



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 310029

(13) B1

(51) Int Cl⁷ C 07 K 14/51, C 12 N 15/70, 15/81,
C 07 K 15/85, 5/10

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19963788	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1987.06.30, PCT/US87/01537
(22) Inng. dag	1996.09.10	(85) Videreføringssdag	1988.02.17
(24) Løpedag	1987.06.30	(30) Prioritet	1986.07.01, US, 880776
(41) Alm. tilgj.	1988.02.17		1986.12.17, US, 943776
(45) Meddelt dato	2001.05.07		1987.03.26, US, 31346
(62) Avdelt fra 19880701			

(71) Patenthaver Genetics Institute Inc, 87 Cambridge Park Drive, Cambridge, MA 02140, US
(72) Oppfinner Elizabeth A. Wang, Carlisle, MA, US
John M. Wozney, Hudson, MA, US
Vicki A. Rosen, Boston, MA, US
(74) Fullmektig Bryns Zacco AS, 0106 Oslo

(54) Benevnelse Fremgangsmåte for fremstilling av huBMP-2 klasse I (BMP-2) og II (BMP-4)

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag

Humane og bovine beninduserende faktor-produkter og fremgangsmåter er tilvelebragt. Faktorene kan fremstilles ved rekombinante teknikker og er nyttige ved forskning og behandling av ben- og tannrothinne-defekter.

Foreliggende oppfinnelsen vedrører fremgangsmåter for fremstilling av nye proteiner. Disse proteinene har mulighet for indusering av brusk- og bendannelse.

5 Ben er et høyt spesialisert vev kjennetegnet ved omfattende matriks-struktur som dannes av fibrøse bunter av proteinet kollagen, og proteoglykaner, ikke-kollagenholdige proteiner, lipider og sure proteiner. Fremgangsmåtene for bendannelse og fornyings/preparering av benvev, som skjer kontinuerlig
10 gjennom livet, utføres av spesialiserte celler. Normal dannelse av langskaft-skjelettdelene hos fostere forutgår for dannelsen av en bruskmodell. Benvekst utføres antagelig av "osteoblaster" (ben-dannende celler), mens ommodellering av ben utføres antageligvis av ben-resorberende celler, som
15 kalles "osteoklaster" og osteoblaster. Forskjellige knokkel-dannende, brusk-induserende og ben-induserende faktorer er blitt beskrevet. Se f.eks. Europa patentsøknad 148,155 og 159,016 angående diskusjoner derav.

20 Det er fremstilt nye proteiner i rensset form. Fire av de nye proteinene er betegnet BMP-1, BMP-2 klasse I (eller BMP-2), BMP-3, og BMP-2 klasse II (eller BMP-4) hvori BMP er ben-morfogen protein. To av disse, BMP-2 og BMP-4, er proteiner fremstilt ifølge oppfinnelsen. Proteinene er kjennetegnet ved
25 peptidsekvenser som er de samme som eller i vesentlig grad homologe til aminosyresekvensene illustrert i tabellene II til og med VIII nedenfor. De har mulighet for indusering av bendannelse ved et forutbestemt sted. Disse ben-induserende faktorene er videre kjennetegnet ved biokjemiske og bio-
30 logiske egenskaper som innbefatter en aktivitet ved en konsentrasjon på 10 til 1000ng/gram ben i en in vivo rotte-bendannende analyse som er beskrevet nedenfor. Proteinene fremstilt i denne oppfinnelsen kan bli kodet av DNA-sekvensene beskrevet i tabellene eller av sekvenser som har mulighet
35 for å hybridisere dertil og som koder for polypeptider ved benvekstfaktor biologiske egenskaper eller andre modifiserte sekvenser som demonstrerer slike egenskaper.

Et av proteinene betegnes BMP-1. En del av det humane BMP-1 eller hBMP-1 er kjennetegnet av den samme eller i vesentlig grad den samme peptidsekvensen som aminosyre #1 til og med #37 i tabell V nedenfor, som står for et genomisk hBMP-1 fragment eller aminosyre #1 til og med aminosyre #730 i tabell VI som står for hBMP-1 cDNA. hBMP-1 eller en beslektet ben-induserende faktor kan videre bli kjennetegnet ved i hvert fall en del av disse sekvensene. Disse peptidsekvensene er kodet av den samme eller vesentlig den samme DNA-sekvensen, som fremstilt i nukleotid #3440 til og med nukleotid #3550 i tabell V og i nukleotid #36 til og med nukleotid #2225 i tabell VI, respektivt. Disse hBMP-1 polypeptidene er videre kjennetegnet ved at de kan indusere bendannelse. hBMP-1 demonstrerer aktivitet i en in vivo rotte bendannelse-analyse ved en konsentrasjon på 10 til 1000ng/gram ben.

Den homologe bovine vekstfaktor betegnes bBMP-1, og er kjennetegnet ved en peptidsekvens som inneholder den samme eller vesentlig den samme sekvensen som den til aminosyre #1 til og med aminosyre #37 i tabell II som står for et genomisk bBMP-1 fragment. Denne peptidsekvensen blir kodet fra den samme eller vesentlig den samme DNA-sekvensen som fremstilt i nukleotid #294 til og med nukleotid #404 i tabell II. Den bovine peptidsekvensen identifisert i tabell II nedenfor har også en lengde på 37 aminosyrer. bBMP-1 er videre kjennetegnet ved at det kan indusere bendannelse.

Et annet beninduserende proteinpreparat fremstilt i denne oppfinnelsen er betegnet BMP-2 klasse I (eller BMP-2). Det er kjennetegnet ved i hvert fall en del av en peptidsekvens som er den samme eller vesentlig den samme som det til aminosyre #1 til og med aminosyre #396 i tabell VII som står for cDNA hBMP-2 klasse I. Denne peptidsekvensen blir kodet av den samme eller vesentlig den samme sekvensen, som fremstilt i nukleotid #356 til og med nukleotid #1543 i

tabell VII. Den humane peptidsekvensen identifisert i tabell VII har en lengde på 396 aminosyrer. hBMP-2 eller beslektede ben-induserende proteiner kan også kjennetegnes ved minst en del av denne peptidsekvensen. hBMP-2 klasse I blir videre kjennetegnet ved muligheten for å indusere bendannelse.

Det homologe bovine ben-induserende proteinet betegnet bBMP-2 klasse I (eller bBMP-2), har en DNA-sekvens som er identifisert i tabell III som representerer den genome sekvensen. Denne bovine DNA-sekvensen har en 129 aminosyre-kodende sekvens etterfulgt av omtrent 205 nukleotider (presumtiv 3' ikke-kodende sekvens). bBMP-2, klasse I er videre kjennetegnet ved muligheten for å indusere bendannelse. Et beninduserende proteinpreparat i oppfinnelsen er betegnet BMP-2 klasse II eller BMP-4. Det humane proteinet hBMP-2 klasse II (eller hBMP-4) er kjennetegnet ved minst en del av den samme eller vesentlig den samme peptidsekvensen mellom aminosyre #1 til og med aminosyre #408 i tabell VIII, som står for cDNA'et til hBMP-2 klasse II. Denne peptidsekvensen blir kodet av minst en del av den samme eller vesentlig den samme DNA-sekvensen som fremstilt i nukleotid #403 til og med nukleotid #1626 i tabell VIII. Denne faktoren er videre kjennetegnet ved muligheten til å indusere bendannelse.

Enda en annen ben-induserende faktor er representert ved det bovine homologe bBMP-3. bBMP-3 er kjennetegnet ved DNA-sekvensen og aminosyresekvensen i tabell IV A og B som står for den bovine genome sekvensen. Det blir kjennetegnet av minst en del av en peptidsekvens som er den samme eller vesentlig den samme som aminosyre #1 til og med aminosyre #175 i tabell IV A og B. BMP-3 er videre kjennetegnet ved muligheten til å indusere bendannelse. Den bovine faktoren kan bli benyttet som et verktøy for å oppnå det analoge humane BMP-3 proteinet eller andre pattedyr-ben-induserende proteiner. En riktig karakterisering av denne bovine ben-induserende faktoren tilveiebringer det essensielle "utgangspunktet" for fremgangsmåten som benytter denne sekven-

sen. Denne fremgangsmåten, som benytter teknikker som er kjent innen genteknologi, innbefatter bruk av den bovine DNA-sekvensen som en probe for å screene et humant genomisk eller cDNA-bibliotek; og identifisering av DNA-sekvensene som hybridiserer til probene. En klon med en sekvens som hybridiserer blir renset ved plaque-dannelse og DNA'et isolert derifra, subklonet og utsatt for DNA-sekvensanalyse. Humant hBMP-3 protein er fremstilt ved bruk av denne fremgangsmåten.

Foreliggende oppfinnelse omfatter en fremgangsmåte for fremstilling av huBMP-2 klasse I (BMP-2), kjennetegnet ved at den innbefatter dyrking av en mikroorganisme transformert med en vektor inneholdende en DNA-sekvens som koder for huBMP-1 i et egnet kulturmedium, hvor nevnte DNA-sekvens er nukleotidsekvensen som følger:

```

      10          20          30          40          50          60          70
GTCGACTCTA GAGTGTGTGT CAGCACTTGG CTGGGGACTT CTGGAACITG CAGGGAGAAAT AACTTGCCCA

      80          90          100         110          120          130          140
CCCCACTTTG CGCCGGTGGC TTTGGCCCGAG OGGAGCGGCG TTCCGCATCT CCGAGCCCCA CCGCCCGTCC

     150         160         170         180         190         200         210
ACTCCTCGGC CTTGCCCGAC ACTGAGAAGC TGTTCOCAGC GTGAAAAGAG AGACTGCGCG GCCCGCACCC

     220         230         240         250         260         270         280
GGGAGAAGGA GGAGGCAAAG AAAAGGAACG GACATTCGGT CCTTGCGCCA GGTCCTTTCA CCAGAGTTTT

     290         300         310         320         330         340         350
TCCATGTGGG CGCTCTTTCA ATGGAAGTGT CCCCAGGCGC TTCTTAGAAG GACTGCGGTC TCCTAAAGGT

           370           385           400
CGACC ATG GTG GCC GGG ACC CGC TGT CTT CTA GCG TTG CTG CTT CCC CAG GTC
      MET Val Ala Gly Thr Arg Cys Leu Leu Ala Leu Leu Leu Pro Gln Val

           415           430           445
CTC CTG GGC GGC GCG GGT GGC CTC GTT CCG GAG CTG GGC CGC AGG AAG TTC GCG
Leu Leu Gly Gly Ala Ala Gly Leu Val Pro Glu Leu Gly Arg Arg Lys Phe Ala

     460           475           490           505
GOG GCG TOG TOG GGC CGC CCC TCA TCC CAG CCC TCT GAC GAG GTC CTG AGC GAG
Ala Ala Ser Ser Gly Arg Pro Ser Ser Gln Pro Ser Asp Glu Val Leu Ser Glu

           520           535           550           565
TTC GAG TTG CCG CTG CTC AGC ATG TTC GGC CTG AAA CAG AGA CCC ACC CCC AGC
Phe Glu Leu Arg Leu Leu Ser MET Phe Gly Leu Lys Gln Arg Pro Thr Pro Ser

```

580 595 610
 AGG GAC GCC GTG GTG CCC CCC TAC ATG CTA GAC CTG TAT CGC AGG CAC TCG GGT
 Arg Asp Ala Val Val Pro Pro Tyr MET Leu Asp Leu Tyr Arg Arg His Ser Gly

625 640 655 670
 CAG CCG GCC TCA CCC GCC CCA GAC CAC CCG TTG GAG AAG GCA GCC AGC CGA GCC
 Gln Pro Gly Ser Pro Ala Pro Asp His Arg Leu Glu Arg Ala Ala Ser Arg Ala

685 700 715
 AAC ACT GTG CGC AGC TTC CAC CAT GAA GAA TCT TTG GAA GAA CTA CCA GAA ACG
 Asn Thr Val Arg Ser Phe His His Glu Glu Ser Leu Glu Glu Leu Pro Glu Thr

730 745 760 775
 AGT GGG AAA ACA ACC CCG AGA TTC TTC TTT AAT TTA AGT TCT ATC CCC ACG GAG
 Ser Gly Lys Thr Thr Arg Arg Phe Phe Phe Asn Leu Ser Ser Ile Pro Thr Glu

790 805 820 835
 GAG TTT ATC ACC TCA GCA GAG CTT CAG GTT TTC CGA GAA CAG ATG CAA GAT GCT
 Glu Phe Ile Thr Ser Ala Glu Leu Gln Val Phe Arg Glu Gln MET Gln Asp Ala

850 865 880
 TTA GGA AAC AAT AGC AGT TTC CAT CAC CGA ATT AAT ATT TAT GAA ATC ATA AAA
 Leu Gly Asn Asn Ser Ser Phe His His Arg Ile Asn Ile Tyr Glu Ile Ile Lys

895 910 925 940
 CCT GCA ACA GCC AAC TCG AAA TTC CCC GTG ACC AGT CTT TTG GAC ACC AGG TTG
 Pro Ala Thr Ala Asn Ser Lys Phe Pro Val Thr Ser Leu Leu Asp Thr Arg Leu

955 970 985
 GTG AAT CAG AAT GCA AGC AGG TGG GAA AGT TTT GAT GTC ACC CCC GCT GTG ATG
 Val Asn Gln Asn Ala Ser Arg Trp Glu Ser Phe Asp Val Thr Pro Ala Val MET

1000 1015 1030 1045
 CCG TGG ACT GCA CAG GGA CAC GCC AAC CAT GGA TTC GTG GTG GAA GTG GCC CAC
 Arg Trp Thr Ala Gln Gly His Ala Asn His Gly Phe Val Val Glu Val Ala His

1060 1075 1090 1105
 TTG GAG GAG AAA CAA GGT GTC TCC AAG AGA CAT GTT AGG ATA AGC AGG TCT TTG
 Leu Glu Glu Lys Gln Gly Val Ser Lys Arg His Val Arg Ile Ser Arg Ser Leu

1120 1135 1150
 CAC CAA GAT GAA CAC AGC TGG TCA CAG ATA AGG CCA TTG CTA GTA ACT TTT GGC
 His Gln Asp Glu His Ser Trp Ser Gln Ile Arg Pro Leu Leu Val Thr Phe Gly

1165 1180 1195 1210
 CAT GAT GCA AAA GGG CAT OCT CTC CAC AAA AGA GAA AAA CGT CAA GCC AAA CAC
 His Asp Gly Lys Gly His Pro Leu His Lys Arg Glu Lys Arg Gln Ala Lys His

1225 1240 1255
 AAA CAG CCG AAA CGC CTT AAG TCC AGC TGT AAG AGA CAC CCT TTG TAC GTG GAC
 Lys Gln Arg Lys Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg His Pro Leu Tyr Val Asp

1270 1285 1300 1315
 TTC AGT GAC GTG GGG TGG AAT GAC TGG ATT GTG GCT CCC CCG GGG TAT CAC GCC
 Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr His Ala

og hvor DNA-sekvensen er i relativ forbindelse med en ekspresjonskontrollsekvens derfor, og isolering av huBMP-2 klasse II fra nevnte kulturmedium.

5 Videre omfatter oppfinnelsen cDNA-sekvens, kjennetegnet ved at den blir valgt fra gruppen bestående av:

a. cDNA-sekvens som koder for huBMP-2 klasse I som innbefatter nukleotidsekvensen ifølge krav 1 eller en sekvens som hybridiseres dertil under stringente betingelser og som ved ekspresjon koder for et protein som har de samme egenskaper som huBMP-2 klasse I; og

10 b. cDNA-sekvens som koder for huBMP-2 klasse II som innbefatter nukleotidsekvensen ifølge krav 2 eller en sekvens som hybridiseres dertil under stringente betingelser og som ved ekspresjon koder for et protein som har de samme egenskaper som huBMP-2 klasse II.

Omfattet er også vektor, kjennetegnet ved at den inneholder og kan uttrykke en DNA-sekvens som koder for et humant benvekstinduserende protein, hvorpå DNA-sekvensen koder for proteinet som blir valgt fra gruppen bestående av:

a. en DNA-sekvens som koder for huBMP-2 klasse I som innbefatter nukleotidsekvensen ifølge krav 1; og

25 b. en DNA-sekvens som koder for huBMP-2 klasse II som innbefatter nukleotidsekvensen ifølge krav 2 eller en sekvens som hybridiseres dertil under stringente betingelser og som ved ekspresjon koder for et protein som har de samme egenskapene som huBMP-2 klasse II, samt mikroorganisme, kjennetegnet ved at den inneholder og kan uttrykke vektoren som tidligere nevnt, og at den velges fra gruppen bestående av en bakterie-celle, en gjær-celle og en mammalsk celle.

35 Benvekst-faktorene som tilveiebringes heri innbefatter også faktorer som koder fra sekvensene som ligner sekvensene i tabellene II - VIII, men hvorpå modifikasjoner er naturlig innbefattet (f.eks. alleliske variasjoner i nukleotidsekvens

som kan resultere i aminosyre-forandringer i polypeptidet) eller som er med vilje konstruert. For eksempel, syntetiske polypeptider kan helt eller delvis duplikere kontinuerlige sekvenser av aminosyreresidene i tabellene II - VIII. Disse sekvensene kan i kraft av å dele primære, sekundære eller tertiære strukturelle og konformasjons-karaktertrekk med benvekstfaktor polypeptider i tabellene II - VIII derfor inneholde felles benvekstfaktor biologiske egenskaper. De kan derfor bli benyttet som biologisk aktive substanser for naturlig forekommende benvekstfaktor-polypeptider i terapeutiske fremgangsmåter.

Andre spesifikke mutasjoner i sekvensene til benvekstfaktorene beskrevet heri innbefatter modifikasjoner av en eller begge av glykosyleringssetene. Ingen glykosylering eller bare delvis glykosylering resulterer fra aminosyresubstitusjon ved en eller begge asparagin-bundet glykosyleringsgjenkjennings-seter som er tilstede i sekvensen til benvekstfaktorene vist i tabellene II - VIII. Asparagin-bundet glykosylerings-gjenkjenningssetene innbefatter tripeptid-sekvensene som blir spesifikt gjenkjent av hensiktsmessige cellulære glykosyleringsenzymmer. Disse tripeptidsekvensene innbefatter enten asparagin-X-threonin eller asparagin-X-serin, hvor X vanligvis er en hvilken som helst aminosyre. Forskjellige aminosyresubstitusjoner eller delesjoner ved en eller begge av den første eller tredje aminosyreposisjonene til et glykosylerings-gjenkjenningssete (og/eller aminosyredelesjon ved den andre posisjonen) resulterer i ikke-glykosylering ved den modifiserte tripeptid-sekvensen.

Denne oppfinnelsen innbefatter også de nye DNA-sekvensene, som ikke har noen tilknytning til DNA-sekvenser som koder for andre proteinholdige materialer, og som koder ved ekspresjon for benvekstfaktorer. Disse DNA-sekvensene innbefatter de som er fremstilt i tabellene VII og VIII i en 5' til 3' retning og de sekvensene som hybridiserer under stringente hybridiserings-betingelser [se T. Maniatis et al, Molecular

Cloning (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory (1982), sidene 387 til 389] til DNA-sekvensene i tabellene VII og VIII.

5 DNA-sekvenser som hybridiserer til sekvensene i tabell VII og VIII under andre hybridiseringsbetingelser og som kode ved ekspresjon for benvekstfaktorer som har benvekstfaktor-biologiske egenskaper også koder for benvekstfaktorer i denne oppfinnelsen. For eksempel, en DNA-sekvens som deler områder
10 med signifikant homologi, f.eks. glykosyleringssteder eller disulfid-bindingssteder, med sekvensene i tabellene VII og VIII og som koder for en benvekstfaktor som har en eller flere benvekstfaktor-biologiske egenskaper koder helt klart for et medlem av denne nye vekstfaktorfamilien, selv om ikke
15 en slik DNA-sekvens ville hybridisere stringent til sekvensen i tabellene VII og VIII.

DNA-sekvensene som koder for benvekstfaktor-polypeptider som kodes av sekvensene i tabellene VII og VIII, men som har
20 forskjellig kodon-sekvenser på grunn av degenerasjon av den genetiske koden eller alleliske variasjoner (naturlig forekommende baseforandringer i arts-populasjonen som kan eller behøver ikke å resultere i aminosyreforandring) koder også for de nye vekstfaktorene beskrevet heri. Variasjoner i
25 DNA-sekvensene i tabellene VII og VIII som skyldes punktmutasjoner eller som skyldes induserte modifikasjoner for å øke aktiviteten, halveringstiden eller fremstilling av polypeptidene som kodes fra denne DNA-sekvensen er også innbefattet i denne oppfinnelsen.

30 Fremstilling av nye benvekstinduserende faktorer innbefatter dyrking av egnede celler eller cellelinjer, som er blitt transformert med en DNA-sekvens som ved ekspresjon koder for et nytt benvekstfaktor-polypeptid i oppfinnelsen, under
35 kontroll av kjente regulatoriske sekvenser. Egnede celler eller cellelinjer kan innbefatte pattedyrceller, såsom kinesisk hamster ovarie-celler (CHO). Seleksjon av egnede

pattedyr-vertsceller og fremgangsmåter for transformasjon, oppdyrking, amplifikasjon, screening og produktfremstilling og rensing er kjent innenfor fagområdet. Se, f.eks., Gething og Sambrook, Nature, 293:620-625 (1981), eller alternativt, Kaufman et al, Mol. Cell. Biol., 5(7):1750-1759 (1985) eller Howley et al, U.S. Patent 4,419,446. En annen egnet pattedyr-cellelinje, som er beskrevet i de vedlagte eksemplene er ape COS-1 cellelinje. En annen nyttig pattedyr-cellelinje er CV-1 cellelinje.

Bakterieceller er egnede verter. For eksempel, de forskjellige E. coli stammene (f.eks. HB101, MC1061) er velkjente vertsceller innenfor bioteknologi-området. Forskjellige B. subtilis, Pseudomonas-stammer, andre bakterier og lignende kan også bli benyttet i denne fremgangsmåten.

Mange gjærcelestammer som er kjent innenfor fagområdet er også tilgjengelige som vertsceller for ekspresjon av polypeptidene i denne oppfinnelsen. I tillegg, når det er ønskelig, kan insekts-celler bli benyttet som vertsceller i fremgangsmåtene i denne oppfinnelsen. Se f.eks. Miller et al, Genetic Engineering, 8:277-298 (Plenum Press 1986) og referanser som er beskrevet deri.

Vektorene ifølge oppfinnelsen inneholder fortrinnsvis hele den nye DNA-sekvensen som er beskrevet ovenfor som koder for nye faktorer i denne oppfinnelsen. Disse vektorene inneholder i tillegg hensiktsmessige ekspresjonskontroll-sekvenser som tillater ekspresjon av beninduserende proteinsekvenser. Vektorer som inneholder modifiserte sekvenser som beskrevet ovenfor er også innbefattet i denne oppfinnelsen og nyttige ved fremstilling av beninduserende proteiner. Vektorene kan bli benyttet i fremgangsmåten som transformerer cellelinjer og som inneholder selekterte regulatoriske sekvenser i operativ assosiasjon med DNA-kodingssekvensene til oppfinnelsen som kan lede replikasjonen og ekspresjonen derav i selekterte vertsceller. Egnede regulatoriske sekvenser for

slike vektorer er kjent for de som kjenner fagområdet og kan bli selektert avhengig av de selekterte vertsceller. Slik seleksjon er rutine og danner ikke deler av denne oppfinnelsen.

5

Et protein fremstilt ifølge oppfinnelsen, som induserer benvekst i de tilfeller hvor ben normalt ikke dannes, kan benyttes til leging av benbrudd. Et knokkeldannende preparat som innbefatter en eller flere av proteinene i denne oppfinnelsen kan ha profylaktisk bruk ved lukkede som åpen
10 bruddreduksjon og også ved en forbedret fiksering av kunstige ledd. Ny bendannelse indusert av et knokkeldannende middel deltar i reparasjon av kongenital, skadeindusert eller onkologisk bortskjæring induserte kranie-ansikts defekter, og
15 kan også benyttes i den kosmetiske, plastiske kirurgien. En knokkeldannende faktor i oppfinnelsen kan være verdifull i behandling av tannrotshinne-sykdommer, og i andre tannreparasjons-fremgangsmåter. Slike midler kan tilveiebringe et miljø for å tiltrekke bendannende celler, stimulere vekst
20 av bendannende celler eller indusere differensiering av stamceller til bendannende celler. Proteinene fremstilt ifølge oppfinnelsen kan også brukes i annen terapi.

25

BMP-2 klasse I kan bli brukt individuelt i et farmasøytisk preparat. BMP-2 klasse I kan også bli brukt sammen med en eller flere av de andre proteinene i denne oppfinnelsen. BMP-2 klasse I kan bli kombinert med BMP-2 klasse II. Den kan også kombineres med BMP-3. Videre kan BMP-2 klasse I bli kombinert med BMP-2 klasse II og BMP-3.

30

BMP-2 klasse II kan bli brukt individuelt i farmasøytiske preprater. I tillegg kan det bli brukt sammen med andre proteiner som definert ovenfor. Det kan videre bli brukt sammen med BMP-3.

35

En terapeutiske fremgangsmåte kan innbefatte lokal administrering av preparatet som et implantat eller innretning.

Når det blir administrert, er det terapeutiske preparatet som blir brukt i denne oppfinnelsen, selvfølgelig, i en pyrogenfri, fysiologisk akseptabel form. Preparatet kan hvis ønskelig være forkapslet eller bli injisert i en viskøs form for å føre det til benskade-stedet. Benvekst-induserende faktorpreparatet innbefatter helst en matriks som kan levere den beninduserende faktoren til benskade-stedet, og tilveiebringer en struktur for ben og bruske som utvikles og som eventuelt blir resorbert i kroppen. Slike matrikser kan bli dannet fra andre materialer som nå er i bruk ved andre implanterte medisinske forhold.

Valg av materiale er basert på, for eksempel, biokompatibilitet, biodegradabilitet, mekaniske egenskaper, kosmetisk fremstilling og interfase-egenskaper. Bruk av de benvekst-induserende faktorene vil definere den hensiktsmessige formuleringen. Potensielle matrikser for benvekstinduserende faktorer kan være bionedbrytbare og kjemisk definerte, såsom men ikke begrenset til, kalsiumsulfat, trikalsiumfosfat, hydroksyapatitt, polyledediksyre, polyanhydrid; bionedbrytbare og biologisk veldefinerte, såsom ben eller hud-kollagen, andre rene proteiner eller ekstracellulære matrikskomponenter; ikke-bionedbrytbare og kjemisk definerte, såsom sintret hydroksyapatitt, bioglass, aluminat, eller andre keramikk; eller kombinasjoner av hvilke som helst av de ovenfor nevnte materialtypene, såsom polyledediksyre og hydroksyapatitt eller kollagen og trikalsiumfosfat. Biokeramikken kan også bli forandret i komposisjon, såsom i kalsium-aluminat-fosfat og fremstilling for å forandre for eksempel porestørrelse, partikkelstørrelse, partikkelform og biodegradabiliteten.

Doseregimet vil bli bestemt av behandlende lege som avhenger av forskjellige faktorer som modifierer virkning av slike vekstfaktorer, f.eks. mengde benvekt som er ønskelig at det blir dannet, stedet for benskaden, tilstanden til det skadede benet, pasientens alder, kjønn og diett, alvorlighetsgraden til infeksjoner, tidspunkt for administrering og andre

kliniske faktorer. Dosen kan variere med matrikstyper som blir brukt til rekonstruksjon og sammensetningen av BMP'ene. Tilsetting av andre kjente vekstfaktorer, såsom IGF 1 (insulin-lignende vekstfaktor 1), til det endelige preparatet, kan også påvirke dosen. Generelt så bør doseregimet være i området på omtrent 10 til 10⁶ nanogram protein per gram benvekt som er ønskelig. Fremskritt kan bli avlest ved periodisk bestemmelse av benvekst og/eller reparasjon, f.eks. ved røntgen. Slike terapeutiske preparater er også nå verdifulle for veterinær-medisinsk bruk på grunn av mangel på arts-spesifisitet i beninduserende faktorer. Spesielt husdyr og fullblods hester i tillegg til mennesker er ønskelige pasienter for slik behandling med beninduserende faktorer i denne oppfinnelsen.

Følgende eksempler illustrerer bruk av denne oppfinnelsen i utvinning og karakterisering av bovine proteiner og bruk av disse til å utvinne humane proteiner, oppnåelse av disse humane proteinene og uttrykking av disse proteinene via rekombinante teknikker.

Eksempelene som følger nedenfor omfatter også andre beninduserende faktorer enn de som er omfattet av oppfinnelsen.

Eksempel I

Isolering av bovin beninduserende faktor.

Malt bovin-benpulver (20-120 mesh, Helitrex) er fremstilt i henhold til fremgangsmåten til M.R. Urist et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 70:3511 (1973) med eliminering av noen av ekstraheringsstegene som identifisert nedenfor. Ti kg malt pulver blir demineralisert i påfølgende skiftinger av 0.6N HCl ved 4°C over en 48-timers periode med vigorøs røring. Den resulterende suspensjonen blir ekstrahert i 16 timer ved 4°C med 50 liter 2M CaCl₂ og 10mM etylendiamin-tetraeddiksyre (EDTA), og etterfulgt av ekstraksjon i 4 timer i 50 liter 0.5M EDTA. Resten blir vasket tre ganger med destillert vann før det blir resuspendert i 20 liter 4M guanidin-hydroklorid

[GuCl], 20 mM Tris (pH 7.4), 1mM N-etylmaleimid, 1mM jodoacetamid, 1mM fenylmetylsulfonfyl-fluorin som beskrevet i Clin. Orthop. Rel. Res., 171: 213 (1982). Etter 16 til 20 timer blir supernatanten fjernet og erstattet med nye 10 liter GuCl-buffer. Resten ble ekstrahert i 24 timer til.

De rå GuCl ekstraktene blir slått sammen, konsentrert omtrent 20 ganger på et Pellicon-apparat med 10,000 molekylvekt av kutttings-membran, og deretter dialysert i 50mM Tris, 0.1M NaCl, 6M urea (pH7.2), som er utgangsbufferen for den første kolonnen. Etter lang dialyse blir proteinet applisert på en 4 liter DEAE cellulose-kolonne og de ubundede fraksjonene blir samlet.

De ubundne fraksjonene blir konsentrert og realisert mot 50mM NaAc, 50mM NaCl (pH 4.6) i 6M urea. De ubundne fraksjonene ble applisert på en karboksymetyl-cellulosekolonne. Protein som ikke bindes til kolonnen blir fjernet ved en omfattende vasking med utgangsbufferen, og materialet som inneholder beninduserende faktor blir desorbtert fra kolonnen med 50mM NaAc, 0.25mM NaCl, 6M urea (pH 4.6). Protein fra dette steget blir konsentrert 20- til 40- ganger, deretter fortynnet 5 ganger med 80mM KPO₄, 6M urea (pH6.0). pH til denne oppløsningen blir justert til 6.0 med 500mM K₂HPO₄. Prøven blir applisert på en hydroksyapatitt-kolonne (LKB) ekvilibrert i 80mM KPO₄, 6M urea (pH6.0) og alle ubundne proteinene blir fjernet ved å vaske kolonnen med den samme bufferen. Beninduserende faktoraktivitet blir eluert med 100mM KPO₄ (pH7.4) og 6M urea.

Protein blir konsentrert omtrent 10 ganger, og fast NaCl blir tilsatt til en final konsentrasjon på 0.15M. Dette materialet blir applisert på en heaprin- Sepharose kolonne ekvilibrert i 50m KPO₄, 150mM NaCl, 6M urea (pH7.4). Etter omfattende vasking av kolonnen med utgangsbufferen, blir et protein med beninduserende faktoraktivitet eluert med 50mM KPO₄, 700mM NaCl, 6M urea (pH7.4). Denne fraksjonen blir

konsentrert til et minimalt volum, og 0.4ml aliquoter blir applisert på Superose 6 og Superose 12 kolonner koblet i serier, ekvilibrert med 4M GuCl, 20mM Tris (pH7.2) og kolonnene dannet ved en elueringshasighet på 0.25ml/min. Proteinet som demonstrerer beninduserende faktoraktivitet har en relativ vandring som korresponderer til omtrent 30,000 dalton protein.

Fraksjonene ovenfor blir slått sammen, dialysert mot 50mM NaAc, 6M urea (pH4.6), og applisert på en Pharmacia MonoS HR kolonne. Kolonnen blir utviklet med en gradient på 1.0M NaCl, 50mM NaAc, 6M urea (pH4.6). De aktive fraksjonene blir slått sammen og bragt til pH3.0 med 10% trifluoroeddiksyre (TFA). Materialet blir applisert på en 0.46 x 25 cm Vydac C4 kolonne i 0.1% TFA og kolonnen utviklet med en gradient på 90% acetonitril, 0.1% TFA (31.5% acetonitril, 0.1% TFA til 49.5% acetonitril, 0.1% TFA i 60 minutter ved 1ml per minutt). Aktivt materiale blir eluert ved omtrent 40-44% acetonitril. Aliquoter av de hensiktsmessige fraksjonene blir jodinert ved hjelp av en av de følgende metodene: P.J. McConahey et al, Int. Arch. Allergy, 29:185-189 (1966); A.E. Bolton et al, Biochem J., 133-529 (1973); og D.F. Bowen-Pope, J. Biol. Chem., 237:5161 (1982). De jodinerde proteinene som er tilstede i disse fraksjonene blir analysert ved SDS gel-elektroforese og urea Triton X 100 isoelektrisk fokusering. Ved dette stadiet blir den beninduserende faktoren beregnet til å være omtrent 10-50% rent.

Eksempel II

Karakterisering av bovin-beninduserende faktor.

A. Molekylvekt.

Omtrent 20µg protein fra Eksempel I blir frysetørret og gjenoppløst i 1X SDS prøvebuffer. Etter 15 minutter oppvarming ved 37°C, blir prøven applisert til en 15% SDS polyakrylamid-gel og deretter elektroforeert med kjøling. Molekylvekten blir bestemt relativt til fargede molekylvektstandarder (Bethesda Research Labs). Rett etter at den er ferdig, blir

gel-filen som inneholder den beninduserende faktoren kuttet til 0.3cm deler. Hver dele blir moset og 1.4 ml 0.1% SDS tilsatt. Prøvene blir svakt rystet over natt ved romtemperatur for å eluere proteinet. Hver gel-bit blir avsaltet for å
5 forhindre interferens i den biologiske analysen. Supernatanten fra hver prøve blir surgjort til pH 3.0 med 10% TFA, filtrert gjennom 0.45 mikron membran og applisert på en 0.46cm x 5cm C4 Vydac kolonne utviklet med en gradient på 0.1% TFA til 0.1% TFA, 90% CH₃CN. De hensiktsmessige
10 beninduserende-faktor-inneholdende fraksjonene blir slått sammen og rekonstituert med 20mg rotte-matriks. I dette gelsystemet har hoveddelen av beninduserende-faktorfraksjonene en mobilitet som et protein som har molekylvekt på omtrent 28,000 - 30,000 daltons.

15

B. Isoelektrisk fokusering.

Det isoelektriske punktet til beninduserende faktoraktivitet blir bestemt i en denaturerende isoelektrisk fokuseringssystem. Triton X100 urea gel-systemet (Hoeffler Scientific) blir
20 modifisert som følger: 1) 40% av amfolyttene som blir brukt er Servalyte 3/10; 60% er Servalyte 7-9. 2) Katolytten som blir brukt er 40mM NaOH. Omtrent 20µg av protein fra Eksempel I blir frysetørret, løst opp i prøvebuffer og applisert på isoelektrofokuserende gelen. Gelen blir kjørt
25 ved 20 watt, 10°C i omtrent 3 timer. Ved fullførelse blir filen som inneholder beninduserende faktor kuttet i 0.5 cm biter. Hver bit blir knust i 1.0ml 6M urea, 5mM Tris (pH 7.8) og prøvene blir ristet ved romtemperatur. Prøvene blir surgjort, filtrert, avsaltet og analysert som beskrevet
30 ovenfor. Hoveddelen av aktiviteten slik den blir bestemt i analysen beskrevet i eksempel III vandrer på en måte som tyder med en pI på 8.8 - 9.2.

35

C. Subenhet karakterisering.

Subenhet-komposisjon til beninduserende faktor blir også bestemt. Ren beninduserende faktor blir isolert fra en preparativ 15% SDS-gel som beskrevet ovenfor. En del av

prøven blir deretter redusert med 5mM DTT i prøvebuffer og elektroforert på nytt på en 15% SDS-gel. Det omtrent 30kd proteinet gir to hovedbånd ved omtrent 20kd og 18kd, likeledes et mindre bånd ved 30kd. Bredden på de to båndene indikerer heterogenitet som skyldes sannsynligvis glykosylering, andre post-translasjonsmodifikasjoner, protolytisk degradering eller karbamylering.

Eksempel III

Biologisk aktivitet til den beninduserende faktoren.

En rotte-bendannelse analyse i henhold til de generelle fremgangsmåtene til Sampath og Reddi, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:6591-6595 (1983) blir brukt til å bestemme den knokkeldannende aktiviteten til den bovine beninduserende faktoren i denne oppfinnelsen som ble oppnådd i eksempel I. Denne analysen kan også bli brukt til å bestemme beninduserende faktorer i andre arter. Etanolpresipitasjonssteget blir erstattet med dialysering av fraksjonen som skal bli analysert mot vann. Oppløsningen eller suspensjonen blir deretter gjenoppløst i et flyktig oppløsningsmiddel, f.eks. 0.1 - 0.2% TFA, og den resulterende oppløsningen blir deretter satt til 20mg rotte-matriks. Dette stoffet blir frosset og frysetørket og det resulterende pulveret blir lagt inn i #5 gelatinkapsler. Kapslene blir implantert subkutant i brystbuk-området i 21 - 49 dag gamle hankjønns lang Evansrotter. De implanterte stoffene blir fjernet etter 7 - 10 dager. Halvparten av hvert stoff som blir implantert blir brukt i alkalisk fosfataseanalyser [se A.H. Reddi et al., Proc. Natl Acad Sci., 69:1601 (1972)] og halvparten blir fiksert og preparert for histologisk analyse. Lum glykolmetacrylat-seksjoner blir vanligvis farget med Von Kossa og syrefuschin for å detektere nye benminerale. Alkalisk fosfatase er et enzym som dannes av kondroblaster og osteoblaster i løpet av matriksdannelse, blir også målt. Ny knokkel og bendannelse henger ofte sammen med alkalisk fosfatase nivåer. Tabell I nedenfor illustrerer doseresponsen

i rotte-matrisprøver inkludert en kontroll som ikke er behandlet med induserende faktor.

TABELL I

Protein* implantert μ g	Knokkel	Alk.fos.u/1
7.5	2	Ikke utført
2.5	3	445.7
0.83	3	77.4
0.28	0	32.5
0.00	0	31.0

*På dette stadiet er den beninduserende faktoren omtrent 10-15% ren.

Ben eller knokler som blir dannet er fysisk begrenset til området som okkuperes av matrisen. Prøver blir også analysert ved SDS gelelektroforese og isoelektrisk fokusering som beskrevet ovenfor, etterfulgt av autoradiografi. Analysene viser en korrelasjon mellom aktivitet og proteinbåndene ved 28 - 30kd og ved pI 9.0. En ekstinksjonskoeffisient på 1 OD/mg-cm blir brukt som et estimat for protein og for en omtrentelig bestemmelse av renheten til den beninduserende faktoren i en bestemt fraksjon. I de in vivo rotte-bendannelse analysene gjort på fortyninger som beskrevet ovenfor, er proteinet aktivt in vivo ved 10 til 200ng protein/gram ben til sannsynligvis høyere enn øre protein/gram ben.

Eksempel IV

Bovin beninduserende faktor protein-sammensetning.

Proteinsammensetningen i eksempel IIA med molekylvekt 28 - 30 kd blir redusert som beskrevet i eksempel IIC og kuttet med trypsin. Åtte tryptiske fragmenter blir isolert ved hjelp av standard fremgangsmåte som har følgende aminosyresekvenser:

- Fragment 1: A A F L G D I A L D E E D L G
 Fragment 2: A F Q V Q Q A A D L
 Fragment 3: N Y Q D M V V E G
 Fragment 4: S T P A Q D V S R
 Fragment 5: N Q E A L R

Fragment 6: L S E P D P S H T L E E

Fragment 7: F D A Y Y

Fragment 8: L K P S N ? A T I Q S I V E

5 Et mindre rent proteinpreparat fra bovinben blir fremstilt i henhold til et rensningsskjema som ligner det som er beskrevet i eksempel I. Rensingen er noe forskjellig fra det som tidligere er beskrevet fordi den utelater DE-52 kolonnen, CM-cellulose kolonnen og mono S kolonnen, likeledes en reversering i rekkefølgen av hydroksylapatitt og heparing sefarosekolonner. Det konsentrerte rå 4 M ekstraktet bringes til 85% final konsentrasjon etanol ved 4 grader. Blandingen blir deretter sentrifugert, og presipitatet blir deretter igjen løst opp i 50 mM Tris, 0.15 M NaCl, 6.0 M urea. Dette materialet blir deretter fraksjonert på Heparin Sepharose som 15 beskrevet. Det Heparin-bundne materialet blir fraksjonert på hydroksyapatitt som beskrevet. De aktive fraksjonene blir slått sammen, konsentrert og fraksjonert ved høy-resolusjon gel-filtrering (TSK 30000 i 6 M guanidin-klorid, 50 mM Tris, 20 pH 7.2). De aktive fraksjonene blir slått sammen, dialysert mot 0.1% TFA, og deretter fraksjonert på en C4 Vydac reversfase kolonne som beskrevet. Preparatet blir redusert og elektroforert på en akrylamidgel. Proteinet som korresponderer til 18K-båndet blir eluert og kuttet med trypsin. 25 Tryptiske fragmenter blir isolert og har følgende aminosyresekvenser:

Fragment 9: S L K P S N H A T I Q S ? V

Fragment 10: S F D A Y Y C S ? A

Fragment 11: V Y P N M T V E S C A

30 Fragment 12: V D F A D I ? W

De tryptiske fragmentene 7 og 8 er vesentlig lik fragmentene 10 og 9, respektivt.

35 A. bBMP-1

Prober bestående av oligonukleotid-pools (eller unike oligonukleotider) er betegnet i henhold til fremgangsmåten

til R. Lathe, J. Mol. Biol., 183 (1):1-12 (1985) og fremstilt på en automatisert DNA-syntesemaskin. En probe består av en relativ lang (32 nukleotider) "guessmer" [se J.J. Toole et al., Nature, 312:342-347 (1984)] med følgende nukleotid-sekvens.

TCCTCATCCAGGGCAATGTCGCCAGGAAGGC

På grunn av at den genetiske koden er degenerert (mer enn et kodon kan kode for samme aminosyre), blir antall nukleotider i en probe-pool redusert basert på frekvensen hvorpå kodonet blir brukt i eukaryoter, den relative stabiliteten til G:T baseparene, og den relative sjeldne hyppigheten av dinukleotidet CpG i eukaryote kodingssekvenser [se Toole et al., ovenfor]. Det andre probe-settet består av kortere oligonukleotider (lengder på 17 nukleotider) som inneholder alle mulige sekvenser som aminosyrene kan kodes fra. Det andre probesettet har følgende sekvens:

(a) A [A/G] [A/G] TC [T/C] TC [T/C] TC [A/G] TC [T/C] AA

(b) A [A/G] [A/G] TC [T/C] TC [T/C] TC [A/G] TCNAG

Nukleotidene som står i parentes står for alternativer. "N" betyr enten A, T, C eller G.

I begge tilfeller blir områdene til aminosyresekvenser som blir brukt for probedannelse valgt ved å unngå kodoner som er sterkt degenererte hvor dette er mulig. Oligonukleotider blir fremstilt på en automatisert DNA-syntesemaskin; probene blir deretter radioaktivt merket med polynukleotid-kinase og ^{32}P -ATP.

Disse to probesettene blir brukt til å screene et bovint genomisk rekombinant bibliotek. Biblioteket blir fremstilt som følger: Bovint lever-DNA blir delvis kuttet med restriksjons-endonuklease enzym Sau 3A og sedimentert gjennom et sukrosegradient. Størrelse fraksjonert DNA i området på 15-30kb blir deretter ligert til bakteriofag Bam HI vektor EMBL3

[Frischauf et al, J. Mol. Biol., 170:827-842 (1983)]. Biblioteket blir deretter platet med 8000 rekombinanter per skål. Duplikate nitrocellulose-kopier av plaquene blir utført og amplifisert i henhold til en modifikasjon av fremgangsmåten til Woo et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:3688-91 (1978).

32-mer proben blir kinasebehandlet med ^{32}P -gamma-ATP og hybridisert til et filtersett 5X SSC, 0.1% SDS, 5X Denhardts, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ laksesperm-DNA ved 45 grader C og vasket med 5X SSC, 0.1% SDS ved 45 grader C. 17-mer probene blir kinasebehandlet og hybridisert til det andre filtersettet i 3M tetrametylammonium-klorid (TMAC), 0.1M natriumfosfat pH6.5, 1mM EDTA, 5X Denhardts, 0.6% SDS, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ laksesperm-DNA ved 48 grader C, og vasket i 3M TMAC, 50mM Tris pH8.0 ved 50 grader C. Ved disse betingelsene minimaliseres deteksjon av galt parrede nukleotider til 17-mer probe-pool'en [se Wood et al, Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A., 82:1585-1588 (1985)]. 400,000 rekombinanter blir screenet ved hjelp av denne fremgangsmåten og et positivt duplikat blir plaque-renset. DNA blir isolert fra et skål-lysat fra denne rekombinante bakteriofagen betegnet lambda bP-50. bP-50 ble deponert Desember 16, 1986 til the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD, USA (heretter "ATCC") under aksjonsnummer 40295. Dette og det andre som er deponert heri opprettholder Budapest Treaty når det gjelder "International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and Regulations thereunder". Denne bp-50 klonen koder i hvert fall for en del av den bovine benvekstfaktoren betegnet bBMP-1.

Oligonukleotid-hybridiseringsområdet til denne bBMP-1 klonen er lokalisert til et omtrentelig 800bp Eco RI fragment som blir subklonet inn i M13 og sekvensert ved bruk av standard teknikker. Den partielle DNA-sekvensen og den avledete aminosyresekvensen til lambda bP-50 er vist nedenfor i tabell II. Aminosyresekvenser som korresponderer til de tryptiske

fragmentene isolert fra bovin-ben 28 til 30kd materialet er understreket i tabell II. Den første understrekede delen av sekvensen korresponderer til tryptisk fragment 1 ovenfor som oligonukleotidprobene er konstruert fra. Den andre understrekede delen korresponderer til tryptisk fragment 2 ovenfor. De antatte aminosyresekvensene indikerer at tryptisk fragment 2 forutgås av et basisk residium (R) som er ventet i henhold til spesifisiteten til trypsin. Nukleinsyre-sekvensen som forutgås av den koblede CT ved nukleotidposisjoner #292-293 i tabell II er antatt å være et intron (ikke-kodende sekvens) basert på tilstedeværelse av en konsensus akseptor-sekvens (dvs. et pyrimidinrikt området, TCTCTCTCC, etterfulgt av AG) og mangel på det basiske residiet i den hensiktsmessige posisjonen til den avledete aminosyresekvensen. Denne bBMP-1 genome sekvensen fremgår i tabell II. Den presumptive bBMP-1 peptidsekvensen fra denne genome klonen har en lengde på 37 aminosyrer og kodes fra DNA-sekvensen fra nukleotid #294 til og med #404 i tabell II.

20

TABELL II

	280	290	(1)	308	323
	CCATGCCCTCT	TCTCTCTCCA	GCT GCC TTC CTT	GGG GAC ATC GCC CTG	GAC GAG GAG
			<u>Ala Phe Leu Gly Asp Ile Ala Leu Asp Glu Glu</u>		
25		338	353	368	
	GAC TTG AGG	GCC TTC CAA GTG CAG	CAG GCT GCG GAC CTC	AGA CAG CGT GCA ACC	
	<u>Asp Leu Arg</u>	<u>Ala Phe Gln Val</u>	<u>Gln Gln Ala Ala Asp Leu</u>	<u>Arg Gln Arg Ala Thr</u>	
	383	398	(37)	414	424
	CGC AGG TCT TCC	ATC AAA GCT GCA	GGTACACTGG	GTACAGGCCA	
	Arg Arg Ser Ser	Ile Lys Ala Ala			

30

b. bBMP-2

To prober bestående av oligonukleotid-pooler er konstruert på basis av aminosyresekvensen til fragment 3 og fremstilt på en automatisert DNA-syntesemaskin som beskrevet ovenfor.

35

Probe #1: A C N A C C A T [A/G] T C [T/C] T G [A/G] A T
 Probe #2: C A [A/G] G A [T/C] A T G G T N G T N G A

Disse probene er radioaktivt merket og blir brukt til å screene det bovine genombiblioteket konstruert som beskrevet i del A med unntagelse av vektoren er lambda J1 Bam H1 armer [Mullins et al Nature 308: 856-858 (1984).] Den radioaktivt merkede 17-mer probe #1 blir hybridisert til filtersettene i henhold til fremgangsmåten for 17-mer proben beskrevet i del A.

400,000 rekombinanter blir screenet ved fremgangsmåten beskrevet ovenfor i del A. Et positivt duplikat blir plaque-renset og DNA'et blir isolert fra et skål-lysat av den rekombinante bakteriofagen betegnet lambda bP-21. Bakteriofag bP-21 ble deponert med ATCC under aksesjonsnummer ATCC 40310 6. mars, 1987. bP-21-klonet koder for bovin vekstfaktor betegnet bBMP-2.

Oligonukleotid-hybridiserende området til denne bBMP-2 klonen blir lokalisert til et omtrentelig 1.2 kb Sac I restriksjonsfragment som blir subklonet inn i M13 og sekvensert ved bruk av standard teknikker. Den partielle DNA-sekvensen og DNA-avledete aminosyresekvensen til dette Sac I fragmentet og det tilstøtende Hind III-Sac I restriksjonsfragmentet til bP-21 er vist nedenfor i tabell III. bBMP-2 peptidsekvensen fra denne klonen har en lengde på 129 aminosyrer og blir kodet fra DNA-sekvensen fra nukleotid #1 til og med nukleotid #387. Aminosyresekvensen som korresponderer til det tryptiske fragmentet isolert fra bovin-ben 28 til 30kd materialet er understreket i tabell III. Den understrekede delen av sekvensen korresponderer til tryptisk fragment 3 ovenfor som oligonukleotidprobene for bBMP-2 er konstruert fra. Den antatte aminosyresekvensen indikerer at det tryptiske fragment 3 forutgått av et basisk residium (K) som er ventet på grunnlag av spesifisiteten til trypsin. Arginin-residiet som kodes av CGT-tripletten er antatt å være karboksy-termini til proteinet som er basert på tilstedeværelsen av et stoppkodon (TAG) som ligger ved siden av.

TABELL III

	(1)		15		30		45
	GGC CAC GAT GGG AAA GGA CAC CCT CTC CAC AGA AGA GAA AAG CGG						
	G H D G K G H P L H R R E K R						
5			60		75		90
	CAA GCA AAA CAC AAA CAG CGG AAA CGC CTC AAG TCC AGC TGT AAG						
	Q A K H K Q R K R L K S S C K						
			105		120		135
	AGA CAC CCT TTA TAT GTG GAC TTC AGT GAT GTG GGG TGG AAT GAC						
	R H P L Y V D F S D V G W N D						
10			150		165		180
	TGG ATC GTT GCA CCG CCG GGG TAT CAT GCC TTT TAC TGC CAT GGG						
	W I V A P P G Y H A F Y C H G						
			195		210		225
	GAG TGC CCT TTT CCC CTG GCC GAT CAC CTT AAC TCC ACG AAT CAT						
	E C P F P L A D H L N S T N H						
15			240		255		270
	GCC ATT CTC CAA ACT CTG GTC AAC TCA GTT AAC TCT AAG ATT CCC						
	A I V Q T L V N S V N S K I P						
			385		300		315
	AAG GCA TGC TGT GTC CCA ACA GAG CTC AGC GCC ATC TCC ATG CTG						
	K A C C V P T E L S A I S M L						
20			330		345		360
	TAC CTT GAT GAG AAT GAG AAG GTG GTA TTA AAG AAC TAT CAG GAC						
	Y L D E N E K V V L K N Y Q D						
			375	(129)	397		407
	ATG GTT GTC GAG GGT TGT GGG TGT CGT TAGCACAGCA AAATAAAATA						
	<u>M V V E G C G C R</u>						
25			417	427	437	447	457
	TAAATATATA TATATATATA TTAGAAAAAC AGCAAAAAAA TCAAGTTGAC						
			467	477	487	497	507
	ACTTTAATAT TTCCCAATGA AGACTTTATT TATGGAATGG AATGGAGAAA						
30			517	527	537	547	557
	AAGAAAAACA CAGCTATTTT GAAAACATA TTTATATCTA CCGAAAAGAA						
			567	577	587		
	GTTGGGAAAA CAAATATTTT AATCAGAGAA TTATT						
35							

C. bBMP-3

Prober bestående av oligonukleotid-pooler blir konstruert på basis av aminosyresekvensen til det tryptiske fragment 9 (probe #3), 10 (probe #2), og 11 (probe #1), og fremstilt på en automatisert DNA-syntesemaskin.

Probe #1: A C N G T C A T [A/G] T T N G G [A/G] T A

Probe #2: C A [A/G] T A [A/G] T A N G C [A/G] T C [A/G] A A

Probe #3: T G [A/G/T] A T N G T N G C [A/G] T G [A/G] T T

Et rekombinant bovint genomisk bibliotek konstruert i EMBL3 blir screenet ved bruk av TMAC hybridisasjonsfremgangsmåten beskrevet ovenfor i del A. 400,000 rekombinanter blir screenet i duplikat form med probe #1 som er blitt merket med ³²P. Alle rekombinanter som hybridiserer til denne proben blir platet om for å åpne sekundære. Triplikate nitrocellulose kopier blir laget av de sekundære skålene, og amplifisert som beskrevet. De tre filtersettene blir hybridisert til probe #1, #2 og #3, igjen under TMAC-betingelser. En klon, lambda bP-819, hybridiseres til alle tre probene og blir plaque-renset og DNA'et blir isolert fra et skål-lysat. Bakteriofag lambda bP-819 ble deponert med ATCC 16. juni, 1987 under aksjonsnummer 40344. Denne bP-819-klonen koder for den bovine vekstfaktoren betegnet bBMP-3.

Regionen til bP-819 som hybridiseres til probe #2 blir lokalisert og sekvensert. Det partielle DNA'et og deravledete aminosyresekvensen til denne regionen er vist i tabell IVA. Aminosyresekvensene som korresponderer til tryptisk fragment 10 og 12 er understreket. Den første understrekede sekvensen korresponderer til fragment 12 mens den andre korresponderer til fragment 10. Dette området av bP-819, som hybridiserer til probe #2 koder i hvert fall for 111 aminosyrer. Denne aminosyresekvensen blir kodet fra DNA-sekvensen fra nukleotid #414 til og med #746.

TABELL IV. A.

	383	393	403	413	(1)	428	
	GAGGAGGAAG	CGGTCTAOCG	GGGTCCTTCT	GCCTCTGCAG	AAC AAT GAG CTT	CCT GGG GCA	
					Asn Asn Glu	Leu Pro Gly	Ala
5	443		458		473		488
	GAA TAT CAG TAC AAG GAG GAT GAA GTA TGG GAG GAG AGG AAG CCT TAC AAG ACT		Glu Val Trp Glu Glu Arg Lys Pro Tyr Lys Thr				
	Glu Tyr Gln Tyr Lys Glu Asp						
		503		518		533	
	CIT CAG ACT CAG CCC CCT GAT AAG AGT AAG AAC AAA AAG AAA CAG AGG AAG GCA		Lys Ser Lys Asn Lys Lys Lys		Gln Arg Lys Gly		
	Leu Gln Thr Gln Pro Pro Asp						
10	548		563		578		593
	CCT CAG CAG AAG AGT CAG ACG CTC CAG TTT GAT GAA CAG ACC CTG AAG AAG GCA		Leu Gln Phe Asp Glu Gln Thr Leu Lys Lys Ala				
	Pro Gln Gln Lys Ser Gln Thr						
		608		623		638	
	AGA AGA AAG CAA TGG ATT GAA CCC OGG AAT TGT GCC AGA CCG TAC CTT AAA CTG		Arg Asn Cys Ala Arg Arg Tyr Leu Lys Val				
	Arg Arg Lys Gln Trp Ile Glu Pro Arg						
15	653		668		683		698
	GAC TTC GCA GAT ATT GGC TGG AGC GAA TGG ATT ATT TCC CCC AAG TCC TTC GAT		Ser Glu Trp Ile Ile Ser Pro Lys Ser Phe Asp				
	Asp Phe Ala Asp Ile Gly Trp						
		713		728		743 (111)	756
	GCC TAT TAC TGC TCC GGA GCG TGC CAG TTC CCC ATG CCA AAG GTAGCCATTG		Cys Gln Phe Pro MET Pro Lys				
	Ala Tyr Tyr Cys Ser Gly Ala						
20	766		776		786		
	TTTTTTGTCC	TGTCCTTCCC	ATTTCATAG				

bP-819 området som hybridiserer til probe #1 og #3 blir lokaliseret og sekvensert. Det partielle DNA'et og den avledete aminosyresekvensen til dette området er vist i tabell IVB. Aminosyresekvensene som korresponderer til de tryptiske fragmentene 9 og 11 er understreket. Den første understrekede sekvensen korresponderer til fragment 9, mens den andre understrekede sekvensen korresponderer til fragment 11. Den peptide sekvensen til dette området av bP-819 som hybridiserer til probe #1 og #3 har en lengde på 64 aminosyrer som kodes av nukleotid #305 til og med #493 i tabell IVB. Argininresidiet som blir kodet fra AGA-tripletten er antatt å være karboksy-termini til proteinet som er basert på tilstedeværelsen av et stopp-koden (TAA) som ligger ved siden av det. Nukleinsyresekvensen som forutgår den koblede TC

(posisjoner 305-306) er antatt å være et intron (ikke-kodende sekvens) som er basert på tilstedeværelse av en konsensus akseptor-sekvens (dvs. et pyrimidin-rikt område, TTCTCCCTTTTCGTTTCCT, etterfulgt av AG) og tilstedeværelsen av en stopp i stedet for et basisk residium i den hensiktsmessige posisjonen av den avledete aminosyresekvensen.

bBMP-3 er derfor kjennetegnet ved DNA og aminosyresekvensen i tabell IV A og tabell IV B. Peptidsekvensen til denne klonen har en lengde på 175 aminosyrer og blir kodet fra DNA-sekvensen fra nukleotid #414 til og med nukleotid #746 i tabell IV A og nukleotid #305 til og med nukleotid #493 i tabell IV B.

TABELL IV. B.

	284	294	304	(112)	319	
	CTAACCTG	TTCTCCCTTT	TCGTTTCCTAG	TCT TTG AAG	CCA TCA AAT CAC	GCT ACC
				<u>Ser Leu Lys</u>	<u>Pro Ser Asn His</u>	<u>Ala Thr</u>
	334	349	364	379		
	ATC CAG AGT	ATA GIG AGA	GCT GIG GGG	GTC GTC CCT	GGA ATC CCC	GAG CCT TGC
	<u>Ile Gln Ser</u>	<u>Ile Val Arg</u>	<u>Ala Val Gly</u>	<u>Val Val Pro</u>	<u>Gly Ile Pro</u>	<u>Glu Pro Cys</u>
	394	409	424	439		
	TGT GIG CCA	GAA AAG ATG	TCC TCA CTC	AGC ATC TTA	TTC TTT GAT	GAA AAC AAG
	<u>Cys Val Pro</u>	<u>Glu Lys MET</u>	<u>Ser Ser Leu</u>	<u>Ser Ile Leu</u>	<u>Phe Phe Asp</u>	<u>Glu Asn Lys</u>
	454	469	484	(175)		
	AAT GIG GTA	CTT AAA GTA	TAT CCA AAC	ATG ACA GTA	GAG TCT TGT	GCT TGC AGA
	<u>Asn Val Val</u>	<u>Leu Lys Val</u>	<u>Tyr Pro Asn</u>	<u>MET Thr Val</u>	<u>Glu Ser Cys</u>	<u>Ala Cys Arg</u>
	503	513	523	533		
	TAACCTGG	GIG AAGAAC	TCAT CTGGAT	GCTT AACTCA	ATCG	

Eksempel V

Humane beninduserende faktorer.

A. hBMP-1

På grunn av at bovine og humane benvekstfaktorgener er antatt å være signifikant homologe, blir den bovine bBMP-1 DNA-sekvensen i tabell II (eller deler derav) brukt som en probe til å screene et humant genomisk bibliotek. 800bp EcoRI fragmentet til den bovine genome klonen blir merket med ³²P

ved nick-translasjon. Et humanet genomisk bibliotek (Toole et al., supra) blir platet på 20 skåler med 40,000 rekombinanter per skål. Duplikate nitrocellulose filterkopier blir laget av hver skål og hybridisert til nick-translatert probe i 5 X SSC, 5 X Denhardt's, 100µg/ml denaturert laksesperm DNA, 0.1% SDS (standard hybridisasjons-oppløsninger) ved 50 grader C i omtrent 14 timer. Filtrene blir deretter vasket i 1 X SSC, 0.1% SDS ved 50 grader og utsatt for autoradiografi. Fem positive duplikater blir isolert og plaque-renset. DNA tilveiebringes fra et skål-lysat til en av disse rekombinante bakteriofag, betegnet LP-H1. LP-H1 ble deponert ved ATCC 6. mars, 1987 under aksjonsnummer 40311. Denne klonen koder i hvert fall for en del av den humane genome benvekstfaktor betegnet hBMP-1. Hybridiseringsområdet til LP-H1 er lokalisert til et 2.5 kb XbaI/HindIII restriksjonsfragment.

Den partielle DNA-sekvensen og avledete aminosyresekvensen til lambda LP-H1 er vist nedenfor i tabell V. Peptidsekvensen fra denne klonen har en lengde på 37 aminosyrer og blir kodet fra DNA-sekvensen fra nukleotid #3440 til og med nukleotid #3550. Den kodende sekvensen i tabell V er flankert av omtrent 28 nukleotider (en antatt 5' ikke-kodende sekvens) og omtrent 19 nukleotider (en antatt 3' ikke-kodende sekvens). En sammenligning av bBMP-1 sekvensen i tabell II med hBMP-1 genomisk sekvens i tabell V indikerer den signifikante homologien mellom de to.

På grunnlag av størrelsen av de kodende områdene og posisjonene til ikke-kodende områdene generelt er konserverte i homologe gener fra forskjellige arter, så kan beliggenhetene til de kodende og ikke-kodende områdene til beninduserende faktorgenene bli identifisert. Homologiområder mellom genene til de to artene, flankert av RNA-prosesserings-signaler ved homologe seter, indikerer et kodende område.

TABELL V

	3419	3429	3439	(1)	3454	
	CAGCCCTGGC	TTCTTCTTTT	CTCTTTAGCT	GCC TTT CTT	GGG GAC ATT	GCC CTG GAC
				Ala Phe	Leu Gly	Asp Ile Ala Leu Asp
5	3469	3484		3499		3514
	GAA GAG GAC	CTG AGG GCC	TTC CAG GTA	CAG CAG GCT	GTG GAT CTC	AGA OGG CAC
	Glu Glu Asp	Leu Arg Ala	Phe Gln Val	Gln Gln Ala	Val Asp Leu	Arg Arg His
	3529		3544	(37)	3560	3570
	ACA GCT CGT	AAG TCC TCC	ATC AAA GCT	GCA GGTAAGCOGG	GIGCCAATGG	
	Thr Ala Arg	Lys Ser Ser	Ile Lys Ala	Ala		

En probe som er spesifikk for den humane kodende sekvensen gitt i tabell V blir brukt til å identifisere en human cellelinje eller vev som fremstiller beninduserende faktor. Proben lages i henhold til følgende fremgangsmåte. To oligonukleotider som har følgende sekvenser:

(a) GGGAATTCTGCCTTTCTTGGGGACATTGCCCTGGACGAAGAGGACCTGAG

(b) CGGGATCCGTCTGAGATCCACAGCCTGCTGTACCTGGAAGGCCCTCAGG

fremstilt på en automatisert syntesemaskin, sammensmeltet, utvidet ved bruk av Klenow-fragmentet til E. coli DNA-polymerase I, kuttet med restriksjonszymer Eco RI og Bam HI, og satt inn i en M13 vektor. En enkelt-trådet ³²P-merket probe blir deretter fra templatfremstilling av denne subklo- net ved bruk av standard teknikker. Polyadenylerte RNA'er fra forskjellige celle- og vevskilder blir deretter elektro- forert på formaldehyd-agarosegeler og overført til nitro- cellulose ved bruk av fremgangsmåten til Toole et al., ovenfor. Proben blir deretter hybridisert til nitrocellulose blottet i 50% formamid, 5 X SSC, 0.1% SDS, 40 mM natriumfos- fat pH 6.5, 100 µg/ml denaturert laksesperm DNA, og 5 mM vanadyl ribonukleosider ved 42°C over natt og vasket ved 65°C i 0.2 X SSC, 0.1% SDS. Etter autoradiografi, inneholder filen som inneholder RNA fra den humane osteosarkoma celle- linjen U-2 OS hybridiserende bånd som korresponderer RNA- arter på omtrentelig 4.3 og 3.0 kb.

cDNA blir fremstilt fra U-2 OS polyadenylert RNA og klonet inn i lambda gt10 ved bruk av etablerte teknikker (Toole et

al., ovenfor). 20,000 rekombinanter fra dette biblioteket blir platet på hver av 50 skåler. Duplikate nitrocellulose kopier blir laget av skålene. De ovenfor beskrevne oligonukleotidene blir kinasebehandlet med ^{32}P -gamma-ATP og hybridisert til de to replika-settene ved 55°C i standard hybridisasjonsoppløsning over natt. Filtrene ble deretter vasket i 1 X SSC, 0.1% SDS ved 55°C og utsatt for autoradiografi. Et positivt duplikat, betegnet lambda U2OS-1, blir plaque-renset. Lambda U2OS-1 ble deponert med ATCC 16. juni, 1987 under aksjonsnummer 40343.

Hele nukleotidsekvensen og avledete aminosyresekvensen av innskuddet til lambda U2OS-1 er gitt i tabell VI. Denne cDNA klonen koder for en Met etterfulgt av en hydrofob ledersekvens som er karakteristisk for et protein som utskilles, og inneholder et stoppkodon ved nukleotidposisjonene 2226-2228. Denne klonen inneholder en åpen leseramme på 2190bp, som koder for et protein på 730 aminosyrer med en molekylvekt på 83kd som er basert på denne aminosyresekvensen. Klonen inneholder en sekvens som er identisk til det kodende området gitt i tabell V. Dette proteinet antas å representere et primært translasjonsprodukt som blir kuttet ved utskillelse og danner dermed hBMP-1 protein. Denne klonen er derfor et cDNA for hBMP-1 som korresponderer til det humane genfragmentet i den genome hBMP-1 sekvensen lambda LP-H1. Aminosyrene #550 til #590 til BMP-1 er homolog til overhuds-vekstfaktor og "vekstfaktor" domenene til protein C, faktor X og faktor IX.

TABELL VI

	10	20	30	(1)	50	
	CTAGAGGCG	CTTCCTGCG	CGCGCCCG	CCAGC	ATG CCC GGC GTG GCC OGC CTG CCG	
					MET Pro Gly Val Ala Arg Leu Pro	
5	65	80	95	110		
	CTG CTG CTC GGG	CTG CTG CTG CTC CCG	OGT CCC GGC OGG	COG CTG GAC TTG GCC		
	Leu Leu Leu Gly	Leu Leu Leu Leu	Pro Arg Pro Gly Arg	Pro Leu Asp Leu Ala		
	125	140	155			
	GAC TAC ACC TAT	GAC CTG GCG GAG GAG	GAC GAC TOG GAG	CCC CTC AAC TAC AAA		
	Asp Tyr Thr Tyr	Asp Leu Ala Glu Glu	Asp Asp Ser Glu Pro	Leu Asn Tyr Lys		
10	170	185	200	215		
	GAC CCC TGC AAG	GCG GCT GCC TTT	CTT GGG GAC ATT	GCC CTG GAC GAA GAG GAC		
	Asp Pro Cys Lys	Ala Ala Ala Phe	Leu Gly Asp Ile	Ala Leu Asp Glu Glu Asp		
	230	245	260	275		
	CTG AGG GCC TTC	CAG GTA CAG CAG	GCT GTG GAT CTC	AGA CCG CAC ACA GCT	CGT	
	Leu Arg Ala Phe	Gln Val Gln Gln	Ala Val Asp Leu	Arg Arg His Thr	Ala Arg	
15	290	305	320			
	AAG TCC TCC ATC	AAA GCT GCA GTT	CCA GGA AAC ACT	TCT ACC CCC AGC	TGC CAG	
	Lys Ser Ser Ile	Lys Ala Ala Val	Pro Gly Asn Thr	Ser Thr Pro Ser	Cys Gln	
	335	350	365	380		
	AGC ACC AAC GCG	CAG CCT CAG AGG	GGA GCC TGT GCG	AGA TGG AGA GGT	AGA TCC	
	Ser Thr Asn Gly	Gln Pro Gln Arg	Gly Ala Cys Gly	Arg Trp Arg Gly	Arg Ser	
20	395	410	425			
	OGT AGC OGG OGG	GCG GCG ACG TCC	CGA CCA GAG OGT	GTG TGG CCC GAT	GGG GTC	
	Arg Ser Arg Arg	Ala Ala Thr Ser	Arg Pro Glu Arg	Val Trp Pro Asp	Gly Val	
	440	455	470	485		
	ATC CCC TTT GTC	ATT GGG GGA AAC	TTC ACT GGT AGC	CAG AGG GCA GTC	TTC CCG	
	Ile Pro Phe Val	Ile Gly Gly Asn	Phe Thr Gly Ser	Gln Arg Ala Val	Phe Arg	
25	500	515	530	545		
	CAG GCC ATG AGG	CAC TGG GAG AAG	CAC ACC TGT GTC	ACC TTC CTG GAG	OGC ACT	
	Gln Ala MET Arg	His Trp Glu Lys	His Thr Cys Val	Thr Phe Leu Glu	Arg Thr	
	560	575	590			
	GAC GAG GAC AGC	TAT ATT GTG TTC	ACC TAT CGA CCT	TGC GGG TGC TGC	TCC TAC	
	Asp Glu Asp Ser	Tyr Ile Val Phe	Thr Tyr Arg Pro	Cys Gly Cys Cys	Ser Tyr	
30	605	620	635	650		
	GTG GGT OGC OGC	GGC GGG GGC CCC	CAG GCC ATC TCC	ATC GGC AAG AAC	TGT GAC	
	Val Gly Arg Arg	Gly Gly Gly Pro	Gln Ala Ile Ser	Ile Gly Lys Asn	Cys Asp	
35						

665 680 695
 AAG TTC GGC ATT GTG GTC CAC GAG CTG GGC CAC GTC GTC GGC TTC TCG TAC GAA
 Lys Phe Gly Ile Val Val His Glu Leu Gly His Val Val Gly Phe Trp His Glu
 710 725 740 755
 5 CAC ACT CGG CCA GAC CGG GAC CGC CAC GTT TCC ATC GTT CGT GAG AAC ATC CAG
 His Thr Arg Pro Asp Arg Asp Arg His Val Ser Ile Val Arg Glu Asn Ile Gln
 770 785 800 815
 CCA GGG CAG GAG TAT AAC TTC CTG AAG ATG GAG CCT CAG GAG GTG GAG TCC CTG
 Pro Gly Gln Glu Tyr Asn Phe Leu Lys MET Glu Pro Gln Glu Val Gln Ser Leu
 830 845 860
 10 GGG GAG ACC TAT GAC TTC GAC AGC ATC ATG CAT TAC GCT CGG AAC ACA TTC TCC
 Gly Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ser Ile MET His Tyr Ala Arg Asn Thr Phe Ser
 875 890 905 920
 AGG GGC ATC TTC CTG GAT ACC AAT GTC CCC AAG TAT GAG GTG AAC GGG GTG AAA
 Arg Gly Ile Phe Leu Asp Thr Ile Val Pro Lys Tyr Glu Val Asn Gly Val Lys
 935 950 965
 15 CCT CCC ATT GGC CAA AGG ACA CGG CTC AGC AAG GGG GAC ATT GCC CAA GCC CGC
 Pro Pro Ile Gly Gln Arg Thr Arg Leu Ser Lys Gly Asp Ile Ala Gln Ala Arg
 980 995 1010 1025
 AAG CTT TAC AAG TGC CCA GCC TGT GGA GAG ACC CTG CAA GAC AGC ACA GGC AAC
 Lys Leu Tyr Lys Cys Pro Ala Cys Gly Glu Thr Leu Gln Asp Ser Thr Gly Asn
 1040 1055 1070 1085
 20 TTC TCC TCC CCT GAA TAC CCC AAT GGC TAC TCT GCT CAC ATG CAC TCC GTC TGG
 Phe Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Asn Gly Tyr Ser Ala His MET His Cys Val Trp
 1100 1115 1130
 GGC ATC TCT GTC ACA CCC GGG GAG AAG ATC ATC CTG AAC TTC ACG TCC CTG GAC
 Arg Ile Ser Val Thr Pro Gly Glu Lys Ile Ile Leu Asn Phe Thr Ser Leu Asp
 1145 1160 1175 1190
 25 CTG TAC CGC AGC CGC CTG TGC TGG TAC GAC TAT GTG GAG GTC CGA GAT GGC TTC
 Leu Tyr Arg Ser Arg Leu Cys Trp Tyr Asp Tyr Val Glu Val Arg Asp Gly Phe
 1205 1220 1235
 TGG AGG AAG GCG CCC CTC CGA GGC CGC TTC TGC GGG TCC AAA CTC CCT GAG CCT
 Trp Arg Lys Ala Pro Leu Arg Gly Arg Phe Cys Gly Ser Lys Leu Pro Glu Pro
 1250 1265 1280 1295
 30 ATC GTC TCC ACT GAC AGC CGC CTC TGG GTT GAA TTC CGC AGC AGC AGC AAT TGG
 Ile Val Ser Thr Asp Ser Arg Leu Trp Val Glu Phe Arg Ser Ser Ser Asn Trp
 1310 1325 1340 1355
 35 GGT GGA AAG GGC TTC TTT GCA GTC TAC GAA GCC ATC TCC GGG GGT GAT GTG AAA
 Val Gly Lys Gly Phe Phe Ala Val Tyr Glu Ala Ile Cys Gly Gly Asp Val Lys

1370 1385 1400
 AAG GAC TAT GGC CAC ATT CAA TCG CCC AAC TAC CCA GAC GAT TAC CCG CCC AGC
 Lys Asp Tyr Gly His Ile Gln Ser Pro Asn Tyr Pro Asp Asp Tyr Arg Pro Ser

5 1415 1430 1445 1460
 AAA GTC TGC ATC TGG CCG ATC CAG GTG TCT GAG GGC TTC CAC GTG GGC CTC ACA
 Lys Val Cys Ile Trp Arg Ile Gln Val Ser Glu Gly Phe His Val Gly Leu Thr

1475 1490 1505
 TTC CAG TCC TTT GAG ATT GAG GGC CAC GAC AGC TGT GCC TAC GAC TAT CTG GAG
 Phe Gln Ser Phe Glu Ile Glu Arg His Asp Ser Cys Ala Tyr Asp Tyr Leu Glu

10 1520 1535 1550 1565
 GTG CCG GAC GGG CAC AGT GAG AGC AGC ACC CTC ATC GGG CCG TAC TGT GGC TAT
 Val Arg Asp Gly His Ser Glu Ser Ser Thr Leu Ile Gly Arg Tyr Cys Gly Tyr

1580 1595 1610 1625
 GAG AAG CCT GAT GAC ATC AAG AGC ACG TCC AGC CCG CTC TGG CTC AAG TTC GTC
 Glu Lys Pro Asp Asp Ile Lys Ser Thr Ser Ser Arg Leu Trp Leu Lys Phe Val

15 1640 1655 1670
 TCT GAC GGG TCC ATT AAC AAA GCG GGC TTT GCC GTC AAC TTT TTC AAA GAG GTG
 Ser Asp Gly Ser Ile Asn Lys Ala Gly Phe Ala Val Asn Phe Phe Lys Glu Val

1685 1700 1715 1730
 GAC GAG TGC TCT CCG CCC AAC CCG GGG GGC TGT GAG CAG CCG TGC CTC AAC ACC
 Asp Glu Cys Ser Arg Pro Asn Arg Gly Gly Cys Glu Gln Arg Cys Leu Asn Thr

20 1745 1760 1775
 CTG GGC AGC TAC AAG TGC AGC TGT GAC CCC GGG TAC GAG CTG GCC CCA GAC AAG
 Leu Gly Ser Tyr Lys Cys Ser Cys Asp Pro Gly Tyr Glu Leu Ala Pro Asp Lys

1790 1805 1820 1835
 CCG CCG TGT GAG GCT GCT TGT GGC GGA TTC CTC ACC AAG CTC AAC GGC TCC ATC
 Arg Arg Cys Glu Ala Ala Cys Gly Gly Phe Leu Thr Lys Leu Asn Gly Ser Ile

25 1850 1865 1880 1895
 ACC AGC CCG GGC TGG CCC AAG GAG TAC CCC CCC AAC AAG AAC TGC ATC TGG CAG
 Thr Ser Pro Gly Trp Pro Lys Glu Tyr Pro Pro Asn Lys Asn Cys Ile Trp Gln

1910 1925 1940
 CTG GTG GOC CCC ACC CAG TAC CCG ATC TCC CTG CAG TTT GAC TTC TTT GAG ACA
 Leu Val Ala Pro Thr Gln Tyr Arg Ile Ser Leu Gln Phe Asp Phe Phe Glu Thr

30 1955 1970 1985 2000
 GAG GGC AAT GAT GTG TGC AAG TAC GAC TTC GTG GAG GTG CCG AGT GGA CTC ACA
 Glu Gly Asn Asp Val Cys Lys Tyr Asp Phe Val Glu Val Arg Ser Gly Leu Thr

2015 2030 2045
 GCT GAC TCC AAG CTG CAT GGC AAG TTC TGT GGT TCT GAG AAG CCC GAG GTC ATC
 Ala Asp Ser Lys Leu His Gly Lys Phe Cys Gly Ser Glu Lys Pro Glu Val Ile

35

65° over natt etterfulgt av vasking i 1 X SSC, 0.1% SDS ved 65°C. Tolv positive duplikate kloner blir plukket og platet på ny for å oppnå sekundærer. Duplikate nitrocellulosekopier er laget av de sekundære skålene og begge settene hybridisert til den bovine genome proben slik som den primære screeningen ble utført. Et filtersett ble deretter vasket i 1 X SSC, 0.1% SDS; og den andre 0.1 X SSC, 0.1% SDS ved 65°C.

To klasser av hBMP-2 cDNA kloner er tydelige basert på sterke (4 rekombinanter) eller svake (7 rekombinanter) hybridisasjonssignaler under de mere stringente vaskebetingelsene (0.1 X SSC, 0.1% SDS). Alle 11 rekombinante bakteriofag blir plaque-renset, DNA-preparering i liten skala fra skållysatene av hver, og innskuddene subklonet inn i pSP65 og inn i M13 for sekvensanalyse. Sekvensanalyser av de sterkt hybridiserende klonene betegnet hBMP-2 klasse I (også kjent som BMP-2) indikerer at de har omfattende sekvenshomologi med sekvensen gitt i tabell III. Disse klonene er derfor cDNA'er som koder for den humane ekvivalenten til proteinet so kodes av bBMP-2 genet hvor dens partielle sekvens er gitt i tabell III. Sekvensanalyser av de svakt hybridiserende rekombinantene betegnet hBMP-2 klasse II (også kjent som BMP-4) indikerer at de også er ganske homologe til sekvensen gitt i tabell III ved 3'enden av deres kodende områder, men mindre i de mere 5' områdene. De koder dermed for et humant protein med lignende, men ikke identisk, struktur til det ovenfor.

hBMP-2 klasse I cDNA-kloner med full lengde oppnås på følgende måte. 1.5 kb innskuddet til en av klasse II subkloner (II-10-1) blir isolert og radioaktivt merket ved nick-translasjon. Et sett av nitrocellulose-kopiene til U-2 OS cDNA-biblioteket screenet ovenfor (50 filtere, korrespondende til 1,000,000 rekombinante bakteriofag) blir rehybridisert med denne proben under stringente betingelser (hybridisering ved 65° i standard hybridisasjonsbuffer; vask ved 65° i 0.2 X SSC, 0.1% SDS). Alle rekombinantene som hybridiserer til den bovine genome proben som ikke hybridiserer til klasse

II proben blir plukket og plaque-renset (10 rekombinanter). Det blir laget stokker fra skålene og det blir laget bakteriofag DNA-preparater i liten skala. Etter subkloning inn i M13, indikerer sekvensanalysen at 4 av disse representere kloner som overlapper den opprinnelige klasse I klonen. En av disse, lambda U2OS-39, inneholder et innskudd på omtrent 1.5 kb og ble deponert ved ATCC 16. juni, 1987 under aksjonsnummer 40345. Den partielle DNA-sekvensen (utarbeidet fra lambda U2OS-39 og flere andre hBMP-2 klasse I cDNA rekombinanter) og avledet aminosyresekvens er vist nedenfor i tabell VII. Lambda U2OS-39 er ventet å inneholde hele nukleotidsekvensen som er nødvendig for å kode hele det humane motstykket til protein BMP-2 klasse II som blir kodet fra det bovine gen-segmentet hvor dets partielle sekvens er presentert i tabell III. Denne humane cDNA hBMP-2 klasse II inneholder en åpen leseramme på 1188 bp, som koder for et protein på 396 aminosyrer. Dette proteinet på 396 aminosyrer har en molekylvekt på 45kd som er basert på denne aminosyresekvensen. Det antas at denne sekvensen representerer det primære translasjonsproduktet. Proteinets forutgående av et 5' ikke-translatert område på 342 bp med stopp-kodoner i alle rammer. Det 13 bp området som forutgår dette 5' ikke-translaterte området står for en linker som blir brukt i cDNA-klonings fremgangsmåtene.

5

10

15

20

25

30

35

TABELL VII

	10	20	30	40	50	60	70
5	GTCGACICTA	GAGTGTGTGT	CAGCACTTGG	CTGGGGACTT	CTTGAACITG	CAGGGAGAAT	AACITGCGCA
	80	90	100	110	120	130	140
	CCCCACTTTG	CGCOGGTGGC	TTTGCCOCAG	CGGAGCCTGC	TTGGCCATCT	COGAGCCCCA	COGCCCCCTCC
10	150	160	170	180	190	200	210
	ACTCCTOGGC	CTTGCCOCAG	ACTGAGAOCG	TGTTCCOCAG	GTGAAAAGAG	AGACTGOGOG	GCOCGGCACCC
	220	230	240	250	260	270	280
	GGGAGAAGGA	GGAGGCAAG	AAAAGGAOCG	GACAITTOGGT	CCTTGGGCCA	GGTCCCTTGA	CCAGAGTTTT
15	290	300	310	320	330	340	350
	TCCATGTGGA	CGCTCTTTCA	ATGGAOGTGT	CCCCGGGTGC	TTCTTAGAOC	GACTGGCGTC	TCCPAAAGGT
	(1)	370		385		400	
	CGACC ATG GTG GCC GGG ACC CGC TGT CTT CIA GCG TTG CTG CTT CCC CAG GTC						
	MET Val Ala Gly Thr Arg Cys Leu Leu Ala Leu Leu Leu Pro Gln Val						
20	415		430		445		
	CTC CTG GGC GGC GCG GCT GGC CTC GTT CCG GAG CTG GGC CGC AGG AAG TTC GCG						
	Leu Leu Gly Gly Ala Ala Gly Leu Val Pro Glu Leu Gly Arg Arg Lys Phe Ala						
	460		475		490		505
	GCG GCG TCG TCG GGC CGC CCC TCA TCC CAG CCC TCT GAC GAG GTC CTG AGC GAG						
	Ala Ala Ser Ser Gly Arg Pro Ser Ser Gln Pro Ser Asp Glu Val Leu Ser Glu						
25	520		535		550		565
	TTC GAG TTG OGG CTG CTC AGC ATG TTC GGC CTG AAA CAG AGA CCC ACC CCC AGC						
	Phe Glu Leu Arg Leu Leu Ser MET Phe Gly Leu Lys Gln Arg Pro Thr Pro Ser						
	580		595		610		
	AGG GAC GCC GTG GTG CCC CCC TAC ATG CIA GAC CTG TAT CGC AGG CAC TCG GGT						
	Arg Asp Ala Val Val Pro Pro Tyr MET Leu Asp Leu Tyr Arg Arg His Ser Gly						
30	625		640		655		670
	CAG CCG GGC TCA CCC GCC CCA GAC CAC OGG TTG GAG AGG GCA GCC AGC CGA GCC						
	Gln Pro Gly Ser Pro Ala Pro Asp His Arg Leu Glu Arg Ala Ala Ser Arg Ala						
	685		700		715		
	AAC ACT GTG CGC AGC TTC CAC CAT GAA GAA TCT TTG GAA GAA CTA CCA GAA ACG						
	Asn Thr Val Arg Ser Phe His His Glu Glu Ser Leu Glu Glu Leu Pro Glu Thr						

sekvensen som er nødvendig for at den koder for hele humane BMP-2 klasse II protein. Denne cDNA inneholder en åpen leseramme på 1224 bp, som koder for et protein på 408 aminosyrer, som forutgår av et 5' ikke-translatert område på 394 bp med stoppkodoner i alle rammer, og inneholder en 3' ikke-translatert område på 308 bp etter stoppkodonet i riktig leseramme. Det 8 bp-området som forutgår det 5' ikke-translaterte området står for en linker som brukes ved cDNA kloningsfremgangsmåten. Dette proteinet på 408 aminosyrer har molekylvekt på 47kd og antas å stå for det primære translasjonsproduktet.

15

20

25

30

35

TABELL VIII

	10	20	30	40	50	60	70
	CTCTAGAGGG	CAGAGGAGGA	GGGAGGGAGG	GAAGGAGOGC	GGAGCCOOGC	COGGAAGCTA	GGTGAATGTG
5							
	80	90	100	110	120	130	140
	GCATCOGAGC	TGAGGGAOGC	GAGCCTGAGA	CGOOGCTGCT	GCTCOGGCTG	AGTATCTAGC	TTGTCTCCCC
	150	160	170	180	190	200	210
10	GATGGGATTC	COGTCCAAGC	TATCTCGAGC	CTGCAGOGCC	ACAGTCCCOG	GCCCTOGCCC	AGGTTCACTG
	220	230	240	250	260	270	280
	CAACOGITCA	GAGGTCCOCC	GGAGCTGCTG	CTGGOGAGCC	CGCTACTGCA	GGGACCTATG	GAGCCATGCC
	290	300	310	320	330	340	350
15	GTAGTGCCAT	CCCGAGCAAC	GCACTGCTGC	AGCCTCCCTG	AGCCCTTCCA	GCAAGTTTGT	TCAAGATGG
	360	370	380	390	400	(1)	
	CTGTCAAGAA	TCAITGGACTG	TTATATATAIG	CCCTTGTCTTC	TGTCAAGACA	CC ATG ATT CCT	
						MET Ile Pro	
	417		432		447		462
20	GGT AAC CGA	ATG CTG	ATG GTC	GTT TTA	TTA TTA	TGC CAA	GTC CTG
	Gly Asn Arg	MET Leu	MET Val	Val Val	Leu Leu	Cys Gln	Val Leu
		477		492		507	
	AGC CAT GCT	AGT TTG	ATA OCT	GAG ACG	GGG AAG	AAA AAA	GTC GCC
	Ser His Ala	Ser Leu	Ile Pro	Glu Thr	Gly Lys	Lys Lys	Val Ala
	522		537		552		567
25	GGC CAC GCG	GGA GGA	CGC CGC	TCA GGG	CAG AGC	CAT GAG	CTC CTG
	Gly His Ala	Gly Gly	Arg Arg	Ser Gly	Gln Ser	His Glu	Leu Leu
	582		597		612		627
	GAG GCG ACA	CIT CTG	CAG ATG	TTT GGG	CTG CGC	CGC CGC	COG CAG
	Glu Ala Thr	Leu Leu	Gln MET	Phe Gly	Leu Arg	Arg Arg	Pro Gln
		642		657		672	
30	AGT GOC GTC	AIT CCG	GAC TAC	ATG OGG	GAT CIT	TAC OGG	CIT CAG
	Ser Ala Val	Ile Pro	Asp Tyr	MET Arg	Asp Leu	Tyr Arg	Leu Gln
	687		702		717		732
	GAG GAG GAA	GAG CAG	ATC CAC	AGC ACT	GGT CIT	GAG TAT	OCT GAG
	Glu Glu Glu	Glu Gln	Ile His	Ser Thr	Gly Leu	Glu Tyr	Pro Glu
35							

747 762 777
 AGC OGG GCC AAC ACC GTG AGG AGC TTC CAC CAC GAA GAA CAT CTG GAG AAC ATC
 Ser Arg Ala Asn Thr Val Arg Ser Phe His His Glu Glu His Leu Glu Asn Ile

5 792 807 822 837
 CCA GGG ACC AGT GAA AAC TCT GCT TTT CGT TTC CTC TTT AAC CTC AGC AGC ATC
 Pro Gly Thr Ser Glu Asn Ser Ala Phe Arg Phe Leu Phe Asn Leu Ser Ser Ile

852 867 882 897
 OCT GAG AAC GAG GTG ATC TCC TCT GCA GAG CTT CCG CTC TTC CCG GAG CAG GTG
 Pro Glu Asn Glu Val Ile Ser Ser Ala Glu Leu Arg Leu Phe Arg Glu Gln Val

10 912 927 942
 GAC CAG GGC OCT GAT TGG GAA AGG GGC TTC CAC CGT ATA AAC ATT TAT GAG GTT
 Asp Gln Gly Pro Asp Trp Glu Arg Gly Phe His Arg Ile Asn Ile Tyr Glu Val

957 972 987 1002
 ATG AAG CCC CCA GCA GAA GTG GTG OCT GGG CAC CTC ATC ACA CGA CTA CTG GAC
 MET Lys Pro Pro Ala Glu Val Val Pro Gly His Leu Ile Thr Arg Leu Leu Asp

15 1017 1032 1047
 ACG AGA CTG GTC CAC CAC AAT GTG ACA CCG TGG GAA ACT TTT GAT GTG AGC CCT
 Thr Arg Leu Val His His Asn Val Thr Arg Trp Glu Thr Phe Asp Val Ser Pro

1062 1077 1092 1107
 GOG GTC CTT CGC TGG ACC OGG GAG AAG CAG CCA AAC TAT GGG CTA GCC ATT GAG
 Ala Val Leu Arg Trp Thr Arg Glu Lys Gln Pro Asn Tyr Gly Leu Ala Ile Glu

20 1122 1137 1152 1167
 GTG ACT CAC CTC CAT CAG ACT OGG ACC CAC CAG GGC CAG CAT GTC AGG ATT AGC
 Val Thr His Leu His Gln Thr Arg Thr His Gln Gly Gln His Val Arg Ile Ser

1182 1197 1212
 OGA TCG TTA OCT CAA GGG AGT GGG AAT TGG GCC CAG CTC OGG CCC CTC CTG GTC
 Arg Ser Leu Pro Gln Gly Ser Gly Asn Trp Ala Gln Leu Arg Pro Leu Leu Val

25 1227 1242 1257 1272
 ACC TTT GGC CAT GAT GGC OGG GGC CAT GCC TTG ACC OGA OGC OGG AGG GCC AAG
 Thr Phe Gly His Asp Gly Arg Gly His Ala Leu Thr Arg Arg Arg Ala Lys

1287 1302 1317
 CGT AGC CCT AAG CAT CAC TCA CAG OGG GCC AGG AAG AAG AAT AAG AAC TGC OGG
 Arg Ser Pro Lys His His Ser Gln Arg Ala Arg Lys Lys Asn Lys Asn Cys Arg

30 1332 1347 1362 1377
 OGC CAC TCG CTC TAT GTG GAC TTC AGC GAT GTG GGC TGG AAT GAC TGG ATT GTG
 Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val

1392 1407 1422 1437
 GCC CCA CCA GGC TAC CAG GCC TTC TAC TGC CAT GGG GAC TGC CCC TTT CCA CTG
 Ala Pro Pro Gly Tyr Gln Ala Phe Tyr Cys His Gly Asp Cys Pro Phe Pro Leu

35

Drosophila dekapentaplegic (DPP-C) locus transcript. Se J. Massague, *Cell*, 49:437-438 (1987); R.W. Padgett et al, *Nature*, 325:81-84 (1987); R.L. Cate et al, *Cell* 45: 685-698 (1986). Det er derfor mulig at BMP-2 klasse II er den humane protein-homologen laget fra dette transkriptet fra dette utviklingsmutant-locuset.

C. BMP-3

Fordi bovine og humane benvekstfaktor-gener er antatt å være signifikant homologe, blir oligonukleotide prober som har vist seg å hybridisere til bovine DNA-sekvenser fra tabell IV.A og IV.B brukt til å screene et humant genomisk bibliotek. Et humant genomisk bibliotek (Toole et al., ovenfor) blir screenet ved bruk av disse probene, og presumptive positive blir isolert og DNA-sekvensen tilveiebragt som beskrevet ovenfor. Tegn på at denne rekombinanten koder for en del av det humane beninduserende faktormolekylet ligger på bovin/human proteinet og genstruktur-homologier.

Når en rekombinant bakteriofag som inneholder DNA som koder for en del av det humane BMP-3 molekylet blir oppnådd i den humane kodende sekvensen blir brukt som en probe som beskrevet i eksempel V (A) for å identifisere en human cellelinje eller vev som fremstiller BMP-3. mRNA blir selektert ved oligo (dT) cellulose-kromatografi og cDNA blir fremstilt og klonet i lambda gt10 ved bruk av etablerte teknikker (Toole et al., ovenfor).

Alternativt så kan hele genet som koder for denne humane beninduserende faktoren bli identifisert og tilveiebragt i flere rekombinante kloner hvis nødvendig. Flere rekombinanter som inneholder flere 3' eller 5' regioner av dette humane beninduserende faktorgenet kan tilveiebringes ved identifisering av unike DNA-sekvenser ved enden(e) til den opprinnelige klonen og deretter bruke disse probene til på ny å screene det humane genome biblioteket. Genet kan deretter bli på nytt samlet i et enkelt plasmid ved bruk av standard molekyl-

lær-biologiske teknikker og amplifisert i bakterier. Hele det humane BMP-3 faktorgenet kan deretter bli overført til en hensiktsmessig ekspresjonsvektor. Ekspresjonsvektoren som inneholder genet blir deretter transfektert inn i en patte-
5 dyr celle, f.eks. ape COS celler, hvor det humane genet blir transkribert og RNA'et spleiset på en riktig måte. Media fra de transfekterte cellene blir analysert for beninduserende faktoraktivitet som beskrevet heri som en indikasjon på at genene er fullstendige. mRNA oppnås fra disse cellene og
10 cDNA blir fremstilt fra denne mRNA kilden og klonet. Fremgangsmåten beskrevet ovenfor kan på lignende måte blir benyttet for å isolere andre arters beninduserende faktor som er av interesse ved bruk av den bovine beninduserende faktoren og/eller den humane beninduserende faktoren som en probekilde. Slik annen arts beninduserende faktor viser seg
15 å kunne bli benyttet ved, blant annet, reparasjon av brudd.

Eksempel VI

Ekspresjon av beninduserende faktor

20 For å fremstille bovine, humane eller andre pattedyr-beninduserende faktorer, blir DNA som koder for det overført til en hensiktsmessig ekspresjonsvektor og introdusert inn i pattedyrceller ved bruk av konvensjonelle genetiske konstruksjonsteknikker.

25 En som er kjent innenfor fagområdet kan konstruere pattedyr-ekspresjonsvektorer ved bruk av sekvensen i tabellene II-VIII eller andre modifiserte sekvenser og kjente vektorer, såsom pCD (Okayama et al., Mol. Cell Biol., 2:161-170 (1982))
30 og pJL3, pJL4 [Gough et al., EMBO J., 4:645-653 (1985)]. Transformering av disse vektorene inn i hensiktsmessige vertsceller kan resultere i ekspresjon av benvekstinduserende faktorer. En som er kjent innenfor fagområdet kan manipulere sekvensene i tabellene II - VIII ved eliminering eller
35 erstatning av pattedyr-regulatoriske sekvenser som flankerer den kodende sekvensen med bakterielle sekvenser for dannelselse av bakterielle vektorer for intracellulær eller ekstracellu-

lær ekspresjon ved bakterielle celler. For eksempel, så kan de kodende sekvensene videre bli manipulert (f.eks. ligert til andre kjente linkere eller modifisert ved deletering av ikke-kodende sekvenser derfra eller forandring av nukleotider deri ved bruk av andre kjente teknikker). Den kodende sekvensen til den modifiserte beninduserende faktoren kunne deretter bli satt inn i en kjent bakteriell vektor ved bruk av fremgangsmåter slik som er beskrevet i T. Taniguchi et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77:7230-5233 (1980). Denne bakterielle vektoren kunne deretter bli transformert inn i bakterielle vertsceller og dermed så kunne beninduserende faktor bli uttrykt. En strategi for fremstilling av ekstracellulær av beninduserende faktor i bakterie-celler, se f.eks. europeisk patentsøknad EPA 177,343.

Lignende manipulasjoner kan bli utført ved konstruksjon av en insektvektor [se f.eks. fremgangsmåter beskrevet i publisert Europa-patentsøknad 155,476] for ekspresjon i insektceller. En gjærvektor kan også bli konstruert ved bruk av gjærregulatoriske sekvenser for intracellulær eller ekstracellulær ekspresjon av faktorene i denne oppfinnelsen ved gjær-celler. [Se f.eks. fremgangsmåter beskrevet i publisert PCG søknad W086/00639 og europeisk patentsøknad EPA 123,289].

En fremgangsmåte for fremstilling av store mengder av en benvekststimulerende faktor i oppfinnelsen fra pattedyrceller innbefatter konstruksjon av celler som inneholder flere kopier av det heterologe beninduserende faktorgenet. Det heterologe genet kan bli knyttet til en amplifiserbar markør, f.eks. dihydrofolat reduktase (DHFR) genet hvorpå celler som inneholder økende genkopier kan bli selektert for propagering i økende konsentrasjoner av metotreksat (MTX) i henhold til fremgangsmåten til Kaufman og Sharp, J. Mol. Biol., 159:601-629 (1982). Denne fremgangsmåten kan bli benyttet for et stort antall forskjellige celletyper.

For eksempel, så kan et plasmid som inneholder en DNA-sekvens for en beninduserende faktor i oppfinnelsen som er i operativ assosiasjon med andre plasmidsekvenser som muliggjør ekspressjon derav og DHFR ekspressjonsplasmid pAdA26SV(A)3 [Kaufman og Sharp, Mol. Cell. Biol., 2:1304 (1982)] kan bli ko-introdusert inn i DHFR-defekte CHO-celler, DUKX-BII, ved kalsiumfosfat ko-presipitasjon og transfeksjon. Transformanter som uttrykker DHFR blir selektert for vekst i alfa-medium med dialysert føtalt kalveserum, og deretter selektert for 5
10
15
amplifikasjon ved vekst i økende konsentrasjoner av MTX (påfølgende steg i 0.02, 0.2, 1.0 og 5uM MTX) som beskrevet i Kaufman et al., Mol Cell Biol., 5:1750 (1983). Transformanter blir klonet, og biologisk aktiv beninduserende faktor-ekspressjon blir bestemt ved rotte bendannelse-analyse. Beninduserende faktorekspressjon bør øke med økende nivåer av MTX motstand. Lignende fremgangsmåter kan følges for å fremstille andre beninduserende faktorer.

Alternativt, så kommer det humane genet direkte til uttrykk, 20
som beskrevet ovenfor. Aktivt beninduserende faktor kan bli fremstilt i bakterier og gjærceller. Det ekspressjonssystemet som for tiden er å foretrekke for biologisk aktivt rekombinant human beninduserende faktor er stabilt transformerte CHO-celler.

25
Som et spesifikt eksempel, for å fremstille den humane beninduserende faktoren (hBMP-1) i eksempel V, blir innskuddet til U2OS-1 frigjort fra vektorarmene ved kutting med Sal I og subklonet inn i pattedyr-ekspressjonsvektor pMT2CX kuttet 30
med Xho I. Plasmid DNA fra denne subklonen blir transfektert inn i COS-celler ved DEAE-dekstran-fremgangsmåten [Sompayrac og Danna PNAS 78:7575-7578 (1981); Luthman og Magnusson, Nucl.Acids Res. 11: 1295-1308 (1983)]. Serum-fritt 24 t kondisjonert medium blir samlet fra cellene 40-70 t etter 35
transfeksjonen.

Pattedyr-ekspresjonsvektor pMT2 Cla-Xho (pMT2 CX) er et derivat av p91023 (b) (Wong et al., Science 228:810-815, 1985) som er forskjellig fra den sistnevnte ved at den inneholder ampicillin resistens-genet istedenfor tetracyklin-resistensgenet og at den videre inneholder et XhoI sete for innsetting av cDNA-kloner. De funksjonelle elementene til pMT2 Cla-Xho er blitt beskrevet (Kaufman, R.J., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:689-693) og innbefatter adenovirus VA-gener, SV40 replikasjonsorigo som innbefatter den 72 bp forsterkeren, adenovirus hoved-senpromoter innbefattet et 5' spleise-sete og hovedparten av adenovirusets tredelte ledersekvens som er tilsted epå adenovirus sen mRNA'er, et 3' spleise-akseptorsete, et DHFR innskudd, SV40 tidlig polyadenyleringssete (SV40), og pBR322 sekvenser som er nødvendig for propagering i E. coli.

Plasmid pMT2 Cla-Xho oppnås ved EcoRI kutting av pMT2-VWF, som er blitt deponert ved the American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD (USA) under aksjonsnummer ATCC 67122. EcoRI kutting kutter cDNA-innskuddet som er tilstede i pMT2-VWF ut, som gir pMT2 i lineær form som kan bli ligert og brukt til å transformere E. coli HB 101 eller DH-5 til ampicillin resistens. Plasmid pMT2 DNA kan bli fremstilt ved bruk av konvensjonelle fremgangsmåter. pMT2CX blir deretter konstruert ved kutting av pMT2 med Eco RV og XbaI, behandling av det kuttete DNA'et med Klenow-fragment av DNA-polymerase I, og ligering av Cla-linkere (NEBiolabs, CATCGATG). Dette fjerner basene 2266 til 2421 med utgangspunkt fra Hind III setet nær SV40 replikasjonsorigo og forsterkersekvensen til pMT2. Plasmid DNA blir deretter kuttet med EcoRI, gjort butt som ovenfor, og ligert til en EcoRI adapter,

5' PO₄-AATTCCTCGAGAGCT 3'

3' GGAGCTCTCGA 5'

kuttet med XhoI, og ligert, som gir pMT2 Cla-Xho, som deretter kan bli brukt til å transformere E. coli til ampicillin-resistens. Plasmid pMT2 Cla-Xho DNA kan bli fremstilt ved konvensjonelle fremgangsmåter.

Eksempel VIIBiologisk aktivitet til uttrykt beninduserende faktor

A. BMP-1

5 For måling av den biologiske aktiviteten til uttrykt beninduserende faktor (hBMP-1) tilveiebragt i eksempel VI ovenfor, blir faktoren delvis rensset på en Heparin Sepharose kolonne. 4 ml av transfeksjons-supernatanten fra en 100 mm skål blir konsentrert omtrent 10 ganger ved ultrafiltrering på en YM 10
10 membran og deretter dialysert mot 20mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4 (utgangsbuffer). Dette materialet blir deretter applisert på en 1.1 ml Heparin Sepharose kolonne i utgangsbuffer. Ubundede proteiner blir fjernet ved bruk av en 8 ml vask med utgangsbuffer, og bundne proteiner, innbefattet BMP-1, blir
15 desorbert ved en 3-4 ml vask med 20 mM Tris, 2.0 M NaCl, pH 7.4.

Proteinene som bindes av Heparin-kolonnen blir konsentrert omtrent ti-ganger på en Centricon 10 og saltet reduseres ved
20 diafiltrering med 0.1% trifluoreddiksyre. Den hensiktsmessige mengden av denne oppløsningen blir blandet med 20 mg rottematriks og deretter analyser for in vivo ben- eller brusk-dannelse som nylig beskrevet i eksempel III. En falsk transfeksjons-supernatant fraksjonering blir brukt som en
25 kontroll.

Stoffene som er implantert som inneholder rotte-matriks til hvilket det er tilsatt spesifikke mengder av human BMP-1 blir fjernet fra rottene etter syv dager og prosessert for
30 histologisk evaluering. Represenative seksjoner fra hvert implantat blir farget for tilstedeværelse av nye benminerale med von Kossa og syre-fuschin, og for tilstedeværelse av brusk-spesifikk matriksdannelse ved bruk av toluidin blå. Typer av celler som er tilstede innenfor seksjonen, blir
35 evaluert likeledes i hvilken grad disse cellene utviser fenotype.

Tilsetting av human BMP-1 til matriksmaterialet resulterte i dannelselse av brusk-lignende klumper 7 dager etter implanta- sjon. Bruskdannende-type celler er det mulig å gjenkjenne ved form og ekspresjon av metakromatisk matriks. Aktivitetsmeng- den observert for human BMP-1 var avhengig av mengden av human BMP-1 protein som var satt til matriksen. Tabell IX illustrerer dose-respons-sammenhengen mellom human BMP-1 protein og mengde ben-induksjon som observeres.

TABELL IX

<u>Implantert materiale</u> <u>nummer</u>	<u>Mengde brukt</u> (ekvivalent til ml transfeksjonsmedia)	<u>Histologisk</u> <u>utslag</u>
876-134-1	10 BMP-1	C+2
876-134-2	3 BMP-1	C+1
876-134-3	1 BMP-1	C +/-
876-134-4	10 MOCK	C -
876-134-5	3 MOCK	C -
876-134-6	1 MOCK	C -

Brusk (c) aktivitet ble angitt på en skala på 0(-) til 5.

Lignende aktivitetsnivåer blir sett i Heparin Sepharose fraksjonerte COS-celle-ekstrakter. Partiell opprensning oppnås på en lignende måte som beskrevet ovenfor med unntagelse av at 6 M urea er innbefattet i alle buffere. I en rotte-bendannelse-analyse som beskrevet ovenfor, har BMP-2 på lignende måte demonstrert bruskdannende aktivitet.

Fremgangsmåtene beskrevet ovenfor kan bli benyttet for å isolere andre beninduserende faktorer som er av interesse ved bruk av de bovine beninduserende faktorene og/eller humane beninduserende faktorer som probe-kilde. Slike andre beninduserende faktorer kan være nyttige ved, blant annet, reparasjon av brudd.

De foregående beskrivelsene beskriver de foretrukne fremstillingene av denne oppfinnelsen. Mangfoldige modifikasjoner og variasjoner i utførelse derav er ventet å oppstå til en som er kjent innenfor fagområdet ved betraktning av disse beskrivelsene. Disse modifikasjonene og variasjonene er ment å være innbefattet innenfor de vedlagte kravene.

10

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

1.

5 Fremgangsmåte for fremstilling av huBMP-2 klasse I (BMP-2),
 k a r a k t e r i s e r t v e d at den innbefatter
 dyrking av en mikroorganisme transformert med en vektor
 inneholdende en DNA-sekvens som koder for huBMP-2 klasse I, i
 et egnet kulturmedium, hvor nevntne DNA-sekvens er nukleotid-
 sekvensen som følger:

10 20 30 40 50 60 70
 GTCGACTCTA GAGTGTGTGT CAGCAGCTGG CTGGGGACTT CTTGAACTTG CAGGGAGAAT AACTTGGCCA

80 90 100 110 120 130 140
 CCCCACITTTG CGCGGTGCC TTGCCCCAG OGGAGCCGTC TTGGCCATCT CCGAGCCCCA CCGCCCCGEC

15 150 160 170 180 190 200 210
 ACTOCTCGGC CTTGCCCCAC ACTGAGAGGC TGTTCCCAGC GTGAAAAGAG AGACTGGGCG GCGGGRCCC

220 230 240 250 260 270 280
 GCGAGAAGGA GGAGCCRAAG AAAAGGAACG GACATTOGGT CCTTGGGCCA GGTCCHTTGA CCAGAGTTTT

290 300 310 320 330 340 350
 TCCAGTGGGA OGCTCHTICA ATGGAGGTGT CCCCCTGTC TTCTTAGAAG GACTGGGGTC TCCTAAAGGT

370 385 400
 OGACC ATG GTG GCC GGG ACC CGC TGT CTT CIA GCG TTG CTG CTT CCC CAG GTC
 MET Val Ala Gly Thr Arg Cys Leu Leu Ala Leu Leu Leu Pro Gln Val

415 430 445
 CTC CTG GGC GGC GCG GCT GGC CTC GTT CCG GAG CTG GGC CGC AGG AAG TTC GCG
 Leu Leu Gly Gly Ala Ala Gly Leu Val Pro Glu Leu Gly Arg Arg Lys Phe Ala

460 475 490 505
 GCG GCG TCG TCG GGC CGC CCC TCA TCC CAG CCC TCT GAC GAG GTC CTG AGC GAG
 Ala Ala Ser Ser Gly Arg Pro Ser Ser Gln Pro Ser Asp Glu Val Leu Ser Glu

520 535 550 565
 TTC GAG TTG OGG CTG CTC AGC ATG TTC GGC CTG AAA CAG AGA CCC ACC CCC AGC
 Phe Glu Leu Arg Leu Leu Ser MET Phe Gly Leu Lys Gln Arg Pro Thr Pro Ser

580 595 610
 AGG GAC GCC GTG GTG CCC CCC TAC ATG CIA GAC CTG TAT CGC AGG CAC TCG GGT
 Arg Asp Ala Val Val Pro Pro Tyr MET Leu Asp Leu Tyr Arg Arg His Ser Gly

3 625 640 655 670
 CAG CCG GGC TCA CCC GCC CCA GAC CAC CCG TTG GAG AGG GCA GCC AGC CGA GCC
 Gln Pro Gly Ser Pro Ala Pro Asp His Arg Leu Glu Arg Ala Ala Ser Arg Ala

og hvor DNA-sekvensen er i forbindelse med en ekspresjonskontrollsekvens derfor, og isolering av huBMP-2 klasse II fra nevnte kulturmedium.

5 3.

cDNA-sekvens, k a r a k t e r i s e r t v e d at den blir valgt fra gruppen bestående av:

10 a. cDNA-sekvens som koder for huBMP-2 klasse I som innbefatter nukleotidsekvensen ifølge krav 1 eller en sekvens som hybridiseres dertil under stringente betingelser og som ved ekspresjon koder for et protein som har de samme egenskaper som huBMP-2 klasse I; og

15 b. cDNA-sekvens som koder for huBMP-2 klasse II som innbefatter nukleotidsekvensen ifølge krav 2 eller en sekvens som hybridiseres dertil under stringente betingelser og som ved ekspresjon koder for et protein som har de samme egenskaper som huBMP-2 klasse II.

4.

20 Vektor, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder og kan uttrykke en DNA-sekvens som koder for et humant benvekstinduserende protein, hvorpå DNA-sekvensen koder for proteinet som blir valgt fra gruppen bestående av:

25 a. en DNA-sekvens som koder for huBMP-2 klasse I som innbefatter nukleotidsekvensen ifølge krav 1; og

30 b. en DNA-sekvens som koder for huBMP-2 klasse II som innbefatter nukleotidsekvensen ifølge krav 2 eller en sekvens som hybridiseres dertil under stringente betingelser og som ved ekspresjon koder for et protein som har de samme egenskapene som huBMP-2 klasse II.

5.

35 Mikroorganisme, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder og kan uttrykke vektoren ifølge krav 4, og at den velges fra gruppen bestående av en bakterie-celle, en gjær-celle og en mammalsk celle.