-phosphat, pH = 10,3) werden zu jeder Testmulde zugegeben und die Testschalen werden dann für 30 Minuten bei 37°C in einem schüttelnden Wasserbad bei 60 Oszillationen pro Minute inkubiert.

**[0109]** Am Ende der 30 Minuten Inkubation wird die Umsetzung durch Zugeben von 100 µl von 0,2 N NaOH zu jeder Mulde und Platzieren der Testschalen auf Eis gestoppt. Die spektrophotometrische Extinktion für jede Mulde wird bei einer Wellenlänge von 405 Nanometern abgelesen. Diese Werte werden dann mit bekannten Standards verglichen, um eine Schätzung der alkalischen Phosphataseaktivität in jeder Probe zu ergeben. Zum Beispiel werden unter Verwendung von bekannten Mengen an p-Nitrophenol-phosphat Extinktionswerte erzeugt. Dies wird in Tabelle I gezeigt.

Tabelle 1

| Extinktionswerte für bekannte Standards von P-Nitrophenolphosphat | |
|---|---|
| P-Nitrophenolphosphat µmol | Mittlere Extinktion (405 nm) |
| 0,000 | 0 |
| 0,006 | 0,261 +/– 0,024 |
| 0,012 | 0,521 +/– 0,031 |
| 0,018 | 0,797 +/– 0,063 |
| 0,024 | 1,074 +/– 0,061 |
| 0,030 | 1,305 +/– 0,083 |

**[0110]** Extinktionswerte für bekannte Mengen an BMPs können bestimmt werden und können zu µmol an p-Nitrophenolphosphat, gespalten pro Einheitszeit umgewandelt werden, wie in Tabelle II gezeigt.

Tabelle II

| Alkalische Phosphatasewerte für W-20 Zellen | | |
|---|---|---|
| | Behandeln mit BMP-2 | |
| BMP-2 Konzentration ng/ml | Extinktionsablesung 405 nMeter | µmol Substrat Pro Stunde |
| 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 |

**[0111]** Diese Werte werden dann verwendet, um die Wirksamkeiten von bekannten Mengen an BMP-11 mit BMP-2 zu vergleichen.

C. Osteocalcin RIA Protokoll

**[0112]** W-20 Zellen werden bei $10^6$ Zellen pro Mulde in Multiwell Gewebekulturschalen mit 24 Mulden in 2 ml DME plattiert, welches 10% Hitze-inaktiviertes fötales Kälberserum, 2 mM Glutamin enthält. Die Zeilen dürfen über Nacht in einer Atmosphäre von 95% Luft, 5% $CO_2$ bei 37°C anhaften.

**[0113]** Am nächsten Tag wird das Medium zu DME gewechselt, welches 10% fötales Kälberserum, 2 mM Glutamin und die Testsubstanz in einem Gesamtvolumen von 2 ml enthält. Jede Testsubstanz wird an dreifache Mulden verabreicht. Die Testsubstanzen werden mit den W-20 Zellen für insgesamt 96 Stunden inkubiert, mit Ersetzen bei 48 Stunden durch die gleichen Testmedien.

**[0114]** Am Ende von 96 Stunden werden 50 µl Testmedium aus jeder Mulde entfernt und bezüglich Osteocal-

cin-Produktion unter Verwendung eines Radioimmuntests für Maus-Osteocalcin getestet. Die Details des Tests werden in dem Kit beschrieben, welches durch Biomedical Technologies Inc., 378 Page Street, Stoughton, MA 02072 hergestellt wird. Reagenzien für den Test werden als Produktnummern BT-431 (Maus-Osteocalcin-Standard), BT-432 (Ziegeanti-Maus Osteocalcin), BT-431R (iodiertes Maus-Osteocalcin), BT-415 (normales Ziegenserum) und BT-414 (Esel-anti-Ziege IgG) gefunden. Der RIA für Osteocalcin, synthetisiert durch W-20 Zellen in Antwort auf BMP-Behandlung, wird wie in dem durch den Hersteller vorgesehenen Protokoll beschrieben durchgeführt.

**[0115]** Die erhaltenen Werte für die Testproben werden mit Werten für bekannte Standards von Maus-Osteocalcin verglichen und mit der Menge an Osteocalcin, welche durch W-20 Zellen in Antwort auf Challenge mit bekannten Mengen von BMP-2 produziert werden. Die Werte für BMP-2 induzierte Osteocalcin-Synthese durch W-20 Zellen wird in Tabelle III gezeigt.

Tabelle III

| Osteocalcin-Synthese durch W-20 Zellen | |
|---|---|
| BMP-2 Konzentration ng/ml | Osteocalcin-Synthese ng/Mulde |
| 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 |

Beispiel 6

Rosen-modifizierter Sampath-Reddi-Test

**[0116]** Eine modifizierte Version des Rattenknochenbildungstests, beschrieben in Sampath und Reddi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 6591–6595 (1983) wird verwendet, um Knochen und/oder Knorpel und/oder andere Bindegewebe herbeiführende Aktivität von BMP-11 Proteinen zu bewerten. Dieser modifizierte Test wird hierin der Rosen-modifizierte Sampath-Reddi-Test genannt. Der Ethanol-Ausfällungsschritt des Sampath-Reddi-Verfahrens wird durch Dialysieren (falls die Zusammensetzung eine Lösung ist) oder Diafiltrieren (falls die Zusammensetzung eine Suspension ist) der zu testenden Fraktion gegen Wasser ersetzt. Die Lösung oder Suspension wird dann zu 0,1% TFA äquilibriert. Die sich ergebende Lösung wird zu 20 mg Rattenmatrix zugegeben. Eine Rattenmatrix-Scheinprobe, welche nicht mit dem Protein behandelt wird, dient als Kontrolle. Dieses Material wird gefroren und gefriergetrocknet und das sich ergebende Pulver wird in #5 Gelatinekapseln eingeschlossen. Die Kapseln werden subkutan in den abdominalen Thoraxbereich von 21–49 Tage alten männlichen Long Evans Ratten implantiert. Die Implantate werden nach 7–14 Tagen entfernt. Die Hälfte eines jeden Implantats wird zur alkalischen Phosphatase-Analyse verwendet [siehe Reddi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 69: 1601 (1972)].

**[0117]** Die andere Hälfte von jedem Implantat wird fixiert und zur histologischen Analyse verarbeitet. 1 µm Glycolmethacrylat-Abschnitte werden mit Von Kossa und Säure Fuschin eingefärbt, um die Menge an herbeigeführter Knochen- und Knorpelbildung, welche in jedem Implantat vorhanden ist, zu bewerten. Die Begriffe

+1 bis +5 repräsentieren den Bereich jedes histologischen Abschnitts eines Implantats, der durch neue Knochen- und/oder Knorpelzellen besetzt ist und Matrix. Eine Bewertung von +5 zeigt an, dass mehr als 50% des Implantats neuer Knochen und/ oder Knorpel ist, welcher als direkte Folge von Protein im Implantat hergestellt wurde. Eine Bewertung von +4, +3, +2 und +1 würde anzeigen, dass mehr als 40%, 30%, 20% bzw. 10% des Implantats neuen Knorpel und/oder Knochen enthalten.

**[0118]** Die BMP-11 Proteine dieser Erfindung können in diesem Test auf Wirksamkeit getestet werden.

Beispiel 7

Biologische Aktivität von exprimiertem BMP-11

**[0119]** Um die biologische Aktivität der in Beispiel 3 oben erhaltenen exprimierten BMP-11 Proteine zu messen, werden die Proteine aus der Zellkultur gewonnen und gereinigt, indem man die BMP-11 Proteine von anderen proteinartigen Materialien isoliert, mit welchen sie gemeinsam hergestellt werden, als auch von anderen Verunreinigungen. Das gereinigte Protein kann gemäß dem in Beispiel 6 beschriebenen Rattenknochenbildungstest getestet werden.

**[0120]** Die Reinigung wird unter Verwendung von den Fachleuten bekannten Standardtechniken durchgeführt.

**[0121]** Die Proteinanalyse wird unter Verwendung von Standardtechniken durchgeführt, wie SDS-PAGE Acrylamid [Laemmli, Nature 227: 680 (1970)], mit Silber gefärbt [Oakley et al., Anal. Biochem. 105: 361 (1980)] und durch Immunoblot [Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350 (1979)].

**[0122]** Die vorhergehenden Beschreibungen beschreiben detailliert gegenwärtig bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung. Es wird erwartet, dass zahlreiche Modifikationen und Variationen in der Praxis davon bei den Fachleuten bei Erwägung dieser Beschreibungen auftreten werden. Von jenen Modifikationen und Variationen wird angenommen, dass sie innerhalb der hieran angehängten Ansprüche umfasst werden.

Beispiel 8

Tests, um Activinaktivität von BMP-11 zu bestimmen

**[0123]** Reinigung wird unter Verwendung von den Fachleuten bekannten Standardtechniken durchgeführt. Es wird erwogen, dass wie bei anderen Proteinen der TGF-β Superfamilie, Reinigung die Verwendung von Heparinsepharose einschließen kann.

**[0124]** Proteinanalyse wird unter Verwendung von Standardtechniken durchgeführt, wie SDS-PAGE Acrylamid [Laemmli, Nature 227: 680 (1970)], mit Silber gefärbt [Oakley et al., Anal. Biochem. 105: 361 (1980)] und durch Immunoblot [Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350 (1979)].

**[0125]** BMP-11 Proteine können ferner durch ihre Fähigkeit gekennzeichnet werden, die Abgabe von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) in etablierten in vitro Biotests unter Verwendung von Hypophysenvorderlappenzellen von Ratten zu modulieren, wie beschrieben in zum Beispiel Vale et al., Endocrinology, 91: 562–572 (1972); Ling et al., Nature, 321: 779–782 (1986) oder Vale et al., Nature, 321: 776–779 (1986)], deren Offenbarungen hiermit durch Verweis eingeschlossen werden.

**[0126]** Alternativ kann BMP-11 durch die Fähigkeit gekennzeichnet werden, Erythropoietinaktivität in der humanen K-562 Zelllinie zu stimulieren, wie durch Lozzio et al., Blood, 45: 321–334 (1975) und US-Patent Nr. 5071834 an Spalte 15 beschrieben, deren Ofenbarungen hiermit durch Verweis eingeschlossen werden.

**[0127]** Zusätzlich kann BMP-11 durch die Aktivität in Zellüberlebenstests gekennzeichnet werden, wie in Schubert, Nature, 344: 868–870 (1990) beschrieben, dessen Offenbarung durch Verweis eingeschlossen wird.

**[0128]** Die vorhergehenden Beschreibungen stellen gegenwärtig bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung detailliert dar. Es wird erwartet, dass zahlreiche Modifikationen und Variationen in der Praxis davon bei den Fachleuten bei Erwägung dieser Beschreibungen auftreten werden. von jenen Modifikationen und Variationen wird angenommen, dass sie innerhalb der hieran angehängten Ansprüche umfasst werden.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) Allgemeine Information:

(i) Anmelder:
(A) Name: Genetics Institute, Inc.
(B) Straße: 87 Cambridgepark Drive
(C) Stadt: Cambridge
(D) Bundesstaat: Massachusetts
(E) Land: USA
(F) ZIP: 02140
(G) Telefon: (617) 876-1170
(H) Telefax: (617) 876-5851

(ii) Titel der Erfindung: BMP-11 Zusammensetzungen

(iii) Anzahl an Sequenzen: 11

(iv) Computerlesbar von:
(A) Medium Art: Floppy Disk
(B) Computer: IBM PC kompatibel
(C) Betriebssystem: PC-DOS/MS-DOS
(D) Software: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(2) Informationen für SEQ ID Nr. 1:

(i) Sequenzkennzeichen:
(A) Länge: 789 Basenpaare
(B) Art: Nucleinsäure
(C) Strängigkeit: doppelt
(D) Topologie: linear

(ii) Art des Moleküls: DNA (genomisch)

(vi) Originalquelle:
(A) Organismus: Bos Taurus
(B) Stamm: Bovines Activin WC

(ix) Merkmal:

(A) Name/Schlüssel: CDS

(B) Ort: 324..704

(ix) Merkmal:

(A) Name/Schlüssel: misc_feature

(B) Ort: 322..323

(D) andere Informationen: Anmerkung = „putatives 3'-Ende von Intron"

(ix) Merkmal:

(A) Name/Schlüssel: mat_peptide

(B) Ort: 375..701

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 1:

```
AAACTGTATT TTGGGGTGAA GGTGTGAGTT AATAGATTCA CGGGACAACA AAGATGGGCT      60

GTTGTTGAGA CCTTGGGCCA AGGGGCTGAT GAGGGTCAGG TTGCCAAGAG AGAGAGAATT     120

AGGGAAGGTG AGTTTAGGGA GACATGGCTA GCTGGCAAGA AAAGTGGGTA GAAAACAGGG     180

GTTGGGGAGG GGAGCACTGG AGAAGCTCAG AAATCACTTG GTCTCTGTTC TCCTGCCCCT     240

ACTGAGGGGC AGGTGAGAAG AAACAGGGAG TAGGAGCTCC TCGAGGCTCT ATTACATCTC     300

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

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

AAC TAC TGC TCC GGC CAG TGC GAG TAC ATG TTT ATG CAA AAG TAT CCG        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

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

CCCTAGACTC CCCCAGCCCT GACCCCCTGC TCCCCGGCCC TAGAGCTC                789
```

(2) Informationen für SEQ ID Nr. 2:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 126 Aminosäuren

(B) Art: Aminosäure

(D) Topologie: linear

(ii) Art des Moleküls: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 2:

```
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

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                  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
```

(2) Informationen für SEQ ID Nr. 3:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 213 Basenpaare

(B) Art: Nucleinsäure

(C) Strängigkeit: doppelt

(D) Topologie: linear

(ii) Art des Moleküls: DNA (genomisch)

(vi) Originalquelle:

(A) Organismus: Homo Sapiens

(B) Stamm: Humanes Activin WC

(ix) Merkmal:

(A) Name/Schlüssel: CDS

(B) Ort: 28..183

(ix) Merkmal:

(A) Name/Schlüssel: misc_feature

(B) Ort: 184..185

(D) andere Informationen: Anmerkung = „Zweidrittel von Codon am Ende von partiellem Klon"

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 3:

```
TCTAGATGCT CCGGCCAGTG CGAGTAC ATG TTC ATG CAA AAA TAT CCG CAT          51
                                Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro His
                                  1               5

ACC CAT TTG GTG CAG CAG GCC AAT CCA AGA GGC TCT GCT GGG CCC TGT        99
Thr His Leu Val Gln Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys
     10                  15                  20

TGT ACC CCC ACC AAG ATG TCC CCA ATC AAC ATG CTC TAC TTC AAT GAC       147
Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp
 25                  30                  35                  40

AAG CAG CAG ATT ATC TAC GGC AAG ATC CCT GGC ATG GTGGTGGATC            193
Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Gly Met
                 45                  50

GCTGTGGCTG CTCCGGATCC                                                213
```

(2) Informationen für SEQ ID Nr. 4:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 52 Aminosäuren

(B) Art: Aminosäure

(D) Topologie: linear

(ii) Art des Moleküls: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 4:

**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) Informationen für SEQ ID Nr. 5:

(i) Sequenzkennzeichen:
(A) Länge: 30 Basenpaare
(B) Art: Nucleinsäure
(C) Strängigkeit: einfach
(D) Topologie: linear

(ii) Art des Moleküls: DNA (genomisch)

(vi) Originalquelle:
(A) Organismus: Primer C zu Bovinem Activin WC

(ix) Merkmal:
(A) Name/Schlüssel: misc_feature
(B) Ort: 1..9
(D) andere Informationen: Anmerkung = „Restriktionsstelle für XbaI"

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 5:

TAGTCTAGAT GCTCCGGCCA GTGCGAGTAC

(2) Informationen für SEQ ID Nr. 6:

(i) Sequenzkennzeichen:
(A) Länge: 30 Basenpaare
(B) Art: Nucleinsäure
(C) Strängigkeit: einfach
(D) Topologie: linear

(ii) Art des Moleküls: DNA (genomisch)

(vi) Originalquelle:
(A) Organismus: Primer D zu Bovinem Activin WC

(ix) Merkmal:
(A) Name/Schlüssel: misc_feature
(B) Ort: 1..9
(D) andere Informationen: Anmerkung = „Restriktionsstelle für BamHI"

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 6:

TGCGGATCCG GAGCAGCCAC AGCGATCCAC

(2) Informationen für SEQ ID Nr. 7:

(i) Sequenzkennzeichen:
(A) Länge: 15 Basenpaare
(B) Art: Nucleinsäure
(C) Strängigkeit: einfach
(D) Topologie: linear

(ii) Art des Moleküls: DNA (genomisch)

(vi) Originalquelle:
(A) Organismus: DNA, insertiert in pMT2 CXM

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 7:

CATGGGCAGC TCGAG

(2) Informationen für SEQ ID Nr. 8:

(i) Sequenzkennzeichen:
(A) Länge: 34 Basenpaare
(B) Art: Nucleinsäure
(C) Strängigkeit: einfach
(D) Topologie: linear

(ii) Art des Moleküls: DNA (genomisch)

(vi) Originalquelle:
(A) Organismus: DNA, insertiert in pMT21

(ix) Merkmal:
(A) Name/Schlüssel: misc_feature
(B) Ort: 1..6
(D) andere Informationen: Anmerkung = „ Pst Restriktionsstelle"

(ix) Merkmal:
(A) Name/Schlüssel: misc_feature
(B) Ort: 15..26
(D) andere Informationen: Anmerkung = „ EcoRI und XhoI Restriktionsstellen"

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 8:

CTGCAGGCGA GCCTGAATTC CTCGAGCCAT CATG

(2) Informationen für SEQ ID Nr. 9:

(i) Sequenzkennzeichen:
(A) Länge: 68 Basenpaare
(B) Art: Nucleinsäure
(C) Strängigkeit: einfach
(D) Topologie: linear

(ii) Art des Moleküls: DNA (genomisch)

(vi) Originalquelle:
(A) Organismus: Teil der EMC-Virus Leitsequenz

(x) Veröffentlichungsinformation:
(A) Autoren: Jung, S.K.
(C) Zeitschrift: J. Virol.
(D) Band: 63
(F) Seiten: 1651-1660
(G) Datum: 1989

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 9:

CGAGGTTAAA AAACGTCTAG GCCCCCCGAA CCACGGGGAC GTGGTTTTCC
TTTGAAAAAC ACGATTGC

(2) Informationen für SEQ ID Nr. 10:

(i) Sequenzkennzeichen:
(A) Länge: 1270 Basenpaare
(B) Art: Nucleinsäure
(C) Strängigkeit: einfach
(D) Topologie: linear

(ii) Art des Moleküls: DNA (genomisch)

(vi) Originalquelle:
(A) Organismus: Humanes BMP-11

(vii) Direkte Quelle:
(B) Klon: FB30.5

(ix) Merkmal:
(A) Name/Schlüssel: CDS
(B) Ort: 1..1086

(ix) Merkmal:
(A) Name/Schlüssel: mat_peptid
(B) Ort: 760..1086

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 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

TGC CCC GTG TGC GTT TGG CGG 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 CGG 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

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

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 Phe Ser Pro Lys Val Met Phe Thr
    -140                -135                -130

AAG GTA CTG AAG GCC CAG CTG TGG GTG TAC CTA CGG 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 GGG        480
Pro Ala Thr Val Tyr Leu Gln Ile Leu Arg Leu Lys Pro Leu Thr Gly
                -105                -100                -95

GAA GGG ACC GCA GGG GGA GGG GGC GGA GGC CGG 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

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

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

GAG CTT CGA GTC CTA GAG AAC ACA AAA CGT TCC CGG CGG AAC CTG GGT        768
Glu Leu Arg Val Leu Glu Asn Thr Lys Arg Ser Arg Arg Asn Leu Gly
            -10                 -5                  1

CTG GAC TGC GAC GAG CAC TCA AGC GAG TCC CGC TGC TGC CGA TAT CCC        816
Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro
      5                  10                  15

CTC ACA GTG GAC TTT GAG GCT TTC GGC TGG GAC TGG ATC ATC GCA CCT        864
Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro
 20                  25                  30                  35

AAG CGC TAC AAG GCC AAC TAC TGC TCC GGC CAG TGC GAG TAC ATG TTC        912
Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu Tyr Met Phe
                40                  45                  50

ATG CAA AAA TAT CCG CAT ACC CAT TTG GTG CAG CAG GCC AAT CCA AGA        960
Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala Asn Pro Arg
            55                  60                  65
```

```
GGC TCT GCT GGG CCC TGT TGT ACC CCC ACC AAG ATG TCC CCA ATC AAC      1008
Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn
        70                  75                  80

ATG CTC TAC TTC AAT GAC AAG CAG CAG ATT ATC TAC GGC AAG ATC CCT      1056
Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro
    85                  90                  95

GGC ATG GTG GTG GAT CGC TGT GGC TGC TCT TAAGGTGGGG GATAGAGGAT        1106
Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
100                 105

GCCTCCCCCA CAGACCCTAC CCCAAGACCC CTAGCCCTGC CCCCATCCCC CCAAGCCCTA    1166

GAGCTCCCTC CACTCTTCCC GCGAACATCA CACCGTTCCC CGACCAAGCC GTGTGCAATA    1226

CAACAGAGGG AGGCAGGTGG GAATTGAGGG TGAGGGGTTT GGGG                     1270
```

(2) Informationen für SEQ ID Nr. 11:

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 362 Aminosäuren

(B) Art: Aminosäure

(D) Topologie: linear

(ii) Art des Moleküls: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 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
```

**Patentansprüche**

1. DNA-Sequenz, welche für ein Protein codiert, welches BMP-11 Wirksamkeit aufweist, wobei besagte DNA-Sequenz ausgewählt wird aus der Gruppe bestehend aus:
(a) Nucleotiden #375 oder #390 bis #704 von SEQ ID Nr. 1;
(b) Nucleotiden #760 oder #775 bis #1086 von SEQ ID Nr. 10;
(c) Nucleotiden, welche für Aminosäuren #1 oder #6 bis #109 von SEQ ID Nr. 2 codieren;
(d) Nucleotiden, welche für Aminosäuren #1 oder #6 bis #109 von SEQ ID Nr. 11 codieren; und
(e) natürlich vorkommenden Allele-Sequenzen und äquivalenten degenerativen Codon-Sequenzen von einem von (a) bis (d).

2. DNA-Sequenz, welche für ein Protein codiert, welches mindestens eine BMP-11 Wirksamkeit aufweist, welche unter strengen Hybridisierungsbedingungen zu einer der Sequenzen von Anspruch 1 hybridisiert, wobei die BMP-11 Wirksamkeit ausgewählt wird aus Regulierung von Herstellung von Follikel-stimulierendem Hormon, Förderung von neuronalem Zellüberleben, Stimulieren von Hämatopoiese und Suppression der Entwicklung von gonadalen Tumoren.

3. DNA-Sequenz von Anspruch 1 oder 2, welche ferner eine zweite DNA-Sequenz umfasst, welche für ein geeignetes Propeptid 5' codiert und gebunden im Rahmen an besagte DNA-Sequenz von Anspruch 1.

4. DNA-Sequenz von Anspruch 3, wobei das Propeptid von einem Mitglied der TGF-β-Überfamilie von Proteinen ist.

5. Vektor, welcher die DNA-Sequenz von einem der Ansprüche 1 bis 4 in operativer Assoziation mit einer

Expressions-Kontrollsequenz dafür umfasst.

6. Wirtszelle, welche mit dem Vektor von Anspruch 5 transformiert ist.

7. Wirtszelle von Anspruch 6, welche eine Säugetierzelle ist.

8. Verfahren zum Herstellen eines Proteins, welches BMP-11 Wirksamkeit aufweist, welches umfasst:
(a) Kultivieren der Wirtszelle von Anspruch 6 oder 7; und
(b) Gewinnen des besagten BMP-11 Proteins aus dem Kulturmedium.

9. Verfahren von Anspruch 8, welches ferner Reinigen des besagten BMP-11 Proteins umfasst.

10. BMP-11 Protein, welches durch die DNA-Sequenz von einem der Ansprüche 1 bis 3 codiert oder durch das Verfahren von Anspruch 8 oder 9 hergestellt wird.

11. Polypeptid, welches ein Dimer ist, worin jede Untereinheit eine Aminosäuresequenz für das BMP-11 Protein von Anspruch 10 umfasst.

12. Polypeptid, welches ein Dimer ist, worin eine Untereinheit eine Aminosäuresequenz für das BMP-11 Protein von Anspruch 10 umfasst, und eine Untereinheit eine Aminosäuresequenz für ein Knochen-morphogenes Protein umfasst, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9 und BMP-10.

13. Polypeptid, welches das BMP-11 Protein von Anspruch 10 in dimerer Form mit einem anderen Inhibin-β Protein umfasst.

14. Polypeptid, welches das BMP-11 Protein von Anspruch 10 in dimerer Form mit einem Inhibin-α Protein umfasst.

15. Pharmazeutische Zusammensetzung, welche das BMP-11 Protein von Anspruch 9 oder das Polypeptid von einem der Ansprüche 11 bis 14 in Vermischung mit einem pharmazeutisch annehmbaren Vehikel umfasst.

16. Pharmazeutische Zusammensetzung von Anspruch 15, wobei besagte Zusammensetzung ferner mindestens ein Knochen-morphogenes Protein umfasst.

17. Verwendung der Zusammensetzung von Anspruch 15 oder 16 für die Herstellung eines Medikaments zum Regulieren der Herstellung von Follikel-stimulierendem Hormon, zur Empfängnisverhütung oder für die Behandlung von Knochen- und/oder Knorpeldefekten, Periodontalerkrankung oder Wunden.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen