



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 689 29 472 T2** 2004.05.13

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 723 013 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **689 29 472.7**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 200 044.4**

(96) Europäischer Anmeldetag: **07.04.1989**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.07.1996**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **18.06.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **13.05.2004**

(51) Int Cl.7: **C12N 15/12**

**C07K 14/51, C07K 16/22, A61K 38/18,**

**A61L 27/00, C12N 1/21**

(30) Unionspriorität:

**179406            08.04.1988    US**

**232630            15.08.1988    US**

**315342            23.02.1989    US**

(73) Patentinhaber:

**Stryker Corp., Kalamazoo, Mich., US**

(74) Vertreter:

**Patentanwälte Wallach, Koch & Partner, 80339  
München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE**

(72) Erfinder:

**Opperman, Hermann, Medway, Massachusetts  
02053, US; Kuberasampath, Thangavel, Medway,  
Massachusetts 02053, US; Rueger, David C., West  
Roxbury, Massachusetts 02132, US**

(54) Bezeichnung: **Biosynthetische knochenbildende Proteine, und sie enthaltende knochenbildende Vorrichtungen**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft osteogenetische Vorrichtungen, betrifft synthetische Gene, die Proteine kodieren, und die eine Osteogenese in Säugetieren induzieren können und betrifft Verfahren zu deren Herstellung unter Verwendung von DNA Rekombinationstechniken, betrifft synthetische Formen osteogenetischer Proteine und Knochen- und Knorpelheilungsverfahren und betrifft die Verwendung einer osteogenetischen Vorrichtung, die synthetische Proteine umfasst.

[0002] Es ist bekannt, dass Säugetierknochengewebe ein oder mehrere proteinartige Materialien enthält, die wahrscheinlich während des Wachstums und der natürlichen Knochenheilung aktiv sind, und die eine Entwicklungskaskade zellulärer Ereignisse induzieren können, die eine Ersatzknochenbildung mit sich bringt. Dieser aktive Faktor (oder Faktoren) wurde in der Literatur in verschiedener Weise als Knochen-morphogenetisches oder morphogenetisches Protein, knocheninduktives Protein, osteogenetisches Protein, Osteogenin oder osteoinduktives Protein bezeichnet.

[0003] Die Entwicklungskaskade der Knochendifferenzierung besteht aus der Rekrutierung mesenchymaler Zellen, der Proliferation von Vorläuferzellen, der Kalzifizierung von Knorpel, der vaskulären Invasion, Knochenbildung, Umformung und zuletzt der Marksdifferenzierung (Reddi (1981) Kollagen Rel. Res. 1: 209–226).

[0004] Obwohl die genauen Mechanismen, die diesen phänotypischen Transformationen zugrunde liegen unklar sind, wurde gezeigt, dass die natürliche Ersatzknochendifferenzierungsaktivität der Knochenmatrix dissoziativ extrahiert und mit inaktiver restlicher kollagenöser Matrix zur Wiederherstellung der vollen Knocheninduktionsaktivität rekonstituiert werden kann (Sampath und Reddi, (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7599–7603). Dies ergibt ein experimentelles Verfahren zur Untersuchung von Proteinextrakten auf ihr Vermögen, in vivo eine Ersatzknochenbildung zu induzieren.

[0005] Es hat sich gezeigt, dass dieses vermeintliche Knochen induzierende Protein eine Molekülmasse von weniger als 50 Kilodalton (kD) aufweist. Mehrere Säugetierspezies erzeugen ein eng verwandtes Protein, wie es durch Kreuzspezies-Implantationsexperimente demonstriert wurde (Sampath und Reddi (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6591–6595).

[0006] Die potentielle Nützlichkeit dieser Proteine wurde im weiten Umfang erkannt. Es wird erwogen, dass die Verfügbarkeit des reinen Proteins die orthopädische Medizin, bestimmte Typen der plastischen Chirurgie und verschiedene periodontale und craniofaciale Rekonstruktions-Verfahren revolutionieren würde.

[0007] Die beobachteten Eigenschaften dieser Proteinfraktionen haben einen intensiven Forschungsaufwand in verschiedenen Laboratorien ausgelöst, der auf die Isolierung und Identifizierung des reinen Faktors oder der Faktoren, die für die osteogenetische Aktivität verantwortlich sind, gerichtet war. Der gegenwärtige Stand der Technik der Aufreinigung des osteogenetischen Proteins aus Säugetierknochen ist in Sampath et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 80) offenbart. Urist et al. (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1984) 173: 194–199) offenbaren eine humane osteogenetische Proteinfraktion, die aus demineralisierten kortikalem Knochen mittels eines anorganischen-organischen Kalziumchlorid-Urea-Lösungsmittelgemisches extrahiert wurde und durch differenzielle Präzipitation in Guanidin-Hydrochlorid und präparative Gel-Elektrophorese gewonnen wurden. Die Autoren berichten, dass die Proteinfraktion eine Aminosäure-Zusammensetzung eines sauren Polypeptids und einer Molekülmasse in einem Bereich von 17–18 kD aufweist.

[0008] Urist et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81: 371–375) offenbaren einen morphogenetischen Rinderknochen-Proteinextrakt mit den Eigenschaften eines sauren Polypeptids und einem Molekulargewicht bzw. einer Molekülmasse von ungefähr 18 kD. Die Autoren berichteten, dass das Protein in einer Fraktion vorlag, die durch Hydroxyapatit-Chromatographie aufgetrennt wurde und dass dieses die Knochenbildung im interili-oabdominalen Maus-Muskel und eine Knochenregeneration bei Trephein-Defekten in Ratten- und Hundeschädeln induzierte. Ihr Verfahren zur Gewinnung des Extraktes aus Knochen hat schlecht definierte und unreine Zubereitungen zur Folge.

[0009] Die europäische Patentanmeldung Nummer 148,155, veröffentlicht am 7. Oktober 1985, behauptet osteogenetische Proteine zu offenbaren, die bovinen, porcinen und humanen Ursprungs sind. Eines dieser Proteine, das von den Erfindern als P3-Protein mit einer Molekülmasse von 22–24 kD bezeichnet wird, wurde angeblich bis zu einem im wesentlichen homogenen Zustand aufgereinigt. Es wird berichtet, dass dieses Material die Knochenbildung induziert, wenn es Tieren implantiert wird.

[0010] Die internationale Anmeldung Nummer PCT/087/01537, veröffentlicht am 14. Januar 1988, offenbart eine unreine Fraktion aus Rinderknochen, die Knocheninduktionsqualitäten aufweist. Die genannten Anmelder offenbaren ebenfalls vermeintliche knocheninduktive Faktoren, die durch DNA Rekombinationstechniken erzeugt wurden. Vier DNA-Sequenzen wurden aus humanen oder bovinen genomischen oder cDNA-Bibliotheken gewonnen und werden anscheinend in rekombinanten Wirtszellen exprimiert. Während die Anmelder feststellten, dass die exprimierten Proteine Knochenmorphogenetische Proteine sein können, wurde eine Knocheninduktion nicht demonstriert. Siehe ebenfalls Urist et al., EP 0 212 474 mit dem Titel „Knochen-morphogenetische Mittel“.

[0011] Wang et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1988) 85: 9484–9488) offenbart die Aufreinigung eines mor-

phogenetischen Rinderknochenproteins aus Guanidin-Extrakten von demineralisierten Knochen, das eine Knorpel- und Knochenbildungsaktivität aufweist, als ein basisches Protein, das einer Molekülmasse von 30 kD entspricht, bestimmt durch Gel-Elution. Die Aufreinigung des Proteins ergab Proteine von 30, 18 und 16 kD die nach Auftrennung inaktiv waren. In Hinblick auf dieses Ergebnis erkannten die Autoren an, dass die genaue Identität des aktiven Materials nicht bestimmt wurde.

[0012] Wozney et al. (Science (1988) 242: 1528–1534) offenbart die Isolierung von cDNA's in voller Länge, die die humanen Äquivalente dreier Polypeptide kodiert, die ursprünglich aus Rinderknochen aufgereinigt wurden. Die Autoren berichten, dass jedes der drei rekombinanten exprimierten humanen Proteine unabhängig oder in Kombination dazu in der Lage sind, eine Knorpelbildung zu induzieren. Es wird jedoch nicht von einem Beweis einer Knochenbildung berichtet.

[0013] Es ist eine Aufgabe dieser Erfindung, osteogenetische Vorrichtungen mit Matrizes bereitzustellen, die dispergiertes osteogenetisches Protein enthalten, das zur Induktion von Knochen in allogenen und xenogenen Implantaten in der Lage ist. Es ist eine weitere Aufgabe, synthetische osteogenetische Proteine bereitzustellen, die zum Induzieren einer Ersatzknochenbildung in Säugetieren, einschließlich Menschen, in der Lage sind. Es ist eine noch weitere Aufgabe, Gene bereitzustellen, die nicht-native osteogenetische Proteine kodieren und Verfahren für ihre Herstellung unter Verwendung von DNA-Rekombinationstechniken bereitzustellen. Es ist eine weitere Aufgabe, neue biosynthetische Formen von osteogenetischen Proteinen und ein strukturelles Design für neue, funktionelle osteogenetische Proteine bereit zu stellen. Es ist eine weitere Aufgabe, Verfahren zum Induzieren der Knorpelbildung bereitzustellen.

[0014] Diese und weitere Aufgaben und Merkmale der Erfindung werden aus der Beschreibung, den Zeichnungen und Ansprüchen, die folgen, offensichtlich werden.

#### Zusammenfassung der Erfindung

[0015] Diese Erfindung schließt osteogenetische Vorrichtungen ein, die, wenn sie in einem Säugetierkörper angeordnet werden, am Ort des Implantates die volle Entwicklungskaskade der Ersatzknochenbildung und Knochenmarksdifferenzierung induzieren können. Wie hierin offenbart in geeigneter Weise modifiziert können die Vorrichtungen ebenfalls zum Induzieren einer Knorpelbildung verwendet werden. Die Vorrichtungen umfassen ein Trägermaterial, das hierin als Matrix bezeichnet wird, das die nachstehend offenbarten Eigenschaften aufweist, und das dispergiertes osteogenetisches Protein in Form eines biosynthetischen Konstruktes enthält.

[0016] Der Schlüssel für diese Entwicklungen war die erfolgreiche beziehungsweise Herstellung von im wesentlichen reinem osteogenetischem Protein durch Aufreinigung aus Knochen, das ans Licht bringen der Aminosäuresequenz und Strukturdaten für das native osteogenetische Protein und Einsichten, die eine Studie der DNA- und Aminosäuresequenzen des Produktes aus natürlicher Quelle einschlossen. Es wurde eine Vorschrift entwickelt, die eine Wiedergewinnung von aktiven, im wesentlichen reinen osteogenetischen Proteinen aus Säugetierknochen einschließt. Die Untersuchung der Eigenschaften und Struktur des osteogenetischen Proteins in seiner nativen Form ermöglichte den Erfindern dann, ein rationelles Design für nicht-native Formen zu entwickeln, d. h. Formen, die in der Natur vorher nicht bekannt waren, und die zur Induktion der Knochenbildung in der Lage sind. Soweit es den Anmeldern bewußt ist, stellen die hierin offenbarten Konstrukte den ersten Fall eines Designs eines funktionellen, aktiven Proteins ohne vorher existierendes Wissen bezüglich des aktiven Bereiches einer nativen Form einer Nukleotid- oder Aminosäuresequenz dar.

[0017] Eine Reihe von Consensus DNA-Sequenzen wurde mit dem Ziel entwickelt, ein aktives osteogenetisches Protein zu entwickeln. Die Sequenzen basierten auf Teilaminosäuresequenz-Daten, die aus dem Produkt aus natürlicher Quelle gewonnen wurden und basierten auf beobachteten Homologien mit nicht verwandten Genen, von denen in der Literatur berichtet wurde, oder auf den Sequenzen, die diese kodieren und die eine angenommene oder demonstrierte Entwicklungs-Funktion aufweisen. Mehrere der biosynthetischen Consensus-Sequenzen wurden als Fusionsproteine in Prokaryonten gereinigt, gespalten, erneut gefaltet, mit einer Matrix kombiniert, in ein etabliertes Tiermodell implantiert und es wurde gezeigt, dass diese eine Ersatzknochen-induzierende Aktivität aufweisen. Die gegenwärtig bevorzugten aktiven Proteine umfassen Sequenzen, die als COPS, COP7, COP16 und OP1 bezeichnet werden. Die Aminosäuresequenzen dieser Proteine sind unten dargelegt.

```

1      10      20      30      40
COPS  LYVDFS-DVGWDDWIVAPPGYQAFYCHGECPFPLAD
      50      60      70
HFNSTN--H-AVVQTLVNSVNSKI--PKACCVPTLSA
      80      90     100
ISMLYLDENEKVVVLKKNYQEMVVEGCGCR

```

```

1      10      20      30      40
COP7  LYVDFS-DVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPFPLAD
      50      60      70
HLNSTN--H-AVVQTLVNSVNSKI--PKACCVPTLSA
      80      90     100
ISMLYLDENEKVVVLKKNYQEMVVEGCGCR

```

```

      -10
      PKHHSQRARKKNKN
1      10      20      30      40
COP16 CRRHSLYVDFS-DVGWNDWIVAPPGYQAFYCHGECPFPLAD
      50      60      70
HFNSTN--H-AVVQTLVNSVNSKI--PKACCVPTLSA
      80      90     100
ISMLYLDENEKVVVLKKNYQEMVVEGCGCR

```

```

      -5
      HORQA
1      10      20      30      40
OP1   CKKHELYVSFR-DLGWQDWI I APEGYAAYYCEGECAPFLNS
      50      60      70
YMNATN--H-AIVQTLVHFINPET--VPKPCCAPTQLNA
      80      90     100
ISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

```

[0018] In diesen Sequenzen und in allen anderen Aminosäuresequenzen die hierin offenbart sind, werden die Striche (-) als Füllmittel lediglich dazu verwendet, vergleichbare Sequenzen in verwandten Proteinen in einer Reihe aufzustellen und weisen keine weitere Funktion auf. Somit sind beispielsweise die Aminosäuren 45–50 von COP7 NHAHV. Ebenfalls ist die Numerierung der Aminosäuren lediglich für den Zweck ausgewählt, Vergleiche zwischen Sequenzen zu erleichtern. Somit können beispielsweise die DF-Reste, numeriert als 9 und 10 von COPS und COP7, beispielsweise Reste 35 und 36 eines osteogenetischen Proteins umfassen, das die Erfindung verkörpert. Verschiedene Leader- oder Trailersequenzen können an den operativen aktiven Bereich gebunden werden, vorausgesetzt, dass die osteogenetische oder chondrogenetische bzw. knorpelbildende Aktivität des Proteins nicht zerstört wird.

[0019] Somit umfasst die Erfindung gemäß einem Aspekt ein Protein mit einer Aminosäuresequenz, die mit einer Sequenz von COPS, COP7, COP16 oder OP1 so ausreichend duplikativ ist, dass sie dazu in der Lage ist, eine Ersatzknochenbildung zu induzieren, wenn sie in geeigneter Weise gefaltet und einem Säugetier in Verbindung mit einer Matrix implantiert wird. Einige dieser Sequenzen induzieren Knorpel, jedoch nicht Knochen. Ebenfalls können die Knochenbildungsmaterialien zur Erzeugung von Knorpel verwendet werden, wenn sie an einen avaskulären Ort implantiert werden, oder wenn ein Inhibitor für die volle Knochenentwicklung zusammen mit dem aktiven Protein implantiert wird. Somit umfasst die Erfindung bei einem weiteren Aspekt ein Protein von weniger als 200 Aminosäuren Länge (für jede Kette), einschließlich einer Sequenz, die für die Sequenz von COPS, COP7, COP16 oder OP1 ausreichend duplikativ ist, so dass sie dazu in der Lage ist, zumindest eine Knorpelbildung zu induzieren, wenn es in geeigneter Weise gefaltet und einem Säugetier in Verbindung mit einer Matrix implantiert wird. Der Ausdruck „ausreichend duplikativ“ wie hierin verwendet, wird dazu verwendet, Proteine mit einem Homologiegrad mit den speziellen Sequenzen, die hierin offenbart sind, und anderen, unterschiedlichen Aminosäuren, zu beschreiben, die jedoch nichts desto weniger eine osteogenetische oder chondrogenetische Aktivität zeigen.

[0020] In einem bevorzugten Aspekt umfassen diese Proteine Spezies der generischen Aminosäuresequenzen:

```

1           10           20           30           40           50
  LXVFXDXGWXXWXXXPXGXXAXYCXGXCPXXXXXXXXXXNHAXX
           60           70           80           90           100
OXXVXXNXXXXPXXCCXPXXXXXXXXLXXXXXXXXVXLXXYXXMXVXXCXCX

```

oder

```

1           10           20           30           40           50
  CXXXXLXVFXDXGWXXWXXXPXGXXAXYCXGXCPXXXXXXXXNHAXX
           60           70           80           90           100
OXXVXXXNXXXXPXXCCXPXXXXXXXXLXXXXXXXXVXLXXYXXMXVXXCXCX

```

wobei die Buchstaben die Aminosäurereste im Standard-Einbuchstabencode anzeigen und X jeweils irgendeine der 22 natürlich vorkommenden Aminosäurereste repräsentiert. Bevorzugte Aminosäuresequenzen innerhalb der vorhergehenden generischen Sequenzen sind:

```

1           10           20           30           40           50
  LYVDFRDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPPFLADHLNSTNHAIV
  K S S L QE VIS E FD Y E A AY MPESMKAS VI
  F E K I DN L N S Q ITK F P TL
  A S K
           60           70           80           90           100
  QTLVNSVNPFGKIPKACCVPTELSAISMLYLDENENVVLKNYQDMVVEGCGCR
  SI HAI SEQV EP A EQMNSLAI FFNDQDK I RK EE T DA H H
  RF T S K DPV V Y N S H RN RS
  N S K P E

```

und

```

1           10           20           30           40           50
  CKRHPLYVDFRDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPPFLADHLNSTNHAIV
  RRRS K S S L QE VIS E FD Y E A AY MPESMKAS VI
  KE F E K I DN L N S Q ITK F P TL
  Q A S K
           60           70           80           90           100
  QTLVNSVNPFGKIPKACCVPTELSAISMLYLDENENVVLKNYQDMVVEGCGCR
  SI HAI SEQV EP A EQMNSLAI FFNDQDK I RK EE T DA H H
  RF T S K DPV V Y N S H RN RS
  N S K P E

```

wobei jede der in jeder Position in der Sequenz vertikal angeordneten Aminosäuren alternativ in verschiedenen Kombinationen verwendet werden kann. Es sei erwähnt, dass diese generischen Sequenzen 6 und vorzugsweise 7 Cysteinreste aufweisen, wo sich inter- oder intramolekulare Disulfidbrücken bilden können und enthalten weitere entscheidende Aminosäuren, die die Tertiärstruktur der Proteine beeinflussen. Diese generischen Strukturmerkmale sind in früher veröffentlichten Sequenzen zu finden, von denen jedoch keine als dazu in der Lage beschrieben wurde, eine osteogenetische Aktivität zu zeigen und von denen die meisten niemals mit einer solchen Aktivität in Verbindung gebracht wurden.

[0021] Besonders nützliche Sequenzen schließen folgende ein:

Vg1           1           10           20           30           40  
 CKKRHLYVEFK-DVGWQNWVIAPOGYMANYCYGECFYPLTE  
                   50           60           70  
 ILNGSN--H-AILQTLVHSIEPED-IPLPCCVPTKMSP  
                   80           90           100  
 ISMLFYDNDNDNVVLRHYENMAVDECGCR

DPP           1           10           20           30           40  
 CRRHSLYVDFS-DVGWDDWIVAPLGYDAYYCHGKCPFPLAD  
                   50           60           70  
 HFNSTN--H-AVVQTLVNNNNPGK-VPKACCVPTQLDS  
                   80           90           100  
 VAMLYLNDQSTVVVLKNYQEMTVVGCGR

CBMP-2a       1           10           20           30           40  
 CKRHPLYVDFS-DVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPFPLAD  
                   50           60           70  
 HLNSTN--H-AIVQTLVNSVNS-K-IPKACCVPTELSA  
                   80           90           100  
 ISMLYLDENEKVVVLKNYQDMVVEGCGCR

CBMP-2b       1           10           20           30           40  
 CRRHSLYVDFS-DVGWNDWIVAPPGYQAFYCHGDCPFPLAD  
                   50           60           70  
 HLNSTN--H-AIVQTLVNSVNS-S-IPKACCVPTELSA  
                   80           90           100  
 ISMLYLDEYDKVVVLKNYQEMVVEGCGCR

CBMP-3       1           10           20           30           40  
 CARRYLKVDFA-DIGWSEWII SPKSFDAYYCSGACQFMPK  
                   50           60           70  
 SLKPSN--H-ATIQSIVRAVGUVPGIPEPCCVPEKMSS  
                   80           90           100  
 LSILFFDENKNVVVLKVYPNMTVESACR

COP1           1           10           20           30           40  
 LYVDFQRDVGWDDWIIAPVDFDAYYCSGACQFPSAD  
                   50           60           70  
 HFNSTN--H-AVVQTLVNNMNPBK-VPKPCCVPTELSA  
                   80           90           100  
 ISMLYLDENSTVVVLKNYQEMTVVGCGR

**COP3**

```

1           10           20           30           40
  LYVDFQRDVGWDDWIVAPPGYQAFYCSGACQFPSAD
           50           60           70
  HFNSTN--H-AVVQTLVNNMNP GK-VPKPCCVPTLSA
           80           90          100
  ISMLYLDENEKVV LKNYQEMVVEGCGCR

```

**COP4**

```

1           10           20           30           40
  LYVDFS-DVGWDDWIVAPPGYQAFYCSGACQFPSAD
           50           60           70
  HFNSTN--H-AVVQTLVNNMNP GK-VPKPCCVPTLSA
           80           90          100
  ISMLYLDENEKVV LKNYQEMVVEGCGCR

```

[0022] Vgl ist eine bekannte Xenopus-Sequenz, die bisher nicht mit einer Knochenbildung in Verbindung gebracht wurde. DPP ist eine Aminosäuresequenz, die von einem Drosophila-Gen kodiert wurde, das für die Entwicklung des dorsoventralen Musters verantwortlich ist. OP1 ist eine Region einer natürlichen Sequenz, die durch Exons einer genomischen DNA-Sequenz kodiert wird, die von den Anmeldern aufgespürt wurde. Die CBMPs sind Aminosäuresequenzen, die Unterabschnitte der Säugetierproteine umfassen, die von den genomischen DNAs und cDNAs codiert werden, die von den Aasmeldern aufgespürt wurden. Die COPs sind vollständig biosynthetische Proteinsequenzen, ausgedrückt durch neue Consensus-Genkonstrukte, und designed unter Verwendung der hierin vorstehend dargelegten Kriterien und wurden bis jetzt in der Natur nicht aufgefunden.

[0023] Es wird angenommen, dass diese Proteine Dimere sind. Sie scheinen nicht aktiv zu sein, wenn sie reduziert sind. Verschiedene Kombinationen von Spezies der Proteine können als Heterodimere oder Homodimere existieren. Soweit es den Aasmeldern bewußt ist stellen die COPS, COP7-, COP16- und OP1-Konstrukte die ersten Fälle des Designs eines bioaktiven Proteins ohne vorher existierende Erkenntnis des aktiven Bereichs einer Nukleotid- oder Aminosäuresequenz in nativer Form dar.

[0024] Die Erfindung stellt somit synthetische osteogenetische Proteine bereit, die unter Verwendung von DNA-Rekombinationstechniken hergestellt wurden. Das Protein kann Formen mit variierenden Glykosylierungsmustern, variierenden N-termini, eine Familie verwandter Proteine mit Regionen einer Aminosäuresequenz-Homologie und aktive trunkierte oder mutierte Formen des nativen Proteins einschließen, unabhängig davon, wie diese gewonnen wurden. Im Hinblick auf diese Offenbarung kann der auf dem Fachgebiet tätige Gentechniker Gene entwickeln und synthetisieren, die die geeigneten Aminosäuresequenzen kodieren und kann diese dann in verschiedenen Typen von Wirtszellen exprimieren, einschließlich sowohl von Prokaryonten als auch Eukaryonten, um große Mengen aktiver synthetischer Proteine zu erzeugen, die trunkierte Analoga, Muteine, Fusionsproteine und andere Konstrukte umfassen, die die biologische Aktivität der naiven Formen nachahmen und zur Induktion einer Knochenbildung in Säugetieren, einschließlich von Menschen, in der Lage sind.

[0025] Die synthetischen Proteine sind in klinischen Anwendungen in Verbindung mit einem geeigneten Abgabe- oder Transportsystem (Matrix) von Nutzen. Die Matrix wird aus Teilchen oder porösen Materialien hergestellt. Die Poren müssen eine Dimension aufweisen, die eine Vorläuferzellmigration und eine anschließende Differenzierung und Proliferation ermöglichen. Die Teilchengröße sollte innerhalb des Bereichs von 70–850 Mikrometer, vorzugsweise 70–420 Mikrometer liegen. Sie kann durch enges Packen von teilchenförmigem Material in eine Form hergestellt werden, die den Knochendefekt überspannt oder durch in anderer Weise strukturieren, wie erforderlich, eines Materials, das biokompatibel (nicht entzündlich) und in vivo biodegradierbar ist, um als ein „temporäres Gerüst“ und als ein Substrat zur Rekrutierung von migratorischen Vorläuferzellen und als Basis für deren anschließende Verankerung und Proliferation zu dienen. Gegenwärtig bevorzugte Träger schließen teilchenförmigen, demineralisierten, Guanidin-extrahierten Spezies-spezifischen (allogenen) Knochen und teilchenförmigen, entglykosylierten (oder HF-behandelten) Protein-extrahierten, demineralisierten, xenogenen Knochen ein. Wahlweise können solche xenogenen Knochenpulvermatrizes ebenfalls mit Proteasen wie beispielsweise Trypsin behandelt werden. Weitere nützliche Matrixmaterialien umfassen Kollagen, Homopolymere und Copolymere der Glykolsäure und Milchsäure, Hydroxyapatit, Trikalziumphosphat und andere Kalziumphosphate.

[0026] Die osteogenetischen Proteine und implantierbaren osteogenetischen Vorrichtungen, die hierin ausgeführt und offenbart sind, ermöglichen dem Arzt eine optimale vorhersehbare Knochenbildung zu erzielen, um beispielsweise erworbene oder angeborene craniofaciale oder andere Skelett- und Zahnanomalien zu korrigieren (Glowacki et al. (1981) Lancet 1: 959-963). Die Vorrichtungen können dazu verwendet werden, eine

lokale Ersatzknochenbildung in nicht-gleichförmigen bzw. nicht verheilenden Frakturen und in anderen klinischen Anwendungen zu induzieren, einschließlich periodontaler Anwendungen, bei denen eine Knochenbildung erforderlich ist. Eine andere potentiell klinische Anwendung ist die Knorpelheilung, beispielsweise bei der Behandlung der Osteoarthritis.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnung

[0027] Die vorhergehenden und weiteren Aufgaben dieser Erfindung, deren verschiedene Merkmale, ebenso wie die Erfindung selbst sind aus der nachfolgenden Beschreibung besser verständlich, wenn sie zusammen mit den begleitenden Zeichnungen gelesen werden, bei denen:

[0028] **Fig. 1** ein Vergleich der Aminosäuresequenz verschiedener osteogenetischer Proteine mit derjenigen der TGF-Beta-Familie darstellt. COP1, COP3, COP4, COP6 und COP7 sind eine aus dem Consensus-Gen entwickelte Familie von Analoga synthetischer osteogenetischer Proteine, die über eine Gelenkregion an ein Leader-Protein gebunden sind, das die Sequenz D-P-N-G aufweist, die die chemische Spaltung an der D-P-Stelle (durch Säure) oder N-G (durch Hydroxylamin) ermöglichte, was die Freisetzung des analogen Proteins zur Folge hat; VGI ist ein Xenopus-Protein, DPP ist ein Drosophila-Protein; OP1 ist ein natives osteogenetisches Protein; CBMP2a und 2b und CBMP3 sind Unterabschnitte der Proteine, die in der PCT-Anmeldung 087/01537 offenbart sind; MIS ist die Mullerian Inhibitory Substance; und „Consensus Auswahl“ bedeutet verschiedene Substitutionen von Aminosäuren, die an verschiedenen Positionen in den osteogenetischen Proteinen vorgenommen werden können;

[0029] **Fig. 2A** ist ein E. coli Expressionsvektor, der ein Gen eines osteogenetischen Proteins fusioniert an ein Leader-Protein enthält;

[0030] **Fig. 2B** ist die DNA-Sequenz, die einen modifizierten trp-LE-Leader, zwei Fb-Domänen aus Protein A, einer ASP-PRO-Spaltstelle und die COPS-Sequenz umfasst;

[0031] **Fig. 3A** und **3B** sind Mikrophotographien von Implantaten, die die Histologie (Tag 12) von aktivem rekombinantem COPS-Protein darstellen. A ist Kontrolle (Rattenmatrix alleine, 25 mg). B ist eine Rattenmatrix plus COPS, die \*\*\* Knorpelbildung und \*\* Knochenbildung darstellt (siehe Legende unten). Ähnliche Ergebnisse werden mit COP7 erreicht; und

[0032] **Fig. 4** ist eine schematische Darstellung der DNA-Sequenz und der entsprechenden Aminosäuresequenz eines Consensus-Genes für ein osteogenetisches Protein (COPO).

#### Beschreibung

[0033] Reinigungsvorschriften wurden entwickelt, die die Isolierung des in Protein-Rohextrakten vorliegenden osteogenetischen Proteins aus Säugetierknochen ermöglichen. Das Isolierungsverfahren ermöglicht die Herstellung signifikanter Mengen von im wesentlichen reinen osteogenetischen Proteinen aus irgendeiner Säugertierspezies, vorausgesetzt, dass ausreichende Mengen an frischen Knochen aus der Spezies verfügbar sind. Die empirische Entwicklung des Verfahrens, verbunden mit der Verfügbarkeit von frischen Kalbsknochen ermöglichte die Isolierung von im wesentlichen reinen osteogenetischen Rinderproteinen (Bovine Osteogenic Protein = BOP). BOP wurde signifikant charakterisiert; seine Fähigkeit, ein Knorpel- und letztendlich Ersatzknochenwachstum in Katze, Kaninchen und Ratte zu induzieren, wurde studiert; es hat sich gezeigt, dass es zur Induktion der vollen Entwicklungskaskade der Knochenbildung in der Lage ist, die noch vor kurzem unbekanntem Protein oder Proteinen in heterogenen Knochenextrakten zugeschrieben wurde; und es kann dazu verwendet werden, die Bildung von Ersatzknochen in orthopädischen Defekten einschließlich nicht heilender Frakturen zu induzieren. Es ist in seiner nativen Form ein glykosyliertes, dimeres Protein. Es ist jedoch in entglykosylierter Form aktiv. Es wurde teilweise sequenziert.

[0034] Die Erläuterung der Aminosäuresequenz von BOP ermöglichte die Konstruktion einer Consensus-Nukleinsäuresequenz, die wie hierin offenbart auf Grundlage der Sequenzdaten der gefolgerten Codons für die Sequenz und der Beobachtung der Teilhomologie mit bekannten Genen entwickelt wurde.

[0035] Diese Consensus-Sequenzen wurden durch Vergleich mit den Sequenzen verfeinert, die in bestimmten regulatorischen Genen aus Drosophila, Xenopus und Menschen vorlagen, gefolgt von Punktmutation, Expression und Assay bezüglich der Aktivität. Dieser Ansatz war bei der Erzeugung mehrerer aktiver, vollständig synthetischer Konstrukte erfolgreich, die in der Natur nicht zu finden sind (soweit es den Anmeldern bewußt ist), die eine echte osteogenetische Aktivität aufweisen.

[0036] Diese Entdeckungen ermöglichten die Konstruktion von DNAs, die vollkommen neue, nicht native Proteinkonstrukte kodieren, die individuell und in Kombination dazu in der Lage sind, einen echten Ersatzknochen zu erzeugen. Die DNAs können unter Verwendung wohl etablierter DNA-Rekombinationstechnologien in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen exprimiert werden und die exprimierten Proteine können in vitro oxidiert oder umgefaltet werden, falls dies für die biologische Aktivität erforderlich ist.

[0037] Das Design und die Produktion solcher biosynthetischer Proteine, die Natur der Matrix und andere Ma-

terialaspekte betreffend die Natur, Anwendung, wie diese herzustellen sind und wie der hierin beanspruchte Gegenstand zu verwenden ist, wird weiter aus dem nachfolgenden besser verständlich werden, was das gegenwärtig bekannte beste Verfahren darstellt, die verschiedenen Aspekte der Erfindung auszuüben.

#### Consensus-Sequenzdesign

[0038] Ein synthetisches Consensus-Gen, dargestellt in **Fig. 4**, wurde so designed, dass es ein Consensus-Protein auf Grundlage von Aminosäurevorhersagen aus einer Homologie mit der TGF-Beta-Gen-Familie kodierte. Die entwickelte Consensus-Sequenz wurde dann unter Verwendung bekannter Techniken konstruiert, die einen Zusammenbau von Oligonukleotiden einschlossen, die in einem DNA-Synthesegerät hergestellt wurden.

[0039] Tryptische Peptide, abgeleitet von osteogenetischem Rinderprotein, isoliert von den Anmeldern und sequenziert durch Edmann-Abbau ergab Aminosäuresequenzen, die eine starke Homologie mit der Drosophila DPP-Proteinsequenz (wie aus dem Gen gefolgert), mit Xenopus VG1-Protein, und ein wenig geringere Homologie zu Inhibin und TGF-Beta zeigten, wie es nachstehend in Tabelle 1 demonstriert wurde.

Tabelle 1

<u>Protein</u>	<u>Aminosäuresequenz</u>	<u>Homologie</u>
( <u>BOP</u> )	SFDAYYCSGACQFPS ***** * * **	(9/15 Übereinstimmungen)
( <u>DPP</u> )	GYDAYYCHGKCPFFL	
( <u>BOP</u> )	SFDAYYCSGACQFPS * * * * *	(6/15 Übereinstimmungen)
( <u>Vgl</u> )	GYMANYCYGECPYPL	
( <u>BOP</u> )	SFDAYYCSGACQFPS * * * * *	(5/15 Übereinstimmungen)
( <u>inhibin</u> )	GYHANYCEGECPSHI	
( <u>BOP</u> )	SFDAYYCSGACQFPS * * * * *	(4/15 Übereinstimmungen)
( <u>TGF-beta</u> )	GYHANFCLGPCPYIW	
( <u>BOP</u> )	K/RACCVPTELSAISMLYLDEN ***** * * * * *	(12/20 Übereinstimmungen)
( <u>Vgl</u> )	LPCCVPTKMSPISMLFYDNN	
( <u>BOP</u> )	K/RACCVPTELSAISMLYLDEN * * * * * * * * * *	(12/20 Übereinstimmungen)
( <u>inhibin</u> )	KSCCVPTKLRPMSMLYDDG	
( <u>BOP</u> )	K/RACCVPTELSAISMLYLDE **** * *	(6/19 Übereinstimmungen)
( <u>TGF-beta</u> )	APCCVPQALEPLPIVYVVG	
( <u>BOP</u> )	K/RACCVPTELSAISMLYLDEN ***** * * * *	(12/20 Übereinstimmungen)
( <u>DPP</u> )	KACCVPTQLDSVAMLYLNDQ	

(BOP) LYVDF  
\*\*\*\*\* (5/5 Übereinstimmungen)

(DPP) LYVDF

---

(BOP) LYVDF  
\*\*\* \* (4/5 Übereinstimmungen)

(Vgl) LYVEF

---

(BOP) LYVDF  
\*\* \*\* (4/5 Übereinstimmungen)

(TGF-beta) LYIDF

---

(BOP) LYVDF  
\* \* (2/5 Übereinstimmungen)

(inhibin) FFVSF

---

\*-- Übereinstimmung

[0040] Bei der Bestimmung einer geeigneten Aminosäuresequenz eines osteogenetischen Proteins (von dem die Nukleinsäuresequenz bestimmt werden kann) wurden nachfolgende Punkte in Erwägung gezogen: (1) die durch Edmann-Abbau der tryptischen Fragmente des osteogenetischen Proteins aus natürlicher Quelle bestimmte Aminosäuresequenz wird am höchsten eingeordnet, so lange diese ein starkes Signal aufweist und eine Homologie oder konservative Austausch zeigt, wenn sie mit den anderen Mitgliedern der Genfamilie ausgerichtet bzw. aligned wird; (2) wo die Sequenz für alle vier Proteine übereinstimmt wird diese in der synthetischen Gensequenz verwendet; (3) übereinstimmende Aminosäuren in DPP und Vgl werden verwendet; (4) wenn Vgl oder DPP voneinander abweichen, jedes jedoch mit Inhibin oder TGF-Beta übereinstimmte, wurde diese übereinstimmende Aminosäure ausgewählt; (5) wenn alle Sequenzen abwichen wurde die DPP-Sequenz anfänglich ausgewählt, wobei der spätere Plan, die Vgl-Sequenz durch Mutagenese zu erzeugen, als Möglichkeit beibehalten wurde. Zusätzlich wird die Consensus-Sequenz so entwickelt, dass sie die Disulfid-Verbrückung erhält und die apparente Strukturhomologie zwischen den verwandten Proteinen konserviert.

#### Rekombinante osteogenetische Proteinkonstrukte

[0041] Dieser Ansatz hatte die Produktion neuer rekombinanter Proteine zur Folge, die zur Induzierung der Bildung von Knorpel und Ersatzknochen in der Lage waren, und die eine Proteinstruktur umfassten, die der funktionellen Domäne des Materials aus natürlicher Quelle duplikativ oder analog zu dieser waren. Die Aminosäuresequenzen, die durch die Consensus-DNA-Sequenzen kodiert werden, wurden von einer Familie natürlicher Proteine abgeleitet, die in die Gewebsentwicklung involviert ist. Es ist bekannt, dass diese Genprodukte/Proteine in einer aktiven Form als Dimere existieren und im allgemeinen aus einem Vorläuferprotein prozessiert werden, so dass eine aktive C-terminale Domäne des Vorläufers erzeugt wird.

[0042] Die rekombinanten osteogenetischen/chondrogenetischen Proteine sind in dem Sinne „neu“, dass, soweit es den Anmeldern bewusst ist, sie in der Natur nicht existieren oder, falls diese existieren, sie niemals vorher mit der Knochen- oder Knorpelbildung in Verbindung gebracht worden sind. Der Ansatz zur Entwicklung dieser Proteine besteht darin, Aminosäuresequenzen zu verwenden, die in den nativen OP-Isolaten zu finden sind, in Polypeptid-Strukturen, die nach bestimmten, in der Literatur erwähnten Proteinen gemustert sind, oder die Aminosäuresequenzen, die aus den in der Literatur berichteten DNAs gefolgert werden. Somit wurde, je mehr unter Verwendung der oben dargelegten Designkriterien und unter Verfeinerung der Aminosäuresequenz über die Proteinsequenzinformation gelernt wurde, eine Reihe synthetischer Proteine in der Hoffnung und in der Absicht entwickelt, dass diese eine osteogenetische oder chondrogenetische Aktivität aufweisen könnten, wenn sie im nachstehend offenbarten Bio-Assay-System getestet wurden.

[0043] Es wurde beispielsweise erwähnt, dass DPP von Drosophila, VG1 von Xenopus, der TGF-Beta-Fami-

lie von Proteinen und in einem geringeren Umfang Alpha- und Beta-Inhibine, eine signifikante Homologie mit bestimmten, der von dem OP-Produkt aus natürlicher Quelle abgeleiteten Sequenzen aufwiesen (Fig. 1). Eine Studie dieser Proteine führte zur Realisierung, dass ein Anteil der Sequenz jeder dieser Sequenzen eine strukturelle Ähnlichkeit aufwies, die durch Analyse der positionsbezogenen Beziehung von Cysteinen und anderen Aminosäuren beobachtbar war, die einen bedeutenden Einfluß auf die dreidimensionale Proteinkonformation aufwiesen. Es wurde erwähnt, dass ein Bereich dieser Sequenzen eine Reihe von sieben Cysteinen aufwies, die sehr nahe in denselben relativen Positionen angeordnet waren und bestimmte andere Aminosäuren in Sequenz, wie nachstehend dargelegt ist:

```

      10          20          30          40          50
CXXXXLVVFXDXGWXXWXXXPGXXAXYCXGXCXXPXXXXXXXXNHAXX
      60          70          80          90         100
QXXVXXXNXXXPXXCXXPXXXXXXXXLXXXXXXXXVXLXXYXXMXVXXCXCX

```

wobei jedes X unabhängig eine Aminosäure repräsentiert. Expressionsexperimente von zweien dieser Konstrukte zeigen eine Aktivität. Expressionsexperimente mit Konstrukten, die nach dieser Aminosäuresequenz-Matrize strukturiert waren, mit einer kürzeren Sequenz, die nur sechs Cysteine aufwiesen, zeigen ebenfalls eine Aktivität:

```

      10          20          30          40          50
LVVFXDXGWXXWXXXPGXXAXYCXGXCXXPXXXXXXXXNHAXX
      60          70          80          90         100
QXXVXXXNXXXPXXCXXPXXXXXXXXLXXXXXXXXVXLXXYXXMXVXXCXCX

```

wobei jedes X unabhängig eine Aminosäure repräsentiert. Innerhalb dieser generischen Strukturen liegt eine Vielzahl spezieller Sequenzen, die eine osteogenetische oder chondrogenetische Aktivität aufweisen. Bevorzugte Strukturen sind solche, die die folgende Aminosäuresequenz aufweisen:

```

      10          20          30          40          50
CKRHPLYVDFRDVGVNDWIVAPPGYHAFYCHGECPPFLADHLNSTNHAIV
      RKRS K S S L  QE VIS E FD Y  E A AY MPESMKAS  VI
      KE F E K I  DN  L  N S  Q  ITK F P  TL
      Q  A  S  K
      60          70          80          90         100
QTLVNSVNPFGKIPKACCVPTELSAISMVLDENENVVLKKNYQDMVVEGCGCR
      SI HAI SEQV EP  A EQMNSLAI FFNDQDK I RK EE T DA H H
      RF  T  S  K DPV V  Y N S  H RN  RS
      N  S  K  P  E

```

wobei in jeder Position, in der mehr als eine Aminosäure dargestellt ist, irgendeine der dargestellten Aminosäuren verwendet werden kann. Neue aktive Proteine sind ebenfalls durch Aminosäuresequenzen definiert, die eine aktive Domäne beginnend bei Rest Nr. 6 dieser Sequenz aufweisen, d. h. das N-terminale CXXXX vermeiden oder die jede der bevorzugten speziellen Kombinationen wie beispielsweise CKRHP, CRRKQ, CKRHE etc. vermeiden, was ein Konstrukt mit nur sechs Cystein-Resten zur Folge hat. Nach dieser Arbeit wurde die PCT 87/01537 veröffentlicht und es wurde beobachtet, dass die dort als BMPII a und BMPIII identifizierten Proteine jeweils eine Region einschlossen, die diese generische Struktur verkörpert. In dieser veröffentlichten Anmeldung wurde nicht gezeigt, dass diese Proteine osteogenetisch sind. Die Anmelder entdeckten jedoch, dass eine Untergruppe der Aminosäuresequenz dieser Proteine, in geeigneter Weise gefaltet und wie hierin dargelegt implantiert, aktiv ist. Diese werden hierin als CBMPIIa, CBMPIIb und CBMPIII offenbart. Weiterhin spürten die Anmelder ein bis jetzt unbekanntes Gen durch Sondieren einer humanen genomischen DNA-Bank mit COPO auf. Dieses Protein wurde als OP1 bezeichnet. Es umfasst eine Region, die dieselbe generische Struktur zeigt.

[0044] Somit werden die bevorzugten osteogenetischen Proteine aus rekombinanter DNA exprimiert und umfassen Aminosäuresequenzen, die eine der nachfolgenden Sequenzen einschließen:



1           10           20           30           40  
 CBMP-2b   CRRHSLYVDFS-DVGWNDWIVAPPGYQAFYCHGDCPFPLAD  
                   50           60           70  
           HLNSTN--H-AIVQTLVNSVNS-S-IPKACCVPTELSA  
           80           90           100  
           ISMLYLDEYDKVVLKKNYQEMVVEGCGCR

1           10           20           30           40  
 CBMP-3    CARRYLKVDFA-DIGWSEWIISPXSFDAYYCSGACQFPMPK  
                   50           60           70  
           SLKPSN--H-ATIQSIVRAVGVPPIPEPCCVPEKMSS  
           80           90           100  
           LSILFFDENKNVVLKVYPNMTVESACR

1           10           20           30           40  
 COP1       LYVDFQRDVGWDDWI IAPVDFDAYYCSGACQFPSAD  
                   50           60           70  
           HFNSTN--H-AVVQTLVNNMNPBK-VPKPCCVPTELSA  
           80           90           100  
           ISMLYLDENSTVVLKKNYQEMTVVGGCGCR

1           10           20           30           40  
 COP3       LYVDFQRDVGWDDWIVAPPGYQAFYCSGACQFPSAD  
                   50           60           70  
           HFNSTN--H-AVVQTLVNNMNPBK-VPKPCCVPTELSA  
           80           90           100  
           ISMLYLDENEKVVVLKKNYQEMVVEGCGCR

1           10           20           30           40  
 COP4       LYVDFS-DVGWDDWIVAPPGYQAFYCSGACQFPSAD  
                   50           60           70  
           HFNSTN--H-AVVQTLVNNMNPBK-VPKPCCVPTELSA  
           80           90           100  
           ISMLYLDENEKVVVLKKNYQEMVVEGCGCR

```

1           10           20           30           40
COP5      LYVDFS-DVGWDDWIVAPPGYQAFYCHGECPFPLAD
           50           60           70
HFNSTN--H-AVVQTLVNSVNSKI--PKACCVPTELSA
           80           90           100
ISMLYLDENEKVVVLKKNYQEMVVEGCGCR

```

```

1           10           20           30           40
COP7      LYVDFS-DVGWDDWIVAPPGYHAFYCHGECPFPLAD
           50           60           70
HLNSTN--H-AVVQTLVNSVNSKI--PKACCVPTELSA
           80           90           100
ISMLYLDENEKVVVLKKNYQEMVVEGCGCR

```

```

1           10           20           30           40
COP16     CRRHSLYVDFS-DVGWDDWIVAPPGYQAFYCHGECPFPLAD
           50           60           70
HFNSTN--H-AVVQTLVNSVNSKI--PKACCVPTELSA
           80           90           100
ISMLYLDENEKVVVLKKNYQEMVVEGCGCR

```

[0045] Wie in Fig. 1 dargestellt ist, weisen diese Sequenzen eine beträchtliche Homologie mit den Alpha- und Beta-Inhibinen, mit drei Formen von TGF-Beta und MIS auf.

#### Genherstellung

[0046] Die zum Expressieren der wie oben beschriebenen Proteine entwickelten synthetischen Gene werden durch Zusammenbau chemisch synthetisierter Oligonukleotide erzeugt. 15–100mer Oligonukleotide können auf einem Biosearch DNA-Model 8600 Synthesegerät synthetisiert und durch Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) in Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) aufgereinigt werden. Die DNA wird dann aus dem Gel elektroeluiert. Überlappende Oligomere können durch T4 Polynukleotid-Kinase phosphoryliert und in größere Blocks ligiert werden, die ebenfalls durch PAGE gereinigt werden können. Natürliche Gensequenzen und cDNAs können ebenfalls zur Expression verwendet werden.

#### Expression

[0047] Die Gene können in geeigneten prokaryontischen Wirten wie beispielsweise Stämmen von E. coli exprimiert werden und ebenfalls in Bacillus, Hefen und verschiedenen Tierzellen wie beispielsweise CHO, Myeloma, etc. Im allgemeinen kann eine Expression unter Verwendung vieler Zelltypen und Expressionssystemen, die dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt sind, erreicht werden. Wenn das Gen in E. coli exprimiert werden soll, muss es zunächst in einen Expressionsvektor kloniert werden. Ein Expressionsvektor (Fig. 2A) auf Grundlage von pBR322, der einen synthetischen trp Promotor-Operator und den modifizierten trp-LE-Leader enthält, kann an den EcoRI und PSTI Restriktionsstellen geöffnet werden und FB-FB COP1, COP3, COPS und COP7 Genfragmente (Fig. 2B) können zwischen diesen Stellen eingefügt werden, wobei FB Fragment B aus Staphylococcus-Protein-A ist. Das exprimierte Fusionsprotein ergibt sich aus einer Anlagerung des COP-Gens an ein Fragment, das FB kodiert. Das COP-Protein ist an das Leader-Protein über eine Gelenkregion gebunden, die die Sequenz Asp-Pro-Asn-Gly aufweist. Dieses Gelenk ermöglicht die chemische Spaltung des Fusionsproteins mit verdünnter Säure an der Asp-Pro-Stelle oder eine Spaltung an der Asp-Gly mit Hydroxylamin, was eine Freisetzung des COP-Proteins zur Folge hat. Für COP16 und OP1 werden die Proteine als Fusionsprodukte exprimiert, unter Verwendung des modifizierten trp-LE als Leader.

#### Herstellung aktiver Proteine

[0048] Das nachfolgende Verfahren wurde zur Herstellung aktiver rekombinanter Proteine befolgt. E. coli-Zel-

len, die die Fusionsproteine enthalten, wurden lysiert. Die Fusionsproteine wurden durch differenzielle Solubilisierung aufgereinigt. Im Falle des COP1, 3, 4, 5 und Fusionsproteinen wurde die Spaltung mit verdünnter Säure durchgeführt und die sich ergebenden Spaltprodukte wurden durch eine Sephacryl-200HR-Säule passiert. Die Sephacryl-Säule trennte den größten Teil der nicht gespaltenen Fusionsprodukte aus den COP1, 3, 4, 5 und 7 Analoga auf. Im Falle des COP16 oder OP1 Fusionsproteins wurde die Spaltung mit einer konzentrierteren Säure durchgeführt und eine SP-Trisacrylsäule wurde als zusätzlicher Reinigungsschritt verwendet. Die COP oder OP-Fractionen wurden dann einer HPLC auf einer semi-präparativen C-18-Säule unterworfen. [0049] Die anfänglichen Bedingungen zur Umfaltung von COP-Analoga oder OP1 waren bei pH 8,0 unter Verwendung von Tris, Gu-HCl, Dithiothreitol. Die Endbedingungen zur Umfaltung von COP-Analoga waren bei pH 8,0 unter Verwendung von Tris, oxidiertem Glutathion und geringen Mengen an Gu-HCl und Dithiothreitol. Alternativ wurden die COP- oder OP1-Proteine in 50 mM HCl, 6 M Guanidin-HCl, pH 8,0 für 18 Stunden bei 4°C suspendiert. Die Faltung mag nicht erforderlich sein, falls die Proteine in Tierzellen exprimiert werden.

#### Produktion von Antisera

[0050] Antiseren gegen COP7 und COPS wurden in weissen New Zealand-Kaninchen erzeugt. Western Blots zeigen, dass die Antiseren mit COP7- und COPS-Zubereitungen reagieren. Das Antiserum gegen COP7 wurde bezüglich einer Reaktivität auf Rinder-osteogenetische Protein-Proben aus natürlicher Quelle getestet. Western Blots zeigen eine klare Reaktion mit dem 30 kD-Protein und, wenn sie reduziert sind, mit der 16 kD-Untereinheit. Die immunreaktive Spezies erscheint als eine eng-beabstandete Dublette in der 16 kD-Untereinheitsregion, ähnlich der in Con A-Blots ersichtlichen 16 kD-Dublette.

#### Matrix-Zubereitung

##### Allgemeine Überlegungen bezüglich der Matrixeigenschaften

[0051] Der im Bioassay-Abschnitt, siehe unten, beschriebene Träger kann entweder durch eine biodegradierbare-synthetische oder durch eine synthetisch-anorganische Matrix ersetzt werden (beispielsweise HAP, Kollagen, Trikalziumphosphat oder Polymilchsäure, Polyglykolsäure und verschiedene Copolymere hiervon). Ebenfalls kann xenogener Knochen verwendet werden, wenn er wie unten beschrieben vorbehandelt wird.

[0052] Studien haben gezeigt, dass die Oberflächenladung, Teilchengröße, das Vorliegen von Mineralien und die Methodik zur Kombination von Matrix und osteogenetischem Protein insgesamt eine Rolle bei der Erreichung einer erfolgreichen Knocheninduktion spielen. Eine Störung der Ladung durch chemische Modifikation vernichtet die induktive Reaktion. Die Teilchengröße beeinflusst die quantitative Reaktion von neuem Knochen; Teilchen zwischen 75 und 420 µm zeigen die maximale Reaktion. Eine Kontamination der Matrix mit Knochenmineralien hemmt die Knochenbildung. Es ist äußerst wichtig, dass die zur Formulierung des osteogenetischen Proteins auf der Matrix verwendeten Verfahren gegenüber dem physikalischen und chemischen Zustand sowohl des osteogenetischen Proteins als auch der Matrix extrem empfindlich sind.

[0053] Die sequentiellen zellulären Reaktionen an der Grenzfläche der Knochenmatrix/OP-Implantate sind komplex. Die vielschrittige Kaskade schließt folgendes ein: Bindung von Fibrin und Fibronectin an implantierte Matrix, Chemotaxis der Zellen, Proliferation von Fibroblasten, Differenziation in Knorpelzellen bzw. Chondroblasten, Knorpelbildung, vaskuläre Invasion, Knochenbildung, Umformung und Knochenmarksdifferenziation.

[0054] Ein erfolgreicher Träger für ein osteogenetisches Protein muss mehrere bedeutende Funktionen durchführen können. Er muss ein osteogenetisches Protein binden können und als Abgabe bzw. Transportsystem mit langsamer Freisetzung dienen, sich jedem Schritt der zellulären Reaktion während der Knochenentwicklung anpassen und das osteogenetische Protein bei einer unspezifischen Proteolyse beschützen. Zusätzlich müssen die ausgewählten Materialien in vivo biokompatibel und biodegradierbar sein; der Träger muss als temporäres Gerüst dienen, bis er vollständig von neuem Knochen ersetzt ist. Die Biokompatibilität erfordert, dass die Matrix keine signifikante Entzündung induziert, wenn sie implantiert wird und nicht vom Wirtstier abgestoßen wird. Eine Biodegradierbarkeit bedeutet, dass die Matrix vom Körper des Wirtes während der Entwicklung neuen Knochens oder Knorpels langsam absorbiert wird. Polymilchsäure (Polylactic acid = PLA), Polyglykolsäure (Polyglycolic Acid = PGA) und verschiedene Kombinationen weisen unterschiedliche in vivo Auflösungs-geschwindigkeiten auf. In Knochen können die Auflösungs-geschwindigkeiten gemäß der Frage variieren, ob das Implantat im kortikalen oder trabekulären Knochen angeordnet ist.

[0055] Die Matrixgeometrie, Teilchengröße, die Gegenwart einer Oberflächenladung und die Porosität oder die Gegenwart von Zwischenräumen zwischen den Teilchen einer Größe, die ausreichend sind, um eine Zellinfiltration zu ermöglichen, sind alle für eine erfolgreiche Matrixleistung von Bedeutung. Es wird bevorzugt, die Matrix zur erwünschten Form des neuen Knochens auszuformen, so dass sie Dimensionen aufweist, die nicht-heilende Defekte überspannen. Rattenstudien zeigen, dass der neue Knochen im wesentlichen mit den Dimensionen der implantierten Vorrichtung gebildet wird.

[0056] Die Matrix kann einen die Form erhaltenden Feststoff umfassen, der aus lose bzw. locker befestigtem teilchenförmigem Material hergestellt ist, beispielsweise aus Kollagen. Er kann ebenfalls gegossene bzw. geformte poröse Feststoffe umfassen oder einfach eine Aggregation von eng gepackten Teilchen, die durch das umgebende Gewebe am Ort gehalten werden. Abgebaute Muskel- oder andere Gewebe können ebenfalls verwendet werden. Große allogene Knochenimplantate können als Träger für die Matrix dienen, wenn ihre Markhöhlen bzw. Mark-Kavitäten gereinigt sind und mit Teilchen und dem dispergierten osteogenetischen Protein bepackt sind.

#### Herstellung von biologisch aktiver allogener Matrix

[0057] Demineralisierte Knochenmatrix wird aus den dehydrierten diaphysealen Schäften von Ratten-Oberschenkelknochen und -Schienbeinen wie hierin beschrieben hergestellt, um eine Knochenteilchengröße zu erzeugen, die durch ein 420 µm Sieb passen sollte. Die Knochenteilchen werden einer dissoziativen Extraktion mit 4 M Guanidin-HCl unterworfen. Eine solche Behandlung hat einen vollständigen Verlust der der Knochenmatrix innewohnenden Fähigkeit zur Folge, eine Ersatzknochendifferenzierung zu induzieren. Das verbleibende unlösliche Material wird zur Herstellung der Matrix verwendet. Das Material weist eine überwiegend kollagenöse Natur auf und induziert nach Implantation keine Knorpel und Knochen. Alle neuen Zubereitungen werden bzgl. ihres Mineralgehalts und falsch positiver Ergebnisse vor Verwendung getestet. Ein Totalverlust der biologischen Aktivität der Knochenmatrix wird wiederhergestellt, wenn eine aktive osteoinduktive Proteinfraction oder ein reines Protein mit der biologisch inaktiven unlöslichen kollagenösen Matrix rekonstituiert wird. Das osteoinduktive Protein kann aus irgendeinem Vertebraten, beispielsweise Rind, Schwein, Affe oder Mensch gewonnen werden oder kann unter Verwendung von DNA-Rekombinationstechniken hergestellt werden.

#### Herstellung von entglykosylierter Knochenmatrix zur Verwendung in xenogenen Implantaten

[0058] Wenn osteogenetisches Protein mit kollagenöser Knochen-Matrix aus anderen Spezies rekonstituiert und einer Ratte implantiert wird, wird kein Knochen gebildet. Dies legt nahe, dass, während das osteogenetische Protein xenogen ist (nicht Spezies-spezifisch), die Matrix Spezies-spezifisch ist, möglicherweise aufgrund einer intrinsischen Immunogenität oder inhibitorischer Komponenten nicht Spezies übergreifend implantiert werden kann. Somit war bis jetzt für Matrices auf Knochenbasis, damit das osteogenetische Protein seine volle Knocheninduzierende Aktivität zeigen kann, eine Spezies-spezifische kollagenöse Knochenmatrix erforderlich.

[0059] Die Hauptkomponente aller Knochenmatrices ist Typ I Kollagen. Zusätzlich zu Kollagen schließt extrahierter Knochen nicht kollagenöse Proteine ein, die 5% ihrer Masse ausmachen können. Viele nicht-kollagenöse Bestandteile der Knochenmatrix sind Glycoproteine. Obwohl die biologische Bedeutung der Glycoproteine in der Knochenbildung nicht bekannt ist, können diese sich selbst als potente Antigene mittels ihres Kohlenhydrat-Gehaltes präsentieren und können immunogene und/oder inhibitorische Bestandteile darstellen, die in xenogener Matrix vorliegen.

[0060] Es wurde nunmehr entdeckt, dass eine kollagenöse Knochenmatrix als Träger verwendet werden kann, um eine Knochen-induzierende Aktivität in xenogenen Implantaten zu bewirken, wenn man zunächst die immunogenen und inhibitorischen Bestandteile aus der Matrix entfernt. Die Matrix wird chemisch unter Verwendung von beispielsweise Flußsäure deglycosyliert um diesen Zweck zu erreichen.

[0061] Rinderknochenrückstand, der wie oben beschrieben hergestellt wurde, wird gesiebt und die Teilchen der 74–420 µm werden gesammelt. Die Probe wird im Vakuum über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet, auf das Reaktionsgefäß übertragen und wasserfreie Flußsäure (HF) (10–20 ml/g Matrix) wird dann bei –70°C auf die Probe destilliert. Man läßt das Gefäß sich auf 0°C erwärmen und das Reaktionsgemisch wird bei dieser Temperatur für 120 Minuten gerührt. Nach Abdampfen des HF im Vakuum wird der Rückstand sorgfältig im Vakuum über KOH-Pellets getrocknet, um die verbleibenden Spuren der Säure zu entfernen.

[0062] Der Umfang der Entglykosylierung kann durch eine Kohlenhydrat-Analyse von Matrixproben bestimmt werden, die vor und nach Behandlung mit HF entnommen wurden, nach Waschen der Proben in geeigneter Weise zur Entfernung nicht kovalent gebundener Kohlenhydrate.

[0063] Die entglykosylierte Knochenmatrix wird als nächstes wie unten dargestellt behandelt

- 1) Suspendieren in TBS (Tris gepufferte Salzlösung) 1g/200 ml und Rühren bei 4°C für 2 Stunden; oder in 6 M Urea, 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,0 (UTBS) und Rühren bei Raumtemperatur für 30 Minuten.
- 2) Zentrifugieren und Waschen mit TBS oder UTBS wie in Schritt 1); und
- 3) Zentrifugieren; Verwerfen des Überstands; Waschen des Rückstands mit Wasser und darauf Lyophilisieren.

## Herstellung der Vorrichtung

[0064] Die Herstellung osteogenetischer Vorrichtungen unter Verwendung irgendeiner der oben dargelegten Matrices mit irgendeinem der oben beschriebenen osteogenetischen Proteinen kann wie folgt durchgeführt werden.

## A. Ethanol-Ausfällung

[0065] In diesem Verfahren wird die Matrix osteogenetischem Protein in Guanidin-HCl zugesetzt. Die Proben werden gevortexed und bei einer niedrigen Temperatur inkubiert. Die Proben werden dann weiter gevortexed. Kalter absoluter Ethanol wird dem Gemisch zugesetzt, das dann gerührt und inkubiert wird. Nach Zentrifugation (Hochgeschwindigkeitsmikrofuge) wird der Überstand verworfen. Die rekonstituierte Matrix wird mit kaltem konzentriertem Ethanol in Wasser gewaschen und darauf lyophilisiert.

## B. Acetonitril/Trifluoressigsäure-Lyophilisierung

[0066] In diesem Verfahren wird osteogenetisches Protein in einer Acetonitril-Trifluoressigsäure (ACN/TFA)-Lösung dem Träger zugesetzt. Proben werden kräftig viele Male gevortexed und dann lyophilisiert.

## C. Urea-Lyophilisation

[0067] Für solche Proteine, die in einem Urea-Puffer hergestellt werden, wird das Protein mit der Matrix vermischt, viele Male gevortexed, und dann lyophilisiert bzw. gefriergetrocknet. Das lyophilisierte Material kann „wie es ist“ für Implantate verwendet werden.

## In vivo Ratten-Bioassay

[0068] Mehrere der synthetischen Proteine wurden in Matrices eingebaut, um osteogenetische Vorrichtungen zu produzieren und wurden in Ratten bzgl. ihrer Ersatzknochen-Bildung untersucht. Studien bei Ratten zeigen, dass die osteogenetische Wirkung von der Dosis des in der osteogenetischen Vorrichtung dispergierten osteogenetischen Proteins abhängt. Es wird keine Aktivität beobachtet, wenn die Matrix alleine implantiert wird. Das nachfolgende legt Richtlinien dar, mit denen die hierin offenbarten osteogenetischen Vorrichtungen bzgl. einer Evaluierung von Protein-Konstrukten und Matrices auf eine biologische Aktivität untersucht werden können.

## A. Subkutane Implantation

[0069] Der Bioassay für die Knocheninduktion, wie von Sampath und Reddi (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80: 6591–6595), hierin durch Bezugnahme mit aufgenommen, beschrieben, wird zur Bestimmung der Ersatzknochendifferenzierungsaktivität verwendet. Dieser Assay besteht aus dem Implantieren der Testproben in subkutanen Stellen in allogenen Empfängerratten unter Äther-Anästhesie. Männliche Long-Evans-Ratten im Alter von 28–32 Tagen wurden verwendet. Ein vertikaler Einschnitt (1 cm) wird unter sterilen Bedingungen in der Haut über der Thorax-Region durchgeführt und eine Tasche wird durch stumpfes Präparieren hergestellt. [0070] Ungefähr 25 mg der Testprobe wird tief in der Tasche implantiert und der Einschnitt wird mit einer metallischen Hautklammer geschlossen. Der Tag der Implantation wird als Tag 1 des Experimentes bezeichnet. Die Implantate werden am Tag 12 entfernt. Die heterotrope Stelle ermöglicht die Studie der Knocheninduktion ohne die möglichen Zweideutigkeiten, die sich aus der Verwendung orthotoper Stellen ergeben.

## B. Zelluläre Ereignisse

[0071] Das Implantatmodell in Ratten zeigt eine kontrollierte Progression durch die Stadien der Matrix-induzierten Ersatzknochen-Entwicklung, die folgendes einschließt: (1) transiente bzw. vorübergehende Infiltration von polymorphkernigen Leukozyten am Tag 1; (2) mesenchymale Zellmigration und Proliferation an den Tagen 2 und 3; (3) Chondrozyten-Auftreten an den Tagen 5 und 6; (4) Knochenmatrixbildung am Tag 7; (5) Knorpelkalkifizierung am Tag 8; (6) vaskuläre Invasion, Auftreten von Osteoblasten und Bildung von neuen Knochen an den Tagen 9 und 10; (7) Auftreten einer osteoblastischen und Knochenumformung und Lösung der implantierten Matrix an den Tagen 12–18; und (8) hämatopoetische Knochenmarksdifferenziation im Ossikel am Tag 21. Die Ergebnisse zeigen, dass die Form des neuen Knochens der Form der implantierten Matrix entspricht.

## C. Histologische Auswertung

[0072] Ein histologischer Schnitt und Färbung wird bevorzugt, um den Umfang der Osteogenese in den Implantaten zu bestimmen. Die Implantate werden in Bouins-Lösung fixiert, in Parafilm eingebettet, in 6–8 mm Schnitte geschnitten. Eine Färbung mit Toluidin-blau oder Hämotoxylin/Eosin zeigt klar die letztendliche Entwicklung von Ersatzknochen. Zwölf-Tages-Implantate waren üblicherweise ausreichend, um zu bestimmen, ob die Implantate eine Knochen-induzierende Aktivität aufweisen.

## D. Biologische Marker

[0073] Die alkalische Phosphatase-Aktivität kann als Marker für die Osteogenese verwendet werden. Die Enzym-Aktivität kann spektrophotometrisch nach Homogenisierung des Implantats bestimmt werden. Die Aktivität gipfelt an den Tagen 9–10 in vivo und nimmt danach langsam ab. Implantate, die durch Histologie keine Knochenentwicklung zeigen, sollten unter diesen Assay-Bedingungen nur eine geringe oder keine alkalische Phosphatase-Aktivität zeigen. Der Assay ist zur Quantifizierung und Gewinnung einer Einschätzung der Knochenbildung sehr rasch, nachdem die Implantate aus der Ratte entfernt wurden, von Nutzen. Alternativ kann der Umfang der Knochenbildung durch Messen des Kalziumgehalts des Implantates bestimmt werden.

[0074] Die osteogenetische Aktivität aufgrund des osteogenetischen Proteins wird durch „Knochenbildungseinheiten“ repräsentiert. Eine Knochenbildungseinheit repräsentiert die Proteinmenge, die für eine halbmaximale Knochenbildungsaktivität erforderlich ist, im Vergleich zu demineralisierter Ratten-Knochenmatrix als Kontrolle und wird durch den Kalziumgehalt des Implantats am Tag 12 bestimmt.

[0075] Vorrichtungen, die nur Ratten-Träger enthalten zeigen ein vollkommenes Fehlen einer neuen Knochenbildung. Die Implantate bestehen aus Ratten-Trägermatrix und diese umgebende mesenchymale Zellen. Wiederum zeigen die Vorrichtungen, die Ratten-Träger und nicht korrekt gefaltetes (oder biologisch inaktives) rekombinantes Protein enthielten, ebenso ein voll-ständiges Fehlen einer Knochenbildung. Diese Implantate werden als Knorpelbildung (-) und Knochenbildung (-) eingeordnet. Die Ersatzknochenbildungsaktivität wird als null Prozent (0%) eingeordnet (**Fig. 3A**).

[0076] Die Implantate induzierten ein biologisch aktives rekombinantes Protein, zeigten jedoch Anzeichen einer Ersatzknochenbildung. Histologisch zeigten sie eine neue Knorpel- und Knochenbildung.

[0077] Die Knorpelbildung wird bei Vorhandensein von metachromatisch gefärbten Knorpelzellen im Zentrum des Implantats (+) bewertet, bei Vorhandensein zahlreicher Knorpelzellen in vielen Gegenden des Implantats als (++) und bei Vorhandensein reichlicher Knorpelzellen, die eine Knorpelmatrix bilden und bei Erscheinen hypertrophierter Knorpelzellen, die die Knorpelkalzifizierung begleiten als (+++) (**Fig. 3B**).

[0078] Die Knochenbildung wird bei Vorhandensein von Osteoblasten, die vaskuläres Endothel umgeben, das eine neue Matrix bildet, als (+) bewertet, bei Bildung von Knochen aufgrund von Osteoblasten (wie durch die Pfeile angezeigt) und einer weiteren Knochenumformung durch Auftreten von Osteoblasten im Gegensatz zu neugebildeter Knochenmatrix als (++) . Eine vaskuläre Invasion ist in diesen Implantaten offensichtlich (**Fig. 3B**). Die Bildung wird bei Vorhandensein umfassend umgeformten Knochens, der die Bildung von Ossikeln mit sich bringt, als (+++) bewertet.

[0079] Die gesamte Knochen-induzierende Aktivität, die auf das rekombinante Protein zurückzuführen ist, wird als prozentuale Reaktion der Ersatzknochenbildung (siehe Tabelle 2 unten) dargestellt.

Histologische Auswertung rekombinanter Knochen-induktiver Proteine			
Proben-Nr.	Implantiertes Protein	Knorpelbildung	Knochenbildung
260-54	COP-5	+++	++
279-5	COP-6	++	+
285-13	COP-5	+++	+++
277-7	COP-7	+++	+++
277-8	COP-7	+++	++
277-9	COP-7	++	+
285-14	COP-7	+++	++
285-24	COP-7	++	+
285-25	COP-7	++	++
314-6	COP-16	+++	+++
314-15	COP-16	++	+
314-16	COP-16	++	+
314-12	OP-1	++	+

[0080] Die Erfindung betrifft eine osteogenetische Vorrichtung zur Implantation in ein Säugetier, wobei die Vorrichtung eine biokompatible, in vivo biodegradierbare bzw. biologisch abbaubare Matrix umfasst, die Poren einer Dimension aufweist, die ausreicht, um den Einstrom, die Proliferation und Differenziation migratorischer Vorläuferzellen aus dem Körper des Säugetiers zu erlauben; und ein Protein, produziert durch Expression rekombinanter DNA in einer Wirtszelle, das eine oder mehrere Polypeptid-Ketten umfasst, von denen jede eine für die Sequenz von COPS, COP7, COP16 oder OP1 ausreichend duplikative Aminosäuresequenz umfasst, derart, dass das Protein dazu in der Lage ist, eine Ersatzknochenbildung in Verbindung mit der Matrix zu induzieren, wenn sie einem Säugetier implantiert wird.

[0081] Die Erfindung umfasst ebenfalls eine Vorrichtung zur Implantation in ein Säugetier, wobei die Vorrichtung eine biokompatible, in vivo biodegradierbare Matrix umfasst, die Poren mit einer Dimension aufweist, die ausreichend ist, um den Einstrom, die Proliferation und Differenziation migratorischer Vorläuferzellen aus dem Körper des Säugetiers zu erlauben; und ein Protein, produziert durch Expression rekombinanter DNA in einer Wirtszelle, das ein oder mehrere Polypeptid-Ketten umfasst, von denen jede weniger als ungefähr 200 Aminosäuren aufweist und von denen jede eine für die Sequenz von COPS, COP7, COP16 oder OP1 ausreichend duplikative Sequenz umfasst, so dass das Protein zur Induktion einer Knorpelbildung in Verbindung mit der Matrix in der Lage ist, wenn diese einem Säugetier implantiert wird. Die Sequenz kann folgendes umfassen:

```

      10          20          30          40          50
CXXXXLXVFXDXGWXXWXXXPXGXXAXYCXGXCXXPXXXXXXXXNHAXX
      60          70          80          90          100
QXXVXXNXXXXPXXCCXPXXXXXXXXLXXXXXXXXVXLXXYXXMXVXXCXCX
    
```

wobei jedes X unabhängig eine Aminosäure repräsentiert; oder

```

      10          20          30          40          50
LXVFXDXGWXXWXXXPXGXXAXYCXGXCXXPXXXXXXXXNHAXX
      60          70          80          90          100
QXXVXXNXXXXPXXCCXPXXXXXXXXLXXXXXXXXVXLXXYXXMXVXXCXCX
    
```

wobei jedes X unabhängig eine Aminosäure repräsentiert; oder

```

      10      20      30      40      50
CKRHPLYVDFRDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPPFLADHLNSTNHAIV
  RKRS K S S L QE VIS E FD Y E A AY MPESMKAS VI
    KE F E K I DN L N S Q ITK F P TL
      Q A S K

      60      70      80      90      100
QTLVNSVNP GKIPKACCVPTELSAISMLYLDENENVVLKNYQDMVVEGCGCR
  SI HAI SEQV EP A EQMNSLAI FFNDQDK I RK EE T DA H H
    RF T S K DPV V Y N S H RN RS
      N S K P E
  
```

wobei in jeder Position, in der mehr als eine Aminosäure dargestellt ist, irgendeine der dargestellten Aminosäuren in dieser Position vorliegen kann; oder

```

      10      20      30      40      50
LYVDFRDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPPFLADHLNSTNHAIV
  K S S L QE VIS E FD Y E A AY MPESMKAS VI
    F E K I DN L N S Q ITK F P TL
      A S K

      60      70      80      90      100
QTLVNSVNP GKIPKACCVPTELSAISMLYLDENENVVLKNYQDMVVEGCGCR
  SI HAI SEQV EP A EQMNSLAI FFNDQDK I RK EE T DA H H
    RF T S K DPV V Y N S H RN RS
      N S K P E
  
```

wobei in jeder Position in der mehr als eine Aminosäure dargestellt ist, irgendeine der dargestellten Aminosäuren in dieser Position vorliegen kann; oder

```

Vg1      1      10      20      30      40
      CKKRHLYVEFK-DVGWQNWVIAPQGYMANCYGECPPYPLTE
              50      60      70
      ILNGSN--H-AILQTLVHSIEPED-IPLPCCVPTKMSP
              80      90      100
      ISMLFYDNNDNVVLRHYENMAVDECGCR
  
```

oder

DPP 1 10 20 30 40  
 CRRHSLYVDFS-DVGWDDWIVAPLGYDAYYCHGKCPFPLAD  
 50 60 70  
 HFNSTN--H-AVVQTLVNNNNFPGK-VPKACCVPTQLDS  
 80 90 100  
 VANLYLNDQSTVVLKKNYQEMTVVGGCGR

oder

OP1 1 10 20 30 40  
 LYVSFR-DLGWQDWIIAPEGYAAAYYCEGECAPPLNS  
 50 60 70  
 YMNATN--H-AIVQTLVHFINPET-VPKPCCAPTQLNA  
 80 90 100  
 ISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

oder

OP1 1 10 20 30 40  
 CKKHELYVSFR-DLGWQDWIIAPEGYAAAYYCEGECAPPLNS  
 50 60 70  
 YMNATN--H-AIVQTLVHFINPET-VPKPCCAPTQLNA  
 80 90 100  
 ISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

-5  
 HQRQA

oder

CBMP-2a 1 10 20 30 40  
 CKRHPLYVDFS-DVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPPFLAD  
 50 60 70  
 HLNSTN--H-AIVQTLVNSVNS-K-IPKACCVPTELSA  
 80 90 100  
 ISMLYLDENEKVVVLKKNYQDMVVEGCGCR

oder

CBMP-2b 1 10 20 30 40  
 CRRHSLYVDFS-DVGWNDWIVAPPGYQAFYCHGDCPPFLAD  
 50 60 70  
 HLNSTN--H-AIVQTLVNSVNS-S-IPKACCVPTELSA  
 80 90 100  
 ISMLYLDEYDKVVVLKKNYQEMVVEGCGCR

oder

```

-          10          20          30          40
CBMP-3    CARRYLKVDFA-DIGWSEWII SPKSFDAYYCSGACQFPMPK
          50          60          70
          SLKPSN--H-ATIQSIVRAVGVVPGIPEPCCVPEKMSS
          80          90          100
          LSILFFDENKNVVLKVYPNMTVESCACR

```

oder

```

1          10          20          30          40
COP1      LYVDFORDVGVDDWIIAPVDFDAYYCSGACQFPSAD
          50          60          70
          HFNSTN--H-AVVQTLVNNMNP GK-VPKPCCVPTELSA
          80          90          100
          ISMLYLDENSTVVLKKNYQEMTVVGGCGR

```

oder

```

1          10          20          30          40
COP3      LYVDFORDVGVDDWIVAPPGYQAFYCSGACQFPSAD
          50          60          70
          HFNSTN--H-AVVQTLVNNMNP GK-VPKPCCVPTELSA
          80          90          100
          ISMLYLDENEKVVVLKKNYQEMVVEGGCGR

```

oder

```

1          10          20          30          40
COP4      LYVDFS-DVGWDDWIVAPPGYQAFYCSGACQFPSAD
          50          60          70
          HFNSTN--H-AVVQTLVNNMNP GK-VPKPCCVPTELSA
          80          90          100
          ISMLYLDENEKVVVLKKNYQEMVVEGGCGR

```

oder

```

1          10          20          30          40
COP5      LYVDFS-DVGWDDWIVAPPGYQAFYCHGECPFPLAD
          50          60          70
          HFNSTN--H-AVVQTLVNSVNSKI--PKACCVPTELSA
          80          90          100
          ISMLYLDENEKVVVLKKNYQEMVVEGGCGR

```

oder



säuren in dieser Position vorliegen kann.

[0086] Das Protein der Erfindung kann die folgenden Aminosäuresequenzen umfassen:

```

      10      20      30      40      50
  LYVDFRDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPEPLADHLNSTNHAIV
  K S S L  QE VIS E FD Y  E A AY MPESMKAS  VI
  F E K I  DN      L   N S   Q  ITK F P   TL
      A   S       K
      60      70      80      90      100
  QTLVNSVNPNGKIPKACCVPTELSAISMLYLDENENVVLKNYQDMVVEGCGCR
  SI HAI SEQV EP  A EQMNSLAI FFNDQDK I RK EE T DA H H
  RF  T  S      K DPV V  Y N S      H RN  RS
  N   S              K          P   E

```

wobei in jeder Position in der mehr als eine Aminosäure dargestellt ist, irgendeine der dargestellten Aminosäuren in dieser Position vorliegen kann.

[0087] Das Protein der Erfindung kann die folgenden Aminosäuresequenzen umfassen:

```

      1      10      20      30      40
  Vgl  CKKRHLYVEFK-DVGWQNWVIAPOGYMANYCYGECPEPLTE
      50      60      70
  ILNGSN--H-AILQTLVHSIEPED-IPLPCCVPTKMSP
      80      90      100
  ISMLFYDNNNDNVVLRHYENMAVDECGCR

```

oder

```

      1      10      20      30      40
  DPP  CRRHSLYVDFS-DVGWDDWIVAPLGYDAYYCHGKCFEPLAD
      50      60      70
  HFNSTN--H-AVVQTLVNNNPNPK-VPKACCVPTQLDS
      80      90      100
  VAMLYLNDQSTTVLKNYQENTTVGCGCR

```

oder



CBMP-3           1           10           20           30           40  
CARYLKVDFA-DIGWSEWII SPKSF DAYYCSGACQFPMK  
                  50           60           70  
SLKPSN--H-ATIQSIVRAVGVVPGIPEPCCVPEKMSS  
          80           90           100  
LSILFFDENKNVVLKVYPNMTVESACR

oder

COP1           1           10           20           30           40  
LYVDFORDVGVWDDWIIAPVDFDAYYCSGACQFPSAD  
                  50           60           70  
HFNSTN--H-AVVQTLVNNMNP GK-VPKPCCVPTELSA  
          80           90           100  
ISMLYLDENSTVVLKKNYQEMTVVGCGR

oder

COP3           1           10           20           30           40  
LYVDFQRDVGWDDWIVAPPGYQAFYCSGACQFPSAD  
                  50           60           70  
HFNSTN--H-AVVQTLVNNMNP GK-VPKPCCVPTELSA  
          80           90           100  
ISMLYLDENEKVVVLKKNYQEMVVEGCGR

oder

COP4           1           10           20           30           40  
LYVDFS-DVGWDDWIVAPPGYQAFYCSGACQFPSAD  
                  50           60           70  
HFNSTN--H-AVVQTLVNNMNP GK-VPKPCCVPTELSA  
          80           90           100  
ISMLYLDENEKVVVLKKNYQEMVVEGCGR

oder

```

1           10           20           30           40
COP5      LYVDFS-DVGWDDWIVAPPGYQAFYCHGECPPFLAD
           50           60           70
HFNSTN--H-AVVQTLVNSVNSKI--PKACCVPTELSA
           80           90          100
ISMLYLDENEKVVVLKKNYQEMVVEGCGCR
    
```

oder

```

1           10           20           30           40
COP7      LYVDFS-DVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPPFLAD
           50           60           70
HLNSTN--H-AVVQTLVNSVNSKI--PKACCVPTELSA
           80           90          100
ISMLYLDENEKVVVLKKNYQEMVVEGCGCR
    
```

oder

```

                                     -10
                                     PKHHSSRARKKNKN
1           10           20           30           40
COP16     CRRHSLYVDFS-DVGWNDWIVAPPGYQAFYCHGECPPFLAD
           50           60           70
HFNSTN--H-AVVQTLVNSVNSKI--PKACCVPTELSA
           80           90          100
ISMLYLDENEKVVVLKKNYQEMVVEGCGCR
    
```

[0088] Das Protein der Erfindung kann das Expressionsprodukt einer DNA in einer prokaryontischen Zelle umfassen.

[0089] Ebenfalls umfasst die Erfindung eine Zelllinie, die so gentechnisch verändert wurde, dass sie das Protein der Erfindung exprimiert.

[0090] Das Protein weist vorzugsweise eine halbmaximale Knochenbildungsaktivität von ungefähr 20–25 ng pro 25 mg Implantat auf.

[0091] Die Erfindung umfasst ebenfalls Antikörper, die mit einem Epitop des erfindungsgemäßen Proteins reaktiv sind.

[0092] Die Vorrichtung der Erfindung schließt vorzugsweise eine Matrix ein, die demineralisierten, entglykosylierten Protein-extrahierten, teilchenförmigen, xenogenen Knochen oder demineralisierten, Protein-extrahierten, teilchenförmigen xenogenen Knochen einschließt, der mit HF behandelt ist.

### Patentansprüche

1. Osteogenes Protein, das zwei Polypeptidketten umfasst, die im nicht-reduzierte Zustand gebunden sind, so dass sie eine homo- oder heterodimere Spezies mit einer so chen Konformation bilden, dass die zwei Polypeptidketten dazu in der Lage sind, eine Ersatzknochenbildung zu induzieren, wenn sie in einer Matrix angeordnet und einem Säugetier implantiert werden, wobei das Protein einen Bereich umfasst, der sechs Cyst ein-Reste enthält, die in den in der Sequenz dargestellten relativen Positionen angeordnet sind:

```

LXVFXDXGWXXWXXXPXGXXAXYCXGXCXXPXXXXXXXXXNHAXXQXX'X
XXNXXXXPXXCCPXXXXXXXXXLXXXXXXXXVXLXXYXXMXVXXCXCX,
    
```

wobei die Buchstaben die Aminosäurereste im Standard Ein-Buchstaben-Code angebe: i und jedes X irgendei- ne Aminosäure repräsentiert, unter dem Vorbehalt, dass dpp ausgenon men ist.

2. Protein nach Anspruch 1, wobei das Protein einen Bereich umfasst, der sieben Cystein-Reste enthält, die in den der Sequenz dargestell- ten relativen Positionen angeordnet sind:

CXXXXLXVFXDXGWXXWXXXPXGXXAXYCXGXCXXPXXXXXXXXNH/XX  
 QXXVXXNXXXXPXXCCXPXXXXXXXXLXXXXXXXXVXLXXYXXMXVXXCX CX.

3. Protein nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, das ein rekombinantes Protein ist, das durch Expression in einer Wirtszelle hergestellt wird.

4. Verfahren zur Herstellung eines aktiven synthetischen osteogenen Proteins, wie in Anspruch 1 definiert, wobei das Protein zwei Polypeptidketten umfasst, die durch Disulfid-Brücken verbunden sind, so dass eine dimere Spezies erzeugt wird, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

(a) Erzeugen einer Aminosäure-Consensussequenz durch Vergleich von Aminosäuresequenzen von Proteinen der TGF-beta-Genfamilie, wobei die Consensussequenz das Disulfidvernetzungsmuster erhält, das in der folgenden Sequenz vorliegt:

(i) LXVFXDXGWXXWXXXPXGXXAXYCXGXCXXPXXXXXXXXN  
 HAXXQXXVXXNXXXXPXXCCXPXXXXXXXXLXXXXXXXXVXL  
 XXYXXMXVXXCXCX; oder

(ii) CXXXXLXVFXDXGWXXWXXXPXGXXAXYCXGXCXXPXXXX  
 XXXXNHAXXQXXVXXNXXXXPXXCCXPXXXXXXXXLXXXX  
 XXVXLXXYXXMXVXXCXCX;

wobei die Buchstaben die Aminosäurereste im Standard Ein-Buchstaben-Code anzeigen und jedes X irgendeine Aminosäure repräsentiert;

(b) Konstruieren eines synthetischen Gens, das die Aminosäure-Consensussequenz von Schritt (a) kodiert, beispielsweise durch Zusammenfügen von chemisch synthetisierten Oligonukleotiden;

(c) Einbringen des synthetischen Gens aus Schritt (b) in eine prokaryontische oder eukaryontische Wirtszelle;

(d) Exprimieren des synthetischen Gens zur Erzeugung eines putativen synthetischen osteogenen Proteins;

(e) Untersuchen des putativen synthetischen osteogenen Proteins, um zu bestimmen, ob es zur Induktion einer Ersatzknochenbildung wirksam ist, wenn es einem Säugetier implantiert wird, und wahlweise

(f) Wiederholen der Schritte (a) bis (e) (oder Mutagenisieren des synthetischen Gens und Wiederholen der Schritte (c) bis (e), wenn das putative synthetische osteogene Protein inaktiv ist, wenn es so geprüft wird).

5. Verfahren nach Anspruch 4,

wobei die Nukleinsäure-Consensussequenz die folgende Sequenz umfasst:

(a) LXVFXDXGWXXWXXXPXGXXAXYCXGXCXXPXXXXXXXXN  
 HAXXQXXVXXNXXXXPXXCCXPXXXXXXXXLXXXXXXXXVXL  
 XXYXXMXVXXCXCX;

oder

(b) CXXXXLXVFXDXGWXXWXXXPXGXXAXYCXGXCXXPXXXX  
 XXXXNHAXXQXXVXXNXXXXPXXCCXPXXXXXXXXLXXXX  
 XXVXLXXYXXMXVXXCXCX;

wobei die Buchstaben die Aminosäurereste im Standard Ein-Buchstaben-Code angeben und jedes X irgendeine Aminosäure repräsentiert.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 4 bis 5,

wobei das synthetische Gen aus Schritt (b) eine Nukleotidsequenz umfasst, die eine synthetische Polypeptidkette mit derselben Anzahl an Cystein-Resten in denselben relativen Positionen kodiert, wie COPS, COP?, COP16 oder OP1.

7. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 4 bis 6,

wobei das synthetische Gen aus Schritt (b) eine Nukleotidsequenz umfasst, die eine synthetische Polypeptidkette kodiert, die eine oder mehrere Aminosäuren an den entsprechenden Positionen in irgendeiner der Sequenzen: Vgl, DPP, OP1, CBMP-2a, CMBP 2b, CBMP-3, COPI, COP3, COP4, COPS, COP7 oder COP16, umfasst.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7, wobei das synthetische Gen aus Schritt (b) eine Nukleotidsequenz umfasst, die eine synthetische Polypeptidkette kodiert, die die folgende Aminosäure umfasst:

(a)

```

      10      20      30      40      50
    CKRHPLYVDFRDVGWNDWIVPPGYHAFYCHGECPPFLADHLNSTNHAIV
      RKRS K S S L QE VIS E FD Y E A AY MPESMKAS VI
      KE F E K I DN L N S Q ITK F P TL
      Q A S K
      60      70      80      90      100
    QTLVNSVNP GKIPKACCVPTELSAISMLYLDENENVVLKKNYQDMVVEGCGCR
    SI HAI SEQV EP A EQMNSLAI FFNDQDK I RK EE T DA H H
      RF T S K DPV V Y N S H RN RS
      N S K P E
  
```

wobei in jeder Position, in der mehr als eine Aminosäure dargestellt ist, irgendeine der dargestellten Aminosäuren in dieser Position vorliegen kann; oder

(b)

```

      10      20      30      40      50
    LYVDFRDVGWNDWIVAPPGYHAFYCHGECPPFLADHLNSTNHAIV
      K S S L QE VIS E FD Y E A AY MPESMKAS VI
      F E K I DN L N S Q ITK F P TL
      A S K
      60      70      80      90      100
    QTLVNSVNP GKIPKACCVPTELSAISMLYLDENENVVLKKNYQDMVVEGCGCR
    SI HAI SEQV EP A EQMNSLAI FFNDQDK I RK EE T DA H H
      RF T S X DPV V Y N S H RN RS
      N S K P E
  
```

wobei in jeder Position, in der mehr als eine Aminosäure dargestellt ist, irgendeine der dargestellten Aminosäuren in dieser Position vorliegen kann; oder

(c)

1            10            20            30            40  
CRRHSLYVDFS-DVGWDDWIVAPLGYDAYYCHGKCPFPLAD  
                  50            60            70  
HFNSTN--H-AVVQTLVNNNNPGK-VPKACCVPTQLDS  
          80            90            100  
VAMLYLNDQSTVVLKKNYQEMTVVGCGR;

oder

(d)

1            10            20            30            40  
LYVSFR-DLGWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPPLNS  
                  50            60            70  
YMNATN--H-AIVQTLVHFINPET-VPKPCCAPTQLNA  
          80            90            100  
ISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH;

oder

(e)

-5  
HQRQA

1	10	20	30	40
---	----	----	----	----

CKKHELYVSFR-DLGWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPPLNS

50	60	70	
----	----	----	--

YMNATN--H-AIVQTLVHFINPET-VPKPCCAPTQLNA

80	90	100	
----	----	-----	--

ISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH;

oder

(f)

1	10	20	30	40
---	----	----	----	----

LYVDFQRDVGWDDWIIAPVDFDAYYCSGACQFPSAD

50	60	70	
----	----	----	--

HFNSTN--H-AVVQTLVNNMNPBK-VPKPCCVPTLSA

80	90	100	
----	----	-----	--

ISMLYLDENSTVVLKNYQEMTVVGCGR;

oder

(g)

1	10	20	30	40
---	----	----	----	----

LYVDFQRDVGWDDWIVAPPGYQAFYCSGACQFPSAD

50	60	70	
----	----	----	--

HFNSTN--H-AVVQTLVNNMNPBK-VPKPCCVPTLSA

80	90	100	
----	----	-----	--

ISMLYLDENEKVVVLKNYQEMVVEGCGCR;

oder



20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 19, die in der Markhöhle eines allogenen Knochens angeordnet ist.

21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 20 zur Verwendung in der Therapie, beispielsweise zum Induzieren einer lokalen Knorpel- und/oder Ersatzknochen- oder heterotopen Knochenbildung in einem Säugetier durch Implantieren der Vorrichtung in ein Säugetier an einem Ort, der für migratorische Vorläuferzellen zugänglich ist.

22. Vorrichtung nach Anspruch 21 zur Bildung von geformten heterotopen Knochen, wobei die Form des heterotopen Knochens, der gebildet wird, derjenigen der implantierten Vorrichtung entspricht.

23. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1, 2 oder 3 zur Herstellung des Folgenden:  
(a) einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 16 bis 21, oder (b) eines Medikamentes, wobei das Medikament oder die Vorrichtung zur Induktion einer lokalen Knorpel- und/oder Ersatzknochen- oder heterotopen Knochen-Bildung in einem Säugetier vorgesehen ist, indem das Medikament oder die Vorrichtung einem Säugetier an einem Ort eingebracht wird, der für migratorische Vorläuferzellen zugänglich ist, zur periodontalen Behandlung, Knorpelinstandsetzung und zur Behandlung der Osteoarthritis und zur Korrektur von nichtverheilenden Frakturen, erworbenen oder angeborenen kraniofazialen oder anderen Skelettoder dentalen Anomalien.

24. Verwendung nach Anspruch 23 zur Bildung eines geformten heterotopen Knochens, wobei die Form des heterotopen Knochens, der gebildet wird, derjenigen der implantierten Vorrichtung entspricht.

25. Synthetisches Nukleinsäuremolekül zur Verwendung im Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis B.

26. Wirtszelle zur Verwendung im Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 8, die das synthetische Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 25 enthält.

27. Wirtszelle nach Anspruch 26, die eine prokaryontische oder eukaryontische Wirtszelle ist, beispielsweise E. coli, Bacillus, Hefen oder Tierzellen (beispielsweise CHO oder Myeloma).

28. Isolierte DNA-Sequenz, die die Aminosäuresequenz des wie in einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 9 definierten Proteins kodiert.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen



FIG. 1-2

Y	Y	C	e	g	e	C	p	f	p	l	p	d	h	m	n	s	t	n	h	a	i	v	v	q	t	l	v	h										
f,n	f,n		h,*		a*		a,g,q	y		m,i	a,s,t	e,s,g*	r,n,s*	l,f,p,sa	n,k	a,p,g	t,s,a	n																				
::	::	::	::	::	::	::	::	::	::	::	::	::	::	::	::	::	::	::	::	::	::	::	::	::	::	::	::	::	::									
H	Y	C	H	G	G	C	G	L	H	I	P	P	N	L	S	L	P	V	P	G	A	P	P	T	P	A	Q	P	Y									
N	N	C	Q	G	V	C	G	W	F	Q	S	D	R	N	P	R	Y	G	N	H	V	V	L	L	L	K	M											
:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:								
N	F	C	L	A	S	P		L	W	R				L	S	A				T	Q		Y	H		S	K	V	L	A	S	G						
N	Y	C	E	G	S	C	P	A	Y	L	A	G	V	P	G	S	S	A	S	S	F	H	T	A	V	V	N	Q	Y	R	M							
N	Y	C	E	G	E	C	P	S	H	I	A	G	T	S	G	S	S	L	S	F	H	S	T	V	I	N	H	Y	R	M								
Y	Y	C	S	G	A	C	Q	F	P	M	P	K	S	L	K	P	S	N	H	A	T	I	Q	S	I	V	R											
:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
F	Y	C	H	G	E	C	P	F	P	L	A	D	H	L	N	S	T	N	H	A	I	V	Q	T	L	V	N											
Y	Y	C	E	G	E	C	A	F	P	L	N	S	Y	M	N	A	T	N	H	A	I	V	Q	T	L	V	H											
Y	Y	C	H	G	K	C	P	F	P	L	A	D	H	F	N	S	T	N	H	A	V	V	Q	T	L	V	N											
N	Y	C	Y	G	E	C	P	Y	P	L	T	E	I	L	N	G	S	N	H	A	I	L	Q	T	L	V	H											
:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
F	Y	C	H	G	E	C	P	F	P	L	A	D	H	L	N	S	T	N	H	A	V	V	Q	T	L	V	N											
F	Y	C	H	G	E	C	P	F	P	L	A	D	H	F	N	S	T	N	H	A	V	V	Q	T	L	V	N											
F	Y	C	S	G	A	C	Q	F	P	S	A	D	H	F	N	S	T	N	H	A	V	V	Q	T	L	V	N											
F	Y	C	S	G	A	C	Q	F	P	S	A	D	H	F	N	S	T	N	H	A	V	V	Q	T	L	V	N											
Y	Y	C	S	G	A	C	Q	F	P	S	A	D	H	F	N	S	T	N	H	A	V	V	Q	T	L	V	N											



FIG. 1-4

K	V	V	L	K	N	Y	Q	E	M	V	V	E	G	C	G	C	R	R
K	V	V	L	K	N	Y	Q	E	M	V	V	E	G	C	G	C	R	R
K	V	V	L	K	N	Y	Q	E	M	V	V	E	G	C	G	C	R	R
K	V	V	L	K	N	Y	Q	E	M	V	V	E	G	C	G	C	R	R
T	V	V	L	K	N	Y	Q	E	M	V	V	E	G	C	G	C	R	R
N	V	I	L	K	K	Y	R	N	M	V	V	R	A	C	G	C	H	
K	V	V	L	K	N	Y	Q	D	M	V	V	E	G	C	G	C	R	R
:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
N	V	V	L	K	V	Y	P	N	M	T	V	E	S	C	H	C	R	
N	I	I	K	K	D	I	Q	N	M	I	V	E	E	C	G	C	S	
N	I	V	K	R	D	V	P	N	M	I	V	E	E	C	G	C	A	
P	K	V	E	Q	L	S		N	M	I	V	R	S	C	K	C	S	
:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
I	S	A	H	H	V	P		N	M	V	A	T	E	C	G	C	R	
G	G	Y	S	F	K	Y	E	N	L	L	T	Q	H	C	A	C	I	
:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:
n,k	v,i	v,i	l	k,r	n,d,k*	y	g,e,p,r	n,d,e	m	v,i,t,a	v	e,d,r,k,	g,a,s,e	c	g,h	c	r,h,s,a,	

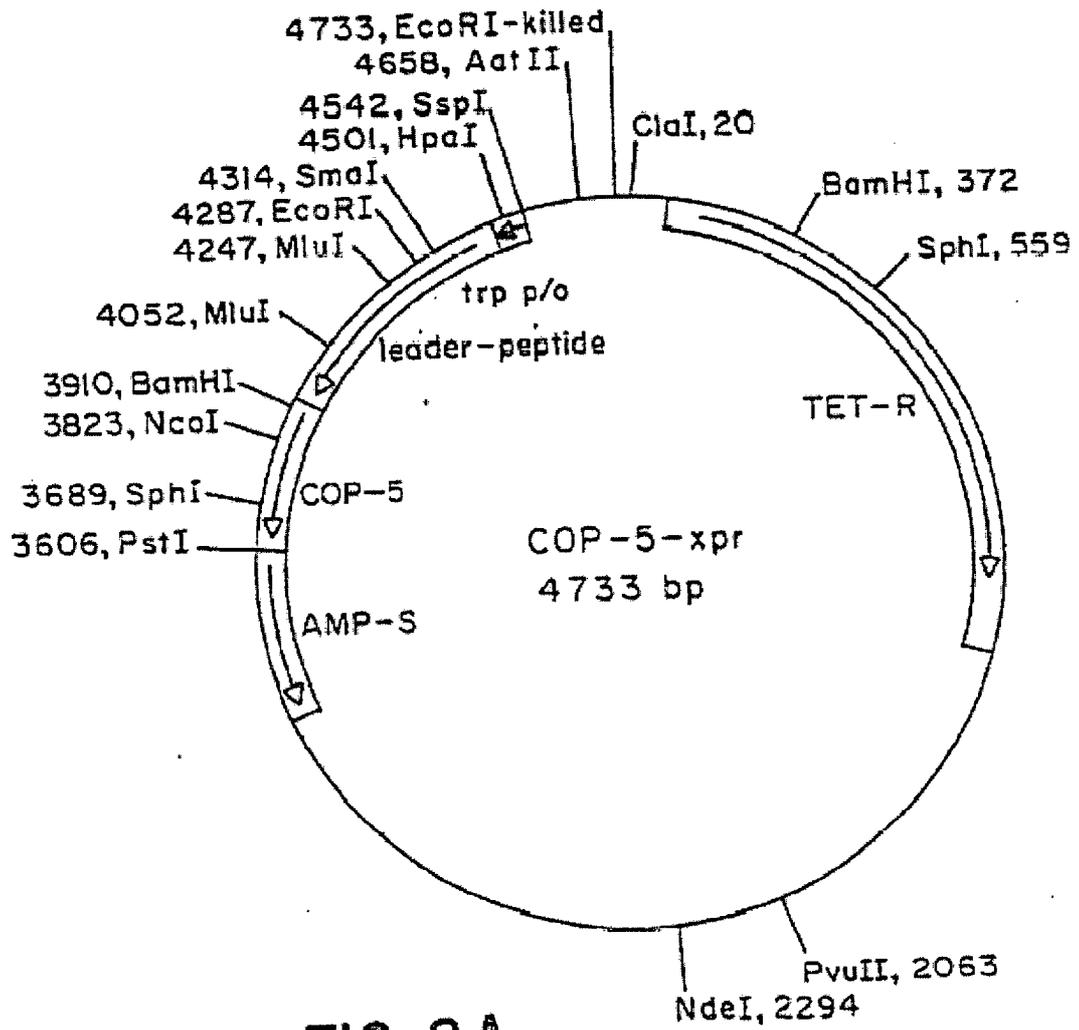


FIG. 2A





**FIG. 3A**

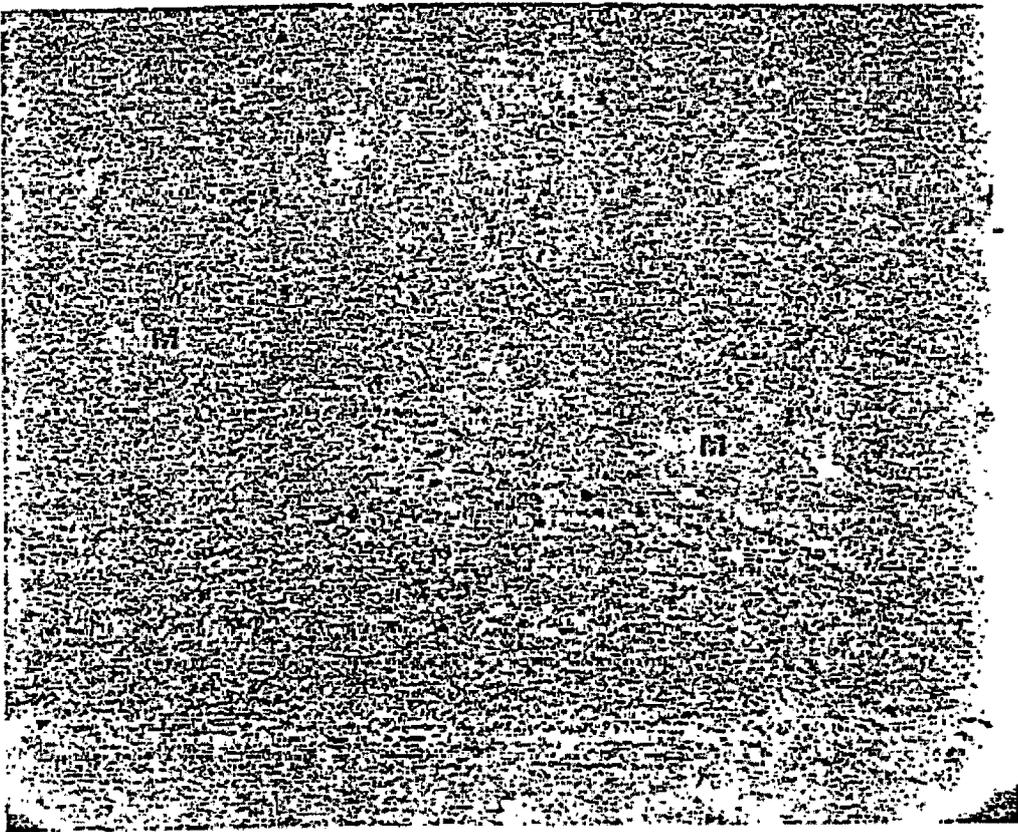


FIG. 3B



## FIG. 4

10                    20                    30                    40                    50  
 GATCCTAATGGGCTGTACGTGGACTTCCAGCGCGACGTGGGCTGGGACGA  
 D P N G L Y V D F Q R D V G W D D

60                    70                    80                    90                    100  
 CTGGATCATCGCCCCGTCGACTTCGACGCTACTACTGCTCCGGAGCCT  
 W I I A P V D F D A Y Y C S G A

110                    120                    130                    140                    150  
 GCCAGTTCCCCTCTGCGGATCACTTCAACAGCACCAACCACGCCGTGGTG  
 C Q F P S A D H F N S T N H A V V

160                    170                    180                    190                    200  
 CAGACCCTGGTGAACAACATGAACCCCGGCAAGGTACCCAAGCCCTGCTG  
 Q T L V N N M N P G K V P K P C C

210                    220                    230                    240                    250  
 CGTGCCACCGAGCTGTCCGCCATCAGCATGCTGTACCTGGACGAGAATT  
 V P T E L S A I S M L Y L D E N

260                    270                    280                    290                    300  
 CCACCGTGGTGCTGAAGAACTACCAGGAGATGACCGTGGTGGGCTGCGGC  
 S T V V L K N Y Q E M T V V G C G

310  
 TGCCGCTAACTGCAG  
 C R \*