

A humán BMP-4-promóter és alkalmazása csonttal
kapcsolatos anyagok azonosítási eljárásában

A2

K I V O N A T

A találmány tárgyát a humán csont morfogenetikus fehérje (BMP, a továbbiakban BMP-4) promóterét tartalmazó 5'-végi DNS régió képezi. A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás a humán BMP-4-fehérje expresszióját pozitív vagy negatív irányban szabályozni képes kis molekulatömegű vegyület azonosítására, állati vagy élesztő eredetű sejtek alkalmazásával, amelyekbe olyan rekombináns expressziós vektort juttatnak, mely a humán BMP-4-promótert tartalmazó 5'-végi DNS régiót alkalmas riportergénhez integrálva tartalmazza, és indikátorként riportergén-aktivitást alkalmaznak.

A találmány szerinti megoldás alkalmas humán csont-morfogenetikus aktivitású kis molekulatömegű szerves vegyületek azonosítására.



Zoo. 06.27

**A humán BMP-4-promóter és alkalmazása csonttal
kapcsolatos anyagok azonosítási eljárásában**

A találmány tárgyát a humán csont morfogenetikus fehérje (BMP, a továbbiakban BMP-4) promóterét tartalmazó 5'-végi DNS régió képezi. A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás humán BMP-4-fehérje expresszióját pozitív vagy negatív irányban szabályozni képes kis molekulatömegű vegyület azonosítására, állati vagy élesztő eredetű sejtek alkalmazásával, amelyekbe olyan rekombináns expressziós vektort juttatunk, mely a humán BMP-4-promótert tartalmazó 5'-irányban elhelyezkedő DNS régiót alkalmas riportergénhez integrálva tartalmazza, és indikátorként riportergén-aktivitást alkalmazunk.

A találmány szerinti megoldás alkalmas humán csont-morfogenetikus aktivitású kis molekulatömegű szerves vegyületek azonosítására.

Napjainkig csont morfogenetikus aktivitást csak egy csont morfogenetikus faktornál - BMP - figyeltek meg, amely a TGF- β (transzformáló növekedési faktor) szupercsaládba tartozik [Science 150 893 (1965); Science 242 1528 (1988)]. Az ismert BMP típusok BMP-1-től BMP-14-ig terjednek. Ezek közül a BMP-2 - BMP-14 tagjaikról ismert, hogy csont morfogenetikus aktivitással rendelkeznek. A BMP-2 - BMP-14 BMP-eket tartják hatásosnak terápiás és megelőző kezelésre különböző csont rendellenességek és csont betegségek eseté-

ben, azonban ezek a természetben csak nagyon kis mennyiségekben fordulnak elő. Ezért tehát az ezen kezelésekben alkalmazott, BMP-2 - BMP-14 fehérjék nagy mennyiségeinek hozzáférhetővé tételéhez rekombináns fehérje előállítása szükséges. A rekombináns fehérje előállítása általában nagyon drága egy kis molekulatömegű vegyülethez viszonyítva. Másrészről a fehérje jellegéből adódóan a fizikai jellemzők és adagolás kérdésében gyógyszerként történő alkalmazás esetében sok korlátozással kell számolni. Ezeket a megállapításokat figyelembe véve egy, a fent említett BMP fehérjék aktivitásával - ha van egyáltalán - megegyező aktivitással rendelkező kismolekulájú szerves vegyület nagyon ígéretes gyógyszer lehet. A találmány által biztosított azonosítási eljárással kapott vegyület rendelkezik a humán BMP-4 - egy csont morfogenetikus fehérje - expresszióját indukáló aktivitással, és mivel a humán BMP-4-fehérjével megegyező aktivitással rendelkezik, fennáll annak lehetősége, hogy nagyon jól alkalmazható legyen. Ezzel ellentmondásban találhatunk olyan közleményt is [New Engl. J. Med., 335 555 (1996)], amelyben feltételezik, hogy a humán BMP-4 csont és porc hiperpláziát okozhat. Ebben az esetben a humán BMP-4 expressziójának gátlása megelőzheti a csont hiperpláziát. A találmány tárgyát képező eljárás segítségével a humán BMP-4 expresszió gátlása kimutatható, és a találmány tárgyát képező eljárás segítségével ilyen hiperpláziát megakadályozó anyag azonosítására is lehetőség nyílik.

Egy ilyen azonosítási eljárásra eddig csak egér BMP-2 promóter alkalmazásával található példa (WO97/15308), nem

található példa humán BMP-4-promóter alkalmazására. Az egér BMP-4-promóter régiót már korábban klónozták [Biochem. Biophys. Acta 1218 221 (1994)], de a humán BMP-4-promóter régió részletes szekvencia adatai még nem állnak rendelkezésre. A leírás során elsőként ismertetjük a humán BMP-4-promóter szekvenciáját. Az 5'-irányban elhelyezkedő DNS-régió teljes szekvencia homológiájának mértéke a humán és az egér BMP-4 között 52,2 százalék [J. Biol. Chem. 270 28364 (1995)]. A találmány szerinti azonosítási eljárásban alkalmazott anyagok teljes egészükben humán forrásokból származnak, így az azonosítás során kapott anyag gyakorlatilag klinikai alkalmazásra alkalmas lehet. Elvárásunk szerint olyan anyagot kapunk, amely képes a humán BMP-4 expresszió pontosabb szabályozására két promóter (promóter-1 és promóter-2) a gazdasejtekbe irányuló külön-külön vagy egyidejű transzfekciójával a rekombináns expressziós vektorban.

A találmány tárgyát képezi egy, a humán BMP-4-promóterét tartalmazó, 5'-irányban elhelyezkedő DNS-régió. A humán BMP-4-promótert tartalmazó 5'-irányban elhelyezkedő DNS-régió gént és egy megfelelő riportergént magába foglaló rekombináns expressziós vektort tartalmazó állati sejt alkalmazásával, a riporteraktivitás figyelemmel kísérésével megtalálhatók a humán BMP-4 expresszióját pozitív vagy negatív módon szabályozó kis molekulatömegű vegyületek. Az kis molekulatömegű vegyületek és azok származékai morfo-genetikus aktivitással és gátló hatással rendelkeznek csont és porc esetében a humán BMP-4 expresszióján keresztül, és

jól alkalmazhatók mint megelőző vagy terápiás ágensek porc és csont betegségeknél, csont-metasztázis gyógyszerekhez vagy terápiás és megelőző ágensekként alkalmazhatók csont-hiperplázia esetében.

Az 1. ábrán a humán BMP-4-gén 6,7 kb nagyságú 5'-irányban elhelyezkedő régiójának exon-intron struktúráját és egy restriktációs enzim térképét mutatjuk be.

A 2. ábra egy rekombináns expressziós vektort mutat be (pMSS116), amely tartalmazza a humán BMP-4-gén 5'-irányban elhelyezkedő régiójának 1. promóterét. Az 1. promóter régiót (1-3361. bázisok, a szekvencialistában az 1. azonosítási szám szerinti szekvenciával bemutatva, az 5'-végtől az *XhoI* helyig, ahogyan ez az 1. ábrán látható) a pGL3-alapvektor *NheI* és *XhoI* restriktációs enzim helyeibe illesztettük.

A 3. ábra egy rekombináns expressziós vektort mutat be (pMSS118), amely tartalmazza a humán BMP-4-gén 5'-irányban elhelyezkedő régiójának 2. promóterét. A 2. promóter régiót (2,3 kb) (3361-5645. bázisok, a szekvencialistában az 1. azonosítási szám szerinti szekvenciával bemutatva, az *XhoI* helytől az exon-2 *BglII* helyéig, ahogyan ez az 1. ábrán látható) a pGL3-alapvektor *XhoI* és *BglII* restriktációs enzim helyeibe illesztettük.

A 4. ábra egy rekombináns expressziós vektort mutat be (pMSS119), amely tartalmazza a humán BMP-4-gén 5'-irányban elhelyezkedő régiójának 1. és 2. promóterét. Az 1. és 2. promóter régiót (1-5645. bázisok, a szekvencialistában az 1. azonosítási szám szerinti szekvenciával bemutatva, az 5'-végtől az exon-2 *BglII* helyéig, ahogyan ez az 1. ábrán

látható) a pGL3-alapvektor *NheI* és *BglII* restrikciós enzim helyeibe illesztettük.

Az 5. ábrán mutatjuk be a humán BMP-4-promóter aktivitás mérésének eredményét (tranzienst expresszió).

A találmány tárgyát olyan DNS képezi, amelynek nukleotid szekvenciája megfelel a szekvencialistában az 1. azonosítási szám szerinti szekvenciában, az 1-6774. bázisok által képviselt szekvenciának, amely egy humán csont morfogenetikus fehérje-4 promóter régiót vagy annak fragmensét kódolja. A szekvencialistában az 1. azonosítási szám szerinti szekvencia mutatja be a humán BMP-4-gén 5'-irányban elhelyezkedő régiójának szekvenciáját.

A találmány tárgyát képezi egy eljárás a szekvencialistában az 1. azonosítási szám szerinti szekvenciával bemutatott DNS előállítására, amelynek során a következő lépéseket hajtjuk végre:

(1) humán placenta eredetű genomi DNS-t emésztünk *EcoRI* restrikciós enzimmal;

(2) agaróz gél elektroforézis segítségével izolálunk;

(3) az *EcoRI*-emésztett izolált DNS-fragmenst ugyanazon enzimmal kezelt λ DASH-II lambda fág vektorba klónozzuk;

(4) a vektort a fágba pakoljuk;

(5) genomi DNS klóntárt hozunk létre a fággal *Escherichia coli*-t fertőzve;

(6) PCR segítségével szkrínélünk; és

(7) szubklónozást végzünk plazmid vektorba.

Az itt alkalmazásra kerülő plazmid vektor kiválasztása nem korlátozott és a kereskedelemben hozzáférhető bármely

vektor alkalmazható. A vektorokra előnyösen alkalmazható példaként szolgálhat egy pUC18 vektor.

A találmány tárgyát rekombináns expressziós vektor képezi, amelyben az 1. azonosítási szám szerinti szekvenciával jellemzett DNS teljes hosszát vagy annak egy részét építettük be egy riportergénbe. Közelebbről meghatározva a rekombináns expressziós vektort úgy szerkesztjük meg, hogy egy riporter gént megelőző tartományban a humán BMP-4-gén 5'-irányban elhelyezkedő régiójában - amelyet a szekvencia-listában feltüntetett 1. azonosítási szám szerinti szekvencia képvisel - egy megfelelő régiót keresünk. A riporter gén - mint például a luciferáz vagy a β -galaktozidáz gén - egy expressziós állapotot mutat az eredeti termék szerint. A rekombináns expressziós vektorhoz eredetiként alkalmazható vektor közelebbről nem korlátozott és alkalmazható a kereskedelemben hozzáférhető bármely plazmid vektor. A találmány megvalósítása során a pGL3-alapvektort használtuk, mint előnyösen alkalmazható, példaként szolgáló vektor. A pGL3-alapvektor alkalmazásával kaptuk a pMSS116 (8,2 kb), pMSS118 (7,1 kb) és a pMSS119 (10,5 kb) vektorokat, amelyek a humán BMP-4-promótert és a luciferáz riporter gént tartalmazó rekombinációs expressziós vektorok. A találmány megvalósítása során ezeket a rekombináns expressziós vektorokhoz soroltuk be. Szükség van a rekombináns expressziós vektor liposzóma segítségével történő bejuttatására emlős sejtekbe, előnyösen humán oszteoblaszt-szerű sejtekbe, mint például az SaOS-2 sejtekbe. A rekombináns expressziós vektorokkal stabil módon transzfektált állati sejteket rezisz-

tencia marker segítségével választottuk ki.

A találmány tárgyát képezi egy eljárás csonttal összefüggésben álló anyag azonosítására, amelynek során a szekvencialistában található, az 1. azonosítási szám szerinti szekvenciával jellemzett DNS teljes hosszát vagy egy részét riportergénbe illesztjük és az ezt tartalmazó rekombináns expressziós vektort alkalmazzuk. A találmány tárgyát képezi az eljárás csonttal összefüggésben álló anyag azonosítására, amely eljárás során a csonttal összefüggésben álló anyag oszteogenezist indukáló anyag, vagy a csonttal összefüggésben álló anyag oszteogenezist gátló anyag. A humán BMP-4 expresszióját indukáló vagy gátló kis molekulatömegű vegyület előállítható oly módon, hogy izoláljuk a gén expresszióját szabályozó promótert, a promótert egy megfelelő riportergénhez kapcsoljuk és a gén struktúrát megfelelő emlős sejtbe juttatjuk be, hogy ezzel kutatásban alkalmazható rendszert állítsunk elő. A kutatásban alkalmazható rendszerben a humán BMP-4 expresszióját szabályozó vegyület a promóteren fejti ki hatását, hogy ezzel emelje vagy csökkentse a riportergén expressziós szintjét. Ennek következtében a riportergén aktivitás egyszerű és könnyű meghatározása lehetővé teszi a kívánt vegyület felderítését.

A vektorokkal transzfektált állati sejt jól alkalmazható kémiai vegyület könyvtár szkrínelési eljárásában nagy átbocsátó képességű szkrínelésre [Nature, 384 Suppl, 14 (1996)] és aktív vegyület felfedezésére természetes anyagokból. Az aktivitást növelő vagy csökkentő vegyület keresését úgy végezzük, hogy a sejtet megfelelő időtartamon ke-

resztül a vegyülettel kezeljük és ezt követően megmérjük a riporteraktivitást. Az így kapott vegyület szabályozhatja az expressziót közvetlenül, amikor hatását egy transzkripciós faktoron fejti ki, vagy közvetett módon hatását a humán BMP-4-promóteren kifejtve, szignál átviteli rendszer szabályozásán keresztül. Ennek következtében ezek a vegyületek hatásosan alkalmazhatók, mint terápiás ágensek csontporc betegségek esetében, csontra irányuló rák metasztázis esetében vagy csont-hiperplázia esetében.

A találmány megvalósítása során nyert vegyület csont vagy porc morfogenetikus aktivitással rendelkezik, és hatékony ágens terápiás és megelőző kezelésre az ortopédiai sebészet területén (törés, csont-arthritisz, mint például ízületi csont-arthritisz és medence ízületi csont-arthritisz, arthroseitisz, porc sérülése esetén, mint például a meniscus sérülése, sérülés vagy tumor eltávolítás okozta csont és porc hiány regenerációja, csont rekonstrukció, mint például gerinc fúzió és csigolyacsatorna kitágítása, valamint kongenitális porc és csont betegségek esetében, mint például a dyoszteogenezis és achondroplázia), vagy fogászati területeken (csont rekonstrukció, mint például palatoschisis, állkapocs rekonstrukció és reziduális taraj rekonstrukció) valamint oszteoporózis esetében. Továbbá a találmány tárgyát képező anyag alkalmazható csont átültetés esetében plasztikai sebészetben. Ezek a terápiás kezelések egyaránt érvényesek az állatorvosi sebészet területének terápiái esetében is. Másrészt viszont a találmány tárgyát képezi továbbá egy vegyület csont és porc morfogenezis gát-

lására. Ebben az esetben az anyagot a csont és porc hiperplázia terápiás és megelőző ágenseként alkalmazzuk.

Az alábbiakban bemutatott példákat a találmány jobb megértése érdekében tesszük közzé. A példák minden szempontból csupán a találmány jobb megértését szolgálják és nem korlátozó értelemben kerülnek bemutatásra.

1. példa

Humán BMP-4-gén 5'-irányban elhelyezkedő régiójának izolálása

Humán placenta genomi DNS-t (a CloneTech terméke) emésztettünk különböző restrikciós enzimekkel (*Bam*HI, *Bgl*III, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sma*I, *Sph*I és *Xba*I), agaróz gél elektroforézissel elválasztottuk, nylon membránra átvittük és standard körülmények között Southern hibridizációt végeztünk, próbaként BMP-4 cDNS-t alkalmazva [Science 242 1528 (1988)]. Ennek eredményeképpen azt találtuk, hogy az alkalmazott restrikciós enzimek közül az *Eco*RI restrikciós enzimmel történő emésztés egy körülbelül 7 kb nagyságú DNS-fragmenst adott, amely a leghosszabb humán BMP-4-gént tartalmazta. Ezt követően humán placenta eredetű genomi DNS-t emésztettünk az *Eco*RI restrikciós enzimmel és agaróz gél elektroforézissel választottuk el, hogy a körülbelül 7 kb hosszúságú DNS-fragmenst az agaróz gélből extraháljuk. Az így kapott DNS-fragmenst egy, az *Eco*RI restrikciós enzimmel emésztett λ DASH-II lambda fág vektorba (Stratagene Ltd.) klónoztuk. A vektort *in vitro* pakoltuk Gigapack III XL Extract-tal (Stratagene Ltd.) és *Escherichia coli* XL1-Blue MRA törzset (Stratagene Ltd.)

fertőztük, hogy genomi DNS klóntárt hozzunk létre. A klóntárt csoportokra osztottuk. Mindegyik csoportot szkrinelés-sel amplifikáltuk PCR alkalmazása mellett [Nucleic Acids Research 21 2627 (1993)], közelebbről meghatározva a PCR eljárás során az 1. exon régióinak megfelelő PCR primereket alkalmaztuk (2. és 3. azonosítási számmal rendelkező szekvenciák a szekvencialistában), hogy ezzel kiválasszuk a számunkra fontos csoportot és végül előállítsuk a humán BMP-4-gén 5'-irányban elhelyezkedő régióját (6,8 kb). Továbbá, az 5'-irányban elhelyezkedő 6,8 kb nagyságú fragmenst egy pUC18 vektorba szubklónoztuk (az Amersham Pharmacia Biotech terméke). A vektor az *E. coli* pKOT 312 vektor elnevezést kapta. Az *E. coli* pKOT 312 vektort 1998. március 30-án letétbe helyeztük az alábbi intézménynél: National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry, 1-3 Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japán, ahol a FERM P-16736 katalógus számot kapta; és a Budapesti Egyezmény értelmében 1999. február 17-én átadásra került a Nemzetközi Letéti Szervezet ("International Depository Authority") számára (katalógus szám: FERM BP-6650).

2. példa

A humán BMP-4-gén 5'-irányban elhelyezkedő régiója DNS-szekvenciájának meghatározása

A kapott humán BMP-4-gén 5'-irányban elhelyezkedő régiójának szekvenciáját az Amersham Pharmacia Biotech ALF DNS-szekvenátora segítségével határoztuk meg Sanger és munka-

társai eljárása szerint [Sanger és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 5463 (1977)]. Az így analizált szekvenciát a szekvencialistában az 1. azonosítási szám szerinti szekvenciában mutatjuk be.

3. példa

A humán BMP-4-promótert és egy luciferáz riporter gént tartalmazó rekombináns expressziós vektor megszerkesztése

Ahogy ezt az 1. ábrán bemutatjuk, a humán BMP-4 két promóterrel rendelkezik, az egyik az 1. exon előtt (1. promóter) és a másik a 2. exon után (2. promóter) helyezkedik el, az egér BMP-4-promóter struktúrájához hasonlóan. Ezután a pGL3-alapvektor luciferáz riporter vektor (a Pro Mega Ltd. terméke) riporter génjének az 5'-irányban elhelyezkedő *NheI* és *XhoI* restrikciós enzim hasító helyeibe beillesztettük az 1. promótert tartalmazó régiót - (az 5'-terminálistól az *XhoI* helyig, ahogy ez az 1. ábrán látható) - az 5'-terminálisban megtalálható, a pUC18 vektorból származó *XbaI* restrikciós enzim hasítóhely alkalmazásával, hogy ezzel létrehozzuk a pMSS116 rekombináns expressziós vektort (8,2 kb). Ezt mutatjuk be a 2. ábrán. Továbbá, a pMSS118 rekombináns expressziós vektort (7,1 kb) hoztuk létre oly módon, hogy a 2. promótert tartalmazó régiót (az *XhoI* helytől a 2. exonban található *BglII* helyig, ahogy ezt az 1. ábra mutatja) a pGL3-alapvektor *XhoI* és *BglII* restrikciós enzim hasító helyeibe illesztettük. Ezt mutatjuk be a 3. ábrán. Továbbá, az 1. promótert és a 2. promótert egyaránt tartalmazó régiót (az 5'-terminálistól a 2. exon *BglII* helyéig, ahogy ezt az 1. ábra mutatja) il-

lesztettük be a pGL3-alapvektor *NheI* és *BglII* restrikciós enzim hasító helyeibe a pUC18 vektorból származó *XbaI* hasítóhely alkalmazásával, - ugyanúgy mint a pMSS116 esetében - hogy ezzel létrehozzuk a pMSS119 rekombináns expressziós vektort (10,5 kb). Ezt mutatjuk be a 4. ábrán.

4. példa

A humán BMP-4-promóter aktivitásának mérése (rekombináns expressziós vektor bevitele emberi sejtbe és tranziens expresszió)

Annak érdekében, hogy a humán BMP-4 rekombináns expressziós vektort tranziens módon expresszáljuk, a fentebb leírt rekombináns expressziós vektorokat (pMSS116, pMSS118, pMSS119) belső kontrollként egyenlő mennyiségű pRL-SV40 vektorral kevertük össze - ez a vektor a tengeri árvácska ("sea pansy", egy lumineszkáló csalánozó faj, *Renilla* nemzetség) luciferáz gént (a Pro Mega cég terméke) tartalmazza - a gén bevitel hatékonyságának mérésére. Ezt követően kationos liposzóma lipofektamint (a Lifetech Oriental cég terméke) kevertünk a fentebb leírt DNS-oldathoz és humán csontszarkóma sejtekhez - HOS, MG63 és SaOS-2 sejtek - adtuk hozzá a transzfekció kiváltására. A szentjánosbogár ("firefly") és a tengeri árvácska luciferáz aktivitást "Pikka Gene Dual Kit" reagens készlettel határoztuk meg (a Toyo Ink cég terméke). Az eredményeket az 5. ábrán mutatjuk be. A promóter aktivitást a szentjánosbogár luciferáz aktivitás és a tengeri árvácska luciferáz aktivitás hányadosaként fejeztük ki. Az eredmények kimutatták, hogy a

szekvencialista 1. azonosítási számú DNS-szekvenciája promóter aktivitással rendelkezik.

5. példa

A humán BMP-4 rekombináns expressziós vektor bejuttatása emberi sejtbe és stabilizált expressziója

Annak érdekében, hogy a humán BMP-4 rekombináns expressziós vektort stabil módon expresszáljuk, a fentebb említett vektorokat pPUR vektorral kevertük össze 10:1 arányban - ez a vektor a puromycin rezisztencia gént tartalmazza (a CloneTech Ltd. terméke) - és ugyanakkor kationos liposzóma lipofektamint (a Lifetech Oriental cég terméke) is kevertünk hozzá, majd HOS humán csontszarkóma sejt-hez adtuk hozzá a transzfekció kiváltására. Azokat a sejteket, amelyekbe a kiválasztott gén bejutott, puromycint (a Sigma Ltd. terméke) tartalmazó táptalajon szelektáltuk.

6. példa

Aktív kis molekulatömegű vegyület szkrínelése

A kiválasztott sejteket 96-lyukas mikrotiter lemezre oltottuk, különböző kémiai vegyület könyvtárak anyagaival kezeltük 1-3 napig, egy citolítikus ágens (a Pro Mega Ltd. terméke) segítségével feloldottuk és enzim aktivitásra vizsgáltuk luciferáz vizsgálati reagens készlet alkalmazásával (a Pro Mega Ltd. terméke). Az ilyen eljárások alkalmazásával lehetőség nyílik különböző olyan anyagok felfedezésére, amelyek a humán BMP-4 expresszióját indukálják vagy gátolják.

SZEKVENCIALISTA

<210> 1

<211> 6774

<212> DNS

<213> humán

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(6774)

<223> A humán BMP-4-gén 5'végi szekvenciarészlete, amely tartalmazza az 1-3. exonokat magukba foglaló régiókat

<400> 1

```
gaattccttc cgtagcttca ccagacacct aattggccaa gaagggttga agacctgatg 60
tggttcttaa ttggggatgg ggaattaagg gctactgtat ctataggatt atcttttcac 120
ttgcatagac ctatttggtg tgttcagggc atagtgtatc tataattgcc atatttaaca 180
gtttataaag ttcaagccca gcatattctt tgcctgttta atgatgtctt ggtatcagcc 240
ttttaatggt acttatcagc atagaaaatg gaaacaaaat aactttttaa acagtagctc 300
tcaagcttta gtgtgctcag aatgaccaga gaaccttgtg aaatatacag atttctgggt 360
ccagatctgg ggcaggacca ggaagtctgc atttcatctg cacccccacc ctactctgag 420
gcttatagtc ctgagaacat gctttgaaaa aggctgtccc aagggtctgc agacaggcta 480
ttgaccagct actctttctt gatgttctcc aggaaaaccc acaaaggaa tgcctttcat 540
tgagtagtag cagcatagga gcaatagttg ctctgaatt atgggtgggt ttccctcttc 600
atcaatgtgc ttttaagggt cagtttcatt tgggtctatct accatgttct ataaaaacat 660
gaaaattcac aggtaagttt gagatacaga aaataactaa actgattctt ctcacgaact 720
ctgatcacta ggctgtgggt gatttagctc tctaaccaac aagtaatttg ttctttggca 780
tgagtaaggg gggaaaagga ggagtgggtg aaagcagctg ataacagatg gcttgcgccc 840
atctaaaatg tggggagaga aataaagctg tccaagaga actaaagctg agttctctcg 900
tcatatatct gaagattcat atcaggggtc taaacatggt atgtcgggtg gcttaattgg 960
aaactcctgg actgtgagtg tcacagactc atggatgggc caatcagtgg ccactttagt 1020
gtctgggctg cagcaaatg agacaatagc tgtcattcaa aaacctttgg aattaaaaaa 1080
accccgaaat gacattgggt ctttaaagta aaataaagtc ctgcctttaa gtccagcata 1140
tcaactgttg ttctgagttt aaatattaag aaccacattt cgttaatgat taaaacaaca 1200
```

gtgattgatt taggggctca gtgagcattt aatctgtcct gacttcaggt accatgctaa 1260
aggagcacia tgectgatgc tgcaggagaa acattaggta actatttaaat ggagttttta 1320
ttttctgtta ttatttttaa taattaattg tgattttgac tatttggaag ctacagggtat 1380
atcttctcct ccttttggg tggtgttatt gccctgccct gttttaatca gtgggttctta 1440
gagaaagtga actcaggagt gacttaaaat gaaggaagac ggactttggc taaaattaca 1500
attaaataat caaatcattt tcaaatataa agggagcatg cagatgatct ggcccaatcc 1560
tttcattctg cagatgagaa aactgaggct cataggaatg aaaagacttg cccaaagcca 1620
tacagcttgt ttctgttgtt tggtgcatta ggccaaaaga cctaggccta atagatggaa 1680
aatatggcag gatgtcttgg ccttgctctg acagttgctt ctctgatctc agatatttcc 1740
caccctttgt aaattctgtg ttccacacag gaagtagttc ttgtttttta aatatcgaag 1800
gtgtataaac gtaaagtttt tatagatgag ccaccaggg ccaatatctg ttttaagtaa 1860
gacctaaatg ctttgcagag acagtaaagt gtcattgtctg tcccaggga agaatccag 1920
gacaggaaat gctcagtctt ccagcactcc tctggctacc tggagctcag gctatgagcc 1980
tcaaccctc cctgaagcat tagctctgga gcagaggctg tgatttactt cagagatctg 2040
ggcaagtccc tttaacctgg tagtccttcc tttccttgtt tgtaaaacag agagatgagg 2100
ctgatagctc cctcacagct ccatcagagg cagtgtgtga aattagttcc tgtttggga 2160
ggtttaaaag ccaccacatt ccacctcct gctaataatga ttactaaaat gtttttatat 2220
gaaagggcca attcctcctc tcccccttc ctttaaaaac agaccaagg gcatcttttc 2280
ttgtctcct gtggcctaaa aggttactgc ttctgtggtt atctccttgg aaagacagag 2340
tgtcaggact cttaggtaca ccaaaaatga acaaaaaaat caacaacaac cataacacca 2400
acaaaaataa ctgctgtgtc ggttcttaag acggcttctg agctagaaac agatttttct 2460
aactgtaaaa aacgtggccc cagcctgtct gcaggccacc tctgtcttta ggcttgggg 2520
ggaggaggga agtgagctca ttactgggt ctacctcagg gtcattacca aggtgttcta 2580
caaacgcac tttagaatg ttttgaagg aaattcacct tttaacagcc caagagggtat 2640
ctctctctgg cacacagttc tgcacacagc ctgtttctca acgtttggaa atcttttaac 2700
agtttatgga aggccacctt ttaaaccgat ccaacagctc ctttctccat accctgattt 2760
tagagggtgtt tcattatctc taattactca gggtaaattg tgattactca gtgtttta 2820
catcagtttg ggcagcagtt aactaaact cagggaagcc cagactccca tgggtatttt 2880
tggaaggtag ggcgactagt cggtagatgc tttctagtac ctccgcagct ggtccccagg 2940
tgagccccag ccgttccca gagctggagg cagcggcgtc ccagctccga cggcagctgc 3000
ggactcggcg ctgcttggc ttccgggacc cgggcctgct aggcgaggtc gggcggtg 3060
aggggaggat gtggcgggg ctccatccc cagaaaggga ggcgagcgag ggaggaggga 3120
aggaggagg ggccgcccgg gaagaggagg aggaaggaaa gaaagaaagc gagggaggga 3180
aagaggagga aggaagatgc gagaaggcag aggaggagg agggaggga ggagcgcgga 3240
gcccgcccgg gaagctaggt gagtgtggca tccgagctga gggacgcgag cctgagacgc 3300
cgctgctgct ccggctgagt atctagcttg tctcccgat gggattccc tccaagctat 3360

ctcgagcctg cagcgccaca gtccccggcc ctcgcccagg ttcactgcaa ccgttcagag 3420
gtccccagga gctgctgctg gcgagcccgc tactgcaggg acctatggtg agcaaggcta 3480
cctggtgagg ggagacaggc agaggggggc taggagcctc cttgggggga agaagctggt 3540
cacaggctgt gaccgaggca aaaggtggcc taattatttt ccaatagtgg tgctggaggt 3600
ggggatgctg gcgctgaaag acctttaaat atcggtact gccctgcca ggccttctct 3660
gtccagcagt ccctgggaga gtctcacctt tgggaagtgc ggggcaggag agcagaaaca 3720
agagaagccc ttggtagggg ggtcgttggg aaaaactgtg ggtcttggg ctgaacgcgt 3780
tgcccacggg ctggaggttgc gatccccgg acggaagcg cgggaggagg aaggagagaa 3840
ccggctctga ggtccagaga gagtgagggg gcagagcgac ggcgagatgg ggagagaaca 3900
cctagctgga gcaggttctg cggtagagag cgagtcctg ctggcctctg gagagtgcgc 3960
gccgctccgg aggtgcgtc gaggggagtgc tcaccaatc tgggccccag ctggcggggc 4020
gcctgagagc ttgcgaactg cagttgcagg acgcgccttc tccacgagct attttcgtcg 4080
acttgcgga cccaaggaac ctgcctcta tcatttcacg gtgtaggggc cctagagacg 4140
acagccaaga tcccaggggc tcccaggacg cttgttctct cgggtgctg tcctatgggg 4200
agttcctggc gggacgaaag gcggacgcgc ggctcttctt ggcctccag gcccggaacc 4260
gacgggaaag gttcccgtga ttcccagtc cctgcaggct tcttccagcg ggagttggtc 4320
cgggggcctt agacgcctcc aagcactgct ttggaggatg gtttccaagg atcgcggttt 4380
gtgagttgaa ggctttgtga gaggttaaac ccccaaaaga tacatacttg gtaaactgag 4440
gctacctgta aacacatttc ggcattagga gaagattcga gtagggaagt gaaggacaac 4500
caccocgagt tacattcctt tcccccaata aaaagctctg gggatgaaag ttcttttggc 4560
ttttatcttt tcgatttaaa aatttgagaa gaaaatgtga ctagagatga atcctggtga 4620
atccgaaatt gaaacacaac tcccccttc ccttctctatc ctctcggttt tagaaccgcg 4680
ctctcccgc ccaggagatt ccttggggcc gaggggtttc cggggaaccg ggcgcccgcc 4740
ccttctactg tccctttgcc ccgcgggcac agcttgcctc cgtctgcttt ctctacttct 4800
ggacctctcc tcggcgggct ttttaaaggc cttctgcgtc tcaaaacaaa acaaaaaaac 4860
cctttgctct tcccaaccct ttgcagccc gccccagcgt ggcgcgggac cagcaaaggc 4920
gaaagcgccg cggtcttgc cgggcgcgga cggtcgcgca ggggcgcccg cggcctccgc 4980
acccggaact gaggtgttgg tcgactccgg gcattccacg tcgggagggg gggctgagct 5040
gttcgatact ttacttttct tcctcaaagt ctacctgcca atgcccctaa gaagaaaacc 5100
aagtatgtgc gtggagagtg gggcggcagg caaccagagt tcttgagctc cggagcgacc 5160
caaagcagca actgggaaca gcctcaggaa agggaggtcg ggtggagtgg gctttggggc 5220
aggagtcag gggcccgggc ccgggggacg acctggcgct cccggccctg ctgaacgctg 5280
agttgcgcct agtcgggttt tcgaagaggc ccttgcgcag agcgaccac gcgcgaggca 5340
gcatcttcga ttagtcagga catcccagta actgcttgaa ctgtaggtag gtaaaattct 5400
tgaaggagta tttgctgcgt gcgactctgc tgctggtgca acggaggaag ggggtggggg 5460
aagggaagtgg cgggggaagg actgtggtgg tggtttaaaa aataaggga gccgaggcga 5520

gagagacgca gacgcagagg tcgagcgag gccgaaagct gttcaccggt ttctcgactc 5580
cggggaacat ggtgggattt cctttctgcg ccgggtcggg agttgtaaaa cctcggccac 5640
attaagatct gaaaactgtg atgcgtcctt tctgcagcga cgctctttc tgaatctgcc 5700
cggagcttcg agccccggcg tctgtccctc agcctggcat ggcttcttcg ggggtctgct 5760
ttgcatgggg agagggggcca cgcagcgcg gactaggttt ggggattctc ggtaatggac 5820
ccggagcaat gactaacagc cgctccctct cactttccca cagcgatcac cctctaaccac 5880
cctccctccc attcccggcc ccgcgcgtga caaggctcggc tgctttcagc cgggagctag 5940
atcgggtggc cggctcttcg gaccttagcg agcgttcgcc aaggggtgac tggctgtcat 6000
tgggagcaat atttggcctt gaggagaccc tggggaggaa gtggcgggga gctcgtgttt 6060
gcttgtgtgt gtgtgggggg gtagtgtgtg taacacgcgc gtgggcaggg tccctctgcg 6120
ctttcctttt taagtgcctc tcggtggtga ggctttgggc gggtgagact ttcccgacct 6180
cgctcccggc ccacttaag ccgggttcga gctgggagac gcagtcctt cagtgcgccc 6240
caaatectct ggcttcaggt ggcccggcgc gggggcccag cacgacgcac cgcgccgaga 6300
accgggttct ccggtgcgtg cgccagtagc cctgggagcg cggcggccgc ggggcaccgg 6360
ccgaggctct gccgagcgcc gccgggagct cctcccggac cgctgaggct cgggcggcgg 6420
acgcggaggt tggcctcgcc tggaggggcg ggcccgcgag gggcgggggg ctgtggagga 6480
ggggagggcg cgcaggccct ttcgccgcct gccgcgggag gggcctcggc gctcacgtga 6540
ctccgagggg ctggaagaaa aacagagcct gtctgcggtg gagtctcatt atattcaaatt 6600
attcctttta ggagccattc cgtagtcca tcccagcaa cgactgctg cagcttccct 6660
gagcctttcc agcaagtttg ttcaagattg gctgtcaaga atcatggact gttattatat 6720
gccttgtttt ctgtcagtga gtagacacct cttccttccc cctccccgga attc 6774

<210> 2

<211> 30

<212> DNS

<213> humán

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(30)

<223> A humán BMP-4-gén 1. exon-régiójának megfelelő 5' végi
szekvenciájának klónozására alkalmas szensz láncindító

<400> 2

ggcagaggag gagggaggga gggaaggagc

30

<210> 3

<211> 30

<212> DNS

<213> humán

<220>

<221> misc_feature

<222> Complement(1)..(30)

<223> A humán BMP-4-gén 1. exon-régiójának megfelelő 5' végi
szekvenciájának klónozására alkalmas reverz láncindító

<400> 3

gggacctctg aacggttgca gtgaacctgg

30

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. DNS, amely a szekvencialistában bemutatott 1. azonosítási szám szerinti szekvencia 1-6774. bázisai szekvenciájának megfelelő nukleotid szekvenciával rendelkezik, és amely humán csont morfogenetikus fehérje-4 promóter régiót, vagy annak fragmensét kódolja.

2. Eljárás a szekvencialistában az 1. azonosítási számon bemutatott DNS előállítására, azzal jellemezve, hogy:

(1) humán placenta eredetű genomi DNS-t emésztünk *EcoRI* restrikciós enzimmal;

(2) agaróz gél elektroforézis segítségével DNS-fragmenst izolálunk;

(3) az *EcoRI* emésztett izolált DNS-fragmenst az ugyanazon enzimmal kezelt λ DASH-II lambda fág vektorba klónozzuk;

(4) a vektort a fágba pakoljuk;

(5) genomi DNS klóntárt hozunk létre a fággal *Escherichia coli*-t fertőzve;

(6) PCR segítségével szkrínélünk; és

(7) szubklónozást végzünk plazmid vektorban.

3. Rekombináns expressziós vektor, amely riportergénbe illesztve tartalmazza a szekvencialistában az 1. azonosítási számon bemutatott teljes hosszúságú DNS-t vagy annak egy részét.

4. Eljárás csonttal összefüggésben álló anyag azonosítására, azzal jellemezve, hogy az eljárás során 3. igénypont szerinti rekombináns expressziós vektort alkalmazunk.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás csonttal összefüggésben álló anyag azonosítására, azzal jellemezve, hogy csonttal kapcsolatos anyagként oszteogenezist indukáló anyagot azonosítunk.

6. A 4. igénypont szerinti eljárás csonttal összefüggésben álló anyag azonosítására, azzal jellemezve, hogy csonttal kapcsolatos anyagként oszteogenezist gátló anyagot azonosítunk.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



dr. Pethő Árpád

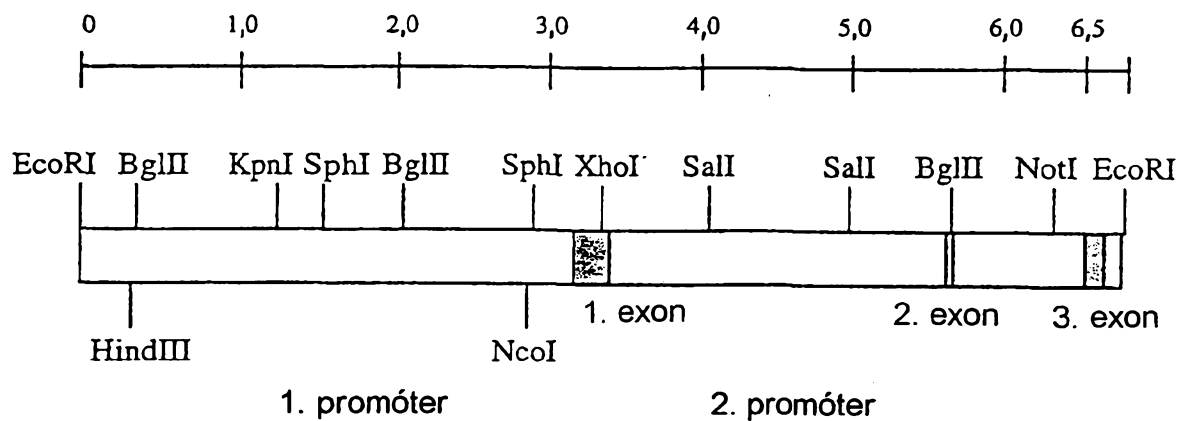
szabadalmi ügyvivő



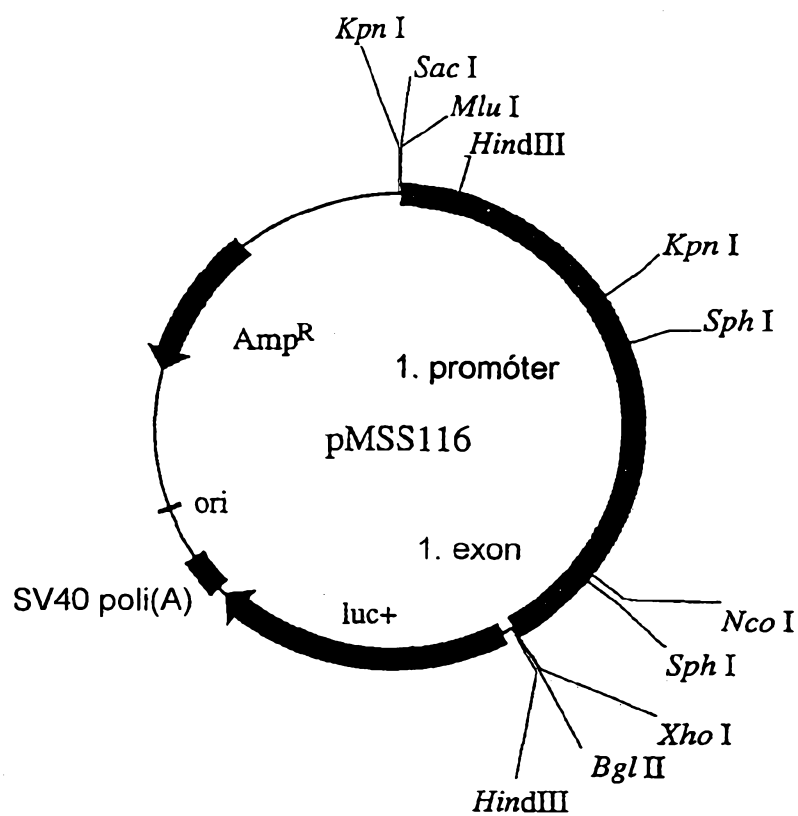
2008. 06. 27.

20x 50 75 2008

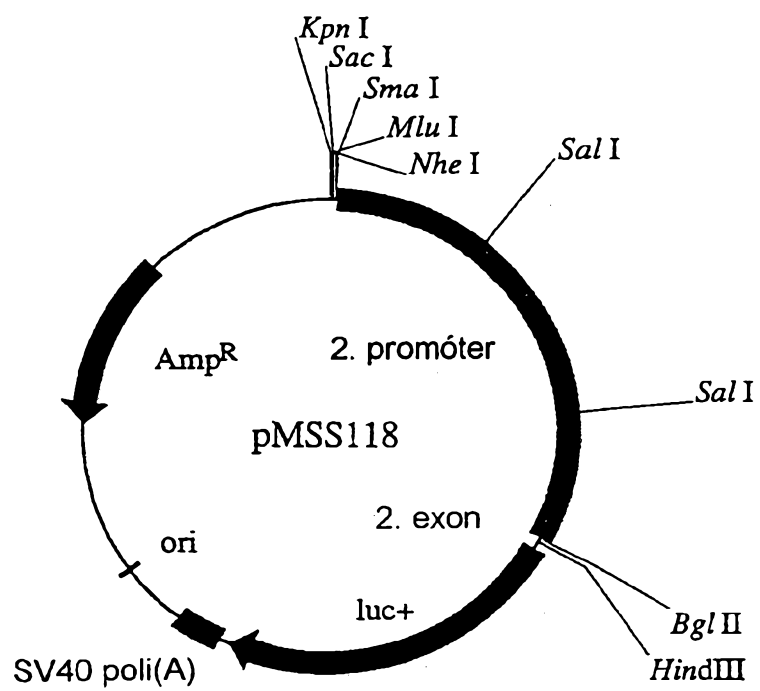
A2



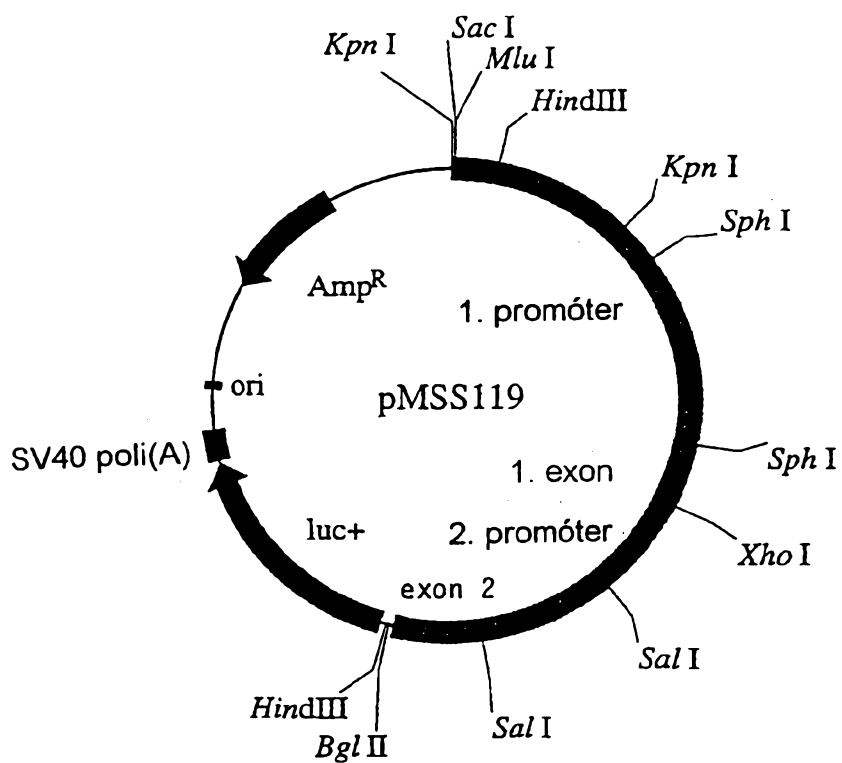
1. ábra



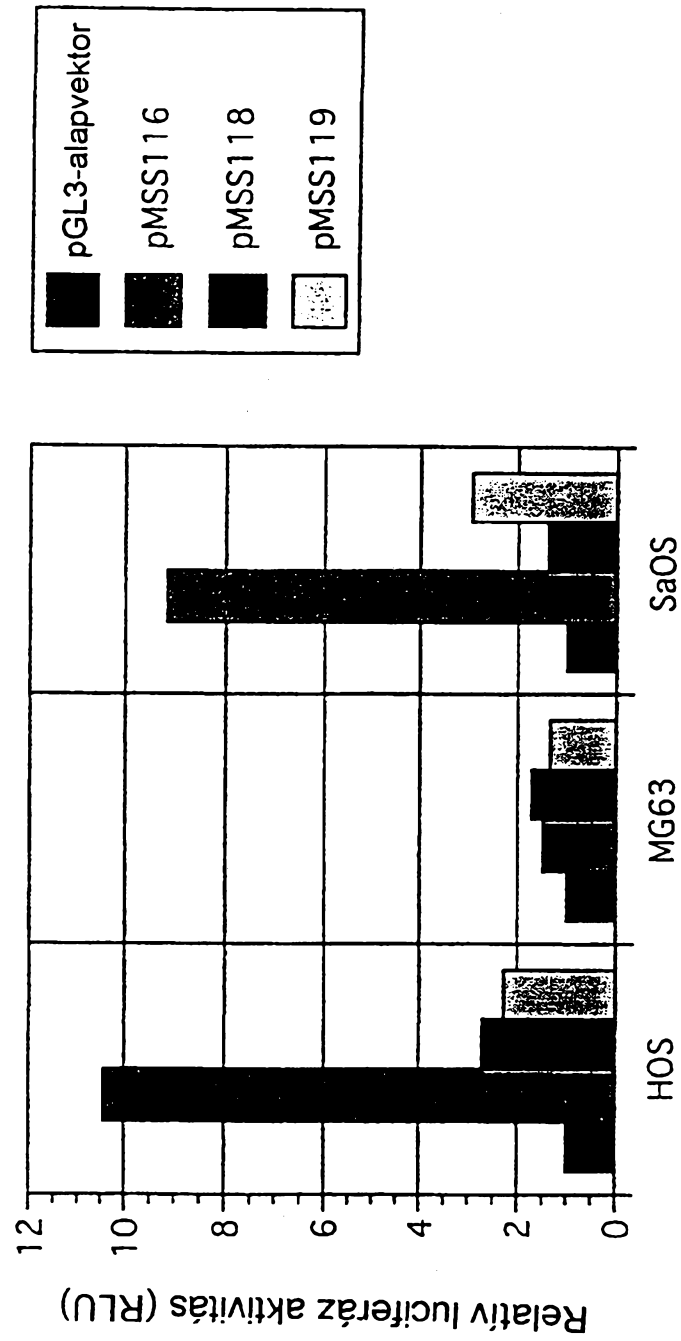
2. ábra



3. ábra



4. ábra



5. ábra