



SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT



FI 000117667B

(10) FI 117667 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

15.01.2007

(51) Kv.lk. - Int.kl.

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

(21) Patentihakemus - Patentansökning

20011478

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

05.07.2001

(24) Alkupaivä - Löpdag

05.07.2001

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

06.01.2003

(73) Haltija - Innehavare

1 •The University of Zurich, Rämistrasse 71, 8006 Zürich, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Sailer,Hermann, Heuelstrasse 28, 8032 Zurich, SVEITSI, (CH)

2 •Weber,Franz, Curth-Georg Beckenstrasse 3, 78224 Singen, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab

Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Farmaseuttinen koostumus, joka soveltuu käytettäväksi ortopediassa ja hammaslääketieteessä
Farmaceutisk komposition, som lämpar sig för användning inom ortopedi och odontologi

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI 103278 B, US 6245889 B1, US 4563489 A, US 5399677 A, WO 00/56879 A, WO 92/09697 A1,
Wozney, J.M. and Rosen, V., Clinical Orthopaedics and Related Research, 1998, nro 346, pp 26-37

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Esillä oleva keksintö koskee farmaseuttista koostumusta, joka sisältää rekombinanttien luun morfogeneettisten proteiinien (rBMP:t) pysyvien laskosvarianttien seoksen, ja sen käyttöä terapiassa, erityisesti ortopedisten ja hammaspotilaiden hoidossa. Erityisesti esillä oleva keksintö koskee farmaseuttista koostumusta, joka sisältää vähintään kahden rBMP:n tai niiden monomeerien tai mutanttien pysyvien laskosvarianttien seoksen sopivassa kantajasysteemissä.

Föreliggande uppfinning avser en farmaceutisk sammansättning, som innehåller en blandning av veckade varianter av rekombinanta morfogenetiska proteiner av ben (rBMP:er), och användning därav i terapi, speciellt i behandling av ortopediska och dentala patienter. I synnerhet avser föreliggande uppfinning en farmaceutisk sammansättning, som innehåller en blandning av stabila veckade varianter av åtminstone två rBMP:er eller monomerer eller mutanter därav i ett lämpligt bärarsystem.

Farmaseuttinen koostumus, joka soveltuu käytettäväksi ortopediassa ja hammaslääketieteessä

Keksinnön ala

Esillä oleva keksintö koskee farmaseuttista koostumusta, joka sisältää rekombinanttien luun morfogeneettisten proteiinien (rBMP:t) pysyvien laskosvarianttien seoksen, ja sen käyttöä valmistettaessa lääkeainetta, joka on tarkoitettu käytettäväksi erityisesti ortopedisten ja hammaspotilaiden hoidossa. Erityisesti esillä oleva keksintö koskee farmaseuttista koostumusta, joka sisältää vähintään kahden rBMP:n tai niiden monomeerien tai mutanttien pysyvien laskosvarianttien seoksen sopivassa kantajasysteemissä.

Keksinnön tausta

Urist julkaisi ensimmäiset tutkimukset luun muodostumisesta autointuktiolla ja esitti uudet siihen osallistuvat proteiinitekijät vuonna 1965 [Urist, M.R., *Science* **150** (1965) 447 - 454]. Luuta indusoivaa toimintaa ei voitu katsoa johtuvaksi yhdestä proteiinista vaan joukosta proteiineja, jolloin kukin ryhmän jäsenen yksinään on riittävä indusoimaan heterotooppisen luutumisen (HO). Tämä aloitti luuta indusoivan toiminnan pitkän etsinnän ja kesti yli kaksikymmentä vuotta, ennen kuin ensimmäiset cDNA:t, jotka koodaavat luun morfogeneettisiä proteiineja eli BMP:itä kloonattiin [Wozney, J. M., *et al.*, *Science* **242** (1988) 1528 - 1534]. Sekvenssi- ja rakenneanalyysin perusteella muita proteiineja, kuten kasvu- ja erilaistumistekijöitä (GDF:t) voitiin yhdistää alkuperäisiin BMP:ihin. Yhdessä ne muodostavat BMP-perheen, jossa on yli kolmekymmentä jäsentä [Reddi, H., *Cytokine & Growth Factor Reviews* **8** (1997) 11 - 20] ja joka kuuluu TGF- β -suurperheeseen.

BMP-perhe jaetaan alaperheisiin, joihin kuuluvat BMP:t, kuten BMP-2 ja BMP-4, osteogeeniset proteiinit (OP:t), kuten OP-1 eli BMP-7, OP-2 eli BMP-8, BMP-5, BMP-6 eli Vgr-1, rustoperäiset morfogeneettiset proteiinit (CDMP:t), kuten CDMP-1 eli BMP-14 eli GDF-5, kasvu/erilaistumistekijät (GDF:t), kuten GDF-1, GDF-3, GDF-8, GDF-9, GDF-11 tai BMP-11, GDF-12 ja GDF-14, ja muut alaperheet, kuten BMP-3 eli osteogeeniini, BMP-9 eli GDF-2 ja BMP10 (Reddi *et al, supra*).

BMP-perheen jäsenten ja muiden TGF- β -suurperheen jäsenten eräs yhteinen piirre on kokonaislaskostumistopologia, joka muistuttaa kättä, joka esittää voittomerkin, jolloin ranne esittää keskeistä alfaheliksiä, kaksi sormea kahta antiparalleelia β -levyä ja kämmen kysteiinisolmualuetta [Scheufeler, C. *et*

al., J. Mol. Biol. **287** (1999) 103 -115]. Kysteiinisolmu koostuu kolmesta ketjujenvälisestä disulfidsillasta ja on kolmiulotteisen rakenteen päästabiloija, ja se on niin tehokas, että biologinen aktiivisuus säilyy jopa pitkällisen alhaiselle pH:lle tai urea- tai guanidiinihydrokloridikäsittelyille altistuksen jälkeen [Sampath, T. K., ja Reddi, A. H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78** (1981) 7599 - 7603]. Kahden monomeerin dimerisoituminen stabiloi edelleen topologiaa, jolloin muodostuu sisäinen hydrofobinen ydin (Scheufeler, C. *et al.*, supra). Kokonaisdimeerirakenne on välttämätön myös biologiselle vaikutukselle, kuten osteoinduktiolle, sillä se mahdollistaa dimeerisen molekyylin samanaikaisen sitoutumisen vastaavaan reseptoriin, esimerkiksi BMP-dimeerin samanaikaisen sitoutumisen tyyppin I ja tyyppin II seriini/treoniinireseptoriin, jolloin muodostuu heterotetrameeri, mikä käynnistää signaalikaskadin Smadsin fosforylaation kautta [Yamashita, H. ja Miyazono, K., Nippon Rinsho **57** (1999) 220 - 226].

BMP:iden proteiini- ja nukleotidisekvensseihin perustuvat tulokset ovat paljastaneet, että luun morfogeneesiä, joka käsittää kemotaksiksen, mittoosin ja erilaistumisen, hallitsee BMP:iden toiminta. On myös osoitettu, että BMP:iden vaikutukset eivät rajoitu luuhun ja rustoon. Embryogeneesin varhaisessa vaiheessa BMP:t ohjaavat koko kehon suunnitelman muodostumista ja spesifioivat kudostyypot ja kiertonikamat. Aikuisessa BMP:t vaikuttavat luiden kykyyn parantua onnistuneesti [yhteenveto, katso Wozney, J. ja Rosen, V., Clin. Orthop. Rel. Res. **346** (1998) 26 - 37]. Tämä BMP-toiminnan aspekti yhdessä sen osteoinduktiivisen voiman kanssa on johtanut ajatukseen käyttää BMP:itä potilaiden hoidossa murtumien paranemisen lisäämiseksi ja luun täydentämiseksi. Ensimmäiset tutkimukset, jotka suoritettiin natiiveilla BMP-valmisteilla ihmisen luista [Johnson, E. E. *et al.*, Clin. Orthop. **250** (1990) 234 - 240; Clin. Orthop. **277** (1992) 229 - 237] ja naudan luista [Sailer, H. F. ja Kolb, E., teoksessa Bone Morphogenetic Proteiinis: Biology, Biochemistry and Reconstructive Surgery, sivut 207 - 230, Lindholm, T. S., toim., R. G. Ljaes Co, 909 Pine St, Georgetown, TX 78626, 1996] paljastivat BMP:iden tehokkuuden ortopedisessä ja Cranio-maxillokasvokirurgiassa, erityisesti vaikeissa tilanteissa.

Toinen BMP:iden aspekti on niiden osallistuminen heterotooppisen luutumisen (HO) ilmenemiseen, mikä on luonut suuria odotuksia kehittää BMP:iden inhibiittoreita ja käyttää näitä terapeuttisina aineina HO:ssa. HO on yleinen komplikaatio potilailla, jotka ovat kärsineet pään ja niskan vammoista tai vamman aiheuttamasta lonkkamaljan murtumasta tai joille on tehty täydellinen lonkkaleikkaus. Se on luunmuodostumisprosessi ektooppisissa kohdissa, kuten

lihas- ja sidekudoksessa, ja voi johtaa vähentyneeseen liikkuvuuteen, kipuun tai jopa täyteen niveljäykistymään, pääasiassa lantion ja kyynärpäiden nivelissä [yhteenveto, katso: Nilsson, O. S., *Acta Orthop. Scj* **69** (1998) 667 - 674]. Kun vanhempi väestö lisääntyy ja täysien lonkan nivelten korjausleikkausten lukumäärä kasvaa, HO:sta kärsivien potilaiden lukumäärän voidaan odottaa kasvavan. Lisäksi HO:ta esiintyy joissakin perinnöllisissä taudeissa, kuten sidekudoksen kasvuhäiriössä, tai hankituissa luuta muodostavissa vammoissa, kuten selkärangan hyperostoosissa, myelopatiassa ja selkärangan jäykistymässä, joihin ei ole olemassa parantavaa hoitoa tai kirurginen operaatio on ainoa hoitokeino.

10 Valitettavasti, ennen kuin nyt, BMP:iden löytymisellä ei ole ollut vaikutusta potilaiden lääkehoitoon huolimatta ensimmäisistä lupaavista tuloksista. Tämä johtuu pääasiassa siitä, ettei saatavissa ole riittäviä määriä BMP:itä eikä niiden inhibiittoreita. BMP:iden puhdistus luonnollisista lähteistä ei tuota hoitotarkoituksiin riittäviä proteiinimääriä, eivätkä nisäkäsekspressiosysteemeissä tuotettujen rekombinanttien ihmisen BMP:iden (rhBMP:t) saannot ole tyydyttäviä.

15 Yksittäiset rhBMP:t eivät myöskään ole yhtä tehokkaita kuin natiivit ihmis-BMP-valmisteet: on osoitettu, että jälkimmäiset ovat kymmenen kertaa tehokkaampia indusoimaan ektooppista luun muodostusta kuin puhtaat ihmisen rekombinantti-BMP:t [Bessho, K., *et al.*, *Br. J. Oral. Maxillofac. Surg.* **37** (1999) 2 - 5]. Lopuksi

20 suuri ongelma BMP:iden rutiinikäytölle potilailla on sopivan BMP-antosysteemin puute. BMP:t on annettava kantajan kanssa, koska niiden anto esimerkiksi injektiona johtaa välittömään BMP:n hajoamiseen. Tämä on täydellisesti ristiriidassa BMP:n ilmentymisprofileihin, jotka osoittavat, että murtuman paranemisen aikana esimerkiksi BMP-2:ta ilmentyy jopa 14 päivää murtuman tapahtua [Kitazawa, R. *et al.*, *Acta Histochem. Cytochem.* **31** (1998) 231 - 236].

Selvästi tarvitaan kiireellisesti uusia lähestymistapoja BMP:iden hyväksikäytössä. Esillä oleva keksintö antaa käyttöön ratkaisun edellä kuvattujen epäkohtien ja haittapuolien voittamiseksi.

30 Esillä olevan keksinnön tarkoitus on antaa käyttöön keinot BMP:iden luun muodostumista indusoivan aktiivisuuden hyväksikäyttöön hoidettaessa potilaita ortopediassa, hammaslääketieteessä ja muilla lääketieteen aloilla.

Toinen keksinnön tarkoitus on antaa käyttöön keinot BMP:iden luun muodostumista inhiboivan aktiivisuuden hyväksikäyttöön hoidettaessa potilaita

35 ortopediassa ja muilla lääketieteen aloilla.

Erityisesti esillä olevan keksinnön tarkoitus on antaa käyttöön farmaseuttinen koostumus, joka olisi käyttökelpoinen hoidettaessa tauteja, joissa halutaan edistää murtuman paranemista ja luun täydentämistä. Tällainen koostumus parantaisi esimerkiksi sellaisen potilaan paranemista, jolle on tehty kirurginen luuleikkaus tai joka kärsii tapaturmaisesta luunmurtumasta. Lisäksi tällaista koostumusta voitaisiin käyttää hammasimplanttien integroinnissa, hampaanpoiston jälkeisessä hammaskuoppien täytössä, hammaskuoppaharjanteen täydentäminen, nenän sivuontelon pohjan kohottamisessa ja luutumatomien murtumien paranemisessa.

Lisäksi toinen esillä olevan keksinnön erityistarkoitus on antaa käyttöön farmaseuttinen koostumus, joka olisi käyttökelpoinen hoidettaessa ja ennalta ehkäistäessä heterotooppista luutumista ja muita tauteja, joissa esiintyy ei-toivottua luunmuodostusta. Tällainen koostumus lisäisi merkittävästi niitä vaihtoehtoja, joita tällä hetkellä on käytettävissä HO:n hoitoon, ja siltä puuttuisivat sivuvaikutukset, jotka liittyvät ei-steroidisiin anti-inflammatorisiin lääkeaineisiin (NSAID:t) ja radioterapiaan, jotka ovat tällä hetkellä vaihtoehtoisia hoitomenetelmiä.

Keksinnön lyhyt kuvaus

Nyt on yllättäen havaittu, että kun yhdistetään yksittäisten rBMP:ien tai rBMP-monomeerien tai jompian kumpien mutanttien pysyvät laskosvariantit, kuten WO-patenttihakemuksessa IB99/00466 kuvatut, tällaisella yhdistelmällä on synergistinen vaikutus, jota ei olisi voitu odottaa rBMP:ien tai rBMP-monomeerien erillisten ominaisuuksien perusteella.

Esillä oleva keksintö koskee farmaseuttisia koostumuksia, jotka soveltuvat käytettäväksi ortopediassa ja hammaslääketieteessä. Koostumuksille on tunnusomaista, että ne sisältävät vähintään kahden rekombinanttisen luun morfogeneettisen proteiinin (rBMP) tai niiden monomeerien pysyvien laskosvarianttien synergistisen seoksen sopivassa farmaseuttisessa kantajasysteemissä, jolloin pysyvät laskosvariantit eroavat disulfididosten muodostumisen suhteen ja tämän seurauksena kolmiulotteisen konformaation suhteen vastaavista kypsistä rBMP:ista tai rBMP-monomeereistä, tai ne on saatu uudelleenlaskostamalla tällainen laskosmuoto, ja jolloin mainittu rBMP valitaan rBMP-2:n, rBMP-4:n ja rBMP-7:n tai niiden monomeerien joukosta.

Edullisessa suoritusmuodossa esillä oleva keksintö koskee farmaseuttisia koostumuksia, jotka sisältävät rBMP-2:n ja rBMP-4:n tai niiden monomeerien tai jommankumman mutanttien pysyvien laskosvarianttien seoksen,

rBMP-2:n ja rBMP-7:n tai niiden monomeerien tai jommankumman mutanttien pysyvien laskosvarianttien seoksen; rBMP-4:n ja rBMP-7:n tai niiden monomeerien tai jommankumman mutanttien pysyvien laskosvarianttien seoksen sopivassa farmaseuttisessa kantajasysteemissä.

5 Toisessa edullisessa suoritusmuodossa esillä oleva keksintö koskee farmaseuttisia koostumuksia, jotka sisältävät rBMP-2:n, rBMP-4:n ja rBMP-7:n tai niiden monomeerien tai kunkin mutanttien pysyvien laskosvarianttien seoksen sopivassa farmaseuttisessa kantajasysteemissä.

10 Esillä oleva keksintö koskee lisäksi edellä olevien koostumusten käyttöä valmistettaessa lääkeainetta, joka on tarkoitettu käytettäväksi luun muodostumista inhiboivana aineena ortopediassa ja hammaslääketieteessä.

Edullisessa suoritusmuodossa esillä oleva keksintö koskee edellä olevien koostumusten käyttöä valmistettaessa lääkeainetta, joka on tarkoitettu käytettäväksi ortopedisten potilaiden hoidossa.

15 Toisessa edullisessa suoritusmuodossa esillä oleva keksintö koskee edellä olevien koostumusten käyttöä valmistettaessa lääkeainetta, joka on tarkoitettu käytettäväksi hammaspotilaiden hoidossa.

20 Vielä eräässä edullisessa suoritusmuodossa esillä oleva keksintö koskee edellä olevien koostumusten käyttöä valmistettaessa lääkeainetta, joka on tarkoitettu käytettäväksi Cranio-maxillokasvokirurgiassa.

Piirustukset

Kuvio 1 esittää luutumisen inhibition demineralisoidussa luussa, joka sisältää inh-rBMP-monomeerejä: a) inh-rBMP-2; b) inh-rBMP-4; ja c) inh-rBMP2 sekä inh-rBMP-4.

25 Kuvio 2 esittää inh-rBMP-2-monomeerien histologisen vaikutuksen 21 päivän kuluttua: a) lataamaton implantti; b) inh-rBMP-2:lla ladattu implantti; c) inh-rBMP-2:lla ladattu implantti, 5-kertainen suurennos.

30 Kuvio 3 esittää kypsän rBMP-2:n laskosvarianttien erottamisen SDS-PAGE:lla: (1) *E. colista* eristetty inh-rBMP-2; (4) *E. colista* pelkistetyssä muodossa eristetty inh-rBMP-2; (2) ind-rBMP-2 *in vitro* -uudelleenlaskostamisen jälkeen; (5) ind-rBMP *in vitro* -uudelleenlaskostamisen jälkeen; (3) molekyyli-painomerkit.

35 Kuvio 4 esittää alkalisen fosfataasin aktiivisuuden määritettynä MC3T3-E1-soluissa inh-rBMP-2:n ja inh-rBMP-4:n 1:1-seoksen vaikutuksen alaisena.

Kuvio 5 valaisee inh-rBMP-2:n ja inh-rBMP-4:n seoksen inhibitiopaikkaa MC3T3-E1-soluissa ja kolme inh-rBMP-4:n katkaistua mutanttia. Vasemmassa paneelissa esitetään kaaviomainen kuva proteiinien rakenteesta. Oikeassa paneelissa esitetään proteiinilla käsiteltyjen MC3T3-E1-solujen vastaava alkalisen fosfataasin aktiivisuus. Proteiinien N- ja C-päät on osoitettu.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Esillä oleva keksintö perustuu ajatukseen valmistaa ja käyttää rBMP:n tai rBMP-monomeerien pysyvien laskosvarianttien seosta niiden biologisen aktiivisuuden parantamiseksi erityisesti heterotooppisen luutumisen inhibitiossa ja luun muodostumisen indusoinnissa. Yllättäen havaittiin, että tällaisilla koostumuksilla on synergistisiä vaikutuksia, joita voidaan käyttää hyväksi sekä inhiboivalla tavalla, toisin sanoen estämään HO:n kehittymistä, tai indusoivalla tavalla, toisin sanoen indusoimaan uuden luun muodostumista. Tällä saadaan etuja siinä suhteessa, että tarvitaan pienempiä määriä materiaalia halutun vaikutuksen aikaansaamiseksi, mikä on erittäin tärkeää, kun otetaan huomioon rBMP:ien työläs valmistus. Lisäksi sivuvaikutusten riski vähenee merkittävästi, kun pienempiä määriä voidaan käyttää.

Esillä oleviin tarkoituksiin termi pysyvä laskosvariantti viittaa mihin tahansa rBMP:ien tai rBMP-monomeerien tai jompien kumpien mutanttien pysyvään konformaatioon, jolloin molekyylin laskostumistila eroaa kolmiulotteiselta konformaatioltaan vastaavan kypsän rBMP:n tai rBMP-monomeerin kolmiulotteisesta konformaatiosta tai jolloin rBMP:ien tai rBMP-monomeerien vastaava kypsä laskostuminen saadaan tällaisen laskostumistilan uudelleen laskostumisen kautta.

Esillä oleviin tarkoituksiin termi rBMP viittaa BMP-perheen jäsenen dimeerisenä rekombinanttutuotteena ja termi rBMP-monomeeri viittaa kypsään geeniekspressiotuotteeseen, joka joko kykenee dimerisoitumaan, jolloin muodostuu rBMP-dimeeri, tai joka ei kykene dimerisoitumaan laskostumisen vuoksi. Niinpä termi rBMP kattaa BMP-alaperheen jäsenet, kuten BMP-2:n ja BMP-4:n, OP-alaperheen jäsenet, kuten OP-1:n (eli BMP-7:n) OP-2:n (eli BMP-8:n), BMP-5:n, BMP-6:n (eli Vgr-1:n), CDMP-alaperheen jäsenet, kuten CDMP-1:n (eli BMP-14:n eli GDF-5:n), GDF-alaperheen jäsenet, kuten GDF-1:n, GDF-3:n, GDF-8:n, GDF-9:n, GDF-11:n (eli BMP-11:n), GDF-12:n ja GDF-14:n, ja muiden BMP-alaperheiden jäsenet, kuten BMP-3:n (eli osteogeeniini), BMP-9:n (eli GDF-2:n) ja BMP10:n, kun ne tuotetaan yhdistelmä-DNA-tekniikalla.

rBMP:itä tai rBMP-monomeerejä, jotka ovat käyttökelpoisia esillä olevan keksinnön mukaisessa koostumuksessa, ovat erityisesti laskosvariantit rBMP-2:sta, rBMP-4:stä ja rBMP-7:stä tai niiden monomeereistä, joiden tällä hetkellä tiedetään olevan tärkeällä tavalla osallisia uuden luun muodostumi-
5 sessa. Keksinnön suojapiirin katsotaan kuitenkin kattavan myös koostumukset, jotka sisältävät sellaisten rBMP:ien tai niiden monomeerien laskosvariantteja, joiden roolia luun muodostuksessa ei ole vielä selvitetty.

Esillä oleviin tarkoituksiin termi induktiivinen viittaa koostumuksen tai yksittäisten rBMP:ien pysyvien laskosvarianttien kykyyn indusoida uuden
10 luun muodostumista.

Esillä oleviin tarkoituksiin termi inhiboiva viittaa koostumuksen tai yksittäisten rBMP:ien pysyvien laskosvarianttien kykyyn estää uuden luun muodostumista.

rBMP:n tai rBMP-monomeerien tai jompian kumpien mutanttien
15 pysyvät laskosvariantit, jotka ovat käyttökelpoisia esillä olevassa keksinnössä, voidaan valmistaa normaalilla yhdistelmä-DNA-tekniikalla käyttäen sekä prokaryoottisia että eukaryoottisia ilmentämissysteemejä tavanomaisella tavalla. Tässä suhteessa viitataan esimerkiksi hakemukseen Cerletti *et al.* (EP-hakemus 0 433 225 A1) ja artikkeliin Israel D.I. *et al.*, *Growth Factors* 7 (1992)
20 139 - 150. Tuotanto prokaryoottisessa ilmentämissysteemissä, kuten *Escherichia coli* -kannoissa tai muissa sopivissa bakteerikannoissa, tarjoaa etuja saannon kannalta. Prokaryoottiset ilmentämissysteemit ovat erityisen sopivia rBMP-monomeerien tuottamiseen. Toisaalta eukaryoottiset ilmentämissysteemit, kuten nisäkäs- tai hyönteissolut, erityisesti nisäkässolut ja erityisesti
25 sellaiset, joissa käytetään proteiinitonta väliainetta, ovat edullisia tuoteturvallisuuden kannalta. Esimerkkejä sopivista nisäkässoluista ovat kiinanhamsterin munasarjasolut (CHO). Nisäkäsilmentämissysteemit ovat erityisen sopivia rBMP-dimeerien tuottamiseen. Sopivan tuotantosysteemin valinta sisältyy hyvin alan ammattimiehen tietoihin.

30 rBMP:n tai rBMP-monomeerien pysyviä laskosvariantteja, jotka ovat käyttökelpoisia esillä olevassa keksinnössä, voidaan tarvittaessa lisäksi käsitellä edelleen altistamalla vastaavat rBMP:t tai rBMP-monomeerit sellaisille olosuhteille, jotka muuttavat, mahdollisesti palautuvasti, mainittujen rBMP:n tai rBMP-monomeerien dimerisoitumiskykyä. Tällaisia olosuhteita ovat käsittely
35 kaotrooppisella aineella sopivassa puskurissa ajanjakso, joka riittää muuttamaan monomeerien stereokemian siten, ettei dimerisoitumista tapahdu. Sopi-

vina kaotrooppisina aineina voidaan mainita urea, guanidiinihydrokloridi, imidotsoli ja tiosulfaatti pitoisuutena vähintään 3 M, edullisesti 3 - 8 M ja edullisimmin 5 - 8 M. Edullisesti käytetään ureaa pitoisuutena 5 - 8 M ja edullisimmin pitoisuutena 6 M. Toinen edullinen kaotrooppi on guanidiinihydrokloridi

5 pitoisuutena 3 - 6 M, edullisesti pitoisuutena 6 M.

Kaotrooppisen aineen sijasta voidaan käyttää pelkistävää ainetta. Sopivia pelkistäviä aineita ovat ditiotreitoli pitoisuutena 0,05 - 1 mM, edullisesti 0,1 mM, ja merkaptoetanoli pitoisuutena 0,1 - 10 mM, edullisesti 1 mM.

Myös käsittelyä sopivalla hapettimella voidaan käyttää. Tässä suhteessa viitataan esimerkiksi EP-hakemukseen 0 433 225 A1 ja US-patenttiin

10 5 756 308. Muita olosuhteita, kuten lämpötilaa, pH:ta, ionivahvuutta ja vastaavia voidaan käyttää rBMP:ien pysyvien laskosvarianttien muodostamiseen tai edellä olevien aineiden toiminnan auttamiseen.

Vaihtoehtoisesti keksinnössä käyttökelpoisia pysyviä laskosvariantteja ovat vastaavien rBMP:ien tai rBMP-monomeerien mutanttimuodot, joita

15 voidaan saada esimerkiksi poistamalla aminohappo tai aminohappoja rBMP:n tai rBMP-monomeerin polypeptidisekvenssistä tai lisäämällä ylimääräinen aminohappo tai aminohappoja rBMP:n tai rBMP-monomeerin polypeptidisekvenssiin. Nämä menettelyt ovat alan ammattimiesten hyvin tuntemia ja käsittävät

20 käsittelyn sopivalla proteaasilla tai yhdistelmä-DNA-tekniikan käytön.

Onnistuneeseen käsittelyyn riittävä aika riippuu käytetystä aineesta mutta on tavallisesti vähintään 10 - 100 tuntia, edullisesti 10 - 50 tuntia ja edullisimmin 24 tuntia. Samoin käytetty lämpötila vaihtelee kyseisen aineen

25 mukaan, mutta on tavallisesti alueella 3 - 24 °C olevia lämpötiloja, edullisesti 4 °C:tta voidaan käyttää.

Valmistuksessa käyttökelpoisia puskureita ovat fosfaattipuskurit, jotka mahdollisesti sisältävät fysiologista suolaliuosta, Tris-puskurit ja vastaavat puskurit, joiden pH on 6 - 8, edullisesti 8, ja pitoisuus 5 - 100 mM. 20 mM

30 Tris-puskuri, pH 8, on erityisen sopiva.

rBMP:ien tai BMP-monomeerien pysyvät laskosvariantit, jotka ovat käyttökelpoisia esillä olevassa keksinnössä, puhdistetaan tavanomaisella tavalla, kuten kromatografisilla menetelmillä, edullisesti geelisuodatuksella ja/tai

35 affiniteettikromatografialla, dialyysillä, membraanisuodatuksella ja vastaavilla tavoilla. Nämä menetelmät ovat alan ammattimiesten hyvin tuntemia.

Näin valmistetut rBMP:ien pysyvät laskosvariantit ovat aluksi monomeerien muodossa ja keksinnön inhiboivaan aspektiin keksinnön mukainen

koostumus sisältää rBMP:ien vastaavat laskosvariantit monomeereinä. Mutta rBMP-dimeeri, jonka toinen monomeeri tai molemmat monomeerit on sopivasti käsitelty normaalin laskostumisen estämiseksi, on yhtä sopiva keksinnön inhiboiviin tarkoituksiin. Indusoiviin tarkoituksiin rBMP-monomeerien annetaan dimerisoitua spontaanisti tai tätä dimerisoitumista voidaan helpottaa esimerkiksi puskurin valinnalla.

Esillä olevassa keksinnössä käyttökelpoisilla, kunkin vastaavan rBMP:n ja rBMP-monomeerien inhiboivilla (inh) ja indusoivilla (ind) laskosvarianteilla on identtiset aminohapposekvenssit, mutta ne eroavat disulfididoksen muodostumisen suhteen ja tämän seurauksena kolmiulotteisen rakenteen suhteen. Esimerkiksi laskosvarianteilla inh-rBMP-2 ja ind-rBMP-2 on riittävän erilainen liikkuvuus, että ne voidaan erottaa SDS-PAGE:lla (kuvio 3).

Koska rBMP:t tai rBMP-monomeerit hajoavat välittömästi joutuesaan kosketukseen kehon nesteiden kanssa ja koska niillä on voimakas morfogeneettinen vaikutus, paikalliset antoreitit ovat edullisia. Tämä tekee kantajasysteemin valinnan kriittiseksi. Siten keksinnön mukaiselle koostumukselle sopivia kantajia ovat kiinteät tai puolikiinteät biologisesti hajoavat kantajat, jotka voidaan implantoida potilaaseen. Tällaisia systeemejä ovat systeemit, jotka perustuvat kollageeniin, fibriiniin, hydrogeeleihin, hydroksiapatiittiin (HA), kuten HA-fibriinikomposiitti, HA-kollageenikomposiitti, HA-kalsiumsulfaatti, tai biologisesti hajoaviin polymeereihin, kuten polyanhydrideihin, poly(maitohappoihin) (PLA), poly(laktidi-ko-glykolidi)-poly(etyleeniglykoli) (PLG-PEG) –kopolymeereihin, PLG-PGA-kopolymeereihin ja vastaaviin. Biologisesti hajoavat polymeerit ovat edullisia.

Edullisessa suoritusmuodossa keksinnön mukainen koostumus sisältää kantajan, joka on hitaasti vapauttava systeemi, joka perustuu biohajoaviin polymeereihin, kuten hydrogeeleihin, tai erityisesti polyestereihin, esimerkiksi polyglykolidiin (PGA), polylaktidiin (PLA) ja vastaaviin polymeereihin, tai niiden kopolymeereihin, kuten polylaktidin kopolymeereihin glykolidien, ϵ -kapolaktiinin, δ -valerolaktonin tai 1,5-dioksepan-2-onin kanssa. Edullisesti kantajana käytetään polylaktidin kopolymeeriä glykolidien kanssa, kuten poly-DL-laktidi-ko-glykolidia (PLGA).

Keksinnön mukaiset koostumukset voivat sisältää esimerkiksi 0,1 - 2 mg rBMP:iden tai rBMP-monomeerien pysyviä laskosvariantteja. Laskosvariantin määrä kuitenkin vaihtelee eri sovelluksissa. Siten pienemmät

määrät voivat riittää joissakin sovelluksissa, kun taas jonkin verran suurempia määriä voidaan tarvita halutun vaikutuksen saamiseksi muissa sovelluksissa.

5 Keksinnön mukaisten koostumusten annos riippuu yksittäisistä potilaista ja hoidettavasta häiriötilasta. Esimerkinomainen yksittäinen annos keksinnön mukaista koostumusta on alueella 0,1 - 2 mg. Kuitenkin pienempi annos voi riittää joissakin häiriötiloissa, kun taas suurempia määriä voidaan tarvita halutun vaikutuksen saamiseksi muissa hoidoissa.

10 Keksinnön mukaiset koostumukset sisältävät vähintään kahden rBMP:n tai BMP-monomeerin tai jomman kumman mutanttien pysyviä laskosvariantteja painosuhteessa 1 - 10:1 - 10, edullisesti painosuhteessa 1 - 5:1 - 5. Edullisimmassa sovellutusmuodossa pysyvien laskosvarianttien painosuhte on 1:1. Kun käytetään useampia kuin kahta rBMP:tä tai BMP-monomeeriä tai jomman kumman mutanttia, pysyvien laskosvarianttien painosuhte on alueella 1 - 10:1 - 10:1 - 10, edullisesti alueella 1 - 5:1 - 5:1 - 5, jolloin painosuhte 1:1:1
15 on edullisin.

Esillä oleva keksintö antaa ensimmäisen kerran käyttöön keinot käyttää hyväksi luun morfogeneettisiä proteiineja hoidettaessa potilaita, jotka kärsivät taudeista tai häiriötiloista, joihin liittyy ei-toivottu luun muodostuminen, kuten heterotooppisesta luutumisesta. Lisäksi esillä oleva keksintö antaa käyttöön
20 keinot uuden luun muodostumisen lisäämiseen luunmurtumien ja muiden vammojen hoidossa. Esillä olevan keksinnön mukaiset koostumukset mahdollistavat sen, että rBMP:itä ja BMP-monomeerejä voidaan käyttää merkittävästi pienempinä määrinä kuin vastaavia yksittäisiä polypeptidejä halutun vaikutuksen saavuttamiseksi. Siten kun inh-rBMP-2- ja inh-rBMP-4-monomeerejä annettiin 1:1-
25 seoksena, niinkin matala annos kuin 25 µg riitti vähentämään kalsiumpitoisuuden 39 %:iin kontrolliarvosta, kun taas yksittäisillä rBMP:illä, annettuna yksin, 50 %:n tai yli vähenemisprosentti saatiin annoksella 50 µg (kuvio 1).

Keksintöä valaistaan seuraavilla esimerkeillä, jotka annetaan vain valaisutarkoituksiin.

30 Tilastollisiin analyysiin sovellettiin Studentin T-testiä kaupallisesti saatavissa olevaa ohjelmistoa käyttäen (SSPE, Chicago, Il). Kaikki arvot edustavat keskiarvoja ± keskiarvon standardivirhe.

Esimerkki 1**Bakteeriperäisten inhiboivien rekombinanttien luun morfogeneettisen proteiinien (inh-rBMP:t) ilmentäminen, puhdistus ja uudelleenlaskostus**

Ensimmäisessä vaiheessa ihmisen istukkakirjastoa (Clontech, Palo Alto, CA) käytettiin templaattina ihmisen BMP-2:n ja ihmisen BMP-4:n täysipitkien cDNA:iden eristämiseksi polymeraasiketjureaktiota (PCR) käyttäen. Kunkin PCR:stä saadun kloonin 500 emäsparia pitkä 5-päätä käytettiin tämän jälkeen lambda gt10 -kirjaston seulomiseksi pesäkehybridisaatiolla, jotta voitiin eristää monistumaton cDNA-klooni. Lopullisten täysipitkien kloonien molemmat juosteet sekvensoitiin dideoksinukleotidi-ketjunlopetusmenetelmällä käyttäen Sequenase 2.0 -kittiä (USB, Cleveland, OH). Nukleotidit luettiin digitalisoidulla geelinlukijalla ja analysoitiin ohjelmistopakettilla GCG (University of Wisconsin Genetics Computer Group).

Inhiboivien luun morfogeneettisen proteiinien inh-rBMP-2 ja inh-rBMP-4 ilmentämiseksi kypsät rBMP-ekspressiokonstruktit muodostettiin PCR:llä käyttäen vastaavia täysipitkiä klooneja templaatteina. Aloitus-ATG laitettiin kypsän rBMP-2-sekvenssin (sekvenssi tunnusnumero 1) eteen ja BMP-4-sekvenssi (sekvenssi tunnusnumero 2) mutagenisoitiin konstruktiin viemällä Nde-restriktiokohta. Tämä salli kloonauksen pET23b+-ekspressiovektoriin [Studier *et al.* *Methods Enzymol* **185** (1990) 60 - 89 (1990)], jota käytettiin *Escherichia coli* -kannan BL21 (DE3) transfektointiin. Soluja kasvatettiin optimaaliseen tiheyteen 0,6 (aallonpituudella 600 nm), indusoiitiin lisäämällä isopropyyli-13-D-tiogalaktopyranosidia loppupitoisuuteen 0,4 mM ja ne otettiin talteen 3 h induktion jälkeen sentrifugoimalla kierrosnopeudella 5 000 x g. Pellettiä säilytettiin yön yli -80 °C. Sulattamisen jälkeen solut suspendoitiin uudelleen puskuriin, jossa oli 20 mM Tris-HCl:a, pH 7,9, 0,5 M NaCl:a ja 5 mM imidatsolia, ja hajotettiin viemällä ne kolmesti French-painekammion läpi paineessa 20 000 psi. Sentrifugoinnin jälkeen rBMP-monomeerit olivat pelletissä. Inh-rBMP:n tuottamiseksi pelletti liuotettiin samaan puskuriin kuin aikaisemmin ja lisättiin 6 M ureaa ja inkuboitiin kääntyvässä pyörässä seitsemän päivää 4 °C:ssa. Liukenematon materiaali poistettiin sentrifugoimalla kierrosnopeudella 15 000 x g 30 min ja supernatantti dialysoitiin perusteellisesti puskuria vastaan, joka sisälsi 10 mM Tris-HCl:a, pH 8, 6 M ureaa, (TU), vietiin affiniteettikoloniin (hepariini, 5 ml, HiTrap®, Pharmacia Biotech) ja eluoiitiin 2 M NaCl:lla TU:ssa. Inh-rBMP-monomeerit ja -dimeerit erotettiin geelisuodatuksella (HiLoad® Superdex® 200, Pharmacia Biotech, 1,6 cm x 60 cm; 124 ml). Inh-rBMP-mono-

meerien ja -dimeerien puhtaus analysoitiin Coomassie-värillä värjätystä SDS-PAGE:sta ja oli yli 99 % (kuvio 3).

Kuten kuvio 3 voidaan nähdä, materiaali koostuu dimeeristä fraktiosta sekä monomeereistä, jotka identifioitiin inh-rBMP-2:ksi ja inh-rBMP-4:ksi. SDS-PAGE-geelien tarkka tutkiminen paljastaa, että leveä nauha, joka vastaa dimeeristä fraktiota, koostuu vähintään kolmesta erotettavissa olevasta proteiinista, mikä osoittaa saman proteiinin kolmen konformeerin läsnä oloa.

Esimerkki 2

rhBMP-4:n tuottaminen kiinanhamsterin munasarjasoluissa käyttäen proteiinia sisältämätöntä väliainetta

rhBMP-4:n täysipitkä cDNA (sekvenssi tunnusnumero 3) kloonattiin pMPSV-HE-vektoriin (lahja prof. Hauserilta, Braunschweig, Saksa), joka kantaa myeloproliferatiivisen sarkoomaviruksen 1 promoottoria, ja kotransfektoitiin suhteessa 50:1 pMSVtrp 33:n kanssa kiinanhamsterin munasarjasoluihin (Cytos 15 Biotechnology GmbH ja Dr Messi, Cell Culture Technologies, Zürich, Sveitsi). Plasmidi pMSVtrp sisältää *E. coli*n tryptofaanisyntaasin (*trpB*) geenin ja sallii solujen pysyä hengissä väliaineessa, jossa tryptofaani on korvattu indolilla. Transfektiot suoritettiin 6-kuoppaisissa levyissä FUGENE®:n (Roche Basel) avulla valmistajan suosituksia noudattaen. Päivä transfektion jälkeen lisättiin 20 yhtä suuri määrä väliainetta, joka sisälsi indolia tryptofaanin sijasta. Kolme päivää transfektion jälkeen yhden kuopan solut laimennettiin suhteessa 1:30 väliaineeseen, jossa oli indolia, ja ympättiin 48 kuoppaan 12-kuoppaisilla levyillä. Yksittäiset kloonit, jotka voitiin tunnistaa kahden viikon kuluttua, testattiin rhBMP-4-tuotannon suhteen immunoblot-analyysillä käyttäen polyklonaalista anti-BMP- 25 4 vasta-ainetta, joka oli nostatettu kaneissa.

Suuren mittakaavan tuotantoon soluja kasvatettiin yhden litran sekoituspulloissa FMX-8-väliaineessa (tri Messi, Cell Culture Technologies, Zürich, Sveitsi) 37 °C:ssa, 5-prosenttisessä CO₂:ssa, kierrosnopeudella 40 rpm ja 720 asteen rotaatiolla. Viiden päivän kuluttua solut poistettiin sentrifugoimalla, supernatantti vietiin HiTrap®-hepariinikolonniin ja rhBMP-4 eluointiin 2 M NaCl:lla 30 TU:ssa. Muita puhdistusvaiheita olivat geelisuodatus (HiLoad® Superdex® 75 -kolonni, Pharmacia Biotech, 1,6 cm x 60 cm; 124 ml), ioninvaihtokromatografia (Mono Q, 1 ml, FPLC, Pharmacia) ja sama käänteisfaasikolonni, jota käytettiin bakteeriperäisten rBMP-monomeerien puhdistukseen.

Edellä olevaa menetelmää voidaan soveltaa muiden rBMP:ien monomeerien tuottamiseen eukaryoottisessa systeemissä. Tarvittavat muutokset kuuluvat hyvin alan ammattimiesten tietoihin.

Esimerkki 3

5 Demineralisoidun luun indusoiman heterotooppisen luutumisen esto

Inh-rBMP-monomeerien 2 ja 4 (katso esimerkki 1) synergistisen vaikutuksen luutumiseen määrittämiseksi demineralisoitua luujauhetta valmistettiin rotan pitkistä luista oleellisesti julkaisussa Muthukumaran, N. *et al.*, Collagen Rel. Res. **8** (1988) 433 - 441, kuvatulla tavalla. Inaktivoitua luun kollageenin valmistamiseksi demineralisoitu luumateriaali uutettiin 4 M guanidiinihydrokloridilla [Sampath, T. K. ja Reddi, A. H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78** (1981) 7599 - 7603]. Lataamista varten 25 mg demineralisoitua materiaalia punnittiin mikrosentrifugiputkeen ja 120 µl esimerkin 1 inh-rBMP:itä 0,05 mM HCl:ssa, joka sisälsi 0,5 mg kondroitiinisulfaattia, lisättiin. Kontrolli valmistettiin vastaa-

10 vasti ilman proteiinia. Yhden tunnin huoneen lämpötilassa inkuboinnin jälkeen 0,3 ml rotan hännän kollageeniä (2 mg/ml 0,1-prosenttisessa etikkahapossa) lisättiin kantajamateriaaliin, sekoitettiin vortex-sekoittimella, minkä jälkeen inkuboitiin vielä 30 min. Ladattu materiaali sekoitettiin sitten 1,1 ml:aan EtOH:a (säilytetty -80 °C:ssa) ja siirrettiin -80 °C:n pakastimeen yhdeksi tunniksi.

20 Suspensiota sentrifugoitiin 30 min 4 °C:ssa, supernatantti poistettiin ja pelletti pestiin kolmesti 85-prosenttisellä EtOH:lla (-20 °C). Lopullinen pelletti muodostettiin 1 ml:n ruiskussa ja kuivattiin steriilin kuvun alla yön yli.

Kuivatut pelletit implantoitiin ihon alle 200 - 300 g painavien, nukutettujen Sprague-Dawley-rottien rintakehän alueelle ja yksi pelletti implantoitiin

25 rintakehän kummallekin puolelle.

Demineralisoidut luupreparaatit, jotka sisälsivät inh-rBMP:itä, sijoitettiin rottien ihon alle rintakehän molempien puolien päälle. Jokaisessa eläimessä yksi implantaatti oli käsitelty 5 µg:lla, 25 µg:lla tai 50 µg:lla rBMP-monomeerejä ja vastakkainen implantaatti oli käsittelemätön. 21 päivän kuluttua

30 implantaatit poistettiin ja luutumisen aste määritettiin mittaamalla niiden kalsiumsisältö. Implantaatin osa punnittiin ja homogenoitiin omni-mixer-laitteella (Waterbury, CT, USA) 1,5 ml:ssa seosta, jossa oli 3 mM NaHCO₃:a ja 150 mM NaCl:a. Sentrifugoinnin (1 000 x g, 15 min) jälkeen pelletti suspendoitiin uudelleen kolmesti 1 ml:aan 10 mM Tris-HCl:a, pH 7, ja sekoitettiin huoneen lämpötilassa

35 1 h. Viimeisen pesun jälkeen pellettejä uutettiin yön yli 1 ml:lla 0,5 M HCl:a. Uutteen kalsiumsisältö mitattiin atomiabsorptiospektroskopiolla.

Tulokset esitetään kuvioissa 1a ja 1b. Kuten niistä voidaan nähdä, sekä inh-rBMP-2- että inh-rBMP-4-monomeerit, jotka ovat 87-prosenttisesti identtisiä aminohappotasolla, kykenevät vähentämään implanttien kalsiumsisältöä annoksesta riippuvalla tavalla. Kuitenkin kun inhBMP-2 ja inhBMP-4-
5 monomeerit lisätään 1:1-seoksena, jopa niinkin matala annos kuin 25 µg riittää vähentämään kalsiumsisällön 39 prosenttiin kontrolliarvosta (kuvio 1c).

Lisäksi useimmat implantaatit tutkittiin histologisesti inh-rBMP-mo-
nomeerien vaikutuksen solutasolla tutkimiseksi. Implantaatit kiinnitettiin ja upo-
tettiin sitten poly(metyylimetakrylaattiin). Valmistettiin 4,5 µm paksut histologiset
10 leikkeet ja värjättiin Goldner-Trichrome- ja toluidiinisininen-väreillä. Värjätyt leik-
keet tutkittiin luun muodostumisen, solutyypin, morfologian ja stromaalisten yksi-
tyiskohtien suhteen käyttäen kirkaskenttävalomikroskopiaa.

Mitään merkkejä tulehduksellisesta immuunireaktiosta tai muusta
poikkeavuudesta ei voida havaita. Ainoa selvä vaste yksittäiselle inh-rBMP-mo-
15 nomeeriannokselle on implantaatin luutumisen viivästyminen (kuvio 2).

Esimerkki 4

inh-rBMP:ien inhiboiva vaikutus solutasolla

Hiiren osteoblastisolulinjaa MC3T3-E1 käytettiin inh-rBMP-2:n ja
inh-rBMP-4:n inhiboivien vaikutusten tutkimiseksi solutasolla. Nämä solut tuotta-
20 vat endogeenistä BMP-2:ta ja BMP-4:ä ja erilaistuvat autokriinisesti kypsiksi
osteoblasteiksi näiden vaikutuksen alaisuudessa [Natsume, T., *et al.*, J. Biol.
Chem. 272 (1997) 11535 - 11540]. Tätä prosessia voidaan monitoroida alkali-
sen fosfataasin (AP) aktiivisuuden lisääntymisen avulla.

MC3T3-E1-soluja kasvatettiin alpha-modifioidussa Minimum Essen-
25 tial Medium -väliaineessa (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA), joka
sisälsi 10 % vasikansikiöseerumia (Life Technologies, Inc.), 50 µg/ml genta-
mysiiniä ja 50 µg/ml askorbiinihappoa. rBMP:n laskosvarianttien biologisen
aktiivisuuden tutkimiseksi 1×10^5 solua per kuoppa levitettiin 6-kuoppaisille
levyille, minkä jälkeen proteiini lisättiin. Väliaine vaihdettiin kolmen päivän kulut-
30 tua ja alkalinen fosfataasi määritettiin päivänä 6. Solut pestiin kolmesti fosfaatilla
puskuroidulla fysiologisella suolaliuoksella ja yhden kuopan solut yhdistettiin
0,5 ml:ssa hajotuspuskuria (0,56 M 2-amino-2-methylpropan-1-oli, pH 10) ja
homogenoitiin omni-mixer-laitteella. 200 µl solulysaattia sekoitettiin 200 µl:aan
hajotuspuskuria, jota oli täydennetty 20 mM p-nitrofenyylifosfaatilla ja 4 mM
35 MgCl₂:lla 4 °C:ssa.

Alkalisen fosfataasin aktiivisuus määritettiin Lowry, O. *et al.*:n. [J. Biol. Chem. **207** (1954) 19 - 37] mukaan. Lisäämällä 400 µl 1 M NaOH:ä vapautunut p-nitrofenoli muutettiin p-nitrofenylaattiksi, joka kvantitoitiin mittaamalla absorbanssi aallonpituudella 410 nm (epsilon = 17 500/mol x cm). Alkalisen fosfataasin aktiivisuus normalisoitiin kokonaisproteiiniin ja ilmoitettiin nmol:ina muodostunutta nitrofenylaattia kohti per min per mg proteiini.

MC3T3-E1-solujen käsittely monomeerisellä inh-rBMP-2:lla tai inh-rBMP-4:lla yksin ei saa aikaan merkittävää AP-aktiivisuuden vähenemistä. Kuitenkin käytettynä 1:1-seoksena inh-rBMP-2- ja inh-rBMP-4-monomeerit vähentävät AP-aktiivisuutta annoksesta riippuvalla tavalla (kuvio 4).

Esimerkki 5

Rakenteelliset elementit ja inhibitiokohta inh-rBMP:issä

Sen tutkimiseksi, mitkä rakenteelliset elementit inh-rBMP-4:ssa osallistuvat inhibitioon, käytettiin MC3T3-E1-soluja. Käytettiin kypsien inh-rBMP-4:n ja inh-rBMP-2:n 1:1-seosta ja kolmea inh-rBMP-4:n deleetiomutanttia. Kypsät BMP-ekspressiokonstruktit muodostettiin PCR:llä käyttäen vastaavia cDNA:ita templaattina. Aloituskodoni osana Nde-restriktiokohtaa vietiin PCR-reaktiolla [Weber, F. *et al.*, Cell Mol Life Sci **54** (1998) 751 - 759] kypsän BMP-sekvenssin eteen [Wozney, J. M. *et al.*, Prog Growth Factor Res **1** (1989) 267 - 280], mikä lisäsi N-terminaalisen yhden metioniinin jatkeen kypsään sekvenssiin. Deleetiomutantit muodostettiin vastaavasti insertoimalla pysäytyskodoni mutantteihin 1 ja 2 tai insertoimalla aloituskodoni määrättyihin asemiin käyttäen alan ammattimiesten tuntemia menetelmiä.

MC3T3-E1-soluja käsiteltiin 1 µg:lla proteiinia/ml kypsien inh-rBMP-4:n ja inh-rBMP-2:n 1:1-seosta tai 1 µg:lla proteiinia/ml inh-rBMP-4-mutantteja ja niiden alkalisen fosfataasin aktiivisuus analysoitiin.

Kypsän BMP-4:n aminohapposekvenssi, joka on identtinen inh-rBMP-4:n kanssa, sisältää 115 aminohappoa. Mutantti 1 kattaa aminohapot 46 - 115; mutantti 2 aminohapot 1 - 55 ja mutantti 3 aminohapot 1 - 88. Dimerisaatiosta vastaava kysteiini sijaitsee asemassa 79 ja on siten läsnä mutanteissa 1 ja 3. Kysteiinisolmun muodostamiseen osallistuvat kysteiinitähteet ovat asemissa 14, 43, 47, 79, 111 ja 113 ja niinpä yksikään mutanteista ei pystynyt muodostamaan kokonaista kysteiinisolmurakennetta.

Inh-rBMP-4:n mutantti 1 kattaa koko sen alueen, joka osallistuu sormen 2 muodostamiseen mutta ei sormen 1 aluetta. Mutantit 2 ja 3 sisältävät vain sormen 1 alueen mutta eivät sormen 2 aluetta. Kuten kuviossa 5 esitetään,

mutantti 1, mutteivät mutantit 2 tai 3, kykeni vähentämään AP-aktiivisuutta MC3T3-E1-soluissa, kun taas kysteiiniin 79, joka osallistuu dimeerin muodostamiseen, läsnä tai poissa olo ei korreloinut soluvasteen kanssa. Siten aminohapposekvenssi, joka on vastuussa luutumisen inhibitiosta, sijaitsee kypsän BMP:n C-terminaaliosassa, alueella, jossa antiparalleeli B-levy, joka ottaa vääristyneen ristikkäisen konformaation, muodostaa sormen 2.



SEQUENCE LISTING

<110> Inion Ltd.

5 <120> Pharmaceutical composition

<130> BMP

<140>

10 <141>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

15 <210> 1
<211> 381
<212> DNA
<213> Homo sapiens

20 <400> 1
atgcaagcca aacacaaaaca gcggaacgc cttaaagtcca gctgtaagag acaccctttg 60
tacgtggact tcagtgaagt ggggtggaat gactggattg tggctcccc ggggtatcac 120
gccttttact gccacggaga atgccctttt cctctggctg atcatctgaa ctccactaat 180
25 catgccattg ttcagacggt ggtcaactct gttaactcta agattcctaa ggcatgctgt 240
gtcccgcacag aactcagtg c tatctcgatg ctgtaccttg acgagaatga aaaggttgta 300
ttaaagaact atcaggacat ggttgtggag ggttgtgggt gtcgctagta cagcaaaatt 360
aaatacataa atatatatat a 381

30 <210> 2
<211> 484
<212> DNA
<213> Homo sapiens

35 <400> 2
atgagcccta agcatcactc acagcggggc aggaagaaga ataagaactg ccggcgccac 60
tcgctctatg tggacttcag cgatgtgggc tggaatgact ggattgtggc ccaccaggc 120
taccaggcct tctactgcca tggggactgc ccctttccac tggctgacca cctcaactca 180
40 accaaccatg ccattgtgca gaccctggtc aattctgtca attccagtat ccccaaagcc 240
tgttgtgtgc ccaactgaact gagtgccatc tccatgctgt acctggatga gtatgataag 300
gtggactga aaaattatca ggagatggta gtagagggat gtgggtgccc ctgagatcag 360
gcagtccttg aggatagaca gatatacaca ccacacacac acaccacata caccacacac 420
acacgttccc atccactcac ccacacacta cacagactgc ttccttatag ctggactttt 480
45 attt 484

<210> 3
<211> 1751
<212> DNA
<213> Homo sapiens

50 <400> 3
ggcagaggag gagggaggga gggaggagc gcgagcccc gcccggaagc taggtgagtg 60
55 tggcatccga gctgaggac gcgagcctga gacgcccgtg ctgctccggc tgagtatcta 120
gcttgtctcc ccgatgggat tcccgtccaa gctatctcga gcctgcagcg ccacagtccc 180
cggccctcgc ccaggttcac tgcaaccggt cagaggtccc caggagctgc tgctggcgag 240
cccgctactg cagggacctg tgagccatt ccgtagtgcc atcccagca acgcaactgct 300
gcagcttccc tgagcctttc cagcaagttt gttcaagatt ggctgtcaag aatcatggac 360
60 tgttattata tgccttgttt tctgtcaaga caccatgatt cctggtaacc gaatgctgat 420
ggtcgtttta ttatgccaag tctgtctagg aggcgcgagc catgctagtt tgatacctga 480
gacggggaag aaaaaagtcg ccgagattca gggccacgcg ggaggacgcc gctcagggca 540

	gagccatgag	ctcctgcggg	acttcgaggg	gacaattctg	cagatgtttg	ggctgcgccc	600
	ccgcccgcag	cctagcaaga	gtgccgtcat	tccggactac	atgcgggatc	tttaccggct	660
	tcagtctggg	gaggaggagg	aagagcagat	ccacagcact	ggtcttgagt	atcctgagcg	720
	cccggccagc	cgggccaaca	ccgtgaggag	cttccaccac	gaagaacatc	tggagaacat	780
5	cccagggacc	agtgaaaact	ctgcttttcg	tttcctcttt	aacctcagca	gcacccctga	840
	gaacgaggtg	atctcctctg	cagagcttcg	gctcttcocg	gagcaggtgg	accagggccc	900
	tgattgggaa	aggggcttcc	accgtataaa	catttatgag	gttatgaagc	ccccagcaga	960
	agtgggtgct	gggcacctca	tcacacgact	actggacacg	agactggctc	accacaatgt	1020
	gacacggtgg	gaaacttttg	atgtgagccc	tgcggctcct	cgctggaccc	gggagaagca	1080
10	gccaaactat	gggctagcca	ttgaggtgac	tcacctccat	cagactcgga	cccaccaggg	1140
	ccagcatgtc	aggattagcc	gatcgttacc	tcaagggagt	gggaattggg	cccagctccg	1200
	gccccctctg	gtcacctttg	gccatgatgg	ccggggccat	gccttgaccc	gacgcccggg	1260
	ggccaagcgt	agccctaagc	atcactcaca	gcgggccagg	aagaagaata	agaactgccc	1320
	gcgccactcg	ctctatgtgg	acttcagcga	tgtgggctgg	aatgactgga	ttgtggcccc	1380
15	accaggctac	caggccttct	actgccatgg	ggactgcccc	ttccactgg	ctgaccacct	1440
	caactcaacc	aacctatgcca	ttgtgcagac	cctggccaat	tctgtcaatt	ccagtatccc	1500
	caaagcctgt	tgtgtgcccc	ctgaactgag	tgccatctcc	atgctgtacc	tggatgagta	1560
	tgataaggtg	gtactgaaaa	attatcagga	gatggtagta	gagggatgtg	ggtgccgctg	1620
	agatcaggca	gtccttgagg	atagacagat	atacacacca	cacacacaca	ccacatacac	1680
20	cacacacaca	cgttcccatc	cactcaccca	cacactacac	agactgcttc	cttatagctg	1740
	gacttttatt	t					1751



Patenttivaatimukset

1. Farmaseuttinen koostumus, joka soveltuu käytettäväksi ortopedi-
assa ja hammaslääketieteessä, tunnettu siitä, että se sisältää vähintään
5 kahden rekombinanttisen luun morfogeneettisen proteiinin (rBMP) tai niiden
monomeerien pysyvien laskosvarianttien synergistisen seoksen sopivassa
farmaseuttisessa kantajasysteemissä, jolloin pysyvät laskosvariantit eroavat
disulfidididosten muodostumisen suhteen ja tämän seurauksena kolmiulottei-
sen konformaation suhteen vastaavista kypsistä rBMP:ista tai rBMP-mono-
10 meereistä, tai ne on saatu uudelleenlaskostamalla tällainen laskosmuoto, ja
jolloin mainittu rBMP valitaan rBMP-2:n, rBMP-4:n ja rBMP-7:n tai niiden mo-
nomeerien joukosta.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttinen koostumus,
tunnettu siitä, että mainitut pysyvät laskosvariantit voidaan saada käsitte-
15 lemällä vastaavia kypsiä rBMP:ja tai rBMP-monomeerejä kaotrooppisella ai-
neella, pelkistäväällä aineella tai hapettavalla aineella sopivassa puskurissa ai-
ka, joka on riittävän pitkä muuttamaan stereokemiaa siten, ettei dimerisoi-
tusta tapahdu.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen farmaseuttinen koostumus,
20 tunnettu siitä, että mainitut pysyvät laskosvariantit ovat rBMP-dimeerien
pysyviä laskosvariantteja.

4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen farmaseuttinen koostumus,
tunnettu siitä, että mainitut pysyvät laskosvariantit ovat rBMP-mono-
meerien pysyviä laskosvariantteja.

25 5. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen farmaseuttinen koostumus,
tunnettu siitä, että mainitut pysyvät laskosvariantit ovat
rBMP-2:n ja rBMP-4:n, rBMP-2:n ja rBMP-7:n tai
rBMP-4:n ja rBMP-7:n tai mainittujen rBMP:iden monomeerien py-
syviä laskosvariantteja.

30 6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen farmaseuttinen koostumus,
tunnettu siitä, että mainitut pysyvät laskosvariantit ovat rBMP-2:n ja
rBMP-4:n tai niiden monomeerien pysyviä laskosvariantteja.

7. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen farmaseuttinen koostumus, tunnettu siitä, että mainittujen pysyvien laskosvarianttien painosuhte on alueella 1 - 10:1 - 10, edullisesti alueella 1 - 5:1 - 5.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen farmaseuttinen koostumus, tunnettu siitä, että mainittujen pysyvien laskosvarianttien painosuhte on 1:1.

9. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen farmaseuttinen koostumus, tunnettu siitä, että se sisältää rBMP-2:n, rBMP-4:n ja rBMP-7:n tai niiden monomeerien pysyvät laskosvariantit.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen farmaseuttinen koostumus, tunnettu siitä, että mainittujen pysyvien laskosvarianttien painosuhte on alueella 1 - 10:1 - 10:1 - 10, edullisesti alueella 1 - 5:1 - 5:1 - 5.

11. Patenttivaatimuksen 9 mukainen farmaseuttinen koostumus, tunnettu siitä, että mainittujen pysyvien laskosvarianttien painosuhte on 1:1:1.

12. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen farmaseuttinen koostumus, tunnettu siitä, että mainittu farmaseuttinen kantajajärjestelmä on säädellysti lääkeainetta vapauttava järjestelmä.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen farmaseuttinen koostumus, tunnettu siitä, että mainittu säädellysti lääkeainetta vapauttava järjestelmä perustuu biohajoavaan polymeeriin.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen farmaseuttinen koostumus, tunnettu siitä, että mainittu biohajoava polymeeri on polyylaktidin ja polyglykosidin kopolymeeri.

15. Koostumuksen käyttö, joka koostumus sisältää vähintään kahden rekombinanttisen luun morfogeneettisen proteiinin (rBMP) tai niiden monomeerien pysyvien laskosvarianttien synergistisen seoksen sopivassa farmaseuttisessa kantajajärjestelmissä, jolloin pysyvät laskosvariantit eroavat disulfididosten muodostumisen suhteen ja tämän seurauksena 3-ulotteisen konformaation suhteen vastaavista kypsistä rBMP:ista tai rBMP-monomeereista, tai ne on saatu uudelleenlaskostamalla tällainen laskosmuoto, ja jolloin mainittu rBMP valitaan rBMP-2:n, rBMP-4:n ja rBMP-7:n tai niiden monomeerien joukosta, valmistettaessa lääkettä, joka on tarkoitettu käytettäväksi luun muodostusta inhiboivana aineena ortopediassa ja hammaslääketieteessä.

35

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen käyttö, tunnettu siitä, että mainittua koostumusta käytetään valmistettaessa lääkettä, joka on tarkoitettu käytettäväksi heterotrofisen ossifikaation ja muiden sairauksien hoidossa, joihin liittyy ei-toivottu luun muodostuminen.

5 17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen käyttö, tunnettu siitä, että mainittua koostumusta käytetään valmistettaessa lääkettä, joka on tarkoitettu käytettäväksi Cranio-maxillokasvokirurgiassa.



Patentkrav

1. Farmaceutisk komposition, som lämpar sig för användning inom ortopedi och odontologi, k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller en syner-
5 gistisk blandning av åtminstone två rekombinanta benmorfogenetiska protein (rBMP) eller deras monomerers stabila veckvarianter i ett lämpligt farmaceutiskt bärarsystem, varvid de stabila veckvarianterna skiljer sig i förhållande till bildandet av disulfidbindningar och till följd av detta i förhållande till en tredimensionell konformation från motsvarande mogna rBMP eller rBMP-monomer-
10 merer, eller de har erhållits genom att man på nytt veckat denna veckform, och varvid nämnda rBMP väljs bland rBMP-2, rBMP-4 och rBMP-7 eller deras monomerer.

2. Farmaceutisk komposition enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d av att nämnda stabila veckvarianter kan erhållas genom att man be-
15 handlar motsvarande mogna rBMPer och rBMP-monomerer med ett kaotropiskt medel, ett reducerande medel eller ett oxiderande medel i en lämplig buffert under en tid, som är tillräckligt lång för att ändra stereokemin så att ingen dimerisering sker.

3. Farmaceutisk komposition enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a d av att nämnda stabila veckvarianter är stabila veckvarianter av
20 rBMP-dimerer.

4. Farmaceutisk komposition enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a d av att nämnda stabila veckvarianter är stabila veckvarianter av
rBMP-monomerer.

5. Farmaceutisk komposition enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a d av att nämnda stabila veckvarianter är stabila veckvarianter av
25 rBMP-2 och rBMP-4,
rBMP-2 och rBMP-7 eller
rBMP-4 och rBMP-7 eller av nämnda rBMP:s monomerer.

6. Farmaceutisk komposition enligt patentkrav 5, k ä n n e t e c k n a d av att nämnda stabila veckvarianter är stabila veckvarianter av rBMP-2
30 och rBMP-4 eller deras monomerer.

7. Farmaceutisk komposition enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a d av att viktförhållandet för nämnda stabila veckvarianter är i områ-
35 det 1 - 10:1 - 10, företrädesvis i området 1 - 5:1 - 5.

8. Farmaceutisk komposition enligt patentkrav 7, kännetecknad av att viktförhållandet för nämnda stabila veckvarianter är 1:1.

9. Farmaceutisk komposition enligt patentkrav 1 eller 2, kännetecknad av att den innehåller stabila veckvarianter av rBMP-2, rBMP-4 och rBMP-7 eller deras monomerer.

10. Farmaceutisk komposition enligt patentkrav 9, kännetecknad av att viktförhållandet för nämnda stabila veckvarianter är i området 1-10:1 - 10:1 - 10, företrädesvis i området 1 - 5:1 - 5:1 - 5.

11. Farmaceutisk komposition enligt patentkrav 9, kännetecknad av att viktförhållandet för nämnda stabila veckvarianter är 1:1:1.

12. Farmaceutisk komposition enligt patentkrav 1 eller 2, kännetecknad av att nämnda farmaceutiska bärarsystem är ett system som frigör läkemedel reglerat.

13. Farmaceutisk komposition enligt patentkrav 12, kännetecknad av att nämnda system som frigör läkemedel reglerat baserar sig på en biodegraderbar polymer.

14. Farmaceutisk komposition enligt patentkrav 13, kännetecknad av att nämnda biodegraderbara polymer är en sampolymer av polyaktid och polyglykosid.

15. Användning av en komposition, vilken komposition innehåller en synergistisk blandning av åtminstone två rekombinanta benmorfogenetiska protein (rBMP) eller deras monomerers stabila veckvarianter i ett lämpligt farmaceutiskt bärarsystem, varvid de stabila veckvarianterna skiljer sig i förhållande till bildandet av disulfidbindningar och till följd av detta i förhållande till en 3-dimensionell konformation från motsvarande mogna rBMP eller rBMP-monomerer, eller de har erhållits genom att man på nytt veckat denna veckform, och varvid nämnda rBMP väljs bland rBMP-2, rBMP-4 och rBMP-7 eller deras monomerer, vid framställning av ett läkemedel som är avsett att användas som ett benbildningsinhiberande medel inom ortopedi och odontologi.

16. Användning enligt patentkrav 15, kännetecknad av att nämnda komposition används vid framställning av ett läkemedel som är avsett att användas vid vård av heterotrofisk ossifikation och andra sjukdomar förknippade med icke-önskvärd benbildning.

17. Användning enligt patentkrav 16, kännetecknad av att nämnda komposition används vid framställning av ett läkemedel som är avsett att användas inom Cranio-maxilloansiktsskirurgi.

Fig. 1

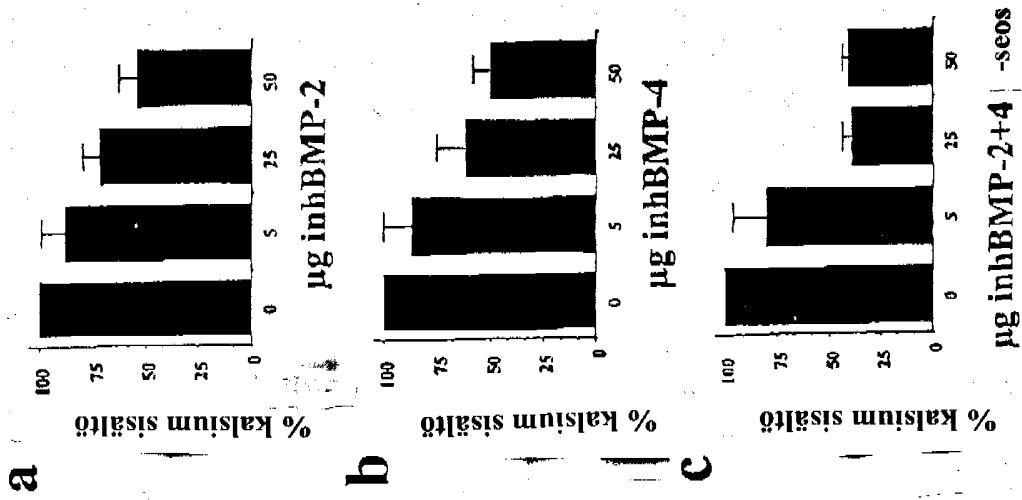
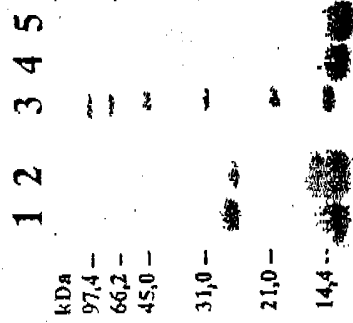


Fig. 2



08-10005 0111770

Fig. 3



117667

Fig. 4

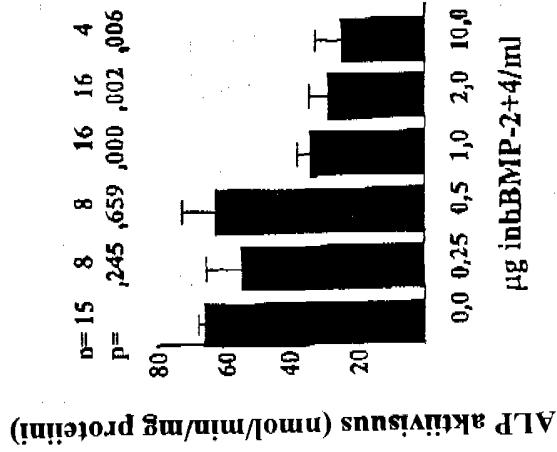


Fig. 5

