(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 33 040 T3** 2007.10.11

(12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 653 942 B2**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 040.6**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/07231**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 918 560.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1994/003200**
(86) PCT-Anmeldetag: **29.07.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **17.02.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.05.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **11.06.2003**
(97) Veröffentlichungstag des geänderten Patents beim EPA: **07.03.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.10.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 38/18*** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

922813	**31.07.1992**	**US**
29335	**04.03.1993**	**US**
40510	**31.03.1993**	**US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Curis, Inc., Cambridge, Mass., US

(74) Vertreter:
Patentanwälte Wallach, Koch & Partner, 80339 München

(72) Erfinder:
RUEGER, David C., Hopkinton, US;
KUBERASAMPATH, Thangavel, Medway, US;
OPPERMANN, Hermann, Medway, US;
OZKAYNAK, Engin, Milford, US; PANG, Roy H.L., Etna, US; COHEN, Charles M., Medway, US

(54) Bezeichnung: **MORPHOGEN INDUZIERTE NERVEN WIEDERHERSTELLUNG UND WIEDERGUTMACHUNG.**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Ausgangspunkt der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von Morphogenen, wie sie in den Ansprüchen definiert ist. Die Erfindung stellt weiterhin eine Vorrichtung bereit.

[0002] Das Säugetiernervensystem umfasst ein periphäres Nervensystem (PNS) und ein zentrales Nervensystem (ZNS, umfassend das Gehirn und das Rückenmark) und ist aus zwei Hauptklassen von Zellen zusammengesetzt: Nerven- und Gliazellen. Die Gliazellen füllen die Räume zwischen den Nervenzellen, ernähren diese und modulieren deren Funktion. Bestimmte Gliazellen, wie beispielsweise Schwann-Zellen im PNS und Oligodendrocyten im ZNS stellen ebenfalls eine Myelin-Schutzscheide bereit, die die Nerven-Axons umgeben und schützen, die die Fortsätze darstellen, die sich vom Nervenzellkörper aus erstrecken und durch die die elektrischen Impulse des Neurons transportiert werden. Im periphären Nervensystem werden die langen Axons vielfacher Nervenzellen zusammengebündelt, um einen Nerv oder eine Nervenfaser zu bilden. Diese wiederum können zu Faszikeln zusammengefaßt werden, wobei die Nervenfasern Bündel bilden, die zusammen mit der intraneuralen vaskulären Versorgung in eine lose kollagenöse Matrix eingebettet sind, begrenzt durch eine protektive multilammelare Scheide. Im zentralen Nervensystem sind die Nervenzellkörper visuell von ihren Myelin-ummantelten Fortsätzen unterscheidbar und werden in der Technik als jeweils graue und weiße Masse bezeichnet.

[0003] Während der Entwicklung senden differenzierende Neurons aus den zentralen und peripheren Nervensystemen Axons aus, die wachsen müssen, und die einen Kontakt mit speziellen Zielzellen herstellen müssen. In manchen Fällen müssen wachsende Axons enorme Distanzen abdecken; einige wachsen in die Peripherie, wohingegen andere innerhalb des Zentralnervensystems begrenzt bleiben. In Säugetieren ist dieses Stadium der Neurogenese während der Embryonalphase des Lebens abgeschlossen und die Nervenzellen vermehren sich nicht mehr, wenn sie einmal vollständig differenziert sind.

[0004] Demgemäß sind die Nervenbahnen eines Säugetiers einem Risiko ausgesetzt, wenn die Nervenzellen einem mechanischen oder chemischen Trauma oder einer neuropathischen Degeneration ausgesetzt werden, die ausreichend ist, dass die Nervenzellen, die die Bahn definieren, einem Risiko des Absterbens unterworfen werden. Eine Vielzahl an Neuropathien, von denen einige nur eine Subpopulation oder ein System von Nervenzellen in den peripheren oder zentralen Nervensystemen beeinträchtigen, wurde bis jetzt identifiziert. Die Neuropathien, die die Nerven selbst oder die mit ihnen verbundenen Gliazellen beeinträchtigen können, können sich aus einer zellulären metabolischen Dysfunktion, Infektion, Exposition gegenüber toxischen Mitteln, Autoimmunitätsdysfunktion, Fehlernährung oder Ischämie ergeben. In einigen Fällen wird angenommen, dass die zelluläre Dysfunktion den Zelltod direkt induziert. In anderen Fällen kann die Neuropathie ausreichend Gewebsnekrose induzieren, um das Immun-/Entzündungssystem des Körpers zu stimulieren und die Mechanismen der Immunantwort des Körpers auf die initiale neuronale Verletzung zerstört dann die Nervenzellen und die Bahn, die von diesen Nervenzellen definiert ist.

[0005] Es existiert gegenwärtig kein zufriedenstellendes Verfahren zur Reparatur bzw. Heilung des Schadens, der durch diese Neuropathien verursacht ist, die Multiple Sklerose, amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Chorea Huntington, Alzheimer Krankheit, Parkinson Krankeit (Parkinsonismus) oder metabolisch abgeleitete Störungen, wie beispielsweise eine hepatische Enzephalopathie, einschließen. Gegenwärtige Ansätze, diesen Wirkungen schwerer traumatischer oder neuraler degenerativer Läsionen des Gehirns und/oder Rückenmarks entgegenzuwirken, haben bis heute in erster Linie die Implantation embryonaler Nervenzellen bei einem Versuch involviert, verloren gegangene oder mangelhafte Nervenzellen funktionell zu ersetzen oder in anderer Weise zu kompensieren. Gegenwärtig jedoch ist die Forschungsarbeit mit humanen Fötalzellen in ernsthafter Weise beschränkt. Die Verabreichung neurotropher Faktoren wie z.B. Nervenwachstumsfaktor und Insulin-artigem Wachstumsfaktor wurden zur Stimulierung des Nervenwachstums innerhalb des ZNS vorgeschlagen (siehe beispielsweise Lundbord, (1987) Acta Orthop. Scand. 58: 145-169 und US-Patent Nr. 5 093 317). Die Verabreichung neurotropher Faktoren an das ZNS erfordert eine Umgehung der Blut-Hirn-Schranke. Die Barriere kann durch direkte Infusion oder durch Modifizieren des Moleküls überwunden werden, um dessen Transport über die Schranke hinweg zu verbessern, wie durch chemische Modifikation oder Bindung oder durch Molekültrunkierung. Ebenfalls wurden Schwann-Zellen an den Ort einer ZNS-Läsion in einem Versuch transplantiert, das Wachstum geschädigter Nervenfortsätze zu stimulieren und aufrechtzuerhalten (Paino et al. (1991) Exp. Neurology 114(2) 254-257).

[0006] Wenn sich die geschädigte Nervenbahn aus einer ZNS-Axon-Schädigung ergibt, wurden autologe pe-

riphere Nerventransplantate dazu verwendet, Läsionen im Zentralnervensystem zu überbrücken, um den Axons zu ermöglichen, zu ihrem normalen Zielareal zurückzukehren. Im Gegensatz zu ZNS-Neuronen können Neuronen des peripheren Nervensystems neue Peripherfortsätze in Reaktion auf eine Axon-Schädigung prolongieren. Es wird angenommen, dass die regenerative Fähigkeit von Axons des peripheren Nervensystems ausreichend ist, um eine Transplantation dieser Segmente an ZNS-Axons zu erlauben. Eine erfolgreiche Transplantierung scheint jedoch durch mehrere Faktoren limitiert zu sein, einschließlich der Länge der ZNS-Axon-Läsion, die umgangen werden muss und der Entfernung der Transplantatstellen von den ZNS-Nervenzellkörpern, wobei erfolgreiche Transplantate nahe dem Zellkörper auftreten.

[0007] Innerhalb der peripheren Nervensystems weist die zelluläre Regenerationsfähigkeit der Nervenzellen eine beschränkte Fähigkeit auf, die Funktion einer geschädigten Nervenbahn wieder herzustellen. Insbesondere prolongieren sich neue Axons nach dem Zufallsprinzip und sind oftmals falsch ausgerichtet, und stellen daher eine Berührung mit nicht geeigneten Zielen her, die eine abnormale Funktion verursachen können. Wenn beispielsweise ein motorischer Nerv geschädigt ist, können neu wachsende Axons die falschen Muskeln berühren, was eine Paralyse zur Folge hat. Zusätzlich tritt eine geeignete Nervenregeneration nicht auf, wo abgebrochene Nervenfortsätze eine Lücke von mehr als einigen Millimetern, beispielsweise mehr als 10 Millimeter (mm) zur Folge haben, entweder weil die Fortsätze die notwendige Distanz nicht überwachsen können oder wegen eines falsch ausgerichteten Axon-Wachstums. Versuche, eine periphere Nervenschädigung durch chirurgische Mittel zu heilen, hat gemischte Ergebnisse mit sich gebracht, insbesondere, wo eine Schädigung sich über eine bedeutende Distanz erstreckt. In einigen Fällen stimulieren die Vernähungsschritte, die zur Gewinnung einer geeigneten Ausrichtung der abgebrochenen Nervenenden aneinander verwendet werden, die Bildung von Narbengewebe, von dem angenommen wird, dass es die Axon-Regeneration hemmt. Sogar dort, wo eine Narbengewebsbildung reduziert wurde, wie bei Verwendung von Nervenleitkanälen oder anderen rohrförmigen Prothesen, ist eine erfolgreiche Regeneration im allgemeinen nach wie vor auf eine Nervenschädigung von weniger als 10 mm Distanz beschränkt. Zusätzlich wird die reparative Fähigkeit peripherer Neuronen signifikant gehemmt, wenn eine Verletzung oder Neuropathie den Zellkörper selbst beeinträchtigt oder eine extensive Degeneration eines distalen Axons zur Folge hat.

[0008] Säugetiernervenbahnen unterliegen ebenfalls einem Risiko aufgrund einer Schädigung, die durch neoplastische Läsionen verursacht ist. Neoplasien sowohl von Nervenzellen als auch Gliazellen wurden identifiziert. Transformierte Zellen neuralen Ursprungs verlieren im allgemeinen ihre Fähigkeit, sich wie normale differenzierte Zellen zu verhalten und können Nervenbahnen durch Funktionsverlust zerstören. Zusätzlich können proliferierende Tumoren durch Störung der normalen Nervengewebsstruktur, durch Hemmung der Bahnen durch Zusammendrücken der Nerven, durch Hemmen der Strömung cerbrospinaler Flüssigkeit oder der Blutzufuhr und/oder durch Stimulieren der Immunreaktion des Körpers induzieren. Metastatische Tumoren, die eine signifikante Ursache neoplastischer Läsionen im Gehirn und Rückenmark sind, können in ähnlicher Weise Nervenbahnen schädigen und den neuronalen Zelltod induzieren.

[0009] Eine Art morphoregulatorischer Moleküle, die mit dem Nervenzellwachstum, Differenzierung und Entwicklung verbunden sind, ist das Zelladhäsions-Molekül („CAM"), besonders erwähnenswert das Nervenzelladhäsions-Molekül (N-CAM). Die CAMs gehören zur Immunglobulin-Superfamilie und vermitteln Zell-Zell-Wechselwirkungen bei der Entwicklung von adulten Geweben durch homophile Bindung, d.h. CAM-CAM-Bindung von gegenüberliegenden Zellen. Mehrere unterschiedliche CAMs wurden bis jetzt identifiziert. Von denen sind die am sorgfältigsten untersuchten bis jetzt N-CAM und L-CAM (Leberzelladhäsions-Moleküle), die beide auf allen Zellen in frühen Stadien der Entwicklung, ebenso wie in unterschiedlichen adulten Geweben identifiziert wurden. In der Nervengewebsentwicklung wird angenommen, dass die N-CAM-Expression in der Gewebsorganisation, in der neuronalen Migration, in der Nerven-Muskelgewebs-Anhaftung, in der retinalen Ausbildung, in der Synaptogenese und in der Nervendegeneration von Bedeutung ist. Es wird ebenfalls angenommen, dass die reduzierte N-CAM-Expression mit einer nervlichen Dysfunktion verbunden ist. Beispielsweise wird die Expression zumindest einer Form von N-CAM, nämlich N-CAM 180 in einer dysmyelinisierenden Maus-Mutante reduziert (Bhat (1988) Brain Res. 452: 373-377). Reduzierte Konzentrationen von N-CAM wurden ebenfalls mit einem Normaldruck Hydrocephalus in Verbindung gebracht (Werdelin (1989) Acta Neurol. Scan. 79: 177-181) und mit Typ II Schizophrenie (Lyons et al. (1988) Biol. Psychiatry 23: 769-775). Es wurde zusätzlich gezeigt, dass Antikörper gegen N-CAM die funktionelle Erholung verletzter Nerven stören (Remsen (1990) Exp. Neurobiol. 110: 268-273).

[0010] Es ist eine weitere Aufgabe, Mittel zum Stimulieren einer CAM-Expression, insbesondere N-CAM-Expression, in einer Zelle bereitzustellen.

[0011] WO 92/00382 beschreibt ein DNA-Segment, das ein Säugetier GDF-1 Protein kodiert und das dadurch

kodierte Protein.

[0012] Jones et al. (1991) Biol. Abstract Nr. 19 Ab-444 (Abstract Nr. 106 862) beschreibt in situ Hybridisierungsstudien der Expressionsmuster von BMP-4 und VGR-1 im zentralen Nervensystem der Maus.

[0013] WO 92/15323 beschreibt morphogenetische Proteine, die in Säugetieren eine Gewebsmorphogenese induzieren können.

Zusammenfassung der Erfindung

[0014] Die Erfindung stellt eine Verwendung eines Morphogens, wie sie in den beigefügten Ansprüchen definiert ist, und eine Vorrichtung zur Aufrechterhaltung von Nervenbahnen in einem Säugetier in vivo bereit.

[0015] Eine therapeutisch wirksame Menge eines morphogenetischen Proteins („Morphogen") kann in der hier definierten Weise verwendet werden,

[0016] Zu Erläuterungszwecken schließen Verfahren zur Verbesserung des Überlebens von Nervenzellen bereit, die einem Risiko des Absterbens unterliegen den Schutz von Neuronen vor Gewebszerstörenden Effekten, die mit der Immun-/Entzündungsreaktion des Körpers auf eine Nervenverletzung in Verbindung stehen. Verfahren zur Stimulierung von Neuronen zur Aufrechterhaltung ihres differenzierten Phänotyps schließen die Induzierung der Redifferenzierung transformierter Zellen neuronalen Ursprungs zu einer Morphologie ein, die für nicht transformierte Neuronen charakteristisch ist. Mittel zum Stimulieren der Produktion von Zelladhäsions-Molekülen in Zellen, insbesondere von Nervenzelladhäsions-Molekülen (N-CAM) in Neuronen werden offenbart. Die Erfindung stellt weiterhin Vorrichtungen zum Stimulieren der Zellheilung geschädigter Neuronen und Nervenbahnen bereit, einschließlich der Regeneration geschädigter Axons des peripheren und Zentralnervensystems.

[0017] Wie hierin verwendet beschreibt eine „Nervenbahn" einen Nervenkanal bzw. -Kreislauf zur Passage elektrischer Signale von einer Quelle zu einer Zielzellstelle. Die Bahn schließt die Nerven ein, durch die der elektrische Impuls transportiert wird, einschließlich Gruppen von untereinander verbundenen Neuronen, die durch gebündelte neuronale Axons gebildeten Nervenfasern und der Gliazellen, die die Neurone umgeben und mit diesen verbunden sind.

[0018] Die hierin beschriebenen Morphogene sind bei der Heilung geschädigter Nervenbahnen des peripheren Nervensystems von Nutzen. Insbesondere sind die Morphogene zur Heilung geschädigter Bahnen, einschließlich durchtrennter oder in anderer Weise geschädigter Nervenfasern (Nerven) von Nutzen, die eine Regeneration von Nervenfortsätzen, insbesondere von Axons erfordern, über eine verlängerte Distanz, um eine Lücke im Nerv selbst oder zwischen dem Nerv und einer postsynaptischen Zelle zu überbrücken. Insbesondere sind Morphogene, wie sie in den Ansprüchen beschrieben werden, zur Stimulierung einer vollständigen axonalen Nervenregeneration in der Lage, einschließlich einer Vaskularisierung und einer Neubildung der protektiven Myelin-Scheiden. Das Morphogen wird vorzugsweise an die Verletzungsstelle in einem biokompatiblen, bioresorbierbaren Trägermaterial dispergiert verabreicht, das dazu in der Lage ist, das Morphogen an der Stelle zu halten und falls notwendig, Mittel, um das axonale Wachstum vom proximalen zum distalen Ende eines abgetrennten Neurons oder Nervs auszurichten. Beispielsweise können Mittel zum Ausrichten des Axon-Wachstums erforderlich sein, wenn die Nervenregeneration über eine verlängerte Distanz induziert werden soll, wie beispielsweise eine Distanz länger als 10 mm. Viele Träger, die zur Bereitstellung dieser Funktionen geeignet sind, werden ins Auge gefaßt. Beispielsweise schließen nützliche Träger im wesentlichen unlösliche Materialien oder Viskoselösungen ein, die wie hierin offenbart hergestellt werden, umfassend Laminin, Hyaluronsäure oder Collagen oder andere geeignete synthetische, biokompatible Polymermaterialien, wie beispielsweise Polymilchsäuren, Polyglykolsäuren oder Polybuttersäuren und/oder Copolymere hiervon. Der gegenwärtig bevorzugte Träger umfasst eine extrazelluläre Matrixzusammensetzung wie beispielsweise diejenige, die hierin beschrieben ist, die beispielsweise von Maus-Sarkom-Zellen abgeleitet ist. Ebenfalls als besonders nützlich ins Auge gefaßt werden Gehirngewebs-abgeleitete extrazelluläre Matrizes.

[0019] Das Morphogen kann dem Ort als Teil einer Vorrichtung verabreicht werden, wobei das Morphogen in einem Nervenführungskanal angeordnet ist, der die Distanz der geschädigten Bahn überbrückt. Der Kanal dient sowohl als Schutzhülle als auch als physikalisches Mittel zur Führung des Wachstums eines Nervenfortsatzes wie beispielsweise eines Axons. Nützliche Kanäle umfassen eine biokompatible Membran oder Gehäuse, die (das) eine rohrförmige Struktur aufweisen kann, und die (das) eine Dimension aufweist, die ausreichend ist, um die Lücke oder den Bruch im zu heilenden Nerv zu überspannen und die Öffnungen aufweist, die so

angepaßt sind, dass sie die abgetrennten Nervenenden aufnehmen können. Das Gehäuse oder die Membran kann aus irgendeinem biokompatiblen, nicht reizenden Material hergestellt sein, wie beispielsweise Silikon oder einem biokompatiblen Polymer, wie beispielsweise Polyethylen oder Polyethylenvinylacetat. Das Gehäuse kann ebenfalls aus biokompatiblen, bioresorbierbaren Polymeren zusammengesetzt sein, einschließlich beispielsweise Collagen, Hyaluronsäure, Polymilchsäure, Polybuttersäure und Polyglykolsäuren. In einer gegenwärtig bevorzugten Ausführungsform ist die Außenoberfläche des Kanals im wesentlichen impermeabel.

[0020] Das Morphogen kann im Kanal in Verbindung mit einem biokompatiblen Trägermaterial angeordnet sein oder es kann an die Innenoberfläche des Gehäuses absorbiert oder in anderer Weise mit dieser verbunden sein, wie es beispielsweise im US-Patent Nr. 5 011486 beschrieben ist, vorausgesetzt, dass das Morphogen für die abgetrennten Nervenenden erreichbar ist. Zusätzlich sollte, obwohl die Nervenführungskanäle, die hierin beschrieben sind, im allgemeinen eine rohrförmige Form aufweisen für den Fachmann auf dem Gebiet klar sein, dass verschiedene alternative Formen verwendet werden können. Das Lumen der Führungskanäle kann beispielsweise oval oder sogar quadratischen Querschnitt aufweisen. Über dies können die Führungskanäle aus zwei oder mehr Teilen konstruiert sein, die zusammengeklemmt sein können, um die Nervenstumpfe zu befestigen. Die Nervenendigungen können an die Nervenführungskanäle durch Nähte, biokompatible Klebstoffe, wie beispielsweise Fibrinklebstoff oder andere Mittel befestigt werden, die in der medizinischen Technik bekannt sind.

[0021] Zu Zwecken der Erläuterung werden die hierin beschriebenen Morphogene werden ebenfalls als in autologen peripheren Nerven-Segmentimplantaten nützlich angesehen, um geschädigte Nervenbahnen im Zentralnervensystem zu umgehen, wie beispielsweise bei der Heilung geschädigter oder abgelöster Netzhaut oder einer anderen Schädigung des Sehnervs. Hier wird das Morphogen der Stelle der Anlagerung zur Verfügung gestellt, um ein Axon-Wachstum an der Implantatstelle zu stimulieren, insbesondere, wo das geschädigte Axon-Segment, das umgangen werden soll, vom Nervenzellkörper weit entfernt auftritt.

[0022] Die hierin beschriebenen Morphogene sind ebenfalls zur Verbesserung des Überlebens von Nervenzellen nützlich, die dem Risiko eines Absterbens unterliegen, wodurch eine Schädigung von Nervenbahnen verhindert, eingeschränkt, oder in anderer Weise gehemmt wird. Nicht-mitotische Nervenzellen sind als Folge einer Neuropathie oder einer anderen zellulären Dysfunktion einer Nerven- oder Gliazelle, die einen Zelltod induziert, oder im Anschluß an eine chemische oder mechanische Verletzung der Zelle oder des diese umgebenden Gewebes, dem Risiko eines Absterbens ausgesetzt. Die chemischen Läsionen können sich aus bekannten toxischen Mitteln, einschließlich Blei, Ethanol, Ammoniak, Formaldehyd und vielen anderen organischen Lösungsmitteln ergeben, ebenso wie den Toxinen in Zigarettenrauch und Opiaten. Excitatorische Aminosäuren wie beispielsweise Glutamat können ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese des Nervenzelltodes spielen (siehe Freese et al. (1990) Brain Res. 521:254-264). Es wird ebenfalls angenommen, dass der Nervenzelltod bei mehreren neurodegenerativen Erkrankungen ein signifikanter beitragender Faktor ist, einschließlich der Alzheimer Krankheit, Chorea Huntington und der Parkinson Krankheit, der amyotrophen Lateralsklerose und der Multiplen Sklerose. Die Ätiologie dieser Neuropathien kann metabolisch, als Folge einer hepatischen Enzephalopathie, infektiös, toxisch, autoimmun, ernährungsbedingt oder ischämisch sein. Zusätzlich wurde Ethanol und mehrere andere Toxine als signifikante beitragende Faktoren bei neurodegenerativen Erkrankungen identifiziert. Die hierin beschriebenen Morphogene können Zellen verabreicht werden, die einem Risiko eines Absterbens unterliegen, um deren Überleben zu verbessern und dadurch den Schutz der Unversehrtheit der Nervenbahnen zu verbessern. Die Morphogene können direkt an den Ort verabreicht werden oder können systemisch verabreicht werden. Alternativ kann, wie zu zwecken der Erläuterung oben beschrieben, ein Mittel, das zur Stimulierung der endogenen Morphogenexpression und/oder Seziernierung, vorzugsweise in Zellen, die mit dem interessierenden Nervengewebe in Verbindung stehen geeignet ist, dem Säugetier verabreicht werden.

[0023] Zu Zwecken der Erläuterung ist das offenbarte Verfahren zur Redifferenzierung transformierter Zellen, insbesondere transformierter Zellen neuronalen oder glialen Ursprungs von Nutzen, so dass die Morphogen-behandelten Zellen so induziert werden, dass sie eine Morphologie zeigen, die für nicht transformierte Zellen charakteristisch ist. Wenn die transformierten Zellen neuronalen Ursprungs sind, induziert die Morphogen-Behandlung vorzugsweise die Zellrundung und Zellaggregation (Verklumpung), Zell-Zelladhäsion, Neurit-Auswuchs-Bildung und Verlängerung und die N-CAM Produktion. Es wird angenommen, dass die hierin beschriebenen Verfahren die Nervenzelltumorbildung und/oder Proliferation in Nervengewebe beträchtlich hemmen oder reduzieren. Es wird angenommen, dass die Verfahren dieser Erfindung nützlich sind, um die Wirkungen verschiedener Karzinome von Nervengewebsursprung beträchtlich zu reduzieren, wie beispielsweise Retinoblastome, Neuroblastome und Gliome oder Glioblastome. Es wird zusätzlich angenommen, dass das Verfahren die Hemmung neoplastischer Läsionen, die durch metastatisches Gewebe verursacht sind, unterstützt.

Metastatische Tumore sind eine der häufigsten Neoplasien des ZNS, weil sie das intracraniale Kompartement durch den Blutstrom erreichen können. Metastatische Tumoren können Nervenbahnen beispielsweise durch Zerstören der normalen Nervengewebsstruktur, durch Zusammendrücken von Nerven, durch Blockierung der Strömung cerebrospinaler Flüssigkeit oder der Blutzufuhr, die das Gehirngewebe ernährt, und/oder durch Stimulieren der Immunreaktion des Körpers schädigen.

[0024] Zu Zwecken der Erläuterung sind die hierin beschriebenen Morphogene zur Bereitstellung neuroprotektiver Wirkungen von Nutzen, um die Schädigung einer Nervenbahn, die mit der Immun/Entzündungs-Reaktion des Körpers in Verbindung steht, gegenüber einer initialen Verletzung des Nervengewebes, zu lindern. Eine solche Reaktion kann einer Verletzung des Nervengewebes folgen, die beispielsweise durch eine Autoimmun-Dysfunktion, neoplastische Läsion, Infektion, chemische oder mechanische Verletzung, Krankheit oder durch Störung der Blutströmung von Nerven- oder Gliazellen verursacht ist, beispielsweise im Anschluß an eine Ischämie oder Hypoxie oder durch eine andere Verletzung des Nervs oder des diesen umgebenden Materials. Beispielsweise wird angenommen, dass die primäre Schädigung, die sich aus einer Hypoxie oder einer Ischämie-Reperfusion im Anschluß an einen Verschluß der Nervenblut-Zufuhr wie beispielsweise bei einem embolischen Schlaganfall ergibt, mit der Immunologie in Verbindung steht. Zusätzlich scheint zumindest ein Teil der Schädigung, die mit mehreren primären Gehirntumoren verbunden ist, ebenfalls mit der Immunologie in Verbindung zu stehen. Eine Aufbringung bzw. Verabreichung des Morphogens direkt an die zu behandelnden Zellen oder eine Bereitstellung des Morphogens systemisch an das Säugetier, beispielsweise intravenös oder indirekt durch orale Verabreichung kann zur Linderung und/oder Hemmung der immunologisch bezogenen Reaktion auf eine Nervenverletzung verwendet werden. Alternativ kann auch eine Verabreichung eines Mittels, das zur Stimulierung einer Morphogen-Expression und/oder Sekretion in vivo geeignet ist, vorzugsweise am Ort der Verletzung, verwendet werden. Wenn die Verletzung induziert werden soll, wie sie während eines chirurgischen Eingriffs oder einer anderen aggressiven klinischen Behandlung auftritt, kann das Morphogen oder Mittel vor der Induktion der Verletzung verabreicht werden, um eine neuroprotektive Wirkung für das Nervengewebe, das dem Risiko unterliegt, bereitzustellen.

[0025] Zu Zwecken der Erläuterung werden Verfahren zur Unterstützung des Wachstums und der Aufrechterhaltung differenzierter Neuronen offenbart, einschließlich dem Induzieren von Neuronen, so dass sie fortfahren, ihren Phänotyp zu exprimieren. Es wird angenommen, dass diese Aktivität insbesondere bei der Behandlung von Nervengewebsstörungen von Nutzen ist, bei denen ein Funktionsverlust durch eine reduzierte oder verloren gegangene metabolische Zellfunktion verursacht ist und die Zellen seneszent oder quieszent bzw. ruhend werden, und es wird beispielsweise angenommen, dass dies in alternden Zellen auftritt oder bei der Alzheimer Krankheit manifestiert wird. Die Aufbringung des Morphogens direkt auf die zu behandelnden Zellen oder die systemische Bereitstellung durch parenterale oder orale Verabreichung stimuliert diese Zellen, so dass sie fortfahren, ihren Phänotyp zu exprimieren, wodurch die Wirkungen der zellulären metabolischen Dysfunktion signifikant gehemmt und/oder umgekehrt werden, wodurch die Nervenbahn dem Risiko ausgesetzt bleibt. Alternativ kann eine Verabreichung eines Mittels, dass zum Stimulieren einer endogenen Morphogen-Expression und/oder Sekretion in vivo geeignet ist, verwendet werden.

[0026] Zu Zwecken der Erläuterung werden Verfahren zum Stimulieren der CAM-Expressionsniveaus in einer Zelle offenbart, insbesondere der N-CAM-Expression in Neuronen. CAMs sind Moleküle, die per Definition Zell-Zell-Wechselwirkungen durchführen, die zur Gewebsbildung notwendig sind. Es wird angenommen, dass CAMs eine fundamentale regulatorische Rolle in der Gewebsentwicklung spielen, einschließlich der Gewebsgrenzflächen-Bildung, der embryonalen Induktion und Migration und der Gewebsstabilisierung und Regeneration. Veränderte CAM-Konzentrationen wurden mit mehreren Gewebsstörungen in Verbindung gebracht, einschließlich congenitaler Effekte, Neoplasien und degenerativen Erkrankungen.

[0027] Die N-CAM-Expression ist insbesondere mit einer normalen neuronalen Zellentwicklung und -differenzierung, einschließlich einer retinalen Bildung, Synaptogenese und Nerven-Muskel-Gewebadhäsion verbunden. Eine Hemmung einer oder mehrerer der N-CAM-Isoformen verhindert bekannterweise die richtige Gewebsentwicklung. Veränderte N-CAM-Expressionsniveaus sind ebenfalls mit Neoplasien verbunden, einschließlich Neuroblastomen (siehe unten), ebenso wie mit mehreren Neuropathien, einschließlich eines Normaldruck-Hydrocephalus und Typ I Schizophrenie. Eine Aufbringung des Morphogens direkt auf die zu behandelnden Zellen oder eine Bereitstellung des Morphogens an das Säugetier systemisch, beispielsweise parenteral oder indirekt durch orale Verabreichung kann zum Induzieren der zellulären Expression einer oder mehrerer CAMs, insbesondere von N-CAM, verwendet werden. Alternativ kann die Verabreichung eines Mittels, das zur Stimulierung der Morphogen-Expression und/oder Sekretion in vivo geeignet ist, vorzugsweise an den Ort der Verletzung, ebenfalls verwendet werden, um die CAM-Produktion zu induzieren.

[0028] CAMs wurde ebenfalls als Teil eines Morpho-regulatorischen Weges postuliert, dessen Aktivität durch ein bis jetzt nicht identifiziertes Molekül induziert wird (siehe beispielsweise Edelmann, G. M. (1986) Ann. Rev. Cell Biol. 2: 81-116). Ohne an eine vorgegebene Theorie gebunden sein zu wollen, können die hierin beschriebenen Morphogene als Induktor dieses Weges fungieren.

[0029] Zu Zwecken der Erläuterung können schließlich Modulationen endogener Morphogen-Konzentrationen als Teil eines Verfahrens zum Nachweisen einer Nervengewebs-Dysfunktion überwacht werden. Insbesondere wird angenommen, dass Modulationen der endogenen Morphogen-Konzentrationen Veränderungen im Nervengewebsstatus widerspiegeln. Die Morphogen-Expression kann direkt in durch Biopsie gewonnenen Zellproben, in cerebrospinaler Flüssigkeit oder Serum überwacht werden. Alternativ können die Morphogen-Konzentrationen durch Nachweisen von Veränderungen der Konzentrationen an endogenen Antikörpern gegen das Morphogen bestimmt werden. Man kann beispielsweise Serumproben von einem Säugetier gewinnen und darauf die Konzentration des Morphogens oder des Antikörpers, der in der Flüssigkeit vorliegt, durch Standardprotein-Nachweismittel nachweisen, die dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt sind. Als Beispiel kann ein Bindungsprotein, das zu einer spezifischen Interaktion mit dem interessierenden Morphogen in der Lage ist, wie beispielsweise ein Anti-Morphogen-Antikörper, zum Nachweis eines Morphogens in einem Standard-Immunassay verwendet werden. Die Morphogen-Konzentrationen die nachgewiesen werden können dann mit einem vorher bestimmten Standard oder Referenz-Niveau verglichen werden, wobei Veränderungen in den nachgewiesenen Niveaus bzw. Konzentrationen auf den Status bzw. Zustand des Gewebes hinweisen.

[0030] Ein Morphogen oder ein Morphogen-stimulierendes Mittel kann dem Individuum systemisch verabreicht, beispielsweise oral oder parenteral. Ein Morphogen kann direkt an das Nervengewebe verabreicht werden, beispielsweise durch Injektion in die cerebrospinale Flüssigkeit oder an einen Nervengewebsort.

[0031] Die „Verabreichung des Morphogens" bezeichnet die Verabreichung des Morphogens entweder alleine oder in Kombination mit anderen Molekülen. Beispielsweise kann die reife Form des Morphogens in Verbindung mit Ihrer Vorläufer „Pro"-Domäne bereitgestellt werden, von der bekannt ist, dass sie die Löslichkeit des Proteins verbessert. Weitere nützliche Moleküle, von denen bekannt ist, dass sie die Proteinlöslichkeit verbessern, schließen Kasein und andere Milchbestandteile ein, ebenso wie verschiedene Serumproteine. Zusätzliche nützliche Moleküle, die mit dem Morphogen oder Morphogen-stimulierenden Mittel verbunden sein können, schließen Gewebstargeting-Moleküle ein, die zur Ausrichtung bzw. Führung des Morphogenstimulierenden Mittels zum Nervengewebe in der Lage sind. Gewebstargeting-Moleküle, von denen angenommen wird, dass sie in den Behandlungsvorschriften dieser Erfindung von Nutzen sind, schließen Antikörper, Antikörperfragmente oder andere Bindungsproteine ein, die spezifisch mit Oberflächenmolekülen auf Nervengewebszellen interagieren.

[0032] Ein noch weiteres nützliches Gewebstargeting-Molekül ist ein Teil oder die gesamte Morphogen-Vorläufer „Pro"-Domäne, insbesondere diejenige von OP-1 oder GDF-1. Diese Proteine sind natürlich mit dem Nervengewebe assoziiert, können jedoch ebenfalls in anderen Geweben synthetisiert und auf Nervengewebe nach Sekretion aus dem synthetisierenden Gewebe gerichtet werden. Beispielsweise erscheint die primäre Quelle der OP-1 Synthese das Gewebe des Urogenitalssystems (beispielsweise Nieren- und Blasengewebe) zu sein, während gezeigt wurde, dass das Protein in Knochengewebe aktiv ist, wobei sekundäre Expressionsniveaus im Gehirn, Herz und Lunge auftreten (siehe unten). Überdies wurde das Protein in Serum, Speichel und verschiedenen Milchformen identifiziert. Zusätzlich umfasst die sezernierte Form des Proteins das reife Dimer in Verbindung mit der Pro-Domäne der intakten Morphogen-Sequenz. Demgemäß können die assoziierten Morphogen-Pro-Domänen dazu dienen, Morphogene spezifisch in vivo an unterschiedliche Gewebe zu liefern.

[0033] Ein assoziiertes Gewebstargeting oder Löslichkeits-verbessernde Moleküle können ebenfalls kovalent unter Verwendung von chemischen Standards an das Morphogen gebunden werden, einschließlich säure-labiler Bindungen, die vorzugsweise in einer sauren Umgebung der Knochenumformungs-Stellen gespalten werden.

[0034] Schließlich können Morphogene in Kombination mit anderen Molekülen verabreicht werden, von denen bekannt ist, dass sie bei der Erhaltung von Nervenbahnen von Vorteil sind, einschließlich, beispielsweise Nervenwachstumsfaktoren und antiinflammatorische Mittel.

[0035] Wenn das Morphogen zur Verwendung als Therapeutikum für Störungen des ZNS vorgesehen ist, muss sich eines zusätzlichen Problems angenommen werden: die Überwindung der so genannten „Blut-Hirnschranke", der Gehirnkapillarwandstruktur, die effektiv alles bis auf ausgewählte Kategorien von Molekülen

aussiebt, die im Gehirn vorliegen, und deren Durchgang in das Gehirn verhindert. Die Blut-Hirnschranke kann effektiv durch direkte Infusion des Morphogens in das Gehirn umgangen werden. Alternativ kann das Morphogen modifiziert werden, so dass dessen Transport über die Blut-Hirnschranke hinweg verbessert wird. Beispielsweise können frankierte Formen des Morphogens am erfolgreichsten sein. Alternativ kann das Morphogen so modifiziert werden, dass es lipophiler wird oder es kann an ein anderes Molekül gebunden werden, das natürlicherweise durch die Barriere hindurch transportiert wird, unter Verwendung von dem Fachmann auf dem Gebiet bekannten Mitteln, die beispielsweise in Pardridge, Endocrine Reviews 7: 314-330 (1986) und im US-Patent Nr. 4 801 575 beschrieben sind.

[0036] Demgemäß betrifft, wie hierin verwendet, ein funktionelles „Analogon" eines Morphogens ein Protein mit einer morphogenetischen biologischen Aktivität, das jedoch zusätzliche strukturelle Unterschiede im Vergleich zu einem wie hierin definierten Morphogen besitzt, beispielsweise indem es zusätzliche chemische Komponenten aufweist, die normalerweise nicht Teil eines Morphogens sind. Solche Komponenten (eingeführt beispielsweise durch Acylierungs-, Alkylierungs-, Kationisierungs- oder Glykosylierungs-Reaktionen oder durch andere Mittel zur Bindung der Komponente an das Morphogen) können die Löslichkeit des Moleküls, dessen Absorption, biologische Halbwertszeit oder Transport beispielsweise durch die Blut-Hirnschranke hindurch verbessern.

[0037] Zu den in dieser Erfindung nützlichen Morphogenen zählen Proteine, die ursprünglich als osteogenetische Proteine identifiziert wurden, wie beispielsweise die OP-1, OP-2 und CBMP2 Proteine, ebenso wie in ihrer Aminosäuresequenz verwandte Proteine wie beispielsweise DPP (von Drosophila), Vgl (von Xenopus), von Vgr-1 (von der Maus, siehe US 5 011691 auf den Namen Oppermann et al.), GDF-1 (von der Maus, siehe Lee (1991) PNAS 88: 4250-4254), die alle in Tabelle II und in den Sequenz ID NO: 5-14 dargelegt sind), und das kürzlich identifizierte 60A Protein (von Drosophila, Sequenz ID NO: 24, siehe Wharton et al. (1991) PNAS 88: 9214-9218). Die Mitglieder dieser Familie, die Mitglieder der TGF-β Superfamilie von Proteinen einschließen, teilen eine beträchtliche Aminosäuresequenz-Homologie in ihren C-terminalen Regionen. Die Proteine werden als Vorläufer translatiert, die eine N-terminale Signalpeptidsequenz aufweisen, die typischerweise weniger als ungefähr 30 Reste beträgt, gefolgt von einer „Pro"-Domäne, die zur Gewinnung der reifen Sequenz abgespalten wird. Das Signalpeptid wird rasch nach Translation abgespalten, an einer Spaltstelle, die in einer vorgegebenen Sequenz unter Verwendung des Verfahrens von Von Heijne ((1986) Nucleic Acids Research 14: 4683-4691) vorhergesagt werden kann. Tabelle I nachstehend beschreibt die verschiedenen Morphogene, die bis jetzt identifiziert wurden, einschließlich ihrer wie hierin verwendeten Nomenklatur, ihrer Sequenz-ID-Referenzen und Veröffentlichungsquellen für die Aminosäuresequenzen für die Proteine in voller Länge, die nicht im Sequenzprotokoll eingeschlossen sind.

Tabelle I

„OP-1“	Betrifft im allgemeinen die Gruppe morphogenetisch aktiver Proteine, die aus einem Teil oder der gesamten DNA-Sequenz exprimiert werden, die das OP-1 Protein kodieren, einschließlich von Allel- und –Speziesvarianten hiervon, beispielsweise humanes OP-1 („hOP-1“, Sequenz ID NO: 5, reife Proteinaminosäuresequenz) oder Maus OP-1 („mOP-1“, Sequenz ID NO: 6, reife Proteineaminosäuresequenz). Das konservierte Sieben-Cystein-Skelett wird durch die Reste 38-139 von Sequenz-ID NO: 5 und 6 definiert. Die cDNA-Sequenzen und die Aminosäuren, die die Proteine in voller Länge kodieren, sind in den Sequenz ID NO: 16 und 17 bereitgestellt (hOP-1) und in den Sequenz ID NO: 18 und 19 (mOP-1). Die reifen Proteine sind durch die Reste 293-431 (hOP-1) und 292-430 (mOP-1) definiert. Die „Pro“-Regionen der Proteine, abgespalten, um die reifen, morphogenetisch aktiven Proteine zu ergeben, sind im wesentlichen durch die Reste 30-292 (hOP-1) und durch die Reste 30-291 (mOP-1) definiert.
„OP-2“	Betrifft im allgemeinen die Gruppe aktiver Proteine, die aus einem Teil oder der gesamten DNA-Sequenz exprimiert werden, die das OP-2 Protein kodiert, einschließlich Allel- und Speziesvarianten hiervon, beispielsweise humanes OP-2 („hOP-2“, Sequenz ID NO: 7, reife Proteinaminosäuresequenz) oder Maus OP-2 („mOP-2“, Sequenz ID NO: 8, reife Proteinaminosäuresequenz). Das konservierte Sieben-Cystein-Skelett wird durch die Reste 38-139 von Sequenz ID NO: 7 und 8 definiert. Die cDNA-Sequenzen und die Aminosäuren, die die Proteine in voller Länge kodieren, sind durch die Sequenz ID NO: 20 und 21 (hOP-2) und durch Sequenz ID NO: 22 und 23 (mOP-2) bereitgestellt. Die reifen Proteine sind im wesentlichen durch die Reste 264-402 (hOP-2) und 261-399 (mOP-2) definiert. Die „Pro“-Regionen der Proteine, abgespalten, um die reifen, morphogenetisch aktiven Proteine zu ergeben, sind wahrscheinlich im wesentlichen durch die Reste 18-263 (hOP-2) und durch die Reste 18-260 (mOP-2) definiert (eine weitere Spaltstelle tritt ebenfalls 21 Reste stromaufwärts für beide OP-2 Proteine auf).

„CBMP2“	Betrifft im allgemeinen die morphogentisch aktiven Proteine, die aus einer DNA-Sequenz exprimiert werden, die die CBMP2-Proteine kodiert, einschließlich Allel- und Speziesvarianten hiervon, beispielsweise humanes CBMP2A („CBMP2A(fx)“, Sequenz ID NO: 9) oder humane CBMP2B DNA („CBMP2B(fx)“, Sequenz ID NO: 10). Die Aminosäuresequenz für die Proteine in voller Länge, die in der Literatur als BMP2A und BMP2B oder BMP2 und BMP4 bezeichnet werden, erscheinen bei Wozney et al. (1988) Science 242: 1528-1534. Die „Pro“-Domäne für BMP2 (BMP2A) schließt wahrscheinlich die Reste 25-248 oder 25-282 ein; das reife Protein die Reste 249-396 oder 283-396. Die „Pro“-Domäne für BMP4 (BMP2B) schließt wahrscheinlich die Reste 25-256 oder 25-292 ein; das reife Protein die Reste 257-408 oder 293 bis 408.
„DPP(fx)“	Betrifft Proteinsequenzen, die durch das Drosophila DPP Gen kodiert werden und die das konservierte Sieben-Cystein-Skelett definieren (Sequenz ID NO: 11). Die Aminosäuresequenz für das Protein in voller Länge erscheint in Padgett et al. (1987) Nature 325: 81-84. Die „Pro“-Domäne erstreckt sich wahrscheinlich von der Signalpeptidspaltstelle bis zu Rest 456; das reife Protein ist wahrscheinlich durch die Reste 457-588 definiert.
„Vgl(fx)“	Betrifft Proteinsequenzen, die durch das Xenopus Vgl Gen kodiert werden und die das konservierte Sieben-Cystein-Skelett (Sequenz ID NO: 12) definieren. Die Aminosäuresequenz für das Protein in voller Länge erscheint bei Weeks (1987) Cell 51: 861-867. Die „Pro“-Domäne erstreckt sich wahrscheinlich von der Signalpeptidspaltstelle bis zu Rest 246; das reife Protein ist wahrscheinlich durch die Reste 247-360 definiert.
„Vgr-1(fx)“	Betrifft Proteinsequenzen, die durch das murine Vgr-1 Gen kodiert sind und die das konservierte Sieben-Cystein-Skelett (Sequenz ID NO: 13) definieren. Die Aminosäuresequenz für das Protein in voller Länge erscheint bei Lyons et al. (1989) PNAS 86: 4554-4558. Die „Pro“-Domäne erstreckt sich wahrscheinlich von der Signalpeptidspaltstelle bis zu Rest 299; das reife Protein ist wahrscheinlich durch die Reste 300-438 definiert.
„GDF-1(fx)“	Betrifft Proteinsequenzen, die durch das humane GDF-1 Gen kodiert sind und die das konservierte Sieben-Cystein-Skelett (Sequenz ID NO: 14) definieren. Die cDNA und die kodierte Aminosäuresequenz für das Protein in voller Länge wird in Sequenz ID NO: 32 bereitgestellt. Die „Pro“-Domäne erstreckt sich wahrscheinlich von der Signalpeptidspaltstelle bis zu Rest 214; das reife Protein ist wahrscheinlich durch die Reste 215-372 definiert.

„60A“	Betrifft generisch morphogenetisch aktive Proteine, die aus einem Teil oder der gesamten DNA-Sequenz (aus dem Drosophila 60A Gen) exprimiert werden, das die 60A Proteine kodiert (siehe Sequenz ID NO: 24, wobei die cDNA und die kodierte Aminosäuresequenz für das Protein in voller Länge bereitgestellt wird. „60A(fx)“ betrifft die Proteinsequenzen, die das konservierte Sieben-Cystein-Skelett definieren (Reste 354-455 von Sequenz ID NO: 24). Die „Pro“-Domäne erstreckt sich wahrscheinlich von der Signalpeptidspaltstelle bis zu Rest 324; das reife Protein ist wahrscheinlich durch die Reste 325-455 definiert.
„BMP3(fx)“	Betrifft Proteinsequenzen, die durch das humane BMP3 Gen kodiert sind und die das konservierte Sieben-Cystein-Skelett (Sequenz ID NO: 26) kodieren. Die Aminosäuresequenz für das Protein in voller Länge erscheint bei Wozney et al. (1988) Science 242: 1528-1534. Die „Pro“-Domäne erstreckt sich wahrscheinlich von der Signalpeptidspaltstelle bis zu Rest 290; das reife Protein ist wahrscheinlich durch die Reste 291-472 definiert.
„BMP5(fx)“	Betrifft Proteinsequenzen, die durch das humane BMP5 Gen kodiert sind und die das konservierte Sieben-Cystein-Skelett (Sequenz ID NO: 27) definieren. Die Aminosäuresequenz des Proteins in voller Länge erscheint bei Celeste et al. (1991) PNAS 87: 9843-9847. Die „Pro“-Domäne erstreckt sich wahrscheinlich von der Signalpeptidspaltstelle bis zu Rest 316; das reife Protein ist wahrscheinlich durch die Reste 317-454 definiert.
„BMP6(fx)“	Betrifft Proteinsequenzen, die durch das humane BMP6 Gen kodiert sind und die das konservierte Sieben-Cystein-Skelett (Sequenz ID NO: 28) definieren. Die Aminosäuresequenz des Proteins in voller Länge erscheint bei Celeste et al. (1990) PNAS 87: 9843-5847. Die „Pro“-Domäne erstreckt sich wahrscheinlich von der Signalpeptidspaltstelle bis zu Rest 374; die reife Sequenz schließt wahrscheinlich die Reste 375-513 ein.

[0038] Die OP-2 Proteine weisen einen zusätzlichen Proteinrest in diesem Bereich auf (beispielsweise siehe Rest 41 von Sequenz ID NO: 7 und 8) zusätzlich zum konservierten Cystein-Skelett, das es mit den anderen Proteinen in dieser Familie gemeinsam hat. Das GDF-1 Protein weist eine Vier-Aminosäure-Insertion innerhalb des konservierten Skeletts auf (Reste 44-47 von Sequenz ID NO: 14), jedoch stört dieses Insert das Verhältnis der Cysteine in der gefalteten Struktur wahrscheinlich nicht. Zusätzlich fehlt den CBMP2 Proteinen ein Aminosäurerest innerhalb des Cystein-Skeletts.

[0039] Die Morphogene sind inaktiv, wenn sie reduziert sind, sind jedoch als oxidierte Homodimere aktiv und wenn sie in Kombination mit anderen Morphogenen dieser Erfindung oxidiert werden. Somit ist ein Morphogen, wie hierin definiert, ein dimeres Protein, das zwei Polypeptidketten umfasst, wobei jede Polypeptidkette zumindest das durch die Reste 43-139 von Sequenz ID NO: 5 definierte C-terminale Sechs-Cystein-Skelett umfasst, einschließlich funktionell äquivalenter Anordnungen dieser Cysteine (beispielsweise Aminosäureinsertionen oder -Deletionen, die die lineare Anordnung der Cysteine in der Sequenz verändern, jedoch nicht deren Verhältnis in der gefalteten Struktur), so dass, wenn die Polypeptidketten gefaltet werden, die dimere Proteinspezies, die zwei Polypeptidketten umfasst, die geeignete dreidimensionale Struktur aufweisen, einschließlich der geeigneten Infra- oder Intrakettendisulfidbrücken, so dass das Protein dazu in der Lage ist, als ein wie hierin definiertes Morphogen zu dienen. Insbesondere sind die Morphogene im allgemeinen dazu in der Lage, all die folgenden biologischen Funktionen in einer morphogenetisch permissiven Umgebung durchzuführen: Stimu-

lierung der Proliferation von Vorläuferzellen; Stimulierung der Differenziation von Vorläuferzellen; Stimulierung der Proliferation differenzierter Zellen; und Unterstützung des Wachstums und der Aufrechterhaltung differenzierter Zellen. Es wird zusätzlich angenommen, dass diese Morphogene dazu in der Lage sind, eine Redifferenzierung festgelegter Zellen unter geeigneten Umgebungsbedingungen zu induzieren.

[0040] Zu Zwecken der Erläuterung umfasst die generische Sequenz 1 das konservierte Sechs-Cystein-Skelett und die generische Sequenz 2 umfasst das konservierte Sechs-Cystein-Skelett plus dem zusätzlich in OP-2 identifizierten Cystein (siehe Rest 36, Sequenz ID NO: 2). Diese Sequenzen können weiterhin die folgende zusätzliche Sequenz an ihrem N-Terminus umfassen:

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa (Seq. ID No. 15)
1 5

[0041] Zu Zwecken der Erläuterung schließen Aminosäuresequenzen innerhalb der vorhergehenden generischen Sequenzen folgendes ein: generische Sequenz 3 (Sequenz ID NO: 3), generische Sequenz 4 (Sequenz ID NO: 4) und generische Sequenz 5 (Sequenz ID NO: 30). Die generische Sequenz 6 (Sequenz ID NO: 31) kann gemäß der Erfindung verwendet werden. Diese generischen Sequenzen nehmen die Homologien auf, die zwischen den verschiedenen bevorzugten Mitgliedern dieser Morphogen-Familie geteilt werden, identifiziert in Tabelle II, ebenso wie die Aminosäuresequenz-Variation zwischen diesen. Insbesondere sind die generischen Sequenzen 3 und 4 zusammengesetzte Aminosäuresequenzen der folgenden Proteine, die in Tabelle II dargestellt sind und die in den Sequenz ID NO: 5-14 identifiziert sind: humanes OP-1 (hOP-1, Sequenz ID NO: 5 und 16-17), Maus OP-1 (mOP-1, Sequenz ID NO: 6 und 18-19), humanes oder Maus OP-2 (Sequenz ID NO: 7, 8 und 20-22), CBMP2A (Sequenz ID NO: 9), CBMP2B (Sequenz ID NO: 10), DPP (von Drosophila, Sequenz ID NO: 11), Vgl (von Xenopus, Sequenz ID NO: 12), Vgr-1 (von der Maus, Sequenz ID NO: 13) und GDF-1 (von der Maus, Sequenz ID NO: 14). Die generischen Sequenzen schließen sowohl die Aminosäureidentität, die von den Sequenzen in Tabelle Π geteilt wird, ebenso wie alternative Reste für die variablen Positionen innerhalb der Sequenz ein. Es sei erwähnt, dass diese generischen Sequenzen ein zusätzliches Cystein in Position 41 oder 46 in den generischen Sequenzen 3 bzw. 4 ermöglichen, wodurch ein geeignetes Cystein-Skelett bereitgestellt wird, in dem sich inter- oder intramolekulare Disulfidbrücken bilden können und enthalten bestimmte entscheidende bzw. kritische Aminosäuren, die die Tertiärstruktur der Proteine beeinflussen.

Generische Sequenz 3

Leu Tyr Val Xaa Phe
1 5

Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa
10

Xaa Ala Pro Xaa Gly Xaa Xaa Ala
15 20

Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa
25 30
Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35
Xaa Xaa Xaa Asn His Ala Xaa Xaa
40 45
Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
50
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
55 60
Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
65
Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
70 75
Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa
80
Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa
85 90
Xaa Cys Gly Cys Xaa
95

wobei jedes Xaa unabhängig aus einer Gruppe einer oder mehrerer spezifizierter Aminosäuren ausgewählt ist, die wie folgt definiert sind: „Res." bedeutet „Rest" und Xaa bei Res. 4 = (Ser, Asp oder Glu); Xaa bei Res.6 = (Arg, Gln, Ser oder Lys); Xaa bei Res.7 = (Asp oder Glu); Xaa bei Res.8 = (Leu oder Val); Xaa bei Res.11 = (Gln, Leu, Asp, His oder Asn); Xaa bei Res.12 = (Asp, Arg oder Asn); Xaa bei Res.14 = (Ile oder Val); Xaa bei Res.15 = (Ile oder Val); Xaa bei Res.18 = (Glu, Gln, Leu, Lys, Pro oder Arg); Xaa bei Res.20 = (Tyr oder Phe); Xaa bei Res.21 = (Ala, Ser, Asp, Met, His, Leu oder Gln); Xaa bei Res.23 = (Tyr, Asn oder Phe); Xaa bei Res.26 = (Glu, His, Tyr, Asp oder Gln); Xaa bei Res.28 = (Glu, Lys, Asp oder Gln); Xaa bei Res.30 = (Ala, Ser, Pro oder Gln); Xaa bei Res.31 = (Phe, Leu oder Tyr); Xaa bei Res.33 = (Leu oder Val); Xaa bei Res.34 = (Asn, Asp, Ala oder Thr); Xaa bei Res.35 = (Ser, Asp, Glu, Leu oder Ala); Xaa bei Res.36 = (Tyr, Cys, His, Ser oder Ile); Xaa bei Res.37 = (Met, Phe, Gly oder Leu); Xaa bei Res.38 = (Asn oder Ser); Xaa bei Res.39 = (Ala, Ser oder Gly); Xaa bei Res.40 = (Thr, Leu oder Ser); Xaa bei Res.44 = (Ile oder Val); Xaa bei Res.45 = (Val oder Leu); Xaa bei Res.46 = (Gln oder Arg); Xaa bei Res.47 = (Thr, Ala oder Ser); Xaa bei Res.49 = (Val oder Met); Xaa bei Res.50 = (His oder Asn); Xaa bei Res.51 = (Phe, Leu, Asn, Ser, Ala oder Val); Xaa bei Res.52 = (Ile, Met, Asn, Ala oder Val); Xaa bei Res.53 = (Asn, Lys, Ala oder Glu); Xaa bei Res.54 = (Pro oder Ser); Xaa bei Res.55 = (Glu, Asp, Asn, oder Gly); Xaa bei Res.56 = (Thr, Ala, Val, Lys, Asp, Tyr, Ser oder Ala); Xaa bei Res.57 = (Val, Ala oder Ile); Xaa bei Res.58 = (Pro oder Asp); Xaa bei Res.59 = (Lys oder Leu); Xaa bei Res.60 = (Pro oder Ala); Xaa bei Res.63 = (Ala oder Val); Xaa bei Res.65 = (Thr oder Ala); Xaa bei Res.66 = (Gln, Lys, Arg oder Glu); Xaa bei Res.67 = (Leu, Met oder Val); Xaa bei Res.68 = (Asn, Ser oder Asp); Xaa bei Res.69 = (Ala, Pro oder Ser); Xaa bei Res.70 = (Ile, Thr oder Val); Xaa bei Res.71 = (Ser oder Ala); Xaa bei Res.72 = (Val oder Met); Xaa bei Res.74 = (Tyr oder Phe); Xaa bei Res.75 = (Phe, Tyr oder Leu); Xaa bei Res.76 = (Asp oder Asn); Xaa bei Res.77 = (Asp, Glu, Asn oder Ser); Xaa bei Res.78 = (Ser, Gln, Asn oder Tyr); Xaa bei Res.79 = (Ser, Asn, Asp oder Glu); Xaa bei Res.80 = (Asn, Thr oder Lys); Xaa bei Res.82 = (Ile oder Val); Xaa bei Res.84 = (Lys oder Arg); Xaa bei Res.85 = (Lys, Asn, Gln oder His); Xaa bei Res.86 = (Tyr oder His); Xaa bei Res.87 = (Arg, Gln oder Glu); Xaa bei Res.88 = (Asn, Glu oder Asp); Xaa bei Res.90 = (Val, Thr oder Ala); Xaa bei Res.92 = (Arg, Lys, Val, Asp oder Glu); Xaa bei Res.93 = (Ala, Gly oder Glu); und Xaa bei Res.97 = (His oder Arg);

Generische Sequenz 4

```
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Tyr Val Xaa Ph
 1               5                   1
Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa
                15
Xaa Ala Pro Xaa Gly Xaa Xaa Ala
 20                  25
Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa
         30                  35
Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
                40
Xaa Xaa Xaa Asn His Ala Xaa Xaa
         45                  50
Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
                55
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
     60                  65
Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
            70
Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
 75                  80
Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa
            85
Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa
 90                  95
Xaa Cys Gly Cys Xaa
        100
```

wobei jedes Xaa unabhängig aus einer Gruppe einer oder mehrerer spezifizierter Aminosäuren ausgewählt ist, die durch das folgende definiert sind: „Res." bedeutet „Rest" und Xaa bei Res. 2 = (Lys oder Arg); Xaa bei Res.3 = (Lys oder Arg); Xaa bei Res.4 = (His oder Arg); Xaa bei Res.5 = (Glu, Ser, His, Gly, Arg oder Pro); Xaa bei Res.9 = (Ser, Asp oder Glu); Xaa bei Res.11 = (Arg, Gln, Ser oder Lys); Xaa bei Res.12 = (Asp oder Glu); Xaa bei Res.13 = (Leu oder Val); Xaa bei Res.16 = (Gln, Leu, Asp, His oder Asn); Xaa bei Res.17 = (Asp, Arg, oder Asn); Xaa bei Res.19 = (Ile oder Val); Xaa bei Res.20 = (Ile oder Val); Xaa bei Res.23 = (Glu, Gln, Leu, Lys, Pro oder Arg); Xaa bei Res.25 = (Tyr oder Phe); Xaa bei Res.26 = (Ala, Ser, Asp, Met, His, Leu, oder Gln); Xaa bei Res.28 = (Tyr, Asn oder Phe); Xaa bei Res.31 = (Glu, His, Tyr, Asp oder Gln); Xaa bei Res.33 = Glu, Lys, Asp oder Gln); Xaa bei Res.35 = (Ala, Ser oder Pro); Xaa bei Res.36 = (Phe, Leu oder Tyr); Xaa bei Res.38 = (Leu oder Val); Xaa bei Res.39 = (Asn, Asp, Ala oder Thr); Xaa bei Res.40 = (Ser, Asp, Glu, Leu oder Ala); Xaa bei Res.41 = (Tyr, Cys, His, Ser oder Ile); Xaa bei Res.42 = (Met, Phe, Gly oder Leu); Xaa bei Res.44 = (Ala, Ser oder Gly); Xaa bei Res.45 = (Thr, Leu oder Ser); Xaa bei Res.49 = (Ile oder Val); Xaa bei Res.50 = (Val oder Leu); Xaa bei Res.51 = (Gln oder Arg); Xaa bei Res.52 = (Thr, Ala oder Ser); Xaa bei Res.54 = (Val oder Met); Xaa bei Res.55 = (His oder Asn); Xaa bei Res.56 = (Phe, Leu, Asn, Ser, Ala oder Val); Xaa bei Res.57 = (Ile, Met, Asn, Ala oder Val); Xaa bei Res.58 = (Asn, Lys, Ala oder Glu); Xaa bei Res.59 = (Pro oder Ser); Xaa bei Res.60 = (Glu, Asp, oder Gly); Xaa bei Res.61 = (Thr, Ala, Val, Lys, Asp, Tyr, Ser oder Ala); Xaa bei Res.62 = (Val, Ala oder Ile); Xaa bei Res.63 = (Pro oder Asp); Xaa bei Res.64 = (Lys oder Leu); Xaa bei Res.65 = (Pro oder Ala); Xaa bei Res.68 = (Ala oder Val); Xaa bei Res.70 = (Thr oder Ala); Xaa bei Res.71 = (Gln, Lys, Arg oder Glu); Xaa bei Res.72 = (Leu, Met oder Val); Xaa bei Res.73 = (Asn, Ser oder Asp); Xaa bei

Res.74 = (Ala, Pro oder Ser); Xaa bei Res.75 = (Ile, Thr oder Val); Xaa bei Res.76 = (Ser oder Ala); Xaa bei Res.77 = (Val oder Met); Xaa bei Res.79 = (Tyr oder Phe); Xaa bei Res.80 = (Phe, Tyr oder Leu); Xaa bei Res.81 = (Asp oder Asn); Xaa bei Res.82 = (Asp, Glu, Asn oder Ser); Xaa bei Res.83 = (Ser, Gln, Asn oder Tyr); Xaa bei Res.84 = (Ser, Asn, Asp oder Glu); Xaa bei Res.85 = (Asn, Thr oder Lys); Xaa bei Res.87 = (Ile oder Val); Xaa bei Res.89 = (Lys oder Arg); Xaa bei Res.90 = (Lys, Asn, Gln oder His); Xaa bei Res.91 = (Tyr oder His); Xaa bei Res.92 = (Arg, Gln oder Glu); Xaa bei Res.93 = (Asn, Glu oder Asp); Xaa bei Res.95 = (Val, Thr oder Ala); Xaa bei Res.97 = (Arg, Lys, Val, Asp oder Glu); Xaa bei Res.98 = (Ala, Gly oder Glu); und Xaa bei Res.102 = (His oder Arg).

[0042] In ähnlicher Weise nehmen die generische Sequenz 5 (Sequenz ID NO: 30) und die generische Sequenz 6 (Sequenz ID NO: 31) die Homologien auf die zwischen all den in Tabelle Π identifizierten Mitgliedern der Morphogen-Proteinfamilie geteilt werden. Insbesondere sind die generischen Sequenzen 5 und 6 zusammengesetzte Aminosäuresequenzen von humanem OP-1 (hOP-1, Sequenz ID NO: 5 und 16-17), Maus OP-1 (mOP-1, Sequenz ID NO: 6 und 18-19), humanem und Maus OP-2 (Sequenz ID NO: 7, 8, 20-22), CBMP2A (Sequenz ID NO: 9), CBMP2B (Sequenz ID NO: 10), DPP (von Drosophila, Sequenz ID NO: 11), Vgl (von Xenopus, Sequenz ID NO: 12), Vgr-1 (von der Maus, Sequenz ID NO: 13) und GDF-1 (von der Maus, Sequenz ID NO: 14), humanem BMP3 (Sequenz ID NO: 26), humanem BMP5 (Sequenz II) NO: 27), humanem BMP6 (Sequenz ID NO: 28) und 60(A) (von Drosophila, Sequenz ID NO: 24-25). Die generischen Sequenzen schließen sowohl die von diesen Sequenzen in der C-terminalen Domäne geteilte Aminosäuresequenz-Identität, definiert durch die Sechs- und Sieben-Cystein-Skelette (generische Sequenzen 5 bzw. 6), ebenso wie alternative Reste für die variablen Positionen innerhalb der Sequenz ein. Wie bei den generischen Sequenzen 3 und 4 ermöglichen die generischen Sequenzen 5 und 6 ein zusätzliches Cystein in Position 41 (generische Sequenz 5) oder in Position 46 (generische Sequenz 6), wodurch ein geeignetes Cystein-Skelett bereitgestellt wird, in dem sich inter- und intramolekulare Disulfidbrücken bilden können und die bestimmte entscheidende Aminosäuren enthalten, die die Tertiärstruktur der Proteine beeinflussen.

Generische Sequenz 5

```
     Leu Xaa Xaa Xaa Phe
     1               5

Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa
                10

Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Ala
 15                 20

Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa
        25                  30

Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
                35

Xaa Xaa Xaa Asn His Ala Xaa Xaa
        40                  45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
                50

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
     55                 60

Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
            65


 Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
  70                 75

 Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa
              80

 Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa
  85                 90

 Xaa Cys Xaa Cys Xaa
          95
```

wobei jedes Xaa unabhängig aus einer Gruppe einer oder mehrerer spezifizierter Aminosäuren ausgewählt ist, die wie folgt definiert sind: „Res." bedeutet „Rest" und Xaa bei Res. 2 = (Tyr oder Lys); Xaa bei Res.3 = (Val oder Ile); Xaa bei Res.4 = (Ser, Asp oder Glu); Xaa bei Res.6 = (Arg, Gln, Ser, Lys oder Ala); Xaa bei Res.7 = (Asp, Glu oder Lys); Xaa bei Res.8 = (Leu, Val oder Ile); Xaa bei Res.11 = (Gln, Leu, Asp, His, Asn oder Ser); Xaa bei Res.12 = (Asp, Arg, Asn oder Glu); Xaa bei Res.14 = (Ile oder Val); Xaa bei Res.15 = (Ile oder Val);

Xaa bei Res.16 = (Ala oder Ser); Xaa bei Res.18 = (Glu Gln, Leu, Lys, Pro oder Arg); Xaa bei Res.19 = (Gly oder Ser); Xaa bei Res.20 = (Tyr oder Phe); Xaa bei Res.21 = (Ala, Ser, Asp, Met, His, Gln, Leu oder Gly); Xaa bei Res.23 = (Tyr, Asn oder Phe); Xaa bei Res.26 = (Glu, His, Tyr, Asp, Gln oder Ser); Xaa bei Res.28 = (Glu, Lys, Asp, Gln oder Ala); Xaa bei Res.30 = (Ala, Ser, Pro, Gln oder Asn); Xaa bei Res.31 = (Phe, Leu oder Tyr); Xaa bei Res.33 = (Leu Val oder Met); Xaa bei Res.34 = (Asn, Asp, Ala, Thr oder Pro); Xaa bei Res.35 = (Ser, Asp, Glu, Leu, Ala oder Lys); Xaa bei Res.36 = (Tyr, Cys, His, Ser oder Ile); Xaa bei Res.37 = (Met, Phe, Gly oder Leu); Xaa bei Res.38 = (Asn, Ser oder Lys); Xaa bei Res.39 = (Ala, Ser, Gly oder Pro); Xaa bei Res.40 = (Thr, Leu oder Ser); Xaa bei Res.44 = (Ile, Val oder Thr); Xaa bei Res.45 = (Val, Leu oder Ile); Xaa bei Res.46 = (Gln oder Arg); Xaa bei Res.47 = (Thr, Ala oder Ser); Xaa bei Res.48 = (Leu oder Ile); Xaa bei Res.49 = (Val oder Met); Xaa bei Res.50 = (His, Asn oder Arg); Xaa bei Res.51 = (Phe, Leu, Asn, Ser, Ala oder Val); Xaa bei Res.52 = (Ile, Met, Asn, Ala, Val oder Leu); Xaa bei Res.53 = (Asn, Lys, Ala, Glu, Gly oder Phe); Xaa bei Res.54 = (Pro, Ser oder Val); Xaa bei Res.55 = (Glu, Asp, Asn, Gly, Val oder Lys); Xaa bei Res.56 = (Thr, Ala, Val, Lys, Asp, Tyr, Ser, Ala, Pro oder His); Xaa bei Res.57 = (Val, Ala oder Ile); Xaa bei Res.58 = (Pro oder Asp); Xaa bei Res.59 = (Lys, Leu oder Glu); Xaa bei Res.60 = (Pro oder Ala); Xaa bei Res.63 = (Ala oder Val); Xaa bei Res.65 = (Thr, Ala oder Glu); Xaa bei Res.66 = (Gln, Lys, Arg oder Glu); Xaa bei Res.67 = (Leu, Met oder Val); Xaa bei Res.68 = (Asn, Ser, Asp oder Gly); Xaa bei Res.69 = (Ala, Pro oder Ser); Xaa bei Res.70 = (Ile, Thr, Val oder Leu); Xaa bei Res.71 = (Ser, Ala oder Pro); Xaa bei Res.72 = (Val, Met oder Ile); Xaa bei Res.74 = (Tyr oder Phe); Xaa bei Res.75 = (Phe, Tyr, Leu oder His); Xaa bei Res.76 = (Asp, Asn oder Leu); Xaa bei Res.77 = (Asp, Glu Asn oder Ser); Xaa bei Res.78 = (Ser, Gln, Asn, Tyr oder Asp); Xaa bei Res.79 = (Ser, Asn, Asp, Glu oder Lys); Xaa bei Res.80 = (Asn, Thr oder Lys); Xaa bei Res.82 = (Ile, Val oder Asn); Xaa bei Res.84 = (Lys oder Arg); Xaa bei Res.85 = (Lys, Asn, Gln, His oder Val); Xaa bei Res.86 = (Tyr oder His); Xaa bei Res.87 = (Arg, Gln, Glu oder Pro); Xaa bei Res.88 = (Asn, Glu oder Asp); Xaa bei Res.90 = (Val, Thr, Ala oder Ile); Xaa bei Res.92 = (Arg, Lys, Val, Asp oder Glu); Xaa bei Res.93 = (Ala, Gly, Glu oder Ser); Xaa bei Res.95 = (Gly oder Ala) und Xaa bei Res.97 = (His oder Arg).

Generische Sequenz 6

```
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Phe
 1               5                  10
Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa
                15
Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Ala
 20                  25
Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa
         30                  35
Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
                40
Xaa Xaa Xaa Asn His Ala Xaa Xaa
         45                  50
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
                55
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
     60                  65
Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
            70
Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
 75                  80
Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa
            85
Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa
 90                  95
Xaa Cys Xaa Cys Xaa
        100
```

wobei jedes Xaa unabhängig aus einer Gruppe einer oder mehrerer spezifizierter Aminosäuren ausgewählt ist, die durch das folgende definiert sind: „Res." bedeutet „Rest" und Xaa bei Res. 2 = (Lys, Arg, Ala oder Gln); Xaa bei Res.3 = (Lys, Arg oder Met); Xaa bei Res.4 = (His, Arg oder Gln); Xaa bei Res.5 = (Glu, Ser, His, Gly, Arg, Pro, Thr, oder Tyr); Xaa bei Res.7 = (Tyr oder Lys); Xaa bei Res.8 = (Val oder Ile); Xaa bei Res.9 = (Ser, Asp oder Glu); Xaa bei Res.11 = (Arg, Gln, Ser, Lys oder Ala); Xaa bei Res.12 = (Asp, Glu, oder Lys); Xaa bei Res.13 = (Leu, Val oder Ile); Xaa bei Res.16 = (Gln, Leu, Asp, His, Asn oder Ser); Xaa bei Res.17 = (Asp, Arg, Asn oder Glu); Xaa bei Res.19 = (Ile oder Val); Xaa bei Res.20 = (Ile oder Val); Xaa bei Res.21 = (Ala oder Ser); Xaa bei Res.23 = (Glu, Gln, Leu, Lys, Pro oder Arg); Xaa bei Res.24 = (Gly oder Ser); Xaa bei Res.25 = (Tyr oder Phe); Xaa bei Res.26 = (Ala, Ser, Asp, Met, His, Gln, Leu, oder Gly); Xaa bei Res.28 = (Tyr, Asn oder Phe); Xaa bei Res.31 = (Glu, His, Tyr, Asp, Gln oder Ser); Xaa bei Res.33 = (Glu, Lys, Asp, Gln oder Ala); Xaa bei Res.35 = (Ala, Ser, Pro, Gln oder Asn); Xaa bei Res.36 = (Phe, Leu oder Tyr); Xaa bei Res.38 = (Leu, Val oder Met); Xaa bei Res.39 = (Asn, Asp, Ala, Thr oder Pro); Xaa bei Res.40 = (Ser, Asp, Glu, Leu, Ala oder Lys); Xaa bei Res.41 = (Tyr, Cys, His, Ser oder Ile); Xaa bei Res.42 = (Met, Phe, Gly oder Leu); Xaa bei Res.43 = (Asn, Ser oder Lys); Xaa bei Res.44 = (Ala, Ser, Gly oder Pro); Xaa bei Res.45 = (Thr, Leu oder Ser); Xaa bei Res.49 = (Ile, Val oder Thr); Xaa bei Res.50 = (Val, Leu oder Ile); Xaa bei Res.51 = (Gln oder Arg); Xaa bei Res.52 = (Thr, Ala oder Ser); Xaa bei Res.53 = (Leu oder Ile); Xaa bei Res.54 = (Val oder Met); Xaa bei Res.55 = (His, Asn oder Arg); Xaa bei Res.56 = (Phe, Leu, Asn, Ser, Ala oder Val); Xaa bei Res.57 = (Ile, Met, Asn, Ala, Val oder Leu); Xaa bei Res.58 = (Asn, Lys, Ala, Glu, Gly oder Phe); Xaa bei Res.59 = (Pro, Ser oder Val); Xaa bei Res.60 = (Glu, Asp, Gly, Val oder Lys); Xaa bei Res.61 = (Thr, Ala, Val, Lys, Asp, Tyr, Ser, Ala, Pro

oder His); Xaa bei Res.62 = (Val, Ala oder Ile); Xaa bei Res.63 = (Pro oder Asp); Xaa bei Res.64 = (Lys, Leu oder Glu); Xaa bei Res.65 = (Pro oder Ala); Xaa bei Res.68 = (Ala oder Val); Xaa bei Res.70 = (Thr, Ala oder Glu); Xaa bei Res.71 = (Gln, Lys, Arg oder Glu); Xaa bei Res.72 = (Leu, Met oder Val); Xaa bei Res.73 = (Asn, Ser, Asp oder Gly); Xaa bei Res.74 = (Ala, Pro oder Ser); Xaa bei Res.75 = (Ile, Thr, Val oder Leu); Xaa bei Res.76 = (Ser, Ala oder Pro); Xaa bei Res.77 = (Val, Met oder Ile); Xaa bei Res.79 = (Tyr oder Phe); Xaa bei Res.80 = (Phe, Tyr, Leu oder His); Xaa bei Res.81 = (Asp, Asn oder Leu); Xaa bei Res.82 = (Asp, Glu, Asn oder Ser); Xaa bei Res.83 = (Ser, Gln, Asn, Tyr oder Asp); Xaa bei Res.84 = (Ser, Asn, Asp, Glu oder Lys); Xaa bei Res.85 = (Asn, Thr oder Lys); Xaa bei Res.87 = (Ile, Val oder Asn); Xaa bei Res.89 = (Lys oder Arg); Xaa bei Res.90 = (Lys, Asn, Gln, His oder Val); Xaa bei Res.91 = (Tyr oder His); Xaa bei Res.92 = (Arg, Gln, Glu oder Pro); Xaa bei Res.93 = (Asn, Glu oder Asp); Xaa bei Res.95 = (Val, Thr, Ala oder Ile); Xaa bei Res.97 = (Arg, Lys, Val, Asp oder Glu); Xaa bei Res.98 = (Ala, Gly, Glu oder Ser); Xaa bei Res.100 = (Gly oder Ala); und Xaa bei Res.102 = (His oder Arg).

[0043] Besonders brauchbare Sequenzen zur Verwendung als Morphogene in dieser Erfindung schließen die C-terminalen Domänen, beispielsweise die C-terminalen 96-102 Aminosäurereste von Vgl, Vgr-1, DPP, OP-1, OP-2, CBMP2A, CBMP2B, GDF-1 (siehe Tabelle II unten und die Sequenz ID NO: 5-14) ein, ebenso wie Proteine, die die C-terminalen Domänen von 60A, BMP3, BMP5 und BMP6 (siehe Sequenz II) NO: 24-28) umfassen, die alle zumindest das konservierte Sechs- oder Sieben-Cystein-Skelett einschließen. Zusätzlich sind biosynthetische Konstrukte, die aus den generischen Sequenzen entwickelt wurden, wie beispielsweise COP-1, 3-5, 7, 16 offenbart im US-Patent Nr. 5 011691, ebenfalls von Nutzen. Es wird angenommen, dass diese Allel-Varianten, Speziesvarianten oder andere Sequenzvarianten einschließen (beispielsweise „Muteine" oder „mutierte Proteine"), gleichgültig ob natürlich vorkommend oder biosynthetisch hergestellt, ebenso wie neue Mitglieder dieser morphogenetischen Proteinfamilie.

[0044] Wie hierin verwendet bedeutet „Aminosäuresequenz-Homologie" eine Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit und homologe Sequenzen teilen identische oder ähnliche Aminosäuren, wobei ähnliche Aminosäuren konservierte Aminosäuren sind, wie sie von Dayoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, Band 5, Ergänzungsband 3, Seiten 345-362 (M. O. Dayhoff Hrsg., National BioMed. Research Fdn., Washington DC 1978) definiert sind. Somit erfordert eine Kandidatensequenz, die eine 70% Aminosäure-Homologie mit einer Referenzsequenz teilt, dass im Anschluß an ein Alignment der Kandidatensequenz mit der Referenzsequenz 70% der Aminosäuren in der Kandidatensequenz mit der entsprechenden Aminosäure in der Referenzssequenz identisch sind oder einen konservierten Aminosäure-Austausch hierzu darstellen. „Aminosäuresequenz-Identität" erfordert identische Aminosäuren zwischen zwei ausgerichteten Sequenzen. Somit erfordert eine Kandidatensequenz, die 60% Aminosäure-Identität mit einer Referenzsequenz teilt, dass im Anschluß an ein Alignment der Kandidatensequenz mit der Referenzsequenz 60% der Aminosäuren in der Kandidatensequenz mit der entsprechenden Aminosäuresequenz in der Referenzsequenz identisch sind.

[0045] Wie hierin verwendet, verwenden alle berechneten Homologien und Identitäten OP-1 als Referenzsequenz. Ebenfalls werden, wie hierin verwendet, Sequenzen für Homologie- und Identitätsberechnungen unter Verwendung des Verfahrens von Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453 ausgerichtet und die Identitäten durch das Alignprogramm (DNAstar, Inc.) berechnet. In allen Fällen werden interne Lücken und Aminosäure-Insertionen in der Kandidatensequenz, wie ausgerichtet, ignoriert, wenn die Homologie/Identitätsberechnung durchgeführt wird.

[0046] Proteinsequenzen, die in dieser Erfindung als Morphogene von Nutzen sind, schließen solche ein, die mehr als 60% Identität, vorzugsweise mehr als 65% Identität mit der Aminosäuresequenz aufweisen, die das konservierte Sechs-Cystein-Skelett von hOP-1 definiert (beispielsweise Reste 43-139 von Sequenz ID NO: 5). Diese am meisten bevorzugten Sequenzen schließen sowohl Allel- als auch Speziesvarianten der OP-1 und OP-2 Proteine ein, einschließlich des Drosophila 60A Proteins. Demgemäß schließen bei einem anderen bevorzugten Aspekt der Erfindung nützliche Morphogene aktive Proteine ein, die Spezies von Polypeptidketten umfassen, die die hierin als „OPX" bezeichnete generische Aminosäuresequenz umfassen, die die Homologien zwischen den verschiedenen identifizierten Spezies von OP-1 und OP-2 aufnimmt (Sequenz ID NO: 29).

[0047] Zu Zwecken der Erläuterung schließen nützliche Morphogene aktive Proteine ein, die durch Nukleinsäuren kodierte Polypeptidketten umfassen, die an DNA- oder RNA-Sequenzen hybridisieren, die die C-terminale Sequenz kodieren, und die die konservierte Cystein-Domäne, beispielsweise Nukleotide 1036-1341 und die Nukleotide 1390-1695 von Sequenz-ID NO: 16 bzw. 20 von OP-1 und OP-2 unter stringenten Hybridisierungsbedingungen definieren. Wie hierin verwendet sind stringente Hybridisierungsbedingungen als Hybridisierung in 40% Formamid, 5 X SSPE, 5 X Denhardt's Lösung und 0,1 % SDS bei 37 °C über Nacht und Waschen in 0,1 X SSPE, 0,1% SDS bei 50 °C definiert.

[0048] Die bei den Anwendungen und Vorrichtungen dieser Erfindung nützlichen Morphogene schließen Proteine, wie sie in den Ansprüchen definiert sind, ein, gleichgültig, ob aus natürlich vorkommenden Quellen isoliert oder durch DNA-Rekombinations- oder andere Synthesetechniken erzeugt und schließen Allel- und Speziesvarianten dieser Proteine, natürlich vorkommende oder biosynthetische Mutanten hiervon ebenso wie verschiedene trunkierte und Fusions-Konstrukte ein. Deletions- und Additionsmutanten werden ebenfalls als aktiv angesehen, einschließlich solcher, die das konservierte C-terminale Cystein-Skelett verändern können, vorausgesetzt, dass die Veränderungen das Verhältnis dieser Cysteine in der gefaltenen Struktur funktionell nicht stören.

[0049] Demgemäß werden solche aktiven Formen als äquivalent der hierin offenbarten spezifisch beschriebenen Konstrukte angesehen. Die Proteine können Formen mit variierenden Glykosylierungsmustern, variierenden N-Termini, eine Familie verwandter Proteine mit Bereichen einer Aminosäuresequenz-Homologie und aktive trunkierte oder mutierte Formen der nativen oder biosynthetischen Proteine einschließen, die durch Expression rekombinanter DNA in Wirtszellen produziert wird.

[0050] Die morphogenetischen Proteine können aus intakter oder trunkierter cDNA oder aus synthetischen DNAs in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen exprimiert und aufgereinigt, gespalten, erneut gefaltet und dimerisiert werden, so dass morphogenetisch aktive Zusammensetzungen gebildet werden. Gegenwärtig bevorzugte Wirtszellen schließen E. coli oder Säugetierzellen ein, wie beispielsweise CHO, COS oder BSC Zellen. Eine ausführliche Beschreibung der in den Verfahren, Zusammensetzungen und Vorrichtungen dieser Erfindung nützlichen Morphogene ist in der gleichzeitig anhängigen US-Patentanmeldung Serien-Nr. 752 764, eingereicht am 30.08.1991 und 667 274, eingereicht am 11.03.1991 offenbart.

[0051] Somit kann im Hinblick auf diese Offenbarung der befähigte Gentechniker Gene aus cDNA- oder genomischen Bibliotheken verschiedener unterschiedlicher Spezies isolieren, die geeignete Aminosäuresequenzen kodieren oder kann DNAs aus Oligonukleotiden konstruieren und kann diese dann in verschiedenen Typen von Wirtszellen exprimieren, einschließlich sowohl von Prokaryonten als auch Eukaryonten, um große Mengen aktiver Proteine zu produzieren, die zur Aufrechterhaltung der Nervenbahnen in einem Säugetier geeignet sind, einschließlich der Verbesserung des Überlebens von Nervenzellen, die einem Absterberisiko unterliegen und der Stimulierung der Nervenregeneration und Heilung bei einer Vielzahl von Säugetieren, einschließlich Menschen.

[0052] Das vorhergehende und weitere Aufgaben, Merkmale und Vorteile der Erfindung werden aus der nachfolgenden ausführlichen Beschreibung der Erfindung besser verständlich werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

[0053] Die vorhergehenden und weitere Aufgaben und Merkmale dieser Erfindung ebenso wie die Erfindung selbst können aus der folgenden Beschreibung vollständiger verständlich werden, weil dies zusammen mit deren begleitenden Zeichnungen gelesen werden, in denen:

[0054] **Fig.** 1(A und B) Mikrophotographien sind, die die Fähigkeit von Morphogen (OP-1) zeigen, transformierte Neuroplastom × Gliom-Zellen (**Fig. 1A**) dazu zu induzieren, eine Morphologie zu redifferenzieren, die für nicht-transformierte Neuronen charakteristisch ist (**Fig. 1B**);

[0055] **Fig. 2A** ist eine Dosis-Wirkungskurve für die Induktion der 180 kDa- und 140 kDA N-CAM Isoformen in Morphogen-behandelten NG108-15 Zellen.

[0056] **Fig. 2B** ist eine Mikrophotographie eines Western-Blots von Gesamtzellextrakten aus Morphogen-behandelten NG108-15 Zellen mit einem N-CAM spezifischen Antikörper; und

[0057] **Fig. 3** ist ein Plot der durchschnittlichen Anzahl von Zellaggregaten, die in 20 zufällig ausgewählten Gebieten als eine Funktion der Morphogenkonzentration gezählt wurden.

[0058] **Fig. 4** ist eine Mikrophotographie eines Immun-Blots, der die Anwesenheit von OP-1 in humanem Serum zeigt.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0059] Die Erfindung ist in den beigefügten Ansprüchen definiert.

[0060] Nachstehend werden ausführliche Beschreibungen geeigneter Morphogene, die in den Anwendungen und Vorrichtungen dieser Erfindung von Nutzen sind, sowie Beispiele von Verfahren zu deren Verabreichung und Anwendung und zahlreiche, nicht einschränkende Beispiele beschrieben, die 1) die Geeignetheit der Morphogene und Morphogen-stimulierenden Mittel, die hierin beschrieben sind, als therapeutische Mittel zur Aufrechterhaltung von Nervenbahnen in einem Säugetier und die Verbesserung des Überlebens von Nervenzellen, die einem Absterberisiko unterliegen, erläutern; und 2) Assays bereitstellen, mit denen Kandidaten-Morphogene und Morphogen-stimulierende Mittel auf ihre Leistungsfähigkeit getestet werden.

1. Nützliche Morphogene

[0061] Nützliche Morphogene sind in den Ansprüchen definiert. Wie dies hier definiert ist, ist ein Protein morphogen bzw. morphogenetisch, wenn es dazu in der Lage ist, die Entwicklungskaskade zellulärer und molekularer Ereignisse zu induzieren, die in der Bildung von neuem, organspezifischen Gewebe gipfeln und umfasst zumindest das konservierte C-terminale Sechs-Cystein-Skelett oder dessen funktionelles Äquivalent (siehe oben). Insbesondere sind die Morphogene im allgemeinen dazu in der Lage, all die nachfolgenden biologischen Funktionen in einer morphogenetisch permissiven Umgebung durchzuführen: Stimulierung der Proliferation von Vorläuferzellen; Stimulierung der Differenzierung von Vorläuferzellen; Stimulierung der Proliferation differenzierter Zellen; und Unterstützung des Wachstums und der Aufrechterhaltung differenzierter Zellen. Details, wie die in dem Verfahren dieser Erfindung nützlichen Morphogene zuerst identifiziert wurden, sowie eine Beschreibung wie diese herzustellen, zu verwenden und diese auf eine morphogenetische Aktivität zu testen sind, sind in der internationalen Anmeldung US 92/01968 (WO 92/15323) offenbart. Wie hierin offenbart, können die Morphogene aus Material aus natürlicher Quelle aufgereinigt oder rekombinant aus prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen hergestellt werden, unter Verwendung der hierin offenbarten genetischen Sequenzen. Alternativ können neue morphogenetische Sequenzen folgend dem hierin offenbarten Verfahren identifiziert werden.

[0062] Besonders nützliche Proteine schließen solche ein, die die natürlich gewonnenen Sequenzen umfassen, die in Tabelle II offenbart sind. Weitere nützliche Sequenzen schließen biosynthetische Konstrukte wie beispielsweise solche ein, die im US-Patent Nr. 5 011691 offenbart sind, dessen Offenbarung hierin durch Bezugnahme mit aufgenommen ist (beispielsweise COP-1, COP-3, COP-4, COP-5, COP-7 und COP-16).

[0063] Die bei der Erfindung nützlichen Morphogene können auch durch die generische Sequenz 6 beschrieben werden (die generischen Sequenzen 1, 2, 3, 4 und 5 werden lediglich zu Erläuterungszwecken beschrieben und liegen außerhalb der vorliegenden Erfindung). Die generischen Sequenzen 1 und 2 können ebenfalls an ihrem N-Terminus die folgende Sequenz einschließen:

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa (Seq. ID No. 15)

1 5

[0064] Die nachfolgende Tabelle II vergleicht die Aminosäuresequenzen der aktiven Bereiche nativer Proteine, die als Morphogene identifiziert wurden, einschließlich menschlichem OP-1 (hOP-1, Sequenz ID NO: 5 und 16-17), Maus OP-1 (mOP-1, Sequenz ID NO: 6 und 18-19), humanem und Maus OP-2 (Sequenz ID NO: 7, 8 und 20-23), CBMP2A (Sequenz ID NO: 9), CBMP2B (Sequenz ID NO: 10), BMP3 (Sequenz ID NO: 26), DPP (von Drosophila, Sequenz ID NO: 11), Vgl (von Xenopus, Sequenz ID NO: 12), Vgr-1 (von der Maus, Sequenz ID NO: 13), GDF-1 (von der Maus, Sequenz ID NO: 14, 32 und 33), 60A Protein (von Drosophila, Sequenz ID NO: 24 und 25), BMP5 (Sequenz ID NO: 27) und BMP6 (Sequenz ID NO: 28). Die Sequenzen werden im wesentlichen folgend dem Verfahren von Needleman et al. (1970) J. Mol. Biol., 48: 443-453 ausgerichtet, berechnet unter Verwendung des Alignprogramms (DNAstar, Inc.). In der Tabelle zeigen drei Punkte an, dass die Aminosäure in dieser Position die selbe wie die Aminosäure in hOP-1 ist. Drei Striche zeigen an, dass in dieser Position keine Aminosäure vorliegt und sind für den Zweck eingeschlossen, Homologien zu veranschaulichen. Beispielsweise „fehlt" Aminosäurerest 60 von CBMP-2A und CBMP-2B. Natürlich umfassen diese beiden Aminosäuresequenzen in dieser Region Asn-Ser (Reste 58, 59), wobei CBMP-2A dann Lys und Ile umfasst, wohingegen CBMP-2B Ser und Ile umfassen.

Tabelle II

hOP-1	Cys	Lys	Lys	His	Glu	Leu	Tyr	Val
mOP-1	...	...	...	...	...	...	...	...
hOP-2	...	Arg	Arg	...	...	...	...	...
mOP-2	...	Arg	Arg	...	...	...	...	...
DPP	...	Arg	Arg	...	Ser	...	...	...
Vgl	...	...	Lys	Arg	His	...	...	...
Vgr-1	...	...	...	...	Gly	...	...	...
CBMP-2A	...	...	Arg	...	Pro	...	...	...
CBMP-2B	...	Arg	Arg	...	Ser	...	...	...
BMP3	...	Ala	Arg	Arg	Tyr	...	Lys	...
GDF-1	...	Arg	Ala	Arg	Arg	...	...	...
60A	...	Gln	Met	Glu	Thr	...	...	...
BMP5	...	...	...	...	...	...	...	...
BMP6	...	Arg	...	...	...	...	...	...
	1				5			

hOP-1	Ser	Phe	Arg	Asp	Leu	Gly	Trp	Gln	Asp
mOP-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...
hOP-2	...	...	Gln	...	...	...	...	Leu	...

mOP-2	Ser	...	...	...	...	...	...	Leu	...
DPP	Asp	...	Ser	...	Val	...	...	Asp	...
Vgl	Glu	...	Lys	...	Val	...	...	...	Asn
Vgr-1	...	...	Gln	...	Val	...	...	...	...
CBMP-2A	Asp	...	Ser	...	Val	...	...	Asn	...
CBMP-2B	Asp	...	Ser	...	Val	...	...	Asn	...
BMP3	Asp	...	Ala	...	Ile	...	...	Ser	Glu
GDF-1	...	...	...	Glu	Val	...	...	His	Arg
60A	Asp	...	Lys	...	...	...	...	His	...
BMP5	...	...	...	...	...	...	...	...	...
BMP6	...	...	Gln	...	...	...	...	...	...
		10					15		

hOP-1	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ala
mOP-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...
hOP-2	...	Val	...	...	...	Gln	...	...	Ser
mOP-2	...	Val	...	...	...	Gln	...	...	Ser
DPP	...	...	Val	...	...	Leu	...	...	Asp
Vgl	...	Val	...	...	...	Gln	...	...	Met
Vgr-1	...	...	...	...	...	Lys	...	...	...
CBMP-2A	...	...	Val	...	...	Pro	...	...	His
CBMP-2B	...	...	Val	...	...	Pro	...	...	Gln
BMP3	...	...	...	Ser	...	Lys	Ser	Phe	Asp
GDF-1	...	Val	...	...	...	Arg	...	Phe	Leu
60A	...	...	...	...	...	...	...	...	Gly
BMP5	...	...	...	...	...	...	...	...	...
BMP6	...	...	...	...	...	Lys	...	...	...
			20					25	

hOP-1	Ala	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly	Glu	Cys	Ala
mOP-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...
hOP-2	...	...	...	...	...	...	...	...	Ser
mOP-2	...	...	...	...	...	...	...	...	...
DPP	...	...	...	...	His	...	Lys	...	Pro

Vgl	...	Asn	...	...	Tyr	...	...	...	Pro
Vgr-1	...	Asn	...	...	Asp	...	...	...	Ser
CBMP-2A	...	Phe	...	...	His	...	Glu	...	Pro
CBMP-2B	...	Phe	...	...	His	...	Asp	...	Pro
BMP3	...	...	...	...	Ser	...	Ala	...	Gln
GDF-1	...	Asn	...	...	Gln	...	Gln	...	...
60A	...	Phe	...	...	Ser	...	...	...	Asn
BMP5	...	Phe	...	...	Asp	...	...	...	Ser
BMP6	...	Asn	...	...	Asp	...	...	...	Ser
				30					35

hOP-1	Phe	Pro	Leu	Asn	Ser	Tyr	Met	Asn	Ala
mOP-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...
hOP-2	...	...	...	Asp	...	Cys	...	...	...
mOP-2	...	...	...	Asp	...	Cys	...	...	...
DPP	...	...	...	Ala	Asp	His	Phe	...	Ser
Vgl	Tyr	...	...	Thr	Glu	Ile	Leu	...	Gly
Vgr-1	...	...	...	...	Ala	His	...	...	...
CBMP-2A	...	...	...	Ala	Asp	His	Leu	...	Ser
CBMP-2B	...	...	...	Ala	Asp	His	Leu	...	Ser
GDF-1	Leu	...	Val	Ala	Leu	Ser	Gly	Ser**	...
BMP3	...	...	Met	Pro	Lys	Ser	Leu	Lys	Pro
60A	...	...	...	...	Ala	His	...	...	...
BMP5	...	...	...	...	Ala	His	Met	...	...
BMP6	...	...	...	...	Ala	His	Met	...	...
					40				

hOP-1	Thr	Asn	His	Ala	Ile	Val	Gln	Thr	Leu
mOP-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...
hOP-2	...	...	...	...	...	Leu	...	Ser	...
mOP-2	...	...	...	...	...	Leu	...	Ser	...
DPP	...	...	...	...	Val	...	...	...	...
Vgl	Ser	...	...	...	...	Leu	...	...	...
Vgr-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...
CBMP-2A	...	...	...	...	...	...	...	...	...

CBMP-2B	...	...	...	...	...	...	...	...	...
BMP3	Ser	...	...	...	Thr	Ile	...	Ser	Ile
GDF-1	Leu	...	...	...	Val	Leu	Arg	Ala	...
60A	...	...	...	...	...	...	...	...	...
BMP5	...	...	...	...	...	...	...	...	...
BMP6	...	...	...	...	...	...	...	...	...
	45					50			

hOP-1	Val	His	Phe	Ile	Asn	Pro	Glu	Thr	Val
mOP-1	...	...	...	...	...	...	Asp	...	...
hOP-2	...	His	Leu	Met	Lys	...	Asn	Ala	...
mOP-2	...	His	Leu	Met	Lys	...	Asp	Val	...
DPP	...	Asn	Asn	Asn	...	...	Gly	Lys	...
Vgl	...	...	Ser	...	Glu	...	...	Asp	Ile
Vgr-1	...	...	Val	Met	...	...	...	Tyr	...
CBMP-2A	...	Asn	Ser	Val	...	Ser	---	Lys	Ile
CBMP-2B	...	Asn	Ser	Val	...	Ser	---	Ser	Ile
BMP3	...	Arg	Ala**	Gly	Val	Val	Pro	Gly	Ile
GDF-1	Met	...	Ala	Ala	Ala	...	Gly	Ala	Ala
60A	...	...	Leu	Leu	Glu	...	Lys	Lys	...
BMP5	...	...	Leu	Met	Phe	...	Asp	His	...
BMP6	...	...	Leu	Met	...	...	...	Tyr	...
		55					60		

hOP-1	Pro	Lys	Pro	Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Gln
mOP-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...
hOP-2	...	...	Ala	...	...	...	...	...	Lys
mOP-2	...	...	Ala	...	...	...	...	...	Lys
DPP	...	...	Ala	...	...	Val	...	...	...
Vgl	...	Leu	...	...	...	Val	...	...	Lys
Vgr-1	...	...	...	...	...	...	...	...	Lys
CBMP-2A	...	...	Ala	...	...	Val	...	...	Glu
CBMP-2B	...	...	Ala	...	...	Val	...	...	Glu

BMP3	...	Glu	...	...	...	Val	...	Glu	Lys
GDF-1	Asp	Leu	...	...	...	Val	...	Ala	Arg
60A	...	...	...	...	...	...	...	...	Arg
BMP5	...	...	...	...	...	...	...	...	Lys
BMP6	...	...	...	...	...	...	...	...	Lys
			65					70	

hOP-1	Leu	Asn	Ala	Ile	Ser	Val	Leu	Tyr	Phe
mOP-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...
hOP-2	...	Ser	...	Thr	...	...	...	...	Tyr
mOP-2	...	Ser	...	Thr	...	...	...	...	Tyr
Vgl	Met	Ser	Pro	...	...	Met	...	Phe	Tyr
Vgr-1	Val	...	...	...	...	...	...	...	...
DPP	...	Asp	Ser	Val	Ala	Met	...	...	Leu
CBMP-2A	...	Ser	...	...	...	Met	...	...	Leu
CBMP-2B	...	Ser	...	...	...	Met	...	...	Leu
BMP3	Met	Ser	Ser	Leu	...	Ile	...	Phe	Tyr
GDF-1	...	Ser	Pro	...	...	...	...	Phe	...
60A	...	Gly	...	Leu	Pro	...	...	...	His
BMP5	...	...	...	...	...	...	...	...	...
BMP6	...	...	...	...	...	...	...	...	...
				75					80

hOP-1	Asp	Asp	Ser	Ser	Asn	Val	Ile	Leu	Lys
mOP-1	...	...	...	...	...	...	...	...	...
hOP-2	...	Ser	...	Asn	...	...	...	...	Arg
mOP-2	...	Ser	...	Asn	...	...	...	...	Arg
DPP	Asn	...	Gln	...	Thr	...	Val	...	...
Vgl	...	Asn	Asn	Asp	...	...	Val	...	Arg
Vgr-1	...	...	Asn	...	...	...	...	...	...
CBMP-2A	...	Glu	Asn	Glu	Lys	...	Val	...	...
CBMP-2B	...	Glu	Tyr	Asp	Lys	...	Val	...	...
BMP3	...	Glu	Asn	Lys	...	...	Val	...	...

GDF-1	...	Asn	...	Asp	...	...	Val	...	Arg
60A	Leu	Asn	Asp	Glu	...	...	Asn	...	...
BMP5	...	...	...	...	...	...	...	...	...
BMP6	...	...	Asn	...	...	...	...	...	...
					85				

hOP-1	Lys	Tyr	Arg	Asn	Met	Val	Val	Arg
mOP-1	...	...	...	...	...	...	...	...
hOP-2	...	His	...	...	...	...	...	Lys
mOP-2	...	His	...	...	...	...	...	Lys
DPP	Asn	...	Gln	Glu	...	Thr	...	Val
Vgl	His	...	Glu	...	...	Ala	...	Asp
Vgr-1	...	...	...	...	...	...	...	...
CBMP-2A	Asn	...	Gln	Asp	...	...	...	Glu
CBMP-2B	Asn	...	Gln	Glu	...	...	...	Glu
BMP3	Val	...	Pro	...	...	Thr	...	Glu
GDF-1	Gln	...	Glu	Asp	...	...	...	Asp
60A	...	...	...	...	...	Ile	...	Lys
BMP5	...	...	...	...	...	...	...	...
BMP6	...	...	...	Trp	...	...	...	...
	90					95		

hOP-1	Ala	Cys	Gly	Cys	His
mOP-1	...	...	...	...	...
hOP-2	...	...	...	...	...
mOP-2	...	...	...	...	...
DPP	Gly	...	...	...	Arg
Vgl	Glu	...	...	...	Arg
Vgr-1	...	...	...	...	...
CBMP-2A	Gly	...	...	...	Arg
CBMP-2B	Gly	...	...	...	Arg
BMP3	Ser	...	Ala	...	Arg
GDF-1	Glu	...	...	...	Arg
60A	Ser	...	...	...	...
BMP5	Ser	...	...	...	...
BMP6	...	...	...	...	...
			100		

** Zwischen den Resten 56 und 57 von BMP3 befindet sich ein Val-Rest; zwischen den Resten 43 und 44 von GDF-1 liegt die Aminosäuresequenz Gly-Gly-Pro-Pro.

[0065] Wie aus den vorhergehenden Aminosäuresequenz-Vergleichen offensichtlich ist, können signifikante Aminosäureaustausche innerhalb der generischen Sequenzen vorgenommen werden, während die morphogenetische Aktivität erhalten bleibt. Beispielsweise teilt die GDF-1 Sequenz mehr als 70% der Aminosäuresequenz-Homologie (oder „Ähnlichkeit") mit der hOP-1 Sequenz, während die GDF-1 Proteinsequenz, die in Tabelle II dargestellt ist, nur ungefähr 50% Aminosäureidentität mit der hOP-1 Sequenz, hierin beschrieben, teilt, während „Homologie" oder „Ähnlichkeit" erlaubte konservative Aminosäuresequenzaustausche innerhalb der Sequenz einschließt, wie von Dayhoff et al, Atlas of Protein Sequence and Structure, Band 5, Ergänzungsband 3, Seiten 345-362 definiert ist (M. O. Dayoff, Hrsg., Nat. BioMed. Res. Fdn. Washington DC 1978).

[0066] Proteinsequenzen, die in dieser Erfindung als Morphogene von Nutzen sind, schließen solche ein, die mehr als 60% Identität, vorzugsweise mehr als 65% Identität mit der Aminosäuresequenz aufweisen, die das konservierte Sechs-Cystein-Skelett von hOP-1 (beispielsweise Reste 43-139 von Sequenz ID NO: 5) aufweisen. Diese Sequenzen schließen sowohl Allel- als auch Speziesvarianten der OP-1 und OP-2 Proteine ein, einschließlich des Drosophila 60A Proteins. Die Erfindung schließt Morphogene ein, die Spezies von Polypeptidketten mit der generischen Aminosäuresquenz einschließen, die hierin als „OPX" bezeichnet wird, die das Sieben-Cystein-Skelett definiert und die Identitäten zwischen den verschiedenen identifizierten Maus- und humanen OP-1 und OP-2 Proteinen aufnimmt. OPX ist in Sequenz ID NO: 29 dargelegt. Wie dort beschrieben, wird jedes Xaa an einer vorgegebenen Position unabhängig aus den Resten ausgewählt, die an der entsprechenden Position an der C-terminalen Sequenz von Maus oder Menschen OP-1 oder OP-2 auftreten (siehe Sequenz ID NO: 5-8 und/oder Sequenz ID NO: 16-23).

II. Zubereitungen und Verfahren zur Verabreichung therapeutischer Mittel

[0067] Zu Zwecken der Erläuterung können die Morphogene einem Individuum durch geeignete Mittel verabreicht werden, vorzugsweise direkt (beispielsweise lokal, wie durch Injektion an einen Nervengewebesort) oder systemisch (beispielsweise parenteral oder oral). Wenn das Morphogen parenteral, beispielsweise intravenös, subkutan, intramuskulär, intraorbital, ophthalmisch, intraventrikulär, intracranial, intracapsulär, intraspinal, intracisternal, intraperitoneal, bukkal, rektal, vaginal, intranasal oder durch Aerosol-Verabreichung bereitgestellt werden soll, bildet das Morphogen vorzugsweise den Teil einer wäßrigen Lösung. Die Lösung ist physiologisch verträglich, so dass die Lösung zusätzlich zum Transport bzw. Abgabe des erwünschten Morphogens an den Patienten die Lösung selbst den Elektrolyt- und Volumenhaushalt des Patienten nicht in anderer Weise nachteilig beeinträchtigt. Das wäßrige Medium für das Morphogen kann somit normale physiologische Salzlösung (9,85% NaCl, 0,15 M), pH 7-7,4 umfassen. Die wäßrige Lösung, die das Morphogen enthält, kann beispielsweise durch Lösen des Proteins in 50% Ethanol hergestellt werden, der Acetonitril in 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) oder in 0,1 % HCl enthält, oder durch äquivalente Lösungsmittel. Ein Volumen der sich ergebenden Lösung wird dann beispielsweise zu 10 Volumina Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) zugefügt, die weiterhin 0,1-0,2% humanes Serumalbumin (HSA) einschließen kann. Die sich ergebende Lösung wird vorzugsweise intensiv gevortexed. Falls erwünscht kann ein gegebenes Morphogen durch Bindung mit einem geeigneten Molekül löslicher gemacht werden. Beispielsweise erhöht die Bindung des reifen Dimers mit der Pro-Domäne des Morphogens die Löslichkeit des Proteins signifikant (siehe Abschnitt 11.1, unten). Es wird tatsächlich angenommen, dass das endogene Protein in dieser Form transportiert wird. Ein weiteres Molekül, dass zur Verbesserung der Löslichkeit in der Lage ist und das insbesondere für orale Verabreichungen von Nutzen ist, ist Kasein. Beispielsweise erhöht der Zusatz von 0,2% Kasein die Löslichkeit der reifen aktiven Form von OP-1 um 80%. Weitere Bestandteile, die in der Milch zu finden sind und/oder verschiedene Serumproteine können ebenfalls von Nutzen sein.

[0068] Nützliche Lösungen für eine parenterale Verabreichung können durch irgendeines der in der pharmazeutischen Technik wohl bekannten Verfahren hergestellt werden, die beispielsweise in Remington's Pharmaceutical Sciences (Gennaro, A., Hrsg.), Mack Pub., 1990, beschrieben sind. Zubereitungen können beispielsweise Polyalkylenglykole wie beispielsweise Polyethylenglykol, Öle pflanzlichen Ursprungs, hydrierte Naphthalene und dergleichen einschließen. Formulierungen zur direkten Verabreichung, können insbesondere Glycerol und weitere Zusammensetzungen mit hoher Viskosität einschließen. Biokompatible, vorzugsweise bioresorbierbare Polymere, die beispielsweise Hyaluronsäure, Collagen, Polybutyrat, Tricalziumphosphat, Lactid und Lactid/Glycolidcopolymere einschließen, können nützliche Trägerstoffe sein, um die Freisetzung des Morphogens in vivo zu steuern. Weitere potentiell nützliche parenterale Abgabe- bzw. Transportsysteme für diese Morphogene schließen Ethylen-Vinylacetatcopolymer-Teilchen, osmotische Pumpen, implantierbare Infusionssysteme und Liposome ein. Zubereitungen zur Inhalationsverabreichung enthalten als Trägerstoffe beispielsweise Lactose oder können wäßrige Lösungen sein, die beispielsweise Polyoxyethylen-9-laurylether, Glycocholat und Desoxycholat enthalten oder können ölige Lösungen zur Verabreichung in Form von Nasentropfen oder als Gel zur intranasalen Verabreichung sein. Zubereitungen zur parenteralen Verabreichung kön-

nen ebenfalls Glycocholat zur bukkalen Verabreichung, Methoxysalicylat zur rektalen Verabreichung oder Zitronensäure zur vaginalen Verabreichung einschließen.

[0069] Alternativ können die hierin beschriebenen Morphogene oral verabreicht werden. Eine orale Verabreichung von Proteinen als Therapeutika wird im allgemeinen nicht praktiziert, weil die meisten Proteine durch Verdauungsenzyme und Säuren im Säugetierverdauungssystem leicht abgebaut werden, bevor diese in den Blutstrom absorbiert werden können. Jedoch sind die hierin beschriebenen Morphogene typischerweise Säure-stabil und Protease-resistent (siehe beispielsweise US-Patent Nr. 4 968 590). Zusätzlich wurde zumindest ein Morphogen, nämlich OP-1, in Brustdrüsenextrakt Colostrum und 57-Tage-Milch identifiziert. Überdies ist das aus Brustdrüsenextrakt aufgereinigte OP-1 morphogenetisch aktiv. Dieses Protein induziert insbesondere die Ersatzknochenbildung in Säugetieren, wenn es in Verbindung mit einem geeigneten Matrixmaterial subkutan implantiert wird, unter Verwendung eines in vivo Standard-Knochenassays, wie er im US-Patent Nr. 4 968 590 offenbart ist. Überdies wird das Morphogen ebenfalls im Blutstrom nachgewiesen (siehe Beispiel 9 unten). Zuletzt ist die lösliche Form des Morphogens, beispielsweise reifes Morphogen, das mit der Pro-Domäne verbunden ist, dazu in der Lage, die Nervenbahnen in einem Säugetier aufrechtzuerhalten (siehe Beispiele 4 und 6 unten). Diese Erkenntnisse zeigen, dass die orale und parenterale Verabreichung brauchbare Mittel zur Verabreichung der Morphogene an ein Individuum sind. Zusätzlich ist, während die reifen Formen bestimmter Morphogene, die hierin beschrieben sind, typischerweise schlecht löslich sind, die in Milch (und Brustdrüsenextrakt und Colostrum) zu findende Morphogenform leicht löslich, möglicherweise durch Bindung der reifen, morphogenetisch aktiven Form mit einem Teil oder der gesamten Pro-Domäne der intakten Sequenz und/oder durch Bindung mit einer oder mehreren Milchbestandteilen. Demgemäß können die hierin bereitgestellten Verbindungen mit Molekülen verbunden werden, die deren Löslichkeit in vitro oder in vivo verbessern.

[0070] Die hierin bereitgestellten Verbindungen können mit Molekülen verbunden werden, die dazu in der Lage sind, das Morphogen oder Morphogen-stimulierende Mittel auf Nervengewebe zu richten. Beispielsweise kann ein Antikörper, ein Antikörperfragment oder ein anderes Bindungsprotein, das spezifisch mit einem Oberflächenmolekül auf Nervengewebszellen interagiert, einschließlich von Nerven- oder Gliazellen, verwendet werden. Nützliche Targetingmoleküle können beispielsweise unter Verwendung der beispielsweise im US-Patent Nr. 5 091 513 offenbarten Einkettenbindungsstellen-Technologie entwickelt werden.

[0071] Wie oben beschrieben teilen die hierin bereitgestellten Morphogene eine signifikante Sequenzhomologie in den C-terminalen aktiven Domänen. Im Gegensatz hierzu weichen die Sequenzen typischerweise in den Sequenzen voneinander ab, die die Pro-Domäne definieren. Deswegen wird angenommen, dass die Pro-Domäne Morphogen-spezifisch ist. Wie oben beschrieben ist ebenfalls bekannt, dass verschiedene bis jetzt identifizierte Morphogene in den verschiedenen Geweben differenziell exprimiert werden. Es ist deswegen wahrscheinlich, ohne an eine vorgegebene Theorie gebunden sein zu wollen, dass unter natürlichen Bedingungen im Körper ausgewählte Morphogene typischerweise auf ein vorgegebenes Gewebe wirken. Demgemäß kann ein Teil oder die gesamten Pro-Domänen, die in Verbindung mit der aktiven Form des Morphogens in Lösung identifiziert wurde, als Targeting-Moleküle für die hierin beschriebenen Morphogene dienen. Beispielsweise können die Pro-Domänen spezifisch mit einem oder mehreren Molekülen am Zielgewebe interagieren, um das mit der Pro-Domäne verbundene Morphogen zu diesem Gewebe zu dirigieren. Demgemäß ist ein weiteres nützliches Targetingmolekül zum Targeting eines Morphogens zu Nervengewebe ein Teil oder die gesamte morphogene Pro-Domäne, insbesondere ein Teil oder die gesamten Pro-Domänen von OP-1 oder GDF-1, welche beiden Proteine natürlich mit Nervengewebe verbunden sind.

[0072] Schließlich können die Morphogene, die hie beschrieben sind, alleine oder in Kombination mit anderen Molekülen verabreicht werden, von denen bekannt ist, dass sie in der Aufrechterhaltung von Nervenbahnen von Vorteil sind, einschließlich Nervenwachstumsfaktoren und anti-inflammatorische Mittel.

[0073] Zu Zwecken der Erläuterung können die hierin bereitgestellten Verbindungen durch Mischung von pharmazeutisch verträglichen nicht-toxischen Trägerstoffen und Trägern zu pharmazeutischen Zusammensetzungen formuliert werden. Wie oben erwähnt können solche Zusammensetzungen zur parenteralen Verabreichung hergestellt werden, insbesondere in Form von flüssigen Lösungen oder Suspensionen; zur oralen Verabreichung, insbesondere in Form von Tabletten oder Kapseln; oder intranasal insbesondere in Form von Pulvern, Nasentropfen oder Aerosolen.

[0074] Die Zusammensetzungen können zur parenteralen oder oralen Verabreichung an Menschen oder andere Säugetiere in therapeutisch wirksamen Mengen formuliert werden, beispielsweise Mengen, die geeignete Konzentrationen für eine Zeitspanne bereitstellen, die ausreichend ist, um den pathologischen Zustand des Patienten zu eliminieren oder zu reduzieren, um eine Therapie für die neurologischen Erkrankungen und Stö-

rungen die oben beschrieben wurden bereitzustellen und Mengen, die wirksam sind, um das Nervenzellüberleben zu verbessern und/oder um Nervenzellen und Nervenbahnen in Vorwegnahme einer Verletzung des Nervengewebes zu schützen.

[0075] Es wird vom Fachmann auf dem Gebiet anerkannt werden, dass die Konzentration der in einer therapeutischen Zusammensetzung beschriebenen Verbindungen abhängig von mehreren Faktoren variieren wird, einschließlich der Dosierung des verabreichten Arzneistoffes, den chemischen Eigenschaften (beispielsweise Hydrophobie) der verwendeten Verbindungen und dem Verabreichungsweg. Die bevorzugte Dosierung des zu verabreichenden Arzneistoffes hängt ebenfalls wahrscheinlich von solchen Variablen wie dem Typ und dem Umfang des Fortschreitens der neurologischen Erkrankung, dem Gesamtgesundheitszustand des speziellen Patienten, der relativen biologischen Leistungsfähigkeit der ausgewählten Verbindung, der Formulierung der Trägerstoffe der Verbindung und dem Verabreichungsweg ab. Allgemein ausgedrückt können die Verbindungen dieser Erfindung in einer wäßrigen physiologischen Pufferlösung bereitgestellt werden, die ungefähr 0,1 bis 10% g/v Verbindung zur parenteralen Verabreichungen enthält. Typische Dosisbereiche liegen von ungefähr 10 ng/kg bis ungefähr 1 g/kg Körpergewicht pro Tag; ein bevorzugter Dosisbereich ist von ungefähr 0,1 µg/kg bis 100 mg/kg Körpergewicht pro Tag. Optimal liegt die gegebene Morphogen-Dosis in allen Fällen zwischen 2–20 µg Protein pro Kilogramm Gewicht des Patienten pro Tag. Keine offensichtlichen OP-1-induzierten pathologischen Läsionen werden induziert, wenn reifes Morphogen (beispielsweise OP-1, 20 µg) täglich normal wachsenden Ratten für 21 aufeinander folgende Tage verabreicht wird. Überdies erzeugen systemische 10 µg Injektionen des Morphogens (beispielsweise OP-1), die für 10 Tage täglich normalen neugeborenen Mäusen injiziert wurden, keine groben Abnormalitäten.

[0076] Weil die Fähigkeit von Proteinen oder Proteinfragmenten, die Blut-Hirnschranke zu durchdringen mit ihrer Größe, Lipophilie oder ihrer Netto-Ionen-Ladung in Verbindung stehen kann, können geeignete Modifikationen der Morphogene formuliert werden (beispielsweise durch Ersetzen von Phenylalanin durch Pentafluorphenylalanin oder durch Bindung eines kationisierten Proteins, wie beispielsweise Albumin), um deren Transportabilität über die Schranke hinweg zu erhöhen, unter Verwendung von in der Technik bekannten Standardmethodologien. Siehe beispielsweise Kastin et al. Pharmac. Biochem. Behav. (1979)11: 713-716; Rapoport et al., Science (1980) 207: 84-86; Pardridge et al. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 146: 307-313; Riekkinen et al. (1987) Peptides 8: 261-265. Die Leistungsfähigkeit dieser funktionellen Analoga kann beispielsweise durch Auswertung des Vermögens dieser Verbindungen beurteilt werden, eine Redifferenzierung transformierter Zellen zu induzieren oder das Überleben von Neuronen zu verbessern, die einem Absterberisiko unterliegen, wie in den hierin bereitgestellten Beispielen beschrieben ist.

[0077] Bei der systemischen Verabreichung der Morphogene wird vorzugsweise eine großvolumige Initialdosis zu Beginn der Behandlung verwendet. Die Behandlung wird dann mit einer Aufrechterhaltungsdosis fortgeführt. Eine weitere Verabreichung kann durch Überwachung der Morphogenkonzentrationen im Blut in Intervallen bestimmt werden.

[0078] Wenn eine Verletzung von Neuronen einer Nervenbahn absichtlich als Teil, beispielsweise eines chirurgischen Verfahrens induziert wird, wird das Morphogen vorzugsweise gerade vor oder gleichzeitig mit der Induktion des Traumas bzw. der Verletzung bereitgestellt. Das Morphogen wird vorzugsweise prophylaktisch in einem chirurgischen Rahmen verabreicht. Optimal liegt die gegebene Morphogendosis in allen Fällen zwischen 2-20 µg Protein pro Kilogramm Gewicht des Patienten.

[0079] Wenn das Morphogen zur Stimulierung der Axon-Regeneration einem Ort bereitgestellt werden soll, wird das Morphogen vorzugsweise dem Ort in Verbindung mit einem biokompatiblen, vorzugsweise bioresorbierbaren Träger verabreicht, der zur Aufrechterhaltung des Proteins an einer Stelle in vivo geeignet ist und durch den ein Nervenfortsatz regeneriert werden kann. Ein gegenwärtig bevorzugter Träger umfasst ebenfalls eine ausreichende Struktur, um die Ausrichtung des axonalen Wachstums zu unterstützen. Gegenwärtig schließen bevorzugte Träger Strukturmoleküle wie beispielsweise Collagen, Hyaluronsäure oder Laminin ein und/oder synthetische Polymere von beispielsweise Polymilchsäure, Polyglykolsäure oder Polybuttersäure. Gegenwärtig am meisten bevorzugt sind Träger, die extrazelluläre Gewebsmatrix umfassen. Diese können im Handel bezogen werden. Zusätzlich kann eine Gehirngewebs-abgeleitete extrazelluläre Matrix wie in der internationalen Anmeldung US 92/01968 (WO 92/15323) beschrieben hergestellt werden, und/oder durch andere Mittel, die in der Technik bekannt sind.

[0080] Die gegenwärtig bevorzugten Mittel zur Heilung von Brüchen in Nervenbahnen, insbesondere Bahnen des peripheren Nervensystems schließen die Bereitstellung des Morphogens an den Ort als Teil einer Vorrichtung bereit, die eine biokompatible Membran oder ein Gehäuse einer Dimension einschließt, die ausreichend

ist, um den Bruch zu überspannen und mit Öffnungen, die zur Aufnahme abgetrennter Nervenenden angepasst sind. Das Morphogen wird im Gehäuse angeordnet, vorzugsweise in einem geeigneten Träger dispergiert und ist für die abgetrennten Nervenenden zugänglich. Alternativ kann das Morphogen auf die Innenoberfläche des Gehäuses adsorbiert oder in anderer Weise mit dieser verbunden werden. Zusätzlich weisen gegenwärtig bevorzugte Gehäuse eine impermeable Außenoberfläche auf. Das Gehäuse dient als Nervenführungskanal, der die Ausrichtung des Axon-Wachstums unterstützt. Zusätzlich schützt das Gehäuse ebenfalls den geschädigten Nerv vor immun-bezogenen bzw. mit der Immunologie bzw. dem Immunsystem in Verbindung stehenden Mitteln, die eine Narbengewebsbildung fördern können. Geeignete Kanal- oder Gehäusematerialien schließen Silikon oder bioresorbierbare Materialien, wie beispielsweise Collagen, Hyaluronsäure, Laminin, Polymilchsäure, Polyglykolsäure, Polybuttersäure und dergleichen ein. Zusätzlich sollte es für den Fachmann auf dem Gebiet klar sein, dass, obwohl die Nervenführungskanäle, die hierin beschrieben sind, im allgemeinen rohrförmig sind, alternative Formen verwendet werden können. Das Lumen der Führungskanäle kann beispielsweise oval sein oder kann sogar quadratischen Querschnitt aufweisen. Überdies können die Führungskanäle aus zwei oder mehr Teilen zusammengesetzt sein, die zusammengeklemmt sind, um die Nervenstumpen zu befestigen. Die Nervenenden können an die Nervenführungskanäle mittels Nähten, biokompatiblen Klebstoffen wie beispielsweise Fibrin-Klebstoff oder anderen in der medizinischen Technik bekannten Mitteln befestigt werden.

II.1 Lösliche Morphogen-Komplexe

[0081] Zu Erläuterungszwecken ist eine Form des Morphogens, die in therapeutischen Zubereitungen von Nutzen ist, die eine verbesserte Löslichkeit in wässrigen Lösungen aufweist und im wesentlichen aus Aminosäuren besteht, ein dimeres morphogenetisches Protein, das zumindest die 100 Aminosäurepeptidsequenz aufweist, die das Muster von Sieben- oder mehr Cystein-Resten aufweist, die für die Morphogen-Familie, die mit einem Peptid komplexiert ist, das einen Teil oder die gesamte Pro-Region eines Mitglieds der Morphogen-Familie umfasst, charakteristisch ist, oder für eine Allel-Spezies oder eine andere Sequenzvariante hiervon. Vorzugsweise wird das dimere morphogenetische Protein mit zwei Peptiden komplexiert. Ebenfalls ist das dimere morphogenetische Protein vorzugsweise mit dem Pro-Region-Peptid oder -Peptiden nicht covalent komplexiert. Die Pro-Region-Peptide umfassen ebenfalls vorzugsweise zumindest die N-terminalen achtzehn Aminosäuren, die eine vorgegebene Morphogen-Pro-Region definieren. In einer am meisten bevorzugten Ausführungsform werden Peptide, die im wesentlichen die Pro-Region in voller Länge definieren, verwendet.

[0082] Weitere lösliche Formen von Morphogenen schließen Dimere der ungespaltenen Pro-Formen dieser Proteine ebenso wie „Hemi-Dimere" ein, bei denen eine Untereinheit des Dimeres eine ungespaltene Pro-Form des Proteins ist und die andere Untereinheit die reife Form des Proteins umfasst, einschließlich trunkierter Formen hiervon, vorzugsweise nicht kovalent mit einem gespaltenen Pro-Domän-Peptid verbunden.

[0083] Zu Erläuterungszwecken schließen, wie oben beschrieben, nützliche Pro-Domänen die Pro-Regionen in voller Länge, ebenso wie verschiedene trunkierte Formen hiervon ein, insbesondere frankierte Formen, die an den proteolytischen Arg-Xaa-Xaa-Arg Spaltstellen gespalten sind. Beispielsweise schließen in OP-1 mögliche Pro-Sequenzen Sequenzen ein, wie sie durch die Reste 30-292 (volle Länge-Form); 48-292; und 158-292 definiert sind. Die Stabilität löslicher OP-1-Komplexe wird verbessert, wenn die Pro-Region die volle Länge-Form umfasst, eher als eine trunkierte Form, wie beispielsweise die trunkierte Form 48-292, insofern, als die Reste 30-47 eine Sequenzhomologie mit den N-terminalen Anteilen anderer Morphogene zeigen und es wird angenommen, dass diese bei der Verbesserung der Komplex-Stabilität für alle Morphogene eine besondere Nützlichkeit aufweisen. Demgemäß sind gegenwärtig bevorzugte Pro-Sequenzen solche, die die Pro-Region für ein gegebenes Morphogen in voller Länge kodieren. Weitere Pro-Sequenzen, von denen angenommen wird, dass sie Nützlichkeit aufweisen, schließen biosynthetische Pro-Sequenzen ein, insbesondere solche, die eine vom N-terminalen Anteil einer oder mehrerer Morphogen-Pro-Sequenzen abgeleitete Sequenz beinhalten.

[0084] Wie der Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet erkennen wird, können nützliche Sequenzen, die die Pro-Region kodieren, aus genetischen Sequenzen gewonnen werden, die bekannte Morphogene kodieren. Alternativ können chimäre Pro-Regionen aus den Sequenzen einer oder mehrerer bekannter Morphogene konstruiert werden. Eine noch weitere Option besteht darin, eine synthetische Sequenzvariante einer oder mehrerer bekannter Pro-Region-Sequenzen zu erzeugen.

[0085] Nützliche Pro-Region-Peptide schließen Polypeptidketten ein, die eine Aminosäuresequenz umfassen, die durch eine Nukleinsäure kodiert ist, die unter stringenten Bedingungen mit einer DNA oder RNA-Sequenz hybridisiert, die zumindest die N-terminalen achtzehn Aminosäuren der Pro-Region-Sequenz für OP-1

oder OP-2 kodiert, beispielsweise die Nukleotide 136-192 und 152-211 von Sequenz ID NO: 16 bzw. 20.

A. Isolierung eines löslichen Morphogenkomplexes aus konditionierten Medien oder Körperflüssigkeit

[0086] Morphogene werden aus Säugetierzellen als lösliche Komplexe exprimiert. Typischerweise wird der Komplex jedoch während der Aufreinigung disassoziiert, im allgemeinen durch Exposition gegenüber denaturierenden Stoffen, die oftmals den Reinigungslösungen zugesetzt werden, wie beispielsweise Tenside, Alkohole, organische Lösungsmittel, chaotrope Mittel und Verbindungen, die zum Reduzieren des pH's der Lösung zugesetzt werden. Unten bereitgestellt ist eine gegenwärtig bevorzugte Vorschrift zur Aufreinigung der löslichen Proteine aus konditionierten Medien (oder wahlweise einer Körperflüssigkeit wie beispielsweise Serum, cerebrospinaler oder peritonealer Flüssigkeit) unter nicht denaturierenden Bedingungen. Das Verfahren ist rasch, reproduzierbar und ergibt isolierte lösliche Morphogen-Komplexe in einer im wesentlichen reinen Form.

[0087] Lösliche Morpogen-Komplexe können aus konditionierten Medien unter Verwendung einer einfachen, dreischrittigen Chromatographievorschrift isoliert werden, die in Abwesenheit von denaturierenden Stoffen durchgeführt wird. Die Vorschrift schließt ein Laufen lassen der Medien (oder der Körperflüssigkeit) über eine Affinitätssäule, gefolgt von Ionenaustausch- und Gelfiltrations-Chromatographien ein. Die Affinitätssäule, die unten beschrieben ist, ist eine Zn-IMAC-Säule. Die vorliegende Vorschrift weist eine allgemeine Anwendbarkeit auf die Aufreinigung einer Vielzahl von Morphogenen auf, von denen angenommen wird, dass sie unter Verwendung nur geringer Modifikationen der Vorschrift, die unten beschrieben ist, isolierbar sind. Eine alternative Vorschrift, von der ebenfalls angenommen wird, dass sie Nützlichkeit aufweist, ist eine Immunaffinitätssäule, die unter Verwendung von Standardverfahren erzeugt wird und beispielsweise unter Verwendung eines Antikörpers, der für eine vorgegebene Morphogen-Pro-Domäne spezifisch ist (komplexiert beispielsweise an eine Protein A-konjugierte Sepharose-Säule). Vorschriften zur Entwicklung von Immunaffmitätssäulen sind in der Technik wohl beschrieben (siehe beispielsweise Guide to Protein Purification, M. Deutscher, Hrsg., Academic Press, San Diego, 1990, insbesondere Abschnitte VII und XI).

[0088] In diesem Experiment wurde OP-1 in Säugetier CHO (Chinese Hamster Ovary) Zellen wie in der Technik beschrieben exprimiert (siehe beispielsweise die internationale Anmeldung US 90/05903 (WO 91/05802)). Die CHO Zell-konditionierten Medien, die 0,5% FBS enthalten, wurden anfänglich unter Verwendung einer immobilisierten Metallionenaffinitäts-Chromatographie (IMAC) aufgereinigt. Der lösliche OP-I Komplex aus konditionierten Medien bindet sehr selektiv an das Zn-IMAC-Harz und eine hohe Konzentration an Imidazol (50 mM Imidazol, pH 8,0) ist für die effektive Elution des gebundenen Komplexes erforderlich. Der Zn-IMAC-Schritt trennt das lösliche OP-1 von der Masse der kontaminierenden Serum-Proteine, die im Durchfluss eluieren und 35 mM Imidazol Waschfraktionen. Das Zn-IMAC gereinigte lösliche OP-1 wird als nächstes auf eine S-Sepharose Kationenaustauschsäule aufgebracht, die in 20 mM $NaPO_4$ (pH 7,0) mit 50 mM NaCl äquilibrert wird. Dieser S-Sepharose-Schritt dient dazu, den löslichen OP-1 Komplex bei der Herstellung für den folgenden Gelfiltrationsschritt aufzureinigen und zu konzentrieren. Das Protein wurde auf eine Sephacryl-S-200HR-Säule aufgebracht, die in TBS äquilibriert wurde. Unter Verwendung des im wesentlichen selben Protokolls können lösliche Morphogene ebenfalls aus einer oder mehreren Körperflüssigkeiten, einschließlich Serum, cerebrospinaler Flüssigkeit oder peritonealer Flüssigkeit isoliert werden.

[0089] Eine IMAC wurde unter Verwendung Komplex-bildender Sepharose (Pharmacia) durchgeführt, die mit drei Säulenvolumina 0,2 $ZnSO_4$ beschickt wurde. Die konditionierten Medien wurden bis auf einen pH von 7,0 titriert und direkt auf das Zn-IMAC Harz aufgebracht, das in 20 mM HEPES (pH 7,0) mit 500 mM NaCl äquilibriert wurde. Das Zn-IMAC-Harz wurde mit 80 ml konditionierten Startmedien pro ml Harz befüllt. Nach dem Beschicken wurde die Säule mit Äquilibrationspuffer gewaschen und die meisten der kontaminierenden Proteine wurden mit 35 mM Imidazol (pH 7,0) in Äquilibrationspuffer eluiert. Der lösliche OP-1-Komplex wird dann mit 50 mM Imidazol (pH 8,0) in 20 mM HEPES und 500 mM NaCl eluiert.

[0090] Das 50 mM Imidazol-Eluat, das den löslichen OP-1-Komplex enthielt, wurde mit 9 Volumina 20 mM $NaPO_4$ (PH 7,0) verdünnt und auf eine S-Sepharose (Pharmacia) Säule aufgebracht, die in 20 mM $NaPO_4$ (pH 7,0) mit 50 mM NaCl äquilibriert wurde. Das S-Sepharose-Harz wurde mit einem Äquivalent von 800 ml konditionierten Startmedien pro ml Harz befüllt. Nach Befüllen wurde die S-Sepharose-Säule mit Äquilibrationspuffer gewaschen und mit 100 NaCl gefolgt von 300 mM und 500 mM NaCl in 20 mM $NaPO_4$ (pH 7,0) eluiert. Der 300 mM NaCl Pool wurde weiterhin unter Verwendung einer Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt. 50 ml des 300 mM NaCl Eluats wurden auf eine 5,0 × 90 cm Sephacryl S-200HR (Pharmacia) Säule aufgebracht, in Tris-gepufferter Salzlösung (TBS), 50 mM Tris, 150 mM NaCl (pH 7,4), äquilibriert. Die Säule wurde in einer Durchflussgeschwindigkeit von 5 ml/min unter Sammeln von 10 ml Fraktionen eluiert. Das scheinbare Molekulargewicht des löslichen OP-1 wurde durch Vergleich mit Proteinmolekulargewichtsstandards (Alkohol-

dehydrogenase (ADH, 150 kDa), Rinderserumalbumin (BSA, 68 kDa), Carboanhydrase (CA, 30 kDa) und Cytochrom C (cyt C, 12,5 kDa) bestimmt. Die Reinheit der S-200 Säulenfraktionen wurde durch Auftrennung auf Standard 15% Polyacrylamid SDS Gels bestimmt, die mit Coomassie-Blau angefärbt wurden. Die Identität des reifen OP-1 und der Pro-Domäne wurde durch N-terminale Sequenzanalyse nach Auftrennung des reifen OP-1 von der Pro-Domäne unter Verwendung einer Standardumkehrphasen C18 HPLC bestimmt.

[0091] Der lösliche OP-1 Komplex eluiert mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 110 kDa. Dies stimmt gut mit der vorhergesagten Zusammensetzung des löslichen OP-1-Komplexes mit einem reifen OP-1-Dimer (35-36 kDa), verbunden mit zwei Pro-Domänen (39 kDa jeweils) überein. Die Reinheit des Endkomplexes kann durch Laufenlassen der geeigneten Fraktion in einem reduzierten 15% Polyacrylamidgel verifiziert werden.

[0092] Die Komplexbestandteile können durch Laufen lassen der Komplex enthaltenden Fraktion aus den S-200 oder S-200HR Säulen über eine Umkehrphasen C18 HPLC Säule und Eluieren in einem Acetonitrilgradienten (in 0,1 % TFA) unter Verwendung von Standardverfahren verifiziert werden. Der Komplex wird durch diesen Schritt dissoziiert und die Pro-Domäne und die reife Spezies eluieren als getrennte Spezies. Diese getrennten Spezies können dann unter Verwendung von Standardverfahren einem N-terminalen Sequenzieren unterworfen werden (siehe beispielsweise Guide to Protein Purification, M. Deutscher Hrsg., Academic Press, San Diego, 1990, insbesondere Seiten 602-613) und die Identität der isolierten 36 kD, 39 kDA Proteine als reifes Morphogen kann bestätigt und diese können jeweils isoliert und die Pro-Domäne abgespalten werden. Eine N-terminale Sequenzierung der isolierten Pro-Domäne aus Säugetierzellerzeugtem OP-1 zeigt zwei Formen der Pro-Region, die intakte Form (beginnend bei Rest 30 von Sequenz ID NO: 16) und eine trunkierte bzw. verkürzte Form (beginnend bei Rest 48 von Sequenz ID NO: 16). Eine N-terminale Sequenzierung der Polypeptiduntereinheit der isolierten reifen Spezies zeigt einen Bereich von N-Termini für die reife Sequenz beginnend bei den Resten 293, 300, 313, 315, 316 und 318 von Sequenz ID NO: 16, von denen alle aktiv waren, wie durch den Standardknocheninduktionsassay gezeigt wurde.

B. In vitro lösliche Morphogen-Komplexbildung

[0093] Als Alternative zur Aufreinigung löslicher Komplexe aus Kulturmedien oder einer Körperflüssigkeit können lösliche Komplexe aus gereinigten Pro-Domänen und reifen dimeren Spezies formuliert werden. Eine erfolgreiche Komplexbildung erfordert anscheinend die Bindung der Bestandteile unter denaturierenden Bedingungen die ausreichend sind, um die gefaltene Struktur dieser Moleküle zu entspannen, ohne Disulfidbrücken zu beeinträchtigen. Vorzugsweise ahmen die Denaturierungsbedingungen die Umgebung eines intrazellulären Vesikels so ausreichend nach, dass die abgespaltene Pro-Domäne die Gelegenheit hat, sich mit der reifen dimeren Spezies unter entspannten Faltungsbedingungen zu verbinden. Die Konzentration von Denaturierungsmitteln in der Lösung wird dann in einer kontrollierten, vorzugsweise schrittweisen Art gesenkt, um eine richtige Faltung des Dimers und der Pro-Regionen zu ermöglichen, während die Bindung der Pro-Domäne mit dem Dimer aufrecht erhalten wird. Nützliche Denaturierungsmittel schließen 4-6M Urea oder Guanidinhydrochlorid (GuHCl) in gepufferten Lösungen von pH 4-10, vorzugsweise pH 6-8, ein. Der lösliche Komplex wird dann durch kontrollierte Dialyse oder Verdünnung in einer Lösung gebildet, die eine Entdenaturierungsmittelkonzentration von weniger als 0,1-2M Urea oder GuHCl, vorzugsweise 1-2M Urea oder GuHCl aufweist, die dann vorzugsweise zu einem physiologischen Puffer verdünnt werden kann. Proteinaufreinigungs/Denaturierungsverfahren und Erwägungen sind in der Technik wohl beschrieben und Details bzgl. der Entwicklung einer geeigneten Renaturierungsvorschrift können in einfacher Weise durch den Fachmann auf dem Gebiet bestimmt werden. Ein nützlicher Text bzgl. dieses Gegenstandes ist Guide to Protein Purification, M. Deutscher, Hrsg., Academic Press, San Diego, 1990, insbesondere Abschnitt V. Die Komplexbildung kann ebenfalls durch Zusatz einer oder mehrerer Chaperon-Proteine unterstützt werden.

C. Stabilität löslicher Morphogenkomplexe

[0094] Die Stabilität des hochgereinigten löslichen Morphogen-Komplexes in einem physiologischen Puffer, beispielsweise Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) und Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) kann durch mehrere Mittel gesteigert werden. Gegenwärtig bevorzugt mittels einer Pro-Region, die zumindest die ersten 18 Aminosäuren der Pro-Sequenz umfasst (beispielsweise Reste 30-47 von Sequenz ID NO: 16 für OP-1) und ist vorzugsweise die Pro-Region in voller Länge. Die Reste 30-47 zeigen eine Sequenzhomologie am N-terminalen Anteil anderer Morphogene und es wird angenommen, dass sie zur Steigerung der Komplexstabilität aller Morphogene eine besondere Nützlichkeit aufweisen. Weitere nützliche Mittel zur Steigerung der Stabilität löslicher Morphogenkomplexe schließen drei Klassen von Zusatzstoffen ein. Diese Zusatzstoffe schließen basische Aminosäuren (beispielsweise L-Arginin, Lysin und Betain); nichtionische Tenside (beispielsweise Tween 80 oder Nonidet P-120); und Trägerproteine (beispielsweise Serumalbumin und Kasein) ein. Nützliche

Konzentrationen dieser Additive schließen 1-100 mM, vorzugsweise 10-70 mM, einschließlich 50 mM basischer Aminosäure; 0,01-1,0%, vorzugsweise 0,05-0,2%, einschließlich 0,1% (v/v) nicht-ionisches Detergenz; und 0,01-1,0%, vorzugsweise 0,05-0,2%, einschließlich 0,1% (g/v) Trägerprotein ein.

III. Beispiele

Beispiel 1. Identifizierung von Morphogen-exprimierendem Gewebe (Bezugs-Beispiel)

[0095] Die Bestimmung der Gewebsverteilung von Morphogenen kann dazu verwendet werden, unterschiedliche Morphogene zu identifizieren, die in einem vorgegebenen Gewebe exprimiert werden, ebenso wie neue, verwandte Morphogene zu identifizieren. Die Gewebsverteilung kann ebenfalls dazu verwendet werden, nützliches Morphogen-produzierendes Gewebe zur Verwendung beim Screenen und Identifizieren von Morphogen-stimulierenden Kandidaten-Mitteln zu identifizieren. Die Morphogene (oder ihre mRNA-Transkripte) können in einfacher Weise in unterschiedlichen Geweben unter Standardmethodologien und unter geringen Modifikationen hiervon in Geweben, in denen die Expression niedrig sein kann, identifiziert werden. Beispielsweise kann die Proteinverteilung unter Verwendung einer Standard-Western-Blot-Analyse oder Immunfluoreszenz-Technik und unter Verwendung von Antikörpern, die für das Morphogen oder die Morphogene von Interesse spezifisch sind, bestimmt werden. In ähnlicher Weise kann die Verteilung von Morphogen-Transkripten unter Verwendung von Standard-Northern-Hybridisierungsvorschriften und Transkript-spezifischen Sonden bestimmt werden.

[0096] Jede Sonde, die zur spezifischen Hybridisierung an ein Transkript in der Lage ist und die zum Unterscheiden des Transkripts von Interesse von anderen verwandten Transkripten in der Lage ist, kann verwendet werden. Weil die hierin beschriebenen Morphogene eine solch hohe Sequenzhomologie in ihrem aktiven C-terminalen Domänen teilen, kann die Gewebsverteilung eines speziellen Morphogen-Transkriptes am besten unter Verwendung einer Sonde bestimmt werden, die für die Pro-Region des unreifen Proteins spezifisch ist und/oder für den N-terminalen Bereich des reifen Proteins. Eine weitere nützliche Sequenz ist die 3' nicht-kodierende Region, die das Stop-Codon flankiert und diesem unmittelbar folgt. Diese Anteile der Sequenz variieren zwischen den Morphogenen dieser Erfindung beträchtlich und demgemäß sind sie für jedes Protein spezifisch. Beispielsweise ist eine besonders nützliche Vgr-1-spezifische Sonden-Sequenz das PvuII-SacI-Fragment, ein 265 bp Fragment, das sowohl einen Teil der nicht translatierten Pro-Region und den N-Terminus der reifen Sequenz kodiert (siehe Lyons et al. (1989) PNAS 86:4554-4558 für eine Beschreibung der cDNA-Sequenz). In ähnlicher Weise sind besonders nützliche mOP-1 spezifische Sonden-Sequenzen das BstX1-BglI-Fragment, eine 0,68 Kb-Sequenz, die ungefähr zwei Drittel der mOP-1 Pro-Region abdeckt; ein StuI-StuI Fragment, eine 0,2 Kb Sequenz unmittelbar stromaufwärts der Sieben-Cystein-Domäne; und das EarI-PstI Fragment, ein 0,3 Kb Fragment, das einen Teil der 3' nicht translatierten Sequenz enthält (siehe Sequenz ID NO: 18, wobei die Pro-Region im wesentlichen durch die Reste 30-291 definiert ist). Ähnliche Ansätze können beispielsweise bei hOP-1 (Sequenz ID NO: 16) oder humanem oder Maus OP-2 (Sequenz ID NO: 20 und 22) verwendet werden.

[0097] Unter Verwendung dieser Morphogen-spezifischen Sonden, die gentechnisch synthetisch hergestellt oder aus geklonten Sequenzen gewonnen werden können, können Morphogen-Transkripte in Säugetiergewebe unter Standardmethodologien identifiziert werden, die dem Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet wohl bekannt sind. Kurz gesagt wird gesamt RNA aus verschiedenen adulten murinen Geweben (beispielsweise Leber, Nieren, Testis, Herz, Gehirn, Thymus und Magen) durch eine Standardmethodik hergestellt, wie beispielsweise durch das Verfahren von Chomczyaski et al. ((1987) Anal. Biochem 162: 156-159), das unten beschrieben ist. Poly(A)+RNA wird unter Verwendung einer Oligo(dT)-Zellulosechromatographie hergestellt (beispielsweise Typ 7 von Pharmacia LKB Biotechnology, Inc.). Poly(A)+RNA (im allgemeinen 15 µg) aus jedem Gewebe wird auf einem 1% Agarose/Formaldehydgel fraktioniert und auf eine Nytranmembran übertragen (Schleicher % Schuell). Im Anschluß an den Transfer wird die Membran bei 80°C gebacken und die RNA unter UV-Licht vernetzt (im allgemeinen 30 Sekunden bei 1 mW/cm^2). Vor der Hybridisierung wird die geeignete Sonde durch Erhitzen denaturiert. Die Hybridisierung wird in einem Lucite-Zylinder, der sich in einem Rollflaschenapparat bei ungefähr 1 Umdrehung/Minute dreht, für ungefähr 15 Stunden bei 37°C unter Verwendung eines Hybridisierungsgemisches aus 40% Formamid, 5 × Denhards, 5 × SSPE und 0,1% SDS durchgeführt. Im Anschluß an die Hybridisierung werden unspezifische Zähler von den Filtern in 0,1 × SSPE, 0,1% SDS bei 50°C abgewaschen.

[0098] Beispiele, die die Gewebsverteilung verschiedener Morphogene zeigen, einschließlich Vgr-1, OP-1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, GDF-1 und OP-2 in sich entwickelnden und adultem Gewebe sind in der internationalen Anmeldung US 92/01968 (WO 92/15323) und in Ozkaynak et al. (1991) Biochem. Biophys. Res.

Comm. 179: 116-123 und Ozkaynak et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 25220-25227 offenbart. Unter Verwendung der hierin beschriebenen allgemeinen Sondierungsmethodik zeigen Northern Blot Hybridisierungen unter Verwendung von Sonden, die für diese Morphogene spezifisch sind, zur Sondierung von Gehirn, Milz, Lunge, Herz, Leber und Nierengewebe, dass Nieren verwandtes Gewebe die primäre Expressionsquelle für OP-1 zu sein scheint, wobei Gehirn-, Herz- und Lungengewebe sekundäre Quellen sind. Lungengewebe scheint die primäre Gewebsexpressionsquelle für Vgr-1, BMP5, BMP4 und BMP3 zu sein. Niedrigere Konzentrationen von Vgr-1 sind ebenfalls in den Nieren- und Herzgewebe ersichtlich, wohingegen die Leber wie in den Nieren- und Herzgewebe zu sein scheint, wohingegen die Leber eine sekundäre Expressionsquelle für BMP5 zu sein scheint und die Milz eine sekundäre Expressionsquelle für BMP4 zu sein scheint. GDF-1 scheint in erster Linie im Gehirngewebe exprimiert zu werden. Bis jetzt scheint OP-2 in erster Linie in frühem embryonalem Gewebe exprimiert zu werden. Insbesondere zeigen Northern Blots muriner Embryos und 6-Tage postnatale Tiere reichliche OP-2 Expressionen in 8-Tage alten Embryonen. Die Expression wird signifikant in 7-Tage alten Embryonen reduziert und wird in post-natalen Tieren nicht mehr nachgewiesen.

Beispiel 2. Morphogen-Lokalisierung im Nervensystem Bezugs-Beispiel)

[0099] Morphogene wurden im sich entwickelnden und adulten Rattengehirn und Rückenmarksgewebe identifiziert, wie beides durch Northern Blot Hybridisierung Morphogen-spezifischer Sonden an mRNA Extrakte aus sich entwickelndem und adultem Nervengewebe (siehe Beispiel 1 oben) und durch Immunlokalisierungsstudien bestimmt wurde. Beispielsweise identifizierte eine Northern Blot Analyse von sich entwickelndem Rattengewebe eine signifikante OP-1 mRNA Transkriptexpression im ZNS, siehe internationale Anmeldung US 92/01968 (WO 92/15323) und Ozkaynak et al. (1991) Biochem. Biophys. Res. Comm.179: 11623 und Ozkaynak et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 25220-25227. GDF-1 mRNA scheint in erster Linie im sich entwickelnden und adulten Nervengewebe, insbesondere im Gehirn exprimiert zu werden, einschließlich dem Cerebellum und Gehirnstamm, Rückenmark und der peripheren Nerven (Lee, S. (1991) PNAS 88: 4250-4254). Es wurde ebenfalls berichtet, dass BMP2B (in der Technik ebenfalls als BMP4 bezeichnet) und Vgr-1 Transkripte in Nervengewebe exprimiert werden (Jones et al. (1991) Development 111: 531-542), obwohl das Nervengewebe nicht das primäre Expressionsgewebe für diese Gene zu sein scheint (Ozkaynak et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 25220-25227). Es wurde insbesondere berichtet, dass CBMP2 Transkripte im Bereich des Diencephalon mit der Hypophysen-Entwicklung in Verbindung steht und es wurde berichtet, dass Vgr-1-Transkripte in der anterioposterioren Achse des ZNS, einschließlich der Deckplatte des sich entwickelnden Neuralrohrs ebenso wie in den Zellen, die unmittelbar der Bodenplatte des sich entwickelnden Neuralrohrs benachbart sind, vorliegen. Es wird berichtet, dass in älteren Ratten Vgr-1 Transkripte im sich entwickelnden Hippocampus-Gewebe vorliegen. Zusätzlich wurden die Gene, die OP-1 und BMP2 kodieren, unsprünglich durch Sondieren von humanen Hippocampus-cDNA-Bibliotheken identifiziert.

[0100] Immunlokalisierungsstudien, die unter Verwendung von in der Technik bekannten Standardmethodologien durchgeführt wurden und die in der internationalen Anmeldung US 92/01968 (WO 92/15323) offenbart sind, lokalisierten die OP-1 Expression auf bestimmte Gegenden des sich entwickelnden und adulten Rattengehirns und Rückenmarks. Insbesondere wurde eine OP-1 Proteinexpression in adulten (2-3 Monate alten) und fünf oder sechs Tage alten Mausembryonervengewebe unter Verwendung von Morphogen-spezifischen Standardantisera festgestellt, insbesondere unter Verwendung von Kaninchen-anti-OP-1 Antiseren, die unter Verwendung von Standardantikörpervorschriften hergestellt wurden, die in der Technik bekannt sind und die vorzugsweise auf einer OP-1-Affinitätssäule aufgereinigt wurden. Der Antikörper selbst wurde unter Verwendung von Standardfluoreszenzmarkierungstechniken markiert oder es wurde ein markiertes anti-Kaninchen IgG-Molekül dazu verwendet, gebundenen OP-1 Antikörper zu visualisieren.

[0101] Eine Immunfluoreszenzfärbung zeigt das Vorhandensein von OP-1 im Zentralnervensystem von adulten Ratten (ZNS). Eine ähnliche und umfassende Färbung ist sowohl im Gehirn (**Fig. 1A**) als auch Rückenmark (**Fig. 1B**) ersichtlich. OP-1 scheint in erster Linie in der extrazellulären Matrix der grauen Substanz (neuronale Zellkörper) lokalisiert zu sein, unterschiedlich vorhanden in allen Gegenden außer den Zellkörpern selbst. Die weiße Substanz, die in erster Linie aus myelinisierten Nervenfasern gebildet ist, scheint die Färbung auf die Astrocyten (Glia-Zellen) begrenzt zu sein. Ein ähnliches Färbungsmuster war ebenfalls in Gehirnschnitten von neugeborenen Ratten (10 Tage alt) ersichtlich.

[0102] Zusätzlich wurde OP-1 speziell in der Substanzia Nigra lokalisiert, die in erster Linie aus Striatum-Basal-Ganglien zusammengesetzt ist, ein System accessorischer Motorneurons, dessen Funktion die Verbindung mit der Hirnrinde und dem corticospinalen System ist. Dysfunktionen in dieser Subpopulation oder System von Neuronen sind mit mehreren Neuropathien, einschließlich Chorea Huntington und Parkinson Krankheit verbunden.

[0103] OP-1 wurde ebenfalls in Adendema-Glia-Zellen lokalisiert, von denen bekannt ist, dass sie Faktoren in die cerebrospinale Flüssigkeit sezernieren und die um das intraventriculäre Ventil herum, die Fissura Coroidea und den Zentralkanal des Gehirns sowohl in der sich entwickelnden als auch adulten Ratte auftreten.

[0104] Schließlich hemmt die Morphogen-Hemmung in sich entwickelnden Embryos die Entwicklung von Nervengewebe. Insbesondere wurden 9-Tage alte Mausembryozellen, die in vitro unter Standardkultivierungsbedingungen kultiviert wurden, in Gegenwart und Abwesenheit eines OP-1 spezifischen monoclonalen Antikörpers inkubiert, der unter Verwendung von rekombinant erzeugtem, gereinigtem reifen OP-1 und dem Immunogen hergestellt wurde. Der Antikörper wurde unter Verwendung von Antikörperstandardproduktionsmitteln hergestellt, die in der Technik wohl bekannt sind und wie sie im allgemeinen in Beispiel 13 beschrieben sind. Nach zwei Tagen wurde die Wirkung des Antikörpers auf den sich entwickelnden Embryo durch Histologie ausgewertet. Wie durch histologische Überprüfung bestimmt, hemmt der OP-1 spezifische Antikörper insbesondere die Augen-Lappenbildung im sich entwickelnden Embryo. Insbesondere entwickelt sich der Diencephalon-Auswuchs nicht. Zusätzlich ist das Herz mißgebildet. Überdies lokalisiert sich der OP-1 spezifische Antikörper in getrennten Immunolokalisierungsstudien bzgl. Embryo-Schnitten mit markiertem OP-1 spezifischem Antikörper auf das neurale Epithel.

[0105] Die endogenen Morphogene, die auf Nervenzellen einwirken, können durch Nervengewebszellen exprimiert und sezerniert werden, beispielsweise durch Neuronen und/oder Glia-Zellen, die mit den Neuronen verbunden sind und/oder sie können zu den Neuronen durch die cerebrospinale Flüssigkeit und/oder den Blutstrom transportiert werden. Kürzlich wurde OP-1 in menschlichem Blut identifiziert (siehe Beispiel 9 unten). Zusätzlich wurde kürzlich gezeigt, dass transplantierte Schwann-Zellen die Nervenfaserbildung in Rattenrückenmark stimulieren, einschießlich der Induktion einer Vaskularisierung und Myelin-Scheidenbildung, um zumindest einige der neuen Nervenfortsätze herum (Bunge (1991) Exp. Neurology 114: 254-257). Die regenerative Eigenschaft dieser Zellen kann durch die Sekretion eines Morphogens durch die Schwann-Zellen vermittelt werden.

Beispiel 3. Verbesserung des Nervenzellüberlebens durch Morphogen

[0106] Die hierin beschriebenen Morphogene verbessern das Zellüberleben insbesondere von Nervenzellen, die einem Absterberisiko unterliegen. Beispielsweise werden voll differenzierte Neurone nicht mitotisch und sterben in vitro, wenn sie unter Standardsäugetierkulturbedingungen kultiviert werden, unter Verwendung eines chemisch definierten und Serum-armen Mediums, das in der Technik bekannt ist (siehe beispielsweise Charness (1986) J. Biol. Chem. 26: 3164-3169 und Freese et al. (1990) Brain Res. 521: 254-264). Wenn jedoch eine Primärkultur aus nicht mitotischen Nervenzellen mit einem Morphogen behandelt wird, wird das Überleben dieser Zellen signifikant verbessert. Beispielsweise wurde eine Primärkultur aus Striatum-Basal-Ganglien, isoliert aus der Substantia Nigra von adultem Rattengehirn unter Verwendung von Standardverfahren hergestellt, beispielsweise durch Dissoziation durch Verreiben mit einer Pasteur-Pipette von Substantia Nigra Gewebe unter Verwendung von Standardgewebskultivierungsvorschriften und wurden in einem Serum-armen Medium gezüchtet, das beispielsweise 50% DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), 50% F-12 Medium, hitzeinaktiviertes Pferdeserum ergänzt mit Penicillin/Streptomycin und 4 g/l Glukose erzielt. Unter Standardkulturbedingungen machen diese Zellen bei drei Wochen einen signifikanten Zelltod durch, wenn sie in einem Serumfreien Medium kultiviert werden. Der Zelltod wird morphologisch durch die Unfähigkeit der Zellen anhaftend zu bleiben und durch Veränderungen in ihren ultrastrukturellen Eigenschaften bewiesen, beispielsweise durch Chromatin-Verklumpung und Organellen-Disintegration.

[0107] In diesem Beispiel wurden die kultivierten Basal-Ganglien mit chemisch definiertem Medium behandelt, konditioniert mit 0,1-100 ng/ml OP-1. Frisches, Morphogen-konditioniertes Medium wurde den Zellen alle 3-4 Tage verabreicht. Das Zellüberleben wurde signifikant verbessert und war von der zugesetzten OP-1 Konzentration abhängig: der Zelltod nahm signifikant ab, wenn die Konzentration an OP-1 in den Zellkulturen zunahm. Insbesondere blieben die Zellen anhaftend und fuhren fort, die Morphologie lebensfähiger differenzierter Neuronen aufrecht zu erhalten. Bei Fehlen einer Morphogen-Behandlung dissoziierte die Mehrzahl der kultivierten Zellen und machte eine Zellnekrose durch.

[0108] Dysfunktionen in den Basal-Ganglien der Substantia Nigra sind mit Parkinsonismus in vivo assoziiert. Die Fähigkeit der Morphogene, die hierin definiert sind, das Überleben von Neuronen zu verbessern zeigt, dass diese Morphogene als Teil einer Therapie zur Verbesserung des Überlebens von Nervenzellen, die einem Absterberisiko in vivo unterliegen nützlich ist, das beispielsweise auf eine Neuropathie oder ein chemisches oder mechanisches Trauma zurückzuführen ist. Es wird insbesondere vorweggenommen, dass diese Morphogene ein nützliches therapeutisches Mittel zur Behandlung von Neuropathien bereitstellen werden, die die Striatum

Basal-Ganglien beeinträchtigen, einschließlich der Parkinson Krankheit. Für klinische Anwendungen kann das Morphogen verabreicht werden.

Beispiel 4. Morphogen-induzierte Redifferenzierung transformierter Zellen (Bezugs-Beispiel

[0109] Die hierin beschriebenen Morphogene induzieren ebenfalls die Redifferenzierung transformierter Zellen zu einer Morphologie, die für nicht-transformierte Zellen charakteristisch sind. Insbesondere sind die Morphogene dazu in der Lage, eine Redifferenzierung transformierter Zellen neuronalen Ursprungs zu einer Morphologie zu induzieren, die für nicht-transformierte Neuronen charakteristisch sind. Das unten dargelegte Beispiel führt eine Morphogen-induzierte Redifferenzierung transformierter humaner Zelllinien neuronalen Ursprungs, nämlich NG108-15 aus. Eine Morphogen-induzierte Redifferenzierung transformierter Zellen wurde ebenfalls in Maus Neuroblastomzellen (N1E-115) und in humanen Embryokarzinomzellen (siehe internationale Anmeldung US 92/01968 (WO 92/15323) gezeigt.

[0110] NF108-15 ist eine transformierte Hybridzelllinie, die durch Fusionieren von Neuroblastom X Gliom-Zellen erzeugt wurde (bezogen von der American Type Tissue Culture, Rockville, MD) und zeigt eine Morphologie, die für transformierte embryonale Neuronen charakteristisch ist, die beispielsweise eine fibroblastische Morphologie aufweisen. Insbesondere weisen die Zellen polygonale Zellkörper, kurze, domartige Fortsätze auf und vollziehen nur wenige Berührungen mit Nachbarzellen (siehe **Fig. 1A**). Die Inkubation von NG108-15 Zellen, kultiviert in einem chemisch definierten Serum-freien Medium mit 0,1-300 ng/ml OP-1 für vier Stunden induziert eine planmäßige, dosisabhängige Veränderung der Zellmorphologie.

[0111] Im Experiment wurden NG108-15 Zellen auf poly-L-lysin-beschichteten 6-Well-Platten subkultiviert. Jedes Well enthielt 40-50.000 Zellen in 2,5 ml chemisch definiertem Medium. Am dritten Tag wurden 2,5 µl OP-1 in 60% Ethanol, der 0,025% Trifluoressigsäure enthielt, jedem Well zugesetzt. OP-1 Konzentrationen von 0-300 ng/ml wurden getestet. Typischerweise wurden die Medien täglich mit neuen Teilmengen OP-1 ausgetauscht, obwohl eine Morphogenese durch eine einzige vierstündige Inkubation mit OP-1 induziert werden konnte. Zusätzlich waren die OP-1 Konzentrationen von 10 ng/ml ausreichend, um eine Redifferenzierung zu induzieren. Nach einem Tag machten die hOP-1 behandelten Zellen eine signifikante Veränderung einer zellulären Ultrastruktur durch, einschließlich einer Abrundung des Somas, einer Zunahme der Phasenhelligkeit und einer Verlängerung der kurzen Neurit-Fortsätze. Nach zwei Tagen beginnen Zellen, die mit OP-1 behandelt wurden, Epithel-ähnliche Platten zu bilden, die die Basis für das Wachstum vielschichtiger Aggregate am Tag 3 nach der Behandlung bereitstellen. Am Tag 4 war eine große Mehrzahl der OP-1 behandelten Zellen in eng gepackten vielschichtigen Aggregaten verbunden (**Fig. 1B**). **Fig.** 2 plottet die durchschnittliche Anzahl vielschichtiger Aggregate oder Zellklumpen, die in zwanzig zufällig ausgewählten Feldern aus sechs unabhängigen Experimenten identifiziert wurden, als eine Funktion der Morphogen-Konzentration. 40 ng/ml OP-1 ist für eine halbmaximale Induktion der Zellaggregation ausreichend.

[0112] Die Morphogen-induzierte Redifferenzierung trat ohne irgendwelche damit verbundenen Veränderungen in der DNA Synthese, Zellteilung oder Zelllebensfähigkeit auf, was es unwahrscheinlich macht, dass die morphologischen Veränderungen auf eine Zelldifferenzierung oder eine toxische Wirkung von bOP-1 folgten. Darüber hinaus hemmt die OP-1 induzierte Morphogenese die Zellteilung nicht, wie durch ^{3}H-Thymidin-Aufnahme bestimmt wurde, anders als andere Moleküle, von denen gezeigt wurde, dass die die Differenzierung transformierter Zellen stimulieren, wie beispielsweise Butyrat, DMSO, Retinsäure oder Forskolin. Die Daten zeigen, dass OP-1 die Zellstabilität und Lebensfähigkeit nach Induzieren einer Redifferention aufrecht erhalten kann. Zusätzlich sind die Effekte Morphogen-spezifisch und die Redifferenzierung wird nicht induziert, wenn NG108-15 Zellen mit 0,1-40 ng/ml TGF-β inkubiert werden.

[0113] Die Experimente wurden weiterhin mit hochgereinigtem löslichen Morphogen durchgeführt (beispielsweise reifes OP-1, das mit seiner Pro-Domäne verbunden ist), das ebenfalls spezifisch eine Redifferenzierung von NG108-15 Zellen induzierte.

[0114] Die hierin beschriebenen Morphogene stellen demgemäß nützliche therapeutische Mittel zur Behandlung von Neoplasien und neoplastischen Läsionen des Nervensystems bereit, insbesondere bei der Behandlung von Neuroblastomen, einschließlich von Retinoblastomen und Gliomen. Die Morphogene können selbst oder alternativ ein Morphogen-stimulierendes Mittel verabreicht werden.

Beispiel 5. Nervengewebsschutz vor einem chemischen Trauma

[0115] Die Fähigkeit der hierin beschriebenen Morphogene, das Überleben von Nervenzellen zu verbessern

und eine Zellaggregation und Zell-Zell-Adhäsion in redifferenzierten Zellen zu induzieren zeigt, dass die Morphogene als therapeutische Mittel zur Aufrechterhaltung der Nervenbahnen durch Schutz der Zellen von Nutzen sind, die die Bahn definierten, vor einer durch eine chemische Verletzung verursachten Schädigung. Die Morphogene können insbesondere Neurone schützen, einschließlich sich entwickelnder Neurone, vor den Wirkungen von Toxinen, von denen bekannt ist, dass sie die Proliferation und Migration von Neuronen hemmen und die Zell-Zell-Adhäsion stören. Beispiele für solche Toxine schließen Ethanol, eine oder mehrere Toxine, die in Zigarettenrauch vorliegen und eine Vielzahl von Opiaten ein. Die toxischen Wirkungen von Ethanol auf sich entwickelnde Neuronen induziert die neurologische Schädigung, die im fötalen Alkoholsyndrom manifestiert ist. Die Morphogene können ebenfalls Neurone vor den cytotoxischen Wirkungen schützen, die im excitatorischen Aminosäuren wie beispielsweise Glutamat verbunden sind.

[0116] Beispielsweise hemmt Ethanol die Zell-Zell-Adhäsionswirkungen, die in Morphogen-behandelten NG108-15 Zellen induziert werden, wenn sie diesen Zellen in einer Konzentration von 25-50 mM verabreicht werden. Eine halbmaximale Hemmung kann mit 5-10 mM Ethanol erreicht werden, die Konzentration an Blutalkohol in einem Erwachsenen im Anschluß an die Einnahme eines einzigen alkoholischen Getränks. Alkohol stört wahrscheinlich die hämophile Bindung von CAMS zwischen Zellen eher als deren Induktion, weil Morphogen-induzierte N-CAM Konzentrationen von Ethanol nicht beeinträchtigt werden. Darüber hinaus ist die inhibitorische Wirkung umgekehrt proportional zur Morphogen-Konzentration. Demgemäß wird ins Auge gefaßt, dass die Verabreichung eines Morphogens oder Morphogen-stimulierenden Mittels an Neurone, insbesondere sich entwickelnde Neurone, die dem Risiko einer Schädigung durch eine Exposition gegenüber Toxinen wie beispielsweise Ethanol ausgesetzt sind, diese Zellen vor einer Nervengewebsschädigung schützen können, indem die inhibitorischen Wirkungen des Toxins überwunden werden. Zu Erläuterungszwecken sind die hierin beschriebenen Morphogene ebenfalls in Therapien zur Behandlung geschädigter Nervenbahnen von Nutzen, was sich aus einer Neuropathie ergibt, die durch Exposition gegenüber diesen Toxinen induziert wird.

Beispiel 6. Morphogen-induzierte CAM-Expression

[0117] Die hierin beschriebenen Morphogene induzieren eine CAM-Expression, insbesondere eine N-CAM-Expression als Teil ihrer Induktion der Morphogenese. CAMs sind morphoregulatorische Moleküle, die in allen Geweben als essentieller Schritt in der Gewebsentwicklung identifiziert werden. N-CAMs, die zumindest drei Isoformen umfassen (N-CAM-180, N-CAM-140 und N-CAM-120, wobei „180", „140" und „120" die scheinbaren Molekülmassen der Isoformen wie durch Polyacrylamidgelelektrophorese gemessen anzeigen) werden zumindest vorübergehend in sich entwickelnden Geweben und dauerhaft in Nervengewebe exprimiert. Sowohl die N-CAM-180 als auch N-CAM 140 Isoformen werden sowohl in sich entwickelndem als auch adultem Gewebe exprimiert. Die N-CAM-120 Isoform ist nur in adultem Gewebe zu finden. Ein weiteres neurales CAM ist L1.

[0118] N-CAMs sind mit einer geeigneten Nervenentwicklung einschließlich einer geeigneten Neurulation, neuralen Migration, Faszikulierung und Synaptogenese verwickelt. Die Hemmung der N-CAM Produktion wie durch Komplexierung des Moleküls mit einem N-CAM spezifischen Antikörper hemmt die Retina-Organisation, einschließlich einer retinalen Axon-Migration und Axon-Regeneration im peripheren Nervensystem ebenso wie der Axon-Synapsis mit Zielmuskelzellen. Zusätzlich weist ein signifikanter Beweis darauf hin, dass physische oder chemische Traumen von Neuronen, eine onkogene Transformierung und einige genetische neurologische Störungen von Veränderungen in der CAM-Expression begleitet werden, die das adhäsive oder migratorische Verhalten dieser Zellen verändert. Es wird insbesondere von erhöhten N-CAM Konzentrationen bei der Huntington Krankheit im Striatum (beispielsweise Striatum-Basal-Ganglien) und von einer gesenkten Adhäsion bei der Alzheimer Krankheit berichtet.

[0119] Die hierin beschriebenen Morphogene können die CAM-Produktion, insbesondere die L1 und N-CAM Produktion, einschließlich aller drei Isoformen des N-CAM Moleküls stimulieren. Beispielsweise wird die N-CAM Expression signifikant in Morphogen-behandelten NG108-15 Zellen stimuliert. Unbehandelte NG108-15 Zellen zeigen eine fibroblastische oder minimal differenzierte Morphologie und exprimieren nur die 180- und 140-Isoformen von N-CAM, die normalerweise mit einer sich entwickelnden Zelle assoziiert sind. Im Anschluß an eine Morphogen-Behandlung zeigen diese Zellen eine Morphologie, die für adulte Neurone charakteristisch ist und exprimieren erhöhte Konzentration aller dreier N-CAM Isoformen. Unter Verwendung einer ähnlichen Vorschrift, wie im Beispiel unten beschrieben, induziert eine Morphogen-Behandlung von NG108-15 Zellen ebenfalls die L1-Expression.

[0120] In diesem Beispiel wurden NG108-15 Zellen 4 Tage lang in Gegenwart zunehmender Konzentrationen von OP-1 kultiviert und es wurden Standard Western Blots bzgl. der Ganzzellextrakte durchgeführt. N-CAM

Isoformen wurden mit einem Antikörper nachgewiesen, der mit allen drei Isoformen kreuzreagiert, nämlich mAb H28.123, bezogen von Sigma Chemical Co., St. Louis, wobei die unterschiedlichen Isoformen durch ihre unterschiedlichen Mobilitäten auf einem Elektrophoresegel unterscheidbar sind. Kontroll NG108-15 Zellen (unbehandelt) exprimieren sowohl die 140 kDa als auch die 180 kDa Isoformen, jedoch nicht die 120 kDa Isoform, wie durch Western Blot Analysen unter Verwendung von bis zu 100 µg Protein bestimmt wurde. Eine Behandlung von NG108-15 Zellen mit OP-1 hat eine Dosis-abhängige Zunahme der Expression der 180 kDa und 140 kDa Isoformen ebenso wie die Induktion der 120 kDa Isoform zur Folge. Siehe Fig. 2A und Fig. 2B. Fig. 2B ist ein Western Blot von OP-1 behandelten NG108-15 Zellextrakten, sondiert mit mAb H28.123, und zeigt die Induktion aller dreier Isoformen. Fig. 2A ist eine Dosis-Wirkungskurve der N-CAM 180 und N-CAM-140 Induktion als eine Funktion der Morphogen-Konzentration. N-CAM-120 ist in der graphischen Darstellung nicht dargestellt, weil es in Kontrollzellen nicht quantifiziert werden konnte. Jedoch wird, wie aus dem Western Blot in **Fig.** 2 klar ersichtlich ist, N-CAM-120 in Reaktion auf eine Morphogen-Behandlung induziert. Die differenzielle Induktion von N-CAM-180 und 140-Isoformen, die ersichtlich ist, kann deswegen vorliegen, weil eine konstitutive Expression der 140-Isoform nahe dem Maximum ist.

[0121] Die Zunahme der N-CAM-Expression entsprach in einer Dosis-abhängigen Weise der Morphogen-Induktion multizellulärer Aggregate. Man vergleiche Fig. 2A und Fig. 3. Fig. 3 stellt die durchschnittliche Anzahl vielschichtiger Aggregate (Klumpen) dar, die pro 20 zufällig ausgewählten Feldern in 6 unabhängigen Experimenten gezählt wurden, gegen die Konzentration an Morphogen. Die Induktion der 120-Isoform zeigt ebenfalls an, dass die Morphogen-induzierte Redifferenzierung transformierter Zellen nicht nur die Redifferenzierung dieser Zellen aus einem transformierten Phänotyp, sondern auch die Differenzierung zu einem Phänotyp stimuliert, der einer entwickelten Zelle entspricht. Standardimmunlokalisierungsstudien, die mit dem mAb H28.123 bzgl. Morphogen-behandelter Zellen durchgeführt wurden, zeigen eine N-CAM Clusterbildung, die mit der Peripherie und den Fortsätzen behandelter Zellen in Verbindung steht und zeigt keine Reaktivität mit unbehandelten Zellen. Darüber hinaus scheint eine Morphogen-Behandlung die Zellteilung nicht zu hemmen, wie es durch Zellzählen oder durch 3H-Thymidinaufnahme bestimmt wurde. Zuletzt induzieren bekannte chemische Differenzierungsmittel wie beispielsweise Forskolin oder Dimethylsulfoxid die N-CAM Produktion nicht.

[0122] Zusätzlich können die Zellaggregationseffekte von OP-1 auf NG108-15 Zellen mit anti-N-CAM-Antikörpern oder Antisense N-CAM-Oligonukleotiden gehemmt werden. Antisense-Oligonukleotide können synthetisch auf einem Nukleotid-Synthesegerät unter Verwendung von in der Technik bekannten Standardverfahren hergestellt werden. Vorzugsweise werden Phosphorothiolat-Oligonukleotide („S-Oligos") hergestellt, um den Transport der Nukleotide durch die Zellmembranen hindurch zu verbessern. Konzentrationen von sowohl N-CAM Antikörpern als auch N-CAM Oligonukleotiden, die ausreichend sind, um die N-CAM Induktion zu hemmen, hemmten ebenfalls die Bildung vielschichtiger Zellaggregate. Insbesondere hemmt die Inkubation von Morphogen-behandelter NG108-115 Zellen mit 0,3-3 µM N-CAM Antisense S-Oligos, 5-500 µM unmodifizierten N-CAM Antisense-S-Oligos, 5-500 µM unmodifizierten N-CAM Antisense-Oligos oder 10 µg/ml mAb H28.123 die Zellaggregation signifikant. Es ist wahrscheinlich, dass die Morphogen-Behandlung ebenfalls andere CAMs stimuliert, weil die Hemmung nicht vollständig war.

[0123] Die Experimente wurden ebenfalls mit löslichem Morphogen (beispielsweise reifem OP-1, verbunden mit seiner Pro-Domäne) durchgeführt, was ebenfalls spezifisch eine CAM-Expression induzierte.

[0124] Zu Erläuterungszwecken sind die hierin beschriebenen Morphogene als therapeutische Mittel zur Behandlung neurologischer Störungen von Nutzen, die mit veränderten CAM-Konzentrationen, insbesondere N-CAM Konzentrationen in Verbindung stehen, wie beispielsweise Chorea Huntington und der Alzheimer Krankheit und dergleichen. In klinischen Anwendungen können die Morphogene selbst verabreicht werden.

[0125] Die Leistungsfähigkeit der hierin beschriebenen Morphogene zur Beeinflussung der N-CAM Expression kann in vitro unter Verwendung einer geeigneten Zelllinie bestimmt werden und unter Verwendung der hierin beschriebenen Verfahren. Zusätzlich zu einer transformierten Zelllinie kann die N-CAM Expression in einer primären Zellkultur von Nerven- oder Glia-Zellen untersucht werden, folgend den hierin beschriebenen Verfahren. Die Leistungsfähigkeit der Morphogen-Behandlung auf die N-CAM Expression in vivo kann durch Gewebs-Biopsie, wie in Beispiel 9 beschrieben, evaluiert werden, siehe unten, und unter Nachweisen von N-CAM Molekülen mit einem N-CAM spezifischen Antikörper wie beispielsweise mAb H28.123 oder unter Verwendung des in Beispiel 11 beschriebenen Tiermodells.

[0126] Alternativ können die Konzentrationen an N-CAM Proteinen oder Protein-Fragmenten, die in cerebrospinaler Flüssigkeit oder Serum vorliegen, ebenfalls nachgewiesen werden, um die Wirkung der Morphogen-Behandlung zu evaluieren. Es ist bekannt, dass N-CAM Moleküle sich von Zelloberflächen ablösen und

sowohl in Serum als auch cerebrospinaler Flüssigkeit nachgewiesen wurden. Zusätzlich sind veränderte Konzentrationen der löslichen Form von N-CAM mit Normaldruck Hydrocephalus und Typ II Schizophrenie verbunden. N-CAM Flüssigkeitskonzentrationen können folgend dem in Beispiel 9 beschriebenen Verfahren und unter Verwendung eines N-CAM spezifischen Antikörpers wie beispielsweise mAb H28.123 nachgewiesen werden.

Beispiel 7. Morphogen-induzierte Nervenlückenreparatur (PNS)

[0127] Die hierin beschriebenen Morphogene stimulieren ebenfalls das Axon-Wachstum im peripheren Nervensystem über ausgedehnte Distanzen, was eine Heilung und Regeneration geschädigter Nervenbahnen ermöglicht. Während Neurons des peripheren Nervensystems im Anschluss an eine Verletzung neue Fortsätze auskeimen können, versagen diese Auskeimungen typischerweise ohne Führung darin, sich in geeigneter Weise zu verbinden und sterben ab. Wo die Bruchstelle so umfassend ist, beispielsweise größer als 5 oder 10 mm, ist eine Regeneration schlecht oder nicht existent.

[0128] In diesem Beispiel wurde die Morphogen-Stimulierung der Nervenregeneration unter Verwendung des Rattenischiasnerv-Modells bestimmt. Der Rattenischiasnerv kann sich spontan über eine 5 mm Lücke hin regenerieren und gelegentlich über eine 10 mm Lücke vorausgesetzt, dass die abgetrennten Enden in einem mit Salzlösung befüllten Nervenführungskanal eingebracht werden. In diesem Experiment wurde eine Nervenregeneration über eine 12 mm Lücke hinweg getestet.

[0129] Adulte weibliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River Laboratories, Inc.) mit einem Gewicht von 230-250 g wurden mit intraperitonealen Injektionen Natriumpentobarbital 35 mg/kg Körpergewicht anästhetisiert. Ein Hauteinschnitt wurde parallel und gerade hinter dem Oberschenkelknochen durchgeführt. Die avaskuläre intramuskuläre Ebene zwischen dem Vastus Lateralis und dem Archillissehnen-Muskel wurde betreten und folgte dem losen fibroareolaren Gewebe, das den Ischiasnerv umgibt. Das lose Gewebe wurde in Längsrichtung aufgeteilt, wobei der Ischiasnerv über seinen vollen Umfang freigelegt wurde, ohne irgendeinen Anteil hiervon zu devaskularisieren. Unter einem chirurgischen Mikroskop wurden die Ischiasnerven mit Mikroscheren am Mittel-Oberschenkel getrennt und mit einem OP-1 Gel Transplantat transplantiert, das die Nervenstumpen um 12 mm trennte. Die Transplantatregion wurde in ein Silikonrohr von 20 mm Länge mit einem 1,5 mm Innendurchmesser eingebracht, dessen Inneres mit einer Morphogen-Lösung befüllt war. Insbesondere bestanden die zentralen 12 mm des Rohres aus einem OP-1 Gel, das durch Vermischen von 1-5 µg im wesentlichen reinen CHO-erzeugten rekombinantem OP-1 mit ungefähr 100 µl MATRIGEL™ (von Collaborative Research, Inc. Bedford, MA), einem extrazellulären Matrixextrakt, gewonnen aus Maus-Sarcom-Gewebe hergestellt wurde, und das solubilisierte Gewebsbasismembran, einschließlich Laminin, Typ IV Collagen, Heparinsulfat, Proteoglycan und Entactin in Phosphat-gepufferter Salzlösung enthielt. Das OP-1 befüllte Rohr wurde direkt in die defekte Stelle implantiert, und ermöglichte auf jedem Ende 4 mm, um die Nervenstumpen einzuführen. Jeder Stumpen wurde gegen das OP-1 Gel angegrenzt und wurde im Silikonrohr durch drei Stiche von im Handel erhältlichen Chirurgie-10-0-Nylon durch das Epineurium befestigt, der Faszikelschutzscheide.

[0130] Zusätzlich zu den OP-1 Geltransplantaten wurden leere Silikonröhrchen, die nur mit Gel und „reversen" Autotransplantaten befüllt wurden, wobei 12 mm geschnittene Segmente des Ischiasnervs des Tieres vor dem Vernähen um 180°C verdreht wurden, als Kontrollen transplantiert. Alle Experimente wurden vierfach durchgeführt. Alle Wunden wurden durch Wundklammern verschlossen, die nach 10 Tagen entfernt wurden. Alle Ratten wurden an beiden Beinen transplantiert. Zum Zeitpunkt 3 Wochen wurden die Tiere getötet und die transplantierten Segmente entfernt und sofort auf Trockeneis eingefroren. Die eingefrorenen Abschnitte wurden durch die Transplantatstelle geschnitten und bzgl. einer Axon-Regeneration durch Immunfluoreszenzfärbung unter Verwendung von anti-Neurofilament-Antikörpern überprüft, die mit Flurocein markiert waren (bezogen von Sigma Chemical Co., St. Lous).

[0131] Die Regeneration des Ischiasnervs trat über die gesamte 12 mm Distanz in allen Transplantatstellen ein, wobei die Lücke mit dem OP-1 Gel befüllt war. Im Gegensatz hierzu zeigten leere Silikonröhrchen und reverse Autotransplantate keine Nervenregeneration und nur eine Transplantatstelle, die Gel alleine enthielt, zeigte eine Axon-Regeneration.

Beispiel 8. Morphogen-induzierte Nervenlückenreparatur (ZNS)

[0132] Im Anschluss an eine Axon-Schädigung in vivo sind die ZNS-Neuronen nicht dazu in der Lage, erneut Fortsätze auszutreiben. Demgemäß schädigt oder zerstört eine Verletzung von ZNS-Nervengewebe, einschließlich des Rückenmarks, des Sehnervs und der Retina, die Nervenwege, die von diesen Zellen definiert

sind. Periphere Nerventransplantate wurden bei einem Versuch verwendet, eine ZNS Axon-Schädigung zu umgehen. Eine erfolgreiche autologe Transplantat-Reparatur bzw. Heilung erfordert bis heute offensichtlich, dass die Transplantatstelle nahe dem neuronalen Zellkörper im ZNS auftritt und ein primäres Ergebnis einer ZNS Axotomie ist der Nervenzelltod. Die Leistungsfähigkeit der hierin beschriebenen Morphogene bzgl. der ZNS Nervenheilung kann unter Verwendung eines zerdrückten Sehnerv-Rattenmodells evaluiert werden, wie beispielsweise das von Bignami et al., (1979) Exp. Eve Res. 28: 63-69 beschrieben wurde, dessen Offenbarung durch diese Bezugnahme hierin mit aufgenommen ist. Kurz, und wie darin beschrieben, wurden Laborratten (beispielsweise von Charles River Laboratories, Wilmington, MA) unter Verwendung chirurgischer Standardverfahren anästhetisiert und der Sehnerv durch behutsames Ziehen des Auges aus der Augenhöhle, durch Einfügen einer Uhrmacherzange hinter dem Augenballen und Drücken des Sehnervs mit der Zange für 15 Sekunden gefolgt von einem 30-sekündigem Intervall und einem zweiten 15-sekündigen Drücken zerquetscht. Die Ratten wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten, beispielsweise bei 48 Stunden, bei 3, 4, 11, 15 und 18 Tagen nach der Operation getötet. Die Wirkung des Morphogens auf die Sehnervheilung kann durch Durchführung des Experimentes in zweifacher Ausführung und unter Bereitstellung von Morphogen oder PBS (beispielsweise 25 µl Lösung und 25 µg Morphogen) an den Sehnerv, beispielsweise knapp vor der Operation, gleichzeitig mit der Operation oder zu spezifischen Zeiten nach der Operation bestimmt werden.

[0133] In Abwesenheit einer Therapie induziert der chirurgische Eingriff eine gliale Narbenbildung des zerdrückten Nervs, wie durch Immunfluoreszenzfärbung für gliafibrillares saures Protein (Glia Fibrillary Acidic Protein = GFA), einem Markerprotein für die Glia-Narbenbildung und durch Histologie bestimmt wurde. Eine indirekte Immunfluoreszenz bzgl. luftgetrockneter Cryostat-Schnitte, wie in Bignami et al. (1974) J. Comp. Neur. 153: 27-38 beschrieben, unter Verwendung von im Handel erhältlichen Antikörpern gegen GFA (beispielsweise Sigma Chemical Co., St. Louis) wurde durchgeführt. Reduzierte Konzentrationen an GFA wurden in Tieren angenommen, die mit dem Morphogen behandelt wurden, was die Fähigkeit der Morphogene beweist, die Glia-Narbenbildung zu hemmen und die Sehnervregeneration zu stimulieren.

Beispiel 9. Nervengewebsdiagnostik Bezugs-Beispiel

[0134] Die Morphogen-Lokalisierung in Nervengewebe kann als Teil eines Verfahrens zum Diagnostizieren einer neurologischen Störung oder Neuropathie verwendet werden. Das Verfahren kann insbesondere zur Diagnose von Neuropathien von Gehirngewebe von Vorteil sein. Insbesondere eine Biopsie von Hirngewebe wird bei einem Patienten, der einem Risiko unterliegt durchgeführt, und zwar unter Verwendung von Standardverfahren, die in der medizinischen Technik wohl bekannt sind. Die mit dem biopsierten Gewebe verbundene Morphogen-Expression wird dann unter Verwendung von Standard-Methodologien festgestellt, wie durch Immunlokalisierung, unter Verwendung von Standardimmunfluoreszenztechniken zusammen mit Morphogenspezifischen Antiseren oder monoklonalen Antikörpern. Insbesondere wird das durch Biopsie gewonnene Gewebe unter Verwendung von in der Technik bekannten Standardmethodologien dünn geschnitten und Fluoreszenz-markierte (oder in anderer Weise nachweisbare) Antikörper werden mit dem Gewebe unter Bedingungen inkubiert, die ausreichend sind, um eine spezifische Antigen-Antikörperkomplexbildung zu erlauben. Das Vorhandensein und die Quantität des Komplexes, der gebildet wird, wird dann nachgewiesen und mit einem vorherbestimmten Standard- oder Referenzwert verglichen. Der Nachweis veränderter Konzentrationen an Morphogen, das im Gewebe vorliegt, kann dann als Indikator einer Gewebsdysfunktion verwendet werden. Alternativ kann eine Fluktuation in den Morphogen-Konzentrationen durch Überwachen der Morphogen-Transkriptionsniveaus, entweder durch Standard Northern Blot Analyse oder in situ Hybridisierung festgestellt werden, unter Verwendung einer markierten Sonde, die speziell zur Hybridisierung an Morphogen RNA in der Lage sind und unter Verwendung von Standard RNA Hybridisierungsvorschriften, die in der Technik wohl bekannt sind.

[0135] Fluktuationen der Morphogen-Konzentrationen, die in der cerebrospinalen Flüssigkeit oder im Blutstrom vorliegen, können ebenfalls dazu verwendet werden, die Nervengewebslebensfähigkeit zu evaluieren. Beispielsweise werden Morphogene nachgewiesen, die mit Adendema-Zellen verbunden sind, von denen bekannt ist, dass sie Faktoren in die cerebrospinale Flüssigkeit sezernieren und sind im allgemeinen mit Glia-Zellen verbunden und in der extrazellulären Matrix, jedoch nicht in neuronalen Zellkörpern. Demgemäß kann die cerebrospinale Flüssigkeit ein natürliches Mittel des Morphogen-Transportes sein. Alternativ können die Morphogene von sterbenden Zellen in die cerebrospinale Flüssigkeit freigesetzt werden. Zusätzlich wurde OP-1 kürzlich in menschlichem Blut identifiziert, das ebenfalls ein Mittel für den Morphogen-Transport sein kann und/oder ein Depot für den Inhalt sterbender Zellen.

[0136] Rückenmarksflüssigkeit kann aus einem Individuum durch eine lumbale Standardpunktion unter Verwendung von in der Technik der Medizin bekannten Standardmethodologien gewonnen werden. In ähnlicher Weise können Serumproben durch Standardvenipunktion und Serum gewonnen werden, hergestellt durch

Zentrifugation bei 3.000 UpM für 10 Minuten. Das Vorhandensein von Morphogen im Serum oder der cerebrospinalen Flüssigkeit kann dann durch Standard Western Blot bestimmt werden (Immunoblot), durch ELISA- oder durch RIA-Verfahren. Kurz gesagt können beispielsweise beim ELISA Proben in einem geeigneten Puffer, wie beispielsweise Phosphat-gepufferter Salzlösung verdünnt werden und 50 µl Teilmengen über Flachboden-Wells in Mikrotiter-Platten absorbieren gelassen werden, die mit Morphogen-spezifischem Antikörper vorbeschichtet sind und für 18 Stunden bei 4°C inkubieren gelassen werden. Platten können dann mit einem Standardpuffer gewaschen und mit 50 µl Teilmengen eines zweiten Morphogen-spezifischen Antikörpers inkubiert werden, der mit einem Nachweismittel konjugiert ist, beispielsweise mit Biotin, in einem geeigneten Puffer, für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Morphogen-Antikörperkomplexe können dann unter Verwendung von Standardverfahren nachgewiesen werden.

[0137] Alternativ kann eine Morphogen-spezifische Affinitätssäule unter Verwendung beispielsweise Morphogen-spezifischer Antikörper erzeugt werden, die an eine Säulenmatrix adsorbiert werden und durch Laufen lassen der flüssigen Probe durch die Matrix, um das interessierende Morphogen selektiv zu extrahieren. Das Morphogen wird dann eluiert. Ein geeigneter Elutionspuffer kann empirisch durch Bestimmen der geeigneten Bindung und der Elutionsbedingungen mit einer ersten Kontrolle (beispielsweise gereinigtem, rekombinant erzeugtem Morphogen) bestimmt werden. Die Fraktionen werden dann auf das Vorhandensein des Morphogens durch Standard-Immunblot getestet und durch N-terminale Sequenzierung bestätigt. Die Morphogen-Konzentrationen im Serum oder anderen flüssigen Proben können dann unter Verwendung von Standardproteinquantifizierungstechniken bestimmt werden, einschließlich durch spektrophotometrische Extinktion oder durch Quantifizierung durch ELISA- oder RIA-Antikörperassays. Unter Verwendung dieses Verfahrens wurde OP-1 im Serum identifiziert.

[0138] OP-1 wurde im humanen Serum unter Verwendung des nachfolgenden Assays nachgewiesen. Ein monoclonaler, gegen rekombinant erzeugtes Säugetier OP-1 gezüchteter Antikörper wurde unter Verwendung von Standardimmunologie-Techniken, die in der Technik wohl bekannt sind und die im allgemeinen in Beispiel 13 beschrieben sind, durch Laufen lassen des Antikörpers über ein aktiviertes Agarose-Gel erzeugt (beispielsweise Affi-Gel™ der Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, hergestellt folgend den Instruktionen des Herstellers) und dazu verwendet, OP-1 aus Serum aufzureinigen. Humanes Serum wurde dann über die Säule passiert und mit 3M K-thiocyanat eluiert. K-thiocyanat-Fraktionen wurden dann in 6M Urea, 20 mM PO_4, pH 7,0 dialysiert, aufgebracht auf eine C8 HPLC-Säule und mit einem 20 Minuten, 25-50% Acetonitril/0,1% TFA-Gradienten eluiert. Reife, rekombinant produzierte OP-1 Homodimere eluieren zwischen 20-22 Minuten. Die Fraktionen wurden dann gesammelt und auf das Vorliegen von OP-1 durch Standardimmunblot getestet. **Fig. 4** ist ein Immunblot, der OP-1 in humanen Seren unter reduzierenden und oxidierenden Bedingungen darstellt. In der Figur sind die Bahnen 1 und 4 OP-1 Standards, laufen unter oxidierten (Bahn 1) und reduzierten (Bahn 4) Bedingungen. Bahn 5 zeigt Molekulargewichtsmarker bei 17, 27 und 39 kDa. Die Bahnen 2 und 3 sind humanes Serum-OP-1, das unter oxidierten (Bahn 2) und reduzierten (Bahn 3) Bedingungen läuft.

[0139] Morphogene können in diagnostischen Anwendungen verwendet werden, um die Quantität von Morphogen, das in einer Körperflüssigkeitsprobe vorliegt, mit einem vorherbestimmten Referenzwert zu vergleichen, wobei Fluktuationen in den Flüssigkeitsmorphogen-Levels eine Veränderung des Status des Nervengewebes anzeigen. Alternativ können Fluktuationen im Level endogener Morphogen-Antikörper durch dieses Verfahren nachgewiesen werden, am wahrscheinlichsten im Serum, unter Verwendung eines Antikörpers oder eines anderen Bindungsproteins, das dazu in der Lage ist, spezifisch mit dem endogenen Morphogen-Antikörper zu interagieren. Nachgewiesene Fluktuationen in den Konzentrationen des endogenen Antikörpers können als Indikatoren einer Veränderung im Gewebsstatus verwendet werden.

Beispiel 10. Linderung einer Immunreaktion-vermittelten Nervengewebsschädigung

[0140] Die hierin beschriebenen Morphogene können dazu verwendet werden, immunologisch bezogene Schädigungen des Nervengewebes zu lindern. Details dieser Schädigung und die Verwendung von Morphogenen zur Linderung dieser Verletzung sind in der internationalen Anmeldung US 92/07358 (WO 93/04692) offenbart. Eine primäre Quelle einer solchen Schädigung des Nervengewebes folgt einer Hypoxie oder einer Ischämie-Reperfusion einer Blutzufuhr einer Nervenbahn, wie sie sich beispielsweise aus einem embolischen Schlaganfall ergeben kann oder wie sie während eines chirurgischen Verfahrens induziert werden kann. Wie in der internationalen Anmeldung US 92/07358 (WO 93/04692) beschrieben, wurde gezeigt, dass Morphogene die Schädigung des Myokard-Gewebes im Anschluß an eine Ischämie-Reperfusion die Blutzufuhr des Gewebes lindern kann. Die Wirkung der Morphogene auf die Linderung einer immunologisch bezogenen Schädigung des Nervengewebes kann unter Verwendung von Methodologien und Modellen eingeschätzt werden, die dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt sind und die unten beschrieben sind.

[0141] Beispielsweise stellt das embolische Schlaganfall-Kaninchenmodell ein nützliches Verfahren zur Bestimmung der Wirkung von Morphogenen auf eine Gewebsverletzung im Anschluß an eine cerebrale Ischämie-Reperfusion bereit. Die unten offenbarte Vorschrift ist im wesentlichen diejenige von Phillips et al. (1989) Annals of Neurology 25: 281-285, deren Offenbarung durch diese Bezugnahme hierin mit aufgenommen ist. Kurz gesagt werden weiße New England Kaninchen (2-3 kg) anästhetisiert und auf einem Respirator angeordnet. Die intracraniale Zirkulation bzw. Kreislauf wird dann selektiv durch die Seldinger-Technik katheterisiert. Eine cerebrale Baseline-Angiographie wird dann durchgeführt, die eine digitale Substraktions-Einheit anwendet. Die distale innere Carotis-Arterie oder ihre Verzweigungen werden dann selektiv mit 0,035 ml eines 18 Stunden alten autologen Thrombus embolisiert. Der arterielle Verschluß wird durch wiederholte Angiographie unmittelbar nach der Embolisierung dokumentiert. Nach einer Zeitspanne die ausreichend ist, um cerebrale Infarkte zu induzieren (15 Minuten oder 90 Minuten) wird eine Reperfusion durch Verabreichung eines Bolus bzw. einer Startgabe eines Reperfusionsmittels wie beispielsweise des TPA-Analogons FB-FB-CF (beispielsweise 0,8 mg/kg über 2 Minuten) induziert.

[0142] Die Wirkung des Morphogens auf Cerebralinfarkte bzw. Gehirninfarkte kann durch Verabreichung variierender Konzentrationen von Morphogenen bestimmt werden, beispielsweise von OP-1, zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Anschluß an die Embolisierung und/oder Reperfusion. Die Kaninchen werden 3-14 Tage nach der Embolisierung getötet und ihre Gehirne für eine neuropathologische Überprüfung durch Fixieren durch Eintauchen in 10% neutraler gepufferter Formation für zumindest 2 Wochen hergestellt. Die Gehirne werden in einer coronalen Ebene in 2-3 mm Intervallen geschnitten, numeriert und einer histologischen Standard-Verarbeitung in Paraffin unterworfen und der Grad der Nervengewebsnekrose wird visuell bestimmt. Es wird angenommen, dass Morphogen-behandelte Tiere die Nervengewebsnekrose im Anschluß an eine cerebrale Ischämie-Reperfusion in den Testtieren reduzieren oder signifikant hemmen, wie es durch einen Histologie-Vergleich mit nicht behandelten Tieren bestimmt wurde.

Beispiel 11. Tiermodell zur Bestimmung der Morphogen-Leistungsfähigkeit in vivo

[0143] Die in vivo Aktivitäten der Morphogene, die hierin beschrieben sind, werden ebenfalls in einfacher Weise in einem Tiermodell wie hierin beschrieben bestimmt. Ein geeignetes Tier, das vorzugsweise eine Nervengewebsschädigung zeigt, die beispielsweise genetisch oder umweltbedingt induziert ist, wird intracerebral mit einer wirksamen Menge eines Morphogens in einer geeigneten therapeutischen Formulierung injiziert, wie beispielsweise Phosphat-gepufferter Salzlösung bei pH 7. Das Morphogen wird vorzugsweise in die Gegend der beeinträchtigten Neurone injiziert. Das beeinträchtigte Gewebe wird zu einem nachfolgenden Zeitpunkt ausgeschnitten und das Gewebe morphologisch und/oder durch Evaluation eines geeigneten biochemischen Markes ausgertet (beispielsweise durch Morphogen- oder N-CAM-Lokalisierung; oder durch Messen der Dosis-abhängigen Wirkung eines biochemischen Markers für eine neurotrophische ZNS Aktivität oder für eine ZNS Gewebsschädigung unter Verwendung beispielsweise des gliafibrillarensauren Proteins als Marker). Die Dosierung und Inkubationszeit variieren mit dem zu testenden Tier. Geeignete Dosisbereiche für unterschiedliche Spezies können durch Vergleich mit etablierten Tiermodellen bestimmt werden. Unten dargelegt ist ein beispielhaftes Protokoll bzw. Vorschrift für ein Rattengehirnbalkenmodell.

[0144] Kurz gesagt wurden männliche Long Evans Ratten, bezogen aus kommerziellen Standardquellen anästhetisiert und der Kopfbereich für einen chirurgischen Eingriff vorbereitet. Die Calvarien werden unter Verwendung von chirurgischen Standardverfahren exponiert und ein Loch hin zu jedem Zentrum jedes Lappen unter Verwendung eines 0,035 K Drahtes gebohrt, der gerade die Calvarien durchbohrt. 25 µl Lösungen, die entweder Morphogen (beispielsweise OP-1, 25 µg) oder PBS enthalten werden dann jeder der Bohrungen bzw. Löcher durch eine Hamilton-Spritze verabreicht. Die Lösungen werden bis zu einer Tiefe von ungefähr 3 mm unter die Oberfläche in die darunter liegende Rinde, Corpus Callosum und Hippocampus transportiert. Die Haut wird dann vernäht wird man lässt die Tiere sich erholen.

[0145] Drei Tage nach dem chirurgischen Eingriff werden die Ratten durch Enthauptung getötet und ihre Gehirne zum Schneiden vorbereitet. Die Narbengewebsbildung wird durch Immunfluoreszenzfärbung für das gliafibrilläre saure Protein, einem Markerprotein für die Glia-Narbenbildung evaluiert, um den Grad der Narbenbildung qualitativ zu bestimmen. Antikörper gegen gliafibrilläres saures Protein sind im Handel beispielsweise von Sigma Chemical Co. St. Louis, MO erhältlich. Die Schnitte werden ebenfalls mit anti-OP-1 Antikörpern sondiert, um das Vorhandensein von OP-1 zu bestimmen. Reduzierte Konzentrationen des Glia-fibrillären sauren Proteins werden in den Gewebsschnitten von Tieren angenommen, die mit dem Morphogen behandelt wurden, was die Fähigkeit der Morphogene unter Beweis stellt, die Glia-Narben-Bildung zu hemmen und die Nervenregeneration zu stimulieren.

Beispiel 12. In vitro Modell zur Evaluierung eines Morphogen-Spezies Transports über die Bluthirnschranke hinweg

[0146] Unten beschrieben ist ein in vitro Verfahren zum Evaluieren der Vorrichtung, mit der ausgewählte Morphogen-Spezies wahrscheinlich die Bluthirnschranke durchdringen werden. Eine ausführliche Beschreibung des Modells und der Vorschrift werden von Audus et al. (1987) Ann. N.Y. Acad. Sci. 507: 9-18 bereitgestellt, deren Offenbarung durch diese Bezugnahme hierin mit aufgenommen ist.

[0147] Kurz gesagt werden Mikrogefäß-Endothelzellen aus der cerebralen grauen Substanz frischer Rinderhirne isoliert. Die Gehirne werden aus ortsansässigen Schlachthäusern gewonnen und in eiskaltem Minimum Essential Medium (MEM) mit Antikörpern zum Labor transportiert. Unter sterilen Bedingungen werden die Blutgefäße mit großer Oberfläche und die Meningen unter Verwendung von Standarddissektionsverfahren entfernt. Die cortikale graue Substanz wird durch Absaugen entfernt, dann zu Würfeln von ungefähr 1 mm geschnitten. Die geschnittene graue Substanz wird dann mit 0,5% Dispase (BMB, Indianapolis, IN) für 3 Stunden bei 37°C in einem Rüttelwasserbad inkubiert. Im Anschluß an die 3-stündige Digestion wird das Gemisch durch Zentrifugation (1000 × g für 10 Minuten) konzentriert, darauf in 13% Dextran resuspendiert und für 10 Minuten bei 5.800 × g zentrifugiert. Fett-, Zelldebris- und Myelinüberstand werden verworfen und das rohe Mikrogefäß-Pellet in 1 mg/ml Collagenase/Dispase resuspendiert und einem Rüttelwasserbad für 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der 5-stündigen Digestion wird die Mikrogefäßsuspension auf einen vorher etablierten 50% Percoll-Gradienten aufgebracht und für 10 Minuten bei 1.000 × g zentrifugiert. Die Bande, die gereinigte endotheliale Zellen enthält (zweite Bande von oben des Gradienten) wird entfernt und zweimal mit Kulturmedium gewaschen (beispielsweise 50% MEM/50% F-12 Nährstoffgemisch). Die Zellen werden in einem Medium eingefroren (–80°C), das 20% DMSO und 10% Pferdeserum enthält, zur späteren Verwendung.

[0148] Nach Isolierung werden ungefähr 5×10^5 Zellen/cm^2 auf Kulturschalen oder Polycarbonatfilter mit 5-12 µm Porengröße ausplattiert, die mit Rattencollagen und Fibronektin beschichtet werden. 10-12 Tage nach dem Aussäen der Zellen werden die Zellmonolayers bzgl. einer Confluenz durch Mikroskopie untersucht.

[0149] Die Charakterisierung der morphologischen, histochemischen und biochemischen Eigenschaften dieser Zellen haben gezeigt, dass diese Zellen viele der hervorragenden Merkmale der Bluthirnschranke besitzen. Diese Merkmale schließen ein: enge interzelluläre Knotenpunkte bzw. Kreuzungen, ein Fehlen von Membranfenestrationen, niedrige Niveaus einer pinocytotischen Aktivität und das Vorhandensein einer Gamma-Glutamyl-Transpeptidase, alkalischen Phosphatase und von Faktor VIII Antigen-Aktivitäten.

[0150] Die kultivierten Zellen können in einer breiten Vielzahl von Experimenten verwendet werden, in denen ein Modell für eine polarisierte Bindung oder Transport erforderlich ist. Durch Ausplattieren der Zellen in Multi-Well-Platten kann eine Rezeptor- und Nicht-Rezeptor-Bindung sowohl großer als auch kleiner Moleküle durchgeführt werden. Um transendotheliale Zellflußmessungen durchzuführen werden die Zellen auf porösen Polycarbonatmembranfiltern gezüchtet (beispielsweise von Nucleopore, Pleasanton, CA). Filter mit großer Porengröße (5-12 µm) werden dazu verwendet, die Möglichkeit zu vermeiden, dass der Filter für den molekularen Fluss die Geschwindigkeits-limitierende Barriere wird. Die Verwendung dieser großporigen Filter ermöglicht kein Zellwachstum unter dem Filter und ermöglicht die visuelle Überprüfung der Zellmonolayer.

[0151] Wenn die Zellen einmal Konfluenz erreichen werden sie in einem Seite-an-Seite Diffusionszellgerät angeordnet (beispielsweise von Crown Glass, Sommerville, NJ). Für Flussmessungen wird die Donorkammer der Diffusionszelle mit einer Testsubstanz gepulst, und darauf wird zu verschiedenen Zeitpunkten im Anschluß an den Impuls eine Teilmenge aus der Empfängerkammer zu einer Analyse entfernt. Radioaktive oder Fluoreszenz-markierte Substanzen ermöglichen eine zuverlässige Quantifizierung der molekularen Strömung bzw. des molekularen Flusses. Die Monolayer-Integrität bzw. Unversehrtheit wird simultan durch den Zusatz einer nicht transportablen Testsubstanz wie beispielsweise Saccharose oder Inulin gemessen und Wiederholungen von zumindest vier Bestimmungen werden gemessen, um die statistische Signifikanz sicherzustellen.

Beispiel 13. Screening Assays nach Kandidatenverbindungen, die endogene Morphogen-Konzentrationen verändern (Bezugs-Beispiel)

[0152] Eine Kandidatenverbindung (Kandidatenverbindungen), die zur Beeinflussung der Konzentrationen eines gegebenen Morphogens verabreicht werden können, werden unter Verwendung des nachfolgenden Screening-Assays aufgefunden, bei denen die Konzentration der Morphogen-Produktion durch einen Zelltyp, der messbare Konzentrationen des Morphogens produziert, mit und ohne Inkubieren der Zelle in Kultur mit der Verbindung bestimmt wird, um die Wirkungen der Verbindung auf die Zelle zu bestimmen. Dies kann durch

Nachweis des Morphogens entweder auf der Protein- oder RNA-Ebene erreicht werden. Eine ausführlichere Beschreibung ist ebenfalls in der internationalen Anmeldung US 92/07359 (WO 92/05172) zu finden.

13.1 Wachstum von Zellen in Kultur

[0153] Zellkulturen von Nieren, Nebennieren, Harnblase, Gehirn oder anderen Organen können wie in der Literatur breit beschrieben gewonnen werden. Beispielsweise können Nieren aus neonatalen oder neugeborenen oder jungen oder Erwachsenen Nagetieren (Maus oder Ratte) explantiert und in Organkultur als Ganz- oder Schnitt- (1-4 mm) Gewebe verwendet werden. Primäre Gewebskulturen und etablierte Zelllinien, die ebenfalls von Niere, Nebennieren, Harnblase, Gehirn, Brustdrüse oder anderem Gewebe etabliert wurden, können in Multi-Well-Platten (6-Well oder 24-Well) gemäß konventioneller Zellkulturtechniken etabliert werden und werden in Abwesenheit oder Anwesenheit von Serum für eine Zeitspanne (1-7 Tage) kultiviert. Die Zellen können beispielsweise in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, Long Island, NY) kultiviert werden, das Serum enthält (beispielsweise fötales Kalbsserum bei 1-10% Gibco) oder in Serum-entzogenem Medium, wie erwünscht, oder in definiertem Medium (beispielsweise eines, das Insulin, Transferrin, Glukose, Albumin oder andere Wachstumsfaktoren enthält).

[0154] Beispiele zum Testen des Niveaus einer Morphogen-Produktion schließen Kulturüberstände oder Zelllysate ein, die periodisch gesammelt und bzgl. der OP-1 Produktion durch Immun-Blot-Analyse ausgewertet werden (Sambrook et al., Hrgb., 1989, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY), oder ein Teil der Zellkultur selbst, die periodisch gesammelt und zur Herstellung von PolyA+RNA zur RNA-Analyse verwendet wird. Um die de novo OP-1 Synthese zu überwachen werden einige Kulturen gemäß herkömmlicher Verfahren mit einem ^{35}S-Methionin/^{35}S-Cystein-Gemisch für 6-24 Stunden markiert und darauf bzgl. einer OP-1 Synthese durch herkömmliche Immunpräzipitationsverfahren ausgewertet.

13.2 Bestimmung der Konzentration an morphogenetischem Protein

[0155] Um die Produktion eines morphogenetischen Proteins durch einen Zelltyp quantitativ zu bestimmen kann ein Immunassay durchgeführt werden, um das Morphogen unter Verwendung eines polyclonalen oder monoclonalen Antikörpers nachzuweisen, der für das Protein spezifisch ist. Beispielsweise kann OP-1 unter Verwendung eines polyclonalen Antikörpers, der für OP-1 spezifisch ist, in einem ELISA wie folgt nachgewiesen werden.

[0156] 1 µg/100 µl Affinitäts-gereinigtes polyclonales Kaninchen-IgG, das für OP-1 spezifisch ist, wird jedem Well einer 96-Well-Platte zugesetzt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Wells werden viermal mit 0,167 M Natriumboratpuffer mit 0,15 M NaCl (BSB), pH 8,2, gewaschen, der 0,1% Tween 20 enthielt. Um eine unspezifische Bindung zu minimieren werden die Wells durch vollständiges Befüllen mit 1% Rinderserumalbumin (BSA) in BSB und durch Inkubieren für 1 Stunde bei 37°C blockiert. Die Wells werden dann viermal mit BSB gewaschen, das 0,1% Tween 20 enthält. Eine 100 µl Teilmenge einer geeigneten Verdünnung jeder dieser Testproben eines Zellkulturüberstandes wird jedem Well dreifach zugesetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation werden 100 µl biotinyliertes Kaninchen-Anti-OP-1-Serum (die Stammlösung ist ungefähr 1 mg/ml und wird vor Verwendung 1:400 in BSB verdünnt) jedem Well zugesetzt und bei 37°C für 30 min. inkubiert. Die Wells werden dann viermal mit BSB gewaschen, das 0,1% Tween 20 enthält. 100 µl Streptavidin-Alkali (Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, Alabama, das vor Verwendung 1:2.000 in BSB verdünnt wird, das 0,1 % Tween 20 enthält) werden jedem Well zugesetzt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Platten werden viermal mit 0,5 M Tris-gepufferter Salzlösung (TBS), pH 7,2 gewaschen.

[0157] 50 µl Substrat (ELISA Amplification System Kit, Life Technologies, Inc. Bethesda, MD) wird jedem Well zugesetzt, der bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert wird. Darauf wird 50 µl Amplifikator (aus dem selben Amplifikationssystem-Kit) zugesetzt und für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zusatz von 50 µl 0,3 M Schwefelsäure gestoppt. Die OD bei 490 nm der Lösung in jeder Well wird aufgezeichnet. Um OP-1 in den Kulturmedien zu quantifizieren wird eine OP-1 Standardkurve parallel mit den Testproben durchgeführt.

[0158] Ein polyclonaler Antikörper kann wie folgt hergestellt werden. Jedem Kaninchen wird eine primäre Immunisierung von 100 µg/500 µl E. coli verabreicht, das OP-1 Monomer erzeugte, (Aminosäuren 328-431 in Sequenz ID NO: 5) in 0,1% SDS vermischt mit 500 µl vollständigem Freundschem Adjuvanz. Das Antigen wird subkutan in verschiedenen Orten auf dem Rücken und den Flanken des Tieres injiziert. Das Kaninchen erhält nach einem Monat in der selben Weise unter Verwendung von unvollständigem Freund'schem Adjuvanz eine Booster-Impfung. Testblutentnahmen werden 7 Tage später aus der Ohrvene entnommen. Zwei zusätzliche

Boost- bzw. Auffrischungsimpfungen und Testblutentnahmen werden zu monatlichen Intervallen durchgeführt, bis Antikörper gegen OP-1 im Serum unter Verwendung eines ELISA-Assays nachgewiesen wird. Darauf erhält das Kaninchen monatlich eine Auffrischungsimpfung aus 100 µg Antigen und Blut (15 ml pro Blutentnahme) am Tag 7 und 10 nach der Auffrischung wird entnommen.

[0159] Ein monoclonaler Antikörper, der für ein gegebenes Morphogen spezifisch ist, kann wie folgt hergestellt werden. Einer Maus werden zwei Injektionen von E. coli produziertem OP-1 Monomer verabreicht. Die erste Injektion enthält 100 µg OP-1 in vollständigem Freund'schem Adjuvanz und wird subkutan gegeben. Die zweite Injektion enthält 50 µg OP-1 in unvollständigem Freund'schem Adjuvanz und wird intraperitoneal verabreicht. Die Maus empfängt dann insgesamt 230 µg OP-1 (Aminosäuren 307-431 in Sequenz ID NO: 5) in vier intraperitonealen Injektionen zu verschiedenen Zeitpunkten über eine achtmonatige Zeitspanne hinweg. Eine Woche vor der Fusion erhalten beide Mäuse eine intraperitoneale Auffrischungsimpfung mit 100 µg OP-1 (307-331) und 30 µg des N-terminalen Peptids (Ser_{293}-Asn_{309}-Cys) gebunden durch das zugesetzte Cystein an Rinderserumalbumin mit SMCC Vernetzungsmittel. Diese Auffrischungsimpfung wurde 5 Tage (IP), 4 Tage (IP), 3 Tage (IP) und 1 Tag (IV) vor Fusion wiederholt. Die Maus-Milzzellen werden dann mit Myelomazellen (beispielsweise 653) in einem Verhältnis von 1:1 unter Verwendung von PEG 1500 (Boeringer Mannheim) fusioniert und die Zellfusion wird ausplattiert und unter Verwendung eines OP-1 (307-431) Antigens nach OP-1 spezifischen Antikörpern gescreent. Die Zellfusion und das monoclonale Screening wird dann gemäß Standardverfahren durchgeführt, die in Standardtexten wohl beschrieben sind, und die in der Technik weithin verfügbar sind.

Sequenzprotokoll

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: CREATIVE BIOMOLECULES, INC.

(B) STRASSE: 35 SOUTH STREET

(C) STADT: HOPKINTON

(D) STAAT: MASSACHUSETTS

(E) LAND: USA

(F) POSTLEITZAHL (ZIP): 01748

(G) TELEFON: 1-508-435-9001

(H) TELEFAX: 1-508-435-0454

(I) TELEX:

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: MORPHOGEN-INDUZIERTE NERVENREGENERATION UND HEILUNG

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 33

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(J) NAME: CREATIVE BIOMOLECULES, INC.

(K) STRASSE: 35 SOUTH STREET

(L) STADT: HOPKINTON

(M) STAAT: MASSACHUSETTS

(N) LAND: USA

(O) POSTLEITZAHL (ZIP): 01748

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) MEDIUMTYP: FLOPPY DISK

(B) COMPUTER: IBM PC KOMPATIBEL

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PATENTIN RELEASE NR. 1.0, VERSION NR. 1.25

(viii) ANWALT/VERTRETERINFORMATION

(A) NAME: KELLEY, ROBIN D.

(B) REGISTRIERNUMMER: 34.637

(C) REFERENZ/AKTENZEICHEN: CRP-070

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION

(A) TELEFON: 617/248-7000

(B) TELEFAX: 617/248-7100

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 97 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRENGIGKEIT: EINFACH

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN

(B) LOKALISIERUNG: 1..97

(D) WEITERE INFORMATION:/MARKIERUNG = GENERISCHE SEQ 1/ BEMERKUNG = „WOBEI JEDES XAA UNABHÄNGIG EINE DER 20 NATÜRLICH VORKOMMENDEN L-ISOMEREN A-AMINOSÄUREN ODER EIN DERIVAT HIERVON BEZEICHNET“.

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 1:

```
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1               5                   10                  15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
            20                  25                  30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
        35                  40                  45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Cys Xaa Xaa
    50                  55                  60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
65                  70                  75                  80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Cys
                85                  90                  95

Xaa
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 97 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINFACH

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN

(B) LOKALISIERUNG: 1..97

(D) WEITERE INFORMATION:/MARKIERUNG = GENERISCHE SEQ 2/ BEMERKUNG = „WOBEI JEDES XAA UNABHÄNGIG EINE DER 20 NATÜRLICH VORKOMMENDEN L-ISOMEREN A-AMINOSÄUREN ODER EIN DERIVAT HIERVON BEZEICHNET“.

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 2:

```
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1               5                   10                  15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
            20                  25                  30

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
        35                  40                  45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Cys Xaa Xaa
    50                  55                  60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
65                  70                  75                  80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Cys
                85                  90                  95

Xaa
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 97 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINFACH

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN

(B) LOKALISIERUNG: 1..97

(D) WEITERE INFORMATION:/MARKIERUNG = GENERISCHE SEQ 3/ BEMERKUNG = „WOBEI JEDES XAA UNABHÄNGIG EINE DER 20 NATÜRLICH VORKOMMENDEN L-ISOMEREN A-AMINOSÄUREN ODER EIN DERIVAT HIERVON BEZEICHNET“.

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 3:

```
Leu Tyr Val Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Ala
1               5                   10                  15

Pro Xaa Gly Xaa Xaa Ala Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa Pro
            20                  25                  30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn His Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Leu
        35                  40                  45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Cys Xaa Pro
    50                  55                  60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
65                  70                  75                  80

Val Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa Xaa Cys Gly Cys
                85                  90                  95

Xaa
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 102 AMINOSÄUREN
(B) TYP: AMINOSÄURE
(C) STRÄNGIGKEIT: EINFACH
(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN
(B) LOKALISIERUNG: 1..102
(D) WEITERE INFORMATION:/MARKIERUNG = GENERISCHE SEQ 4/ BEMERKUNG = „WOBEI JEDES XAA UNABHÄNGIG EINE DER 20 NATÜRLICH VORKOMMENDEN L-ISOMEREN A-AMINOSÄUREN ODER EIN DERIVAT HIERVON BEZEICHNET“.

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 4:

```
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Tyr Val Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa
1               5                   10                  15

Xaa Trp Xaa Xaa Ala Pro Xaa Gly Xaa Xaa Ala Xaa Tyr Cys Xaa Gly
            20                  25                  30
```

```
Xaa Cys Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn His Ala
        35                  40                  45

Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
    50                  55                  60

Xaa Cys Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa
65                  70                  75                  80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val
                85                  90                  95

Xaa Xaa Cys Gly Cys Xaa
            100
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 139 AMINOSÄUREN
(B) TYP: AMINOSÄURE
(C) STRÄNGIGKEIT: EINFACH
(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(Vi) ORIGINALQUELLE:

(A) ORGANISMUS: HOMO SAPIENS
(F) GEWEBSTYP: HIPPOCAMPUS

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN
(B) LOKALISIERUNG: 1..139
(D) WEITERE INFORMATION:/MARKIERUNG = HOP-1 REIF

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 5:

```
Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys
1               5                   10                  15

Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser
            20                  25                  30

Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg
        35                  40                  45

Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala
    50                  55                  60

Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn
65                  70                  75                  80
```

```
Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro
                85                  90                  95

Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile
            100                 105                 110

Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr
        115                 120                 125

Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
    130                 135
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

LÄNGE: 139 AMINOSÄUREN

(A) TYP: AMINOSÄURE

(B) STRÄNGIGKEIT: EINFACH

(C) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(Vi) ORIGINALQUELLE:

(A) ORGANISMUS: MURIDAE

(F) GEWEBSTYP: EMBRYO

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN

(B) LOKALISIERUNG: 1..139

(D) WEITERE INFORMATION:/MARKIERUNG = MOP-1 REIF

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 6:

```
Ser Thr Gly Gly Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys
1               5                   10                  15

Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Ser Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser
            20                  25                  30

Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg
        35                  40                  45

Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala
    50                  55                  60

Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn
65                  70                  75                  80

Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro
                85                  90                  95
```

```
Asp Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile
            100                 105                 110

Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr
        115                 120                 125

Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
    130                 135
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 7:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 139 AMINOSÄUREN
- (B) TYP: AMINOSÄURE
- (C) STRÄNGIGKEIT: EINFACH
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(Vi) ORIGINALQUELLE:

- (A) ORGANISMUS: HOMO SAPIENS
- (F) GEWEBSTYP: HIPPOCAMPUS

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN
- (B) LOKALISIERUNG: 1..139
- (D) WEITERE INFORMATION:/MARKIERUNG = HOP-2 REIF

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 7:

```
Ala Val Arg Pro Leu Arg Arg Arg Gln Pro Lys Lys Ser Asn Glu Leu
1               5                   10                  15

Pro Gln Ala Asn Arg Leu Pro Gly Ile Phe Asp Asp Val His Gly Ser
            20                  25                  30

His Gly Arg Gln Val Cys Arg Arg His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln
        35                  40                  45

Asp Leu Gly Trp Leu Asp Trp Val Ile Ala Pro Gln Gly Tyr Ser Ala
    50                  55                  60

Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ser Phe Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn
65                  70                  75                  80

Ala Thr Asn His Ala Ile Leu Gln Ser Leu Val His Leu Met Lys Pro
                85                  90                  95

Asn Ala Val Pro Lys Ala Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Ser Ala Thr
            100                 105                 110
```

```
Ser Val Leu Tyr Tyr Asp Ser Ser Asn Asn Val Ile Leu Arg Lys His
        115                 120                 125

Arg Asn Met Val Val Lys Ala Cys Gly Cys His
    130                 135
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 8:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 139 AMINOSÄUREN
- (B) TYP: AMINOSÄURE
- (C) STRÄNGIGKEIT: EINFACH
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(Vi) ORIGINALQUELLE:

- (A) ORGANISMUS: MURIDAE
- (F) GEWEBSTYP: EMBRYO

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN
- (B) LOKALISIERUNG: 1..139
- (D) WEITERE INFORMATION:/MARKIERUNG = MOP-2 REIF

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 8:

```
Ala Ala Arg Pro Leu Lys Arg Arg Gln Pro Lys Lys Thr Asn Glu Leu
1               5                   10                  15

Pro His Pro Asn Lys Leu Pro Gly Ile Phe Asp Asp Gly His Gly Ser
            20                  25                  30

Arg Gly Arg Glu Val Cys Arg Arg His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg
        35                  40                  45

Asp Leu Gly Trp Leu Asp Trp Val Ile Ala Pro Gln Gly Tyr Ser Ala
    50                  55                  60

Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn
65                  70                  75                  80

Ala Thr Asn His Ala Ile Leu Gln Ser Leu Val His Leu Met Lys Pro
                85                  90                  95
```

```
Asp Val Val Pro Lys Ala Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Ser Ala Thr
            100                 105                 110

Ser Val Leu Tyr Tyr Asp Ser Ser Asn Asn Val Ile Leu Arg Lys His
        115                 120                 125

Arg Asn Met Val Val Lys Ala Cys Gly Cys His
    130                 135
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 9:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 101 AMINOSÄUREN
(B) TYP: AMINOSÄURE
(C) STRÄNGIGKEIT: EINFACH
(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(Vi) ORIGINALQUELLE:

(A) ORGANISMUS: BOVINAE

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN
(B) LOKALISIERUNG: 1..101
(D) WEITERE INFORMATION:/MARKIERUNG = CBMP-2A-FX

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 9:

```
Cys Lys Arg His Pro Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn
1               5                   10                  15

Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr Cys His Gly
            20                  25                  30

Glu Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala
        35                  40                  45

Ile Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala
    50                  55                  60

Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp
65                  70                  75                  80

Glu Asn Glu Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Asp Met Val Val Glu
                85                  90                  95

Gly Cys Gly Cys Arg
            100
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 10:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 101 AMINOSÄUREN
- (B) TYP: AMINOSÄURE
- (C) STRÄNGIGKEIT: EINFACH
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(Vi) ORIGINALQUELLE:
- (A) ORGANISMUS: HOMO SAPIENS
- (F) GEWEBSTYP: HIPPOCAMPUS

(ix) MERKMAL:
- (A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN
- (B) LOKALISIERUNG: 1..101
- (D) WEITERE INFORMATION:/MARKIERUNG = CBMP-2B-FX

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 10:

```
Cys Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn
1               5                  10                  15

Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr Gln Ala Phe Tyr Cys His Gly
            20                  25                  30

Asp Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala
        35                  40                  45

Ile Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Ser Ile Pro Lys Ala
    50                  55                  60

Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp
65                  70                  75                  80

Glu Tyr Asp Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Glu Met Val Val Glu
                85                  90                  95

Gly Cys Gly Cys Arg
            100
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 11:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:
- (A) LÄNGE: 102 AMINOSÄUREN
- (B) TYP: AMINOSÄURE
- (C) STRÄNGIGKEIT: EINFACH
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(Vi) ORIGINALQUELLE:

(A) ORGANISMUS: DROSOPHILA MELANOGASTER

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN

(B) LOKALISIERUNG: 1..102

(D) WEITERE INFORMATION:/MARKIERUNG = DPP-FX

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 11:

```
Cys Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asp
1               5                  10                  15

Asp Trp Ile Val Ala Pro Leu Gly Tyr Asp Ala Tyr Tyr Cys His Gly
            20                  25                  30

Lys Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Phe Asn Ser Thr Asn His Ala
        35                  40                  45

Val Val Gln Thr Leu Val Asn Asn Asn Asn Pro Gly Lys Val Pro Lys
    50                  55                  60

Ala Cys Cys Val Pro Thr Gln Leu Asp Ser Val Ala Met Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80

Asn Asp Gln Ser Thr Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Glu Met Thr Val
                85                  90                  95

Val Gly Cys Gly Cys Arg
            100
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 12:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 102 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINFACH

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(Vi) ORIGINALQUELLE:

(A) ORGANISMUS: XENOPUS

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN

(B) LOKALISIERUNG: 1..102

(D) WEITERE INFORMATION:/MARKIERUNG = VGL-FX

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 12:

```
Cys Lys Lys Arg His Leu Tyr Val Glu Phe Lys Asp Val Gly Trp Gln
1               5                  10                  15

Asn Trp Val Ile Ala Pro Gln Gly Tyr Met Ala Asn Tyr Cys Tyr Gly
            20                  25                  30

Glu Cys Pro Tyr Pro Leu Thr Glu Ile Leu Asn Gly Ser Asn His Ala
        35                  40                  45

Ile Leu Gln Thr Leu Val His Ser Ile Glu Pro Glu Asp Ile Pro Leu
    50                  55                  60

Pro Cys Cys Val Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Ser Met Leu Phe Tyr
65                  70                  75                  80

Asp Asn Asn Asp Asn Val Val Leu Arg His Tyr Glu Asn Met Ala Val
                85                  90                  95

Asp Glu Cys Gly Cys Arg
            100
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 13:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 102 AMINOSÄUREN
- (B) TYP: AMINOSÄURE
- (C) STRÄNGIGKEIT: EINFACH
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(Vi) ORIGINALQUELLE:

- (A) ORGANISMUS: MURIDAE

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN
- (B) LOKALISIERUNG: 1..102
- (D) WEITERE INFORMATION:/MARKIERUNG = VGR1-FX

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 13:

```
Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln Asp Val Gly Trp Gln
1               5                  10                  15

Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Gly Tyr Ala Ala Asn Tyr Cys Asp Gly
            20                  25                  30

Glu Cys Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala Thr Asn His Ala
        35                  40                  45

Ile Val Gln Thr Leu Val His Val Met Asn Pro Glu Tyr Val Pro Lys
    50                  55                  60

Pro Cys Cys Ala Pro Thr Lys Val Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe
65                  70                  75                  80

Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val
                85                  90                  95

Arg Ala Cys Gly Cys His
            100
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 14:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 106 AMINOSÄUREN
(B) TYP: AMINOSÄURE
(C) STRÄNGIGKEIT: EINFACH
(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(III) HYPOTHETISCH: NEIN

(IV) ANTISENSE: NEIN

(Vi) ORIGINALQUELLE:

(A) ORGANISMUS: HOMO SAPIENS
(F) GEHIRN

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN
(B) LOKALISIERUNG: 1..106
(D) WEITERE INFORMATION:/MARKIERUNG = GDF 1-(FX)

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 14:

```
Cys Arg Ala Arg Arg Leu Tyr Val Ser Phe Arg Glu Val Gly Trp His
1               5                  10                  15
```

```
Arg Trp Val Ile Ala Pro Arg Gly Phe Leu Ala Asn Tyr Cys Gln Gly
            20                  25                  30

Gln Cys Ala Leu Pro Val Ala Leu Ser Gly Ser Gly Gly Pro Pro Ala
        35                  40                  45

Leu Asn His Ala Val Leu Arg Ala Leu Met His Ala Ala Ala Pro Gly
    50                  55                  60

Ala Ala Asp Leu Pro Cys Cys Val Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ile Ser
65                  70                  75                  80

Val Leu Phe Phe Asp Asn Ser Asp Asn Val Val Leu Arg Gln Tyr Glu
                85                  90                  95

Asp Met Val Val Asp Glu Cys Gly Cys Arg
            100                 105
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 15:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 5 AMINOSÄUREN
(B) TYP: AMINOSÄURE
(C) STRÄNGIGKEIT: EINFACH
(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PEPTID

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 15:

```
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
1               5
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 16:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 1822 BASENPAARE
(B) TYP: NUKLEINSÄURE
(C) STRÄNGIGKEIT: EINFACH
(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: CDNA
(III) HYPOTHETISCH: NEIN
(IV) ANTISENSE: NEIN
(Vi) ORIGINALQUELLE:

(A) ORGANISMUS: HOMO SAPIENS
(F) GEWEBSTYP: HIPPOCAMPUS

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDNA

(B) LOKALISIERUNG: 49..1341

(C) IDENTIFIZIERUNGSVERFAHREN: EXPERIMENTELL

(D) WEITERE INFORMATION:/MARKIERUNG = GDF 1-(FX)

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 16:

```
GGTGCGGGCC CGGAGCCCGG AGCCCGGGTA GCGCGTAGAG CCGGCGCG ATG CAC GTG      57
                                                      Met His Val
                                                        1

CGC TCA CTG CGA GCT GCG GCG CCG CAC AGC TTC GTG GCG CTC TGG GCA      105
Arg Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala Leu Trp Ala
      5                  10                  15

CCC CTG TTC CTG CTG CGC TCC GCC CTG GCC GAC TTC AGC CTG GAC AAC      153
Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser Leu Asp Asn
 20                  25                  30                  35

GAG GTG CAC TCG AGC TTC ATC CAC CGG CGC CTC CGC AGC CAG GAG CGG      201
Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser Gln Glu Arg
                 40                  45                  50

CGG GAG ATG CAG CGC GAG ATC CTC TCC ATT TTG GGC TTG CCC CAC CGC      249
Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu Pro His Arg
            55                  60                  65

CCG CGC CCG CAC CTC CAG GGC AAG CAC AAC TCG GCA CCC ATG TTC ATG      297
Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro Met Phe Met
        70                  75                  80

CTG GAC CTG TAC AAC GCC ATG GCG GTG GAG GAG GGC GGC GGG CCC GGC      345
Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly Gly Gly Pro Gly
     85                  90                  95

GGC CAG GGC TTC TCC TAC CCC TAC AAG GCC GTC TTC AGT ACC CAG GGC      393
Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser Thr Gln Gly
100                 105                 110                 115

CCC CCT CTG GCC AGC CTG CAA GAT AGC CAT TTC CTC ACC GAC GCC GAC      441
Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr Asp Ala Asp
                120                 125                 130

ATG GTC ATG AGC TTC GTC AAC CTC GTG GAA CAT GAC AAG GAA TTC TTC      489
Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys Glu Phe Phe
            135                 140                 145
```

```
CAC CCA CGC TAC CAC CAT CGA GAG TTC CGG TTT GAT CTT TCC AAG ATC      537
His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu Ser Lys Ile
        150                 155                 160

CCA GAA GGG GAA GCT GTC ACG GCA GCC GAA TTC CGG ATC TAC AAG GAC      585
Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Asp
    165                 170                 175

TAC ATC CGG GAA CGC TTC GAC AAT GAG ACG TTC CGG ATC AGC GTT TAT      633
Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile Ser Val Tyr
180                 185                 190                 195

CAG GTG CTC CAG GAG CAC TTG GGC AGG GAA TCG GAT CTC TTC CTG CTC      681
Gln Val Leu Gln Glu His Leu Gly Arg Glu Ser Asp Leu Phe Leu Leu
                200                 205                 210

GAC AGC CGT ACC CTC TGG GCC TCG GAG GAG GGC TGG CTG GTG TTT GAC      729
Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu Val Phe Asp
            215                 220                 225

ATC ACA GCC ACC AGC AAC CAC TGG GTG GTC AAT CCG CGG CAC AAC CTG      777
Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg His Asn Leu
        230                 235                 240

GGC CTG CAG CTC TCG GTG GAG ACG CTG GAT GGG CAG AGC ATC AAC CCC      825
Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser Ile Asn Pro
    245                 250                 255

AAG TTG GCG GGC CTG ATT GGG CGG CAC GGG CCC CAG AAC AAG CAG CCC      873
Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn Lys Gln Pro
260                 265                 270                 275

TTC ATG GTG GCT TTC TTC AAG GCC ACG GAG GTC CAC TTC CGC AGC ATC      921
Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe Arg Ser Ile
                280                 285                 290

CGG TCC ACG GGG AGC AAA CAG CGC AGC CAG AAC CGC TCC AAG ACG CCC      969
Arg Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro
            295                 300                 305

AAG AAC CAG GAA GCC CTG CGG ATG GCC AAC GTG GCA GAG AAC AGC AGC     1017
Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser
        310                 315                 320

AGC GAC CAG AGG CAG GCC TGT AAG AAG CAC GAG CTG TAT GTC AGC TTC     1065
Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe
    325                 330                 335

CGA GAC CTG GGC TGG CAG GAC TGG ATC ATC GCG CCT GAA GGC TAC GCC     1113
Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala
340                 345                 350                 355
```

```
GCC TAC TAC TGT GAG GGG GAG TGT GCC TTC CCT CTG AAC TCC TAC ATG      1161
Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met
                360                 365                 370

AAC GCC ACC AAC CAC GCC ATC GTG CAG ACG CTG GTC CAC TTC ATC AAC      1209
Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn
            375                 380                 385

CCG GAA ACG GTG CCC AAG CCC TGC TGT GCG CCC ACG CAG CTC AAT GCC      1257
Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala
        390                 395                 400

ATC TCC GTC CTC TAC TTC GAT GAC AGC TCC AAC GTC ATC CTG AAG AAA      1305
Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys
    405                 410                 415

TAC AGA AAC ATG GTG GTC CGG GCC TGT GGC TGC CAC TAGCTCCTCC           1351
Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
420                 425                 430

GAGAATTCAG ACCCTTTGGG GCCAAGTTTT TCTGGATCCT CCATTGCTCG CCTTGGCCAG    1411

GAACCAGCAG ACCAACTGCC TTTTGTGAGA CCTTCCCCTC CCTATCCCCA ACTTTAAAGG    1471

TGTGAGAGTA TTAGGAAACA TGAGCAGCAT ATGGCTTTTG ATCAGTTTTT CAGTGGCAGC    1531

ATCCAATGAA CAAGATCCTA CAAGCTGTGC AGGCAAAACC TAGCAGGAAA AAAAAACAAC    1591

GCATAAAGAA AAATGGCCGG GCCAGGTCAT TGGCTGGGAA GTCTCAGCCA TGCACGGACT    1651

CGTTTCCAGA GGTAATTATG AGCGCCTACC AGCCAGGCCA CCCAGCCGTG GGAGGAAGGG    1711

GGCGTGGCAA GGGGTGGGCA CATTGGTGTC TGTGCGAAAG GAAAATTGAC CCGGAAGTTC    1771

CTGTAATAAA TGTCACAATA AAACGAATGA ATGAAAAAAA AAAAAAAAAA A              1822
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 17:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 431 AMINOSÄUREN
- (B) TYP: AMINOSÄURE
- (C) STRÄNGIGKEIT: EINFACH
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 17:

```
Met His Val Arg Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala
 1               5                  10                  15
```

```
Leu Trp Ala Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser
            20                  25                  30

Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser
        35                  40                  45

Gln Glu Arg Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu
    50                  55                  60

Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro
65                  70                  75                  80

Met Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly Gly
                85                  90                  95

Gly Pro Gly Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser
            100                 105                 110

Thr Gln Gly Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr
        115                 120                 125

Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys
    130                 135                 140

Glu Phe Phe His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu
145                 150                 155                 160

Ser Lys Ile Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile
                165                 170                 175

Tyr Lys Asp Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile
            180                 185                 190

Ser Val Tyr Gln Val Leu Gln Glu His Leu Gly Arg Glu Ser Asp Leu
        195                 200                 205

Phe Leu Leu Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu
    210                 215                 220

Val Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg
225                 230                 235                 240

His Asn Leu Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser
                245                 250                 255

Ile Asn Pro Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn
            260                 265                 270

Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe
        275                 280                 285
```

```
Arg Ser Ile Arg Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser
    290                 295                 300

Lys Thr Pro Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu
305                 310                 315                 320

Asn Ser Ser Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr
                325                 330                 335

Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu
            340                 345                 350

Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn
        355                 360                 365

Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His
    370                 375                 380

Phe Ile Asn Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln
385                 390                 395                 400

Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile
                405                 410                 415

Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
            420                 425                 430
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 18:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1873 BASENPAARE
- (B) TYP: NUKLEINSÄURE
- (C) STRÄNGIGKEIT: EINFACH
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: CDNA

(III) HYPOTHETISCH: NEIN

(IV) ANTISENSE: NEIN

(Vi) ORIGINALQUELLE:

- (A) ORGANISMUS: MURIDAE
- (F) GEWEBSTYP: EMBRYO

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LOKALISIERUNG: 104..1393
- (D) WEITERE INFORMATION:/FUNKTION = „OSTEOGENETISCHES PROTEIN“/PRODUKT=“MOP1“/BEMERKUNG= „MOP1 (CDNA)“

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 18:

```
CTGCAGCAAG TGACCTCGGG TCGTGGACCG CTGCCCTGCC CCCTCCGCTG CCACCTGGGG      60

CGGCGCGGGC CCGGTGCCCC GGATCGCGCG TAGAGCCGGC GCG ATG CAC GTC CGC       115
                                                Met His Val Arg
                                                  1

TCG CTG CGC GCT GCG GCG CCA CAC AGC TTC GTG GCG CTC TGG GCG CCT       163
Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala Leu Trp Ala Pro
  5                  10                  15                  20

CTG TTC TTG CTG CGC TCC GCC CTG GCC GAT TTC AGC CTG GAC AAC GAG       211
Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser Leu Asp Asn Glu
                 25                  30                  35

GTG CAC TCC AGC TTC ATC CAC CGG CGC CTC CGC AGC CAG GAG CGG CGG       259
Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser Gln Glu Arg Arg
             40                  45                  50

GAG ATG CAG CGG GAG ATC CTG TCC ATC TTA GGG TTG CCC CAT CGC CCG       307
Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu Pro His Arg Pro
         55                  60                  65

CGC CCG CAC CTC CAG GGA AAG CAT AAT TCG GCG CCC ATG TTC ATG TTG       355
Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro Met Phe Met Leu
     70                  75                  80

GAC CTG TAC AAC GCC ATG GCG GTG GAG GAG AGC GGG CCG GAC GGA CAG       403
Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Ser Gly Pro Asp Gly Gln
 85                  90                  95                  100

GGC TTC TCC TAC CCC TAC AAG GCC GTC TTC AGT ACC CAG GGC CCC CCT       451
Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser Thr Gln Gly Pro Pro
                105                 110                 115

TTA GCC AGC CTG CAG GAC AGC CAT TTC CTC ACT GAC GCC GAC ATG GTC       499
Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr Asp Ala Asp Met Val
            120                 125                 130

ATG AGC TTC GTC AAC CTA GTG GAA CAT GAC AAA GAA TTC TTC CAC CCT       547
Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys Glu Phe Phe His Pro
        135                 140                 145

CGA TAC CAC CAT CGG GAG TTC CGG TTT GAT CTT TCC AAG ATC CCC GAG       595
Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu Ser Lys Ile Pro Glu
    150                 155                 160

GGC GAA CGG GTG ACC GCA GCC GAA TTC AGG ATC TAT AAG GAC TAC ATC       643
Gly Glu Arg Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Asp Tyr Ile
165                 170                 175                 180
```

```
CGG GAG CGA TTT GAC AAC GAG ACC TTC CAG ATC ACA GTC TAT CAG GTG        691
Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Gln Ile Thr Val Tyr Gln Val
                185                 190                 195

CTC CAG GAG CAC TCA GGC AGG GAG TCG GAC CTC TTC TTG CTG GAC AGC        739
Leu Gln Glu His Ser Gly Arg Glu Ser Asp Leu Phe Leu Leu Asp Ser
            200                 205                 210

CGC ACC ATC TGG GCT TCT GAG GAG GGC TGG TTG GTG TTT GAT ATC ACA        787
Arg Thr Ile Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu Val Phe Asp Ile Thr
        215                 220                 225

GCC ACC AGC AAC CAC TGG GTG GTC AAC CCT CGG CAC AAC CTG GGC TTA        835
Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg His Asn Leu Gly Leu
    230                 235                 240

CAG CTC TCT GTG GAG ACC CTG GAT GGG CAG AGC ATC AAC CCC AAG TTG        883
Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser Ile Asn Pro Lys Leu
245                 250                 255                 260

GCA GGC CTG ATT GGA CGG CAT GGA CCC CAG AAC AAG CAA CCC TTC ATG        931
Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn Lys Gln Pro Phe Met
                265                 270                 275

GTG GCC TTC TTC AAG GCC ACG GAA GTC CAT CTC CGT AGT ATC CGG TCC        979
Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Leu Arg Ser Ile Arg Ser
            280                 285                 290

ACG GGG GGC AAG CAG CGC AGC CAG AAT CGC TCC AAG ACG CCA AAG AAC       1027
Thr Gly Gly Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys Asn
        295                 300                 305

CAA GAG GCC CTG AGG ATG GCC AGT GTG GCA GAA AAC AGC AGC AGT GAC       1075
Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Ser Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser Asp
    310                 315                 320

CAG AGG CAG GCC TGC AAG AAA CAT GAG CTG TAC GTC AGC TTC CGA GAC       1123
Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp
325                 330                 335                 340

CTT GGC TGG CAG GAC TGG ATC ATT GCA CCT GAA GGC TAT GCT GCC TAC       1171
Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr
                345                 350                 355

TAC TGT GAG GGA GAG TGC GCC TTC CCT CTG AAC TCC TAC ATG AAC GCC       1219
Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala
            360                 365                 370

ACC AAC CAC GCC ATC GTC CAG ACA CTG GTT CAC TTC ATC AAC CCA GAC       1267
Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro Asp
        375                 380                 385
```

```
ACA GTA CCC AAG CCC TGC TGT GCG CCC ACC CAG CTC AAC GCC ATC TCT      1315
Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile Ser
    390                 395                 400

GTC CTC TAC TTC GAC GAC AGC TCT AAT GTC GAC CTG AAG AAG TAC AGA      1363
Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Asp Leu Lys Lys Tyr Arg
405                 410                 415                 420

AAC ATG GTG GTC CGG GCC TGT GGC TGC CAC TAGCTCTTCC TGAGACCCTG        1413
Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
                425                 430

ACCTTTGCGG GGCCACACCT TTCCAAATCT TCGATGTCTC ACCATCTAAG TCTCTCACTG    1473

CCCACCTTGG CGAGGAGAAC AGACCAACCT CTCCTGAGCC TTCCCTCACC TCCCAACCGG    1533

AAGCATGTAA GGGTTCCAGA AACCTGAGCG TGCAGCAGCT GATGAGCGCC CTTTCCTTCT    1593

GGCACGTGAC GGACAAGATC CTACCAGCTA CCACAGCAAA CGCCTAAGAG CAGGAAAAAT    1653

GTCTGCCAGG AAAGTGTCCA GTGTCCACAT GGCCCCTGGC GCTCTGAGTC TTTGAGGAGT    1713

AATCGCAAGC CTCGTTCAGC TGCAGCAGAA GGAAGGGCTT AGCCAGGGTG GGCGCTGGCG    1773

TCTGTGTTGA AGGGAAACCA AGCAGAAGCC ACTGTAATGA TATGTCACAA TAAAACCCAT    1833

GAATGAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAGAATTC                          1873
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 19:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 430 AMINOSÄUREN
- (B) TYP: AMINOSÄURE
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 19:

```
Met His Val Arg Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala
  1               5                  10                  15

Leu Trp Ala Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser
            20                  25                  30

Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser
        35                  40                  45

Gln Glu Arg Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu
    50                  55                  60
```

```
Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro
 65                  70                  75                  80

Met Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Ser Gly
                85                  90                  95

Pro Asp Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser Thr
            100                 105                 110

Gln Gly Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr Asp
        115                 120                 125

Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys Glu
    130                 135                 140

Phe Phe His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu Ser
145                 150                 155                 160

Lys Ile Pro Glu Gly Glu Arg Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr
                165                 170                 175

Lys Asp Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Gln Ile Thr
            180                 185                 190

Val Tyr Gln Val Leu Gln Glu His Ser Gly Arg Glu Ser Asp Leu Phe
        195                 200                 205

Leu Leu Asp Ser Arg Thr Ile Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu Val
    210                 215                 220

Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg His
225                 230                 235                 240

Asn Leu Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser Ile
                245                 250                 255

Asn Pro Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn Lys
            260                 265                 270

Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Leu Arg
        275                 280                 285

Ser Ile Arg Ser Thr Gly Gly Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys
    290                 295                 300

Thr Pro Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Ser Val Ala Glu Asn
305                 310                 315                 320

Ser Ser Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val
                325                 330                 335
```

```
Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly
            340                 345                 350

Tyr Ala Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser
        355                 360                 365

Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe
    370                 375                 380

Ile Asn Pro Asp Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu
385                 390                 395                 400

Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Asp Leu
                405                 410                 415

Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
            420                 425                 430
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 20:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1723 BASENPAARE
- (B) TYP: NUKLEINSÄURE
- (C) STRÄNGIGKEIT: EINFACH
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(Vi) ORIGINALQUELLE:

- (A) ORGANISMUS: HOMO SAPIENS
- (F) GEWEBSTYP: HIPPOCAMPUS

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LOKALISIERUNG: 490..1696
- (D) WEITERE INFORMATION:/FUNKTION = „OSTEOGENETISCHES PROTEIN“/PRODUKT=“HOP2-PP“/BEMERKUNG= „HOP2 (CDNA)“

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 20:

```
GGCGCCGGCA GAGCAGGAGT GGCTGGAGGA GCTGTGGTTG GAGCAGGAGG TGGCACGGCA     60

GGGCTGGAGG GCTCCCTATG AGTGGCGGAG ACGGCCCAGG AGGCGCTGGA GCAACAGCTC    120

CCACACCGCA CCAAGCGGTG GCTGCAGGAG CTCGCCCATC GCCCCTGCGC TGCTCGGACC    180

GCGGCCACAG CCGGACTGGC GGGTACGGCG GCGACAGAGG CATTGGCCGA GAGTCCCAGT    240
```

```
CCGCAGAGTA GCCCCGGCCT CGAGGCGGTG GCGTCCCGGT CCTCTCCGTC CAGGAGCCAG      300

GACAGGTGTC GCGCGGCGGG GCTCCAGGGA CCGCGCCTGA GGCCGGCTGC CCGCCCGTCC      360

CGCCCCGCCC CGCCGCCCGC CGCCCGCCGA GCCCAGCCTC CTTGCCGTCG GGGCGTCCCC      420

AGGCCCTGGG TCGGCCGCGG AGCCGATGCG CGCCCGCTGA GCGCCCCAGC TGAGCGCCCC      480

CGGCCTGCC ATG ACC GCG CTC CCC GGC CCG CTC TGG CTC CTG GGC CTG           528
          Met Thr Ala Leu Pro Gly Pro Leu Trp Leu Leu Gly Leu
            1               5                  10

GCG CTA TGC GCG CTG GGC GGG GGC GGC CCC GGC CTG CGA CCC CCG CCC        576
Ala Leu Cys Ala Leu Gly Gly Gly Gly Pro Gly Leu Arg Pro Pro Pro
     15                  20                  25

GGC TGT CCC CAG CGA CGT CTG GGC GCG CGC GAG CGC CGG GAC GTG CAG        624
Gly Cys Pro Gln Arg Arg Leu Gly Ala Arg Glu Arg Arg Asp Val Gln
 30                  35                  40                  45

CGC GAG ATC CTG GCG GTG CTC GGG CTG CCT GGG CGG CCC CGG CCC CGC        672
Arg Glu Ile Leu Ala Val Leu Gly Leu Pro Gly Arg Pro Arg Pro Arg
                50                  55                  60

GCG CCA CCC GCC GCC TCC CGG CTG CCC GCG TCC GCG CCG CTC TTC ATG        720
Ala Pro Pro Ala Ala Ser Arg Leu Pro Ala Ser Ala Pro Leu Phe Met
            65                  70                  75

CTG GAC CTG TAC CAC GCC ATG GCC GGC GAC GAC GAC GAG GAC GGC GCG        768
Leu Asp Leu Tyr His Ala Met Ala Gly Asp Asp Asp Glu Asp Gly Ala
        80                  85                  90

CCC GCG GAG CGG CGC CTG GGC CGC GCC GAC CTG GTC ATG AGC TTC GTT        816
Pro Ala Glu Arg Arg Leu Gly Arg Ala Asp Leu Val Met Ser Phe Val
     95                  100                 105

AAC ATG GTG GAG CGA GAC CGT GCC CTG GGC CAC CAG GAG CCC CAT TGG        864
Asn Met Val Glu Arg Asp Arg Ala Leu Gly His Gln Glu Pro His Trp
110                 115                 120                 125

AAG GAG TTC CGC TTT GAC CTG ACC CAG ATC CCG GCT GGG GAG GCG GTC        912
Lys Glu Phe Arg Phe Asp Leu Thr Gln Ile Pro Ala Gly Glu Ala Val
                130                 135                 140

ACA GCT GCG GAG TTC CGG ATT TAC AAG GTG CCC AGC ATC CAC CTG CTC        960
Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Val Pro Ser Ile His Leu Leu
            145                 150                 155

AAC AGG ACC CTC CAC GTC AGC ATG TTC CAG GTG GTC CAG GAG CAG TCC       1008
Asn Arg Thr Leu His Val Ser Met Phe Gln Val Val Gln Glu Gln Ser
        160                 165                 170
```

```
AAC AGG GAG TCT GAC TTG TTC TTT TTG GAT CTT CAG ACG CTC CGA GCT      1056
Asn Arg Glu Ser Asp Leu Phe Phe Leu Asp Leu Gln Thr Leu Arg Ala
    175                 180                 185

GGA GAC GAG GGC TGG CTG GTG CTG GAT GTC ACA GCA GCC AGT GAC TGC      1104
Gly Asp Glu Gly Trp Leu Val Leu Asp Val Thr Ala Ala Ser Asp Cys
190                 195                 200                 205

TGG TTG CTG AAG CGT CAC AAG GAC CTG GGA CTC CGC CTC TAT GTG GAG      1152
Trp Leu Leu Lys Arg His Lys Asp Leu Gly Leu Arg Leu Tyr Val Glu
                210                 215                 220

ACT GAG GAC GGG CAC AGC GTG GAT CCT GGC CTG GCC GGC CTG CTG GGT      1200
Thr Glu Asp Gly His Ser Val Asp Pro Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly
            225                 230                 235

CAA CGG GCC CCA CGC TCC CAA CAG CCT TTC GTG GTC ACT TTC TTC AGG      1248
Gln Arg Ala Pro Arg Ser Gln Gln Pro Phe Val Val Thr Phe Phe Arg
        240                 245                 250

GCC AGT CCG AGT CCC ATC CGC ACC CCT CGG GCA GTG AGG CCA CTG AGG      1296
Ala Ser Pro Ser Pro Ile Arg Thr Pro Arg Ala Val Arg Pro Leu Arg
    255                 260                 265

AGG AGG CAG CCG AAG AAA AGC AAC GAG CTG CCG CAG GCC AAC CGA CTC      1344
Arg Arg Gln Pro Lys Lys Ser Asn Glu Leu Pro Gln Ala Asn Arg Leu
270                 275                 280                 285

CCA GGG ATC TTT GAT GAC GTC CAC GGC TCC CAC GGC CGG CAG GTC TGC      1392
Pro Gly Ile Phe Asp Asp Val His Gly Ser His Gly Arg Gln Val Cys
                290                 295                 300

CGT CGG CAC GAG CTC TAC GTC AGC TTC CAG GAC CTC GGC TGG CTG GAC      1440
Arg Arg His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln Asp Leu Gly Trp Leu Asp
            305                 310                 315

TGG GTC ATC GCT CCC CAA GGC TAC TCG GCC TAT TAC TGT GAG GGG GAG      1488
Trp Val Ile Ala Pro Gln Gly Tyr Ser Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu
        320                 325                 330

TGC TCC TTC CCA CTG GAC TCC TGC ATG AAT GCC ACC AAC CAC GCC ATC      1536
Cys Ser Phe Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile
    335                 340                 345

CTG CAG TCC CTG GTG CAC CTG ATG AAG CCA AAC GCA GTC CCC AAG GCG      1584
Leu Gln Ser Leu Val His Leu Met Lys Pro Asn Ala Val Pro Lys Ala
350                 355                 360                 365
```

```
TGC TGT GCA CCC ACC AAG CTG AGC GCC ACC TCT GTG CTC TAC TAT GAC      1632
Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Ser Ala Thr Ser Val Leu Tyr Tyr Asp
                370                 375                 380

AGC AGC AAC AAC GTC ATC CTG CGC AAA GCC CGC AAC ATG GTG GTC AAG      1680
Ser Ser Asn Asn Val Ile Leu Arg Lys Ala Arg Asn Met Val Val Lys
            385                 390                 395

GCC TGC GGC TGC CAC T GAGTCAGCCC GCCCAGCCCT ACTGCAG                  1723
Ala Cys Gly Cys His
        400
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 21:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 402 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 21:

```
Met Thr Ala Leu Pro Gly Pro Leu Trp Leu Leu Gly Leu Ala Leu Cys
 1               5                  10                  15

Ala Leu Gly Gly Gly Gly Pro Gly Leu Arg Pro Pro Pro Gly Cys Pro
            20                  25                  30

Gln Arg Arg Leu Gly Ala Arg Glu Arg Arg Asp Val Gln Arg Glu Ile
        35                  40                  45

Leu Ala Val Leu Gly Leu Pro Gly Arg Pro Arg Pro Arg Ala Pro Pro
    50                  55                  60

Ala Ala Ser Arg Leu Pro Ala Ser Ala Pro Leu Phe Met Leu Asp Leu
65                  70                  75                  80

Tyr His Ala Met Ala Gly Asp Asp Asp Glu Asp Gly Ala Pro Ala Glu
                85                  90                  95

Arg Arg Leu Gly Arg Ala Asp Leu Val Met Ser Phe Val Asn Met Val
            100                 105                 110

Glu Arg Asp Arg Ala Leu Gly His Gln Glu Pro His Trp Lys Glu Phe
        115                 120                 125

Arg Phe Asp Leu Thr Gln Ile Pro Ala Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala
    130                 135                 140
```

Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Val Pro Ser Ile His Leu Leu Asn Arg Thr
145 150 155 160

Leu His Val Ser Met Phe Gln Val Val Gln Glu Gln Ser Asn Arg Glu
165 170 175

Ser Asp Leu Phe Phe Leu Asp Leu Gln Thr Leu Arg Ala Gly Asp Glu
180 185 190

Gly Trp Leu Val Leu Asp Val Thr Ala Ala Ser Asp Cys Trp Leu Leu
195 200 205

Lys Arg His Lys Asp Leu Gly Leu Arg Leu Tyr Val Glu Thr Glu Asp
210 215 220

Gly His Ser Val Asp Pro Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly Gln Arg Ala
225 230 235 240

Pro Arg Ser Gln Gln Pro Phe Val Val Thr Phe Phe Arg Ala Ser Pro
245 250 255

Ser Pro Ile Arg Thr Pro Arg Ala Val Arg Pro Leu Arg Arg Arg Gln
260 265 270

Pro Lys Lys Ser Asn Glu Leu Pro Gln Ala Asn Arg Leu Pro Gly Ile
275 280 285

Phe Asp Asp Val His Gly Ser His Gly Arg Gln Val Cys Arg Arg His
290 295 300

Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln Asp Leu Gly Trp Leu Asp Trp Val Ile
305 310 315 320

Ala Pro Gln Gly Tyr Ser Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ser Phe
325 330 335

Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Leu Gln Ser
340 345 350

Leu Val His Leu Met Lys Pro Asn Ala Val Pro Lys Ala Cys Cys Ala
355 360 365

Pro Thr Lys Leu Ser Ala Thr Ser Val Leu Tyr Tyr Asp Ser Ser Asn
370 375 380

Asn Val Ile Leu Arg Lys Ala Arg Asn Met Val Val Lys Ala Cys Gly
385 390 395 400

Cys His

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 22:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 1926 BASENPAARE
(B) TYP: NUKLEINSÄURE
(C) STRÄNGIGKEIT: EINFACH
(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(Vi) ORIGINALQUELLE:

(A) ORGANISMUS: MURIDAE
(F) GEWEBSTYP: EMBRYO

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LOKALISIERUNG: 93..1289
(D) WEITERE INFORMATION:/FUNKTION = „OSTEOGENETISCHES PROTEIN"/PRODUKT="MOP2-PP"/BEMERKUNG= „MOP2 (CDNA)"

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 22:

```
GCCAGGCACA GGTGCGCCGT CTGGTCCTCC CCGTCTGGCG TCAGCCGAGC CCGACCAGCT      60

ACCAGTGGAT GCGCGCCGGC TGAAAGTCCG AG ATG GCT ATG CGT CCC GGG CCA       113
                                    Met Ala Met Arg Pro Gly Pro
                                      1               5

CTC TGG CTA TTG GGC CTT GCT CTG TGC GCG CTG GGA GGC GGC CAC GGT       161
Leu Trp Leu Leu Gly Leu Ala Leu Cys Ala Leu Gly Gly Gly His Gly
         10                  15                  20

CCG CGT CCC CCG CAC ACC TGT CCC CAG CGT CGC CTG GGA GCG CGC GAG       209
Pro Arg Pro Pro His Thr Cys Pro Gln Arg Arg Leu Gly Ala Arg Glu
     25                  30                  35

CGC CGC GAC ATG CAG CGT GAA ATC CTG GCG GTG CTC GGG CTA CCG GGA       257
Arg Arg Asp Met Gln Arg Glu Ile Leu Ala Val Leu Gly Leu Pro Gly
 40                  45                  50                  55

CGG CCC CGA CCC CGT GCA CAA CCC GCC GCT GCC CGG CAG CCA GCG TCC       305
Arg Pro Arg Pro Arg Ala Gln Pro Ala Ala Ala Arg Gln Pro Ala Ser
                 60                  65                  70

GCG CCC CTC TTC ATG TTG GAC CTA TAC CAC GCC ATG ACC GAT GAC GAC       353
Ala Pro Leu Phe Met Leu Asp Leu Tyr His Ala Met Thr Asp Asp Asp
             75                  80                  85

GAC GGC GGG CCA CCA CAG GCT CAC TTA GGC CGT GCC GAC CTG GTC ATG       401
Asp Gly Gly Pro Pro Gln Ala His Leu Gly Arg Ala Asp Leu Val Met
         90                  95                  100
```

```
AGC TTC GTC AAC ATG GTG GAA CGC GAC CGT ACC CTG GGC TAC CAG GAG        449
Ser Phe Val Asn Met Val Glu Arg Asp Arg Thr Leu Gly Tyr Gln Glu
    105                 110                 115

CCA CAC TGG AAG GAA TTC CAC TTT GAC CTA ACC CAG ATC CCT GCT GGG        497
Pro His Trp Lys Glu Phe His Phe Asp Leu Thr Gln Ile Pro Ala Gly
120                 125                 130                 135

GAG GCT GTC ACA GCT GCT GAG TTC CGG ATC TAC AAA GAA CCC AGC ACC        545
Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Glu Pro Ser Thr
                140                 145                 150

CAC CCG CTC AAC ACA ACC CTC CAC ATC AGC ATG TTC GAA GTG GTC CAA        593
His Pro Leu Asn Thr Thr Leu His Ile Ser Met Phe Glu Val Val Gln
            155                 160                 165

GAG CAC TCC AAC AGG GAG TCT GAC TTG TTC TTT TTG GAT CTT CAG ACG        641
Glu His Ser Asn Arg Glu Ser Asp Leu Phe Phe Leu Asp Leu Gln Thr
        170                 175                 180

CTC CGA TCT GGG GAC GAG GGC TGG CTG GTG CTG GAC ATC ACA GCA GCC        689
Leu Arg Ser Gly Asp Glu Gly Trp Leu Val Leu Asp Ile Thr Ala Ala
    185                 190                 195

AGT GAC CGA TGG CTG CTG AAC CAT CAC AAG GAC CTG GGA CTC CGC CTC        737
Ser Asp Arg Trp Leu Leu Asn His His Lys Asp Leu Gly Leu Arg Leu
200                 205                 210                 215

TAT GTG GAA ACC GCG GAT GGG CAC AGC ATG GAT CCT GGC CTG GCT GGT        785
Tyr Val Glu Thr Ala Asp Gly His Ser Met Asp Pro Gly Leu Ala Gly
                220                 225                 230

CTG CTT GGA CGA CAA GCA CCA CGC TCC AGA CAG CCT TTC ATG GTA ACC        833
Leu Leu Gly Arg Gln Ala Pro Arg Ser Arg Gln Pro Phe Met Val Thr
            235                 240                 245

TTC TTC AGG GCC AGC CAG AGT CCT GTG CGG GCC CCT CGG GCA GCG AGA        881
Phe Phe Arg Ala Ser Gln Ser Pro Val Arg Ala Pro Arg Ala Ala Arg
        250                 255                 260

CCA CTG AAG AGG AGG CAG CCA AAG AAA ACG AAC GAG CTT CCG CAC CCC        929
Pro Leu Lys Arg Arg Gln Pro Lys Lys Thr Asn Glu Leu Pro His Pro
    265                 270                 275

AAC AAA CTC CCA GGG ATC TTT GAT GAT GGC CAC GGT TCC CGC GGC AGA        977
Asn Lys Leu Pro Gly Ile Phe Asp Asp Gly His Gly Ser Arg Gly Arg
280                 285                 290                 295

GAG GTT TGC CGC AGG CAT GAG CTC TAC GTC AGC TTC CGT GAC CTT GGC       1025
Glu Val Cys Arg Arg His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly
                300                 305                 310
```

```
TGG CTG GAC TGG GTC ATC GCC CCC CAG GGC TAC TCT GCC TAT TAC TGT      1073
Trp Leu Asp Trp Val Ile Ala Pro Gln Gly Tyr Ser Ala Tyr Tyr Cys
            315                 320                 325

GAG GGG GAG TGT GCT TTC CCA CTG GAC TCC TGT ATG AAC GCC ACC AAC      1121
Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn Ala Thr Asn
        330                 335                 340

CAT GCC ATC TTG CAG TCT CTG GTG CAC CTG ATG AAG CCA GAT GTT GTC      1169
His Ala Ile Leu Gln Ser Leu Val His Leu Met Lys Pro Asp Val Val
    345                 350                 355

CCC AAG GCA TGC TGT GCA CCC ACC AAA CTG AGT GCC ACC TCT GTG CTG      1217
Pro Lys Ala Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Ser Ala Thr Ser Val Leu
360                 365                 370                 375

TAC TAT GAC AGC AGC AAC AAT GTC ATC CTG CGT AAA CAC CGT AAC ATG      1265
Tyr Tyr Asp Ser Ser Asn Asn Val Ile Leu Arg Lys His Arg Asn Met
                380                 385                 390

GTG GTC AAG GCC TGT GGC TGC CAC TGAGGCCCCG CCCAGCATCC TGCTTCTACT     1319
Val Val Lys Ala Cys Gly Cys His
            395

ACCTTACCAT CTGGCCGGGC CCCTCTCCAG AGGCAGAAAC CCTTCTATGT TATCATAGCT    1379

CAGACAGGGG CAATGGGAGG CCCTTCACTT CCCCTGGCCA CTTCCTGCTA AAATTCTGGT    1439

CTTTCCCAGT TCCTCTGTCC TTCATGGGGT TTCGGGGCTA TCACCCCGCC CTCTCCATCC    1499

TCCTACCCCA AGCATAGACT GAATGCACAC AGCATCCCAG AGCTATGCTA ACTGAGAGGT    1559

CTGGGGTCAG CACTGAAGGC CCACATGAGG AAGACTGATC CTTGGCCATC CTCAGCCCAC    1619

AATGGCAAAT TCTGGATGGT CTAAGAAGGC CCTGGAATTC TAAACTAGAT GATCTGGGCT    1679

CTCTGCACCA TTCATTGTGG CAGTTGGGAC ATTTTTAGGT ATAACAGACA CATACACTTA    1739

GATCAATGCA TCGCTGTACT CCTTGAAATC AGAGCTAGCT TGTTAGAAAA AGAATCAGAG    1799

CCAGGTATAG CGGTGCATGT CATTAATCCC AGCGCTAAAG AGACAGAGAC AGGAGAATCT    1859

CTGTGAGTTC AAGGCCACAT AGAAAGAGCC TGTCTCGGGA GCAGGAAAAA AAAAAAAAAC    1919

GGAATTC                                                              1926
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 23:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 399 AMINOSÄUREN
- (B) TYP: AMINOSÄURE
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 23:

```
Met Ala Met Arg Pro Gly Pro Leu Trp Leu Leu Gly Leu Ala Leu Cys
 1               5                  10                  15

Ala Leu Gly Gly Gly His Gly Pro Arg Pro Pro His Thr Cys Pro Gln
            20                  25                  30

Arg Arg Leu Gly Ala Arg Glu Arg Arg Asp Met Gln Arg Glu Ile Leu
        35                  40                  45

Ala Val Leu Gly Leu Pro Gly Arg Pro Arg Pro Arg Ala Gln Pro Ala
    50                  55                  60

Ala Ala Arg Gln Pro Ala Ser Ala Pro Leu Phe Met Leu Asp Leu Tyr
65                  70                  75                  80

His Ala Met Thr Asp Asp Asp Asp Gly Gly Pro Pro Gln Ala His Leu
                85                  90                  95

Gly Arg Ala Asp Leu Val Met Ser Phe Val Asn Met Val Glu Arg Asp
            100                 105                 110

Arg Thr Leu Gly Tyr Gln Glu Pro His Trp Lys Glu Phe His Phe Asp
        115                 120                 125

Leu Thr Gln Ile Pro Ala Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg
    130                 135                 140

Ile Tyr Lys Glu Pro Ser Thr His Pro Leu Asn Thr Thr Leu His Ile
145                 150                 155                 160

Ser Met Phe Glu Val Val Gln Glu His Ser Asn Arg Glu Ser Asp Leu
                165                 170                 175

Phe Phe Leu Asp Leu Gln Thr Leu Arg Ser Gly Asp Glu Gly Trp Leu
            180                 185                 190

Val Leu Asp Ile Thr Ala Ala Ser Asp Arg Trp Leu Leu Asn His His
        195                 200                 205

Lys Asp Leu Gly Leu Arg Leu Tyr Val Glu Thr Ala Asp Gly His Ser
    210                 215                 220
```

```
Met Asp Pro Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly Arg Gln Ala Pro Arg Ser
225                 230                 235                 240

Arg Gln Pro Phe Met Val Thr Phe Phe Arg Ala Ser Gln Ser Pro Val
                245                 250                 255

Arg Ala Pro Arg Ala Ala Arg Pro Leu Lys Arg Arg Gln Pro Lys Lys
            260                 265                 270

Thr Asn Glu Leu Pro His Pro Asn Lys Leu Pro Gly Ile Phe Asp Asp
        275                 280                 285

Gly His Gly Ser Arg Gly Arg Glu Val Cys Arg Arg His Glu Leu Tyr
    290                 295                 300

Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Leu Asp Trp Val Ile Ala Pro Gln
305                 310                 315                 320

Gly Tyr Ser Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asp
                325                 330                 335

Ser Cys Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Leu Gln Ser Leu Val His
            340                 345                 350

Leu Met Lys Pro Asp Val Val Pro Lys Ala Cys Cys Ala Pro Thr Lys
        355                 360                 365

Leu Ser Ala Thr Ser Val Leu Tyr Tyr Asp Ser Ser Asn Asn Val Ile
    370                 375                 380

Leu Arg Lys His Arg Asn Met Val Val Lys Ala Cys Gly Cys His
385                 390                 395
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 24:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1368 BASENPAARE
- (B) TYP: NUKLEINSÄURE
- (C) STRÄNGIGKEIT: EINFACH
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: CDNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LOKALISIERUNG: 1..1368

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 24:

```
ATG TCG GGA CTG CGA AAC ACC TCG GAG GCC GTT GCA GTG CTC GCC TCC        48
Met Ser Gly Leu Arg Asn Thr Ser Glu Ala Val Ala Val Leu Ala Ser
 1               5                  10                  15

CTG GGA CTC GGA ATG GTT CTG CTC ATG TTC GTG GCG ACC ACG CCG CCG        96
Leu Gly Leu Gly Met Val Leu Leu Met Phe Val Ala Thr Thr Pro Pro
            20                  25                  30

GCC GTT GAG GCC ACC CAG TCG GGG ATT TAC ATA GAC AAC GGC AAG GAC       144
Ala Val Glu Ala Thr Gln Ser Gly Ile Tyr Ile Asp Asn Gly Lys Asp
        35                  40                  45

CAG ACG ATC ATG CAC AGA GTG CTG AGC GAG GAC GAC AAG CTG GAC GTC       192
Gln Thr Ile Met His Arg Val Leu Ser Glu Asp Asp Lys Leu Asp Val
    50                  55                  60

TCG TAC GAG ATC CTC GAG TTC CTG GGC ATC GCC GAA CGG CCG ACG CAC       240
Ser Tyr Glu Ile Leu Glu Phe Leu Gly Ile Ala Glu Arg Pro Thr His
65                  70                  75                  80

CTG AGC AGC CAC CAG TTG TCG CTG AGG AAG TCG GCT CCC AAG TTC CTG       288
Leu Ser Ser His Gln Leu Ser Leu Arg Lys Ser Ala Pro Lys Phe Leu
                85                  90                  95

CTG GAC GTC TAC CAC CGC ATC ACG GCG GAG GAG GGT CTC AGC GAT CAG       336
Leu Asp Val Tyr His Arg Ile Thr Ala Glu Glu Gly Leu Ser Asp Gln
            100                 105                 110

GAT GAG GAC GAC GAC TAC GAA CGC GGC CAT CGG TCC AGG AGG AGC GCC       384
Asp Glu Asp Asp Asp Tyr Glu Arg Gly His Arg Ser Arg Arg Ser Ala
        115                 120                 125

GAC CTC GAG GAG GAT GAG GGC GAG CAG CAG AAG AAC TTC ATC ACC GAC       432
Asp Leu Glu Glu Asp Glu Gly Glu Gln Gln Lys Asn Phe Ile Thr Asp
    130                 135                 140

CTG GAC AAG CGG GCC ATC GAC GAG AGC GAC ATC ATC ATG ACC TTC CTG       480
Leu Asp Lys Arg Ala Ile Asp Glu Ser Asp Ile Ile Met Thr Phe Leu
145                 150                 155                 160

AAC AAG CGC CAC CAC AAT GTG GAC GAA CTG CGT CAC GAG CAC GGC CGT       528
Asn Lys Arg His His Asn Val Asp Glu Leu Arg His Glu His Gly Arg
                165                 170                 175

CGC CTG TGG TTC GAC GTC TCC AAC GTG CCC AAC GAC AAC TAC CTG GTG       576
Arg Leu Trp Phe Asp Val Ser Asn Val Pro Asn Asp Asn Tyr Leu Val
            180                 185                 190

ATG GCC GAG CTG CGC ATC TAT CAG AAC GCC AAC GAG GGC AAG TGG CTG       624
Met Ala Glu Leu Arg Ile Tyr Gln Asn Ala Asn Glu Gly Lys Trp Leu
        195                 200                 205
```

```
ACC GCC AAC AGG GAG TTC ACC ATC ACG GTA TAC GCC ATT GGC ACC GGC          672
Thr Ala Asn Arg Glu Phe Thr Ile Thr Val Tyr Ala Ile Gly Thr Gly
    210                 215                 220

ACG CTG GGC CAG CAC ACC ATG GAG CCG CTG TCC TCG GTG AAC ACC ACC          720
Thr Leu Gly Gln His Thr Met Glu Pro Leu Ser Ser Val Asn Thr Thr
225                 230                 235                 240

GGG GAC TAC GTG GGC TGG TTG GAG CTC AAC GTG ACC GAG GGC CTG CAC          768
Gly Asp Tyr Val Gly Trp Leu Glu Leu Asn Val Thr Glu Gly Leu His
                245                 250                 255

GAG TGG CTG GTC AAG TCG AAG GAC AAT CAT GGC ATC TAC ATT GGA GCA          816
Glu Trp Leu Val Lys Ser Lys Asp Asn His Gly Ile Tyr Ile Gly Ala
            260                 265                 270

CAC GCT GTC AAC CGA CCC GAC CGC GAG GTG AAG CTG GAC GAC ATT GGA          864
His Ala Val Asn Arg Pro Asp Arg Glu Val Lys Leu Asp Asp Ile Gly
        275                 280                 285

CTG ATC CAC CGC AAG GTG GAC GAC GAG TTC CAG CCC TTC ATG ATC GGC          912
Leu Ile His Arg Lys Val Asp Asp Glu Phe Gln Pro Phe Met Ile Gly
    290                 295                 300

TTC TTC CGC GGA CCG GAG CTG ATC AAG GCG ACG GCC CAC AGC AGC CAC          960
Phe Phe Arg Gly Pro Glu Leu Ile Lys Ala Thr Ala His Ser Ser His
305                 310                 315                 320

CAC AGG AGC AAG CGA AGC GCC AGC CAT CCA CGC AAG CGC AAG AAG TCG         1008
His Arg Ser Lys Arg Ser Ala Ser His Pro Arg Lys Arg Lys Lys Ser
                325                 330                 335

GTG TCG CCC AAC AAC GTG CCG CTG CTG GAA CCG ATG GAG AGC ACG CGC         1056
Val Ser Pro Asn Asn Val Pro Leu Leu Glu Pro Met Glu Ser Thr Arg
            340                 345                 350

AGC TGC CAG ATG CAG ACC CTG TAC ATA GAC TTC AAG GAT CTG GGC TGG         1104
Ser Cys Gln Met Gln Thr Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Asp Leu Gly Trp
        355                 360                 365

CAT GAC TGG ATC ATC GCA CCA GAG GGC TAT GGC GCC TTC TAC TGC AGC         1152
His Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Gly Ala Phe Tyr Cys Ser
    370                 375                 380

GGC GAG TGC AAT TTC CCG CTC AAT GCG CAC ATG AAC GCC ACG AAC CAT         1200
Gly Glu Cys Asn Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala Thr Asn His
385                 390                 395                 400

GCG ATC GTC CAG ACC CTG GTC CAC CTG CTG GAG CCC AAG AAG GTG CCC         1248
Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Leu Glu Pro Lys Lys Val Pro
                405                 410                 415
```

```
AAG CCC TGC TGC GCT CCG ACC AGG CTG GGA GCA CTA CCC GTT CTG TAC      1296
Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Arg Leu Gly Ala Leu Pro Val Leu Tyr
            420                 425                 430

CAC CTG AAC GAC GAG AAT GTG AAC CTG AAA AAG TAT AGA AAC ATG ATT      1344
His Leu Asn Asp Glu Asn Val Asn Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Ile
        435                 440                 445

GTG AAA TCC TGC GGG TGC CAT TGA                                      1368
Val Lys Ser Cys Gly Cys His
    450                 455
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 25:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 455 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 25:

```
Met Ser Gly Leu Arg Asn Thr Ser Glu Ala Val Ala Val Leu Ala Ser
 1               5                  10                  15

Leu Gly Leu Gly Met Val Leu Leu Met Phe Val Ala Thr Thr Pro Pro
            20                  25                  30

Ala Val Glu Ala Thr Gln Ser Gly Ile Tyr Ile Asp Asn Gly Lys Asp
        35                  40                  45

Gln Thr Ile Met His Arg Val Leu Ser Glu Asp Asp Lys Leu Asp Val
    50                  55                  60

Ser Tyr Glu Ile Leu Glu Phe Leu Gly Ile Ala Glu Arg Pro Thr His
65                  70                  75                  80

Leu Ser Ser His Gln Leu Ser Leu Arg Lys Ser Ala Pro Lys Phe Leu
                85                  90                  95

Leu Asp Val Tyr His Arg Ile Thr Ala Glu Glu Gly Leu Ser Asp Gln
            100                 105                 110

Asp Glu Asp Asp Asp Tyr Glu Arg Gly His Arg Ser Arg Arg Ser Ala
        115                 120                 125

Asp Leu Glu Glu Asp Glu Gly Glu Gln Gln Lys Asn Phe Ile Thr Asp
    130                 135                 140
```

Leu Asp Lys Arg Ala Ile Asp Glu Ser Asp Ile Ile Met Thr Phe Leu
145 150 155 160

Asn Lys Arg His His Asn Val Asp Glu Leu Arg His Glu His Gly Arg
165 170 175

Arg Leu Trp Phe Asp Val Ser Asn Val Pro Asn Asp Asn Tyr Leu Val
180 185 190

Met Ala Glu Leu Arg Ile Tyr Gln Asn Ala Asn Glu Gly Lys Trp Leu
195 200 205

Thr Ala Asn Arg Glu Phe Thr Ile Thr Val Tyr Ala Ile Gly Thr Gly
210 215 220

Thr Leu Gly Gln His Thr Met Glu Pro Leu Ser Ser Val Asn Thr Thr
225 230 235 240

Gly Asp Tyr Val Gly Trp Leu Glu Leu Asn Val Thr Glu Gly Leu His
245 250 255

Glu Trp Leu Val Lys Ser Lys Asp Asn His Gly Ile Tyr Ile Gly Ala
260 265 270

His Ala Val Asn Arg Pro Asp Arg Glu Val Lys Leu Asp Asp Ile Gly
275 280 285

Leu Ile His Arg Lys Val Asp Asp Glu Phe Gln Pro Phe Met Ile Gly
290 295 300

Phe Phe Arg Gly Pro Glu Leu Ile Lys Ala Thr Ala His Ser Ser His
305 310 315 320

His Arg Ser Lys Arg Ser Ala Ser His Pro Arg Lys Arg Lys Lys Ser
325 330 335

Val Ser Pro Asn Asn Val Pro Leu Leu Glu Pro Met Glu Ser Thr Arg
340 345 350

Ser Cys Gln Met Gln Thr Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Asp Leu Gly Trp
355 360 365

His Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Gly Ala Phe Tyr Cys Ser
370 375 380

Gly Glu Cys Asn Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala Thr Asn His
385 390 395 400

Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Leu Glu Pro Lys Lys Val Pro
405 410 415

```
Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Arg Leu Gly Ala Leu Pro Val Leu Tyr
            420                 425                 430

His Leu Asn Asp Glu Asn Val Asn Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Ile
        435                 440                 445

Val Lys Ser Cys Gly Cys His
    450                 455
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 26:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 104 AMINOSÄUREN
- (B) TYP: AMINOSÄURE
- (C) STRÄNGIGKEIT. EINZELN
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN
- (B) LOKALISIERUNG: 1..104
- (D) WEITERE INFORMATION:/BEMERKUNG= „BMP3“

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 26:

```
Cys Ala Arg Arg Tyr Leu Lys Val Asp Phe Ala Asp Ile Gly Trp Ser
1               5                   10                  15

Glu Trp Ile Ile Ser Pro Lys Ser Phe Asp Ala Tyr Tyr Cys Ser Gly
            20                  25                  30

Ala Cys Gln Phe Pro Met Pro Lys Ser Leu Lys Pro Ser Asn His Ala
        35                  40                  45

Thr Ile Gln Ser Ile Val Ala Arg Ala Val Gly Val Val Pro Gly Ile
    50                  55                  60

Pro Glu Pro Cys Cys Val Pro Glu Lys Met Ser Ser Leu Ser Ile Leu
65                  70                  75                  80

Phe Phe Asp Glu Asn Lys Asn Val Val Leu Lys Val Tyr Pro Asn Met
                85                  90                  95

Thr Val Glu Ser Cys Ala Cys Arg
            100
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 27:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 102 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINZELN

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(VI) ORIGINALQUELLE:

(A) ORGANISMUS: HOMO SAPIENS

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN

(B) LOKALISIERUNG: 1..102

(D) WEITERE INFORMATION:/BEMERKUNG= „BMP5“

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 27:

```
Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln
1               5                  10                  15

Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Phe Tyr Cys Asp Gly
            20                  25                  30

Glu Cys Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala Thr Asn His Ala
        35                  40                  45

Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Met Phe Pro Asp His Val Pro Lys
    50                  55                  60

Pro Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe
65                  70                  75                  80

Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val
                85                  90                  95

Arg Ser Cys Gly Cys His
            100
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 28:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 102 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINZELN

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(VI) ORIGINALQUELLE:

(A) ORGANISMUS: HOMO SAPIENS

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN

(B) LOKALISIERUNG: 1..102

(D) WEITERE INFORMATION:/BEMERKUNG= „BMP6“

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 28:

```
Cys Arg Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln Asp Leu Gly Trp Gln
1               5                  10                  15

Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Gly Tyr Ala Ala Asn Tyr Cys Asp Gly
            20                  25                  30

Glu Cys Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala Thr Asn His Ala
        35                  40                  45

Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Met Asn Pro Glu Tyr Val Pro Lys
    50                  55                  60

Pro Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe
65                  70                  75                  80

Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg Trp Met Val Val
                85                  90                  95

Arg Ala Cys Gly Cys His
            100
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 29:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 102 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINZELN

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(VI) ORIGINALQUELLE:

(A) ORGANISMUS: HOMO SAPIENS

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN

(B) LOKALISIERUNG: 1..102

(D) WEITERE INFORMATION:/MARKIERUNG = OPX7 BEMERKUNG = „WOBEI JEDES XAA UNABHÄNGIG AUS EINER GRUPPE EINER ODER MEHRERER WIE IN DER BESCHREIBUNG SPEZIFIZIERTER AMINOSÄUREN AUSGEWÄHLT IST (ABSCHNITT II B.2)“.

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 29:

```
Cys Xaa Xaa His Glu Leu Tyr Val Xaa Phe Xaa Asp Leu Gly Trp Xaa
1               5                   10                  15

Asp Trp Xaa Ile Ala Pro Xaa Gly Tyr Xaa Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly
            20                  25                  30

Glu Cys Xaa Phe Pro Leu Xaa Ser Xaa Met Asn Ala Thr Asn His Ala
        35                  40                  45

Ile Xaa Gln Xaa Leu Val His Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Val Pro Lys
    50                  55                  60

Xaa Cys Cys Ala Pro Thr Xaa Leu Xaa Ala Xaa Ser Val Leu Tyr Xaa
65                  70                  75                  80

Asp Xaa Ser Xaa Asn Val Xaa Leu Xaa Lys Xaa Arg Asn Met Val Val
                85                  90                  95

Xaa Ala Cys Gly Cys His
            100
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 30:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 97 AMINOSÄUREN

(B) TYP: AMINOSÄURE

(C) STRÄNGIGKEIT: EINZELN

(D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(VI) ORIGINALQUELLE:

(A) ORGANISMUS: HOMO SAPIENS

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN

(B) LOKALISIERUNG: 1..97

(D) WEITERE INFORMATION:/MARKIERUNG = GENERISCHE SEQUENZ 5/ BEMERKUNG = „WOBEI JEDES XAA UNABHÄNGIG AUS EINER GRUPPE EINER ODER MEHRERER WIE IN DER BESCHREIBUNG SPEZIFIZIERTER AMINOSÄUREN AUSGEWÄHLT IST “.

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 30:

```
Leu Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa
1               5                   10                  15

Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa Pro
            20                  25                  30
```

```
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn His Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
        35                  40                  45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Cys Xaa Pro
    50                  55                  60

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
65                  70                  75                  80

Val Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa Xaa Cys Xaa Cys
                85                  90                  95

Xaa
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 31:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 102 AMINOSÄUREN
- (B) TYP: AMINOSÄURE
- (C) STRÄNGIGKEIT: EINZELN
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(VI) ORIGINALQUELLE:

- (A) ORGANISMUS: HOMO SAPIENS

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: PROTEIN
- (B) LOKALISIERUNG: 1..102
- (D) WEITERE INFORMATION:/MARKIERUNG = GENERISCHE SEQUENZ 6/ BEERKUNG = „WOBEI JEDES XAA UNABHÄNGIG AUS EINER GRUPPE EINER ODER MEHRERER WIE IN DER BESCHREIBUNG SPEZIFIZIERTER AMINOSÄUREN AUSGEWÄHLT IST".

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 31:

```
Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa
1               5                   10                  15

Xaa Trp Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Tyr Cys Xaa Gly
            20                  25                  30

Xaa Cys Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asn His Ala
        35                  40                  45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
    50                  55                  60

Xaa Cys Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa
65                  70                  75                  80
```

```
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val
                85                  90                  95

Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa
            100
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 32:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 1247 BASENPAARE
- (B) TYP: NUKLEINSÄURE
- (C) STRÄNGIGKEIT: EINFACH
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: CDNA

(Vi) ORIGINALQUELLE:

- (A) ORGANISMUS: HOMO SAPIENS
- (F) GEWEBSTYP: GEHIRN

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LOKALISIERUNG: 84..1199
- (D) WEITERE INFORMATION:/PRODUKT = „GDF-1"/BEMERKUNG= „GDF1 (CDNA)"

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 32:

```
GGGGACACCG GCCCCGCCCT CAGCCCACTG GTCCCGGGCC GCCGCGGACC CTGCGCACTC      60

TCTGGTCATC GCCTGGGAGG AAG ATG CCA CCG CCG CAG CAA GGT CCC TGC          110
                          Met Pro Pro Pro Gln Gln Gly Pro Cys
                            1               5

GGC CAC CAC CTC CTC CTC CTC CTG GCC CTG CTG CTG CCC TCG CTG CCC        158
Gly His His Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Pro Ser Leu Pro
 10                  15                  20                  25

CTG ACC CGC GCC CCC GTG CCC CCA GGC CCA GCC GCC GCC CTG CTC CAG        206
Leu Thr Arg Ala Pro Val Pro Pro Gly Pro Ala Ala Ala Leu Leu Gln
                30                  35                  40

GCT CTA GGA CTG CGC GAT GAG CCC CAG GGT GCC CCC AGG CTC CGG CCG        254
Ala Leu Gly Leu Arg Asp Glu Pro Gln Gly Ala Pro Arg Leu Arg Pro
            45                  50                  55

GTT CCC CCG GTC ATG TGG CGC CTG TTT CGA CGC CGG GAC CCC CAG GAG        302
Val Pro Pro Val Met Trp Arg Leu Phe Arg Arg Arg Asp Pro Gln Glu
        60                  65                  70
```

```
ACC AGG TCT GGC TCG CGG CGG ACG TCC CCA GGG GTC ACC CTG CAA CCG        350
Thr Arg Ser Gly Ser Arg Arg Thr Ser Pro Gly Val Thr Leu Gln Pro
     75                  80                  85

TGC CAC GTG GAG GAG CTG GGG GTC GCC GGA AAC ATC GTG CGC CAC ATC        398
Cys His Val Glu Glu Leu Gly Val Ala Gly Asn Ile Val Arg His Ile
 90                  95                 100                 105

CCG GAC CGC GGT GCG CCC ACC CGG GCC TCG GAG CCT GTC TCG GCC GCG        446
Pro Asp Arg Gly Ala Pro Thr Arg Ala Ser Glu Pro Val Ser Ala Ala
                110                 115                 120

GGG CAT TGC CCT GAG TGG ACA GTC GTC TTC GAC CTG TCG GCT GTG GAA        494
Gly His Cys Pro Glu Trp Thr Val Val Phe Asp Leu Ser Ala Val Glu
            125                 130                 135

CCC GCT GAG CGC CCG AGC CGG GCC CGC CTG GAG CTG CGT TTC GCG GCG        542
Pro Ala Glu Arg Pro Ser Arg Ala Arg Leu Glu Leu Arg Phe Ala Ala
        140                 145                 150

GCG GCG GCG GCA GCC CCG GAG GGC GGC TGG GAG CTG AGC GTG GCG CAA        590
Ala Ala Ala Ala Ala Pro Glu Gly Gly Trp Glu Leu Ser Val Ala Gln
    155                 160                 165

GCG GGC CAG GGC GCG GGC GCG GAC CCC GGG CCG GTG CTG CTC CGC CAG        638
Ala Gly Gln Gly Ala Gly Ala Asp Pro Gly Pro Val Leu Leu Arg Gln
170                 175                 180                 185

TTG GTG CCC GCC CTG GGG CCG CCA GTG CGC GCG GAG CTG CTG GGC GCC        686
Leu Val Pro Ala Leu Gly Pro Pro Val Arg Ala Glu Leu Leu Gly Ala
                190                 195                 200

GCT TGG GCT CGC AAC GCC TCA TGG CCG CGC AGC CTC CGC CTG GCG CTG        734
Ala Trp Ala Arg Asn Ala Ser Trp Pro Arg Ser Leu Arg Leu Ala Leu
            205                 210                 215

GCG CTA CGC CCC CGG GCC CCT GCC GCC TGC GCG CGC CTG GCC GAG GCC        782
Ala Leu Arg Pro Arg Ala Pro Ala Ala Cys Ala Arg Leu Ala Glu Ala
        220                 225                 230

TCG CTG CTG CTG GTG ACC CTC GAC CCG CGC CTG TGC CAC CCC CTG GCC        830
Ser Leu Leu Leu Val Thr Leu Asp Pro Arg Leu Cys His Pro Leu Ala
    235                 240                 245

CGG CCG CGG CGC GAC GCC GAA CCC GTG TTG GGC GGC GGC CCC GGG GGC        878
Arg Pro Arg Arg Asp Ala Glu Pro Val Leu Gly Gly Gly Pro Gly Gly
250                 255                 260                 265

GCT TGT CGC GCG CGG CGG CTG TAC GTG AGC TTC CGC GAG GTG GGC TGG        926
Ala Cys Arg Ala Arg Arg Leu Tyr Val Ser Phe Arg Glu Val Gly Trp
                270                 275                 280
```

```
CAC CGC TGG GTC ATC GCG CCG CGC GGC TTC CTG GCC AAC TAC TGC CAG        974
His Arg Trp Val Ile Ala Pro Arg Gly Phe Leu Ala Asn Tyr Cys Gln
            285                 290                 295

GGT CAG TGC GCG CTG CCC GTC GCG CTG TCG GGG TCC GGG GGG CCG CCG       1022
Gly Gln Cys Ala Leu Pro Val Ala Leu Ser Gly Ser Gly Gly Pro Pro
        300                 305                 310

GCG CTC AAC CAC GCT GTG CTG CGC GCG CTC ATG CAC GCG GCC GCC CCG       1070
Ala Leu Asn His Ala Val Leu Arg Ala Leu Met His Ala Ala Ala Pro
    315                 320                 325

GGA GCC GCC GAC CTG CCC TGC TGC GTG CCC GCG CGC CTG TCG CCC ATC       1118
Gly Ala Ala Asp Leu Pro Cys Cys Val Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ile
330                 335                 340                 345

TCC GTG CTC TTC TTT GAC AAC AGC GAC AAC GTG GTG CTG CGG CAG TAT       1166
Ser Val Leu Phe Phe Asp Asn Ser Asp Asn Val Val Leu Arg Gln Tyr
                350                 355                 360

GAG GAC ATG GTG GTG GAC GAG TGC GGC TGC CGC TAACCCGGGG CGGGCAGGGA      1219
Glu Asp Met Val Val Asp Glu Cys Gly Cys Arg
            365                 370

CCCGGGCCCA ACAATAAATG CCGCGTGG                                        1247
```

(2) INFORMATION FÜR SEQUENZ ID NO: 33:

(i) SEQUENZ-EIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 372 AMINOSÄUREN
- (B) TYP: AMINOSÄURE
- (D) TOPOLOGIE: LINEAR

(ii) MOLEKÜLTYP: PROTEIN

(xi) Sequenz-Beschreibung: Sequenz ID NO: 33:

```
Met Pro Pro Pro Gln Gln Gly Pro Cys Gly His His Leu Leu Leu Leu
  1               5                  10                  15

Leu Ala Leu Leu Leu Pro Ser Leu Pro Leu Thr Arg Ala Pro Val Pro
             20                  25                  30

Pro Gly Pro Ala Ala Ala Leu Leu Gln Ala Leu Gly Leu Arg Asp Glu
         35                  40                  45

Pro Gln Gly Ala Pro Arg Leu Arg Pro Val Pro Pro Val Met Trp Arg
     50                  55                  60

Leu Phe Arg Arg Arg Asp Pro Gln Glu Thr Arg Ser Gly Ser Arg Arg
 65                  70                  75                  80
```

```
Thr Ser Pro Gly Val Thr Leu Gln Pro Cys His Val Glu Glu Leu Gly
                 85                  90                  95

Val Ala Gly Asn Ile Val Arg His Ile Pro Asp Arg Gly Ala Pro Thr
            100                 105                 110

Arg Ala Ser Glu Pro Val Ser Ala Ala Gly His Cys Pro Glu Trp Thr
        115                 120                 125

Val Val Phe Asp Leu Ser Ala Val Glu Pro Ala Glu Arg Pro Ser Arg
    130                 135                 140

Ala Arg Leu Glu Leu Arg Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Pro Glu
145                 150                 155                 160

Gly Gly Trp Glu Leu Ser Val Ala Gln Ala Gly Gln Gly Ala Gly Ala
                165                 170                 175

Asp Pro Gly Pro Val Leu Leu Arg Gln Leu Val Pro Ala Leu Gly Pro
            180                 185                 190

Pro Val Arg Ala Glu Leu Leu Gly Ala Ala Trp Ala Arg Asn Ala Ser
        195                 200                 205

Trp Pro Arg Ser Leu Arg Leu Ala Leu Ala Leu Arg Pro Arg Ala Pro
    210                 215                 220

Ala Ala Cys Ala Arg Leu Ala Glu Ala Ser Leu Leu Leu Val Thr Leu
225                 230                 235                 240

Asp Pro Arg Leu Cys His Pro Leu Ala Arg Pro Arg Arg Asp Ala Glu
                245                 250                 255

Pro Val Leu Gly Gly Gly Pro Gly Gly Ala Cys Arg Ala Arg Arg Leu
            260                 265                 270

Tyr Val Ser Phe Arg Glu Val Gly Trp His Arg Trp Val Ile Ala Pro
        275                 280                 285

Arg Gly Phe Leu Ala Asn Tyr Cys Gln Gly Gln Cys Ala Leu Pro Val
    290                 295                 300

Ala Leu Ser Gly Ser Gly Gly Pro Pro Ala Leu Asn His Ala Val Leu
305                 310                 315                 320

Arg Ala Leu Met His Ala Ala Ala Pro Gly Ala Ala Asp Leu Pro Cys
                325                 330                 335

Cys Val Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ile Ser Val Leu Phe Phe Asp Asn
            340                 345                 350

Ser Asp Asn Val Val Leu Arg Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Asp Glu
        355                 360                 365

Cys Gly Cys Arg
    370
```

Patentansprüche

1. Verwendung eines Morphogens zur Herstellung eines Medikamentes (i) zur Behandlung der amyotrophen Lateralsklerose, (ii) zur Behandlung einer Rückenmarksverletzung, (iii) zur Behandlung der Parkin-

son-Krankheit oder (iv) zur Stimulierung der Reparatur einer Nervenlücke, wobei das Morphogen ein dimeres Protein mit einer Aminosäuresequenz umfasst, die Folgendes aufweist:
a) eine durch die generische Sequenz 6, Sequenz ID Nr. 31 definierte Sequenz; oder
b) eine Sequenz mit mehr als 60% Aminosäureidentität mit der C-terminalen 6-Cystein-Domäne von humanem OP-1, Reste 43-139 von Sequenz ID Nr. 5; oder
c) eine durch OPX, Sequenz ID Nr. 29, definierte Sequenz;
wobei das Morphogen die Produktion einer N-CAM- oder L1-Isoform durch eine NG108-15 Zelle in vitro stimuliert.

2. Vorrichtung, die ein biokompatibles, röhrenförmiges Gehäuse umfasst, das eine äußere und eine innere Oberfläche aufweist, wobei die innere Oberfläche einen Kanal definiert, durch den sich ein neuraler Prozess regenerieren kann, wobei die Vorrichtung eine solche Form und Dimension aufweist, die ausreicht, einen Bruch in einer Nervenbahn zu überbrücken, und Öffnungen aufweist, die zur Aufnahme getrennter Nervenenden geeignet sind, wobei die Vorrichtung weiterhin ein Morphogen umfasst, das im Kanal angeordnet ist, wobei das Morphogen ein dimeres Protein mit einer Aminosäuresequenz umfasst, die Folgendes aufweist:
a) eine durch die generische Sequenz 6, Sequenz ID Nr. 31 definierte Sequenz; oder
b) eine Sequenz mit mehr als 60% Aminosäureidentität mit der C-terminalen 6-Cystein-Domäne von humanem OP-1, Reste 43-139 von Sequenz ID Nr. 5; oder
c) eine durch OPX, Sequenz ID Nr. 29, definierte Sequenz;
wobei das Morphogen die Produktion einer N-CAM- oder L1-Isoform durch eine NG108-15 Zelle in vitro stimuliert;
und wobei das Gehäuse wahlweise im Wesentlichen undurchlässig ist.

3. Verwendung oder Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Aminosäuresequenz von jedem der Morphogen-Polypeptide aus
(a) einer Sequenz mit mehr als 65% Aminosäuresequenzidentität mit der C-terminalen 6-Cystein-Domäne von humanem OP-1, Reste 43-139 von Sequenz ID Nr. 5; und
(b) der C-terminalen 7-Cystein-Domäne von humanem OP-1, Reste 38-139 von Sequenz ID Nr. 5, ausgewählt ist.

4. Verwendung oder Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das Morphogen mit zumindest einem Morphogen-Prodomänen-Peptid komplexiert ist.

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1-3 oder 4, wobei das Morphogen mit einem Molekül verbunden ist, das den Transport des Morphogens durch die Blut-Him-Schranke verbessert.

6. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Medikament weiterhin einen biokompatiblen, in vivo bioresorbierbaren Träger umfasst, der zum Halten eines Proteins an einer Stelle in vivo geeignet ist und wahlweise entweder
(i) der Träger strukturell ausreichend ist, um die Richtung des Axon-Wachstums zu unterstützen und/oder
(ii) der Träger ein Polymermaterial, Laminin, Kollagen oder extrazelluläre Matrix-Bestandteile umfasst, die aus Gehirngewebe abgeleitet sind.

7. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Morphogen aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus humanem OP-1, Maus OP-1, humanem OP-2, Maus OP-2; 60A, GDF-1, BMP2A, BMP2B, DPP, Vgl, Vgr-1, BMP3, BMP5 und BMP6 besteht.

8. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Medikament in einem biokompatiblen Polymer-Träger dispergiert ist und wahlweise entweder
(i) der Träger strukturell ausreichend ist, um die Richtung des Axon-Wachstums zu unterstützen; und/oder
(ii) der Träger ein Polymermaterial, Laminin, Kollagen oder extrazelluläre Matrixbestandteile umfasst, die von Gehirngewebe abgeleitet sind.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

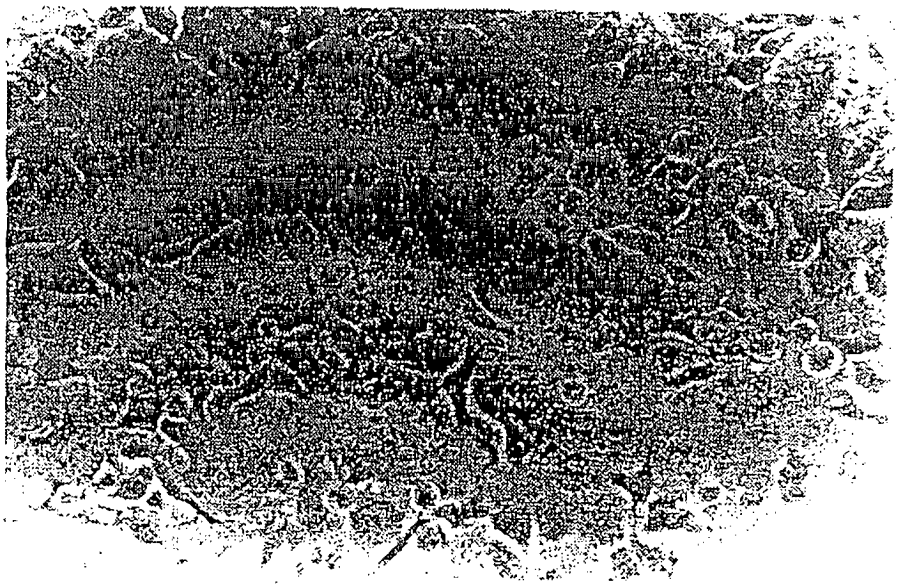

Fig. 1A

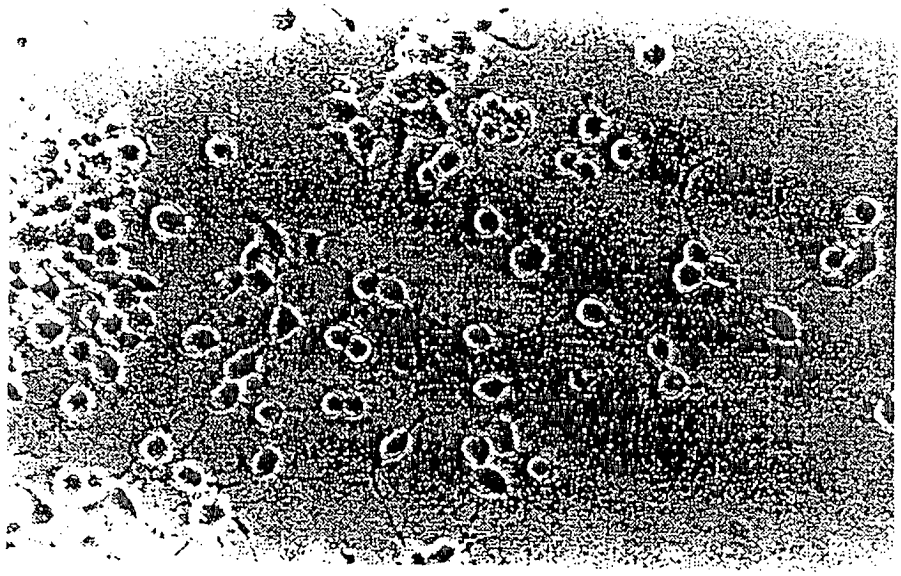

Fig. 1B

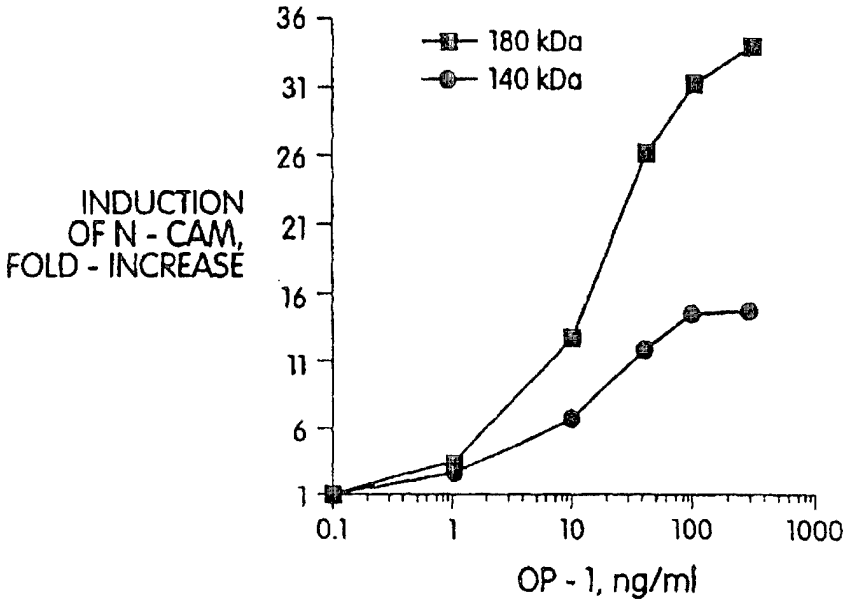
180 kDa
140 kDa
INDUCTION OF N - CAM, FOLD - INCREASE
36
31
26
21
16
11
6
1
0.1
1
10
100
1000
OP - 1, ng/ml

Fig. 2A

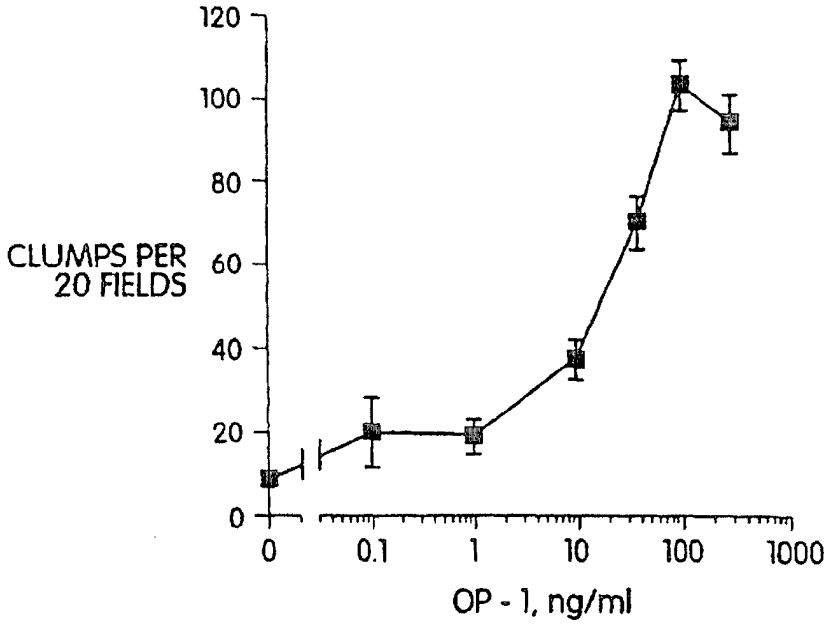
CLUMPS PER 20 FIELDS
120
100
80
60
40
20
0
0
0.1
1
10
100
1000
OP - 1, ng/ml

Fig. 3

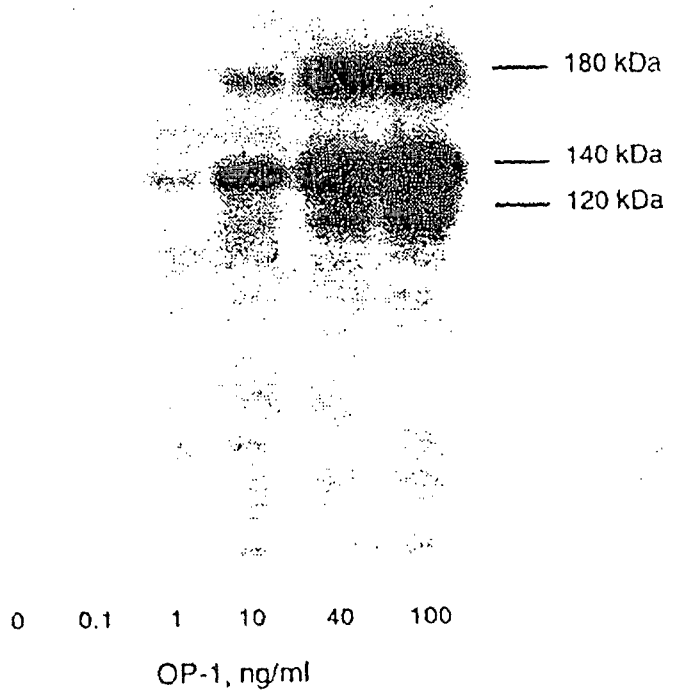

Fig. 2B

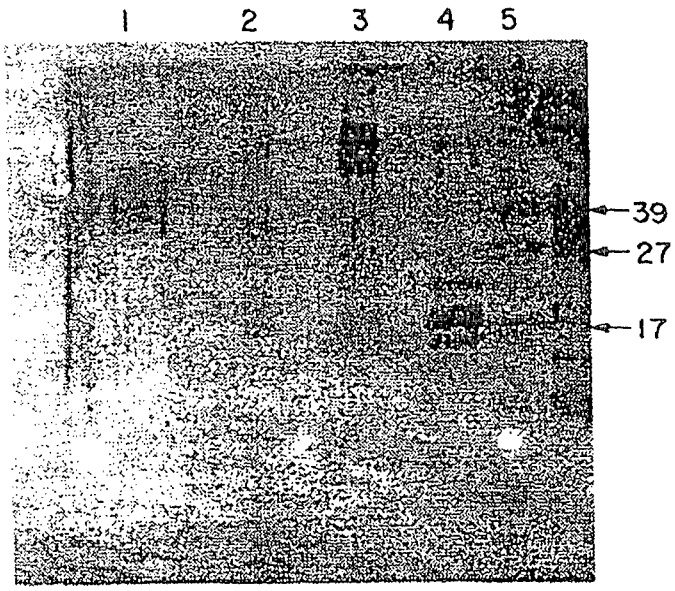

Fig. 4