

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
C12N 15/12  
A61K 37/02  
C07K 13/00

(45) 공고일자 1999년12월01일  
(11) 등록번호 10-0231640  
(24) 등록일자 1999년08월31일

(21) 출원번호	10-1995-0704837	(65) 공개번호	특 1996-0701997
(22) 출원일자	1995년11월02일	(43) 공개일자	1996년03월28일
번역문제출일자	1995년11월02일		
(86) 국제출원번호	PCT/US 94/05290	(87) 국제공개번호	WO 94/26893
(86) 국제출원일자	1994년05월12일	(87) 국제공개일자	1994년11월24일
(81) 지정국	EP 유럽특허 : 핀란드 네덜란드 OA OAPI특허 : 코트디부아르 국내특허 : 기네 오스트레일리아 브라질 캐나다 일본 북한 대한민국 노르웨이		

(30) 우선권주장 8/061695 1993년05월12일 미국(US)

(73) 특허권자 제네틱스 인스티튜트 인코포레이티드 토마스 제이 데스로저  
미합중국 매사추세츠 02140 캠브리지 캠브리지파크 드라이브 87제네틱스 인  
스티튜트 인코포레이티드 브루스 엠. 에이센

(72) 발명자 미합중국 매사추세츠 02140 캠브리지 캠브리지파크 드라이브 87  
안토니 제이. 셀레스트  
미합중국 매사추세츠 07149 허드슨 패카드 스트리트 86  
존 엠. 우즈니  
미합중국 매사추세츠 01749 허드슨 올드 볼튼 로오드 59

(74) 대리인 박해선, 윤여범

**심사관 : 김형준**

**(54) BMP-10 조성물**

**요약**

본 발명은 정제 BMP-10 단백질 및 그의 생산 방법에 관한 것이다. 또한, BMP-10 단백질을 코딩하는 DNA 분자도 기재되어 있다. 상기 단백질은 뼈 및 연골 결함의 치료 및 상처 치유 및 관련 조직 복구에 사용될 수 있다.

**명세서**

[발명의 명칭]

BMP-10 조성물

[발명의 상세한 설명]

본 발명의 BMP-10 조성물로 명명된 신규한 정제 단백질의 군, 이것을 코딩하는 DNA 및 이것을 얻는 방법에 관한 것이다. 상기 단백질을 사용하여 뼈 및/또는 연골 형성을 유발하고 상처를 치유하고 조직을 복구할 수 있다. 또한 상기 단백질을 사용하여 기타 뼈 형태형성 단백질의 활성을 증대시킬 수 있다.

[발명의 배경]

뼈 및 기타 조직 추출물내에 존재하며 뼈 및 연골-유발 활성의 원인이 되는 분자 또는 분자들에 대한 연구를 통해 뼈 형태형성 단백질(BMP)로 불리는 신규한 분자 세트를 발견하였다. BMP-1 ~ BMP-9로 명명된 몇몇 단백질 구조가 앞서 해명되었다. 이들 단백질의 독특한 유발 활성은 뼈내에 이 단백질이 존재한다는 것과 함께 이들 단백질이 뼈 복구 고정의 중요한 조절자이며 뼈 조직의 정상적인 유지관리에 관련있음을 시사한다. 이러한 과정에서 역할을 하는 부가적인 단백질이 존재하는지를 확인할 필요가 있다. 본 발명은 이러한 단백질의 동정에 관한 것으로 본 발명자들은 이를 BMP-10 으로 명명했다.

[발명의 요약]

[소 BMP-10 ]

소 BMP-10 DNA 서열 (서열 확인 번호 : 1) 및 아미노산 서열 (서열 확인 번호 : 2)는 서열 목록에 나열되어 있다. BMP-10 단백질은 연골, 뼈 또는 그의 조합물의 형성을 유발할 수 있다. BMP-10 단백질은 더 나아가 하기 서술되는 래트 (rat) 형성 검정에서 연골 및/또는 뼈 형성 활성을 나타내는 능력을 특징으로 한다.

소 BMP-10는 서열 확인 번호 : 1에 제시된 바의 뉴클레오티드 #779 ~ 뉴클레오티드 #1102로 구성되어 성

속 BMP-10 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 서열을 포함하는 DNA 서열로써 형질전환된 세포를 배양하고, 실질적으로 기타 단백질 물질이 동시에 생성되지 않으며 서열 확인 번호 : 2로 제시된 바의 아미노산 #1 ~ #108로 구성되는 아미노산 서열을 특징으로 하는 단백질을 배양 배지로부터 회수하고 정제함으로써 생산할 수 있다. 포유동물 세포에서의 생산을 위해, DNA 서열은 더 나아가 성숙 BMP-10 폴리펩티드를 코딩하는 누클레오티드 서열에 대해 프레임으로 결합되고 적당한 프로펩티드 5' 를 코딩하는 DNA 서열을 포함한다. 프로펩티드는 천연 BMP-10 프로펩티드일 수 있거나 TGF-β 상과의 또다른 단백질로부터의 프로펩티드일 수 있다.

사람 BMP-10는 소 BMP-10과 동일하리라고 예측된다. 따라서, 본 발명은 사람 BMP-10를 코딩하는 DNA 서열을 얻기 위한 방법, 상기 방법에 의해 얻은 DNA 서열 및 상기 DNA 서열에 의해 코딩된 사람 단백질을 포함한다. 상기 방법은 표준 기술을 사용하여 사람 유전자 또는 그의 코딩 서열 또는 단편에 대한 라이브러리를 스크리닝하기 위한 프로브를 고안하기 위한 소 BMP-10 누클레오티드 서열 또는 그의 부분의 사용을 포함한다. 사람 BMP-10 단백질(서열 확인 번호 : 3)의 DNA 서열 코딩부 및 상응하는 아미노산 서열(서열 확인 번호 : 4)는 본원에 나열되어 있다. 상기 서열은 또한 표준 기술을 통하여 완전한 사람 BMP-10 유전자 또는 코딩 서열을 얻기 위한 프로브를 고안하기 위해 사용될 수 있다. 사람 BMP-10은 또한 BMP-10 DNA 서열로써 형질전환된 세포를 배양하고 배양 배지로부터 BMP-10을 회수 및 정제함으로써 생산할 수 있다. 정제된 발현 단백질은 동시에 생산되는 기타 단백질 물질, 뿐만아니라 기타 오염물이 실질적으로 없다. 회수된 정제 단백질은 연골 및/또는 뼈 형성 활성을 나타낸다고 추측된다. 본 발명의 단백질은 더 나아가 하기 서술되는 래트 뼈 형성 검정에서 연골 및/또는 뼈 형성 활성을 나타내는 능력을 특징으로 한다.

본 발명의 또다른 특징은 제약학적으로 허용가능한 부형제 또는 담체내에 치료학적으로 유효량의 BMP-10 단백질을 함유하는 약학 조성물을 제공한다. 본 발명 BMP-10 조성물은 연골 형성에 사용될 수 있다. 이들 조성물은 또한 뼈의 형성에 사용될 수 있다. BMP-10 조성물은 또한 상처 치유 및 조직 복구에 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 미합중국 특허 제 5,108,922 호; 제 5,016,649 호; 제 5,116,738 호; 제 5,103,748호; 제5,187,076 호; 및 제 5,141,905호에 기재된 BMP 단백질들, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7; PCT 공개 W091/18098에 기재된 BMP-8; 및 PCT 공개 W093/00432에 기재된 BMP-9와 같은 적어도 하나 이상의 기타 치료학적으로 유용한 제제를 포함할 수 있다.

본 발명의 조성물은 BMP-10 단백질에 더하여 표피 성장 인자 (EGF), 섬유아세포 성장 인자 (FGF), 전환 성장 인자 (TGF-α 및 TGF-β) 및 인슐린-형 성장 인자 (IGF)와 같은 성장 인자를 포함하는 기타 치료학적으로 유용한 제제를 포함할 수 있다. 조성물은 또한 예컨대 조성물을 지지하고 뼈 및/또는 연골 성장을 위한 표면을 제공하기 위한 적당한 매트릭스를 포함할 수 있다. 매트릭스는 골유발 단백질의 느린 방출 및/또는 그의 표현을 위한 적당한 환경을 제공할 수 있다.

BMP-10 조성물은 다수의 뼈 및/또는 연골 장애, 치근막 질병 및 각종 유형의 상처의 치료 방법에 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 상기 방법은 상기 뼈 및/또는 연골 형성, 상처 치유 또는 조직 복구를 필요로 하는 환자에게 유효량의 BMP-10 단백질을 투여하는 것을 포함한다. 또한 상기 방법은 상기 서술된 공유된 출원에 기재된 신규한 BMP 단백질을 중 하나 이상과 함께 본 발명의 단백질을 투여하는 것을 포함한다. 게다가, 상기 방법은 또한 EGF, FGF, TGF-α, TGF-β 및 IGF를 포함하는 기타 성장 인자와 함께 BMP-10 단백질의 투여를 포함할 수 있다.

본 발명의 또다른 측면은 BMP-10 단백질의 발현을 코딩하는 DNA 서열이다. 상기 서열은 서열 확인 번호 : 1 또는 서열 확인 번호 : 10에 예시된 5' 에서 3' 방향의 누클레오티드 서열, 유전자 코드의 변형을 제외하고 DNA 서열 서열 확인 번호 : 1 또는 서열 확인 번호 : 10과 동일하고 서열 확인 번호 : 2 또는 서열 확인 번호 : 11의 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 포함한다. 본 발명에 연골 및/또는 뼈의 형성을 유발하는 능력을 갖는 단백질을 코딩하고 서열 확인 번호 : 1 또는 서열 확인 번호 : 10의 DNA 서열과 엄격한 조건하에 하이브리다이제이션 (hybridization)하는 DNA 서열도 또한 포함한다. 바람직한 DNA 서열은 엄격한 조건하에 하이브리다이제이션하는 것을 포함한다[참조, T.Manatis et al, 분자 클로닝 (실형실 매뉴얼), Cold Spring Harbor Laboratory (1982), 페이지 387 ~ 389]. 마지막으로 상기 누클레오티드 변화가 펩티드 서열의 변화를 초래하더라도 펩티드 서열이 여전히 BMP-10 활성을 가진다면 서열 확인 번호 : 1 또는 서열 확인 번호 : 10의 서열의 대립 또는 기타 변이체도 또한 본발명에 포함한다.

본 발명 부가적인 측면으로 발현 제어 서열과 함께 작용하는 상기 서술된 바의 DNA 서열을 포함하는 벡터를 포함한다. 상기 벡터는 발현 제어 서열과 함께 작용하는 BMP-10 단백질을 코딩하는 DNA 서열로써 형질전환된 세포계를 적당한 배양 배지 내에서 배양하고 BMP-10 단백질을 그로부터 회수 및 정제하는, 본 발명의 BMP-10 단백질의 신규한 생산 방법에 사용될 수 있다. 상기 방법은 폴리펩티드의 발현을 위한 숙주 세포로서 원핵 세포 및 진핵세포 모두의 공지된 다수의 세포를 사용할 수 있다.

상기 벡터들은 유전자 치료 용도에 사용될 수 있다. 이러한 용도에서, 벡터를 생체외에서 환자의 세포내로 트랜스펙션 (transfection)시켜 세포를 환자에게 재도입시킬 수 있다. 대안적으로, 벡터를 목표하는 트랜스펙션을 통해 새체내에서 환자에게 도입시킬 수 있다.

#### [서열의 서술]

서열 확인 번호 : 1은 클론 λ7r-20으로부터 유래된 소 BMP-10의 일부를 코딩하는 누클레오티드 서열이다.

서열 확인 번호 : 2는 성숙 소 BMP-10 폴리펩티드를 포함하는 아미노산 서열이다.

서열 확인 번호 : 3은 사람 BMP-10의 부분적인 누클레오티드 서열이다.

서열 확인 번호 : 4는 사람 BMP-10 폴리펩티드에 대한 부분적인 아미노산 서열이다.

서열 확인 번호 : 5 및 6은 사람 BMP-10 또는 기타 BMP-10 단백질을 단리하는데 사용되는 소 BMP-10에 대한 프라이머이다.

서열 확인 번호 : 7는 복제의 SV40 원천 근처에서 XhoI 인식 부위를 추가하기 위해 pMT2 CXM 내로 삽입되

는 DNA 서열이다.

서열 확인 번호 : 8은 DHFR 유전자로부터 상류에 XhoI 인식 부위를 삽입하기 위해 pMT21 내로 삽입되는 DNA 서열이다.

서열 확인 번호 : 9는 EMC 바이러스 리더 서열의 일부를 구성하는 DNA 서열이다.

서열 확인 번호 : 10은 cDNA 클론 HFL-3 및 게놈 클론 20GEN.3으로부터 유래된, 뉴클레오티드 #160 ~ #1107에서의 완전한 프로펩티드, 및 #1108 ~ #1431에서의 성숙 폴리펩티드를 포함하는 완전 사람 BMP-10 단백질을 코딩하는 DNA 서열이다.

서열 확인 번호 : 11은 서열 확인 번호 : 10에 의해 코딩된 아미노산 서열이다.

[발명의 상세한 설명]

[BMP-10]

소 BMP-10 뉴클레오티드 서열 (서열 확인 번호 : 1) 및 코딩된 아미노산 서열 (서열 확인 번호 : 2)은 본원의 서열 목록에 기재되어 있다. 성숙 소 BMP-10 단백질 코딩 서열은 뉴클레오티드 #779에서 시작하여 뉴클레오티드 #1102를 통하여 계속된다. 본 발명의 정제된 소 BMP-10 단백질은 뉴클레오티드 #167 ~ #1102로부터 또는 뉴클레오티드 #779 ~ #1102로부터의 서열 확인 번호 : 1의 DNA 코딩 서열을 포함하는 DNA 서열로써 형질전환의 숙주 세포를 배양하고 서열 확인 번호 : 2의 아미노산 #204 ~ #108 또는 #1 ~ #108로 표현된 바의 아미노산 서열 또는 그와 실질적으로 동일한 서열을 함유하는 단백질을 배양 배지로부터 회수 및 정제함으로써 생산된다. 숙주 세포는, 성숙 BMP-10 단백질에 대한 코딩 서열에 적당한 해독 프레임으로 연결되고, 숙주 세포에 의한 단백질의 분비에 적당한 프로펩티드를 코딩하는 코딩 서열로써 형질전환될 수 있다. 예컨대, BMP-2 외의 포유동물 단백질의 전구체 부분을 코딩하는 DNA가 성숙 BMP-2 단백질을 코딩하는 DNA에 융합된 미합중국 특허 제 5,168,050 호 참조, 이 기재물은 본원에 참고로 병합된다. 따라서, 본 발명은 BMP-10 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 서열에 정확한 해독 프레임으로 결합된, BMP-10의 단백질들의 TGF- $\beta$  상과의 구성원으로부터의 프로펩티드를 코딩하는 DNA 서열로 구성되는 키메라 DNA 분자를 포함한다. “키메라”라는 용어는 프로펩티드가 BMP-10와 상이한 폴리펩티드로부터 유래됨을 나타내는데 사용된다.

본 발명의 사람 BMP-10 서열은 프로브로서 소 BMP-10 DNA 서열의 전체 또는 단편, 또는 서열 확인 번호 : 3의 부분적인 사람 BMP-10 서열을 사용하여 얻는다. 따라서, 사람 BMP-10 DNA 서열은 서열 확인 번호 : 3의 뉴클레오티드 #30 ~ #167의 DNA 서열을 포함한다. 사람 BMP-10 DNA 서열의 부분적인 서열은 서열 확인 번호 : 1에 제시된 소 BMP-10 DNA 서열의 #889 ~ #1036에 매우 상응한다. 사람 BMP-10 단백질은 서열 확인 번호 : 4의 아미노산 #1 #46의 서열을 포함한다.

CHO 세포와 같은 포유동물 세포에 의해 발현되는 BMP-10는 N-말단의 변화에 따라 BMP-10 단백질의 활성 중의 이중 집단으로서 존재한다고 예측된다. 활성종은 서열 확인 번호 : 1의 아미노산 #7에서의 시스테인 잔기로 시작하는 아미노산 서열로 이루어지거나, N-말단 방향으로 부가적으로 아미노산 서열을 더 포함할 것이라고 예측된다. 따라서, 활성 BMP-10 단백질을 코딩하는 DNA 서열은 서열 확인 번호 : 1의 뉴클레오티드 #779 또는 #797 ~ #1102 또는 서열 확인 번호 : 10의 뉴클레오티드 #1108 또는 #1126 ~ #1431로 구성되는 뉴클레오티드 서열을 포함할 것이라고 예측된다.

사람 BMP-10의 N-말단은 다음과 같이 이.콜라이 (E. coli)내에서의 발현에 의해 실험적으로 측정했다. [M]NAGNYXKRTPLYIDFKEI, 여기서 X는 그 위치에서 시스테인 잔기와 일치하는 명확한 시그널을 갖지 않는 아미노산을 나타낸다. 따라서, BMP-10의 상기 중의 N-말단은 서열 확인 번호 : 1 또는 서열 확인 번호 : 10의 아미노산 #1에서 인 듯하고 상기 BMP-10종을 코딩하는 DNA 서열은 서열 확인 번호 : 1의 #779 ~ #1102 또는 서열 확인 번호 : 10의 #1108 ~ #1431인 듯하다. 사람 약티빈 WC 또는머의 겔보기 분자량은 SDS-PAGE에 의해 측정하여 Novex 16% 트리신 겔 상에서 대략 10-12 kd이었다. Finnigan TSQ 7000 상에서 전자분무 이온화 질량 분광계에 의한 단량체의 분자량은 12292.50이다. 사람 BMP-10 단백질은 0.1 % 삼불화아세트산 내 맑은 무색 용액으로 존재한다.

배양 배지로부터 회수된 BMP-10 단백질은 동시에 생산되는 기타 단백질성 물질 및 기타 존재하는 오염물로부터 상기 단백질은 단리함으로써 정제한다. BMP-10 단백질은 예컨대 하기 서술된 래트 뼈 형성 검정에서 연골 및/또는 뼈의 형성을 유발할 수 있는 능력을 특징으로 할 수 있다.

본원에 제공되는 BMP-10 단백질은 또한 서열 확인 번호 : 1의 서열과 유사하나, 이에 자연적으로 변형이 주어지거나 (예컨대, 폴리펩티드내 아미노산의 변화를 초래할 수 있는 뉴클레오티드 서열에서의 대립 유전자 변이) 신중히 조작된 서열에 의해 코딩된 인자들을 포함한다. 예컨대 합성 폴리펩티드는 서열 확인 번호 : 2의 아미노산 잔기의 연속 서열을 전부 또는 부분적으로 복제할 수 있다. 상기 서열들은 서열 확인 번호 : 2의 뼈 성장 인자 폴리펩티드와 일치, 이차 및 삼차의 구조 특징 및 배좌 특징을 공유하므로 공통적으로 뼈 정성 인자 생물학적 성질을 가질 수 있다. 따라서, 상기 서열들은 치료 과정에서 자연-발생 BMP-10 및 기타 BMP-10 폴리펩티드에 대한 생물학적 활성 대체물로서 사용될 수 있다.

본원에 서술된 BMP-10 서열의 기타 특이적 변이는 글리코실화 부위의 변형을 포함한다. 상기 변형은 O-결합 또는 N-말단 글리코실화 부위를 포함한다. 예컨대, 글리코실화 또는 단지 부분적 글리코실화의 부재는 아스파라긴-결합 글리코실화 인식 부위에서의 아미노산 치환 또는 결실로부터 초래된다. 아스파라긴-결합 글리코실화 인식 부위는 적당한 세포 글리코실화 효소에 의해 특이적으로 인식되는 트리펩티드 서열로 이루어진다. 상기 트리펩티드 서열은 아스파라긴-X-트레오닌 또는 아스파라긴-X-세린 (여기서 X는 보통 임의 아미노산임)중 하나이다. 글리코실화 인식 부위에 제1 또는 제3아미노산 위치 중 하나 또는 모두에게서 다양한 아미노산 치환 또는 결실 (및/또는 제2위치에서의 아미노산 결실)은 변형된 트리펩티드 서열에서 글리코실화를 초래하지 않는다. 게다가, BMP-10의 박테리아 발현은 글리코실화 부위가 변형되지 않은 채로 남아 있더라도 비-글리코실화 단백질의 생산을 초래할 것이다.

본 발명은 또한 BMP-10 단백질의 발현을 코딩하며 기타 단백질성 물질을 코딩하는 DNA 서열과 관련이 없는

신규한 DNA 서열을 포함한다. 상기 DNA 서열은 서열 확인 번호 : 1에서 5' 에서 3' 방향으로 묘사된 것들, 및 엄격한 하이브리다이제이션 조건 하에 [예컨대, 65 °C에서의 0.1X SSC, 0.1% SDS; 참조 T.Maniatis et al, Molecular Cloning (실험실 매뉴얼), Cold Spring Harbor Laboratory (1982), 페이지 387 ~ 389)] 그에 하이브리다이제이션되고 연골 및/또는 뼈 유발 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 서열을 포함한다. 상기 DNA 서열은 또한 서열 확인 번호 : 2의 DNA 서열 및 엄격한 하이브리다이제이션 조건하에서 거기에 하이브리다이제이션하고 연골 및/또는 뼈 유발 활성을 갖는 단백질을 코딩하는 서열들을 포함한다.

유사하게, 서열 확인 번호 : 1의 서열에 의해 코딩되는 BMP-10 단백질, 또는 서열 확인 번호 : 2의 아미노산 서열로 이루어지는 BMP-10 단백질을 코딩한, 유전자 코드의 변성 또는 대립 유전자 변이 (아미노산 변화를 초래하거나 하지않는 중 집단에서 자연-발생하는 염기 변화) 로 인하여 코돈 서열이 상이한 DNA 서열도 또한 본원에 서술된 신규한 인자를 코딩한다. 코딩된 폴리펩티드의 활성, 반감기 또는 생산을 증진시키기 위해 (삽입, 결실 및 치환을 포함하여) 점 변이에 의해 또는 유도 변형에 의해 야기되는 서열 확인 번호 : 1 또는 서열 확인 번호 : 3의 DNA 서열에서의 변이도 또한 본원에 포괄된다.

본 발명의 또다른 측면은 BMP-10 단백질 생산을 위한 신규한 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 공지된 조절 서열의 제어하에 본 발명 BMP-10 단백질을 코딩하는 DNA 서열로써 형질전환시킨 적당한 세포계를 배양하는 것을 포함한다. 형질전환된 숙주 세포를 배양하고 배양 배지로부터 BMP-10 단백질을 회수하고 정제한다. 정제된 단백질은 기타 오염물 및 동시에 생산되는 기타 단백질이 실질적으로 없다.

적당한 세포 또는 세포계는 예컨대 차이나이즈 햄스터 난소 세포 (CHO)와 같은 포유동물 세포이다. 적당한 포유동물 숙주 세포의 선택 및 형질전환, 배양, 증폭, 스크리닝, 생산물 생산 방법은 당업계에 공지되어 있다. 참조, 예컨대, Gething and Sanbrook, Nature, 293:620-625 (1981), 또는 대안적으로, Kaufman et Mol. Cell. Biol., 5(7):1750-1759 (1985) 또는 Howey et al, 미합중국 특허 제 4,419,446 호. 또다른 적당한 포유동물 세포계는 첨부된 실시예에 서술된 원숭이 COS-1 세포계이다. 포유동물 세포 CV-1도 또한 적당할 수 있다.

박테리아 세포도 또한 적당한 숙주이다. 예컨대, 다양한 이 콜라이 균주 (예컨대 HB101, Mc1061)가 생명공학 숙주세포로서 널리 공지되어 있다. 다양한 비. 서브틸러스 (B. subtilis), 슈도모나스 (Pseudomonas), 기타 바실러스 등도 또한 이 방법에 사용될 수 있다. 박테리아 세포내에서 단백질을 발현시키기 위해서 BMP-10의 프로펩티드를 코딩하는 DNA가 필수적인 것은 아니다.

당업자들에게 공지된 많은 효모세포 균주도 또한 본 발명의 폴리펩티드의 발현을 위한 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 게다가, 원하는 경우에는 본 발명의 방법에서 숙주 세포로서 곤충 세포도 사용할 수 있다. 참조, 예컨대 Miller et al, Genetic Engineering, 8:227-298 (Plenum Press 1986) 및 본원에 언급된 참고문헌.

본 발명의 또다른 측면은 상기 신규한 BMP-10 폴리펩티드의 발현 방법에 사용하기 위한 벡터를 제공하는 것이다. 바람직하게 벡터는 본 발명의 신규한 인자를 코딩하는 상기 서술된 바의 완전한 신규 DNA 서열을 함유한다. 게다가, 벡터는 BMP-10 단백질 서열의 발현을 허용하는 적당한 발현 제어 서열을 함유한다. 대안적으로, 상기 서술된 바의 변형된 서열을 통합한 벡터도 또한 본 발명의 실시양태이다. 게다가, 서열 확인 번호 : 1의 서열 또는 BMP-10 단백질을 코딩하는 기타 서열은 BMP-10을 코딩하는 프로펩티드 서열을 결실시키고 이를 기타 BMP 단백질의 완전한 프로펩티드를 코딩하는 서열 또는 TGF-β 상과의 구성원으로 대체함으로써 성숙 BMP-10 단백질을 발현하도록 조작될 수 있다. 따라서, 본 발명은 BMP-10 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 서열에 정확한 핵도 프레임으로 결합된 TGF-β 상과의 구성원으로부터의 프로펩티드를 코딩하는 키메라 DNA 분자를 포함한다.

벡터는 세포계의 형질전환 방법에 사용될 수 있고 선택된 숙주세포에서 복제 및 그의 발현을 지지할 수 있는 본 발명의 DNA 코딩 서열과 연관되어 작용되는 선택된 조절 서열을 함유할 수 있다. 상기 벡터에 대한 조절 서열은 당업자들에게 공지되어 있고 숙주 세포에 따라 선택될 수 있다. 이러한 선택은 일상적인 것이고 본 발명의 일부를 이루는 것은 아니다.

뼈가 정상적으로 형성되지 않는 상황하에서 연골 및/또는 뼈 형성을 유발하는 본 발명의 단백질은 사람 및 기타동물에 있어 뼈 손상 및 연골 골절의 치유에 용도가 있다. 이러한 BMP-10 단백질을 사용하는 제제는 폐쇄 골절 및 개방 골절 복원 및 또한 인공 무릎의 개선된 고정에 예방 용도가 있다. 골유도제에 의해 유발된 새로운 뼈 형성은 선천성 외상 유발 또는 종양성 절제 유발된 두개안면의 결손을 복원하는데 기여하며 또한 화상 성형외과 수술에 유용하다. BMP-10 단백질은 치근막 질병의 치료 및 기타 치아 복원 고정 에 사용될 수 있다. 상기 제제는 뼈 형성 세포를 유발하는 환경을 제공하거나 뼈 형성 세포의 성장을 촉진하거나 뼈 형성 세포의 선조의 분화를 유발할 수 있다. 본 발명의 BMP-10 폴리펩티드는 또한 골다공증의 치료에 유용하다. 다양한 골유발성 연골-유발 및 뼈 유발 인자가 서술되었다. 참고, 예컨대 유럽 특허 출원 제 148,155 호 및 제 169,016호.

본 발명의 단백질은 또한 상처 치유 및 관련 조직 복원이 사용될 수 있다. 상처의 유형은 화상, 절개 및 궤양을 포함하나 이에 제한되지 않는다. (참조, 예컨대 상처 치유 및 관련 조직 복원에 대한 논의에 대해서는 PCT 공개 W084/01106).

본 발명의 부가적인 측면은 골절 및 연골 및/또는 뼈 결손 또는 치근막 질병에 관련된 기타 조건에 대한 치료 방법 및 조성물이다. 본 발명은 부가적으로 상처 치유 및 조직 복원을 위한 치료법 및 조성물을 포함한다. 상기 조성물은 혼합물로 치료 유효량의 본발명 BMP-10 단백질 하나 이상 및 제약학적으로 허용가능한 부형제, 단체 또는 매트릭스루 구성된다.

본 발명의 단백질은 기타 관련 단백질 및 성장 인자들과 제휴하거나 아마도 상승적으로 작용할 것이라고 예측된다. 따라서 본 발명의 부가적인 치료법 및 조성물은 치료량의 본발명 BMP-10 단백질 하나 이상과 치료량의, 상기 서술된 출원에 기재된 기타 BMP 단백질 하나 이상으로 구성된다. 상기 배합물은 다른 BMP 단백질 분자 또는 상이한 BMP 부분으로 구성된 이종분자를 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 방법 및 조성물은 BMP-10 단백질 서브유닛 및 상기 서술된 "BMP" 단백질 중의 하나로부터의 서브유닛으로 이

루어진 이황화물 결합된 이량체를 포함한다. 따라서, 본 발명은 한 서브유니트는 최소한 서열확인번호 : 2의 아미노산 #1 ~ 아미노산 #108 으로부터의 아미노산 서열을 포함하고, 한 서브유니트는 BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, 및 BMP-9로 구성되는 군으로부터 선택된 뼈 형태형성 단백질에 대한 아미노산 서열을 포함하는 이종이량체인 정제 BMP-10 폴리펩티드를 포함한다. 추가적인 실시양태는 BMP-10 부분의 이종이량체를 포함할 수 있다. 더 나아가 BMP-10 단백질은 뼈 및/또는 연골 결손, 상처 또는 해당 조직의 치료에 유리한 기타 제제와 배합할 수 있다. 상기 제제들은 표피 성장 인자(EGF), 섬유아세포 성장 인자 (FGF), 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF), 전환 성장 인자 (TGF- $\alpha$  및 TGF- $\beta$ ), k-섬유아세포 성장 인자 (kFGF), 파라티로이드 호르몬 (PTH), 백혈병 억제 인자 (LIF/HILDA/DIA), 인슐린형 성장 인자 (IGF-I 및 IGF-II)와 같은 각종 성장 인자를 포함한다. 상기 제제들의 부분도 또한 본 발명의 조성물에 사용될 수 있다.

pH, 등장성, 안정성 등에 대한 한계를 갖는 상기 약리학적으로 허용가능한 단백질 조성물의 제조 및 배합은 당업계의 기술에 해당한다. 또한 치료학적 조성물은 BMP 단백질내에 종 특이성의 결여로 인해 수의학적인 용도에 가치가 있다. 사람에게 더하여 특히 가축 및 순종 말도 본 발명의 BMP-10 단백질을 사용한 이러한 치료에 대한 환자로서 바람직하다.

치료법은 이식물 또는 장치로서 국부적으로, 조직적으로 또는 지역적으로 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 투여시에, 본 발명에 사용하기 위한 치료 조성물은 물론 발열물질이 없는 약리학적으로 허용가능한 형태이다. 더 나아가, 조성물은 바람직하게 뼈, 연골 또는 조직 손상 부위에 운반하기 위한 점성 형태로 주사시키거나 캡슐화시킬 수 있다. 국부 투여도 상처 치유 및 조직 복구에 적당하다. 또한 상기 서술된 바의 조성물에 임의로 포함될 수 있는 BMP-10 단백질 외의 치료학적으로 유용한 제제는 대안적으로 또는 추가로 본 발명의 방법에서 BMP 조성물과 함께 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

바람직하게 뼈 및/또는 연골 형성에 있어, 조성물은 BMP-10 또는 기타 BMP 단백질을 뼈 및/또는 연골 손상 부위에서 운반하고 뼈 및 연골의 발육 구조를 제공할 수 있고 최적으로 신체에 흡수될 수 있는 매트릭스를 포함한다. 상기 매트릭스는 BMP-10 및/또는 기타 뼈 유발 단백질의 느린 방출, 및 적당한 출현 및 세포 침윤의 위한 적당한 환경을 제공할 것이다. 상기 매트릭스는 기타 인식된 의료 적용물에 현재 사용되는 재료로 형성될 수 있다.

매트릭스 재료의 선택은 생적합성, 생분해성, 기계적 성질, 화장외관 및 상호작용 성질에 근거한다. BMP-10 조성물의 특정 용도는 특정 배합물을 한정할 것이다. 조성물에 대한 효능있는 매트릭스는 생분해가능하고 화학적으로 형성된 황산칼슘, 트리칼슘포스페이트, 히드록시아파타이트, 폴리락트산 및 다중무수물일 수 있다. 기타 효능있는 물질은 뼈 또는 피부 콜라겐과 같은 생분해성이고 생물학적으로 잘 형성된다. 추가적인 매트릭스는 순수한 단백질 또는 세포외 매트릭스 성분들을 포함한다. 기타 효능있는 매트릭스는 소성 히드록시아파타이트, 바이오글래스, 알루미늄이트 또는 기타 세라믹과 같은 비생분해성이고 화학적으로 형성될 수 있다. 매트릭스는 폴리락트산 및 히드록시아파타이트 또는 콜라겐 및 트리칼슘포스페이트와 같이 상기 언급된 유형의 물질들중 임의의 조합물로 구성될 수 있다. 바이오세라믹은 칼슘-알루미늄이트-포스페이트에서와같이 조성물내에서 변형되어 기공 크기, 입자 크기, 입자 형상 및 생분해성이 변형되도록 가공될 수 있다.

투여량 규제는 BMP-10 단백질의 작용을 변형하는 다양한 인자, 예컨대 형성하고자 하는 뼈의 양, 뼈 손상 부위, 손상된 뼈의 상황, 상처의 크기, 손상된 조직의 유형, 환자의 나이, 성별 및 식이요법, 임의 감염의 엄격도, 투여 시간 및 기타 임상적인 인자들을 고려하여 담당 의사가 결정할 것이다. 투여량은 재구성 시에 사용되는 매트릭스의 유형 및 조성물내 BMP 단백질의 유형에 따라 변할 것이다. 예컨대 IGF I (인슐린형 성장인자 I)와 같은 기타 공지된 성장 인자를 최종 조성물에 첨가하는 것도 또한 투여량에 영향을 미칠 수 있다.

뼈 성장 및/또는 복원의 주기적인 평가에 의해 진전을 감지할 수 있다. 진전은 예컨대, X-선, 조직형태학적 측정, 및 테트라사이클린라벨링으로 감지할 수 있다.

하기 실시예는 본 발명의 실행을 예시하며, 소 BMP-10 단백질을 회수 및 특정하고 이를 사용하여 사람 및 기타 BMP-10 단백질을 회수하고 사람 단백질을 얻고 재조합 기술에 단백질을 발현시킨다.

[실시예 1]

[소 BMP-10 ]

벡터  $\lambda$ EMBL3 내에 구성된 소 게놈 라이브러리의 800,000 개 재조합체를 100 개 평판 상에 평판 당 8000 개 재조합 박테리오파지 플라크의 밀도로 도포시킨다. 재조합 박테리오파지 플라크의 이중 니트로셀룰로스 리플리카 (replica)를 상기 평판들로부터 제조하고 증폭시킨다. 누클레오티드 #1081 ~ #1403 (제4도, 미합중국 특허 제 5,141,905 호)에 상응하는 사람 BMP-7 DNA의 단편은 Feinberg 일행의 랜덤 프라이밍 절차에 의해  $^{32}$ P-라벨링시키고 [Anal. Biochem. 132:6-13 (1983)] 60°C에서 2 ~ 3 일 동안 표준 하이브리다이제이션 완충액 (5X SSC, 0.1% SDS, 5X 덴하르트, 100  $\mu$ g/ml 연어 정자 DNA) (3HB)내에서 한 세트의 필터에 하이브리다이제이션 시킨다. 엄격도가 감소된 조건 (60 °C에서 4X, SSX, 0.1% SDS) 하에서 필터를 세척시킨다. 다수의 양성 하이브리다이제이션된 재조합체에 주목한다. 52개의 양성 하이브리다이제이션 재조합 박테리오파지 플라크를 선택하고 이차 재조합을 위해 재도포시킨다. 재조합 플라크의 이중 니트로셀룰로스 리플리카를 52 개 이차 평판으로부터 제조하고 증폭시킨다.

한 세트의 니트로셀룰로스 필터를 상기 서술된 바의 사람 BMP-7 DNA 프로브에 하이브리다이제이션시키고 상기 엄격도가 감소된 조건하에서 세척시킨다. 나머지 세트의 필터를 65 °C에서 밤새도록 SHB 에서 혼합 BMP-5, BMP-6, BMP-7 프로브에 하이브리다이제이션시키고 65 °C에서 0.1X SSC, 0.1% SDS로 세척시킨다. (엄격한 하이브리다이제이션 및 세척 조건). 혼합된 프로브는 비교적 동일량의 사람 BMP-5 서열의 #1452 ~ #2060 (제4도, 미합중국 특허 제 5,106,748 호), 사람 BMP-6 서열의 누클레오티드 #1395 ~ #1698 (제4도, 미합중국 특허 제 5,187,076 호) 및 사람 BMP-7 서열의 누클레오티드 #1081 ~ #1403 (제4도, 미합중국 특허 제 5,141,905 호)로 구성되는  $^{32}$ P-라벨링된 DNA 단편으로 구성된다. BMP-5, BMP-6 및 BMP-7

DNA 단편은 랜덤 프라이밍 절차에 의해 <sup>32</sup>P-라벨링시키고 각각의 프로브의 분당 계수치 (cpms) 각각의 숫자를 합하고 52 개의 2 차 평판의 다른 니트로셀룰로스 필터 리플리카 세트를 함유하는 SHB에 첨가한다.

염격도가 감소된 조건하에서 사람 BMP-7 프로브에 대해 양성으로 하이브리다이제이션되고 매우 엄격한 조건하에서 혼합 BMP-5/6/7 프로브에 대해 약한 하이브리다이제이션을 나타내거나 하이브리다이제이션을 나타내지 않는 14 개 재조합체를 부가적인 분석을 위해 선택한다. 상기 하이브리다이제이션 특성을 나타내는 모두 14 개 재조합체를 플라크 정제시키고 박테리오파지 DNA를 각각으로부터 제조한다.  $\lambda$ 7r-20으로 명명된, 재조합체중 하나의 양성 하이브리다이제이션 영역을 0.5 kb EcoRI/HindIII 제한 단편에 국재시킨다. 상기 단편을 플라스미드 벡터 (pGEM-3) 내로 2차 클로닝시키고 DNA 서열 분석을 수행한다. 부분적인 DNA 서열 (서열 확인 번호 : 1) 및 클론  $\lambda$ 7r-20의 유래된 아미노산 서열 (서열 확인 번호 : 2)은 서열 목록에 도시되어 있다.

박테리오파지  $\lambda$ 7r-20을 1993 년 4 월 23 일에 매릴랜드주 20852 록빌시 카프러언 드라이브 12301에 소재하는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션에 기탁하고 수탁 번호 ATCC 75452를 받았다. 이러한 기탁을 특허 절차를 위한 미생물 기탁에 관한 국제 조약의 요건 및 그의 규정에 부합한다.

상기  $\lambda$ 7r-20 클론은 본 발명의 소 BMP-10 단백질의 적어도 한 부분을 코딩한다. 클론  $\lambda$ 7r-20의 누클레오티드 서열은 서열 확인 번호 : 1의 #165 ~ #1102에 의해 한정되는 바의 938 bp 이상의 전사해독 프레임 을 함유한다 (#165 - 166은 인트론에 의해 차단된 코돈의 마지막 3분의 2 이다). 전사 해독 프레임은 BMP-10 단백질의 적어도 312 개 아미노산을 코딩한다. 이 코딩된 312 개 아미노산 BMP-10 단백질은 완전한 성숙 소 BMP-10 단백질 (서열 확인 번호 : 2의 아미노산 #1 ~ #108), 및 제1번역 생산물의 폴리펩티드 영역의 C-말단 부분 (서열 확인 번호 : 2의 아미노산 #-204 ~ #-1)을 포함한다. #165 ~ #1102에서의 BMP-10 코딩 서열 바로 앞의 컨센서스 스플라이스 수용체 (consensus splice acceptor) 및 프레임내의 위치 #101 ~ #103에서의 종지 코돈을 누클레오티드 #165의 5' 방향으로 인트론 서열이 존재함을 시사한다.

기타 BMP 단백질 및 TGF- $\beta$  과내의 기타 단백질에 대한 지시에 근거하여 전구체 폴리펩티드 ARG-X-X-ARG의 추정된 컨센서스 단백질분해 프로세싱 서열과 일치하는 다중 염기 서열 ARG-ILE-ARG-ARG에서 분열될 것이다. BMP-10 전구체 폴리펩티드의 분열은 위치 #1에서의 아미노산 ASN에서 시작하는 108개 아미노산 성숙 펩티드를 발생시킬 것이라고 예측된다. 성숙 형태대로 BMP-10의 프로세싱은 이량체화 및 관련 단백질 TGF- $\beta$  의 프로세싱과 유사한 방식으로 N-말단 영역의 제거를 수반할 것 이라고 예측된다 [Gentry et al., Molec. & Cell. Biol., 8:4162 (1988); Derynck et al., Nature, 316:701 (1985)]

따라서 BMP-10의 성숙 활성종은 각각의 서브유니트가 약 12,000 달톤의 예측 분자량을 갖는 아미노산 #1 ~ #108으로 구성되는 두개의 폴리펩티드 서브유니트의 동종이량체로 구성된다. 부가적인 활성종은 아미노산 #7 ~ #108으로 구성된다고 사료되며 이로써 제1보존 시스테인 서열을 포함한다. 단백질의 BMP 및 TGF- $\beta$  과의 기타 구성원들에 대하여 BMP-10 단백질의 카르복시-말단 영역이 아미노산 말단 영역이 많을 수록 더 큰 서열 보존을 나타낸다. TGF- $\beta$  과내 기타 단백질 및 기타 사람 BMP 단백질에 상응하는 영역에 대한 시스테인-풍부 C-말단 영역 (아미노산 #7 ~ #108) 내 소 BMP-10 단백질의 아미노산 동일도 퍼센트는 다음과 같다: BMP-2, 56%; BMP-3, 39%; BMP-4, 54%; BMP-5, 48%; BMP-6, 48%; BMP-7, 47%; BMP-8, 46%; BMP-9, 67%; Vgl, 50%; GDF-1, 40%; TGF- $\beta$  1, 37%; TGF- $\beta$  2, 37%; TGF- $\beta$  3, 37%; 인히빈  $\beta$  (B), 36%; 인히빈  $\beta$  (A), 39%

[실시예 2]

[사람 BMP-10 ]

소 및 사람 뼈유발 인자 유전자는 유의하게 동종이라고 추정되며, 따라서 소 코딩 서열 또는 그의 부분은 사람 게놈 라이브러리를 스크리닝 하기 위한 프로브로서 사용되거나 동종 사람 연골 및/또는 뼈 단백질을 합성하는 사람 세포계 또는 조직을 동정하기 위한 프로브로서 사용된다. 예컨대, 총 유전자 카타로그 #944201과 같은 사람 게놈 라이브러리는 상기 프로브로써 스크리닝될수 있고 추정상 양성물질을 단리하고 DNA 서열을 얻는다. 상기 재조합체가 사람 BMP-10의 일부를 코딩한다는 증거는 소/사람 단백질 및 유전자 구조 동일성을 신뢰한다.

일반 사람 연골 및/또는 뼈 유발 인자 분자의 일부를 코딩하는 DNA 를 함유하는 재조합 박테리오파지를 얻으면, 사람 코딩 서열을 BMP-10mRNA 를 합성하는 사람 세포계 또는 조직을 동정하기 위한 프로브로서 사용할 수 있다. 대안적으로, 소 BMP-10 코딩 서열은 상기 사람 세포계 또는 조직을 동정하기 위한 프로브로서 사용될 수 있다. 간단하게 설명하면, RNA 를 선택된 세포 또는 조직원으로부터 추출하고 포름알데히드 아가로스 겔 상에서 전기영동시키고 니트로셀룰로스로 옮기거나, 포름알데히드와 반응시키고 직접 니트로셀룰로스 상에 점을 찍는다. 그다음 니트로셀룰로스를 소 또는 사람 BMP-10의 코딩 서열로부터 유래된 프로브에 하이브리다이제이션시킨다. 대안적으로 소 BMP-10코딩 서열을 사용하여 특이적 증폭 반응을 수행하는데 사용되는 프라이머들 사이에 위치하는 영역내에 위치한 BMP-10 코딩 서열의 일부를 특이적으로 증폭시킬 올리고뉴클레오티드 서열을 고안한다. 소 및 사람 BMP-10 서열은 mRNA, cDNA 또는 게놈 DNA주형으로부터의 상응하는 사람 BMP-10 코딩 서열을 특이적으로 증폭시킬수 있게 할 것이다. 일단 양성 원천이 상기 서술된 방법중 하나에 의해 동정되면, mRNA를 올리고 (dT) 셀룰로스 크로마토그래피에 의해 선택하고 cDNA를 합성하고 당업계에 공지된  $\lambda$ gt 또는  $\lambda$ 박테리오파지 벡터, 예컨대  $\lambda$ ZAP에서 공지된 방법에 의해 클로닝시킨다 (Toole et al, 앞의 책). 또한  $\lambda$ 박테리오파지내로 클로닝된 앞서 제조된 게놈 라이브러리 또는 사람 cDNA 상에 직접, 상기 서술된, 올리고뉴클레오티드 프라이머 지식 증폭 반응을 수행하는 것이 가능하다. 이러한 경우에, 사람 BMP-10 단백질의 일부를 코딩하는 특이적으로 증폭된 DNA 생산물을 산출하는 라이브러리는 프로브로서 증폭된 BMP-10 코딩 DNA의 단편을 사용하여 직접 스크리닝될수 있다.

소 BMP-10 게놈 클론  $\lambda$ 70r-20의 DNA 서열에 기초하여 고안된 올리고뉴클레오티드 프라이머는 서열 확인 번호. 1에 나열된 DNA 서열의 뉴클레오티드 #876 ~ #898에 기초하여 고안되고 자동 DNA 합성기 상에서 합성한다.

**프라이머 A: TGCTCTAGACCTATGAATGTCGTTGGTGTTTGC**

프라이머 A의 첫번째 9개가 뉴클레오티드 (밑줄 부분)는 본 발명의 BMP-10 단백질을 코딩하는 특이적으로 증폭된 DNA 서열의 조작을 용이하게 하기 위해 사용될 수 있는 제한 엔도뉴클레아제 XbaI에 대한 인식 서열을 포함하며 따라서 서열 확인 번호 : 1에 제공된 DNA 서열로부터 유래되지 않는다.

하기 올리고 뉴클레오티드 프라이머는 서열 확인 번호. 1에 나열된 DNA 서열의 뉴클레오티드 #1060 ~ #1037에 기초하여 고안되고 자동 DNA 합성기 사에서 합성시킨다.

**프라이머 B: TAGGGATCCCTTGTAGGTGACGACGCCCTTATC**

프라이머 B의 첫번째 9개가 뉴클레오티드 (밑줄 부분)는 본 발명의 BMP-10 단백질을 코딩하는 특이적으로 증폭된 DNA 서열의 조작을 용이하게 하기 위해 사용될 수 있는 제한 엔도뉴클레아제 BamHI에 대한 인식 서열을 포함하며 따라서 서열 확인 번호 : 1에 제공된 DNA 서열로부터 유래되지 않는다.

상기 동정된 프라이머에서 표준 뉴클레오티드 기호는 다음과 같다: A, 아데노신; C, 시토신; G, 구아닌; 및 T, 티민.

상기 동정된 프라이머 A 및 B는 사람 게놈 DNA로부터 특이적 뉴클레오티드의 증폭을 허용하기 위한 프라이머로서 사용된다. 증폭 반응은 하기와 같이 수행된다.

사람 게놈 DNA (원천: 말초 혈 백혈구)를 100 °C에서 5 분 동안 변성시킨 edma 200 μM 각각의 데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트 (dATP, dGTP, dCTP 및 dTTP) 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% 젤라틴, 1.25 단위 Taq DNA 폴리머라제, 100 pM 올리고뉴클레오티드 프라이머 A 및 100 pM 올리고뉴클레오티드 프라이머 B를 함유하는 반응 혼합물을 하기의 방식으로 열 순환에 적용시킨다 : 한 주기 동안 94 °C에서 3 분, 50 °C에서 1분, 72 °C에서 1분, 그 다음 39 주기 동안 94 °C에서 1 분, 50 °C에서 1 분, 72 °C에서 1분.

제조업자에 의해 제안된 조건하에 DNA 정제 수지 기재 프로토콜의 사용에 의해 증폭을 개시하기 위해 사용되는 과량의 올리고뉴클레오티드 프라이머 A 및 B로부터 상기 반응에 의해 특이적으로 증폭되는 DNA를 분리시킨다. 결과생산된 DNA 생산물을 제한 엔도뉴클레아제 XbaI/BamHI로써 소화시키고 페놀 추출시키고 클로로포름 추출시킨다. XbaI/BamHI 소화로부터 조래된 DNA의 소단편들의 제거 및 완충제 교환은 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA에 소화된 DNA 생산물을 희석시키고, 이어서 센트리콘™ 30 마이크로콘세트레이터 (W.R.Grace & Co., Beverly, Ma.; Product \$4209)를 통하여 원심분리시킨다. 결과생산된 XbaI/BamHI 소화된 증폭 DNA 생산물을 플리링커 영역의 XbaI와 BamHI 제한 부위사이의 플라스미드 벡터 (pBluescript)내로 2차 클로닝시킨다. 결과생산된 서브클론의 DNA 서열 분석은 특이적으로 증폭된 DNA 서열 생산물이 본 발명의 사람 BMP-10 단백질의 일부분을 코딩함을 나타낸다. DNA 서열 (서열 확인 번호 : 3) 및 상기 특이적으로 증폭된 DNA 단편의 유래된 아미노산 서열 (서열 확인 번호 : 4)은 서열 목록에 나열되어 있다.

상기 서열의 뉴클레오티드 #1 ~ #29는 올리고뉴클레오티드 프라이머 A의 일부를 포함하고 뉴클레오티드 #168 ~ #197은 특이적으로 증폭반응을 수행하는데 사용되는 올리고뉴클레오티드 프라이머 B의 일부를 포함한다. 증폭 반응 개시에 올리고뉴클레오티드 프라이머 A 및 B (소 BMP-10 DNA 서열에 기초하여 고안됨)의 작용으로 인해 사람 BMP-10을 코딩하는 실제 서열에 정확하게 상응하지 않을 수 있으므로 상기 아미노산 서열 유래에서 번역되지 않는다. 사람 게놈 DNA 주형으로부터 특이적으로 증폭된 서열 확인 번호 : 3의 뉴클레오티드 #30 ~ #167로부터의 DNA 서열 또는 그의 일부를 당업자에게 공지된 표준 하이브리다이제이션/스크리닝 기술에 의해 사람 게놈 또는 사람 cDNA 라이브러리로부터 부가적인 사람 BMP-10 코딩 서열을 동정하기 위한 프로브로서 사용할 수 있다.

[전체-길이 사람 BMP-10]

전체-길이 사람 BMP-10 DNA 서열 (서열 확인 번호 : 10) 및 코딩된 아미노산 서열 (서열 확인 번호 : 11)은 서열 목록에 서술되어 있다.

벡터 λgt10으로 제조된 사람 태아 간 cDNA 라이브러리의 백만개 재조합체 (클론테크 카타로그 # HL1064a)를 50 개 평판상에서 평판당 20,000 개 재조합체 박테리오파지 플라크의 밀도로 도포시킨다. 재조합 박테리오파지 플라크의 이중 니트로셀룰로스 리플리카를 상기 평판들로부터 제조한다. 서열 확인 번호 : 3의 뉴클레오티드 #85 ~ #114에 기초하여 고안된 올리고뉴클레오티드 프로브를  $\gamma$  <sup>32</sup>P-ATP로써 qd사성 라벨링시키고 65 °C에서 SHB에서 이중 니트로셀룰로스 리플리카의 두 세트에 하이브리다이제이션시킨다. 11개의 양성으로 하이브리다이제이션된 재조합체에 주목한다. HFL-3으로 명명된 양성으로 하이브리다이제이션된 재조합체 중 하나를 플라크 정제시킨다. 정제된 HFL-3 cel 클론의 박테리오파지 평판 원료를 제조하고 박테리오파지 DNA를 단리시킨다. 상기 cDNA 클론의 박테리오파지 원료를 부다페스트 조약의 요건에 따라 미합중국 매릴랜드주 록빌시 파그러언 드라이브 12301에 소재하는 ATCC에 기탁했고 ATCC # 75779로 명명되었다. 클론 HFL-3의 DNA 서열의 일부는 서열 확인 번호 : 10에 나열되어 있다.

벡터 λFix로 제조된 사람 게놈 라이브러리의 백만개 재조합 (스트라타젠 카타로그 # 944201)를 50 개 평판 상에서 평판 당 20,000 개 재조합 박테리오파지 플라크의 밀도로 도포시킨다. 재조합 박테리오파지 플라크의 이중 니트로셀룰로스 리플리카를 상기 평판들로부터 제조한다. 서열 확인 번호 : 10의 뉴클레오티드 #355 ~ #384에 기초하여 고안된 올리고뉴클레오티드 프로브를 자동 DNA 합성기 상에서 합성시킨다. 상기 올리고뉴클레오티드 프로브를  $\gamma$  <sup>32</sup>P-ATP로써 방사성 라벨링시키고 65 °C에서 SHB에서 이중 니트로셀룰로스 리플리카의 두 세트에 하이브리다이제이션시킨다. 6개의 양성으로 하이브리다이제이션된 재조합체에 주목한다. 20GEN.3으로 명명된 양성으로 하이브리다이제이션된 재조합체 중 하나를 플라크 정제시킨다. 정제된 20GEN.3 게놈 DNA 클론의 박테리오파지 평판 원료를 제조하고 박테리오파지 DNA를 단리시킨다. 상

기 계능 클론의 박테리오파지 원료를 부다페스트 조약의 요건에 따라 미합중국 매릴랜드주 록빌시 파그러 언 드라이브 12301에 소재하는 ATCC에 기탁했고 ATCC # 75774로 명명되었다. 클론 20GEN.3의 DNA 서열의 일부는 서열 확인 번호 : 10에 나열되어 있다. 계능 클론 20GEN.3의 DNA 서열의 일부는 cDNA 클론 HFL-3 DNA 서열의 일부와 동일하다고 평가되었다. 서열 확인 번호 : 10에 상기 중첩 정도 (뉴클레오티드 #219 ~ #316) BMP-10 단백질의 완전 코딩 서열을 번역하기 위한 기초로서 사용되었다. 상기 서열은 서열 확인 번호 : 10에 있고 뉴클레오티드 #1 ~ #218이 계능 클론 20GEN.3에 포함된 DNA 서열로부터 전체적으로 유래되고 뉴클레오티드 #317 ~ #1584가 cDNA 클론 HFL-3에 함유된 DNA 서열로부터 전체적으로 유래된다는 사실에 주목해야 하며, 한편 뉴클레오티드 #219 ~ #316은 20GEN.3 및 HFL-3 모두에 존재한다고 판단되었다. 서열 확인 번호 : 10은 424 아미노산의 사람 BMP-10 전구체 단백질을 예측한다. 기타 BMP 및 TGF- $\beta$  과 내의 기타 단백질에 대한 지식을 기초로, 전구체 폴리펩티드는 제안된 컨센서스 단백질 분해 프로세스 서열 ARG-X-ARG에 따라서 다중 염기 서열 ARG-ILE-ARG-ARG (서열 확인 번호 : 11의 아미노산 #-4 ~ #-1)에서 분열될 것이라고 예측된다. 이 위치에서의 사람 BMP-10 전구체 폴리펩티드의 분열은 서열 확인 번호 : 11의 위치 #1에서의 아미노산 ASN으로 시작하는 108개 아미노산 성숙 펩티드를 산출한다. 성숙한 형태로 사람 BMP-10의 프로세스는 관련 단백질 TGF- $\beta$  의 프로세스와 유사한 방식으로 N-말단 영역의 이량체화 및 제거를 수반한다고 예측된다 [ L.E. Gentry et al., *Molec. & Cell. Biol.*, 8:4162 (1988); R. Derynck et al., *Nature*, 316:701 (1985). 사람 BMP-10의 성숙 활성종은 12,000 달톤의 예측 분자량을 가지며, 각각의 서브유닛이 서열 확인 번호 : 11의 아미노산 #1 ~ #108으로 구성되는 두개의 폴리펩티드 서브유닛의 동종이량체를 포함한다고 생각된다. 부가적인 활성종은 아미노산 #7 ~ #108로 이루어지고 이로써 첫 번째의 보존 시스테인 잔기를 포함한다고 생각된다. BMP-10 한 서브유닛 및 BMP/TGF- $\beta$  상과의 또다른 구성원의 또다른 서브유닛으로 구성되는 이종이량체 분자도 고려된다.

당업자에게 공지된 부가적인 방법을 본 발명의 기타 종들의 BMP-10 단백질을 분리하는데 사용할 수 있다.

[실시예 3]

[W-20 생검정]

[A. W-20 세포에 대한 서술]

지시자 세포계로서 W-20 뼈 골수 스트로마 세포를 사용하는 것은 BMP 단백질로써 처리한 후에 이들 세포를 골아세포-형 세포로 전환시키는 것에 기초한다 [Thies et al., *Journal of Bone and Mineral Research*, 5:305 (1990); 및 Thies et al., *Endocrinology*, 130:1318 (1992)]. 구체적으로 W-20 세포는 매사추세츠주 보스턴시에 소재하는 소아 병원의 Dr. d. Nathan의 실험실에 있는 연구자들에 의해 성숙 마우스로부터 유래된 골로날 뼈 골수 스트로마 세포이다. 특정 BMP 단백질로써 W-20 세포를 처리하면 (1) 알칼리성 포스파타제 생산의 증가, (2) PTH 자극 cAMP의 유발, 및 (3) 세포에 의해 골칼신 (osteocalcin) 합성의 유발을 초래한다. (1) 및 (2)는 골아세포 표현형과 관련된 특성을 나타내고 골칼신을 합성하는 능력은 성숙 골아세포에 의해서만 표현되는 표현형 성질이다. 더욱이, 현재까지 단지 BMP 만으로써 처리할 시에 골아세포-형 세포에 W-20 스트로마 세포의 전환이 관찰되었다. 상기 방식으로, BMP 처리된 W-20 세포에 의해 표현된 생체의 활성은 BMP에 대해 공지된 생체내 뼈 형성 활성과 상관관계가 있다.

신규한 골유발 분자의 BMP 활성과 비교하여 유용한 하기 두가지 생체내 검정이 서술된다.

[B. W-20 알칼리성 포스파타제 검정 프로토콜]

W-20 세포를 배지 200  $\mu$ l (10% 열 실할 우태아 혈청, 2 mM 글루타민 및 100 유닛/ml 페니실린 + 100 $\mu$ g/ml 스트렙토마이신을 함유하는 DME)내 웰당 10,000 개 세포의 밀도로 96 개 웰 조직 배양 상층에 도포시킨다. 세포를 방사도록 37 °C의, 95% 공기, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 부착시킨다.

배지 200  $\mu$ l를 다중채널 피펫터를 갖는 각각의 웰로부터 제거하고, 동일 부피의, 10% 열 실할 우태아 혈청, 2 mM 글루타민 및 1 페니실린-스트렙토마이신을 갖는 DME내에 운반된 시험 샘플로 대체한다. 시험 물질을 세번 검정한다.

시험 샘플 및 표준을 W-20 지시자 세포와 함께 24시간 인큐베이션 기간을 허용한다. 24 시간 후에, 평판을 37 °C 인큐베이터로부터 제거하고 시험 배지를 세포로부터 제거시킨다.

W-20 세포층을 칼슘/마그네슘이 없는 인산염 환충 식염 200  $\mu$ l로 웰 당 3회 세척하고 상기 세척물을 따라 버린다.

유리 증류수 50  $\mu$ l를 각각의 웰에 첨가하고 그 다음 검정 평판을 드라이 아이스/에탄올 욕 상에 도포시켜 급냉시킨다. 일단 냉동되면, 검정 평판을 드라이 아이스/에탄올 욕으로부터 제거하고 37 °C에서 해동시킨다. 이 단계를 총 3 번 냉동-해동 절차 동안 2 회 이상 반복한다. 일단 완료되면, 막 결합 알카리성 포스파타제를 측정에 사용할 수 있다.

검정 혼합물 50  $\mu$ l (50 mM 글리신, 0.05% Triton X-100, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM p-니트로페놀 포스페이트, pH = 10.3)을 각각 검정 웰에 첨가한 다음 검정 평판을 분당 60 진동으로 진탕 수욕에서 37 °C에서 30 분 동안 인큐베이션시킨다.

30 분 인큐베이션의 말려에, 각각의 웰에 0.2 N NaOH 100  $\mu$ l를 첨가하고 얼음상에 검정 평판을 놓음으로써 반응을 정지시킨다.

각각의 웰에 대한 분광사진계 흡광도는 405 나노미터의 파장에서 읽는다. 그 다음 상기 값을 공지된 기준과 비교하여 각각의 샘플에서의 알칼리성 포스파타제의 평가를 산출한다. 예컨대, 공지된 양의 p-니트로페놀 포스페이트를 사용하여 흡광도값을 산출한다. 이는 표 1에 제시된다.



[표 1]

P-니트로페놀 포스페이트의 공지된 기준에 대한 흡광도	
P-니트로페놀 포스페이트 $\mu\text{mol}$	평균 흡광도 (405nm)
0.000	0
0.006	0.261 +/- .024
0.012	0.521 +/- .031
0.018	0.797 +/- .063
0.024	1.074 +/- .061
0.030	1.305 +/- .083

공지된 양의 BMP에 대한 흡광도 값을 측정하여 표 2에 도시된 바와같이 단위 시간 당 분해된 p-니트로페놀 포스페이트의  $\mu\text{mol}$ 로 전환시킬수 있다.

[표 2]

BMP-2 로 처리한 W-20 세포에 대한 알카리성 포스파타제 값		
BMP-2 농도 ng/ml	판독 흡광도 405 nm	시간당 기질 $\mu\text{mol}$
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

그 다음 상기 값들을 사용하여 공지된 양의 BMP-10 ~ BMP-2의 활성을 비교한다.

#### [C. 골칼신 RIA 프로토콜]

W-20 세포를 10 % 열 실활 우태아 혈청, 2 mM 글루타민 함유하는 DME 2ml 내 24 개 웰 다중웰 조직 배양 접시에 웰 당  $10^6$  개 세포를 도포시킨다. 세포를 95 % 공기, 5% CO<sub>2</sub> 의 분위기에서 37 °C에서 밤새도록 부착시킨다.

다음 날, 배지를 총 2 ml 부피로 10% 우태아 혈청, 2 mM 글루타민 및 시험 물질을 함유하는 DME로 바꾼다. 각각의 실험 물질을 세개의 웰에 투여한다. 시험 물질을 총 96 시간 동안 W-20 세포와 인큐베이션하고 동일한 시험 배지로 48 시간에 대체한다.

96 시간의 말엽에, 시험 배지 50  $\mu\text{l}$ 를 각각의 웰로부터 제거하고 마우스 골칼신에 대한 방사성면역검정법을 사용하여 골칼신 생산에 대한 검정을 한다. 검정의 상세한 점들을 매사추세츠 주 02072 스토우톤 파지 스트리트 378 바이오메디칼 테크놀로지사에서 제조한 키트에 서술되어 있다. 검정 시약은 제품 번호 BT0431 (마우스 골칼신 표준), BT-432 (염소 항-마우스 골칼신), BT-431R (요오드화 마우스 골칼신)m BT-415 (정상 염소 혈청) 및 BT-414 (당나귀 항 염소 IgG)이 알려져 있다. BMP 처리에 반응하여 W-20 세포에 의해 합성된 골칼신에 대한 RIA를 제조업자가 제공한 프로토콜에 서술된 바와 같이 수행한다.

시험 샘플에 대해 얻어진 값을 마우스 골칼신의 공지 기준에 대한 값 및 공지된 양의 BMP-2를 사용한 공격에 반응하여 W-20 세포에 의해 생산된 골아세포의 양과 비교한다. W-20 세포에 의한 BMP-2 유발 골칼신 합성 값은 표 3에 도시되어 있다.

[표 3]

W-20 세포에 의한 골칼신 합성	
BMP-2 농도 ng/ml	골칼신 합성 ng/웰
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

## [실시에 4]

## [로센 변형 샘패스-레드 검정]

Smaph 및 Reddi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:6591-6595 (1983)에 서술된 래트 뼈 형성 검정의 변형된 버전을 사용하여 BMP 단백질의 뼈 / 연골 활성을 평가한다. 상기 변형된 검정법은 본원에서 로센-변형된 샘패스-레드 검정법 (Rosen-modified Sanmpath-Reddi assay)이라고 불린다. 샘패스-레디 절차의 에탄올 침전 단계를 물에 대해 검정될 분획을 투석으로 (조성물이 용액인 경우) 또는 투여과로 (조성물이 현탁액인 경우) 대체한다. 그 다음 용액 또는 현탁액을 0.1 % TFA로 평형을 맞춘다. 결과생산된 용액을 래트 매트릭스 20 mg에 첨가시킨다. 본 단백질로 처리하기 않는 모조 래트 매트릭스 샘플을 대조표준으로 사용했다. 상기 물질을 냉동시키고 동결건조시키고 결과생산된 분말을 #5 젤라틴 캡슐에 밀봉시킨다. 캡슐을 21-49 일령의 암컷 롱 에반스 래트의 복강 흉부 영역에 피하 이식시킨다. 이식물을 7-14 일 후에 제거시킨다. 각각의 이식물의 절반을 알카리성 포스파타제 분석을 위해 사용했다. [참조, Reddi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 69:1601 (1972)].

각각의 이식물의 나머지 절반을 부착시키고 조직학적 분석을 한다. 1  $\mu$ m 글리코메타크릴레이트 구간을 Von Kossa 및 산 푸신으로 염색시키고 각각의 이식물에 존재하는 유발된 뼈 및 연골 형성량에 대해 점수를 매긴다. +1 ~ +5는 새로운 뼈 및/또는 연골 세포 및 매트릭스에 의해 점유된 이식물의 각각의 조직학적 구간의 면적을 나타낸다. +5의 점수는 이식물의 50 % 이상이 이식물내 단백질의 직접적인 결과로서 생산된 새로운 뼈 및/또는 연골임을 나타낸다. +4, +3, +2, +1의 점수는 이식물의 각각 40%, 30%, 20% 및 10% 이상이 새로운 연골 및/또는 뼈를 함유함을 의미할 것이다.

본 발명의 BMP-10 단백질은 상기 검저에 있어 활성을 평가한다.

## [실시에 5]

## [BMP-10의 발현]

소, 사람 또는 기타 포유동물 BMP-10 단백질을 생산하기 위하여, 이를 코딩하는 DNA를 적당한 발현 벡터 내로 옮기고 통상적인 유전자 조작 기술에 의해 포유동물 세포 또는 기타 바람직한 원핵 또는 진핵 숙주 내로 도입시킨다. 생물학적으로 활성인 재조합체 사람 BMP-10에 대한 바람직한 발현계는 안정하게 형질전환된 포유동물 세포라고 생각된다.

당업자는 서열 확인 번호 : 1 또는 서열 확인 번호 : 10의 서열 또는 BMP-10 단백질 또는 기타 변형된 서열을 코딩하는 기타 DNA 서열 및 공지의 벡터, 예컨대 pCD [Okayama et al., Mol. Cell Biol., 2:161-170 (1982)], pJL3, pJL4 [Gough et al., EMBO J., 4:645-653 (1985)] 및 pMT2 CXM을 사용하여 포유동물 발현 벡터를 제조할 수 있다. 포유동물 발현 벡터 pMT2 CXM은 테트라사이클린 내성 유전자 대신에 암피실린 내성 유전자를 함유하고 부가적으로 cDNA 클론의 삽입을 위한 XhoI 부위를 함유한다는 점에서 후자와 상이한 p91023(b) (Wong et al., Science 228:810-815, 1985)의 유도체이다. pMT2 CXM의 작용 요소들은 하기에 서술되어 있고 (Kaufman, R.J., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:689-693) 아데노비루스 VA 유전자, 72 bp 엔핸서 (enhancer)를 포함하는 복제의 SV40원천, 5' 스플라이스 부위를 포함하는 아데노비루스 주요 후반 프로모터 및 아데노비루스 후반 mRNA 상에 존재하는 아데노비루스 3조의 리더 서열의 대부분, 3' 스플라이스 (splice) 수용체 부위, DHGR 삽입물, SV40 초기 폴리아데닐화 부위 (SV40), 및 이. 콜라이 내에서의 전파를 위해 필요한 pBR32 서열을 포함한다.

플라스미드 pMT2 CXM 은 수탁 번호 ATCC 67122 하에 미합중국 메릴랜드 록빌시 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (ATCC)에 기탁한 pMT2-VWF 를 EcoRI로 소화시켜 얻었다. EcoRI 소화는 pMT2-VWF에 존재하는 cDNA 삽입물을 절단하여 선형형태의 pMT2를 산출하는 데, 이는 검출될 수 있으며 이를 사용하여 이. 콜라이 HB101

또는 DH-5에 암피실린 내성을 형질전환시킬 수 있다. 플라스미드 pMT2 DNA는 통상의 방법에 의해 제조할 수 있다. 그 다음 pMT2 CXM을 루프아웃/인 (loopout/in) 돌연변이 유발을 사용하여 제조한다 [Morinaga, et al., Biotechnology 84:636 (1984)]. 이는 복제의 SV40 원천 근처의 Hind III 부위에 대한 염기 1075 ~ 115 및 pMT2의 앤헐서 서열을 제거한다. 게다가 이것은 뉴클레오티드 1145에 다음의 서열을 삽입한다.

### 5' PO-CATGGGCAGCTCGAG-3'

이 서열은 제한 엔도뉴클레아제 XhoI에 대한 인식 부위를 함유한다. pMT23으로 명명된 pMT2CXM의 유도체는 제한 엔도뉴클레아제 PstI, EcoRI, SAI 및 XhoI에 대한 인식 부위를 함유한다. 플라스미드 pMTCMX 및 pMT23 DNA는 통상의 방법에 의해 제조될 것이다.

pMT21로부터 유래된 pEMC2 β 1도 또한 본 발명의 실행에 적당할 것이다. pMT21-VWF 로부터 유래된 pMT2로부터 유래된다. 상기 서술된 바대로, EcoRI 소화는 pMT-VWF내에 존재하는 cDNA 삽입물을 절단하여 선형 형태의 pMT2를 산출하는데, 이를 결찰될 수 있고 이를 사용하여 이. 콜라이 HB 101 또는 DH-5에 암피실린 내성을 형질전환시킨다. 플라스미드 pMT2DNA는 통상적인 방법에 의해 제조할 수 있다.

pMT21은하기의 두가지 변형을 통하여 pMT2로부터 유래된다. 먼저, cDNA 클로닝을 위해 G/C꼬리 (tailin g)로부터 19 G 잔기의 스크레치를 포함하는 DHFR cDNA의 5' 비번역 영역중 76 bp를 제거한다. 상기 과정에서, XhoI 부위를 삽입하여 DHFR로부터 바로 상류에 다음의 서열을 얻는다:

### 5'-CTGCAGGCGAGCCTGAATTCTCGAGCCATCATG-3'

**PstI**

**Eco RI**

**XhoI**

두번째로 독특한 ClaI 부위를 EcoRV 및 XbaI을 사용한 소화, DNA 폴리머라제 I의 클레나우 (Klenow) 단편으로의 처리 및 ClaI 링커 (CATCGATG) 에로의 결찰에 의해 도입시킨다. 이는 아데노비루스관련 RNA (VAI) 영역으로부터 250bp를 결실시키거나 VAI RNA 유전자 발현 또는 작용을 장애하지 않는다. pMT21을 EcoRI 및 XhoI로써 소화시키고 이를 사용하여 벡터 pEMC2B1를 유도한다.

EMCV 리더 (leader)의 부분은 Eco RI 및 PstI 로써의 소화에 의해 pMT2-ECAT1 [S. K. Jung, et al, J. Virol 63:1651-1660 (1989)]로부터 얻으며 2752 bp 단편을 결과한다. 상기 단편을 TaqI로써 소화시켜 508 bp의 Eco RI-TaqI 단편을 산출하고 이를 저온 용융 아가로스 겔 사에서의 전기영동에 의해 정제시킨다. 68bp 어댑터 (adapter) 및 그의 상보적 가닥을 하기 서열을 갖는 5' TaqI 돌출 말단 및 3' XhoI 돌출 말단과 합성한다:

### 5'-CGAGGTTAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTGG

**TaqI**

### TTTTCTTTGAAAAACACGATTGC-3'

**XhoI**

상기 서열은 뉴클레오티드 763 ~ 827의 EMC 바이러스 리더 서열과 일치한다. 또한 이는 EMC 바이러스 리더내 위치 10의 ATG를 ATT로 바꾸고 이에 XhoI 부위가 이어진다 pMT21 EcoRI-XhoI 단편, EMC 바이러스 EcoRI-TaqI 단편, 및 68 bp 올리고 뉴클레오티드 어댑터 TaqI-XhoI 어댑터의 세가지 방식 결찰은 벡터 pEMC2 β 1을 생산한다.

상기 벡터는 복제의 SV40 원천 및 앤헐서, 아데노비루스 주요 후반 프로모터, 아데노비루스 3조 리더 서열의 주요부의 cDNA 카피 (copy), 작은 하이브리드 인터베닝 (intervening) 서열, SV40 폴리아데닐화 시그널 및 아데노비루스 VA I 유전자, DHFR 및 β-락타마제마커 및 EMC 서열을 포유동물 세포 내에서 원하는 cDNA의 높은 발현 수준을 지시하는 적당한 관계로 함유한다.

벡터의 구성은 BMP-10 DNA 서열의 변형을 수반할 것이다. 예컨대, BMP-10 cDNA는 코딩 영역의 5' 및 3' 말단 상에서 비-코딩 뉴클레오티드를 제거함으로써 변형시킬 수 있다. 상기 결실된 비-코딩 뉴클레오티드는 발현을 위해 이롭다고 공지된 기타 서열에 의해 치환될 수도 있고 또는 치환되지 않을 수도 있다. 상기 벡터들은 BMP-10 단백질의 발현을 위해 적당한 숙주 세포 내로 형질전환시킬 수 있다. 게다가, 서열 확인 번호 : 1 또는 서열 확인 번호 : 10의 서열 또는 BMP-10 단백질을 코딩하는 기타 서열을 조작하여 BMP-10 코딩 프로펫이드 서열을 결실시키고 기타 BMP 단백질의 완전한 프로펫이드를 코딩하는 서열로 이를 대체시킴으로써 성숙 BMP-10를 발현시킬 수 있다.

당업자는 박테리아 세포에 의한 세포내 또는 세포외 발현을 위한 박테리아 벡터를 창출하는 박테리아 서열로써 코딩 서열에 인접한 포유 동물 조절 서열을 치환시키거나 제거함으로써 서열 확인 번호 : 1 또는 서열 확인 번호 : 10의 서열을 조작할 수 있다. 예컨대, 코딩 서열을 부가적으로 조작할 수 있다. (예컨대, 기타 공지된 링커에 결합하거나 그로부터 비-코딩 서열을 결실시키거나 기타 공지 기술에 의해 그간의 뉴클레오티드를 변경시킴으로써 변형시킴). 그 다음 변형된 BMP-10 코딩 서열을 Taniguchi et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77:5230-5233 (1980)에 서술된 바와 같은 절차를 사용하여 공지된 박테리아 벡터내로 삽입시킬 수 있다. 그 다음 이 시험 박테리아 벡터를 박테리아 숙주 세포 내로 형질전환시킬 수 있고 이로써 BMP-10 단백질이 발현된다. 박테리아 세포내 BMP-10 단백질의 세포외 발현 생산 계획은 예컨대 유럽 특허 출원 EPa 제 177,343 호 참조.

근종 세포내에서의 발현을 위한 근종 백터의 제조를 위해서도 유사한 조작을 수행할 수 있다 [참조, 예컨대 공개 유럽 특허 출원 제 155,476 호에 서술된 절차]. 또한 효모 백터를 효모 세포에 의해 본 발명의 인자들의 세포내 또한 세포의 발현을 위한 효모 조절 서열을 사용하여 제조할 수 있다. [참조, 예컨대 공개 PCT 출원 W086-00639 및 유럽 특허 출원 EPA 제 13,289 호에 서술된 절차].

포유동물 세포에서 본발명의 BMP-10 단백질을 높은 수준으로 생산하는 방법은 이중 BMP-10 유전자의 다수의 카피를 함유하는 세포의 제조를 수반할 것이다. 이중 유전자는 증폭가능한 마커 (marker), 예컨대 디히드로엽산 환원효소 (DHFR) 유전자에 결합되는데, Kaufman 및 Sharp, J. Mo. Biol., 159:601-692 (1982)의 절차에 따라 메토티레세이트 (MTX)의 농도 증가시에 전파를 위해 증가된 유전자 카피를 함유하는 세포가 선택될 수 있다. 이러한 접근법은 다수의 상이한 세포 유형에 있어 사용될 수 있다.

예컨대 발현을 가능하게 하는 기타 플라스미드 서열과 연관되어 작용하는 본 발명의 BMP-10에 대한 DNA 서열을 함유하는 플라스미드 및 DHFR 발현 플라스미드 pAdA26SV(A)3 [Kaufman and Sharp, Mo.: Cell. Biol., 2:1304 (1982)]를 인산칼슘 공침강 및 트랜스펙션, 일렉트로포레이션 또는 원형질체 융합을 포함하는 다양한 방법에 의해 DHFR-결합 CHO 세포, DUKX-B11 내로 동시에 도입시킬 수 있다. DHFR 발현 형질 전환체를 투석된 우태아 혈청과 함께 알파 배지내에서의 성장에 대해 선택하고 Kaufman et al., Mol Cell Biol., 5:1750 (1983)에 서술된 바의 MTX (예컨대, 0.02, 0.2, 1.0 및 5  $\mu$ M MTX로 순차적 단계들)의 농도 증가시에 성장에 의한 증폭에 대해 선택한다. 형질전환체를 클로닝하고 생물학적으로 활성인 BMP-10 발현을 실시예 4에 상기 서술된 로센-변형 샘퍼스-레드 래트 뼈 형성 검정에 의해 모니터링한다. BMP-10 발현은 MTX 내성의 수준이 증가함에 따라 증가해야 한다. BMP-10 폴리펩티드는 [35S] 메티오닌 또는 시스테인 사용한 펄스라벨링 및 폴리아크릴아미드 겔 전기영동과 같이 당업계에 공지된 표준 기술을 사용하여 특성화시킨다. 유사한 절차를 계속하여 기타 관련 BMP-10 단백질을 생산할 수 있다.

[실시예 6]

[발현된 BMP-10의 생물학적 활성]

상기 실시예 5에서 얻어진 발현된 BMP-10 단백질의 생물학적 활성을 측정하기 위하여, 단백질을 세포 배양물로부터 회수하고 동시에 생산된 기타 단백질성 물질 및 기타오염물로부터 BMP-10 단백질을 단리시킴으로써 정제한다. 정제된 단백질을 실시예 4에 서술된 래트 뼈 형성 검정에 따라 검정할 수 있다.

당업자에게 공지된 표준 기술을 사용하여 정제를 수행한다.

은으로 염색된 [Oakley, et al, Anal. Biochem. 105 : 361 (1980)] SDS-PAGE 아크릴아미드 [Laemmli, Nature 227:680 (1970)] 및 면역학적 블로팅에 의해 [Towbin, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350 (1979)]와 같은 표준 기술을 사용하여 수행한다.

상기 설명은 본 발명의 현재 바람직한 실시양태를 상세히 설명한다. 실행시에 당업자에게 상기 서술을 고려하여 우수한 변형 및 변화가 발생하리라고 예측된다. 변형 및 변화는 본원에 첨부된 청구의 범위내에 포괄되리라 사료된다.

[서열 목록]

(1) 일반 정보 :

(i) 출원인:

(A) 성명 : 제네틱스 인스티튜트 인코포레이티드

(B) 거리 : 캠브리지파크 드라이브 87

(C) 도시 : 캠브리지

(D) 주 : 메사추세트

(E) 국가 : 미합중국

(F) 우편번호 : 02140

(G) 전화번호 : 617 876-1170

(H) 팩스 : 617 876-5851

(ii) 발명의 명칭 : BMP-10 단백질

(iii) 서열 수 : 11

(iv) 컴퓨터 판독 형태 :

(A) 매체 형태 : 플로피 디스크

(B) 컴퓨터 : IBM PC 호환 기종

(C) 운영 시스템 : PC-DOS/MS-DOS

(D) 소프트웨어 : PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPO)

(2) 서열 확인 번호 : 10에 대한 정보;

(i) 서열 특성

(A) 길이 : 1442 염기쌍

- (B) 유형 : 핵산  
 (C) 가닥수 : 이중  
 (D) 토폴로지 : 선형  
 (ii) 분자유형 : DNA (게놈)  
 (vi) 원천 :  
 (A) 유기체 : 보스 타우러스 (Bos taurus)  
 (B) 계통 : 소 BMP-10  
 (ix) 특징;  
 (A) 이름/키(key) : CDs  
 (B) 위치 : 167..1105  
 (ix) 특징  
 (A) 이름/키 : misc\_feature  
 (B) 위치 : 165..778  
 (D) 기타 정보 : /주 = “프로펩티드에 대한 부분적 코딩 서열”  
 (ix) 특징 :  
 (A) 이름/키 : mat\_peptide  
 (B) 위치 : 779..1102  
 (D) 기타 정보 : /주 = “성숙 펩티드의 시작”  
 (ix) 특징 :  
 (A) 이름/키 : misc\_feature  
 (B) 위치 : 163..164  
 (D) 기타 정보 : /주 = “인트론의 3' 말달”  
 (ix) 특징 :  
 (A) 이름/키 : misc\_feature  
 (B) 위치 : 165..166  
 (D) 기타 정보 : /주 = “인트론에 의해 차단된 코돈의 마지막 3분의 2”  
 (xi) 서열 설명: 서열 확인 번호 : 1 :

TTCCGTACTT CCTCTTAGAG AATGCCAACA CTGTGTTTGT TTTCACGTGAT TTTCCTTCAT 60  
 TCTTTCGTGG TGGAGAGAAT GGACAGGCAC TCTTATTGCA TAAATAAGCA TCTGTTTTCC 120  
 TCTGCTACAT GCTGCCAAATC TGATTTCITT TTTGTTTTTT CCAGAT CTG TTT TCC 175  
 Leu Phe Ser  
 -204  
 CAA CCA GCC ACT TTT AAT GGA CTC CGA AAA TAC CCT CTC CTC TTC AAC 223  
 Gln Pro Ala Ser Phe Asn Gly Leu Arg Lys Tyr Pro Leu Leu Phe Asn  
 -200 -195 -190  
 GTA TCC ATC CCT CAC CAT GAA GAC ATC ATC ATG GCT GAG CTC AGG TTG 271  
 Val Ser Ile Pro His His Glu Asp Ile Ile Met Ala Glu Leu Arg Leu  
 -185 -180 -175 -170  
 TAC ACC CTC CTG CAA AGA GAC CGC CTT ATA TAT GAA GGA GTG CAC CCA 319  
 Tyr Thr Leu Val Gln Arg Asp Arg Leu Ile Tyr Glu Gly Val Asp Arg  
 -165 -160 -155  
 AAA ATC ACC ATT TTT GAA GTA CTT GAG AGC AAA GAG GAC CAT GAA GGG 367  
 Lys Ile Thr Ile Phe Glu Val Leu Glu Ser Lys Glu Asp His Glu Gly  
 -150 -145 -140  
 GAA AGA AAC ATG CTC GTC TTG GTG TCA GGC GAG ATC TAC GGA ACC AAC 415  
 Glu Arg Asn Met Leu Val Leu Val Ser Gly Glu Ile Tyr Gly Thr Asn  
 -135 -130 -125  
 AGT GAG TGG GAG ACT TTT GAT GTC ACT GAT GCC ATC AGG CAT TGG CAA 463  
 Ser Glu Trp Glu Thr Phe Asp Val Thr Asp Ala Ile Arg His Trp Gln  
 -120 -115 -110  
 AAG TCA GGC TCA TCC ACC CAC CAG CTG GAG GTC CAC ATT GAG ACC AAA 511  
 Lys Ser Gly Ser Ser Thr His Gln Leu Glu Val His Ile Glu Ser Lys  
 -105 -100 -95 -90  
 CAC GAA ATG GAG GAC ACA CTT GGC AGG GGA CAG CTG GAA ATA GAC ACT 559  
 His Glu Met Glu Asp Thr Leu Gly Arg Gly Gln Leu Glu Ile Asp Thr  
 -85 -80 -75  
 AGT GCC CCG AAT AAG CAC GAT CCT TTG CTT GTC GTG TTT TCT GAT GAC 607  
 Ser Ala Arg Asn Lys His Asp Pro Leu Leu Val Val Phe Ser Asp Asp  
 -70 -65 -60  
 CAA AGC AGT GAG AAG GAG CGG AAA GAG GAA CTG GAT GAA ATC ATC GCC 655  
 Gln Ser Ser Glu Lys Glu Arg Lys Glu Glu Leu Asp Glu Met Ile Ala  
 -55 -50 -45  
 CAC GAG CAA TTC CCA GAG ATG GAC AAC CTG GAT TTG GAC GGT TAT TCC 703  
 His Glu Gln Phe Pro Glu Met Asp Asn Leu Asp Leu Asp Gly Tyr Ser  
 -40 -35 -30  
 AAC GGA CCT GGG GAA GAG CCT TTG CTG CAG ATG AGG TCG AAT ATC ATC 751  
 Asn Gly Pro Gly Glu Glu Ala Leu Leu Gln Met Arg Ser Asn Ile Ile  
 -25 -20 -15 -10  
 TAT GAC TCC ACT GCC GGC ATC AGA AGG AAT GCA AAA GGA AAC TAC TCC 799  
 Tyr Asp Ser Thr Ala Arg Ile Arg Arg Asn Ala Lys Gly Asn Tyr Cys  
 -5 1 5  
 AAG AGG ACC CCG CTC TAC ATC GAC TTC AAG GAG ATT GGC TGG GAC TCT 847  
 Lys Arg Thr Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Glu Ile Gly Trp Asp Ser  
 10 15 20  
 TGG ATC ATC GCT CCA CCT GGA TAT GAA CCC TAT GAA TGT COT GGT GTT 895  
 Trp Ile Ile Ala Pro Pro Gly Tyr Glu Ala Tyr Glu Cys Arg Gly Val  
 25 30 35  
 TGC AAC TAC CCC CTG GCA GAG CAT CTC ACC CCC ACA AAG CAT GCG ATT 943  
 Cys Asn Tyr Pro Leu Ala Glu His Leu Thr Pro Thr Lys His Ala Ile  
 40 45 50 55  
 ATC CAG GCC TTG GTC CAC CTC AAG AAT TCC CAG AAG GCT TCC AAA GCC 991  
 Ile Gln Ala Leu Val His Leu Lys Asn Ser Gln Lys Ala Ser Lys Ala  
 60 65 70  
 TGC TGT GTG CCC ACC AAG CTC GAG CCC ATC TCC ATC CTC TAT TTA GAT 1039  
 Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Glu Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Leu Asp  
 75 80 85  
 AAG GCC GTC GTC ACC TAC AAG TTT AAA TAT GAG GGC ATG GCT GTC TCT 1087  
 Lys Gly Val Val Thr Tyr Lys Phe Lys Tyr Glu Gly Met Ala Val Ser  
 90 95 100  
 GAA TGT GGC TGT AGA TAGGAGAGCA ATCCTGTGGC TTATTAATA ACTGTAAATG 1142  
 Glu Cys Gly Cys Arg  
 105  
 TGTATATTTT GTGTTCTAT TTAATGAGAT TATTTAATAA GGGGTACAG ATCATAGAGG 1202  
 CITGCTGCCT TAGGGAATT GACAGGTCGG TTGTTGTAG GAAATCCATG TTTTACTCTA 1262  
 CAGTGGAGTC CCTTCCAAATC TATTTTTCTT TGGACTTACC ATGCTCTGCA ATGCCATCTC 1322  
 TAACAGCAAG GCAAGCCACC ACTACTTGCC TTCTATGTCA ATTCRAAAGG AACACCGCTA 1382  
 AGCAGAAATA CAGTGTCCAG AGAGGTAGAT ATTTGTGTAT GTATATGTGT ACATAGATAA 1442

(2) 서열 확인 번호 : 2에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 312 아미노산

(B) 유형 : 아미노산

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자 유형 : 단백질

(xi) 서열 설명 : 서열 확인 번호 : 2 :

```

Leu Phe Ser Gln Pro Ala Ser Phe Asn Gly Leu Arg Lys Tyr Pro Leu
-204                -200                -195                -190

Leu Phe Asn Val Ser Ile Pro His His Glu Asp Ile Ile Met Ala Glu
-185                -180                -175

Leu Arg Leu Tyr Thr Leu Val Gln Arg Asp Arg Leu Ile Tyr Glu Gly
-170                -165                -160

Val Asp Arg Lys Ile Thr Ile Phe Glu Val Leu Glu Ser Lys Glu Asp
-155                -150                -145

His Glu Gly Glu Arg Asn Met Leu Val Leu Val Ser Gly Glu Ile Tyr -125
-140                -135                -130

Gly Thr Asn Ser Glu Trp Glu Thr Phe Asp Val Thr Asp Ala Ile Arg
-120                -115                -110

His Trp Gln Lys Ser Gly Ser Ser Thr His Gln Leu Glu Val His Ile
-105                -100                -95

Glu Ser Lys His Glu Met Glu Asp Thr Leu Gly Arg Gly Gln Leu Glu
-90                -85                -80

Ile Asp Thr Ser Ala Arg Asn Lys His Asp Pro Leu Val Val Phe
-75                -70                -65

Ser Asp Asp Gln Ser Ser Glu Lys Glu Arg Lys Glu Glu Leu Asp Glu
-60                -55                -50                -45

Met Ile Ala His Glu Gln Phe Pro Glu Met Asp Asn Leu Asp Leu Asp
-40                -35                -30

Gly Tyr Ser Asn Gly Pro Gly Glu Glu Ala Leu Leu Gln Met Arg Ser
-25                -20                -15

Asn Ile Ile Tyr Asp Ser Thr Ala Arg Ile Arg Arg Asn Ala Lys Gly
-10                -5                1

Asn Tyr Cys Lys Arg Thr Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Glu Ile Gly
5                10                15                20

Trp Asp Ser Trp Ile Ile Ala Pro Pro Gly Tyr Glu Ala Tyr Glu Cys
25                30                35

Arg Gly Val Cys Asn Tyr Pro Leu Ala Glu His Leu Thr Pro Thr Lys
40                45                50

His Ala Ile Ile Gln Ala Leu Val His Leu Lys Asn Ser Gln Lys Ala
55                60                65

Ser Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Glu Pro Ile Ser Ile Leu
70                75                80

Tyr Leu Asp Lys Gly Val Val Thr Tyr Lys Phe Lys Tyr Glu Gly Met
85                90                95                100

Ala Val Ser Glu Cys Gly Cys Arg
105

```

(2) 서열 확인 번호 : 3에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 197 염기쌍

(B) 유형 : 핵산

(C) 가닥수 : 이중

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자 유형 : DNA (게놈)

(vi) 원천 :

(A) 유기체 : 호모 사피엔스

(B) 계통 : 사람 BMP-10

(ix) 특징 :

(A) 이름/키이 : CDS

(B) 위치 : 30..167

(xi) 서열 설명 : 서열 확인 번호 : 3 :

```

TCTAGACCTA TGAATGTCCT GGTGTTCC AAC TAC CCC CTG GCA GAG CAT CTC      53
                Asn Tyr Pro Leu Ala Glu His Leu
                1                    5

ACA CCC ACA AAG CAT GCA ATT ATC CAG GCC TTG GTC CAC CTC AAG AAT      101
Thr Pro Thr Lys His Ala Ile Ile Gln Ala Leu Val His Leu Lys Asn
    10                15                20

TCC CAG AAA GCT TCC AAA GCC TGC TGT GTG CCC ACA AAG CTA GAG CCC      149
Ser Gln Lys Ala Ser Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Glu Pro
    25                30                35                40

ATC TCC ATC CTC TAT TTA GATAAGGGCG TCGTCACCTA CAAGGGATCC          197
Ile Ser Ile Leu Tyr Leu
                45

```

(2) 서열 확인 번호 : 4에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 46 아미노산

(B) 유형 : 아미노산

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자 유형 : 단백질

(xi) 서열 설명 : 서열 확인 번호 : 4 :

```

Asn Tyr Pro Leu Ala Glu His Leu Thr Pro Thr Lys His Ala Ile Ile
    1                    5                10                15

Gln Ala Leu Val His Leu Lys Asn Ser Gln Lys Ala Ser Lys Ala Cys
    20                25                30

Cys Val Pro Thr Lys Leu Glu Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Leu
    35                40                45

```

(2) 서열 확인 번호 : 5에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 32 아미노산

(B) 유형 : 핵산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자 유형 : DNA (게놈)

(xi) 원천 :

(A) 유기체 : 소 BMP-10에 대한 프라이머 A

(xi) 서열 설명 : 서열 확인 번호 : 5 :

**TGCTCTAGAC CTATGAATGT CGTGGTGT TT GC**

(2) 서열 확인 번호 : 6에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 33 염기쌍

(B) 유형 : 핵산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : DNA (게놈)

(vi) 원천 :

(A) 유기체 : BMP-10에 대한 프라이머 B



(xi) 서열 설명 : 서열 확인 번호 : 6 :

**TAGGGATCCC TTGTAGGTGA CGACGCCCTT ATC**

(2) 서열 확인 번호 : 7에 대한 정보 :

( i ) 서열 특성 :

(A) 길이 : 15 염기쌍

(B) 유형 : 핵산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

( ii ) 분자 유형 : DNA ( 게놈 )

(vi) 원천 :

(A) 유기체 : pMT2 CXM 에 삽입된 DNA

(xi) 서열 설명 : 서열 확인 번호 : 7 :

**CATGGGCAGC TCGAG**

(2) 서열 확인 번호 : 8에 대한 정보 :

( i ) 서열 특성 :

(A) 길이 : 34 염기쌍

(B) 유형 : 핵산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

( ii ) 분자 유형 : DNA ( 게놈 )

(vi) 원천 :

(A) 유기체 : pMT21에 삽입된 DNA

(ix) 특징 :

(A) 이름/키이 : misc\_feature

(B) 위치 : 1..6

(D) 기타 정보 : /주 = "PstI 제한 부위"

(ix) 특징 :

(A) 이름/키이 : misc\_feature

(B) 위치 : 15..26

(D) 기타 정보 ; /주 = "Eco RI 및 XhoI 제한 부위"

(ix) 서열 설명 : 서열 확인 번호 : 8 :

**CTGCAGGCGA GCCTGAATTC CTCGAGCCAT CATG**

(2) 서열 확인 번호 : 9에 대한 정보 :

( i ) 서열 특성 :

(A) 길이 : 68 염기쌍

(B) 유형 : 핵산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

( ii ) 분자 유형 : DNA ( 게놈 )

(vi) 원천 :

(A) 유기체 : EMC 비루스 리더 서열의 이름

( x ) 출판 정보:

(A) 저자 : Jung, S K

(C) 저널 : J. Virol.

(D) 권 : 63

(F) 페이지 : 1651-1660

(G) 일자 : 1989

(xi) 서열 설명 : 서열 확인 번호 : 9 :

**CGAGGTTAAA AAACGTCTAG GCCCCCCGAA CCACGGGGAC**

**GTGGTTTTCC TTTGAAAAAC ACGATTGC**

(2) 서열 확인 번호 : 10에 대한 정보 :

( i ) 서열 특성 :

(A) 길이 : 1584 염기쌍

(B) 유형 : 핵산

(C) 가닥수 : 단일

(D) 토폴로지 : 선형

( ii ) 분자 유형 : DNA (게놈)

( vi ) 원천 :

(A) 유기체 : 사람 BMP-10

( vii ) 직접 원천 :

(B) 클론 : 20GEN.3/HL-3

( ix ) 특징 :

(A) 이름/키 : CDS

(B) 위치 : 160..1431

( ix ) 특징 :

(A) 이름/키 : sig\_peptide

(B) 위치 : 160..1107

( ix ) 특징 :

(A) 이름/키 : mat\_peptide

(B) 위치 : 1108..1431

(xi) 서열 설명 : 서열 확인 번호 : 10 :

GCGGAGAGGA AGAGTGGTAG GGGGAGGGAG AGAGAGAGGA AGAGTTTCCA AACTTGTCTC	60
CAGTGACAGG AGACATTAC GTTCCACAAG ATAAAAGTGC CRCTTAGAGC CCAGGGAAGC	120
TAAACCTTCC TGGCTTGGCC TAGGAGCTCC AGCCGGAGTC ATG GGC TCT CTG GTC	174
Met Gly Ser Leu Val	
-316-315	
CTG ACA CTG TGC GCT CTT TTC TGC CTG GCA GCT TAC TTG GTT TCT GGC	222
Leu Thr Leu Cys Ala Leu Phe Cys Leu Ala Ala Tyr Leu Val Ser Gly	
-310 -305 -300	
AGC CCC ATC ATG AAC CTA GAG CAG TCT CCT CTG GAA GAA GAT ATG TCC	270
Ser Pro Ile Met Asn Leu Glu Gln Ser Pro Leu Glu Glu Asp Met Ser	
-295 -290 -285 -280	
CTC TTT GGT GAT GTT TTC TCA CAG CAA GAC GGT GTC GAC TTT AAC ACA	318
Leu Phe Gly Asp Val Phe Ser Glu Gln Asp Gly Val Asp Phe Asn Thr	
-275 -270 -265	
CTG CTC CAG AGC ATG AAG GAT GAG TTT CTT AAG ACA CTA AAC CTC ICT	366
Leu Leu Gln Ser Met Lys Asp Glu Phe Leu Lys Thr Leu Asn Leu Ser	
-260 -255 -250	
GAC ATC CCC ACG CAG GAT TCA GCC AAG GTG GAC CCA CCA GAG TAC ATG	414
Asp Ile Pro Thr Gln Asp Ser Ala Lys Val Asp Pro Pro Glu Tyr Met	
-245 -240 -235	
TTG GAA CTC TAC AAC AAA TTT GCA ACA GAT CGG ACC TCC ATG CCC TCT	462
Leu Glu Leu Tyr Asn Lys Phe Ala Thr Asp Arg Thr Ser Met Pro Ser	
-230 -225 -220	
GCC AAC ATC ATT AGG AGT TTC AAG AAT GAA GAT CTC TTT TCC CAG CCG	510
Ala Asn Ile Ile Arg Ser Phe Lys Asn Glu Asp Leu Phe Ser Gln Pro	
-215 -210 -205 -200	

GTC AGT TTT AAT GGG CTC CGA AAA TAC CCC CTC CTC TTC AAT GTG TCC Val Ser Phe Asn Gly Leu Arg Lys Tyr Pro Leu Leu Phe Asn Val Ser -195 -190 -185	558
ATT GCT CAC CAT GAA GAG GTC ATC ATG GCT GAA CTT AGG CTA TAC ACA Ile Pro His His Glu Glu Val Ile Met Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Thr -180 -175 -170	606
CTG CTC CAA AGG GAT CGT ATG ATA TAC CAT GGA GTA CAC CGG AAA ATT Leu Val Gln Arg Asp Arg Met Ile Tyr Asp Gly Val Asp Arg Lys Ile -165 -160 -155	654
ACC ATT TTT GAA GTC CTC GAC AGC AAA GCG GAT AAT GAG GGA GAA AGA Thr Ile Phe Glu Val Leu Glu Ser Lys Gly Asp Asn Glu Gly Glu Arg -150 -145 -140	702
AAC ATG CTG GTC TTC CTC TCT GGG GAC ATA TAT GGA ACC AAC AGT CAG Asn Met Leu Val Leu Val Ser Gly Glu Ile Tyr Gly Thr Asn Ser Glu -135 -130 -125 -120	750
TGG GAG ACT TTT GAT GTC ACA GAT CCC ATC AGA CGT TGG CAA AAG TCA Trp Glu Thr Phe Asp Val Thr Asp Ala Ile Arg Arg Trp Gln Lys Ser -115 -110 -105	798
GGC TCA TCC ACC CAG CAG CTG GAG GTC CAC ATT GAG AGC AAA CAC GAT Gly Ser Ser Thr His Gln Leu Glu Val His Ile Glu Ser Lys His Asp -100 -95 -90	846
GAA GCT GAG GAT GCC AGC AGT GGA CCC CTA GAA ATA GAT ACC AGT GCC Glu Ala Glu Asp Ala Ser Ser Gly Arg Leu Glu Ile Asp Thr Ser Ala -85 -80 -75	894
CAG AAT AAG CAT AAC CCT TTG CTC ATC GTG TTT TCT GAT GAC CAA AGC Gln Asn Lys His Asn Pro Leu Leu Ile Val Phe Ser Asp Asp Gln Ser -70 -65 -60	942
AGT GAC AAG GAG AGG AAG GAG GAA CTG AAT GAA ATG ATT TCC CAT GAC Ser Asp Lys Glu Arg Lys Glu Glu Leu Asn Glu Met Ile Ser His Glu -55 -50 -45 -40	990
CAA CTT CCA GAG CTG GAC AAC TTG GCG CTG GAT AGC TTT TCC AGT GGA Gln Leu Pro Glu Leu Asp Asn Leu Gly Leu Asp Ser Phe Ser Ser Gly -35 -30 -25	1038
CCT GCG GAA GAG GCT TTG TTG CAG ATG AGA TCA AAC ATC ATC TAT GAC Pro Gly Glu Glu Ala Leu Leu Gln Met Arg Ser Asn Ile Ile Tyr Asp -20 -15 -10	1086
TCC ACT GCG GGA ATC AGA AGG AAC GCC AAA GCA AAC TAC TGT AAG AGG Ser Thr Ala Arg Ile Arg Arg Asn Ala Lys Gly Asn Tyr Cys Lys Arg -5 1 5	1134
ACC CCC CTC TAC ATC GAC TTC AAG GAC ATT GCC TCG GAC TCC TCC ATC Thr Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Glu Ile Gly Trp Asp Ser Trp Ile 10 15 20 25	1182
ATC GCT CCG CCT GGA TAC GAA GCC TAT GAA TGC CGT GGT GTT TGT AAC Ile Ala Pro Pro Gly Tyr Glu Ala Tyr Glu Cys Arg Gly Val Cys Asn 30 35 40	1230
TAC CCC CTG GCA GAG CAT CTC ACA CCC ACA AAG CAT GCA ATT ATC CAG Tyr Pro Leu Ala Glu His Leu Thr Pro Thr Lys His Ala Ile Ile Gln 45 50 55	1278
GCC TTG GTC CAC CTC AAG AAT TCC CAG AAA GCT TCC AAA GCC TGC TGT Ala Leu Val His Leu Lys Asn Ser Gln Lys Ala Ser Lys Ala Cys Cys 60 65 70	1326
GTG CCC ACA AAG CTA GAG CCC ATC TCC ATC CTC TAT TTA GAC AAA GGC Val Pro Thr Lys Leu Glu Pro Ile Ser Ile Leu Tyr Leu Asp Lys Gly 75 80 85	1374
GTC CTC ACC TAC AAG TTT AAA TAC GAA GCC ATG GCC GTC TCC GAA TGT Val Val Thr Tyr Lys Phe Lys Tyr Glu Gly Met Ala Val Ser Glu Cys 90 95 100 105	1422
GCC TGT AGA TAGAAGAAGA GTCCTATGCC TTATTTAATA ACTGTAAATG Gly Cys Arg	1471
TGTATATTTG GGTTCCTAT TTAATGAGAT TATTTAATAA GGGGTACAG TAATAGAGCC	1531
TTGCTGCCIT CAGGAATCG ACAGGTCACT TTGTTGTAGG AAATGCATAT TTT	1584

(2) 서열 확인 번호 : 11에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 길이 : 424 아미노산

(B) 유형 : 아미노산

(D) 토폴로지 : 선형

(ii) 분자 유형 : 단백질

(xi) 서열 설명 : 서열 확인 번호 : 11 :

```

Met Gly Ser Leu Val Leu Thr Leu Cys Ala Leu Phe Cys Leu Ala Ala
-316 -315 -310 -305
Tyr Leu Val Ser Gly Ser Pro Ile Met Asn Leu Glu Gln Ser Pro Leu
-300 -295 -290 -285
Glu Glu Asp Met Ser Leu Phe Gly Asp Val Phe Ser Glu Gln Asp Gly
-280 -275 -270
Val Asp Phe Asn Thr Leu Leu Gln Ser Met Lys Asp Glu Phe Leu Lys
-265 -260 -255
Thr Leu Asn Leu Ser Asp Ile Pro Thr Gln Asp Ser Ala Lys Val Asp
-250 -245 -240
Pro Pro Glu Tyr Met Leu Glu Leu Tyr Asn Lys Phe Ala Thr Asp Arg
-235 -230 -225
Thr Ser Met Pro Ser Ala Asn Ile Ile Arg Ser Phe Lys Asn Glu Asp
-220 -215 -210 -205
Leu Phe Ser Gln Pro Val Ser Phe Asn Gly Leu Arg Lys Tyr Pro Leu
-200 -195 -190
Leu Phe Asn Val Ser Ile Pro His His Glu Glu Val Ile Met Ala Glu
-185 -180 -175
Leu Arg Leu Tyr Thr Leu Val Gln Arg Asp Arg Met Ile Tyr Asp Gly
-170 -165 -160
Val Asp Arg Lys Ile Thr Ile Phe Glu Val Leu Glu Ser Lys Gly Asp
-155 -150 -145
Asn Glu Gly Glu Arg Asn Met Leu Val Leu Val Ser Gly Glu Ile Tyr
-140 -135 -130 -125
Gly Thr Asn Ser Glu Trp Glu Thr Phe Asp Val Thr Asp Ala Ile Arg
-120 -115 -110
Arg Trp Gln Lys Ser Gly Ser Ser Thr His Gln Leu Glu Val His Ile
-105 -100 -95
Glu Ser Lys His Asp Glu Ala Glu Asp Ala Ser Ser Gly Arg Leu Glu
-90 -85 -80
Ile Asp Thr Ser Ala Gln Asn Lys His Asn Pro Leu Leu Ile Val Phe
-75 -70 -65
Ser Asp Asp Gln Ser Ser Asp Lys Glu Arg Lys Glu Glu Leu Asn Glu
-60 -55 -50 -45
Met Ile Ser His Glu Gln Leu Pro Glu Leu Asp Asn Leu Gly Leu Asp
-40 -35 -30
Ser Phe Ser Ser Gly Pro Gly Glu Glu Ala Leu Leu Gln Met Arg Ser
-25 -20 -15
Asn Ile Ile Tyr Asp Ser Thr Ala Arg Ile Arg Arg Asn Ala Lys Gly
-10 -5 1
Asn Tyr Cys Lys Arg Thr Pro Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Glu Ile Gly
5 10 15 20
Trp Asp Ser Trp Ile Ile Ala Pro Pro Gly Tyr Glu Ala Tyr Glu Cys
25 30 35
Arg Gly Val Cys Asn Tyr Pro Leu Ala Glu His Leu Thr Pro Thr Lys
40 45 50
His Ala Ile Ile Gln Ala Leu Val His Leu Lys Asn Ser Gln Lys Ala
55 60 65
Ser Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Glu Pro Ile Ser Ile Leu
70 75 80
Tyr Leu Asp Lys Gly Val Val Thr Tyr Lys Phe Lys Tyr Glu Gly Met
85 90 95 100
Ala Val Ser Glu Cys Gly Cys Arg
105

```

**(57) 청구의 범위****청구항 1**

(a)-(b)로 구성되는 군으로부터 선택되는 BMP-10 단백질을 코딩하는 단리된 DNA 서열 : (a) 서열 확인 번호 : 1의 뉴클레오티드 #779 또는 #797 ~ #1102; (b) 서열 확인 번호 : 10의 뉴클레오티드 #1108 또는 #1126 ~ #1431.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 DNA 서열이 하기 (a)-(b)로 구성되는 군으로부터 선택되는 DNA 서열: (a) 서열 확인 번호 : 2의 아미노산 #1 ~ #108을 코딩하는 뉴클레오티드; (b) 서열 확인 번호 : 11의 아미노산 #1 ~ #108을 코딩하는 뉴클레오티드.

**청구항 3**

제1항의 DNA 서열로써 형질전환된, CHO, COS-1, CV-1, 이.콜라이 균주, 비.서브틸러스, 슈도모나스중 선택된 숙주 세포.

**청구항 4**

제2항의 DNA 서열로써 형질전환된, CHO, COS-1, CV-1, 이.콜라이 균주, 비.서브틸러스, 슈도모나스중 선택된 숙주 세포.

**청구항 5**

하기 (a)-(b)로 구성된 군으로부터 선택된 DNA 서열을 포함하며, 연골 및/또는 뼈 형성을 유발하는 능력을 특징으로하는 단백질을 코딩하는 서열을 갖는 단리된 DNA 분자: (a) 서열 확인 번호 : 1의 뉴클레오티드 #779 ~ #1105; (b) 서열 확인 번호 : 10의 뉴클레오티드 #1108 ~ #1431.

**청구항 6**

제5항의 DNA 분자로써 형질전환된, CHO, COS-1, CV-1, 이.콜라이 균주, 비.서브틸러스, 슈도모나스중 선택된 숙주 세포.

**청구항 7**

제5항의 DNA 분자를 포함하는 벡터.

**청구항 8**

제7항의 벡터로써 형질전환된, CHO, COS-1, CV-1, 이.콜라이 균주, 비.서브틸러스, 슈도모나스중 선택된 숙주 세포.

**청구항 9**

서열 확인 번호 : 10의 뉴클레오티드 #160 ~ # 1431로 구성되는, BMP-10 단백질을 코딩하는 단리된 DNA 분자.

**청구항 10**

서열 확인 번호 : 10의 뉴클레오티드 # 1108 ~ #1431로 구성되고, DNA 코딩 서열에 프레임으로 결합되고 적당한 프로펩티드 5' 을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 더 포함하는 단리된 DNA 분자.

**청구항 11**

제9항의 DNA 분자를 포함하는 벡터.

**청구항 12**

제10항의 벡터로써 형질전환된, CHO, COS-1, CV-1, 이.콜라이 균주, 비.서브틸러스, 슈도모나스중 선택된 숙주 세포.

**청구항 13**

하기 (a)-(b)의 단계들로 구성되는, 정제 BMP-10 단백질 생산 방법: (a) BMP-10 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열로 구성되는, 제1항에 따른 DNA 서열로써 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 배양 상형으로부터 상기 BMP-10 단백질을 회수 및 정제하는 단계.

**청구항 14**

하기 (a)-(b)의 단계들로 구성되는, 정제 BMP-10 단백질 생산 방법: (a) BMP-10 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열로 구성되는, 제2항에 따른 DNA 서열로써 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 배양 상형으로부터 상기 BMP-10 단백질을 회수 및 정제하는 단계.

**청구항 15**

하기 (a)-(b)의 단계들로 구성되는, 정제 BMP-10 단백질 생산 방법: (a) BMP-10 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열로 구성되는, 제5항에 따른 DNA 서열로써 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 배양 상형으로부터 상기 BMP-10 단백질을 회수 및 정제하는 단계.

**청구항 16**

서열 확인 번호 : 11로 나열된 바의 아미노산 #1 ~ 아미노산 #108의 아미노산 서열로 이루어진 정제 BMP-10 폴리펩티드.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 상기 폴리펩티드는 각각의 서브유니트가 최소한 서열 확인 번호 : 11의 아미노산 #1 ~

아미노산 #108의 아미노산 서열을 포함하는 이량체인 정제 BMP-10 폴리펩티드.

#### 청구항 18

제16항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 한 서브유니트는 최소한 서열 확인 번호 : 11의 아미노산 #1 ~ 아미노산 #108의 아미노산 서열을 포함하고, 한 서브유니트는 BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8 및 BMP-9로 구성되는 군으로부터 선택된 뼈 형태형성 단백질에 대한 아미노산 서열을 포함하는 이량체인 정제 BMP-10 단백질.

#### 청구항 19

하기 (a)-(b)의 단계들에 의해 생산된 정제 BMP-10 단백질: (a) 서열 확인 번호 : 10에 제시된 바의 뉴클레오티드 #1108 ~ #1431의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 DNA로써 형질전환된 세포를 배양하는 단계; 및 (b) 서열 확인 번호 : 11에 제시된바의 아미노산 #1 ~ 아미노산 #108의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 상기 배양 상정으로부터 회수 및 정제하는 단계.

#### 청구항 20

제19항에 있어서, 세포가 포유동물 세포이고 DNA는 서열 확인 번호 : 10의 뉴클레오티드 #160 ~ #1107을 더 포함하는 정제 BMP-10 단백질.

#### 청구항 21

서열확인번호 11에 제시된바의 아미노산#1~ 아미노산 #108의 아미노산 서열을 포함하는 정제 BMP-10 단백질.