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

(10) **DE 695 13 149 T3** 2006.07.20

(12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 741 785 B2**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 13 149.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/02251**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 912 589.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/022611**
(86) PCT-Anmeldetag: **21.02.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **24.08.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **13.11.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **03.11.1999**
(97) Veröffentlichungstag des geänderten Patents beim EPA: **10.08.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **20.07.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/12*** (2006.01)
C12N 15/16 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/39 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61L 27/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

199780	**18.02.1994**	**US**
316650	**30.09.1994**	**US**

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

(73) Patentinhaber:
The Regents of the University of Michigan, Ann Arbor, Mich., US

(72) Erfinder:
Bonadio, Jeffrey, Ann Arbor, MI 48108, US;
GOLDSTEIN, Steven, A, Ann Arbor, MI 48105, US

(74) Vertreter:
Andrae Flach Haug, 81541 München

(54) Bezeichnung: **Verfahren und Zusammensetzungen für die Stimulierung von Knochenzellen**

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

[0001] Die vorliegende Anmeldung ist eine "continuation-in-part" der U.S.-Anmeldung mit der Seriennummer 08/316,650, eingereicht am 30. September 1994, die eine "continuation-in-part" der U.S.-Anmeldung mit der Seriennummer 48/199,780, eingereicht am 18. Februar 1994, ist; der gesamte Text und die Figuren dieser Offenbarungen werden auf spezifische Weise hierin durch Bezugnahme ohne eine Ausnahmebestimmung aufgenommen. Die Regierung der Vereinigten Staaten besitzt bestimmte Rechte an der vorliegenden Erfindung gemäß dem "Grant HL-41926" des "National Institutes of Health".

1. Gebiet der Erfindung

[0002] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein das Gebiet von Knochenzellen und -geweben, genauer gesagt betreffen bestimmte Ausführungsformen die Übertragung von genetischem Material in Knochen und andere Ausführungsformen betreffen Typ II-Collagen. In bestimmten Beispielen betrifft die Erfindung die Verwendung von Typ II-Collagen und Nukleinsäuren zum Stimulieren von Knochenwachstum, -reparatur und -regeneration. Verfahren, Zusammensetzungen, Kits und Vorrichtungen werden bereitgestellt für das Übertragen eines osteotropen Gens in Knochen-Vorläuferzellen, von dem gezeigt worden ist, daß es Vorläuferzellen stimuliert und erhöhte Knochenbildung in vivo fördert.

2. Beschreibung des verwandten Standes der Technik

[0003] Störungen in dem Prozeß der Knochenreparatur und -regeneration sind mit der Entwicklung mehrerer menschlicher Krankheiten und Störungen verbunden, z.B. Osteoporose und Osteogenese imperfecta. Das Versagen der Knochenreparaturmechanismen ist natürlich auch mit bedeutenden Komplikationen in der klinischen orthopädischen Praxis verbunden, z.B. fibröser, schlechter Frakturheilung im Anschluß an eine Knochenfraktur, Implantat-Grenzflächen-Störungen und Störungen bei großen allogenen Transplantaten. Das Leben vieler Individuen würde durch die Entwicklung neuer Therapien verbessert werden, die auf das Stimulieren und Stärken der Fraktur-Reparatur-Prozesse zugeschnitten sind.

[0004] Natürlicherweise würde jede neue Technik zum Stimulieren der Knochenreparatur ein wertvolles Werkzeug bei der Behandlung von Knochenfrakturen darstellen. Ein bedeutender Anteil von gebrochenen Knochen wird immer noch durch Eingipsen behandelt, was natürlichen Mechanismen erlaubt, die Wundreparatur zu bewirken. Obwohl es in den letzten Jahren Fortschritte bei der Behandlung von Brüchen gegeben hat, einschließlich verbesserter Vorrichtungen, würde die Entwicklung neuer Verfahren zum Stimulieren oder Ergänzen der Wundreparaturmechanismen einen bedeutenden Fortschritt auf diesem Gebiet bedeuten.

[0005] Eine sehr bedeutende Population von Patienten, denen neue Therapien nutzen würde, die dazu bestimmt sind, die Reparatur von Brüchen zu fördern oder sogar Brüche zu verhindern oder zu vermindern, sind solche Patienten, die an Osteoporose leiden. Der Begriff "Osteoporose" betrifft eine heterogene Gruppe von Störungen, die durch Abnehmen der Knochenmasse und Brüche gekennzeichnet sind. Klinisch wird die Osteoporose in Typ I und Typ II unterschieden. Die Typ I-Osteoporose tritt vorherrschend bei Frauen mittleren Alters auf und ist mit dem Östrogenverlust bei der Menopause assoziiert, während die Typ II-Osteoporose Typ II mit fortschreitendem Alter assoziiert ist.

[0006] Schätzungsweise 20-25 Millionen Menschen haben ein erhöhtes Risiko für Brüche wegen stellenspezifischem Knochenverlust. Die Kosten der Behandlung von Osteoporose in den Vereinigten Staaten werden gegenwärtig auf eine Größenordnung von 10 Milliarden pro Jahr geschätzt. Demographische Trends, d.h. das schrittweise ansteigende Alter der US-Bevölkerung, legen nahe, daß diese Kosten um das 2-3-fache bis zum Jahr 2020 steigen könnten, wenn eine sichere und wirksame Behandlung nicht gefunden wird.

[0007] Der Schwerpunkt der gegenwärtigen Therapien für Osteoporose ist die Vermeidung von Brüchen und nicht die Reparatur von Brüchen. Dies ist eine wichtige Betrachtung, da bekannt ist, daß eine bedeutende Morbidität und Mortalität mit verlängerter Bettruhe bei älteren Menschen, insbesondere denen, die einen Hüftbruch erlitten haben, verbunden ist. Es ist klar, das neue Verfahren für die Stimulierung der Bruchreparatur benötigt werden, um auf diese Weise die Mobilität dieser Patienten wiederherzustellen, bevor Komplikationen auftreten.

[0008] Osteogenese imperfecta (OI) ist eine Gruppe von vererbten Bindegewebskrankheiten, die durch die Brüchigkeit von Knochen und weichem Bindegewebe gekennzeichnet ist (Byers und Steiner, 1992; Prockop, 1990). Männer und Frauen sind auf gleiche Weise beeinträchtigt, und das allgemeine Auftreten wird gegenwärtig auf 1 in 5.000-14.000 lebenden Geburten geschätzt. Hörverlust, Dentinogenese imperfecta, Atmungs-

insuffizienz, schwere Skoliose und Emphyseme sind einfach einige der Bedingungen, die mit einer oder mehreren Arten von OI verbunden sind. Während genaue Schätzungen der Gesundheitskosten nicht zur Verfügung stehen, resultiert die mit OI verbundene Morbidität und Mortalität sicherlich aus der extremen Neigung zu Brüchen (OI-Typen I-IV) und der Deformation von anormalen Knochen im Anschluß an die Reparatur von Brüchen (OI-Typen II-IV) (Bonadio und Goldstein, 1993). Der wichtigste Punkt bei der Behandlung von OI ist, neue Verfahren zu entwickeln, durch die die Reparatur von Brüchen verbessert wird, und auf diese Weise die Lebensqualität dieser Patienten zu verbessern.

[0009] Die Verfahren der Rekonstruktion von Knochen, wie die, die zum Rekonstruieren von Störungen, die als ein Ergebnis von Traumata, Krebschirurgie und Entwicklungsfehlern auftreten, verwendet werden, würden ebenfalls durch neue Verfahren zur Förderung der Knochenreparatur verbessert werden. Gegenwärtig eingesetzte rekonstruktive Verfahren, wie die Verwendung von autologen Knochentransplantaten oder Knochentransplantaten mit befestigtem weichen Bindegewebe und Blutgefäßen, sind mit bedeutenden Nachteilen von sowohl Kosten als auch Schwierigkeiten verbunden. Zum Beispiel wird das Ernten einer nützlichen Menge an autologen Knochen nicht leicht erreicht, und sogar autologe Transplantate werden oft infiziert oder leiden unter Resorption.

[0010] Der Prozeß der Wundreparatur und -regeneration ähnelt dem Prozeß der Wundheilung in anderen Geweben. Eine typische Abfolge von Ereignissen schließt ein: Blutungen, Gerinselbildung, Auflösung des Gerinsels mit gleichzeitiger Entfernung des beschädigten Gewebes, Einwachsen von Granulationsgewebe, Bildung von Knorpel, Einwachsen und Umsatz des Knorpels, schnelle Knochenbildung (Kallusgewebe), und schließlich das Umformen des Kallus in Knochenrinde und Knochenbälkchen. Deshalb ist die Knochenreparatur ein komplexer Prozeß, der viele Zellarten und regulatorische Moleküle beinhaltet. Die verschiedenen an der Reparatur von Brüchen beteiligten Zellpopulationen schließen Stammzellen, Makrophagen, Fibroblasten, Gefäßzellen, Osteoblasten, Chondroblasten und Osteoklasten ein.

[0011] Es ist bekannt, daß regulatorische Faktoren, die an der Knochenreparatur beteiligt sind, systemische Hormone, Zytokine, Wachstumsfaktoren und andere Moleküle, die das Wachstum und die Differenzierung regulieren, einschließen. Verschiedene osteoinduktive Agenzien sind gereinigt worden, von denen gezeigt wurde, daß sie Polypeptidwachstumsfaktor-artige Moleküle sind. Diese stimulatorischen Faktoren werden Knochen-morphogenetische oder Knochen-morphogene Proteine genannt (Bone Morphogenetic/Morphogenic Proteins; BMPs). Sie sind auch osteogene knocheninduktive Proteine oder osteogene Proteine genannt worden (Osteogenic Bone Inductive Proteins/Osteogenic Protein; OPs). Verschiedene BMP-(oder OP-) Gene sind nun kloniert worden, und die häufigsten Bezeichnungen sind BMP-1 bis BMP-8. Neue BMPs sind im Prozeß der Entdeckung begriffen. Obwohl die BMP-Terminologie weithin verwendet wird, kann es sich herausstellen, daß es der Fall ist, daß es einen OP-Gegenstück-Begriff für jedes einzelne BMP gibt (Alper, 1994).

[0012] Es wird allgemein angenommen, daß BMPs 2-8 osteogen sind, obwohl BMP-1 ein eher allgemeines Morphogen ist (Shimell et al., 1991). BMP-3 wird auch Osteogenin genannt (Luyten et al., 1989) und BMP-7 wird auch OP-1 genannt (Ozkaynak et al., 1990). Die BMPs sind verwandt mit der TGF-β-(Transforming Growth Factor-β-) Superfamilie oder Teilen davon, und sowohl TGF-β1 als auch TGF-β2 regulieren auch die Osteoblastenfunktion (Seitz et al., 1992). Mehrere BMP-(oder OP-) Nukleotidsequenzen und -polypeptide sind in US-Patenten beschrieben worden, z.B. 4,795,804; 4,877,864; 4,968,590; 5,108,753; dies schließt insbesondere ein: BMP-1, offenbart in US-Patent 5,108,922; BMP-2A (derzeit als BMP-2 bezeichnet) in US-Patenten 5,166,058 und 5,013,649; BMP-2B (derzeit als BMP-4 bezeichnet), offenbart in US-Patent 5,013,649; BMP-3 in 5,116,738; BMP-5 in 5,106,748; BMP-6 in 5,187,076; BMP-7 in 5,108,753 und 5,141,905; und OP-1, COP-5 und COP-7 in 5,011,691.

[0013] Andere Wachstumsfaktoren oder -hormone, von denen berichtet wurde, daß sie die Fähigkeit zum Stimulieren von neuer Knochenbildung besitzen, schließen den Acidic Fibroblast Growth Factor (Jingushi et al., 1990); Östrogen (Boden et al., 1989); Macrophage Colony Stimulating Factor (Horowitz et al., 1989); und Calcium-regulierende Agenzien wie PTH (Parathyroid Hormone) (Raisz und Kream, 1983) ein.

[0014] Mehrere Gruppen haben die Möglichkeit der Verwendung von knochenstimulierenden Proteinen und Polypeptiden, insbesondere rekombinanten BMPs, zum Beeinflussen der Knochenreparatur in vivo untersucht. Zum Beispiel ist rekombinanter BMP-2 eingesetzt worden, um chirurgisch erzeugte Defekte in den Unterkiefern von ausgewachsenen Hunden zu reparieren (Toriumi et al., 1991), und es ist von hohen Dosen dieses Moleküls gezeigt worden, daß es auf funktionelle Weise segmentale Defekte in Oberschenkelknochen von Ratten repariert (Yasko et al., 1992). Chen und Mitarbeiter zeigten, daß eine einzige Anwendung von 25-100 mg rekombinantem TGF-β1 nahe am Knorpel die endochondrale Knochenbildung in Hautwunden über die ge-

samte Dicke in Rattenohren induziert (Chen et al., 1991). Es ist auch berichtet worden, daß die Anwendung von TGF-β1 in einem 3%-igen Methylcellulose-Gel in der Lage war, chirurgisch induzierte große Schädeldefekte zu reparieren, die andernfalls mittels fibrösem Bindegewebe heilen und niemals Knochen bilden (Beck et al., 1991). WO88/00205 offenbart die Verwendung eines rekombinanten Proteins für die Knochenreparatur.

[0015] Der Stand der Technik (WO 94/01139) beschreibt ein Verfahren zum Transfizieren einer Zelle in der Struktur eines Gelenks, wobei ein DNA-Vektor, enthaltend eine Nukleinsäurekassette, die ein gewünschtes Protein kodiert, zum Beispiel ein Zellablationsagens oder ein therapeutisches Agens, direkt in das Gelenk injiziert wird. Zellen, die mit dem Gen transfiziert werden, sind z.B. synoviale Zellen.

[0016] EP 0 248 531 offenbart Mikrokapseln für die kontrollierte Freisetzung von Nukleinsäure.

[0017] Es gibt jedoch viele mit dieser Art von Behandlungsprotokollen verbundene Nachteile, nicht zuletzt die teure und zeitaufwendige Reinigung der rekombinanten Proteine aus ihren Wirtzellen. Auch sind Polypeptide, sobald sie an ein Tier verabreicht werden, instabiler als im allgemeinen für ein therapeutisches Mittel erwünscht ist, und sie sind proteolytischen Angriffen gegenüber anfällig. Darüber hinaus kann die Verabreichung rekombinanter Proteine verschiedene hemmende oder andersweitig schädliche Immunantworten in Gang setzen. Es ist deshalb klar, daß ein neues Verfahren, das in der Lage ist, Knochenreparatur und -regenerierug in vivo zu fördern, einen bedeutenden wissenschaftlichen und medizinischen Fortschritt mit unmittelbarem Nutzen für eine große Anzahl von Patienten darstellen würde. Ein Verfahren, das leicht zur Verwendung mit einer Vielzahl von Matrices und Knochen-stimulierenden Genen anpaßbar ist, würde besonders vorteilhaft sein.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0018] Die vorliegende Erfindung überwindet einen oder mehrere dieser oder anderer dem Stand der Technik innewohnender Nachteile durch Bereitstellen neuer Verfahren, Zusammensetzungen und Vorrichtungen zur Verwendung bei der Übertragung von Nukleinsäuren in Knochenzellen und -gewebe, und zum Fördern von Knochenreparatur und -regeneration. Bestimmte Ausführungsformen der Erfindung beruhen im allgemeinen auf dem überraschenden Befund der Erfinder, daß Nukleinsäure auf wirksame Weise in vivo auf Knöchen-Vorläuferzellen übertragen werden kann, und daß in bestimmten Ausführungsformen die Übertragung eines osteotropen Gens die Knochenreparatur bei einem Tier stimuliert.

[0019] Bei der Verwendung hierin, "isoliertes Nukleinsäuresegment" bedeutet eine Nukleinsäure, wie sie in Anspruch 1 definiert ist.

[0020] Bei der Verwendung hierin, eine "Matrix" bedeutet eine Matrix gemäß Anspruch 1.

[0021] Die Erfindung betrifft allgemein ausgedrückt somit Verfahren, Zusammensetzungen und Vorrichtungen zum Übertragen eines Nukleinsäuresegments in Knochen-Vorläuferzellen oder -geweben. Die erfindungsgemäßen Verfahren umfassen im allgemeinen das Kontaktieren von Knochen-Vorläuferzellen mit einer Zusammensetzung, die ein Nukleinsäuresegment umfaßt, auf eine Weise, die die Übertragung des Nukleinsäuresegments in die Zellen bewirkt. Die Zellen können gezüchtete Zellen oder rekombinante Zellen, die in vitro gehalten werden, sein, wenn alles, was erforderlich ist, das Zugeben der Nukleinsäurezusammensetzung zu den Zellen durch z.B. deren Zugabe zu dem Kulturmedium, ist.

[0022] Alternativ dazu können die Vorläuferzellen sich innerhalb der Stelle eines Knochen-Vorläufergewebes eines Tieres befinden, wenn die Nukleinsäurezusammensetzung auf die Stelle aufgebracht wird, um die Nukleinsäureübertragung in die Knochen-Vorläuferzellen in vivo zu bewirken oder zu fördern. Bei dem Übertragen von Nukleinsäuren in Knochenzellen in einem Tier beinhaltet ein bevorzugtes Verfahren zunächst das Zusetzen des genetischen Materials zu einer Knochenverträglichen Matrix, und dann die Verwendung der resultierenden Matrix zum Kontaktieren einer geeigneten Gewebestelle in dem Tier. Die "resultierende" Matrix kann in bestimmten Ausführungsformen eine mit genetischem Material imprägnierte Matrix sein oder sie kann die Form eines Matrix-Nukleinsäure-Gemisches oder sogar Konjugates einnehmen.

[0023] Eine extrem große Vielfalt an genetischem Material kann in Knochen-Vorläuferzellen oder -gewebe unter Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen und Verfahren übertragen werden, wie sie im Anspruch 1 beansprucht werden. Zum Beispiel kann das Nukleinsäuresegment DNA (doppel- oder einzelsträngig) oder RNA sein. Die Nukleinsäuresegmente können somit genomische Sequenzen, einschließlich Exons oder Introns allein oder Exons und Introns oder kodierende cDNA-Regionen oder tatsächlich jedes Konstrukt sein, das man in einer Gewebe-Vorläuferzelle oder -gewebe zu übertragen wünscht. Geeignete Nukle-

insäuresegmente können auch praktisch in jeder beliebigen Form sein, beispielsweise "nackte" DNA oder RNA, einschließlich linearer Nukleinsäuremoleküle und -plasmide; funktionellen Inserts innerhalb des Genoms verschiedener rekombinanter Viren, einschließlich von Viren mit DNA-Genomen und Retroviren; und jeder beliebigen Form von Nukleinsäuresegmenten, -plasmiden oder mit einem Liposom oder einem Goldpartikel-assoziiertem Virus, wobei letzterer im Zusammenhang mit der "Gene Gun"-Technologie eingesetzt werden kann.

[0024] Die Erfindung kann eingesetzt werden, um die Expression eines gewünschten Gens in Knochenzellen oder -geweben zu fördern, und den Zellen einen bestimmten gewünschten Phänotyp zu verleihen. Diese Expression könnte die erhöhte Expression eines Gens, das normalerweise exprimiert wird (d.h. eine "Überexpression") sein, oder sie könnte verwendet werden, um ein Gen exprimieren, daß normalerweise nicht Knochen-Vorläuferzellen in der natürli cher Umgebung assoziiert ist. Alternativ dazu kann die Erfindung verwendet werden, um die Expression eines Gens zu unterdrücken, das natürlicherweise in derartigen Zellen und Geweben exprimiert wird, und wiederum, um den Phänotyp zu wechseln oder zu verändern. Eine Gensuppression kann ein Weg der Expression eines Gens sein, das ein Protein kodiert, das eine abschwächend-regulatorische Funktion ausübt.

1. Knochen-Vorläuferzellen und -gewebe

[0025] In bestimmten Ausführungsformen stellt diese Erfindung vorteilhafte Verfahren zur Verwendung von Genen zur Stimulation von Knochen-Vorläuferzellen bereit. Wie er hierin verwendet wird, bezeichnet der Begriff "Knochen-Vorläuferzellen" beliebige oder sämtliche der Zellen, die dass Vermögen zur letztendlichen Bildung von neuem Knochengewebe besitzen, oder zu deren Bildung beitragen. Dies schließt verschiedene Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien ein, wie beispielsweise Stammzellen, Makrophagen, Fibroblasten, Gefäßzellen, Osteoblasten, Chondroblasten, Osteoklasten und dergleichen. Knochen-Vorläuferzellen schließen ebenfalls Zellen ein, die in vitro isoliert und manipuliert worden sind, z.B. einer Stimulation mit Agenzien wie Zytokinen oder Wachstumsfaktoren oder sogar gentechnisch veränderten Zellen unterworfen wurden. Die besondere Art oder Arten von Knochen-Vorläuferzellen, die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Verfahren und Zusammensetzungen stimuliert worden sind, ist nicht wichtig, solange die Zellen auf eine Weise stimuliert werden, daß sie aktiviert werden, und im Zusammenhang mit den in vivo-Ausführungsformen schließlich neues Knochengewebe ergeben.

[0026] Der Begriff "Knochen-Vorläuferzelle" wird ebenfalls verwendet, um insbesondere jene Zellen zu bezeichnen, die sich innerhalb von Knochenvorläufer-Gewebe befinden, mit diesem in Kontakt sind oder zu diesem wandern (d.h. "nach hause wandern"), und wobei diese Zellen direkt oder indirekt die Bildung von entwickeltem Knochen stimulieren. Als derartige Zellen können die Vorläuferzellen Zellen sein, die schließlich zu entwickelten Knochenzellen selbst differenzieren, d.h. Zellen die "direkt" neues Knochengewebe bilden. Zellen, die nach Stimulation weitere Vorläuferzellen anziehen und benachbarte Zellen dabei fördern, zu Knochen-bildenden Zellen zu differenzieren (z.B. in Osteoblasten, Osteozyten und/oder Osteoklasten) werden ebenfalls im Rahmen dieser Offenbarung als Vorläuferzellen betrachtet, da ihre Stimulation "indirekt" zu Knochenreparatur oder -regeneration führt. Zellen, die die Knochenbildung indirekt beeinträchtigen, können dies durch das "Ausfeilen" von verschiedenen Wachstumsfaktoren oder Zytokinen oder durch ihre physische Wechselwirkung mit anderen Zelltypen tun. Obwohl es von wissenschaftlichem Interesse ist, sind die direkten oder indirekten Mechanismen, mittels derer Vorläuferzellen Knochen- oder Wundreparatur stimulieren, nicht ein Gesichtspunkt bei der Ausübung dieser Erfindung.

[0027] Knochen-Vorläuferzellen und Knochen-Vorläufergewebe können Zellen und Gewebe sein, die in ihrer natürlichen Umgebung zu einem Bereich von aktivem Knochenwachstum, -reparatur oder -regeneration (ebenfalls als Wundreparaturstelle bezeichnet) gelangen. In bezug auf die Knochen-Vorläuferzellen können diese auch Zellen sein, die zu einem derartigen Bereich angezogen oder rekrutiert werden. Diese können Zellen sein, die innerhalb einer künstlich erzeugten Osteotomie-Region in einem Tiermodell wie dem hierin offenbarten vorkommen. Knochen-Vorläuferzellen können ebenfalls von tierischen oder menschlichen Geweben isoliert werden und in einer in vitro-Umgebung am Leben gehalten werden. Geeignete Körperbereiche, von denen Knochen-Vorläuferzellen erhalten werden können, sind Bereiche wie die Knochengewebe und die Flüssigkeit, die einen Bruch oder einen anderen Skelettdefekt (unabhängig davon, ob dies eine künstlich erzeugte Region ist) umgibt, oder tatsächlich vom Knochenmark. Isolierte Zellen können unter Verwendung von den hierin offenbarten Verfahren und Zusammensetzungen stimuliert werden und, sofern gewünscht, an eine geeignete Stelle in dem Tier zurückgeführt werden, an der eine Knochenreparatur stimuliert werden soll. In derartigen Fällen würden die Nukleinsäure enthaltenden Zellen selbst eine Form eines therapeutischen Mittels darstellen. Derartige ex vivo-Protokolle sind dem Fachmann wohlbekannt.

[0028] In wichtigen Ausführungsformen der Erfindung werden die Knochen-Vorläuferzellen und -gewebe solche Zellen und Gewebe sein, die an den Bereich des Knochenbruchs oder -schadens gelangen, den man zu behandeln wünscht. Demgemäß gibt es in den auf eine Behandlung zielenden Ausführungsformen keine mit der Identifizierung von geeigneten Ziel-Vorläuferzellen, auf die die vorliegenden therapeutischen Zusammensetzungen angewendet werden sollen, verbundenen Schwierigkeiten. Alles was in derartigen Fällen erforderlich ist, ist eine geeignete stimulatorische Zusammensetzung zu erhalten, wie es hierin offenbart ist, und die Region des Knochenbruchs oder Defekts mit der Zusammensetzung zu kontaktieren. Die Art dieser biologischen Umgebung ist derart, daß die geeigneten Zellen in Abwesenheit irgendwelchen "Targetings" oder zellulärer Identifizierung durch den Praktiker aktiviert werden.

[0029] Bestimmte erfindungsgemäße Verfahren beinhalten im allgemeinen das Kontaktieren von Knochen-Vorläuferzellen mit einer Zusammensetzung, die ein oder mehrere osteotrope Gene (mit oder ohne zusätzliche Gene, Proteine oder andere Biomoleküle) umfaßt, um die Expression des Gens in den Zellen zu fördern. Wie vorstehend umrissen, können die Zellen in vitro oder in vivo kontaktiert werden. Dies wird auf die direkteste Art und Weise durch einfaches Erhalten eines funktionellen Konstrukts eines osteotropen Gens und das Anwenden dieses Konstukts auf die Zellen erreicht. Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben auf überraschende Weise gefunden, daß es keine besonderen molekularbiologischen Modifikationen gibt, die durchgeführt werden müssen, um eine wirksame Expression des Gens in den Vorläuferzellen zu fördern. Ein Kontaktieren der Zellen mit DNA, z.B. einem linearen DNA-Molekül oder DNA in Form eines Plasmids oder anderen rekombinanten Vektors, der das interessierende Gen unter der Kontrolle eines Promoters enthält, sowie die geeigneten Terminationssignale, ist ausreichend, um zu einer Aufnahme und Expression der DNA zu führen, ohne daß weitere Schritte erforderlich sind.

[0030] In bevorzugten Ausführungsformen wird das Verfahren des Kontaktierens der Vorläuferzellen mit der osteotropen Gen-Zusammensetzung in vivo durchgeführt. Wiederum ist eine direkte Folge dieses Verfahrens, daß die Zellen das Gen aufnehmen und exprimieren, und daß sie ohne zusätzliche Schritte das Stimulieren von Knochengewebewachstum, -reparatur oder -regeneration bewirken.

[0031] Ein Assay eines osteoinduktiven Gens kann unter Verwendung des Knocheninduktions-Bioassays von Sampath und Reddi (1981; durch Bezugnahme hierin aufgenommen) durchgeführt werden. Dies ist ein Rattenknochenbildungs-Assay, der routinemäßig eingesetzt wird, um die osteogene Aktivität von Knochen-induzierenden Faktoren zu bewerten.

[0032] Zum Analysieren der Wirkungen von osteotropen Genen auf das Knochenwachstum wird man jedoch im allgemeinen dazu geleitet, das neue hierin offenbarte Osteotomie-Modell zu verwenden.

2. Osteotrope Gene

[0033] Wie sie hierin verwendet werden, werden die Begriffe "osteotrop" und "osteogenes Gen" verwendet, um ein Gen oder eine DNA-kodierende Region zu bezeichnen, die ein Protein, Polypeptid oder Peptid kodiert, das die Eigenschaft besitzt, die Knochenbildung zu fördern oder an deren Förderung mitzuwirken, oder das die Geschwindigkeit des Wachstums oder Heilens von primären Knochen erhöht (oder sogar ein Gen, das die Geschwindigkeit des Wachstums oder Heilens von Skelett-Bindegewebe erhöht). Die Begriffe "fördern", "induzieren" und "stimulieren" werden im gesamten Text miteinander austauschbar verwendet, um direkte oder indirekte Prozesse zu bezeichnen, die schließlich in der Bildung von neuem Knochengewebe oder in einem erhöhten Grad der Knochenreparatur resultieren. Somit ist ein osteotropes Gen ein Gen, das bei Expression bewirkt, daß der Phänotyp einer Zelle wechselt, so daß die Zelle entweder differenziert, andere Zellen zum Differenzieren stimuliert, Knochen-bildende Zellen anzieht, oder auf eine andere Art wirkt, die schließlich zu neuem Knochengewebe führt.

[0034] Bei der Verwendung des neuen Osteotomie-Modells der Erfindung ist ein osteotropes Gen als ein Gen gekennzeichnet, das richtiges Knochenwachstum in dem Osteotomiespalt zu einem beliebigen Grad stimuliert, der höher ist, als der in Kontrollstudien beobachtete, z.B. parallelen Studien unter Verwendung von irrelevanten Marker-Genen wie β-Galactosidase. Diese Stimulierung von "richtigem Knochenwachstum" beinhaltet sowohl die Art des Gewebewachstums wie auch die Geschwindigkeit der Knochenbildung. Bei der Verwendung des Modells mit einem Osteotomiespalt von 5 mm wird ein osteotropes Gen im allgemeinen gekennzeichnet als ein Gen, das in der Lage ist, neue Knochenbildung zu fördern oder zu induzieren, anstatt eine anormale Knochenbruch-Reparatur, d.h. eine schlechte Frakturheilung. Bei der Verwendung eines Osteotomiespalts von 2 mm kann man osteotrope Gene als Gene kennzeichnen, die die Geschwindigkeit der primären Knochenheilung im Vergleich zu Kontrollen erhöhen, und stärker bevorzugt als Gene, die die Reparatur des Osteoto-

mie-Defekts in einem Zeitraum von weniger als neun Wochen stimulieren.

[0035] Allgemein ausgedrückt kann ein osteotropes Gen auch als ein Gen gekennzeichnet werden, das das Wachstum oder die Regeneration von Skelett-Bindegeweben wie Sehnen, Knorpel und Ligament stimulieren kann. So könnten in bestimmten Ausführungsformen die erfindungsgemäßen Verfahren und Zusammensetzungen eingesetzt werden, um das Wachstum oder die Reparatur von sowohl Knochengewebe selbst als auch Skelett-Bindegeweben zu stimulieren.

[0036] Eine Vielzahl von osteotropen Genen ist nun bekannt, die sich alle zur Verwendung in Verbindung mit der vorliegenden Erfindung eignen. Osteotrope Gene und die Proteine, die sie kodieren, umfassen zum Beispiel systemische Hormone wie PTH (Parathyroid Hormone) und Östrogen; viele verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine; chemotaktische adhäsive Peptide oder Polypeptide; Moleküle wie Activin (U.S.-Patent 5,208,219, das hierin unter Bezugnahme aufgenommen wird); spezifische BMPs (Bone Morphogenetic Proteins); und sogar Wachstumsfaktor-Rezeptor-Gene.

[0037] Beispiele geeigneter osteotroper Wachstumsfaktoren umfassen solche der TGF (Transforming Growth Factor)-Genfamilie, einschließlich TGFs 1-3, und insbesondere TGF-β1, TGF-β2 und TGF-β3 (U.S.-Patente 4,886,747 und 4,742,003, die hierin durch Bezugnahme aufgenommen werden), wobei TGF-α (U.S.-Patent 5,168,051, das hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird) möglicherweise auch verwendet werden kann; und auch FGFs (Fibroblast Growth Factors), die zuvor als saurer und basischer FGF bezeichnet wurden und nun als FGF1-9 bezeichnet werden; GMCSF (Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor); EGF (Epidermal Growth Factor); PDGF (Platelet Derived Growth Factor); IGFs (Insulin-Like Growth Factors), einschließlich IGF-I und IGF-II; und LIF (Leukemia Inhibitory Factor), der ebenfalls als HILDA und DIA bekannt ist. Jedes beliebige der vorangehenden oder anderer verwandter Gene oder DNA-Segmente, die die aktiven Teile derartiger Proteine kodieren, kann in den neuen Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung verwendet werden.

[0038] Bestimmte bevorzugte osteotrope Gene und DNA-Segmente sind die der TGF-Superfamilie, wie TGF-β1, TGF-β2, und TGF-β3 und Mitglieder der BMP-Genfamilie. Zum Beispiel sind verschiedene BMP-Gene kloniert worden, die ideale Kandidaten für die Verwendung bei den Nukleinsäure-Übertragungs- oder Zufuhr-Protokollen der Erfindung sind. Geeignete BMP-Gene sind die als BMP-2 bis BMP-12 bezeichneten. BMP-1 wird derzeit nicht als besonders nützlich betrachtet.

[0039] Es gibt eine beträchtliche Vielfalt bei der Terminologie, die gegenwärtig in der Literatur zur Bezeichnung dieser Gene und Polypeptide benutzt wird. Es wird dem Fachmann klar sein, daß sämtliche BMP-Gene, die ein aktives osteogenes Protein kodieren, zur Verwendung in dieser Erfindung in Erwägung gezogen werden, unabhängig von der verschiedenen Terminologie, die benutzt werden kann. Zum Beispiel wird BMP-3 ebenfalls Osteogenin genannt und BMP-7 wird auch OP-1 (Osteogenes Protein-1) genannt. Es ist wahrscheinlich, daß die Familie der OP genannten Faktoren so groß wie die der BMP genannten ist, und daß diese Begriffe tatsächlich die gleiche Gruppe von Molekülen beschreibt (Alper, 1994).

[0040] Die DNA-Sequenzen für verschiedene BMP- (oder OP-)Gene ist sowohl in wissenschaflichen Artikeln als auch in U.S.-Patenten wie 4,877,864; 4,968,590; 5,108,753 beschrieben worden. Auf spezifische Weise wurden BMP-1-Sequenzen in U.S.-Patent 5,108,922 offenbart; BMP-2A (derzeit als BMP-2 bezeichnet) in U.S.-Patenten 5,166,058 und 5,013,649; BMP-2B (derzeit als BMP-4 bezeichnet) wurde in U.S.-Patent 5,013,649 offenbart; BMP-3 in 5,116,738; BMP-5 in 5,106,748; BMP-6 in 5,187,076; und BMP-7 in 5,108,753 und 5,141,905; die alle hierin durch Bezugnahme aufgenommen werden. Der Artikel von Wozney et al., (1988; durch Bezugnahme hierin aufgenommen) wird als besonders nützlich für das Beschreiben von molekularen Klonen von BMP und ihren 'Aktivitäten betrachtet. DNA-Sequenzen, die die als OP-1, COP-5 und COP-7 bezeichneten osteogenen Proteine kodieren, werden ebenfalls in U.S.-Patent 5,011,691 offenbart.

[0041] Sämtliche der vorstehend genannten erteilten U.S.-Patente werden hierin durch Bezugnahme aufgenommen und es ist beabsichtigt, sie zu verwenden, um die vorliegenden Lehren hinsichtlich der Herstellung von BMP- und OP-Genen und DNA-Segmenten, die osteotrope Polypeptide exprimieren, zu ergänzen. Wie in den vorangehenden Patenten offenbart ist und dem Fachmann bekannt ist, muß die ursprüngliche Quelle eines rekombinanten Gens oder DNA-Segments, das in einer therapeutischen Kur verwendet werden soll, nicht von der gleichen Spezies wie das zu behandelnde Tier stammen. In dieser Hinsicht wird in Erwägung gezogen, daß jedes beliebige rekombinante PTH-, TGF- oder BMP-Gen eingesetzt werden kann, um Knochenreparatur oder -regeneration bei einem menschlichen Subjekt oder einem Tier, z.B. einem Pferd, zu fördern. Besonders bevorzugte Gene sind solche, die aus menschlichen, Maus- und Rinder-Quellen stammen, da derartige Gene

und Gen-Segmente leicht erhältlich sind, wobei die menschlichen und Maus-Formen des Gens am stärksten zur Verwendung bei Behandlungskuren beim Menschen bevorzugt sind. Rekombinante Proteine und Polypeptide, die durch isolierte DNA-Segmente und Gene kodiert werden, werden oft mit einem Präfix "r" für rekombinant und "rh" für rekombinant, menschlich bezeichnet. Als solche werden DNA-Segmente, die rBMPs kodieren, wie rhBMP-2 oder rhBMP-4, als besonders nützlich in Verbindung mit dieser Erfindung betrachtet.

[0042] Die Definition eines "BMP-Gens", wie sie hierin verwendet wird, ist die eines Gens, das unter relativ stringenten Hybridisierungsbedingungen (siehe z.B. Maniatis et al., 1982) mit DNA-Sequenzen hybridisiert, von denen man gegenwärtig weiß, daß sie BMP-Gensequenzen enthalten.

[0043] Um ein osteotropes Gensegment oder cDNA herzustellen, kann man den hierin offenbarten technischen Lehren folgen und ebenfalls den Lehren jedes Patents oder jeder wissenschaftlichen Publikation, auf die hierin spezifisch Bezug genommen wird. Verschiedene Nukleotidsequenzen, die aktive BMPs kodieren, sind in U.S.-Patenten 5,166,058, 5,013,649, 5,116,738, 5,106,748, 5,187,076, 5,108,753 und 5,011,691, offenbart, die jeweils hierin durch Bezugnahme aufgenommen werden. Um hier nur ein Beispiel zu geben, U.S.-Patent 5,166,058 lehrt das hBMP-2 durch eine Nukleinsäuresequenz von Nukleotid #356 bis Nukleotid #1543 der in Tabelle II des Patents gezeigten Sequenz kodiert wird. Man kann somit ein hBMP-2-DNA-Segment unter Verwendung von molekularbiologischen Verfahren, wie der Polymerasekettenreaktion (PCR™) oder dem Durchmustern ("Screening") einer cDNA oder genomischen Genbank unter Verwendung von Primern oder Sonden mit Sequenzen, die auf der vorangehenden Nukleotid-Sequenz basieren, erhalten. Die Ausführung derartiger Verfahren ist eine Routineangelegenheit für den Fachmann, wie in verschiedenen wissenschaftlichen Artikeln wie Sambrook et al. (1989) gelehrt wird, der hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird. Bestimmte Dokumente beschreiben weiterhin auf besondere Weise geeignete Säuger-Expressions-Vektoren, z.B. U.S.-Patent 5,168,050, das hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird.

[0044] Osteotrope Gene und DNA-Segmente, die besonders für eine Verwendung bei bestimmten Aspekten der vorliegenden Zusammensetzung und Verfahren bevorzugt sind, sind die TGF-, PTH- und BMP-Gene. TGF-Gene werden in U.S.-Patenten 5,168,051; 4,886,747 und 4,742,003 beschrieben, die jeweils hierin durch Bezugnahme aufgenommen werden. TGFα kann möglicherweise nicht so weit anwendbar sein wie TGFβ, aber er wird zur Verwendung insbesondere bei Anwendungen, an denen Skelettgewebeerweichungen beteiligt sind, vorgeschlagen. Das PTH-Gen oder ein DNA-Segment, das dessen aktives Fragment kodiert, wie ein DNA-Segment, das ein die Aminosäuren 1-34 enthaltendes Polypeptid kodiert (hPTH1-34; Hendy et al., 1981; hierin durch Bezugnahme aufgenommen) ist ein anderes bevorzugtes Gen; wie es auch die BMP-4 und BMP-2 genannten Gene sind, wie das Gen oder die das Maus-BMP-4 kodierende cDNA, die hierin offenbart ist.

[0045] Es wird ebenfalls in Erwägung gezogen, daß man weitere Gene oder cDNAs klonieren kann, die ein osteotropes Protein oder Polypeptid kodieren. Die Verfahren zum Klonieren von DNA-Molekülen, d.h. zum Erhalten einer spezifischen kodierenden Sequenz aus einer DNA-Genbank, die sich von anderen DNA-Teilen unterscheidet, sind im Stand der Technik wohlbekannt. Dies kann zum Beispiel mittels des Durchmusterns einer geeigneten DNA-Genbank, wie es hierin in Beispiel XV offenbart wird, erreicht werden, wobei dieses Beispiel das Klonieren eines Wundheilungsgens betrifft. Das Verfahren zum Durchmustern/Screenen kann auf der Hybridisierung von Oligonukleotidsonden basieren, die aufgrund der Betrachtung von Anteilen der Aminosäuresequenz von bekannten DNA-Sequenzen, die verwandte osteogene Proteine kodieren, zugeschnitten werden. Die Durchführung derartiger Screening-Protokolle ist dem Fachmann wohlbekannt und ist ausführlich in der wissenschaftlichen Literatur, wie in Sambrook et al. (1989) beschrieben worden, die hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird.

[0046] Osteotrope Gene mit Sequenzen, die von denen in der Literatur beschriebenen abweichen, sind ebenfalls von der Erfindung umfaßt, solange die veränderten oder modifizierten Gene noch ein Protein kodieren, das die Stimulierung von Knochen-Vorläuferzellen auf beliebige direkte oder indirekte Art bewirkt. Diese Sequenzen schließen jene ein, die durch Punktmutationen hervorgerufen wurden, solche, die die Folge der Degeneriertheit des genetischen Codes sind oder natürlich auftretende allelische Varianten und weitere Modifikationen, die durch gentechnische Veränderungen, d.h. durch den Menschen, eingeführt worden sind.

[0047] Verfahren zum Einführen von Veränderungen in den Nukleotidsequenzen, die darauf ausgelegt sind, die funktionellen Eigenschaften der kodierten Proteine oder Polypeptide zu verändern, sind im Stand der Technik wohlbekannt, z.B. in U.S.-Patent 4,518,584, das hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird, wobei diese Techniken ebenfalls ausführlich hierin beschrieben sind. Derartige Modifikationen schließen die Deletion, Insertion oder Substitution von Basen ein, und somit Veränderungen der Aminosäuresequenz. Veränderungen können durchgeführt werden, um die osteogene Aktivität eines Proteins zu erhöhen, seine biologische Stabi-

lität oder Halbwertzeit zu erhöhen, sein Glykosylierungsmuster zu verändern und dergleichen mehr. Alle derartigen Modifikationen der Nukleotidsequenzen werden von dieser Erfindung umfaßt.

[0048] Es wird natürlich klar sein, daß ein oder mehr als ein osteotropes Gen in den Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung verwendet werden kann. Nukleinsäure-Zuführungs-Verfahren können somit die Verabreichung von einem, zwei, drei oder mehreren osteotropen Genen beinhalten. Die maximale Anzahl von Genen, die angewendet werden kann, ist nur durch praktische Erwägungen begrenzt, wie dem Aufwand für das gleichzeitige Präparieren einer großen Anzahl von Genkonstrukten oder sogar der Möglichkeit des Hervorrufens eines signifikanten nachteiligen zytotoxischen Effekts. Die bestimmte Kombination von Genen kann zwei oder mehr verschiedene BMP-Gene sein; oder sie kann derart sein, daß ein Wachstumsfaktor-Gen mit einem Hormon-Gen kombiniert wird, z.B. ein BMP-Gen und ein PTH-Gen; ein Hormon- oder Wachstumsfaktor-Gen kann sogar mit einem Gen kombiniert sein, das einen Zelloberflächen-Rezeptor, der mit dem Polypeptidprodukt des ersten Gens wechselwirken kann, kodiert.

[0049] Bei der Verwendung mehrerer Gene können diese in einem einzelnen genetischen Konstrukt unter der Kontrolle eines oder mehrerer Promotoren oder sie können als separate Konstrukte der gleichen oder verschiedener Art hergestellt werden. So kann eine fast unendliche Kombination verschiedener Gene und genetischer Konstrukte eingesetzt werden. Bestimmte Genkombinationen können ausgestaltet werden, um synergistische Wirkungen auf die Zellstimulierung und das Knochenwachstum zu erzielen oder ihre Verwendung kann auf andere Weise in diesen resultieren, wobei beabsichtigt ist, daß beliebige oder sämtliche derartigen Kombinationen in den Schutzbereich der vorliegenden Erfindung fallen. Tatsächlich sind viele synergistische Wirkungen in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben worden, so daß ein Fachmann leicht wahrscheinliche synergistische Genkombinationen oder sogar Gen-Proteinkombinationen identifizieren könnte.

[0050] Es wird ebenfalls klar sein daß, sofern gewünscht, das Nukleinsäuresegment oder Gen in Kombination mit anderen Mitteln verabreicht werden könnte, wie z.B. Proteinen oder Polypeptiden oder verschiedenen pharmazeutisch aktiven Agenzien. So lange das genetische Material einen Teil der Zusammensetzung bildet, gibt es praktisch keine Grenze hinsichtlich anderer Komponenten, die ebenfalls enthalten sein können, vorausgesetzt, daß die zusätzlichen Agenzien keine signifikant nachteilige Wirkung nach Kontakt mit den Zielzellen oder -geweben hervorrufen. Die Nukleinsäuren können somit mit einer Vielzahl anderer Agenzien zugeführt werden, zum Beispiel in bestimmten Ausführungsformen kann es erwünscht sein, einen Angiogenese-Faktor und/oder einen Inhibitor der Knochenresorption zu verabreichen, wie es in U.S.-Patent 5,270,300 bzw. 5,118,667 offenbart ist, die jeweils hierin durch Bezugnahme aufgenommen werden.

3. Genkonstrukte und DNA-Segmente

[0051] Wie sie hierin verwendet werden, werden die Begriffe "Gen" und "DNA-Segment" beide verwendet, um ein DNA-Molekül zu bezeichnen, das frei von gesamter genomischer DNA einer bestimmten Spezies isoliert worden ist. Deshalb ist ein Gen oder DNA-Segment, das ein osteotropes Gen kodiert, ein DNA-Segment, das Sequenzen enthält, die ein osteotropes Protein kodieren, aber es ist von gesamter genomischer DNA der Spezies, aus der die DNA erhalten wird, abgetrennt oder gereinigt worden. Umfaßt innerhalb des Begriffs "DNA-Segment" sind DNA-Segmente und kleinere Fragmente derartiger Segmente und ebenfalls rekombinante Vektoren, einschließlich beispielsweise Plasmiden, Cosmiden, Phagen, Retroviren, Adenoviren und dergleichen.

[0052] Der Begriff "Gen" wird der Einfachheit halber verwendet, um eine ein funktionelles Protein oder Peptid kodierende Einheit zu bezeichnen. Wie dem Fachmann verständlich sein wird, schließt dieser funktionelle Begriff sowohl genomische Sequenzen als auch cDNA-Sequenzen ein. Der Ausdruck "im wesentlichen von anderen kodierenden Sequenzen abgetrennt/isoliert" bedeutet, daß das Gen von Interesse, in diesem Fall ein osteotropes Gen, einen signifikanten Teil der kodierenden Region des DNA-Segments bildet, und daß das DNA-Segment nicht große Anteile natürlich vorkommender kodierender DNA, wie große chromosomale Fragmente oder andere funktionelle Gene oder cDNA kodierende Regionen enthält. Natürlich bezieht sich dies auf das DNA-Segment, wie es ursprünglich isoliert wurde, und schließt nicht Gene oder kodierende Regionen, wie Leader-Peptide oder Targeting-Sequenzen-kodierende Sequenzen, aus, die nachträglich durch die Hand des Menschen dem Segment zugefügt wurden.

[0053] Diese Erfindung stellt neue Wege bereit zum Verwenden verschiedener bekannter osteotroper DNA-Segmente und rekombinanter Vektoren. Wie vorstehend beschrieben, sind viele derartige Vektoren leicht erhältlich; ein besonders ausführliches Beispiel eines geeigneten Vektors zur Expression in Säugerzellen ist das in U.S.-Patent 5,168,050 beschriebene, das hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird. Es gibt jedoch

nicht das Erfordernis, daß ein hochgereinigter Vektor verwendet wird, solange wie das eingesetzte kodierende Segment ein osteotropes Protein kodiert und keine beliebigen kodierenden oder regulatorischen Sequenzen enthält, die eine signifikante nachteilige Wirkung auf die Knochen-Vorläuferzellen haben würden. Deshalb wird es auch verständlich sein, daß nützliche Nukleinsäuresequenzen zusätzliche Reste einschließen können, wie zusätzliche nichtkodierende Sequenzen, die entweder die 5'- oder 3'-Anteile der kodierenden Region flankieren oder verschiedene interne Sequenzen einschließen können, d.h. Introns, die bekanntlich innerhalb von Genen auftreten.

[0054] Nach dem Identifizieren eines geeigneten osteotropen Gens oder DNA-Moleküls kann es in einen beliebigen der vielen gegenwärtig im Stand der Technik bekannten Vektoren eingesetzt werden, so daß es die Expression und Bildung des osteotropen Proteins lenken wird, wenn es in eine Knochen-Vorläuferzelle eingebaut wird. In einem rekombinanten Expressions-Vektor ist die kodierende Region des DNA-Segments unter der Kontrolle eines Promoters positioniert. Der Promoter kann in Form des Promoters sein, der natürlicherweise mit einem osteotropen Gen assoziiert ist, wie vielleicht erhalten durch Isolieren der 5'-nichtkodierenden Sequenzen, die sich stromaufwärts von dem kodierenden Segment oder Exon befinden, zum Beispiel unter Verwendung von rekombinanten Klonierungsverfahren und/oder der PCR™-Technologie, im Zusammenhang mit den hierin offenbarten Zusammensetzungen.

[0055] In anderen Ausführungsformen wird vorausgesehen, daß bestimmte Vorteile erzielt werden können durch Positionieren des kodierenden DNA-Segments unter die Kontrolle eines rekombinanten oder heterologen Promoters. Wie hierin verwendet, ist es beabsichtigt, daß ein rekombinanter oder heterologer Promoter einen Promoter bezeichnet, der normalerweise nicht mit einem osteotropen Gen in seiner natürlichen Umgebung assoziiert ist. Derartige Promotoren können die normalerweise mit anderen osteotropen Genen assoziierten Promotoren einschließen und/oder Promotoren, die aus beliebigen anderen bakteriellen, viralen, eukaryotischen Zellen oder Säugerzellen isoliert wurden. Natürlicherweise wird es wichtig sein, einen Promoter zu verwenden, der auf wirksame Weise die Expression des DNA-Segments in Knochen-Vorläuferzellen lenkt.

[0056] Die Verwendung von rekombinanten Promotoren zur Erzielung von Protein-Expression ist im allgemeinen dem Fachmann in dem Gebiet der Molekularbiologie bekannt; siehe zum Beispiel Sambrook et al. (1989). Die eingesezten Promotoren können konstitutiv oder induzierbar sein, und können unter den geeigneten Bedingungen eingesetzt werden, um eine Expression auf hohem Niveau oder eine regulierte Expression des eingeführten DNA-Segments zu lenken. Die gegenwärtig bevorzugten Promotoren sind solche wie der CMV-, RSV-, LTR- und der SV40-Promoter (allein), und der SV40-Promoter in Kombination mit verschiedenen Enhancer-Elementen.

[0057] Osteotrope Gene und DNA-Segmente können auch in Form eines DNA-Inserts vorliegen, das sich innerhalb des Genoms eines rekombinanten Virus befindet, wie zum Beispiel einem rekombinanten Adenovirus, einem Adeno-assoziierten Virus (AAV) oder einem Retrovirus. In derartigen Ausführungsformen würde man, um das Gen in Kontakt mit einer Knochen-Vorläuferzelle zu bringen, die rekombinanten viralen Partikel herstellen, deren Genom das aus dem osteotropen Gen bestehende Insert enthält, und auf einfache Weise die Vorläuferzellen oder -gewebe mit dem Virus kontaktieren, wodurch der Virus die Zellen infiziert und das genetische Material überträgt.

[0058] In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen würde man eine Matrix oder ein Implantat-Material mit Virus imprägnieren, indem man das Material in eine Stocklösung des rekombinanten Virus eintaucht, z.B. für 1-2 Stunden, und dann die Knochen-Vorläuferzellen oder -gewebe mit der resultierenden imprägnierten Matrix kontaktiert. Die Zellen durchdringen oder wachsen dann in die Matrix ein, wodurch sie den Virus kontaktieren und eine Virusinfektion erfolgen lassen, die dazu führt, daß die Zellen das gewünschte Gen oder cDNA aufnehmen und das kodierte Protein exprimieren.

[0059] In anderen bevorzugten Ausführungsformen würde man ein Matrix-Nukleinsäure-Gemisch bilden, sei es unter Verwendung von "nackter" DNA, einem Plasmid oder einem viralen Vektor, und die Knochen-Vorläuferzellen oder -gewebe mit der resultierenden gemischten Matrix kontaktieren. Die Matrix kann dann die Nukleinsäure in die Zellen liefern im Anschluß an eine Disassoziation an der Zelloberfläche, oder in der unmittelbaren zellulären Umgebung. Auf die gleiche Weise kann das Matrixgemisch selbst, insbesondere ein Partikel- oder Faser-DNA-Gemisch, durch die Zellen aufgenommen werden, um anschließend eine intrazelluläre Freisetzung des genetischen Materials bereitzustellen. Die Matrix kann dann aus der Zelle extrudiert werden, durch die Zelle abgebaut werden, oder sogar innerhalb der Zelle gespeichert werden. Die molekularen Mechanismen, durch die eine Knochen-verträgliche Matrix die Übertragung von DNA auf eine Zelle erreicht, sind für die Ausübung der vorliegenden Erfindung unwesentlich.

4. Knochen-verträgliche Matrices

[0060] In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen beinhalten die erfindungsgemäßen Verfahren das Herstellen einer Zusammensetzung, in der das osteotrope Gen, Gene, DNA-Segmente oder Zellen, die bereits derartige Gene oder Segmente eingebaut haben, mit einer Knochen-verträglichen Matrix gemäß Anspruch 1 assoziiert, darin imprägniert oder sogar damit verknüpft sind unter Bildung einer "Matrix-Gen-Zusammensetzung" und die Matrix-Gen-Zusammensetzung wird dann in Kontakt gebracht mit den Knochen-Vorläuferzellen oder -geweben. Die Matrix kann mit einem Gen-DNA-Segment auf einfache Weise imprägniert werden, indem die Matrix in eine Lösung, die die DNA enthält, wie eine Plasmid-Lösung, für einen kurzen Zeitraum zwischen etwa 5 Minuten oder so bis zu und einschließlich etwa zwei Wochen eingetaucht wird.

[0061] Matrix-Gen-Zusammensetzungen sind alle solche, in denen genetisches Material adsorbiert, absorbiert, imprägniert, daran verknüpft oder auf andere Weise im allgemeinen in Kontakt mit der Matrix gehalten wird. Der Ausdruck "in Kontakt mit der Matrix gehalten" bedeutet, daß eine wirksame Menge der Nukleinsäure-Zusammensetzung auf funktionelle Weise mit der Matrix bis zu ihrer Übertragung auf die Knochen-Vorläuferzelle oder ihre Freisetzung in die Stelle des Knochengewebes auf funktionelle Weise mit der Matrix assoziiert ist.

[0062] Die Matrixart, die in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen, Vorrichtungen und Verfahren verwendet werden kann, ist eine "Knochen-verträgliche Matrix". Dies bedeutet, daß die Matrix alle Eigenschaften, die gemeinhin mit "biokompatibel" assoziiert werden, besitzt, daß sie in einer Form vorliegt, die nicht eine signifikante nachteilige, allergische oder anderweitig unpassende Reaktion hervorruft, wenn sie einem Tier verabreicht wird, und daß sie sich ebenfalls für ein Inkontaktbringen mit Knochengewebe eignet. Eine "signifikante" nachteilige Wirkung ist eine, die die normalerweise akzeptierten Nebenwirkungen, die mit jeder gegebenen Therapie assoziiert sind, überschreitet.

[0063] "Knochen-verträglich", wie hierin verwendet, bedeutet, daß die Matrix (und das Gen) nicht eine signifikante, nachteilige oder unpassende Reaktion hervorruft, wenn sie in Kontakt mit Knochen gebracht wird. In bestimmten Ausführungsformen, wenn man eine bestimmte Knochen-verträgliche Matrix zur Verwendung aussucht, kann man wahlweise verschiedene andere Faktoren mitberücksichtigen, zum Beispiel das Vermögen der Matrix, eine Struktur der entwickelnden Knochen bereitzustellen, ihr Vermögen, nachdem der Knochen repariert worden ist, in den Knochen resorbiert zu werden, und dergleichen. Diese Eigenschaften sind jedoch nicht für die Ausführung der Erfindung erforderlich, und sind lediglich beispielhaft für Faktoren, die man berücksichtigen kann.

[0064] In anderen Ausführungsformen kann man auch die Wahrscheinlichkeit berücksichtigen, daß die Matrix in die Zelle transportiert wird, z.B. durch aktiven oder passiven Membrantransport. Wo ein derartiger Transport und eine anschließende Nukleinsäure-Freisetzung vorausgesehen wird, können andere Eigenschaften der Matrix und des Gens bei der Optimierung der Matrix-Gen-Formulierung geprüft werden. Zum Beispiel können Adenovirus-Vektoren eine vorteilhafte DNA-Freisetzung in derartigen Ausführungsformen bereitstellen. Die Matrices, die leicht im Zytoplasma metabolisiert werden, würden wahrscheinlich ebenfalls in deratigen Ausführungsformen bevorzugt sein. Matrices, die später aus der Zelle freigesetzt werden, und vorzugsweise auch aus dem umgebenden Gewebegebiet entfernt werden, würden eine andere bevorzugte Form einer Matrix zur Verwendung in derartigen Ausführungsformen sein.

[0065] Die Wahl des Matrixmaterials wird entsprechend den bestimmten Umständen und der zu behandelnden Knochenregion unterschiedlich ausfallen. Matrices, wie die in U.S.-Patent 5,270,300 beschriebenen (das hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird) können eingesetzt werden. Physikalische und chemische Charakteristika, wie z.B. die Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit, Festigkeit, Biegfestigkeit, Grenzflächeneigenschaften und sogar kosmetisches Erscheinungsbild, können bei der Wahl der Matrix berücksichtigt werden, wie es dem Fachmann wohlbekannt ist. Geeignete Matrices werden die Gen-Zusammensetzung zuführen und können in bestimmten Umständen in eine Zelle eingebaut werden oder sie können eine Oberfläche für neues Knochenwachstum bereitstellen, d.h. sie können als ein in situ-Gerüst wirken, durch das die Vorläuferzellen wandern können.

[0066] Ein besonders wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ihre Verwendung im Zusammenhang mit orthopädischen Implantaten und Grenzflächen und künstlichen Gelenken, einschließlich der Implantate selbst und funktioneller Teile eines Implantats, wie zum Beispiel chirurgischen Schrauben, Nägeln und dergleichen. In bevorzugten Ausführungsformen wird vorgesehen, daß die Metalloberfläche oder -oberflächen eines Implantats oder eines Anteils davon, wie eine Titanoberfläche, mit einem Material beschichtet sein wird, daß

eine Affinität für Nukleinsäuren besitzt, am stärksten bevorzugt mit Hydroxylapatit, und das beschichtete Metall weiterhin mit einem Gen oder einer Nukleinsäure beschichtet wird, die man zu übertragen wünscht. Die zur Verfügung stehenden chemischen Gruppen des absorptiven Materials, wie des Hydroxylapatits, können zur Kontrolle seiner Affinität zur Nukleinsäure leicht manipulierbar sein, wie dies dem Fachmann bekannt ist.

[0067] In bestimmten Ausführungsformen können nicht-bioabbaubare Matrices eingesetzt werden, wie gesintertes Hydroxylapatit, Aluminate, andere biokeramische Materialien und Metallmaterialien, insbesondere Titan. Die geeignete keramische Zufuhreinrichtung ist die in U.S.-Patent 4,596,574 beschriebene, das hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird. Polymere Matrices können ebenfalls eingesetzt werden, einschließlich Acrylesterpolymere, Milchsäurepolymere und Polymilchsäure/Polyglycolsäure-(PLGA-) Blockcopolymere, die offenbart worden sind (U.S.-Patent 4,526,909, U.S.-Patent 4,563,489, Simons et al., 1992, bzw. Langer und Folkman, 1976, die jeweils hierin durch Bezugnahme aufgenommen werden).

[0068] In bestimmten Ausführungsformen wird vorausgesehen, daß eine bioabbaubare Matrix wahrscheinlich die nützlichste ist. Eine bioabbaubare Matrix wird allgemein als eine definiert, die im Körper resorbiert werden kann. Potentielle bioabbaubare Matrices zur Verwendung im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen, Vorrichtungen und Verfahren umfassen beispielsweise bioabbaubares und chemisch definiertes Calciumsulfat, Tricalciumphosphat, Hydroxylapatit, PLGA-Blockcopolymere, Polyanhydride, Matrices aus gereinigten Proteinen, und halbgereinigte extrazelluläre-Matrix-Zusammensetzungen.

[0069] Eine bevorzugte Gruppe von Matrices sind collagenartige Matrices, einschließlich solcher, die aus Sehnen oder Hautcollagen erhalten wurden, z.B. Typ I-Collagen, das im allgemeinen aus der Dermis hergestellt wird; die aus Knorpel erhaltenen, wie Typ II-Collagen; und verschiedene andere Collagentypen. Collagene können aus einer Vielzahl von handelsüblichen Quellen erhalten werden, z.B. von Sigma, die Typ II-Collagen bereitstellt, das aus Rinder-Trachea erhalten wurde; und von der Collagen Corporation. Collagen-Matrices können ebenfalls, wie in den U.S.-Patenten 4,394,370 und 4,975,527 beschrieben, erhalten werden, die jeweils hierin durch Bezugnahme aufgenommenen werden.

[0070] Die verschiedenen collagenartigen Materialien können ebenfalls in Form von mineralisiertem Collagen vorliegen. Ein bevorzugtes mineralisiertes collagenartiges Material ist das als UltraFiber™ bezeichnete, das von der Norian Corp. (Mountain View, CA) erhältlich ist. U.S.-Patent 5,231,169, das hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird, beschreibt die Herstellung von mineralisiertem Collagen durch die Bildung von Calciumphosphat-Mineral unter mildem Rühren in situ in Gegenwart von dispersierten Collagen-Fibrillen. Eine derartige Formulierung kann im Zusammenhang des Zuführen eines Nukleinsäuresegments zu einer Knochengewebe-Region eingesetzt werden.

[0071] Bestimmte andere bevorzugte collagenartige Materialien sind solche, die auf Typ II-Collagen basieren. Es ist entdeckt worden, daß Typ II-Collagen-Zubereitungen die überraschende und vorteilhafte Eigenschaft besitzen, in Abwesenheit eines osteotropen Gens Knochen-Vorläuferzellen stimulieren zu können. Vor der vorliegenden Erfindung war angenommen worden, daß Typ II-Collagen nur eine strukturelle Rolle in der extrazellulären Matrix des Knorpels hat, und die vorliegende Feststellung, daß Typ II-Collagen tatsächlich ein osteokonduktives/osteoinduktives Material ist, ist unerwartet. Die vorliegende Erfindung sieht daher die Verwendung einer Vielzahl von Typ II-Collagen-Zubereitungen als Genübertragungs-Matricen oder Knochenzellen-Stimulantien vor, entweder mit oder ohne DNA-Segmente, einschließlich nativen Typ II-Collagens, wie es aus Knorpel hergestellt wird, und rekombinantem Typ II-Collagen.

[0072] PLGA-Blockcopolymere können ebenfalls als Genübertragungs-Matrices eingesetzt werden. Es ist gezeigt worden, daß derartige Polymere leicht DNA aufnehmen/einbauen, im Handel erhältlich sind, nicht toxisch sind, und mit definierten Geschwindigkeiten hydrolysieren (d.h. sie erleichtern das depotartige Freisetzen von pharmazeutischen Mitteln). PLGA-Blockcopolymere besitzen zwei besonders vorteilhafte Eigenschaften, die darin bestehen, daß sie erstens ein reversibles thermisches Festwerden zeigen und zweitens mit anderen Mitteln kombiniert werden können, die ein radiographisches Sichtbarmachen erlauben.

5. Nukleinsäureübertragungs-Ausführungsform

[0073] Sobald eine geeignete Matrix-Gen-Zusammensetzung hergestellt oder erhalten wurde, ist alles, was zum Zuführen des osteotropen Gens zu Knochen-Vorläuferzellen in einem Tier erforderlich ist, die Matrix-Gen-Zusammensetzung in Kontakt mit der Stelle in dem Körper zu bringen, an der man die Knochenbildung zu fördern wünscht. Dies kann erzielt werden durch physikalisches Positionieren der Matrix-Gen-Zusammensetzung in Kontakt mit der Körperstelle oder durch Injizieren einer injizierbaren Form der Matrix-Gen-Zu-

sammensetzung in den geeigneten Bereich.

[0074] Die Matrix-Gen-Zusammensetzung kann auf eine einfache Knochenbruchstelle aufgebracht werden, die man zu heilen/reparieren versucht, auf einen Bereich eines schwachen Knochens, wie bei einem Patienten mit Osteoporose, oder einen Knochenhöhlenbereich, den man mit neuem Knochengewebe zu füllen wünscht. Knochenhöhlen können als das Ergebnis einer vererblichen Störung, eines Geburtsdefektes auftreten, oder können sich ergeben im Anschluß an eine dentale oder periodontale Chirurgie oder nach Entfernung eines Osteosarkoms.

[0075] Die Verwendung von PLGA und derartigen Verbindungen als Matrices erlaubt, daß die Matrix-DNA-Zusammensetzung injizierbar ist, was im allgemeinen dadurch erreicht wird, daß die Matrix-Gen-Zusammensetzung mit einem Pluronischen Mittel gemischt wird. Die resultierende Matrix-Gen-Pluronisches Mittel-Zusammensetzung kann in einer Spritze mit Wärmeisolierung gelagert werden, bei einer Temperatur von ungefähr 4°C gehalten werden, unmittelbar vor der Verabreichung an den Körper. Bei dieser Temperatur und Umgebung wird die Zusammensetzung eine Flüssigkeit sein. Im Anschluß an das Einsetzen in den Körper wird die Zusammensetzung sich hin zu der Körpertemperatur ausgleichen und dabei eine Gel-artige Matrix bilden.

[0076] Das zuvor genannte Phänomen wird "reversibles thermisches Festwerden/Gelbildung" genannt und dies erlaubt, eine kontrollierte Geschwindigkeit des Festwerdens zu erzielen. Die Art der Verwendung von Pluronic-artigen Mitteln in diesem Zusammenhang wird dem Fachmann angesichts der vorliegenden Offenbarung bekannt sein. Matrix-Gen-Pluronische Mittel-Zusammensetzungen können auch mit einem Abbildungsmittel gemischt werden oder auf allgemeine Weise damit assoziiert werden, so daß die vorliegende Gen-Übertragungstechnologie in Abbildungsmodalitäten verwendet werden kann. In diesen Fällen wird der behandelnde Arzt oder Tierarzt in der Lage sein, die Zufuhr und die Positionierung der Matrix-Gen-Zusammensetzung zu verfolgen. Es sind viele sichere und wirksame Abbildungsmittel, wie die radiographische Verbindung Calciumphosphat, erhältlich, die in Verbindung mit der Fluoroskopie eingesetzt werden können, oder sogar mit der Tomographie, um den Körper oder die Gewebestelle abbilden zu können, während die Zusammensetzung zugeführt wird.

[0077] In Fällen, in denen ein Abbild einer Gewebestelle bereitzustellen ist, wird man ein nachweisbares Abbildungsmittel zu verwenden wünschen, wie ein radiographisches Mittel oder sogar ein paramagnetisches oder radioaktives Mittel. Es sind viele radiographische diagnostische Mittel im Stand der Technik als für Abbildungszwecke nützlich bekannt, einschließlich z.B. Calciumphosphat.

[0078] Im Falle von paramagnetischen Ionen schließen Beispiele Chrom (III), Mangan (II), Eisen (III), Eisen (II), Kobalt (II), Nickel (II), Kupfer (II), Neodym (III), Samarium (III), Ytterbium (III), Gadolinium (III), Vanadium (II), Terbium (III), Dysprosium (III), Holmium (III) und Erbium (III) ein, wobei Gadolinium im allgemeinen bevorzugt ist. Ionen, die in anderen Zusammenhängen nützlich sind, wie bei der Röntgenstrahlabbildung, schließen Lanthan (III), Gold (III), Blei (II) und insbesondere Bismuth (III) ein, sind aber nicht auf diese beschränkt.

[0079] Obwohl es im allgemeinen nicht bevorzugt ist, sind radioaktive Isotope nicht ausgeschlossen und können, falls gewünscht, zu Abbildungszwecken eingesetzt werden. Geeignete Ionen umfassen ^{131}Iod, ^{123}Iod, ^{99m}Technetium, ^{111}Indium, ^{188}Rhenium, ^{186}Rhenium, ^{67}Gallium, ^{67}Kupfer, ^{90}Yttrium, ^{125}Iod und ^{211}Astatin.

[0080] Die Menge an Gen-Konstrukt, die auf die Matrix aufzubringen ist, und die Menge an Matrix-Gen-Material, die auf das Knochengewebe aufzubringen ist, wird durch den behandelnden Arzt oder Tierarzt unter Berücksichtigung verschiedener biologischer und medizinischer Faktoren bestimmt werden. Beispielsweise würde man wünschen, das bestimmte osteotrope Gen und die Matrix zu berücksichtigen, die Menge an Knochengewicht, die man zu bilden wünscht, die Stelle des Knochenschadens, den Zustand des geschädigten Knochens, das Alter des Patienten oder des Tiers, das Geschlecht und die Diät, die Ernsthaftigkeit einer beliebigen Infektion, die Zeit der Verabreichung und beliebige weitere klinische Faktoren, die Knochenwachstum beeinträchtigen können, wie die Serumwerte verschiedener Faktoren und Hormone. Die geeignete Dosistherapie wird deshalb für den Fachmann angesichts der vorliegenden Offenbarung unter gleichzeitiger Berücksichtigung der individuellen Umstände gleich bestimmbar sein.

[0081] Bei der Behandlung von Menschen und Tieren kann ein Fortschritt durch periodische Überprüfung des Knochenwachstums und/oder -reparatur, z.B. unter Verwendung von Röntgenstrahlen, verfolgt werden. Die therapeutischen Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung sind zur Verwendung bei sowohl medizinischen als auch tiermedizinischen Anwendungen gedacht, aufgrund des Fehlens einer Speziesspezifität bei den Knochen-induktiven Faktoren. Insbesondere wird daran gedacht, daß Tiere aus dem Haushalt, der Land-

wirtschaft und dem Zoologischen sowohl wie durchgekreuzte Pferde unter Verwendung der hierin offenbarten Protokolle zur Nukleinsäure-Übertragung behandelbar sein würden.

[0082] Die vorliegenden Verfahren und Zusammensetzungen können auch prophylaktische Verwendungen bei der Reduktion von geschlossenen und offenen Brüchen und auch bei der verbesserten Fixierung von künstlichen Gelenken haben. Die Erfindung ist auf die Stimulierung von Knochenreparatur bei congenitalen, trauma-induzierten oder durch onkologische Resektion induzierten craniofacialen Defekten anwendbar, und ist ebenfalls bei der Behandlung der periodontalen Krankheit und anderer Zahnreparaturprozesse und sogar bei der kosmetischen plastischen Chirurgie nützlich. Die erfindungsgemäßen Matrix-Gen-Zusammensetzungen und -Vorrichtungen können ebenfalls bei der Wundheilung und der verwandten Gewebereparatur verwendet werden, einschließlich der Heilung von Verbrennungen, Einschnitten und Ulzera, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0083] Die vorliegende Erfindung umfaßt auch auf DNA-basierende Zusammensetzungen zur Verwendung bei einer zellulären Übertragung zur Behandlung von Knochendefekten und Störungen. Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen umfassen im allgemeinen ein osteotropes Gen in Verbindung mit einer Knochen-verträglichen Matrix, wie Typ II-Collagen, wobei die Verbindung Knochenwachstum, -reparatur oder -regeneration nach Verabreichung an oder Implantation in eine Knochen-Vorläufergewebestelle eines Tieres stimulieren kann. Das osteotrope Gen oder die osteotropen Gene können ein beliebiges der vorstehend beschriebenen sein, wobei das TGF-α- (für weiches Skelettgewebe), TGF-β1-, TGF-β2, TGF-β3-, PTH-, BMP-2- und BMP-4-Gen im allgemeinen bevorzugt ist. Gleichfalls kann die Knochen-verträgliche Matrix unabhängig von der Wahl des Gens eine beliebige der vorstehend beschriebenen sein, wobei die bioabbaubaren Matrices wie Collagen und insbesondere Typ II-Collagen bevorzugt sind.

[0084] In weiteren Ausführungsformen betrifft die vorliegende Erfindung osteotrope Vorrichtungen, wobei die Vorrichtung im allgemeinen als geformte oder ausgestaltete Matrix-Gen-Zusammensetzung betrachtet werden kann. Die erfindungsgemäßen Vorrichtungen umfassen natürlicherweise eine Knochen-verträgliche Matrix, in der ein osteotropes Gen mit der Matrix assoziiert ist. Die Kombination von Genen und Matrix-Komponenten ist derart, daß die Vorrichtung Knochenwachstum oder Heilung bei Implantation in ein Tier stimulieren kann. Die Vorrichtungen können praktisch jede beliebige Größe oder Form besitzen, so daß ihre Dimensionen passend zur Stelle des Knochenbruchs oder der Knochenhöhle bei dem zu behandelnden Tier angepaßt sind, was erlaubt, daß der Bruch sich einheitlicher verbindet und/oder das neue Knochenwachstum einheitlicher ist. Andere besonders in Erwägung gezogene Vorrichtungen sind solche, die ausgelegt sind, um als ein künstliches Gelenk zu wirken. Titanvorrichtungen und Hydroxylapatitbeschichtete Titanvorrichtungen werden bei bestimmten Vorrichtungen bevorzugt sein. Teile von Vorrichtungen in Kombination mit einem osteotropen Nukleinsäuresegment, wie einer DNA-beschichteten Schraube für ein künstliches Gelenk und dergleichen, fallen ebenfalls in den Bereich der Erfindung.

[0085] Therapeutische Kits umfassend, in einem geeigneten Behältermittel, eine Knochen-verträgliche Matrix, wie Typ II-Collagen oder ein PLGA-Blockcopolymer, und ein osteotropes Gen, bilden einen anderen Aspekt der Erfindung. Derartige Kits werden im allgemeinen eine pharmazeutisch verträgliche Formulierung der Matrix und eine pharmazeutisch verträgliche Formulierung eines osteotropen Gens enthalten, wie ein PTH-, BMP-, TGF-β-, FGF-, GMCSF-, EGF-, PDGF-, IGF- oder ein LIF-Gen. Gegenwärtig bevorzugte Gene umfassen PTH-, TGF-β1-, TGF-β2-, TGF-β3- und BMP-4-Gene.

[0086] Die Kits können ein einzelnes Behältermittel umfassen, das sowohl die biokompatible Matrix als auch das osteotrope Gen enthält. Das Behältermittel kann, sofern gewünscht, eine pharmazeutisch verträgliche sterile einspritzbare Matrix enthalten, die assoziiert mit ihr die osteotrope Gen-Zusammensetzung und wahlweise eine nachweisbare Markierung oder ein Abbildungmittel besitzt. Die einspritzbare Matrix-DNA-Formulierung kann in der Form einer Gel-artigen Zusammensetzung sein, z.B. eine Typ II-Collagen-DNA-Zusammensetzung oder sie kann sogar in einer flüssigeren Form sein, die nichtsdestoweniger bei Verabreichung an den Körper eine Gel-artige Zusammensetzung bildet. In diesen Fällen kann das Behältermittel selbst eine Spritze sein, eine Pipette oder eine andere derartige Vorrichtung, aus der das Matrix-DNA-Material auf eine Knochengewebe-Stelle oder Wundfläche aufgetragen werden kann. Jedoch kann das einzelne Behältermittel ein trockenes oder lyophilisiertes Gemisch einer Matrix und einer osteotropen Gen-Zusammensetzung enthalten, das vor Verwendung eine Vorbenetzung erfordern kann oder auch nicht.

[0087] Alternativ dazu können die erfindungsgemäßen Kits verschiedene Behältermittel für jede Komponente umfassen. In diesen Fällen würde ein Behälter das osteotrope Gen enthalten, entweder als eine sterile DNA-Lösung oder in lyophilisierter Form, und der andere Behälter würde die Matrix enthalten, die selbst mit

einer sterilen Lösung vorbenetzt ist oder nicht, oder in einer Gel-artigen, flüssigen oder anderen einspritzbaren Form ist.

[0088] Die Kits können auch ein zweites oder drittes Behältermittel zum Enthalten eines sterilen pharmazeutisch verträglichen Puffers, Verdünnungmittels oder Lösungsmittels umfassen. Eine derartige Lösung kann erforderlich sein, um entweder die DNA-Komponente, die Matrix-Komponente, beide Komponenten getrennt, oder eine vorgemischte Kombination der Komponenten in einer geeignetere Form für die Anwendung auf den Körper zu formulieren, z.B. eine mehr Gel-artige Form. Es sollte jedoch festgestellt werden, daß alle Komponenten eines Kits in einer trockenen Form (lyophilisiert) bereitgestellt werden können, was eine "Benetzung" nach Kontakt mit den Körperflüssigkeiten erlauben würde. Somit ist die Anwesenheit einer beliebigen Art eines pharmazeutisch verträglichen Puffers oder Lösungsmittels nicht ein Erfordernis für die erfindungsgemäßen Kits. Die Kits können auch ein zweites oder drittes Behältermittel zum Enthalten eines pharmazeutisch verträglichen nachweisbaren Abbildungsmittels oder -zusammensetzung umfassen.

[0089] Das Behältermittel wird im allgemeinen ein Behälter sein wie eine Ampulle, ein Teströhrchen, ein Kolben, eine Flasche, eine Spritze oder ein anderes Behältermittel, in das die Komponenten des Kits eingebracht werden können. Die Matrix- und Gen-Komponenten können auch in kleinere Behälter aliquotiert werden, falls dies erwünscht werden sollte. Die erfindungsgemäßen Kits können ebenfalls ein Mittel zum Enthalten der individuellen Behälter in engen Grenzen zum Verkauf im Handel enthalten, wie z.B. injektions- oder blasgeformte Plastikbehälter, in denen die gewünschten Ampullen oder Spritzen aufbewahrt werden.

[0090] Unabhängig von der Anzahl an Behältern können die erfindungsgemäßen Kits ein Instrument zum Unterstützen des Einbringens der letztendlichen Matrix-Gen-Zusammensetzung in den Körper eines Tieres enthalten oder mit diesem verpackt sein. Ein derartiges Instrument kann eine Spritze, eine Pipette, eine Zange oder ein beliebiges derartiges medizinisch zugelassenes Zufuhrvehikel sein.

6. Typ II-Collagen als ein osteokonduktives/-induktives Material

[0091] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls Verfahren zur Stimulierung von Knochen-Vorläuferzellen bereit, wie sie auch unter bestimmten Umständen angewendet werden können, um die Bildung von neuen Knochen zu fördern oder die Wundheilung zu stimulieren. Als derartige können die Knochen-Vorläuferzellen, die die Ziele der Erfindung sind, auch "Wundheilungs-Knochen-Vorläuferzellen" genannt werden. Obwohl die Funktion der Wundheilung selbst nicht immer erforderlich sein wird, um sämtliche Aspekte der Erfindung auszuführen, und obwohl ein mechanistisches Verständnis nicht erforderlich ist, um die Erfindung auszuführen, wird im allgemeinen angenommen, daß der Wundheilungsprozeß durch die Ausführung der Erfindung funktioniert.

[0092] Um eine Knochen-Vorläuferzellen gemäß diesen erfindungsgemäßen Aspekten zu stimulieren, würde man im allgemeinen eine Knochen-Vorläuferzelle mit einer Zusammensetzung kontaktieren, die eine biologisch wirksame Menge an Typ II-Collagen enthält. Obwohl es gezeigt worden ist, daß Zubereitungen von zerkleinertem Knochen und mineralisiertem Collagen osteokonduktiv sind, ist diese Eigenschaft zuvor nicht Typ II-Collagen zugeschrieben worden. Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben festgestellt, daß Typ II-Collagen allein überraschend wirksam bei der Förderung der Bildung von neuem Knochen ist, wobei es in der Lage ist, einen Osteotomiespalt von 5 mm in nur acht Wochen in allen getesteten Tieren zu überbrücken (**Fig. 5A**, **Fig. 5B**, **Fig. 6A**, **Fig. 6B**, **Fig. 6C**, **Fig. 6D**, **Fig. 7A**, **Fig. 7B**, **Fig. 8A**, **Fig. 8B** und **Fig. 8C**).

[0093] Die Arten von Typ II-Collagen, die in dieser Erfindung eingesetzt werden können, sind praktisch unbegrenzt. Zum Beispiel kann Typ II-Collagen aus hyalinem Knorpel von Rinder-Trachea gereinigt werden, oder kann wie aus Diathrodial-Gelenken oder -Wachstumsplatten isoliert sein. Gereinigtes Typ II-Collagen ist im Handel erhältlich und kann z.B. von Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, bezogen werden. Auch kann jede Form von rekombinantem Typ II-Collagen eingesetzt werden, wie es aus einer Typ II-Collagen-exprimierenden rekombinanten Wirtszelle erhalten werden kann, einschließlich von Bakterien-, Hefe-, Säuger- und Insekten-Zellen. Ein besonderes Beispiel eines Expressionssystems für rekombinantes Typ II-Collagen ist eine Hefezelle, die einen Expressionsvektor enthält, der Typ II-Collagen kodiert, wie es hierin in Beipiel VI offenbart ist.

[0094] Das in dieser Erfindung eingesetzte Typ II-Collagen kann, sofern gewünscht, mit zusätzlichen Mineralien ergänzt werden, wie Calcium, z.B. in Form von Calciumphosphat. Sowohl natives als auch rekombinantes Typ II-Collagen kann durch Mischen, Adsorbieren oder andersweitiges Assoziieren mit zusätzlichen Mineralien auf diese Weise ergänzt werden. Derartige Typ II-Collagen-Zubereitungen unterscheiden sich deutlich von den

Arten von "mineralisiertem Collagen" die zuvor z.B. in U.S.-Patent 5,231,169 beschrieben wurden, das die Herstellung von mineralisierten Gesamtcollagen-Fibrillen beschreibt.

[0095] Eine Aufgabe dieses erfindungsgemäßen Aspekts ist, eine Quelle für osteokonduktives Matrixmaterial bereitzustellen, das auf einfache und wirtschaftliche Weise reproduzierbar hergestellt werden kann, und das mit einem osteotropen Gen-Segment eingesetzt werden kann, um Knochen-Vorläuferzellen zu stimulieren. Es wurde überraschend festgestellt, daß rekombinantes Typ II-Collagen diese Kriterien erfüllt. Obwohl klarerweise nicht für wirksame Ergebnisse erforderlich, wird die Kombination von nativem oder rekombinantem Typ II-Collagen mit Mineralzusätzen wie Calcium von dieser Erfindung umfaßt.

[0096] Eine biologisch wirksame Menge an Typ II-Collagen ist eine Menge an Typ II-Collagen, die die Stimulierung einer Knochen-Vorläuferzelle bewirkt, wie hierin beschrieben wird. Beispielsweise ist ein Maß für eine biologisch wirksame Menge eine Menge, die die Stimulierung von Knochen-Vorläuferzellen in einem Ausmaß bewirkt, daß die Bildung von neuem Knochen offensichtlich ist. In dieser Hinsicht haben die Erfinder gezeigt, daß 10 mg lyophilisiertes Collagen wirksam bewirkt, einen Osteotomiespalt von 5 mm in drei Wochen zu schließen. Diese Information kann vom Fachmann benutzt werden, die Menge an Typ II-Collagen zu optimieren, die für jede gegebene Situation erforderlich ist.

[0097] Abhängig von dem einzelnen Fall würde ein Fachmann angesichts dieser Offenbarung leicht in der Lage sein, die geeignete Menge oder Dosis an Typ II-Collagen für die Stimulierung von Knochenzellen und das Fördern von Knochenwachstum zu berechnen. In Hinsicht auf kleine Tiere oder menschliche Subjekte schließen geeignete wirksame Mengen an Collagen zwischen ungefähr 1 mg und ungefähr 500 mg, und vorzugsweise zwischen ungefähr 1 mg und ungefähr 100 mg lyophilisiertes Typ II-Collagen pro Knochengewebestelle ein. Natürlich ist es wahrscheinlich, daß es Variationen geben wird infolge von z.B. einem individuellen Ansprechen, besonderen Gewebebedingungen, und der Geschwindigkeit, mit der die Bildung von Knochen erforderlich ist. Während es gezeigt wurde, daß 10 mg in dem veranschaulichenden Beispiel nützlich sind, sehen die Erfinder vor, daß 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 300 mg und dergleichen auf nützliche Weise für menschliche Patienten und kleinere Tiere eingesetzt werden können. Natürlich können beliebige Werte innerhalb dieser in Erwägung gezogenen Bereiche für einen beliebigen besonderen Fall nützlich sein.

[0098] Natürlich ist als eine der Hauptvariablen die Menge an neuem Knochen zu berücksichtigen, die in einem bestimmten Bereich oder Knochenhöhle gebildet werden muß. Dies kann im großen und ganzen eine Funktion der Größe des zu behandelnden Tieres sein, z.B. einer Katze oder eines Pferdes. Deshalb gibt es gegenwärtig keine obere Grenze für die Menge an Typ II-Collagen oder tatsächlich für die Menge an einer beliebigen Matrix-Gen-Zusammensetzung, die in den erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden kann, wobei eine sorgfältige Beobachtung durch den Behandelnden vorausgesetzt wird.

[0099] Bei dem Kontaktieren oder Anwenden von Typ II-Collagen mit DNA-Segment mit bzw. auf Knochen-Vorläuferzellen die sich in der Knochen-Vorläufergewebe-Region eines Tieres befinden, wird Knochengewebewachstum stimuliert werden. Auf diese Weise können Knochenhöhlenstellen und Knochenbrüche gefüllt und repariert/geheilt werden.

[0100] Die Verwendung von Typ II-Collagen in Verbindung mit einem Nukleinsäuresegment, das ein Polypeptid oder Protein kodiert, das Knochen-Vorläuferzellen stimuliert, wenn es in den Zellen exprimiert wird, ist bevorzugt, wie vorstehend beschrieben. Nukleinsäuresegmente, die ein isoliertes PTH-Gen, BMP-Gen, ein Wachstumsfaktor-Gen, ein Wachstumsfaktorrezeptor-Gen, ein Zytokin-Gen oder ein Gen eines chemotaktischen Faktors umfassen, sind bevorzugt, wobei die PTH-, TGF-β und BMP-Gene am stärksten bevorzugt sind. Die Gene arbeiten im Anschluß an ihre Übertragung in und Expression in Knochen-Vorläuferzellen des behandelten Tieres und fördern auf diese Weise das Knochenwachstum.

[0101] Obwohl Typ II-Collagen allein wirksam ist, kann es sich herausstellen, daß seine vereinte Verwendung mit einem osteotropen Gen-Segment synergistische und besonders vorteilhafte Wirkungen ergibt. Typ II-Collagen, sei es nativ oder rekombinant, kann somit auch in einem therapeutischen Kit mit einem osteotropen Gen-Segment in Übereinstimmung mit den hierin zuvor beschriebenen Kits formuliert sein. Dies schließt die Verwendung von einzelnen oder mehreren Behältermitteln ein und ihre Verbindung mit jedem beliebigen medizinisch zugelassenen Zuführvehikel, einschließlich, aber nicht begrenzt darauf, Spritzen, Pipetten, Zangen, zusätzlichen Verdünnungsmitteln und dergleichen.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0102] Die Zeichnungen bilden einen Teil der vorliegenden Patentschrift und sind hierin enthalten, um bestimmte Aspekte der vorliegenden Erfindung weiter darzustellen. Die Erfindung kann vielleicht besser durch Bezugnahme auf eine oder mehrere dieser Zeichnungen in Verbindung mit der ausführlichen Beschreibung von spezifischen Ausführungsformen, die hierin wiedergegeben sind, verstanden werden.

[0103] Fig. 1. Modell einer DNA-Therapie zur Knochenreparatur.

[0104] Fig. 2A. Schematisches Modell der zellulären und molekularen Basis des direkten DNA-Übertragungsmechanismus in osteogene Zellen in vivo. Gezeigt ist ein Verfahren der Bildung einer Osteotomie und das Einbringen einer Gen-aktivierten Matrix in situ.

[0105] Fig. 2B. Schematisches Modell der zellulären und molekularen Basis des direkten DNA-Übertragungsmechanismus in osteogene Zellen in vivo. Gezeigt ist das Verfahren des Brechens von Reparaturzellen, wo Blutgefäße in die Gen-aktivierte Matrix wachsen (Fig. 2A).

[0106] Fig. 2C Schematisches Modell der zellulären und molekularen Basis des direkten DNA-Übertragungsmechanismus in osteogene Zellen in vivo. Gezeigt sind gebrochene Zellen, die DNA als ein episomales Element aufnehmen, d.h. eine direkte Gen-Übertragung in vivo.

[0107] Fig. 2D. Schematisches Modell der zellulären und molekularen Basis des direkten DNA-Übertragungsmechanismus in osteogene Zellen in vivo. Gezeigt sind gebrochene Reparaturzellen, die rekombinante Proteine synthetisieren und sekretieren, die durch die episomale DNA kodiert werden.

[0108] **Fig.** 2E. Schematisches Modell der zellulären und molekularen Basis des direkten DNA-Übertragungsmechanismus in osteogene Zellen in vivo. Gezeigt ist die resultierende Bildung von neuem Knochen.

[0109] Fig. 3A. Eine Achillessehnen-Gen-Übertragung wird als ein Überblick über den Zeitverlauf bei 3 Wochen nach dem chirurgischen Eingriff gezeigt.

[0110] Fig. 3B. Eine Achillessehnen-Gen-Übertragung wird als ein Überblick über den Zeitverlauf bei 9 Wochen nach dem chirurgischen Eingriff gezeigt.

[0111] Fig. 3C. Eine Achillessehnen-Gen-Übertragung wird als ein Überblick über den Zeitverlauf bei 12 Wochen nach dem chirurgischen Eingriff gezeigt.

[0112] Fig. 3D. Eine Achillessehnen-Gen-Übertragung wird als eine immunhistochemische Zeitverlaufsstudie gezeigt. Gezeigt ist die Mikroskopie von Sehnengewebe, das ein SIS-Implantat erhielt, das mit der Expressionsplasmid-DNA imprägniert war. Man beachte die positive Zytoplasmaanfärbung von fibroblastischen Zellen 9 Wochen nach dem chirurgischen Eingriff.

[0113] Fig. 3E. Eine Achillessehnen-Gen-Übertragung wird als eine immunhistochemische Zeitverlaufsstudie gezeigt. Gezeigt ist die Mikroskopie von Sehnengewebe, das ein SIS-Implantat allein, ohne DNA, erhielt. Man beachte das relative Fehlen einer Zytoplasmaanfärbung.

[0114] Fig. 4. Verfolgen einer Kreuzband-Gen-Übertragung unter Verwendung eines Substratverbrauchs-Assays. Drei Wochen nach der Implantation von SIS, getaucht in eine Lösung des pSV40β-gal-Expressionsplasmids, wurde Sehnengewebe geerntet, kurz in 0,5% Glutaraldehyd fixiert, und dann gemäß veröffentlichten Verfahren mit X-Gal inkubiert. Die Gewebe wurden dann in Paraffin eingebettet und Schnitte wurden hergestellt und mit H und E gefärbt. Man beachte das positive (Pfeile) Anfärben im Zytoplasma von Granulationsgewebe-Fibroblasten.

[0115] Fig. 5A. Direkte DNA-Übertragung in regenerierende Knochen: β-Gal-aktivität. Die Abbildung vergleicht β-Galactosidase-Aktivität in Homogenaten von Osteotomiespalt-Gewebe von zwei Sprague-Dawley-Ratten. In Tier #1 wurde das UltraFiber™-Implantat-Material in einer Lösung von pSV40β-gal-DNA (Promega) getaucht, die die bakterielle β-Galactosidase kodiert. In Tier #2 wurde das Implantatmaterial in eine reine Lösung von pGL2-Promoter-Vektor-DNA (Promega) getaucht, die die Insektenluciferase kodiert. Die Enzymaktivität wurde unter Verwendung von Substrat-Assay-Kits (β-Galactosidase- und Luciferase-Assaysysteme, Promega) bestimmt. Man beachte, daß eine signifikante β-Galactosidase-Aktivität nur in dem vom Tier #1 her-

gestellten Homogenat festgestellt wurde.

[0116] Fig. 5B. Direkte DNA-Übertragung in regenerierende Knochen: Luciferase-Aktivität. Die Abbildung vergleicht die Luciferase-Aktivität in Aliquots des in Fig. 5A beschriebenen Homogenats. Die Luciferase-Aktivität wurde unter Verwendung von handelsüblichen Reagenzien und Protokollen (Promega), die in Fig. 5A beschrieben sind, bestimmt. Man beachte, daß eine signifikante Luciferase-Aktivität nur in dem vom Tier #2 hergestellten Homogenat festgestellt wurde.

[0117] Fig. 6A. Osteotomie-Gen-Übertragung, die durch PTH-Studien verfolgt wurde. Bei dieser Studie wurde ein Expressionsplasmid, das für ein funktionelles 34 Aminosäuren umfassendes Peptidfragment des menschlichen Parathyroidhormons kodiert (PTH1-34) übertragen und in vivo unter Verwendung der GAM-Technologie exprimiert. Das Fortschreiten der Bildung von neuem Knochen in dem Spalt wurde radiographisch für drei Wochen verfolgt und die Tiere wurden getötet. Gezeigt ist eine Radiographie des Osteotomiespalts des Kontrolltieres, das ein Antisense hPTH1-34-GAM-Konstrukt erhielt. Es gab keinen Hinweis auf radiodichtes Gewebe in dem Spalt.

[0118] Fig. 6B. Osteotomie-Gen-Übertragung (Fig. 6A), die durch PTH-Studien verfolgt wurde. Gezeigt ist ein histologischer Schnitt des Osteotomie-Reparaturgewebes aus dem gleichen Kontrolltier. Der Schnitt ist durch die Anwesenheit von Granulationsgewebe-Fibroblasten und Kapillaren gekennzeichnet.

[0119] Fig. 6C. Osteotomie-Gen-Übertragung (Fig. 6A), die durch PTH-Studien verfolgt wurde. Gezeigt ist eine Radiographie des Osteotomiespalts, der das Sense-PTH-1-34-GEM-Konstrukt erhielt. Man beachte die Anwesenheit von radiodichtem Gewebe in dem Spalt (Pfeil).

[0120] Fig. 6D. Osteotomie-Gen-Übertragung (Fig. 6A), die durch PTH-Studien verfolgt wurde. Gezeigt ist ein histologischer Schnitt von Osteotomie-Reparaturgewebe von dem gleichen Kontrolltier. Der Schnitt ist durch die Anwesenheit von Knochenbälkchenplatten gekennzeichnet, die von dem chirurgischen Rand in den Spalt hineinreichen.

[0121] Fig. 7A. Osteotomie-Gen-Übertragung-BMP-4-Studien. Gezeigt ist ein immunhistochemischer Befund von BMP-4-Transgen-Expression durch Granulationsgewebe-Fibroblasten nahe dem Zentrum eines Osteotomiespalts drei Wochen nach dem chirurgischen Eingriff. Man beachte die positive (Pfeile) Anfärbung von gespindelten Zellen ("spindled cells"). Das BMP-4-Transgen beinhaltet eine Epitop-Markierung (HA-Epitop, Pharmacia), die die Identifizierung von Transgenen BMP-4-Molekülen erleichtert. Eine Gewebeanfärbung wurde unter Verwendung von im Handel erhältlichen polyklonalen anti-HA-Antikörpern und Standardverfahren durchgeführt. Eine Immunanfärbung wurde nur auf Spaltgeweben lokalisiert. Kontrollschnitte beinhalteten Serienschnitte, die mit dem Präimmun-Kaninchenserum angefärbt worden waren, und Gewebeschnitte von 13 Kontroll-Osteotomiespalten. In beiden Fällen waren alle Kontrollen negativ für eine Peroxidaseanfärbung von Granulationsgewebe-Fibroblasten.

[0122] Fig. 7B. Osteotomie-Gen-Übertragung-BMP-4-Studien. Gezeigt ist die Histologie von neu gebildetem Knochen zu einem so frühen Zeitpunkt wie drei Wochen nach Gen-Übertragung (Fig. 7A).

[0123] Fig. 8A. Radiographischer Befund der Bildung von überbrückendem neuen Knochen (Pfeile) als Folge der BMP-4-Gen-Übertragung und -Expression sechs Wochen nach dem chirurgischen Eingriff. 9 und 16 Wochen nach dem chirurgischen Eingriff sind in Fig. 8B bzw. Fig. 8C dargestellt, um das ordnungsgemäße Wachstum von neuem Knochen in situ über die Zeit zu zeigen. Dieses für 23 Wochen gehaltene Tier ist normal gehfähig ("ambulating") für die letzten 7 Wochen gewesen, ohne einen externen Fixator. Ähnliche Ergebnisse sind bei einem zweiten Langzeit-Tier (von zweien) erhalten worden, das sich nun zu einem Zeitpunkt 17 Wochen nach dem chirurgischen Eingriff befindet.

[0124] Fig. 8B. Radiographischer Befund der Bildung von überbrückendem neuen Knochen (Pfeile) als Folge der BMP-4-Gen-Übertragung und -Expression neun Wochen nach der Chirurgie (siehe Fig. 8A).

[0125] Fig. 8C. Radiographischer Befund der Bildung von überbrückendem neuen Knochen (Pfeile) als Folge der BMP-4-Gen-Übertragung und -Expression sechzehn Wochen nach der Chirurgie (siehe Fig. 8A).

[0126] Fig. 9A. Das hier gezeigte Tier ist für die Kontrollgruppe repräsentativ, die eine Osteotomie plus einen Collagenschwamm ohne DNA irgendeiner Art erhielt. Das Tier wurde nach dem chirurgischen Eingriff für 9 Wochen gehalten und dann getötet. Das Fortschreiten der Bildung von neuem Knochen in dem Spalt wurde radi-

ographisch und histologisch verfolgt. Gezeigt ist eine Radiographie des Osteotomiespalts nach 9 Wochen. Man beachte die Abwesenheit von radiodichtem Gewebe in dem Spalt.

[0127] Fig. 9B. Gezeigt ist ein histologischer Schnitt des Osteotomiespalt-Gewebes des in Fig. 9A eingesetzten Kontrolltieres. Der Schnitt ist durch die Gegenwart von Granulationsgewebe-Fibroblasten und Kapillaren gekennzeichnet.

[0128] Fig. 10. PLJ-hPTH1-34-Expressionskonstrukt. Ein cDNA-Fragment, das ein Präpro-hPTH1-34-Peptid kodiert, wurde durch PCR™ erzeugt (Hendy et al., 1981) und dann in eine BamHI-Klonierstelle in dem retroviralen Expressionsvektor pLJ ligiert (Wilson et al., 1992). Mehrere unabhängige Klone mit dem Insert in der kodierenden Orientierung wurden isoliert und charakterisiert.

[0129] Fig. 11. Southern-Analyse der retroviralen Integration in dem YZ-15-Klon. 10 mg von YZ-15 genomischer DNA wurden mit KpnI verdaut (für welche es eine einzelne Restriktionsschnittstelle in dem Vektor-LTR gibt) und durch Southern-Blot analysiert. Ein cDNA-Fragment, das für Präpro-hPTH1-34 kodierte, wurde als eine Sonde verwendet. Die Positivkontrolle für die Southern-Hybrisierungs-Bedingungen war ein KpnI-Verdau genomischer DNA von Rat-1-Zellen, die infiziert und selektiert mit dem rekombinanten, Replikations-defekten Retrovirus PL7-hPTH1-84 waren (Wilson et al., 1992). KpnI-Verdaus von DNA wurden ebenfalls von zwei Negativkontrollen hergestellt: native Rat-1-Zellen und mit BAG infizierte und selektierte Rat-1-Zellen ("BAG-Zellen"), (Wilson et al., 1992), einem Replikations-defekten rekombinanten Retrovirus, der β-Galactosidase kodiert, welches ein irrelevantes Markergen in diesen Studien ist. Die Bezeichnung der Bahnen war wie folgt: 1, PLJ-hPTH1-84-Zellen; 2, BAG-Zellen; 3, YZ-15; 4, native Rat-1-Zellen. DNA-Größen (kb) sind auf der linken Seite der Abbildung gezeigt. Wie erwartet, wird ein Fragment der vorhergesagten Größe (z.B. 4,3 kb) nur in Bahn 1 (die Positivkontrolle) und in Bahn 3 (YZ-15-DNA) gesehen.

[0130] Fig. 12. Northern-Blot-Analyse eines transduzierten Rat-1-Klons. Poly-A ($^+$)-RNA wurde von dem YZ-15-Klon hergestellt, und durch Northern-Blot wie beschrieben analysiert (Chen et al., 1993). Fig. 12 enthält zwei Tafeln auf einem einzelnen Blatt. Poly-A ($^+$)-RNA, hergestellt von PLJ-hPTH1-84-Zellen, BAG-Zellen, und nativen Rat-1-Zellen wurde als Positiv- und Negativkontrolle verwendet. Vier Sonden wurden auf einen einzelnen Blot nach einem sequenziellen Strippen aufgebracht: hPTH1-34, β-Gal, Neo, und β-Actin. Die Bezeichnung der Bahnen war wie folgt: 1, PLJ-hPTH1-84-Zellen; 2, BAG-Zellen; 3, YZ-15-Zellen; 4, native Rat-1-Zellen. Wie erwartet wird das hPTH1-34-Transkript nur in Bahn 1 (Positivkontrolle) und in Bahnen 3-4 gesehen; ein Neo-Transkript wird in Bahnen 1-3 gesehen; ein β-Gal-Transkript wird nur in Bahn 2 gesehen; und β-Actin-Transkripte werden in Bahnen 1-4 gesehen.

[0131] Fig. 13. Northern-Analyse von poly-A ($^+$)-RNA, die die Expression des PTH/PTHrP-Rezeptors in Osteotomie-Reparaturgewebe zeigt.

[0132] Fig. 14. Überlappende Maus-cDNA-Klone, die die LTBP-artige (LTBP-3) Sequenz darstellen. Eine Teildarstellung der Restriktionsschnittstellen ist gezeigt. N, NcoI; P, PvuII; R, RsaII; B, BamHI; H, HindIII. Das Bezeichnungssystem an dem unteren Teil geht davon aus, daß das "A" des Initiator-Met-Codons nt #1 ist.

[0133] Fig. 15A. Ein Schema, das die Struktur des Maus-Fibrillin-1-Genprodukts zeigt. Strukturdomänen werden unter dem Diagramm gezeigt. Symbole, die die verschiedenen Strukturelemente definieren, werden in der Legende zu Fig. 15B definiert.

[0134] Fig. 15B. Ein Schema, das die Struktur des Maus-LTBP-artigen (LTBP-3) Moleküls zeigt. Domänen #1-5 sind unter dem Diagramm dargestellt. Symbole bezeichnen die folgenden Strukturelemente: EGF-CB-Sequenzwiederholungen: leere Rechtecke; TGF-bp-Sequenzwiederholungen: leere Ovale; Fib-Motiv: leerer Kreis; TGF-bp-artige Sequenzwiederholung: gemustertes Oval; Cystein-reiche Sequenzen: gemusterte Rechtecke; Prolin-/Glycin-reiche Region: dicke gebogene Linie, Domäne #2; Prolin-reiche Region, dicke gebogene Linie, Domäne #3. Man beachte, daß die das Signalpeptid bezeichnenden Symbole der Einfachheit halber entfernt worden sind. Zusätzlich geht das Schema davon aus, daß EGF-artige und EGF-CB-Sequenzwiederholungen sich mehrere Aminosäuren hinter die C_6-Stellung ausdehnen können.

[0135] Fig. 15C. Ein Schema, das die Struktur des menschlichen LTBP-1 zeigt. Domänen #1-5 sind unter dem Diagramm dargestellt. Die Symbole, die die Strukturelemente bezeichnen, sind in der Legende zu Fig. 15B definiert.

[0136] Fig. 16. Überblick über die Expression des neuen LTBP-artigen (LTBP-3) Gens während der Mausent-

wicklung, wie durch in situ-Hybridisierung bestimmt wurde. Fig. 16 besteht aus Autoradiogrammen, die durch direkte Exposition der Gewebeschnitte mit Film nach Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden hergestellt wurden. Tag 8,5-9,0-Schnitte enthalten Embryos, die von intakten Membranen, Uteringewebe, und der Plazentascheibe, geschnitten in zufälligen Ebenen, umgeben sind. Tag 13,5- und 16,5-Schnitte enthalten isolierte Gesamtembryos, geschnitten in der Sagittalfläche nahe oder ungefähr an der Mittellinie. Identische Bedingungen wurden während der Autoradiographie und Photographie beibehalten, wodurch ein Vergleich der allgemeinen Stärke der Hybridisierung in allen Gewebeschnitten möglich ist. Das Transkript wird in Bindegewebe, Mesenchym, Leber, Herz und ZNS exprimiert.

[0137] Fig. 17A. Ausgewählte mikroskopische Ansichten der Maus-LTBP-3-Gen-Expression in sich entwickelnden Geweben der Maus an Tag 8,5-9,0 p.c.. Alle Photopraphien in Fig. 17A-Fig. 17D wurden von den gleichen Objektträgern aufgenommen, die verwendet wurden, um Ganz-Objektträger-Schnitte herzustellen (nach Eintauchen der Objektträger in eine radiographische Emulsion). Gezeigt ist das Neuralrohr, Hellfeld-Abbildung.
1 cm = 20 mm.

[0138] Fig. 17B. Ausgewählte mikroskopische Ansichten der Maus-LTBP-3-Gen-Expression in sich entwickelnden Geweben der Maus an Tag 8,5-9,0 p.c.. Gezeigt ist das Neuralrohr, Dunkelfeld-Abbildung. Man beachte die Expression durch die neuroepithelialen Zellen und durch das umgebende Mesenchym. 1 cm = 20 mm.

[0139] Fig. 17C. Ausgewählte mikroskopische Ansichten der Maus-LTBP-3-Gen-Expression in sich entwickelnden Geweben der Maus an Tag 8,5-9,0 p.c.. Gezeigt ist das Herz, Hellfeld-Abbildung. Die Figur zeigt die Expression durch myocardiale und endocardiale (Pfeilspitzen) Zellen. 1 cm = 20 mm.

[0140] Fig. 17D. Ausgewählte mikroskopische Ansichten der Maus-LTBP-3-Gen-Expression in sich entwickelnden Geweben der Maus an Tag 8,5-9,0 p.c.. Gezeigt ist das Herz, Dunkelfeld-Abbildung. Die Figur zeigt die Expression durch myocardiale und endocardiale (Pfeilspitzen) Zellen. Dunkelfeld-Photomikrographien wurden aufgenommen nach Exposition der Gewebe mit einer photographischen Emulsion für 2 Wochen. In dieser Abbildung und in der in Fig. 17B gezeigten ergeben Erythrocyten- und andere Plasma-Membranen ein schwach weißes Signal, das zu dem Hintergrund des Experiments beiträgt. 1 cm = 20 mm.

[0141] Fig. 18A. Mikroskopie der Maus-LTBP-3-Gen-Expression in sich entwickelnden Geweben der Maus an Tag 13,5 und Tag 16 p.c.. Alle Photographien in Fig. 18A-Fig. 18P wurden von den gleichen Objektträgern genommen, die verwendet wurden, um Ganz-Objektträger-Schnitte herzustellen (nach Eintauchen der Objektträger in eine radiographische Emulsion). Gezeigt ist das Knorpelmodell des sich entwickelnden langen Knochens der unteren Extremität, Hellfeld-Abbildung. Eine Expression durch Chondrocyten und durch perichondriale Zellen wird in Fig. 18B beobachtet. 1 cm = 20 mm.

[0142] Fig. 18B. Mikroskopie der Maus-LTBP-3-Gen-Expression in sich entwickelnden Geweben der Maus an Tag 13,5 und Tag 16 p.c. Gezeigt ist das Knorpelmodell des sich entwickelnden langen Knochens der unteren Extremität, Dunkelfeld-Abbildung. Man beachte die Expression durch Chondrocyten und durch perichondriale Zellen. In allen Dunkelfeld-Ansichten von **Fig.** 18 ergeben die Erythrocyten- und andere Plasmamembranen ein schwaches weißes Signal, das zu dem Hintergrund des Experiments beiträgt. Man beachte die Abwesenheit von falschen Hybridisierungssignalen in Flächen des Objektträgers, denen zelluläre Elemente fehlen. 1 cm = 20 mm.

[0143] Fig. 18C. Mikroskopie der Maus-LTBP-3-Gen-Expression in sich entwickelnden Geweben der Maus an Tag 13,5 und Tag 16 p.c. Gezeigt ist die Lunge, Hellfeld-Abbildung. 1 cm = 20 mm.

[0144] Fig. 18D. Mikroskopie der Maus-LTBP-3-Gen-Expression in sich entwickelnden Geweben der Maus an Tag 13,5 und Tag 16 p.c.. Gezeigt ist das Herz, Hellfeld-Abbildung. 1 cm = 20 mm.

[0145] Fig. 18E. Mikroskopie der Maus-LTBP-3-Gen-Expression in sich entwickelnden Geweben der Maus an Tag 13,5 und Tag 16 p.c.. Gezeigt ist die Lunge, Dunkelfeld-Abbildung. Man beachte die Expression durch epitheliale Zellen der sich entwickelnden Luftwege und durch die umgebenden parenchymalen Zellen. 1 cm = 20 mm.

[0146] Fig. 18F. Mikroskopie der Maus-LTBP-3-Gen-Expression in sich entwickelnden Geweben der Maus an Tag 13,5 und Tag 16 p.c.. Gezeigt ist das Herz, Dunkelfeld-Abbildung. Man beachte die andauernde Ex-

pression durch myocardiale Zellen. 1 cm = 20 mm.

[0147] Fig. 18G. Mikroskopie der Maus-LTBP-3-Gen-Expression in sich entwickelnden Geweben der Maus an Tag 13,5 und Tag 16 p.c.. Gezeigt ist der Pankreas, Hellfeld-Abbildung. 1 cm = 20 mm.

[0148] Fig. 18H. Mikroskopie der Maus-LTBP-3-Gen-Expression in sich entwickelnden Geweben der Maus an Tag 13,5 und Tag 16 p.c.. Gezeigt ist der Darm, Hellfeld-Abbildung. 1 cm = 20 mm.

[0149] Fig. 18I. Mikroskopie der Maus-LTBP-3-Gen-Expression in sich entwickelnden Geweben der Maus an Tag 13,5 und Tag 16 p.c.. Gezeigt ist der Pankreas, Dunkelfeld-Abbildung. Man beachte die Expression durch azinöse epitheliale Zellen. 1 cm = 20 mm.

[0150] Fig. 18J. Mikroskopie der Maus-LTBP-3-Gen-Expression in sich entwickelnden Geweben der Maus an Tag 13,5 und Tag 16 p.c.. Gezeigt ist der Darm, Dunkelfeld-Abbildung. Man beachte die Expression in epithelialen und subepithelialen Zellen. 1 cm = 20 mm.

[0151] Fig. 18K. Mikroskopie der Maus-LTBP-3-Gen-Expression in sich entwickelnden Geweben der Maus an Tag 13,5 und Tag 16 p.c.. Gezeigt ist die Niere, Hellfeld-Abbildung. 1 cm = 20 mm.

[0152] Fig. 18L. Mikroskopie der Maus-LTBP-3-Gen-Expression in sich entwickelnden Geweben der Maus an Tag 13,5 und Tag 16 p.c.. Gezeigt ist die Haut, Hellfeld-Abbildung. 1 cm = 20 mm.

[0153] Fig. 18M. Mikroskopie der Maus-LTBP-3-Gen-Expression in sich entwickelnden Geweben der Maus an Tag 13,5 und Tag 16 p.c.. Gezeigt ist die Niere, Dunkelfeld-Abbildung. Man beachte die Expression durch Blastem-Zellen unterhalb der Nierenkapsel, epitheliale Zellen der sich entwickelnden Nephrons und Tubuli und das interstitiale Mesenchym. 1 cm = 20 mm.

[0154] Fig. 18N. Mikroskopie der Maus-LTBP-3-Gen-Expression in sich entwickelnden Geweben der Maus an Tag 13,5 und Tag 16 p.c.. Gezeigt ist die Haut, Dunkelfeld-Abbildung. Man beachte die Expression durch epidermale, adnexale und dermale Zellen der sich entwickelnden Haut. 1 cm = 20 mm.

[0155] Fig. 18O. Mikroskopie der Maus-LTBP-3-Gen-Expression in sich entwickelnden Geweben der Maus an Tag 13,5 und Tag 16 p.c.. Gezeigt ist die Retina, Hellfeld-Abbildung. 1 cm = 20 mm.

[0156] Fig. 18P. Mikroskopie der Maus-LTBP-3-Gen-Expression in sich entwickelnden Geweben der Maus an Tag 13,5 und Tag 16 p.c.. Gezeigt ist die Retina, Dunkelfeld-Abbildung. Man beachte die Expression durch retinale epitheliale Zellen und durch benachbarte Bindegewebs-Zellen. 1 cm = 20 mm.

[0157] Fig. 19. Zeitabhängige Expression des LTBP-3-Gens durch MC3T3-E1-Zellen. Die mRNA-Präparation und der Northern-Blot wurden wie in Beispiel XIV durchgeführt. Gleiche Aliquots von Gesamt-RNA, wie durch UV-Spektroskopie bestimmt, wurden in jeder Bahn des Northern-Gels geladen. Wie durch Methylenblau-Anfärbung (Sambrook et al., 1989) gezeigt wurde, wurden gleiche Mengen an RNA auf die Nylon-Membran übertragen. Die Ergebnisse zeigen einen klaren, starken Peak in der LTBP-3-Gen-Expression bis zu 14 Tagen in Kultur. Schwächere Signale, die eine LTBP-3-Gen-Expression anzeigen, können auch nach 5 Tagen und 28 Tagen in Kultur beobachtet werden.

[0158] Fig. 20 Antiserum #274 bindet auf spezifische Weise LTBP-3-Epitope. Die Transfektion von 293T-Zellen mit einem "Full Length"-Maus-LTBP-3-Expressionsplasmid, gefolgt von einer Radiomarkierung, Herstellung einer Mediumprobe, Immunpräzipitation und einer 4-18%-Gradienten-SDS-PAGE wurden wie in Beispiel XIV beschrieben durchgeführt. Die Abbildung stellt ein SDS-PAGE-Autoradiogramm von Mediumproben im Anschluß an eine Exposition gegenüber einem Film für 2 Tage dar. Die Bezeichnung der Bahnen ist wie folgt: Bahn 1, radiomarkiertes 293T-Medium (vor der Transfektion) immunpräzipitiert mit Präimmun-Serum; Bahn 2, radiomarkiertes 293T-Medium (vor der Transfektion), immunpräzipitiert mit Antikörper #274; Bahn 3, radiomarkiertes 293T-Medium (im Anschluß an Transfektion und Präinkubation mit 10 µg des Cocktails des synthetischen LTBP-3-Peptids), immunpräzipitiert mit Antikörper #274; und Bahn 4, radiomarkiertes 293T-Medium (nach Transfektion), immunpräzipitiert mit Antikörper #274. Wie durch den Balken angezeigt, wandert das LTBP-3-Molekül, das die Gesamtlänge besitzt, bei 180-190 kDa.

[0159] Fig. 21. Co-Immunpräzipitation von durch MC3T3-E1-Zellen erzeugtem LTBP-3 und TGF-β. Aliquots (~10^6 eingebaute CPM) von radiomarkierten Medien, die durch MC3T3-E1-Zellen nach 7 Tagen in Kultur er-

zeugt worden waren, wurden wie in Beispiel XIV beschrieben immunpräzipitiert. Die Balken zeigen die Position von kalten Molekulargewichts-Standards an, die eingesetzt wurden, um das Molekulargewicht zu schätzen (Rainbox-Mix, Amersham). Die Immunpräzipitate wurden unter Verwendung einer 4%-18% Gradienten-SDS-PAGE und reduzierenden Bedingungen getrennt. Die Abbildung zeigt die Negativkontrolle der Bahn 1, bestehend aus MC3T3-E1-Medium, das mit Anti-LTBP-3-Antikörper #274 immunpräzipitiert worden war. Ein Western-Blot wurde unter Verwendung des unteren Teils des Gradientengels und eines im Handel erhältlichen Antikörpers gegen TGF-β1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) durchgeführt. Die Antikörper-Anfärbung wurde unter Verwendung von im Handel erhältlichen Reagenzien und Protokollen (ECL Western Blotting Reagent, Amersham) nachgewiesen. Das MC3T3-E1-Medium wurde mit dem Anti-LTBP-3-Antikörper #274 immunpräzipitiert.

[0160] Fig. 22A. Radiographische Analyse des Typ II-Collagen-Osteotomiespalts drei Wochen nach dem chirurgischen Eingriff.

[0161] Fig. 22B. Radiographische Analyse des Typ I-Collagen-Osteotomiespalts drei Wochen nach dem chirurgischen Eingriffs.

[0162] Fig. 22C. Histologische Analyse der Typ II-Collagen-Osteotomie, die in Fig. 22A gezeigt ist.

[0163] Fig. 23A. Adenovirus-vermittelte Genübertragung in Knochenreparatur/Regenerations-Zellen in vivo. Positive (Pfeile) β-Gal-Zytoplasma-Anfärbung wird in den Bruch-Reparatur-Zellen beobachtet.

[0164] Fig. 23B. Adenovirus-vermittelte Genübertragung in Knochenreparatur/Regenerations-Zellen in vivo. Serienschnitt-Negativ-Kontrolle, angefärbt mit dem Vehikel des β-Gal-Antikörpers plus einem Cocktail von unspezifischen Kaninchen-IgG-Antikörpern.

[0165] Fig. 23C. Adenovirus-vermittelte Genübertragung in Knochenreparatur/Regenerationszellen in vivo. Die Osteotomie-Stelle/-Region wurde mit einem fibrösen Collagen-Implantat-Material gefüllt, das in eine Lösung des Replikations-defekten rekombinanten Adenovirus AdRSVβ-Gal (~10^{11} Plaque-bildende Einheiten/ml) getaucht worden war. Man beachte die positive (Pfeil) β-Gal-Kernanfärbung von Chondrocyten innerhalb der Osteotomie-Region, wie durch Immunhistochemie unter Verwendung eines spezifischen anti-β-Gal-Antikörpers gezeigt wurde.

[0166] Fig. 24. Die BMP-4-Aminosäuresequenz der Maus, SEQ ID NO:1. Das HA-Epitop ist in Fettdruck an dem äußersten Carboxylende der Sequenz gezeigt.

[0167] **Fig.** 25. DNA-Sequenz des LTBP-3-Gens der Maus (SEQ ID NO:2).

[0168] **Fig.** 26. Aminosäuresequenz des LTBP-3-Genprodukts der Maus (SEQ ID NO:3).

[0169] **Fig.** 27. DNA-Sequenz des LTBP-2-Gens der Maus (SEQ ID NO:17).

[0170] Fig. 28. Aminosäure des LTBP-2-Genprodukts der Maus (SEQ ID NO:18).

BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORM

1. Anwendungen der Knochenreparatur-Technologie auf die Behandlung des Menschen

[0171] Das folgende ist eine kurze Diskussion von vier menschlichen Leiden, um die Vielzahl von Krankheiten und Störungen zu veranschaulichen, die von der Entwicklung von neuer Technologie zum Verbessern von Knochenreparatur- und Heilungsprozessen einen Nutzen ziehen würden. Zusätzlich zu den folgenden können mehrere andere Leiden wie zum Beispiel Vitamin D-Mangel; Wundheilung im allgemeinen, Reparatur des weichen Skelettgewebes; und Knorpel- und Sehnenreparatur- und -regeneration ebenfalls aus der Technologie, die die Stimulierung der Knochenvorläuferzellen betrifft, einen Nutzen ziehen.

[0172] Das erste Beispiel ist das ansonsten gesunde Individuum, das einen Bruch erleidet. Oft wird ein klinischer Knochenbruch durch Eingipsen behandelt, um den Schmerz zu lindern und natürliche Reparaturmechanismen die Wunde reparieren zu lassen. Während es in jüngster Zeit Fortschritte bei der Behandlung von Brüchen gegeben hat, würden alle neuen Verfahren zur Erhöhung der Knochenheilung unter normalen Umständen einen großen Fortschritt bedeuten, selbst ohne daß man die verschiedenen Komplikationen berücksich-

tigt, die bei der Behandlung von gebrochenen Knochen auftreten können.

[0173] Ein zweites Beispiel, dem neue Behandlungsmethoden nützen würden, ist Osteogenesis imperfecta (OI). OI umfaßt verschiedene vererbliche Bindegewebskrankheiten, die beim Menschen eine Zerbrechlichkeit von Knochen- und weichen Bindegeweben beinhalten (Byers und Steiner, 1992; Prockop, 1990). Ungefähr ein Kind pro 5 000 bis 20 000 ist von OI betroffen, und die Krankheit ist von einer signifikanten Morbidität während des Lebens begleitet. Eine bestimmte Anzahl von Toten treten ebenfalls auf, die teilweise aus der hohen Neigung zu Knochenbrüchen und der Deformation von anormalem Knochen nach Bruchreparatur resultieren (OI-Typen II-IV; Bonadio und Goldstein, 1993). Die relevante Frage ist hier die Lebensqualität; klarerweise würde das Leben der betroffenen Individuen durch die Entwicklung neuer Therapien, die für eine Stimulierung und Verstärkung der Bruchreparaturprozesse ausgelegt sind, verbessert werden.

[0174] OI-Typ I ist eine leichte Störung, die durch Knochenbruch ohne Deformation, blaue Skleren, normale oder nahezu normale Statur und eine autosomal dominante Vererbung gekennzeichnet ist (Bonadio und Goldstein, 1993). Osteopenie ist von einer erhöhten Rate an Markknochen/-Röhrenknochen-Brüchen nach dem Gehen ("ambulation") gekennzeichnet (die Bruchhäufigkeit nimmt dramatisch in der Pubertät und während des jungen Erwachsenseins ab, aber erhöht sich wieder im mittleren Lebensalter). Ein Hörverlust, der oft in dem zweiten oder dritten Jahrzehnt beginnt, ist in ungefähr der Hälfte der Familien ein Merkmal dieser Krankheit und kann trotz einer allgemeinen Abnahme der Bruchfrequenz fortschreiten. Dentinogenesis imperfecta wird bei einer Untergruppe von Individuen beobachtet.

[0175] Im Gegensatz dazu stellen OI-Typen II-VI ein Spektrum ernsterer Störungen dar, das mit einer verkürzten Lebensdauer verbunden ist. OI-Typ II, die perinatal lethale Form, ist durch eine kleine Statur, eine weiche Schädeldecke, blaue Scleren, fragile Haut, einen kleinen Oberkörper, schlacksig erscheinende untere Extremitäten (in Folge externer Rotation und Abduktion der Oberschenkelknochen), fragile Sehnen und Ligamente, Knochenbrüche mit schwerer Deformation, und Tod in der perinatalen Periode in folge von Atmungsinsuffizienz gekennzeichnet. Radiographische Anzeichen von Knochenschwäche schliessen eine Kompression der Oberschenkelknochen, ein Biegen der Schienbeine, breite und perlschnurartige Rippen, und eine Dickenabnahme der Schädeldecke ein.

[0176] OI-Typ III ist durch eine kleine Statur, ein dreieckiges Gesicht, schwere Skoliose und Knochenbrüche mit mittlerer Deformation gekennzeichnet. Skoliose kann zu Emphysemen und einer verkürzten Lebensdauer in folge von Atmungsinsuffizienz führen. OI-Typ IV ist durch normale Scleren, Knochenbrüche mit leichter oder mittlerer Deformation, Zahndefekte und eine natürliche Krankengeschichte, die im wesentlichen eine Zwischenstufe zwischen OI-Typ II und OI-Typ I ist, gekennzeichnet.

[0177] Es sind seit 1989 mehr als 200 OI-Mutationen charakterisiert worden (Übersichtsartikel von Byers und Steiner, 1992; Prockop, 1990). Der überwiegende Teil tritt in den COL1A1- und COL1A2-Genen von Typ I-Collagen auf. Die meisten Fälle von OI-Typ I scheinen aus heterozygoten Mutationen in dem COL1A1-Gen zu resultieren, die die Collagenerzeugung herabsetzen, aber nicht die Primärstruktur verändern, d.h. heterozygoten Nullmutationen, die die COL1A1-Expression beeinträchtigen. Die meisten Fälle der OI-Typen II-IV resultieren aus heterozygoten Mutationen in den COL1A1- und COL1A2-Genen, die die Struktur von Collagen verändern.

[0178] Ein drittes wichtiges Beispiel ist die Osteoporose. Der Begriff "Osteoporose" bezeichnet eine heterogene Gruppe von Störungen, die durch herabgesetzte Knochenmasse und Brüche gekennzeichnet ist. Schätzungsweise 20-25 Millionen Menschen besitzen ein erhöhtes Risiko für Brüche aufgrund stellenspezifischen Knochenverlustes. Risikofaktoren für Osteoporose schließen zunehmendes Alter, Geschlecht (mehr Frauen), geringe Knochenmasse, frühe Menopause, Rasse (Kaukasier), niedrige Calciumaufnahme, reduzierte physische Aktivität, genetische Faktoren, Umweltfaktoren (einschließlich Zigarettenrauchen und Alkohol- oder Koffeinmißbrauch) und Fehler in der neuromuskulären Kontrolle ein, die eine Neigung zum Fallen erzeugen.

[0179] Mehr als eine Million Brüche in den USA pro Jahr können der Osteoporose zugeordnet werden, und im Jahr 1986 allein kostete die Behandlung von Osteoporose schätzungsweise 7-10 Millionen US-Dollar an Gesundheitsvorsorge. Demographische Trends (d.h. das schrittweise zunehmende Alter der US-Bevölkerung) lassen vermuten, daß diese Kosten bis zum Jahr 2020 um das 2-3fache ansteigen können, wenn eine sichere und wirksame Behandlung nicht gefunden wird. Klarerweise ist Osteoporose ein bedeutendes Problem der Gesundheitsfürsorge.

[0180] Die Osteoporose wird klinisch in Typ I und Typ II eingeteilt. Typ I-Osteoporose tritt hauptsächlich bei Frauen mittleren Alters auf und ist mit Östrogenverlust in der Menopause verbunden, während Osteoporosetyp

II mit fortschreitendem Alter verbunden ist. Ein großer Teil der mit Osteoporose verbundenen Morbidität und Mortalität resultiert aus der Immobilisierung von älteren Patienten im Anschluß an Brüche.

[0181] Gegenwärtige Therapien für Osteoporosepatienten sind auf die Prävention von Brüchen, und nicht die Reparatur von Brüchen fokussiert. Dies bleibt eine wichtige Betrachtung aufgrund der Literatur, die deutlich feststellt, daß eine signifikante Morbidität und Mortalität mit einer verlängerten Bettruhe bei älteren Menschen verbunden ist, insbesondere solchen, die Hüftbrüche erlitten haben. Komplikationen der Bettruhe schließen Blutgerinsel und Pneumonien ein. Diese Komplikationen werden erkannt und üblicherweise werden Maßnahmen zu ihrer Vermeidung ergriffen, aber diese Maßnahmen stellen kaum die beste Herangehensweise an eine Therapie dar. Somit würde die Population der osteoporotischen Patienten einen Nutzen aus neuen Therapien ziehen, die auf das Stärken der Knochen und das Beschleunigen des Bruchreparaturprozesses zugeschnitten sind, wodurch diese Leute wieder auf ihre Füße gelangen, bevor Komplikationen auftreten.

[0182] Ein viertes Beispiel betrifft die Knochenrekonstruktion und insbesondere die Fähigkeit, Fehler im Knochengewebe zu rekonstruieren, die aus traumatischen Verletzungen; Krebs oder Krebschirurgie; Geburtsfehlern, einem Entwicklungsfehler oder einer vererbbaren Krankheit oder dem Altern resultieren. Es gibt einen bedeutenden orthopädischen Bedarf an stabileren Gesamtgelenk-Implantaten und die Schädel- und die Gesichtsknochen sind besondere Ziele für diese Art an rekonstruktivem Bedarf. Die Verfügbarkeit der neuen Implantatmaterialien, z.B. Titan, hat die Reparatur relativ großer Defekte erlaubt. Titanimplantate stellen eine exzellente vorübergehende Stabilität über knochigen Defekten bereit. Jedoch hat die Erfahrung gezeigt, daß ein Mangel an lebensfähigem Knochen, der den Defekt überbrückt, zu einer Exposition der Vorrichtung, Infektion, struktureller Instabilität und schließlich Scheitern der Reparatur des Defektes führen kann.

[0183] Autologe Knochentransplantate sind eine andere mögliche rekonstruktive Modalität, aber sie besitzen mehrere nachgewiesene Nachteile dahingehend, daß sie aus einer Donorstelle wie dem Darmbeinkamm oder der Rippe geerntet werden müssen, sie üblicherweise unzureichend Knochen bereitstellen, um den Defekt zu füllen, und der sich bildende Knochen manchmal anfällig für Infektion und Resorption ist. Teilweise gereinigte xenogene Zubereitungen sind für die klinische Verwendung nicht praktikabel, weil Mikrogramm-Mengen aus Kilogramm Rinderknochen gereinigt werden, was die kommerzielle Herstellung im großen Maßstab sowohl teuer wie unpraktisch macht. Allogene Transplantate und demineralisierte Knochenpräparationen werden daher oftmals eingesetzt. Mikrochirurgische Übertragungen von Transplantaten aus freien Knochen mit verbundenem weichen Gewebe und Blutgefäßen können knochige Defekte mit einer direkten Quelle an Blutzufuhr zu dem Transplantat schließen. Jedoch sind diese Verfahren zeitaufwendig. Es ist gezeigt worden, daß sie ein großes Maß an Morbidität erzeugen, und sie nur durch speziell ausgebildete Individuen eingesetzt werden können. Darüber hinaus ist das Knochenimplantat oft mengenmäßig begrenzt und ist nicht leicht konturiert. In dem Unterkieferknochen kann zum Beispiel die Mehrzahl der Patienten keine dentalen Vorrichtungen unter Verwendung der gegenwärtig akzeptierten Verfahren tragen (sogar nachdem eine Kontinuität hergestellt wird), und somit nur eine geringe Verbesserung bei der Fähigkeit beim Kauen gewinnen. Toriumi et al., haben geschrieben, daß "rekonstruktive Chirurgen einen Knochenersatz zu ihrer Verfügung haben sollten, der zuverlässig, biokompatibel, leicht zu gebrauchen und lange andauernd ist, und der die Unterkieferkontinuität mit geringer verbundener Morbidität wiederherstellt".

[0184] In Zusammenhang mit der Knochenrekonstruktion sind spezifische Problembereiche zur Verbesserung jene, die die Behandlung großer Defekte betreffen, wie die durch Traumata, Geburtsfehler und insbesondere nach Tumorresektion gebildeten. Der Erfolg von orthopädischen Implantaten, Grenzflächen und künstlichen Gelenken könnte vorstellbar verbessert werden, wenn die Oberfläche des Implantats oder ein funktioneller Teil des Implantats mit einem knochenstimulatorischen Mittel zu beschichten wäre. Die Oberflächen von Implantaten könnten mit einem oder mehreren geeigneten Materialien beschichtet werden, um eine effektivere Wechselwirkung mit der biologischen Stelle, die das Implantat umgibt, zu fördern, und idealerweise die Gewebereparatur zu fördern.

2. Knochenreparatur

[0185] Es ist bekannt, daß Knochengewebe die Fähigkeit zur Reparatur und Regeneration besitzt und es gibt ein gewisses Verständnis der zellulären und molekularen Basis dieser Prozesse. Das Auslösen der Bildung von neuem Knochen beinhaltet die Bestimmung, die klonale Expansion und die Differenzierung von Vorläuferzellen.

[0186] Nach dem Auslösen wird die Knochenbildung durch eine Vielzahl von Polypeptid-Wachstumsfaktoren gefördert. Der neu gebildete Knochen wird dann durch eine Reihe von lokalen und systemischen Wachstums-

und Differenzierungsfaktoren aufrecht erhalten.

[0187] Das Konzept der spezifischen Knochenwachstum-fördernden Mittel ist der Arbeit von Huggins und Urist entnommen. Huggins et al., 1936, zeigten, daß eine autologe Transplantation von Schneidezahn zu Skelettmuskel des Hundes in lokaler neuer Knochenbildung resultiert (Huggins et al., 1936). Urist und Mitarbeiter berichteten, daß demineralisierte lyophilisierte Knochensegmente die Knochenbildung induzierten (Urist, 1965; Urist et al., 1983), ein Prozeß, der Makrophagen- Chemotaxis beinhaltet; die Rekrutierung von Vorläuferzellen; die Bildung von Granulationsgewebe, Knorpel und Knochen; Knochenumbau; und Markdifferenzierung. Das Auslösen von Knorpel- und Knochenbildung an einer extraskelettalen Stelle, ein Prozeß, der als Osteoinduktion bezeichnet wird, hat die eindeutige Identifizierung von Auslösern der Knochenmorphogenese erlaubt (Urist, 1965; Urist et al., 1983; Sampath et al., 1984; Wang et al., 1990; Cunningham et al., 1992).

[0188] Es ist nun ein bedeutender Fortschritt bei der Charakterisierung der biologischen Agenzien gemacht worden, die durch aktives Knochengewebe während des Wachstums und der natürlichen Knochenheilung herausgebildet werden. Demineralisierte Knochenmatrix ist hochunlöslich; Sampath und Reddi (1981) zeigten, daß nur 3% der Proteine unter Verwendung starker Kombinationen von denaturierenden und oberflächenaktiven Mitteln extrahiert werden können. Sie zeigten ebenfalls, daß der unfraktionierte demineralisierte Knochenextrakt die Knochenmorphogenese auslösen wird, eine kritische Beobachtung, die zu der Reinigung von "osteoinduktiven" Molekülen führte. Es sind nun Familien von Proteinartigen osteoinduktiven Faktoren gereinigt und charakterisiert worden. Sie sind auf unterschiedliche Weise in der Literatur als knochenmorphogenetische oder knochenmorphogene Proteine (BMPs), osteogene knocheninduktive Proteine oder osteogene Proteine (OPs) bezeichnet worden.

3. Knochenreparatur und knochenmorphogenetische Proteine (BMPs)

[0189] Nach ihrer anfänglichen Reinigung sind mehrere knochenmorphogenetische Protein-Gene unter Verwendung von molekularen Techniken kloniert worden (Wozney et al., 1988; Rosen et al., 1989; zusammengefaßt in Alper, 1994). Diese Arbeit hat die BMPs, basierend auf DNA-Sequenzhomologien, als Mitglieder der TGF-β-(Transforming Growth Factor-β-)Superfamilie ermittelt. Es ist auch gezeigt worden, daß andere TGF-Moleküle an der Bildung von neuem Knochen teilnehmen, und TGF-β wird als ein komplexer multifunktioneller Regulator der Osteoblastenfunktion betrachtet (Centrell et al., 1988; Carrington et al., 1988; Seitz et al., 1992). Tatsächlich ist die Familie der Transforming Growth Factors (TGF-β1, TGF-β2 und TGF-β3) als potentiell nützlich bei der Behandlung von Knochenkrankheiten vorgeschlagen worden (U.S.-Patent 5,125,978, hierin durch Bezugnahme aufgenommen).

[0190] Die Klonierung von unterschiedlichen BMP-Genen hat zu der Bezeichnung von individuellen BMP-Genen und -Proteinen als BMP-1 bis BMP-8 geführt. Es wird allgemein angenommen, daß BMPs 2-8 osteogen sind (BMP-1 kann ein stärker allgemeines Morphogen sein; Shimell et al., 1991). BMP-3 wird auch Osteogenin genannt (Luyten et al., 1989) und BMP-7 wird auch OP-1 genannt (Ozkaynak et al., 1990). Die TGFs und BMPs wirken jeweils auf Zellen über komplexe Gewebe-spezifische Wechselwirkungen mit Familien von Zelloberflächenrezeptoren (Roberts und Sporn, 1989; Paralkar et al., 1991).

[0191] Mehrere BMP- (oder OP-)Nukleotidsequenzen und -Vektoren gezüchteter Wirtszellen und -Polypeptide sind in der Patentliteratur beschrieben worden. Zum Beispiel betreffen U.S.-Patente 4,877,864, 4,968,590 und 5,108,753 alle osteogene Faktoren. Insbesondere wird BMP-1 in U.S.-Patent 5,108,922 offenbart; BMP-2-Spezies einschließlich BMP-2A und BMP-2B sind in U.S.-Patenten 5,166,058, 5,013,649 und 5,013,649 offenbart; BMP-3 in 5,116,738; BMP-5 in 5,106,748; BMP-6 in 5,187,076; und BMP-7 in 5,108,753 und 5,141,905; die alle hierin durch Bezugnahme aufgenommen werden. Verschiedene BMP-Klone und deren Aktivitäten sind insbeondere durch Wozney et al. (1988; hierin durch Bezugnahme aufgenommen) beschrieben worden. DNA-Sequenzen, die osteogene Proteine kodieren, die als OP-1, COP-5 und COP-7 bezeichnet worden sind, werden ebenfalls in U.S.-Patent 5,011,691 offenbart. Obwohl die BMP-Terminologie weithin verwendet wird, kann es sich als Möglichkeit erweisen, daß es einen OP-Gegenstück-Begriff für jedes individuelle BMP gibt (Alper, 1994).

4. Knochenreparatur und Wachstumsfaktoren und Zytokine

[0192] TGFs (Transforming Growth Factors) besitzen eine zentrale Rolle bei der Regulierung von Gewebeheilung durch Beeinträchtigung der Zellproliferation, der Genexpression und der Matrixprotein-Synthese (Roberts und Sporn, 1989). Während dies nicht notwendigerweise eine direkte Wirkung sein muß, haben Bolander und Mitarbeiter den Nachweis dafür erbracht, daß TGF-β1 und TGF-β2 sowohl die Chondrogenese als auch

die Osteogenese auslösen können (Joyce et al., 1990; Izumi et al., 1992; Jingushi et al., 1992). In diesen Studien schienen die Bildung von neuem Knorpel und Knochen Dosis-abhängig zu sein (d.h. abhängig von der lokalen Wachstumsfaktorkonzentration). Diese Daten lassen auch vermuten, daß TGF-β1 und TGF-β2 die Zelldifferenzierung durch einen ähnlichen Mechanismus stimulieren, sogar obwohl sie sich in bezug auf die letztendliche Menge an gebildetem neuen Knorpel und Knochen unterscheiden.

[0193] Andere Wachstumsfaktoren-/Hormone neben TGF und BMP können die Bildung von neuem Knochen im Anschluß an einen Bruch beeinflussen. Bolander und Mitarbeiter injizierten rekombinanten Acidic Fibroblast Growth Factor in eine Bruchstelle bei einer Ratte (Jingushi et al., 1990). Die Hauptwirkung von mehreren hohen Dosen (1,0 mg/50 ml) war eine signifikante Zunahme des Knorpelgewebes in dem Bruchspalt, während geringere Dosen keine Wirkung besaßen. Diese Forscher haben auch die Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion(PCR™-)Technik eingesetzt, um die Expression von Östrogenrezeptor-Transkripten in Kallusgewebe zu zeigen (Boden et al., 1989). Diese Ergebnisse ließen eine Rolle für Östrogen bei der normalen Bruchreparatur vermuten.

[0194] Horowitz und Mitarbeiter haben gezeigt, daß aktivierte Osteoblasten das Zytokin Makrophage Colony Stimulating Factor synthetisieren werden (Horowitz et al., 1989). Die in dieser Studie eingesetzten osteotropen Agenzien schließen Lipopolysaccharide, PTH1-84, PTH1-34, Vitamin D und all-trans-Retinolsäure ein. Diese Beobachtung hat zu der Vermutung geführt, daß eine Osteoblastenaktivierung im Anschluß an einen Bruch zu der Bildung von Zytokinen führen kann, die sowohl die Hämatopoiese als auch die Bildung von neuen Knochen regulieren. Verschiedene andere Proteine oder Polypeptide, von denen man festgestellt hat, daß sie in hohem Maße in osteogenen Zellen exprimiert werden, wie z.B. das Vgr-1 bezeichnete Polypeptid (Lyons et al., 1989), besitzen ebenfalls ein Potential für die Verwendung in Verbindung mit der vorliegenden Erfindung.

5. Knochenreparatur und Calcium-regulierende Hormone

[0195] Calcium-regulierende Hormone wie das Parathyroid-Hormon (PTH) nehmen an der Bildung von neuem Knochen und der Knochenumbildung teil (Raisz und Kream, 1983). PTH ist ein 84 Aminosäuren umfassendes Calcium-regulierendes Hormon, dessen hauptsächliche Funktion ist, die Ca^{+2}-Konzentration im Plasma und der extrazellulären Flüssigkeit zu erhöhen. Studien mit dem nativen Hormon und synthetischen Peptiden haben gezeigt, daß der Aminoterminus des Moleküls (As 1-34) die strukturellen Erfordernisse für die biologische Aktivität enthält (Tregear et al., 1973; Hermann-Erlee et al., 1976; Riond, 1993). PTH übt seine Funktion aus durch Binden an einen spezifischen Oberflächenrezeptor, der zu der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört (Silve et al., 1982; Rizzoli et al., 1983; Juppner et al., 1991).

[0196] Unter Einsatz einer retroviralen Herangehensweise ist ein menschliches "Full-Length"-PTH-Genkonstrukts in gezüchtete Ratten-Fibroblasten eingeführt worden, um eine rekombinante PTH-sekretierende Zelle zu erzeugen. Diese Zellen wurden dann in syngenische Rattenempfänger transplantiert, die beobachtet wurden, eine Hypercalcemie zu entwickeln, die durch die erhöhten Serumkonzentrationen von PTH vermittelt wurde (Wilson et al., 1992). Die Aufgabe dieser Studien war es, ein Tiermodell für primären Hyperparathyroidismus zu erzeugen.

[0197] PTH besitzt eine doppelte Wirkung auf die Bildung von neuem Knochen, was ein etwas verwirrender Aspekt der Hormonfunktion trotz intensiver Untersuchung ist. Es ist gezeigt worden, daß PTH ein hochwirksamer Inhibitor der Typ I-Collagenerzeugung durch Osteoblasten ist (Kream et al., 1993). Vor über 30 Jahren ist auch gezeigt worden, daß intaktes PTH die Knochenresorption in Organkultur stimuliert, und das Hormon ist bekannt, die Anzahl und Aktivität von Osteoklasten zu erhöhen. Jüngste Studien durch Gay und Mitarbeiter haben die Bindung von [^{125}I-]PTH(1-84) an Osteoklasten in Gewebeschnitten gezeigt, und, daß Osteoklasten intaktes PTH auf eine Weise binden, die sowohl sättigbar als auch Zeit- und Temperatur-abhängig ist (Agarwala und Gay, 1992). Während diese Eigenschaften mit der Gegenwart von PTH-/PTHrP-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Osteoklasten in Einklang stehen, wird diese Hypothese immer noch kontrovers betrachtet. Eine stärker akzeptierte Ansicht ist vielleicht, daß die Osteoklastenaktivierung über einen Osteoblasten-Signal-Mechanismus eintritt.

[0198] Andererseits kann eine Osteosklerose bei menschlichen Patienten mit primärem Hyperparathyroidismus auftreten (Seyle, 1932). Es ist wohlbekannt, daß Individuen mit Hyperparathyroidismus nicht unaufhaltsam Knochenmasse verlieren, sondern schließlich nach einer anfänglichen Periode eines Netto-Knochenverlustes ein Gleichgewicht des Umbaus neuer Knochen erreichen. Chronische, niedrigdosige Verabreichung des Amino-terminalen Fragments von PTH (As 1-34) kann auch gemäß einer Zeit- und Dosis-abhängigen Dosierung die Bildung neuer Knochen induzieren (Seyle, 1932; Parsons und Reit, 1974).

[0199] Es ist kürzlich gezeigt worden, daß menschliches PTH1-34 die DNA-Synthese in Hühnchen-Osteoblasten und -Chondrocyten in Kultur stimuliert (van der Plas, 1985; Schluter et al., 1989; Somjen et al., 1990); die Knochenzellanzahl in vivo erhöht (Malluche et al., 1986); das in vitro-Wachstum von embryonalem Knorpel und Knochen beim Hühnchen erhöht (Kawashima, 1980; Burch und Lebovitz, 1983; Lewinson und Silbermann, 1986; Endo et al., 1980; Klein-Nulend et al., 1990); die Bildung von Oberflächenknochen (sowohl der Knochenrinde als auch der Knochenbälkchen) bei normalen und osteogenen Tieren und beim Menschen mit Osteoporose verstärkt (Reeve et al., 1976; Reeve et al., 1980; Tam et al., 1982; Hefti et al., 1982; Podbesek et al., 1983; Stevenson und Parsons, 1983; Slovik et al., 1986; Gunness-Hey und Hock, 1984; Tada et al., 1988; Spencer et al., 1989; Hock und Fonseca, 1990; Liu und Kalu, 1990; Hock und Gera, 1992; Mitlak et al., 1992; Ejersted et al., 1993); und die katabolischen Wirkungen von Östrogenmangel auf die Knochenmasse verzögert oder umkehrt (Hock et al., 1988; Hori et al., 1988; Gunness-Hey und Hock, 1989; Liu et al., 1991). Es sind Hinweise auf synergistische Wechselwirkungen zwischen hPTH-1-34 und anderen anabolischen Molekülen, einschließlich Insulin-like Growth Factor, BMP-2, Wachstumshormon, Vitamin D und TGF-β vorgelegt worden (Slovik et al., 1986; Spencer et al., 1989; Mitlak et al., 1992; Canalis et al., 1989; Linkhart und Mohan, 1989; Seitz et al., 1992; Vukicevic et al., 1989).

[0200] Anektotische Beobachtung hat gezeigt, daß Serum-PTH-Werte im Anschluß an einen Knochenbruch erhöht sein können (Meller et al., 1984; Johnston et al., 1985; Compston et al., 1989; Hardy et al., 1993), aber die Bedeutung dieser Beobachtung wird nicht verstanden. Es gibt anscheinend keine Berichte in der Literatur, Versuche betreffend, entweder PTH oder den PTH-/PTHrP-Rezeptor in situ in menschlichen Bruchstellen oder in experimentellen Modellen zu lokalisieren. Darüber hinaus ist kein Versuch angestellt worden, die Knochenreparatur durch die exogene Zugabe von PTH-Peptiden zu erhöhen. Obwohl bekannt ist, daß hPTH1-34 als ein anabolisches Agens für Knochen wirkt, blieb vor der vorliegenden Erfindung viel über die Rolle (wenn überhaupt) von PTH während der Knochenregeneration und -reparatur zu lernen übrig.

6. Proteinverabreichung und Knochenreparatur

[0201] Mehrere Studien sind durchgeführt worden, in denen Zubereitungen von Protein-Wachstumsfaktoren, einschließlich BMPs, an Tiere in dem Bemühen verabreicht worden sind, das Knochenwachstum zu stimulieren. Die Ergebnisse von vier derartigen exemplarischen Studien werden nachfolgend beschrieben.

[0202] Toriumi et al. untersuchten die Wirkung von rekombinanten BMP-2 auf die Reparatur von chirurgisch erzeugten Defekten in den Unterkieferknochen von erwachsenen Hunden (Toriumi et al., 1991). Sechsundzwanzig erwachsene Hunde wurden in drei Gruppen im Anschluß an die Bildung eines Unterkieferknochendefekts einer Gesamtdicke von 3 cm eingeteilt: 12 Tiere erhielten Testimplantate, die aus inaktivem Hundeknochen-Matrix-Träger und menschlichem BMP-2 bestand, 10 Tiere erhielten Kontrollimplantate, bestehend aus Träger ohne BMP-2, und BMP-4-Tiere erhielten kein Implantat. Die Hunde wurden nach 2,5-6 Monaten euthanasiert, und die rekonstruierten Segmente wurden durch Radiographie, Histologie, Histomorphometrie und biomechanisches Testen analysiert. Tiere, die Testimplantate erhielten, wurden nach 2,5 Monaten wegen der Gegenwart von gut mineralisiertem Knochen, der den Defekt überbrückte, euthanasiert. Der neue Knochen erlaubte diesen Tieren, eine feste Diät zu kauen, und die mittlere Biegefestigkeit der rekonstruierten Unterkieferknochen betrug 27% der normalen ("normal" stellt in diesem Fall den unoperierten kontralateralen Halbunterkieferknochen dar). Im Gegensatz dazu waren die Implantate in den beiden anderen Gruppen sogar nach 6 Monaten unwirksam und zeigten minimale Knochenbildung.

[0203] Yasko et al. veröffentlichten eine verwandte Studie, in der die Wirkung von BMP-2 auf die Reparatur von segmentalen Defekten in dem Oberschenkelknochen der Ratte untersucht wurde (Yasko et al., 1992). Die Gestaltung der Studie beinhaltete eine Gruppe, die eine Dosis von 1,4 mg BMP-2 erhielt, eine andere Gruppe, die 11,0 mg BMP-2 erhielt, und eine Kontrollgruppe, die die Träger-Matrix allein erhielt. Eine endochondrale Knochenbildung wurde in beiden Tiergruppen, die BMP-2 erhielten, beobachtet. Wie durch Radiographie, Histologie und Gesamtknochen-(Torsions-)Tests der mechanischen Integrität gezeigt wurde, resultierte die größere Dosis mit Beginn von 4,5 Wochen nach dem chirurgischen Eingriff in einer funktionellen Reparatur des 5 mm umfassenden Defekts. Die niedrigere Dosis resultierte in dem radiographischen und histologischen Nachweis neuer Knochenbildung, aber sogar 9 Wochen nach dem chirurgischen Eingriff wurde keine funktionelle Vereinigung beobachtet. Auch gab es zu dieser Zeit keinen Hinweis auf eine Knochenbildung bei Kontrolltieren.

[0204] Chen et al. zeigten, daß eine einfache Anwendung von 25-100 mg rekombinantem TGF-β1 nahe des Knorpels bei Hautwunden über die gesamte Dicke des Ohrs beim Kaninchen die endochondrale Knochenbildung induzierte (Chen et al., 1991). Die Knochenbildung begann 21 Tage im Anschluß an die Bildung der Wun-

de und erreichte einen Peak an Tag 42, wie durch morphologische Verfahren gezeigt wurde. Nach diesem Zeitpunkt wurde ein aktiver Knochenumbau beobachtet.

[0205] In einer verwandten Studie zeigten Beck et al., daß eine einzelne Anwendung von TGF-β1 in einem 3% Methylcellulose-Gel in der Lage war, chirurgisch induzierte große Schädeldefekte zu reparieren, die andernfalls durch fibröse Bindegewebe heilen und niemals Knochen bilden (Beck et al., 1991). Ein Knochen-artiger Verschluß wurde innerhalb von 28 Tagen nach der Anwendung von 200 mg TGF-β1 erzielt und es wurde gezeigt, daß die Heilungsrate Dosis-abhängig ist.

[0206] Studien wie die zuvor beschriebenen haben somit ermittelt, daß exogene Wachstumsfaktoren eingesetzt werden können, um neue Knochenbildung/-reparatur/-regeneration in vivo zu stimulieren.

[0207] Bestimmte U.S.-Patente betreffen ebenfalls Verfahren zur Behandlung von Knochendefekten oder zum Induzieren der Knochenbildung. Zum Beispiel betrifft U.S.-Patent 4,877,864 die Verabreichung einer therapeutischen Zusammensetzung eines Knochen-induktiven Proteins zur Behandlung von Knorpel- und/oder Knochen-Defekten; U.S.-Patent 5,108,753 betrifft die Verwendung einer Vorrichtung, die ein reines osteogenes Protein enthält, zum Induzieren der endochondralen Knochenbildung und zur Verwendung in periodontalen, dentalen oder craniofacialen rekonstruktiven Verfahren.

[0208] Jedoch scheint es nirgends in dieser umfangreichen Literatur irgendeinen Hinweis darauf zu geben, daß osteogene Gene selbst bei einem Tier angewendet werden können, um Knochenreparatur oder -regeneration zu fördern. In der Tat scheint sogar innerhalb der Patentliteratur, die Gene betrifft, die die verschiedenen Knochen-stimulatorischen Faktoren und deren in vitro-Expression in Wirtzellen zur Erzeugung von rekombinanten Proteinen betrifft, keine Erwähnung der Möglichkeit des Einsatzes einer Nukleinsäure-Übertragung in dem Bemühen zu geben, ein osteogenes Gen in Knochen-Vorläuferzellen in vivo zu exprimieren oder eine neue Knochenbildung in einem Tier oder menschlichem Subjekt zu fördern.

7. Biokompatible Matices zur Verwendung bei der Knochenreparatur

[0209] Es gibt eine beträchtliche Menge an Arbeiten, die auf die Entwicklung von biokompatiblen Maticen zur Verwendung in medizinischen Implantaten gerichtet ist, die spezifisch jene zur Knochenimplantationsarbeit einschließen. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung kann eine Matrix in Verbindung mit dem Gen oder der DNA-kodierenden Region eingesetzt werden, die das osteotrope Polypeptid kodiert, um auf einfache Weise das Gen der Stelle des Knochenschadens zuzuführen. Derartige Matrices können aus einer Vielzahl von Materialien, die gegenwärtig für implantierte medizinische Anwendungen in Verwendung sind, gebildet werden.

[0210] In bestimmten Fällen kann die Matrix auch als ein "Biofüllstoff" dienen, um eine Struktur für den sich entwickelnden Knochen und Knorpel bereitzustellen. Die Bildung einer derartigen Gerüststruktur ist jedoch nicht ein vorrangiges Erfordernis, vielmehr sind die Haupterfordernisse der Matrix, biokompatibel zu sein, und ein Nukleinsäuresegment zu einer Knochenzelle oder Knochengewebestelle zuführen zu können.

[0211] Matrices, die in bestimmten Ausführungsformen verwendet werden können, schließen nichtbioabbaubare und chemisch definierte Matrices ein, wie gesinterten Hydroxylapatit, Bioglas, Aluminate und andere Keramiken. Die Biokeramiken können in der Zusammensetzung verändert sein, wie in Calcium-Aluminat-Phosphat; und sie können verarbeitet sein, um die besonderen physikalischen und chemischen Eigenschaften, wie die Porengröße, Partikelgröße, Partikelform und Bioabbaubarkeit, zu modifizieren. Bestimmte polymere Matrices können auch bei Wunsch eingesetzt werden, diese schließen Acrylesterpolymere und Milchsäurepolymere ein, wie in U.S.-Patenten 4,526,909 bzw. 4,563,489 offenbart, die jeweils hierin durch Bezugnahme aufgenommen werden. Besondere Beispiele nützlicher Polymere sind solche von Orthoestern, Anhydriden, Propylen-Cofumaraten oder ein Polymer aus einer oder mehreren α-Hydroxycarboxylsäure-Monomeren, z.B. α-Hydroxyessigsäure (Glykolsäure) und/oder α-Hydroxypropionsäure (Milchsäure).

[0212] Einige der bevorzugten Matrices zur Verwendung bei den vorliegenden Zwecken sind solche, die im Körper resorbiert werden können. Potentielle bioabbaubare Matrices zur Verwendung bei der Knochen-Genübertragung schließen zum Beispiel PLGA-Blockcopolymere, bioabbaubares und chemisch definiertes Calciumsulfat, Tricalciumphosphat, Hydroxylapatit und Polyanhydride ein. Darüber hinaus können Biomatrices bestehend aus reinem Protein und/oder Komponenten der extrazellulären Matrix eingesetzt werden.

[0213] Die Erfinder haben die Verwendung von Collagen-artigen Materialien aus Knochen oder Haut als Ma-

trices, wie sie aus verschiedenen im Handel erhältlichen lyophilisierten Collagenzubereitungen, wie denen aus Rinder- oder Rattenhaut, hergestellt werden können, sowie von PLGA-Blockcopolymeren, gezeigt. Collagen-Matrices können auch wie in U.S.-Patent 4,394,370 beschrieben formuliert sein, das hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird, welches die Verwendung von Collagen-artigen Matrices als Zuführvehikel für osteogene Proteine betrifft. UltraFiber™; wie es von der Norian Corp. (Mountain View, CA) erhalten werden kann, ist eine bevorzugte Matrix. Bevorzugte Matrices sind jene, die mit Typ II-Collagen und stärker bevorzugt rekombinantem Typ II-Collagen und mineralisiertem Typ II-Collagen formuliert sind.

[0214] Weitere geeignete Matrices können ebenfalls aus Kombinationen von Materialien hergestellt werden, wie PLGA-Blockcopolymeren, die ein andauerndes Freisetzen erlauben; Hydroxyapatit; oder Collagen und Tricalciumphosphat. Obwohl eine ausreichende Sequestration und anschließende Zufuhr eines osteotropen Gens in keiner Weise eine Begrenzung der vorliegenden Erfindung darstellt, kann, sollte sie erwünscht sein, eine Kombination aus einer porösen Matrix und einem Gen ebenfalls an eine Knochengewebestelle in Kombination mit einem autologen Blutgerinsel verabreicht werden. Die Basis für dies ist, daß Blutgerinsel zuvor eingesetzt worden sind, um die Sequestration von osteogenen Proteinen zur Verwendung bei der Knochenbehandlung zu erhöhen (U.S.-Patent 5,171,579, durch Bezugnahme hierin aufgenommen) und ihre Verwendung im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung keinesfalls ausgeschlossen ist (sie können sogar Wachstumsfaktoren oder Zytokine anziehen).

8. Collagen

[0215] Obwohl zuvor nicht zur Verwendung mit einem Nukleinsäure-Molekül vorgeschlagen, ist die Verwendung von Collagen als ein pharmazeutisches Zuführvehikel beschrieben worden. Die Biokompatibilität von Collagen-Matrices ist im Stand der Technik wohlbekannt. U.S.-Patente 5,206,028, 5,128,136, 5,081,106, 4,585,797, 4,390,519 und 5,197,977 (die alle hierin durch Bezugnahme aufgenommen werden) beschreiben die Biokompatibilität von Collagen-enthaltenden Matrices bei der Behandlung von Hautläsionen, die Verwendung als Wundverband und als ein Mittel zum Kontrollieren von Blutungen. Angesichts dieser Dokumente stellt sich daher keine Frage hinsichtlich der Geeignetheit des Aufbringens einer Collagenzubereitung auf eine Gewebestelle eines Tieres.

[0216] U. S.-Patent 5,197,977 beschreibt die Herstellung eines Collagen-imprägnierten Gefäßtransplantats, das Arzneimittelstoffe in Komplex mit Collagen zum langsamen Freisetzen aus dem Transplantat im Anschluß an das Implantieren enthält. U.S.-Patent 4,538,603 betrifft einen Okklusivverband, der zur Behandlung von Hautläsionen geeignet ist, und einen granulären Stoff, der mit dem Wundexudat wechselwirken kann. U.S.-Patent 5,162,430 beschreibt eine pharmazeutisch verträgliche, nichtimmunogene Zusammensetzung, die ein Telopeptidcollagen umfaßt, das chemisch mit einem synthetischen hydrophilen Polymer verknüpft ist.

[0217] Weitere Dokumente, die ein Fachmann nützlich finden kann, schließen U.S.-Patente 4,837,285, 4,703,108, 4,409,332 und 4,347,234 ein, die jeweils hierin durch Bezugnahme aufgenommen werden. Diese Druckschriften beschreiben die Verwendungen von Collagen als ein nichtimmunogenes, bioabbaubares und bioresorbierbares Bindungsmittel.

[0218] Die Erfinder sehen voraus, daß Collagen aus vielen Quellen bei der vorliegenden Erfindung geeignet sein wird. Besonders geeignet sind die Aminosäuresequenzen von Typ II-Collagen. Beispiele von Typ II-Collagen sind im Stand der Technik wohlbekannt. Zum Beispiel sind die Aminosäuresequenzen vom Menschen (Lee et al., 1989), der Ratte (Michaelson et al., 1994) und der Maus (Ortmann et al., 1994) bestimmt worden (SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 bzw. SEQ ID NO: 14).

[0219] Obwohl es zuvor nicht bekannt war, daß Typ II-Collagen in der Lage ist, Knochen-Vorläuferzellen selbst zu stimulieren, wird hierin überraschenderweise gezeigt, daß es diese Eigenschaft besitzt, was somit die neuen Möglichkeiten für die klinischen Verwendungen ergibt.

9. Nukleinsäurezuführung

[0220] Die Übertragung von Nukleinsäuren auf Säugerzellen hat ein Verfahren zur Behandlung bestimmter Krankheiten oder Störungen vorgeschlagen. Die Nukleinsäureübertragung oder -zufuhr wird oft als "Gentherapie" bezeichnet. Die anfänglichen Bemühungen hinsichtlich der postnatalen (somatischen) Gentherapie beruhten auf indirekten Mitteln des Einführens von Genen in Gewebe, z.B. Zielzellen wurden aus dem Körper entnommen, mit viralen Vektoren, die rekombinante Gene tragen, infiziert und in den Körper implantiert. Diese Art von Verfahren wurde im allgemeinen als ex vivo-Behandlungsprotokolle bezeichnet. Eine direkte in vi-

vo-Gen-Übertragung ist kürzlich mit Formulierungen von DNA, die in Liposomen eingefangen ist, erzielt worden (Ledley et al., 1987); oder in Proteoliposomen eingefangen ist, die die viralen Hüllrezeptorproteine enthalten (Nicolau et al., 1983); mit Calciumphosphat copräzipitierter DNA (Benvenisty und Reshef, 1986); und mit DNA, die an einen Polylysin-Glycoprotein-Trägerkomplex gekoppelt war (Wu und Wu, 1988). Die Verwendung von rekombinanten Replikationsdefekten viralen Vektoren zum Infizieren von Zielzellen in vivo ist ebenfalls beschrieben worden (z.B. Seeger et al., 1984).

[0221] In den letzten Jahren hat Wolff et al. gezeigt, daß die direkte Injektion von gereinigten Präparationen von DNA und RNA in dem Skelettmuskel der Maus in einer signifikanten Expression des Reportergens resultierte (Wolff et al., 1990). Dies war ein unerwarteter Befund und die Mechanismen der Gen-Übertragung konnten nicht definiert werden. Die Autoren spekulierten, daß Muskelzellen besonders für die Aufnahme und die Expression von Polynukleotiden in vivo geeignet sein können oder daß die mit der DNA-Injektion verbundene Beschädigung das Stattfinden der Transfektion erlauben kann.

[0222] Wolff et al. schlugen mehrere mögliche Anwendungen des direkten Injektionsverfahrens vor, einschließlich (a) der Behandlung von vererbbaren Störungen des Muskels, (b) der Modifikation von Nichtmuskel-Störungen durch Muskelgewebe-Expression von therapeutischen Transgenen, (c) die Entwicklung einer Vaccine, und (d) eine reversible Art der Gen-Übertragung, bei der die DNA sehr ähnlich wie bei einer herkömmlichen pharmazeutischen Behandlung verabreicht wird. In einer eleganten Studie zeigten kürzlich Liu und Mitarbeiter, daß das direkte Injektionsverfahren erfolgreich bei dem Problem der Entwicklung einer Influenzavaccine angewendet werden kann (Ulmer et al., 1993).

[0223] Die Verwendung der Gen-Übertragung auf Synoviocyten als ein Mittel der Behandlung von Arthritis ist ebenfalls diskutiert worden (Bandara et al., 1992; Roessler et al., 1993). Die in Betracht gezogenen Protokolle haben sowohl die ex vivo-Behandlung von isolierten Synoviocyten und deren erneute Einführung in das Tier als auch die direkte Gen-Übertragung, bei der geeignete Vektoren in das Gelenk injiziert werden, eingeschlossen. Die Übertragung von Markergenen in Synoviocyten ist bereits gezeigt worden unter Verwendung von sowohl retroviraler als auch adenoviraler Technologie (Bandara et al., 1992; Roessler et al., 1993).

[0224] Trotz der ausschließlichen Betonung auf Proteinbehandlung durch jene, die in dem Gebiet des neuen Knochenwachstums arbeiten, haben die vorliegenden Erfinder gesehen, daß es ein großes Potential für die Verwendung von Nukleinsäuren selbst gibt, um die Knochenregeneration/-reparatur in vivo zu fördern. Dies stellt eine hoch entwickeltere Art des pharmazeutischen Zuführens dar. Zusätzlich zu der Einfachheit und den Kosten der Herstellung von DNA wurde auch gefolgert, daß die Verwendung von DNA-Übertragung anstatt einer Peptid-Übertragung weitere Vorteile bereitstellen würde. Zum Beispiel erlaubt die DNA-Übertragung die Expression oder Überexpression von integralen Membranrezeptoren auf der Oberfläche von Knochenregenerations/-reparaturzellen, während dies nicht unter Einsatz einer Peptid-Übertragung getan werden kann, da letztere (a priori) eine extrazelluläre Manipulation ist. Wichtig ist auch, daß eine DNA-Übertragung ebenfalls die Expression von Polypeptiden erlaubt, die auf eine Stellen-spezifische Weise mit sehr geringer zusätzlicher Arbeit modifiziert sind (d.h. eine einfache molekularbiologische Manipulation ohne Proteinreinigung), sowie das andauernde Freisetzen von Therapien, die durch einen injizierbaren Weg zugeführt werden.

[0225] Die Vorteile der Verwendung von DNA sind ebenfalls mannigfaltig in Hinsicht auf die Entwicklung von pharmazeutischen Produkten und wirksamen Mitteln für die Zufuhr. Hierbei schließen wichtige Vorteile die Fähigkeit zur Herstellung injizierbarer Formulierungen, insbesondere solchen Zusammensetzungen, die eine reversible thermische Erstarrung/Gelbildung zeigen, und die Möglichkeit zum Kombinieren derartiger injizierbarer Stoffe mit der Abbildungstechnologie während der Zufuhr ein. Die "andauernde Freisetzung" ist ebenfalls ein wichtiger Vorteil der Verwendung von DNA dahingehend, daß die exogen zugesetzte DNA weiterhin die Bildung eines Proteinprodukts im Anschluß an eine Aufnahme in eine Zelle lenkt. Die Verwendung von bestimmten Matrix-DNA-Zusammensetzungen erlaubt auch ein typischeres Phänomen der "andauernden Freisetzung" dahingehend, daß die operative Freisetzung der DNA aus dem Matrixgemisch auch manipuliert werden kann.

[0226] Die Erfinder sehen voraus, daß sowohl nackte DNA als auch Virus-vermittelte DNA bei Bemühungen, Gene auf Knochen-Vorläuferzellen zu übertragen, eingesetzt werden können. Bei Beginn, dies zu studieren, mußte das geeignete Tiermodell eingesetzt werden, das heißt eines, bei dem die Möglichkeiten der Verwendung von Nukleinsäuren zum Fördern der Knochenraparatur auf angemessene Weise in kontrollierten Studien getestet werden konnte.

10. Osteotomie-Modell

[0227] Vor der vorliegenden Erfindung standen drei Modellsysteme für eine Studie in diesem Bereich zur Verfügung, einschließlich der Mov13-Mäuse, einem Tiermodell der OI. Unglücklicherweise litt jedes dieser Modelle an bedeutenden Nachteilen. Bei den Mov13-Mäusen starben diese Mäuse erstens typischerweise im jungen Erwachsenenalter aufgrund von Retrovirus-induzierten Leukämien (Schnieke et al., 1983); zweitens können Gen-Übertragungsstudien bei Mov13-Mäusen, die zwischen den postnatalen Wochen 8-16 (d.h. vor der Entwicklung von Leukämien) durchgeführt werden, durch eine natürliche Adaption verkompliziert werden, bei der eine signifikante Menge an neuem Knochen auf der periostealen Oberfläche abgelagert wird (Bonadio et al., 1993); und drittens kann ein in eine Osteotomiestelle übertragenes osteotropes Gen mit dem aktiven Retrovirus in Synergie treten und kann ihn sogar stärker virulent machen.

[0228] Ein anderes System ist das durch Einhorn und Mitarbeiter (Bonnarens und Einhorn, 1984) geschaffene in vivo-Knochenbruchmodell. Dieses Modell ist jedoch ein geschlossenes System, das nicht auf leichte Weise anfängliche Studien der Gen-Übertragung in vivo erlauben würde. Das von Bolander und Mitarbeitern (Joyce et al., 1990) entwickelte Organkulturmodell stand ebenfalls zur Verfügung, aber wiederum ist dieses Modell nicht zum Studieren der Gen-Übertragung in vivo geeignet. Infolge der Ungeeignetheit der vorangehenden Modelle für das Studieren der Wirkungen der Gen-Übertragung auf Knochenreparatur und -regeneration haben die Erfinder ein Ratten-Osteotomie-System, wie nachfolgend beschrieben, eingesetzt.

[0229] Die wichtigen Eigenschaften des Ratten-Osteotomie-Modells sind wie folgt: unter allgemeiner Anästhesie werden vier Nägel mit einem Durchmesser von 1,2 mm in die femorale Diaphyse von normalen ausgewachsenen Sprague-Dawley-Ratten geschraubt. Eine chirurgische Vorlage stellt das parallele Plazieren der Nägel sicher. Ein externer Fixator wird dann auf den Nägeln befestigt, und ein segmentaler Defekt von 2 mm oder 5 mm wird in der zentralen Diaphyse mit einer Hall Micro 100 oszillierenden Säge erzeugt. Ein bioabbaubares Implantatmaterial, getaucht in eine Lösung von Plasmid-DNA, einem anderen genetischen Konstrukt oder einer rekombinanten Viruspräparation, wird dann in den intramedullären Kanal eingebracht und der Defekt wird geschlossen (**Fig. 5A**, **Fig. 5B**, **Fig. 6A**, **Fig. 6B**, **Fig. 6C**, **Fig. 6D**, **Fig. 7A**, **Fig. 7B**, **Fig. 8A**, **Fig. 8B**, **Fig. 8C**).

[0230] Die neue Knochenbildung kann so früh wie drei Wochen später in dem 2 mm umfassenden Spalt nachgewiesen werden, obwohl man im allgemeinen die neue Knochenbildung bis zu 9 Wochen stattfinden läßt. Der Fixator stellte die notwendige Stabilität bereit und es gab keine Begrenzungen beim Gehen der Tiere. Das chirurgische Protokoll ist heute erfolgreich bei 21 von 21 Tieren durchgeführt worden. Keines dieser Tiere starb. Die Assays auf die neue Knochenbildung wurden nach dem Töten durchgeführt, mit Ausnahme von einfacher Filmradiographie, die wöchentlich von der Zeit des chirurgischen Eingriffs bis zum Töten durchgeführt wurde.

[0231] Frühere Studien bei Sprague-Dawley-Ratten haben gezeigt, daß der 5 mm umfassende Osteotomiespalt als eine fibröse, schlechte Frakturheilung heilen wird, während ein Spalt von weniger als 3 mm (wie der in den hierin beschriebenen Studien üblicherweise eingesetzte Spalt von 2 mm) durch primäre Knochenbildung heilen wird. Studien unter Verwendung des 5 mm umfassenden Spalts erlauben somit eine Bestimmung, ob eine Transgen-Expression neue Knochenbildung stimulieren kann, wenn normalerweise eine fibröse Gewebeheilung erwartet wird. Andererseits erlauben Studien mit einem 2 mm umfassenden Spalt eine Bestimmung, ob die Transgen-Expression das natürliche primäre Knochenheilen beschleunigen kann. Kontrollen wurden ebenfalls durchgeführt, bei denen die Tiere keine DNA erhielten (**Fig. 9A** und **Fig. 9B**).

11. Die Gen-Übertragung fördert die Knochenreparatur in vivo

[0232] Die vorliegenden Erfinder haben überraschend festgestellt, daß eine Gen-Übertragung in Knochen-Vorläuferzellen in vivo (d.h. Zellen in dem regenerierenden Gewebe in dem Osteotomiespalt) einfach erzielt werden konnte. Gegenwärtig beinhalten bevorzugte Verfahren zur Erzielung einer Gen-Übertragung im allgemeinen die Verwendung eines fibrösen Collagen-Implantatmaterials, das in eine Lösung von DNA getaucht wird, kurz bevor man es an die Stelle, an der man das Knochenwachstum zu fördern wünscht, bringt. Wie die hierin vorgestellten Studien zeigen, erleichtert das Implantatmaterial die Aufnahme von exogenen Plasmidkonstrukten durch die Zellen (in dem Osteotomiespalt), die auf klare Weise an der Knochenregeneration/-reparatur teilnehmen. Nach zellulärer Aufnahme lenken die Transgene die Expression von rekombinanten Polypeptiden, wie durch die in vivo-Expression von funktionellen Marker-Gen-Produkten bewiesen wird.

[0233] Es werden hierin weitere Studien vorgestellt, die zeigen, daß die Übertragung eines osteotropen Gens in der zellulären Expression eines rekombinanten osteotropen Moleküls resultiert, wobei die Expression direkt

mit der Stimulierung neuer Knochenbildung verbunden ist. Nach Berücksichtigung einer relativen großen Anzahl von Kandidatengenen wurde ein Gen-Übertragungsvektor, der für ein Fragment des menschlichen Parathyroidhormons (hPTH1-34) kodiert, für die anfänglichen Studien der Erfinder ausgewählt. Mehrere Faktoren wurden bei der Auswahl berücksichtigt: (a), rekombinante hPTH1-34-Peptide können von jedem endogenen Rattenhormon, das in Osteotomiegeweben vorkommt, unterschieden werden; (b), hPTH1-34-Peptide werden die neue Knochenbildung in Sprague-Dawley-Ratten stimulieren, was darauf hindeutet, daß das menschliche Peptid auf effiziente Weise den PTH-/PTHrP-Rezeptor auf der Osteoblasten-Zelloberfläche der Ratte binden kann; und (c), es gibt nur einen PTH-/PTHrP-Rezeptor, das Gen für diesen Rezeptor ist kloniert worden und cDNA-Sonden für den Rezeptor stehen zur Verfügung.

[0234] In bezug auf das Verstehen des Wirkungsmechanismus des Transgens auf die neue Knochenbildung in vivo zogen die Erfinder somit den Schluß, daß es am einfachsten ist, die Expression des rekombinanten hPTH1-34-Peptids und seines Rezeptors mit der neuen Knochenbildung in dem Ratten-Osteotomie-Modell zu korrelieren. Natürlich wird im Anschluß an diese anfänglichen Studien vorausgesehen, daß jedes einer großen Vielzahl von Genen in Verbindung mit den Knochen-Gen-Übertragungsausführungsformen der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden kann.

[0235] Vorangehende Studien haben gezeigt, daß hPTH1-34 ein stärkeres anabolisches Mittel ist, wenn es periodisch im Gegensatz zu kontinuierlich verabreicht wird. Trotz der Tatsache, daß eine anabolische Wirkung bei kontinuierlicher Dosierung immer noch erwartet würde, wie durch die Studien von Parsons und Mitarbeitern (Tam et al., 1982; Spencer et al., 1989) dokumentiert wurde, gab es die Sorge, daß das pLJ-hPTH1-34-Transgen nicht sehr wirksam funktionieren könnte, da von transfizierten Zellen erwartet werden würde, daß sie rekombinante hPTH1-34-Moleküle auf eine konstitutive Art exprimieren. Der Befund, daß eine Transfektion und Expression des pLJ-hPTH1-34-Transgens auf wirksame Weise die Knochenbildung in dem Ratten-Osteotomie-Modell stimulierte, war deshalb ein wichtiges Ergebnis.

[0236] Da die Osteotomiestelle in diesem Modell stark mit Gefäßen ausgestattet ist, ist eine mögliche Komplikation der Studien mit dem pLJ-hP7H1-34-Transgen die Sekretion von rekombinantem menschlichen PTH aus der Osteotomiestelle mit anschließender Hypercalcemie und (möglichem) Tod des Tieres. Wöchentliche Serum-Calciumspiegel sollten deshalb bestimmt werden, wenn dieses Transgen eingesetzt wird. Die Tatsache, daß kein Nachweis von gestörten Serum-Calciumspiegeln in dieser Arbeit festgestellt worden ist, ist deshalb ein weiterer ermutigender Befund.

[0237] Diese Studien ergänzen andere Studien der Erfinder, in denen eine direkte Gen-Übertragung eingesetzt wurde, um Gene in die Achillesferse und die Kreuzbänder einzuführen, wie in Beispiel IX beschrieben wird.

[0238] Verschiedene direkte Anwendungen zur Verwendung von Nukleinsäurezufuhr in Verwindung mit Knochenstörungen wurden den Erfindern im Anschluß an diese überraschenden Befunde offensichtlich. Die Direktübertragung eines osteotropen Gens zur Förderung von Bruchreparatur in der klinischen orthopädischen Praxis ist nur eine Verwendung. Andere wichtige Aspekte dieser Technologie schließen die Verwendung von Gen-Übertragung zur Behandlung von Patienten mit "schwachen Knochen" ein, wie bei Krankheiten wie Osteoporose; um schwaches Heilen zu verbessern, das sich aus unbekannten Gründen ergeben kann, z.B. eine schlechte Frakturheilung; um die Integration des Implantats und die Funktion der künstlichen Gelenke zu fördern; um die Heilung anderer Skelettgewebe wie der Achillessehne zu stimulieren; und als ein Adjuvants zur Reparatur großer Defekte.

[0239] In allen diesen Ausführungsformen wird die DNA als ein direktes pharmazeutisches Mittel eingesetzt.

12. Biologisch funktionelle Äquivalente

[0240] Wie vorstehend erwähnt, können Modifikationen und Veränderungen in der Struktur eines osteotropen Gens vorgenommen und dennoch ein funktionelles Molekül erhalten werden, das Proteine oder Polypeptide mit den gewünschten Eigenschaften kodiert. Das folgende ist eine Diskussion, die auf der Veränderung der Aminosäuren eines Proteins zum Bilden eines Äquivalents oder sogar eines verbesserten Moleküls der zweiten Generation basiert. Die Aminosäureveränderungen können durch Verändern der Codons der DNA-Sequenz gemäß der folgenden Codontabelle erzielt werden:

Tabelle 1

Aminosäuren			**Codons**
Alanin	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Cystein	Cys	C	UGC UGU
Asparginsäure	Asp	D	GAC GAU
Glutaminsäure	Glu	E	GAA GAG
Phenylalanin	Phe	F	UUC UUU
Glycin	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Histidin	His	H	CAC CAU
Isoleucin	Ile	I	AUA AUC AUU
Lysin	Lys	K	AAA AAG
Leucin	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Methionin	Met	M	AUG
Asparagin	Asn	N	AAC AAU
Prolin	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Glutamin	Gln	Q	CAA CAG
Arginin	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serin	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Threonin	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Valin	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Tryptophan	Trp	W	UGG
Tyrosin	Tyr	Y	UAC UAU

[0241] Zum Beispiel können bestimmte Aminosäuren andere Aminosäuren in einer Proteinstruktur ersetzen, ohne einen nennenswerten Verlust des interaktiven Bindungsvermögens mit Strukturen wie zum Beispiel den Antigen-bindenden Regionen von Antikörpern oder Bindungsstellen auf Substratmolekülen. Da es das interaktive Vermögen und die Natur eines Proteins ist, die die biologische funktionelle Aktivität des Proteins bestimmen, können bestimmte Aminosäuresequenzaustausche in einer Proteinsequenz und natürlich in der zugrunde liegenden DNA-kodierenden Sequenz vorgenommen werden und nichtsdestotrotz ein Protein mit ähnlichen Eigenschaften erhalten. Es wird daher durch die Erfinder vorgesehen, daß verschiedene Veränderungen in den DNA-Sequenzen von osteotropen Genen ohne einen nennenswerten Verlust ihrer biologischen Nützlichkeit oder Aktivität vorgenommen werden können.

[0242] Bei der Durchführung derartiger Wechsel kann der hydropathische Index der Aminosäuren berücksichtigt werden. Die Bedeutung des hydropathischen Aminosäureindex beim Verleihen der interaktivischen biologischen Funktion an ein Protein wird im allgemeinen im Stand der Technik verstanden (Kyte und Doolittle, 1982, die hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird). Es wird akzeptiert, daß der relative hydropathische Charakter der Aminosäuren zu der Sekundärstruktur des resultierenden Proteins beiträgt, welcher wiederum die Wechselwirkung des Proteins mit anderen Molekülen, zum Beispiel Enzymen, Substraten, Rezeptoren, DNA, Antikörpern, Antigenen und dergleichen, definiert.

[0243] Jede Aminosäure ist ein hydropathischer Index auf Basis ihrer Hydrophobie und Ladungscharakteristika zugewiesen worden (Kyte und Doolittle, 1982); diese sind: Isoleucin (+4,5); Valin (+4,2); Leucin (+3,8); Phenylalanin (+2,8); Cystein/Cystin (+2,5); Methionin (+1,9); Alanin (+1,8); Glycin (–0,4); Threonin (–0,7); Serin (–0,8); Tryptophan (–0,9); Tyrosin (–1,3); Prolin (–1,6); Histidin (–3,2); Glutamat (–3,5); Glutamin (–3,5); Aspartat (–3,5); Asparagin (–3,5); Lysin (–3,9); und Arginin (–4,5).

[0244] Es ist im Stand der Technik bekannt, daß bestimmte Aminosäuren durch andere Aminosäuren ersetzt werden können, die einen ähnlichen hydropathischen Index oder Wert besitzen und noch zu einem Protein mit ähnlicher biologischer Aktivität führen, d.h. noch ein biologisch funktionell äquivalentes Protein erhalten. Beim Vornehmen derartiger Wechsel wird der Austausch von Aminosäuren bevorzugt, deren hydropathische Indices innerhalb von +2 liegen, solche, die innerhalb ±1 liegen sind besonders bevorzugt, und jene, die innerhalb ±0,5 liegen, sind sogar besonders stark bevorzugt.

[0245] Es wird auch im Stand der Technik verstanden, daß der Austausch von ähnlichen Aminosäuren auf wirksame Weise auf der Basis der Hydrophilie vorgenommen werden kann. U.S.-Patent 4,554,101, das hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird, stellt fest, daß die größte lokale mittlere Hydrophilie eines Proteins, wie sie durch die Hydrophilie von benachbarten Aminosäuren bestimmt wird, mit einer biologischen Eigenschaft des Proteins korreliert.

[0246] Wie ausführlich in U.S.-Patent 4,554,101 ausgeführt, sind die folgenden Hydrophiliewerte den Aminosäureresten zugewiesen worden: Arginin (+3,0); Lysin (+3,0); Aspartat (+3,0 ± 1); Glutamat (+3,0 ± 1); Serin (+0,3); Asparagin (+0,2); Glutamin (+0,2); Glycin (0); Threonin (-0,4); Prolin (–0,5 ± 1); Alanin (–0,5); Histidin (–0,5); Cystein (–1,0); Methionin (–1,3); Valin (–1,5); Leucin (–1,8); Isoleucin (–1,8); Tyrosin (–2,3); Phenylalanin (–2,5); Tryptophan (–3,4).

[0247] Es ist klar, daß eine Aminosäure eine andere ersetzen kann, die einen ähnlichen Hydrophiliewert besitzt und noch ein auf biologische Weise gleichwirkendes und insbesondere auf immunologische Weise gleichwirkendes Protein erhält. Bei derartigen Veränderungen ist der Austausch von Aminosäuren, deren Hydrophiliewerte innerhalb von +2 sind, bevorzugt, solche, die innerhalb ±1 liegen, sind besonders bevorzugt, und solche, die innerhalb ±0,5 liegen, sind sogar besonders stark bevorzugt.

[0248] Wie vorstehend umrissen, werden deshalb Aminosäureaustausche im allgemeinen auf der Basis der relativen Ähnlichkeit der Aminosäure-Seitenketten-Substituenten vorgenommen, zum Beispiel ihrer Hydrophobie, Hydrophilie, Ladung, Größe und dergleichen. Beispielhafte Austausche, welche verschiedene der vorgenannten Charakteristika berücksichtigen, sind dem Fachmann wohlbekannt und umfassen: Arginin und Lysin; Glutamat und Aspartat; Serin und Threonin; Glutamin und Asparagin; und Valin, Leucin und Isoleucin.

13. Stellen-spezifische Mutagenese

[0249] Die Stellen-spezifische Mutagenese ist eine nützliche Technik bei der Herstellung von individuellen Peptiden oder biologisch funktionell gleichwirkenden Proteinen oder Peptiden durch spezifische Mutagenese der zugrunde liegenden DNA. Die Technik bietet weiterhin eine einfache Möglichkeit zur Herstellung und zum Testen von Sequenzvarianten, zum Beispiel unter Beinhaltung einer oder mehrerer der vorher genannten Betrachtungen durch Einführen einer oder mehrerer Nukleotid-Sequenzwechsel in die DNA. Die Stellen-spezifische Mutagenese erlaubt die Herstellung von Mutanten durch die Verwendung von spezifischen Oligonukleotidsequenzen, die die DNA-Sequenz der gewünschten Mutation kodieren, sowie eine ausreichende Anzahl von benachbarten Nukleotiden zum Bereitstellen einer Primer-Sequenz ausreichender Größe und Sequenzkomplexität, um eine stabile Duplex auf beiden Seiten des überbrückten Deletionspunktes zu bilden. Typischerweise ist ein Primer von ungefähr 17 bis 25 Nukleotiden Länge bevorzugt, wobei ungefähr 5 bis 10 Reste auf beiden Seiten des Punktes der Sequenz geändert werden.

[0250] Im allgemeinen ist die Technik der Stellen-spezifischen Mutagenese im Stand der Technik wohlbe-

kannt, wie durch zahlreiche Publikationen veranschaulicht wird. Es wird anerkannt werden, daß die Technik typischerweise einen Phagenvektor einsetzt, der sowohl in einzelsträngiger als auch doppelsträngiger Form existiert.

[0251] Typische Vektoren, die bei der Stellen-spezifischen Mutagenese nützlich sind, schließen Vektoren wie den M13-Phagen ein. Diese Phagen sind leicht im Handel erhältlich und ihre Verwendung wird im allgemeinen dem Fachmann wohlbekannt sein. Doppelsträngige Plasmide werden ebenfalls routinemäßig bei der Stellen-spezifischen Mutagenese eingesetzt, was den Schritt des Übertragens des interessierenden Gens von einem Plasmid zu einem Phagen erübrigt.

[0252] Im allgemeinen wird die Stellen-spezifische Mutagenese in Übereinstimmung hiermit durchgeführt durch erstens Erhalten eines einzelsträngigen Vektors oder Wegschmelzens/Aufwindens von zwei Strängen eines doppelsträngigen Vektors, der innerhalb seiner Sequenz eine DNA-Sequenz enthält, die das gewünschte osteotrope Protein kodiert. Ein Oligonukleotid-Primer, der die gewünschte mutierte Sequenz trägt, wird im allgemeinen auf synthetische Weise hergestellt. Dieser Primer wird dann mit dem einzelsträngigen Vektor gepaart, und dann DNA-polymerisierenden Enzymen wie dem Klenow-Fragment der E. coli-Polymerase I ausgesetzt, um die Synthese des Mutations-tragenden Strangs zu vollenden. Auf diese Weise wird eine Heteroduplex gebildet, in der ein Strang die ursprüngliche nichtmutierte Sequenz kodiert und der zweite Strang die gewünschte Mutation trägt. Dieser Heteroduplex-Vektor wird dann eingesetzt, um geeignete Zellen zu transformieren, wie E. coli-Zellen, und es werden Klone selektiert, die rekombinante Vektoren enthalten, die die mutierte Sequenzanordnung tragen.

[0253] Die Herstellung von Sequenzvarianten des ausgewählten osteotropen Gens unter Verwendung der Stellen-spezifischen Mutagenese wird als ein Mittel der Erzeugung von potentiell nützlichen Spezies bereitgestellt und ist nicht als eine Begrenzung gedacht, da es andere Wege gibt, auf denen Sequenzvarianten von osteotropen Genen erhalten werden können. Zum Beispiel können rekombinante Vektoren, die das gewünschte osteotrope Gen kodieren, mit mutagenen Mitteln wie Hydroxylamin behandelt werden, um Sequenzvarianten zu erhalten.

14. Bildung von monoklonalen Antikörpern

[0254] Mittel zum Herstellen und Charakterisieren von Antikörpern sind im Stand der Technik wohlbekannt (siehe z.B. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, das hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird).

[0255] Die Verfahren zum Herstellen von monoklonalen Antikörpern (MAbs) beginnen im allgemeinen ähnlich denen zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern. Kurz gesagt wird ein polyklonaler Antikörper hergestellt durch Immunisieren eines Tieres mit einer immunogenen Zusammensetzung gemäß der vorliegenden Erfindung und Sammeln von Antiseren von diesem immunisierten Tier. Ein weiter Bereich von Tierspezies kann zur Herstellung von Antiseren eingesetzt werden. Typischerweise ist das zur Herstellung von Anti-Antiseren eingesetzte Tier ein Kaninchen, eine Maus, eine Ratte, ein Hamster, ein Meerschweinchen oder eine Ziege. Wegen des relativ großen Blutvolumens von Kaninchen ist ein Kaninchen eine bevorzugte Wahl zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern.

[0256] Wie im Stand der Technik wohlbekannt ist, kann eine gegebene Zusammensetzung in ihrer Immunogenität variieren. Es ist deshalb oft notwendig, das Wirtsimmunsystem zu verstärken, wie es durch Kopplung eines Peptid- oder Polypeptidimmunogens an einen Träger erreicht werden kann. Beispielhafte und bevorzugte Träger sind Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) und Rinderserumalbumin (BSA). Andere Albumine wie Ovalbumin, Mausserumalbumin oder Rattenserumalbumin können ebenfalls als Träger verwendet werden. Mittel zum Verknüpfen eines Polypeptids mit einem Trägerprotein sind im Stand der Technik wohlbekannt und schließen Glutaraldehyd, m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester, Carbodiimid und bis-biazotiertes Benzidin ein.

[0257] Wie auch im Stand der Technik wohlbekannt ist, kann die Immunogenität einer bestimmten Immunogen-Zusammensetzung durch Verwendung von unspezifischen Stimulatoren der Immunantwort, als Adjuvantien bekannt, verstärkt werden. Beispielhafte und bevorzugte Adjuvantien schließen das komplette Freund'sche Adjuvants (ein unspezifischer Stimulator der Immunantwort, der getötetes Mycobacterium tuberculosis enhält), inkomplettes Freund'sches Adjuvants und Aluminiumhydroxid-Adjuvants ein.

[0258] Die Menge an Immunogen-Zusammensetzung, die bei der Herstellung von polyklonalen Antikörpern

eingesetzt wird, variiert mit der Art des Immunogens sowie des Tiers, das zur Immunisierung eingesetzt wird. Eine Vielzahl von Wegen kann angewendet werden, um das Immunogen zu verabreichen (subkutan, intramuskulär, intradermal, intravenös und intraperitoneal). Die Herstellung von polyklonalen Antikörpern kann durch Sammeln von Blut des immunisierten Tiers zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung verfolgt werden. Eine zweite Injektion zur Verstärkung kann ebenfalls gegeben werden. Der Prozeß des Verstärkens und Titerns wird wiederholt, bis ein geeigneter Titer erzielt wird. Wenn ein gewünschter Spiegel an Immunogenität erhalten wird, kann das immunisierte Tier ausgeblutet und das Serum isoliert und gespeichert und/oder das Tier kann verwendet werden, um MAbs zu bilden.

[0259] MAbs können leicht durch die Anwendung wohlbekannter Verfahren hergestellt werden, wie denen in U.S.-Patent 4,196,265 veranschaulichten, die hierin durch Bezugnahme aufgenommen werden. Typischerweise beinhaltet dieses Verfahren das Immunisieren eines geeigneten Tiers mit einer ausgewählten Immunogen-Zusammensetzung, z.B. einem gereinigten oder teilweise gereinigten LTBP-3-Protein, -Polypeptid oder -Peptid. Die immunisierende Zusammensetzung wird auf eine wirksame Weise zum Stimulieren von Antikörper-erzeugenden Zellen verabreicht. Nagetiere wie Mäuse und Ratten sind bevorzugte Tiere, jedoch ist die Verwendung von Kaninchen und "sheep frog"-Zellen ebenfalls möglich. Die Verwendung von Ratten kann bestimmte Vorteile bieten (Goding, 1986, S. 60-61), aber Mäuse sind bevorzugt, wobei die BALB/c-Maus am stärksten bevorzugt ist, da sie routinemäßig am häufigsten eingesetzt wird und im allgemeinen einen höheren Prozentsatz einer stabilen Fusion ergibt.

[0260] Im Anschluß an die Immunisierung werden somatische Zellen mit dem Potential zur Erzeugung von Antikörpern, insbesondere B-Lymphocyten (B-Zellen) zur Verwendung in dem Protokoll zur Erzeugung von MAbs ausgewählt. Diese Zellen können aus durch Biopsie erhaltener Milz, Mandeln oder Lymphknoten oder aus einer peripheren Blutprobe erhalten werden. Milzzellen und periphere Blutzellen sind bevorzugt, die ersteren weil sie eine reiche Quelle an Antikörper erzeugenden Zellen sind, die sich in dem Stadium von teilenden Plasmablasten befinden, und die letzteren, weil das periphere Blut leicht zugänglich ist. Oft wird eine Gruppe von Tieren immunisiert worden sein und die Milz des Tieres mit dem höchsten Antikörpertiter wird entfernt und die Milzlymphocyten werden durch Homogenisieren der Milz mit einer Spritze erhalten werden. Typischerweise enhält die Milz einer immunisierten Maus schätzungsweise 5×10^7 bis 2×10^8 Lymphocyten.

[0261] Die Antikörper-erzeugenden B-Lymphocyten des immunisierten Tiers werden dann mit Zellen einer immortalisierten Myeloma-Zellinie fusioniert, im allgemeinen einer der gleichen Spezies wie das immunisierte Tier. Myeloma-Zellinien, die zur Verwendung in Verfahren zur Hybridom-erzeugenden Fusion geeignet sind, sind im allgemeinen nicht Antikörper-erzeugende Zellen, besitzen eine hohe Fusionseffizienz, und Enzymmängel, die sie unfähig machen, in bestimmten selektiven Medien zu wachsen, die nur das Wachstum der gewünschten fusionierten Zellen (Hybridomen) fördern.

[0262] Jede beliebige einer Anzahl von Myelomzellen kann verwendet werden, wie dem Fachmann bekannt ist (Goding, S. 65-66, 1986; Campbell, S. 75-83, 1984). Wenn das immunisierte Tier beispielsweise eine Maus ist, kann man P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 und S194/5XX0 Bul verwenden; für Ratten kann man R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F und 4B210 verwenden; und U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 und UC729-6 sind alle in Verbindung mit menschlichen Zellfusionen nützlich.

[0263] Eine bevorzugte Maus-Myelomlinie ist die NS-1-Myelom-Zellinie (auch P-3-NS-1-Ag4-1 genannt), die auf einfache Weise von der NIGMS Human Genetic Mutant Cell Repository durch Anfordern der Zellinie mit der Hinterlegungsnummer GM3573 erhältlich ist. Eine andere Maus-Myelom-Zellinie, die eingesetzt werden kann, ist die 8-Azaguanin-resistente, nichterzeugende Maus-Myelom SP2/0-Zellinie.

[0264] Verfahren zur Herstellung von Hybriden von Antikörper-erzeugenden Milz- oder Lymphknoten-Zellen und Myelomzellen umfassen üblicherweise das Vermischen somatischer Zellen mit Myelomzellen in einem Verhältnis von 2:1, obwohl das Verhältnis von ungefähr 20:1 bis ungefähr 1:1 variieren kann in Gegenwart eines Mittels oder von Mitteln (chemisch oder elektrisch), die die Fusion von Zellmembranen fördern. Fusionsverfahren unter Verwendung des Sendai-Virus sind von Köhler und Milstein (1975; 1976) beschrieben worden, und solche unter Verwendung von Polyethylenglykol (PEG), wie 37% (v/v) PEG, von Gefter et al. (1977). Die Verwendung von Verfahren der elektrisch induzierten Fusion ist ebenfalls geeignet (Goding, S. 71-74, 1986).

[0265] Fusionsverfahren erzeugen üblicherweise lebensfähige Hybride mit niedrigen Frequenzen, ungefähr 1×10^{-6} bis 1×10^{-8}. Dies stellt jedoch nicht ein Problem dar, da lebensfähige, fusionierte Hybride von den parentalen und fusionierten Zellen (insbesondere den unfusionierten Myelomzellen, die normalerweise fortfahren

würden, sich unendlich zu teilen), durch Kultur in einem Selektionsmedium differenziert werden. Das Selektionsmedium ist im allgemeinen eines, das ein Mittel enthält, das die de novo-Synthese von Nukleotiden in dem Gewebekulturmedium blockiert. Beispielhafte und bevorzugte Mittel sind Aminopterin, Methotrexat und Azaserin. Aminopterin und Methotrexat blockieren die de novo-Synthese von sowohl Purinen als auch Pyrimidinen, während Azaserin nur die Purin-Synthese hemmt. Wenn Aminopterin oder Methotrexat verwendet wird, wird das Medium mit Hypoxanthin und Thymidin als eine Quelle von Nukloetiden ergänzt (HAT-Medium), wenn Azaserin verwendet wird, wird das Medium mit Hypoxanthin ergänzt.

[0266] Das bevorzugte Selektionsmedium ist HAT. Nur Zellen, die in der Lage sind, "Nukleotidrettungsstoffwechselwege" ("nukleotide salvage pathways") zu betreiben, können in HAT-Medium überleben. Die Myelomzellen besitzen einen Mangel in den Schlüsselenzymen des Rettungsstoffwechselweges, z.B. der Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) und sie können nicht überleben. Die B-Zellen können diesen Stoffwechselweg benutzen, aber sie besitzen eine begrenzte Lebensdauer in Kultur und sterben im allgemeinen innerhalb von etwa zwei Wochen. Deshalb sind die einzigen Zellen, die in dem Selektionsmedium überleben können, jene Hybride, die aus Myelom- und B-Zellen gebildet wurden.

[0267] Diese Züchtung stellt eine Population von Hybridomen bereit, aus der spezifische Hybridome selektiert werden können. Typischerweise wird die Selektion von Hybridomen durchgeführt, indem die Zellen bei Einzelklon-Verdünnung in Mikrotiterplatten kultiviert werden, gefolgt von dem Testen der individuellen Klon-Überstände (nach ungefähr zwei bis drei Wochen) auf die erwünschte Reaktivität. Der Assay sollte sensitiv, einfach und schnell sein, wie Radioimmunoassays, Enzymimmunoassays, Zytotoxizitätsassays, Plaqueassays, Dot-Immunbindungs-Assays und dergleichen.

[0268] Die selektierten Hybridome würden dann serienmäßig verdünnt und in individuellen Antikörper-erzeugenden Zellinien kloniert werden, wobei die Klone dann unendlich zur Erzeugung von MAbs vermehrt werden können. Die Zellinien können auf zwei grundsätzliche Arten zur MAb-Erzeugung eingesetzt werden. Eine Probe des Hybridoms kann (oft in die Peritonealhöhle) in ein Gewebe-verträgliches Tier der Art injiziert werden, die für das Bereitstellen der somatischen und Myelomzellen für die ursprüngliche Fusion eingesetzt wurde. Das injizierte Tier entwickelt Tumore, die den spezifischen monoklonalen Antikörper, der durch das fusionierte Zellhybrid erzeugt wird, sekretieren. Die Körperflüssigkeiten des Tiers, wie das Serum oder die Aszitesflüssigkeit, kann dann abgezogen werden, um MAbs in hoher Konzentration bereitzustellen. Die individuellen Zellinien könnten auch in vitro gezüchtet werden, wobei die MAbs auf natürliche Weise in das Kulturmedium sekretiert werden, aus dem sie dann leicht in hohen Konzentrationen erhalten werden können. Mabs, die auf eine der beiden Wege erzeugt wurden, können dann weiter gereinigt werden, wenn gewünscht, unter Einsatz von Filtration, Zentrifugation und mit verschiedenen chromatographischen Verfahren wie HPLC oder Affinitätschromatographie.

15. LTBP-3

[0269] Andere Aspekte der vorliegenden Erfindung betreffen isolierte DNA-Segmente und rekombinante Vektoren, die LTBP-3 kodieren, und die Bildung und Verwendung von rekombinanten Wirtszellen durch Anwendung der DNA-Technologie, die LTBP-3-Genprodukte exprimieren. Als eine derartige betrifft die Erfindung ein DNA-Segment, das ein isoliertes Gen umfaßt, das ein Protein oder Peptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz im wesentlichen wie durch die fortlaufende Sequenz der SEQ ID NO:3 ausgeführt enthält. Diese DNA-Segmente werden durch jene dargestellt, die eine Nukleinsäuresequenz im wesentlichen wie durch eine fortlaufende Sequenz von SEQ ID NO:2 (**Fig.** 25) ausgeführt enthalten. Zusammensetzungen, die ein gereinigtes Protein einschließen, das eine Aminosäuresequenz im wesentlichen wie durch die Aminosäuresequenz von SEQ ID NO:3 (**Fig.** 26) ausgeführt besitzen, werden ebenfalls von der Erfindung umfaßt.

[0270] Die TGF-βs stellen eine Familie von strukturell verwandten Molekülen mit verschiedenen Wirkungen auf die Form, das Wachstum und die Differenzierung von Säugerzellen dar (Roberts und Sporn, 1990). Anfänglich als ein Vorläufer synthetisiert, der aus einem aminoterminalen Propeptid, gefolgt von maturiertem TGF-β besteht, assoziieren die beiden Ketten des entstehenden Pro-TGF-β in den meisten Geweben unter Bildung eines inaktiven Disulfid-verknüpften Dimers von Mr~106. 000.

[0271] Homodimere sind am häufigsten, aber Heterodimere sind ebenfalls beschrieben worden (Cheifetz et al., 1987; Ogawa et al., 1992). Während der Biosynthese wird das maturierte TGF-β-Dimer von dem Propeptiddimer gespalten. Die TGF-β-Latenz resultiert teilweise aus der nichtkovalenten Assoziierung von Propeptiddimer und maturierten TGF-β-Dimeren (Pircher et al., 1984, 1986; Wakefield et al., 1987, Millan et al., 1992, Miyazono und Heldin, 1989). Folglich wird das Propeptiddimer oft als das Latenz-assoziierte Protein (LAP) be-

zeichnet und LAP plus das Disulfid-verknüpfte TGF-β-Dimer sind auch als der kleine latente Komplex (Small Latent Complex) bekannt. In dem extrazellulären Raum müssen kleine latente Komplexe dissoziiert werden, um maturiertes TGF-β zu aktivieren. Der Mechanismus der Aktivierung des latenten Komplexes wird als einer der wichtigsten Schritte zur Steuerung der TGF-β-Wirkungen vermutet (Lyons et al., 1988; Antonelli-Orlidge et al., 1989; Twardzik et al., 1990; Sato et al., 1993).

[0272] In bestimmten Linien von kultivierten Zellen können kleine latente Wachstumsfaktorkomplexe zusätzliche Proteine mit hohem Molekulargewicht enthalten. Das am besten charakterisierte dieser Proteine mit hohem Molekulargewicht ist das Latent TGF-β Binding Protein oder LTBP (Miyazono et al., 1988; Kanzaki et al., 1990; Tsuji et al., 1990; Olofsson et al., 1992; Taketazu et al., 1994). Das durch die verschiedenen Zellarten erzeugte LTBP ist heterogen in Größe, vielleicht aufgrund von alternativem Spleißen oder aufgrund von gewebespezifischer proteolytischer Prozessierung (Miyazono et al., 1988; Wakefield et al., 1988; Kanzaki et al., 1990; Tsuji et al., 1990). Latente TGF-β-Komplexe, die LTBP enthalten, sind als große latente Komplexe (Large Latent Complexes) bekannt. LTBP besitzt keine bekannte kovalente Verknüpfung mit maturiertem TGF-β, vielmehr ist es durch eine Disulfidbrücke mit LAP verbunden.

[0273] Hinsichtllich des neuen Proteins LTBP-3 betrifft die vorliegende Erfindung DNA-Segmente, die praktisch aus jeder beliebigen Säugerquelle isoliert werden können, die frei sind von sämtlicher genomischer DNA und die Proteine mit LTBP-3-artiger Aktivität kodieren. Es kann sich herausstellen, daß DNA-Segmente, die LTBP-3-artige Spezies kodieren, Proteine, Polypeptide, Untereinheiten, funktionelle Domänen und dergleichen kodieren.

[0274] Wie er hierin verwendet wird, bezeichnet der Begriff "DNA-Segment" ein DNA-Molekül, das frei von gesamter genomischer DNA einer bestimmten Spezies isoliert worden ist. Deshalb bezeichnet ein LTBP-3-kodierendes DNA-Segment ein DNA-Segment, das LTBP-3-kodierende Sequenzen enthält, aber von gesamter genomischer DNA der Spezies, aus der das DNA-Segment erhalten wurde, abgetrennt oder frei von dieser gereinigt wurde. Umfaßt innerhalb des Begriffs "DNA-Segment" sind DNA-Segmente und kleinere Fragmente derartiger Segmente und rekombinante Vektoren, einschließlich von beispielsweise Plasmiden, Cosmiden, Phagemiden, Phagen, Viren und dergleichen.

[0275] Auf ähnliche Weise betrifft ein DNA-Segment, das ein isoliertes oder gereinigtes LTBP-3-Gen umfaßt, ein DNA-Segment, das LTBP-3-kodierende Sequenzen enthält, und in bestimmten Aspekten regulatorische Sequenzen, die im wesentlichen von anderen natürlich auftretenden Genen oder Protein-kodierenden Sequenzen abgetrennt/isoliert sind. In dieser Hinsicht wird der Begriff "Gen" der Einfachheit halber verwendet, um ein funktionelles Protein, Polypeptid oder eine Peptidkodierende Einheit zu bezeichnen. Wie der Fachmann verstehen wird, schließt dieser funktionelle Begriff sowohl genomische Sequenzen, cDNA-Sequenzen als auch kleinere gentechnische Gen-Segmente, die Proteine, Polypeptide oder Peptide exprimieren oder zur Expression derselben angepaßt sind, ein.

[0276] "Im wesentlichen abgetrennt/isoliert von anderen kodierenden Sequenzen" bedeutet, daß das interessierende Gen, in diesem Fall ein LTBP-3-kodierendes Gen, den bedeutenden Teil der kodierenden Region des DNA-Segments bildet, und daß das DNA-Segment nicht große Anteile von natürlich vorkommender kodierender DNA enthält, wie große chromosomale Fragmente oder andere funktionelle Gene oder cDNA-kodierende Regionen. Natürlich betrifft dies das DNA-Segment, wie es ursprünglich isoliert wurde, und schließt nicht Gene oder kodierende Regionen aus, die später dem Segment durch die Hand des Menschen zugefügt wurden.

[0277] In besonderen Ausführungsformen betrifft die Erfindung isolierte DNA-Segmente und rekombinante Vektoren, die DNA-Sequenzen beinhalten, die eine LTBP-3-Spezies kodieren, die innerhalb ihrer Aminosäuresequenz eine Aminosäuresequenz enthalten, die im wesentlichen wie die in SEQ ID NO:3 aufgeführte ist. In anderen besonderen Ausführungsformen betrifft die Erfindung isolierte DNA-Segmente und rekombinante Vektoren, die DNA-Sequenzen beinhalten, die innerhalb ihrer Sequenz eine Sequenz enthalten, die im wesentlichen wie die in SEQ ID NO:2 aufgeführte ist.

[0278] Der Begriff "eine Sequenz, die im wesentlichen wie die in SEQ ID NO:3 aufgeführte ist" bedeutet, daß die Sequenz im wesentlichen einem Teil der SEQ ID NO:3 entspricht und relativ wenige Aminosäuren besitzt, die nicht identisch mit oder nicht ein biologisch funktionelles Äquivalent der Aminosäuren von SEQ ID NO:3 sind. Der Begriff "biologisch funktionelles Äquivalent" ist im Stand der Technik klar und wird weiterhin ausführlich hierin definiert (siehe zum Beispiel Abschnitt 7, bevorzugte Ausführungsform). Somit werden Sequenzen, die zwischen ungefähr 70% und ungefähr 80%; oder stärker bevorzugt zwischen ungefähr 81 % und ungefähr 90%; oder sogar noch stärker bevorzugt zwischen ungefähr 91% und ungefähr 99% der Aminosäuren besit-

zen, die identisch oder funktionell gleichwirkend mit den Aminosäuren von SEQ ID NO:3 sind, Sequenzen sein, die "im wesentlichen wie die in SEQ ID NO:3 aufgeführte sind".

[0279] In bestimmten anderen Ausführungsformen betrifft die Erfindung isolierte DNA-Segmente und rekombinante Vektoren, die innerhalb ihrer Sequenz eine Nukleinsäuresequenz enthalten, die im wesentlichen wie die in SEQ ID NO:2 aufgeführte ist. Der Begriff "im wesentlichen wie die in SEQ ID NO:2 aufgeführte ist" wird in dem gleichen Sinne wie vorstehend beschrieben verwendet und bedeutet, daß die Nukleinsäuresequenz im wesentlichen einem Anteil von SEQ ID NO:2 entspricht und relativ wenige Codons besitzt, die nicht identisch mit oder funktionell gleichwirkend mit den Codons von SEQ ID NO:2 sind. Wiederum werden DNA-Segmente, die Proteine kodieren, die eine LTBP-3-artige Aktivität zeigen, am stärksten bevorzugt sein.

[0280] Es wird auch klar sein, daß Aminosäure- und Nukleinsäuresequenzen zusätzliche Reste einschließen können, wie zusätzliche N- oder C-terminate Aminosäuren oder 5'- oder 3'-Sequenzen, und dennoch noch im wesentlichen wie in einer der hierin offenbarten Sequenzen sein können, so lange die Sequenz die vorstehend ausgeführten Kriterien erfüllt, einschließlich des Beibehaltens der biologischen Proteinaktivität, wenn die Protein-Expression betroffen ist. Das Hinzufügen von terminalen Sequenzen gilt insbesondere für Nukleinsäuresequenzen, die beispielsweise verschiedene nichtkodierende Sequenzen einschließen können, die sowohl die 5'- oder 3'-Anteile der kodierenden Region flankieren, oder sie können verschiedene interne Sequenzen, d.h. Introns, einschließen, die bekanntlich innerhalb von Genen auftreten.

[0281] Natürlich betrifft die vorliegende Erfindung ebenfalls DNA-Segmente, die komplementär oder im wesentlichen komplementär zu der in SEQ ID NO:2 aufgeführten Sequenz sind. Nukleinsäuresequenzen, die "komplementär" sind, sind jene, die Basenpaarungen eingehen können gemäß den Standard-Watson-Crick-Komplementaritätsregeln. Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff "komplementäre Sequenz" Nukleinsäuresequenzen, die im wesentlichen komplementär sind, wie durch den gleichen Nukleotidvergleich wie oben ausgeführt überprüft werden kann, oder wie als zur Hybridisierung mit dem Nukleinsäuresegment von SEQ ID NO:2 unter relativ stringenten Bedingungen wie den hierin beschriebenen fähig definiert.

[0282] Die Nukleinsäuresegmente der vorliegenden Erfindung, unabhängig von der Länge der kodierenden Sequenz selbst, können mit anderen DNA-Sequenzen, wie Promotern, Polyadenylierungssignalen, zusätzlichen Restriktionsenzymschnittstellen, Mehrfachklonierungsschnittstellen ("Multiple Cloning Sites"), anderen kodierenden Segmenten und dergleichen derart kombiniert werden, daß ihre gesamte Länge beträchtlich variieren kann. Es wird deshalb vorausgesehen, daß ein Nukleinsäurefragment einer fast beliebigen Länge eingesetzt werden kann, wobei die Gesamtlänge vorzugsweise durch die Einfachheit der Herstellung und Verwendung bei dem beabsichtigten rekombinanten DNA-Protokoll begrenzt wird. Beispielsweise können Nukleinsäurefragmente hergestellt werden, die ein kurzes benachbartes Stück, identisch zu oder komplimentär mit SEQ ID NO:2, wie ungefähr 14 Nukleotide, einschließen, und die bis zu ungefähr 10 000 oder ungefähr 5 000 Basenpaare in Länge sind, wobei Segmente mit ungefähr 3 000 in bestimmten Fällen bevorzugt sind. DNA-Segmente mit Gesamtlängen von ungefähr 1 000, ungefähr 500, ungefähr 200, ungefähr 100 und ungefähr 50 Basenpaaren in Länge (einschließlich aller dazwischen liegender Längen) werden ebenfalls als nützlich in Erwägung gezogen.

[0283] Es wird leicht verstanden werden, daß "dazwischenliegende Längen" in diesem Kontext jede beliebige Länge zwischen den zitierten Bereichen bedeutet, wie 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, etc.; 21, 22, 23, etc.; 30, 31, 32, etc.; 50, 51, 52, 53, etc.; 100, 101, 102, 103, etc.; 150, 151, 152, 153, etc.; einschließlich aller ganzen Zahlen durch die Bereiche 200-500; 500-1 000; 1 000-2 000; 2 000-3 000; 3 000-5 000; 5 000-10 000, bis zu und einschließlich von Sequenzen von ungefähr 12 001, 12 002, 13 001, 13 002 und dergleichen.

[0284] Es wird auch verstanden werden, daß diese Erfindung nicht auf die besonderen Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen von SEQ ID NO:2 und SEQ II) NO:3 beschränkt sind. Rekombinante Vektoren und isolierte DNA-Segmente können daher auf variierende Weise die LTBP-3-kodierenden Regionen selbst, kodierende Regionen, die ausgewählte Veränderungen oder Modifikationen in der grundlegenden kodierenden Region tragen, einschließen, oder sie können größere Polypeptide kodieren, die nichtdestotrotz LTBP-3-kodierende Regionen einschließen oder sie können biologisch funktionell gleichwirkende Proteine oder Peptide kodieren, die abweichende Aminosäuresequenzen besitzen.

[0285] Die DNA-Segmente der vorliegenden Erfindung umfassen biologisch funktionell gleichwirkende LTBP-3-Proteine und -Peptide. Derartige Sequenzen können sich ergeben als eine Folge der Codonredundanz und funktioneller Gleichwertigkeit, die bekanntlich auf natürliche Weise innerhalb von Nukleinsäuresequenzen und den so kodierten Proteinen auftreten. Alternativ dazu können funktionell gleichwirkende Proteine

oder Peptide durch die Anwendung der rekombinanten DNA-Technologie erzeugt werden, bei der Wechsel in der Proteinstruktur technisch erzeugt werden können, basierend auf Betrachtungen der Eigenschaften der Aminosäuren, die ausgetauscht werden. Durch den Menschen zugeschnittene Veränderungen können durch die Anwendung der Technik der Stellen-spezifischen Mutagenese eingeführt werden, z.B. zum Einführen von Verbesserungen der Antigenität des Proteins oder um Mutanten zu testen, um die Aktivität auf der molekularen Ebene zu untersuchen.

[0286] Wenn gewünscht, kann man ebenfalls Fusionsproteine und -peptide herstellen, z.B. in denen die LTBP-3-kodierenden Regionen innerhalb der gleichen Expressionseinheit mit anderen Proteinen oder Peptiden ausgerichtet angeordnet werden, die gewünschte Funktionen besitzen, wie zu Zwecken der Reinigung oder des Immunnachweises (z.B. Proteine, die durch Affinitätschromatographie gereinigt werden können bzw. Enzymmarkierungs-kodierende Regionen).

[0287] Rekombinante Vektoren bilden weitere Aspekte der vorliegenden Erfindung. Als besonders nützliche Vektoren werden jene Vektoren in Erwägung gezogen, in denen der kodierende Anteil des DNA-Segments, ein Protein mit gesamter Länge oder ein kleineres Peptid kodierend, unter die Kontrolle eines Promotors gebracht ist. Der Promotor kann in Form des Promotors sein, der auf natürliche Weise mit dem LTBP-3-Gen assoziiert ist, wie er erhalten werden kann durch Isolieren der 5'-nichtkodierenden Sequenzen, die sich stromaufwärts des kodierenden Segments oder Exons befinden, zum Beispiel unter Einsatz rekombinanter Klonierungs- und/oder PCR™-Technologie, in Zusammenhang mit den hierin offenbarten Zusammensetzungen.

[0288] In anderen Ausführungsformen wird vorgesehen, daß bestimmte Vorteile erzielt werden können, indem das kodierende DNA-Segment unter die Kontrolle eines rekombinanten oder heterologen Promotors gebracht wird. Wie hierin verwendet, ist beabsichtigt, daß ein rekombinanter oder heterologer Promotor einen Promotor bezeichnet, der nicht auf normale Weise mit einem LTBP-3-Gen in seiner natürlichen Umgebung assoziiert ist. Derartige Promoter können LTBP-3-Promoter einschließen, die normalerweise mit anderen Genen verbunden sind, und/oder Promoter, die aus beliebigen bakteriellen, viralen, eukaryotischen oder Säugerzellen isoliert wurden. Natürlich wird es wichtig sein, einen Promotor einzusetzen, der auf wirksame Weise die Expression des DNA-Segments in dem Zelltyp, Organismus oder sogar Tier, das für die Expression ausgewählt wurde, lenkt. Die Verwendung von Promoter- und Zelltyp-Kombinationen zur Protein-Expression ist dem Fachmann in dem Gebiet der Molekularbiologie im allgemeinen bekannt, siehe beispielsweise Sambrook et al., 1989. Die eingesetzten Promoter können konstitutiv oder induzierbar sein, und können unter den geeigneten Bedingungen eingesetzt werden, um eine Expression des eingeführten DNA-Segments auf einem hohen Niveau zu lenken, wie es bei der Herstellung von rekombinanten Proteinen oder Peptiden in großem Maßstab vorteilhaft ist. Geeignete Promotersysteme, die für die Verwendung bei einer Expression auf hohem Niveau in Erwägung gezogen werden, schließen das Pichia-Expressionsvektor-System (Pharmacia LKB Biotechnologie) ein (siehe Beispiel XVI hierin), sind aber nicht darauf beschränkt.

[0289] Im Zusammenhang mit Expressionsausfürungsformen zur Herstellung von rekombinanten LTBP-3-Proteinen und -Peptiden wird vorgesehen, daß längere DNA-Segmente am meisten benutzt werden werden, wobei DNA-Segmente, die das gesamte LTBP-3-Protein oder funktionelle Domänen, Untereinheiten etc. kodieren, am stärksten bevorzugt sind. Es wird jedoch anerkannt werden, daß die Verwendung von kürzeren DNA-Segmenten zur Lenkung der Expression von LTBP-3-Peptiden oder epitopischen Kernregionen, wie die, die zur Bildung von Anti-LTBP-3-Antikörper eingesetzt werden können, ebenfalls in den Bereich der Erfindung fällt. DNA-Segmente, die Peptid-Antigene von ungefähr 15 bis ungefähr 50 Aminosäuren Länge und stärker bevorzugt von ungefähr 15 bis ungefähr 30 Aminosäuren Länge kodieren, werden als besonders nützlich in Erwägung gezogen.

[0290] Das LTBP-3-Gen und -DNA-Segmente können ebenfalls in Verbindung mit der somatischen Expression in einem Tier oder bei der Erzeugung eines transgenen Tieres verwendet werden. Wiederum wird in derartigen Ausführungsformen die Verwendung eines rekombinanten Vektors, der die Expression des LTBP-3-Proteins in aktiver Form oder in gesamter Länge lenkt, als besonders nützlich in Erwägung gezogen.

[0291] Zusätzlich zu ihrer Verwendung beim Lenken der Expression des LTBP-3-Proteins haben die hierin offenbarten Nukleinsäuresequenzen auch eine Vielzahl anderer Anwendungen. Zum Beispiel besitzen sie eine Nützlichkeit als Sonden oder Primer bei Ausführungsformen der Nukleinsäurehybridisierung. Es wird vorausgesehen, daß derartige Nukleinsäuresegmente, die eine Sequenzregion umfassen, die aus mindestens einer 14 Nukleotiden langen aufeinanderfolgenden Sequenz besteht, die die gleiche Sequenz wie eine 14 Nukleotide lange aufeinanderfolgende Sequenz von SEQ ID NO:2 hat oder komplementär zu dieser ist, besonderen Nutzen finden wird. Längere aufeinanderfolgende identische oder komplementäre Sequenzen, z.B. jene von

ungefähr 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000 (einschließlich aller dazwischen liegenden Längen) und sogar bis zu Sequenzen gesamter Länge werden ebenfalls bei bestimmten Ausführungsformen von Nutzen sein.

[0292] Die Fähigkeit derartiger Nukleinsäuresonden, mit LTBP-3-kodierenden Sequenzen spezifisch zu hybridisieren, wird sie in die Lage versetzen, beim Nachweisen des Vorliegens komplementärer Sequenzen in einer gegebenen Probe von Nutzen zu sein. Jedoch stellt man sich auch andere Verwendungen vor, einschließlich der Verwendung der Sequenzinformation zur Herstellung von mutanten Primerspezies oder Primern zur Verwendung bei der Herstellung anderer genetischer Konstrukte.

[0293] Nukleinsäuremoleküle mit Sequenzregionen, bestehend aus aufeinanderfolgenden Nukleotidstücken von 10-14, 15-20, 30, 50 oder sogar von 100-200 Nukleotiden oder so, identisch oder komplementär zu SEQ ID NO:2, werden insbesondere als Hybridisierungssonden zur Verwendung in z.B. Southern und Northern Blot in Erwägung gezogen. Dies würde erlauben, die LTBP-3-Struktur oder -Regulatorgene zu analysieren, sowohl in verschiedenen Zelltypen als auch in verschiedenen Säugetierzellen. Die Gesamtgröße des Fragments sowie die Größe des komplementären Stücks oder der komplementären Stücke wird schließlich von der beabsichtigten Verwendung oder Anwendung des besonderen Nukleinsäuresegments abhängen. Kleinere Fragmente werden im allgemeinen bei Hybridisierungs-Ausführungsformen Nutzen finden, wobei die Länge der aufeinanderfolgenden komplementären Region variiert werden kann, wie zwischen ungefähr 10-14 und ungefähr 100 Nukleotiden, aber längere aufeinanderfolgende komplementäre Stränge können eingesetzt werden gemäß der Länge der komplementären Sequenzen, die man nachzuweisen wünscht.

[0294] Die Verwendung einer Hybridisierungssonde von ungefähr 10-14 Nukleotiden in Länge erlaubt die Bildung eines Duplex-Moleküls, das sowohl stabil als auch selektiv ist. Moleküle mit aufeinanderfolgenden komplementären Sequenzen über Stücke, die größer als 10 Basen in Länge sind, sind im allgemeinen allerdings bevorzugt, um die Stabilität und Selektivität des Hybrids zu erhöhen und dadurch die Qualität und den Grad des erhaltenen spezifischen Hybridmoleküls zu verbessern. Man wird es im allgemeinen bevorzugen, Nukleinsäuremoleküle zu entwerfen, die Gen-komplementäre Stücke von 15 bis 20 aufeinanderfolgende Nukleotide oder sogar länger, wenn gewünscht, besitzen.

[0295] Hybridisierungssonden können aus jedem beliebigen Anteil jeder der hierin offenbarten Sequenzen ausgewählt werden. Alles, was erforderlich ist, ist, die in SEQ ID NO:2 aufgeführte Sequenz erneut zu überprüfen, und einen beliebigen aufeinanderfolgenden Anteil der Sequenz von ungefähr 10-14 Nukleotiden in Länge bis zu und einschließlich der Sequenz gesamter Länge auszuwählen, die man als eine Sonde oder Primer zu verwenden wünscht. Die Wahl der Sonden- und Primersequenzen kann von verschiedenen Faktoren bestimmt sein, wie, lediglich als Beispiel gedacht, man wünschen kann, Primer einzusetzen von Sequenzen zu den Enden der Gesamtsequenz hin. Der Prozeß des Auswählens und Herstellens eines Nukleinsäuresegments, das eine aufeinanderfolgende Sequenz aus SEQ ID NO:2 enthält, kann alternativ dazu als das Herstellen eines Nukleinsäurefragments beschrieben werden. Natürlich können Fragmente auch durch andere Verfahren, wie z.B. durch mechanisches Scheren oder durch Restriktionsenzymverdau erhalten werden. Kleine Nukleinsäuresegmente oder -fragmente können leicht durch zum Beispiel direktes Synthetisieren des Fragments durch chemische Mittel hergestellt werden, wie es gemeinhin unter Verwendung eines automatisierten Oligonukleotid-Synthetisierers praktiziert wird. Auch können Fragmente durch Anwendung von Nukleinsäure-Reproduktionstechnologie, wie der PCR™-Technologie von US-Patent 4,603,102 (hierin durch Bezugnahme aufgenommen), durch Einführen ausgewählter Sequenzen in rekombinante Vektoren zur rekombinanten Herstellung, und durch andere rekombinante DNA-Techniken, die im allgemeinen dem molekularbiologischen Fachmann bekannt sind, erhalten werden.

[0296] Somit können die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen wegen ihrer Fähigkeit zum selektiven Bilden von Duplex-Molekülen mit komplementären Stücken von LTBP-3-Gen oder -cDNA-Fragmenten verwendet werden. Abhängig von der Anwendung, die man sich vorstellt, wird man variierende Hybridisierungsbedingungen einzusetzen wünschen, um variierende Grade an Selektivität der Sonde gegenüber den Zielsequenzen zu erzielen. Für Anwendungen, die eine hohe Selektivität erfordern, wird man typischerweise relativ stringente Bedingungen einzusetzen wünschen, z.B. man wird relativ niedrige Salz- und/oder hohe Temperatur-Bedingungen auswählen, wie sie bereitgestellt werden durch ungefähr 0,02 M bis ungefähr 0,15 M NaCl bei Temperaturen von 50°C bis 70°C. Derartig selektive Bedingungen tolerieren wenig, sofern überhaupt, Fehlpaarung zwischen der Sonde und dem Matrizen- oder Ziel-Strang und würden besonders für das Isolieren von LTBP-3-Genen geeignet sein.

[0297] Für einige Anwendungen, zum Beispiel wenn man wünscht, Mutanten unter Verwendung eines Mutanten-Primerstrangs, der an eine zugrundeliegende Matrix hybridisiert, herzustellen, oder wenn man

LTBP-3-kodierende Sequenzen aus verwandten Spezies, funktionelle Äquivalente oder dergleichen zu isolieren sucht, werden natürlich weniger stringente Hybridisierungsbedingungen typischerweise erforderlich sein, um eine Bildung der Heteroduplex zu erlauben. Unter diesen Umständen kann man wünschen, Bedingungen einzusetzen, wie ungefähr 0,15 M bis 0,9 M Salz, bei Temperaturen, die von 20°C bis 55°C reichen. Kreuzhybridisierende Spezies können dadurch leicht als positiv hybridisierende Signale in bezug auf die Kontrollhybridisierungen identifiziert werden. Jedenfalls ist es allgemein anerkannt, daß Bedingungen stringenter gemacht werden können durch die Zugabe von ansteigenden Mengen an Formamid, das zum Destabilisieren der Hybridduplex auf die gleiche Weise dient wie erhöhte Temperatur. So können Hybridisierungsbedingungen leicht manipuliert werden und so wird im allgemeinen ein Verfahren der Wahl von den gewünschten Ergebnissen abhängig sein.

[0298] Bei bestimmten Ausführungsformen wird es vorteilhaft sein, erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen in Verbindung mit einem geeigneten Mittel, wie einer Markierung, zur Bestimmung der Hybridisierung einzusetzen. Eine große Vielzahl von geeigneten Indikatormitteln sind im Stand der Technik bekannt, einschließlich fluoreszenten, radioaktiven, enzymatischen oder anderen Liganden, wie Avidin/Biotin, die ein nachweisbares Signal ergeben können. In bevorzugten Ausführungsformen wird man wahrscheinlich eine fluoreszente Markierung oder eine Enzymmarkierung einzusetzen wünschen, wie Urease, Alkalische Phosphatase oder Peroxidase, anstatt radioaktiven oder anderen Reagenzien, die in Hinsicht auf die Umwelt unerwünscht sind. Im Fall von Enzymmarkierungen sind colorimetrische Indikatorsubstrate bekannt, die eingesetzt werden können, um Mittel bereitzustellen, die für das menschliche Auge oder spektrophotometrisch sichtbar sind, um eine spezifische Hybridisierung mit komplementären Nukleinsäure-enthaltenden Proben zu identifizieren.

[0299] Im allgemeinen stellt man sich vor, daß die hierin Hybridisierungssonden sowohl als Reagenzien bei der Hybridisierung als auch in Ausführungsformen unter Einsatz einer festen Phase nützlich sein werden. Bei Ausführungsformen, die eine Festphase beinhalten, wird die Test-DNA (oder RNA) adsorbiert oder auf eine andere Art an eine ausgewählte Matrix oder Oberfläche angehängt. Diese befestigte, einzelsträngige Nukleinsäure wird dann einer spezifischen Hybridisierung mit ausgewählten Sonden unter gewünschten Bedingungen unterworfen. Die ausgewählten Bedingungen werden von den besonderen Umständen abhängen, basierend auf den besonderen erforderlichen Kriterien (abhängig beispielsweise von dem G+C-Gehalt, der Art der Zielnukleinsäure, der Quelle der Nukleinsäure, der Größe der Hybridisierungssonde, etc.). Im Anschluß an das Waschen der hybridisierten Oberfläche zum Entfernen der unspezifisch gebundenen Sondenmoleküle, wird die spezifische Hybridisierung mit Hilfe der Markierung nachgewiesen oder sogar quantifiziert.

[0300] Die folgenden Beispiele sind enthalten, um bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung darzustellen. Es sollte durch den Fachmann anerkannt werden, daß die in den folgenden Beispielen offenbarten Verfahren Verfahren darstellen, von denen die Erfinder entdeckt haben, daß sie bei der Ausführung der Erfindung gut funktionieren, und somit betrachtet werden können, besondere Weisen zu ihrer Ausführung zu bilden. Jedoch sollte der Fachmann angesichts der vorliegenden Offenbarung anerkennen, daß viele Veränderungen bei den hierin offenbarten spezifischen Ausführungsformen vorgenommen werden können und dennoch ein gleiches oder ähnliches Ergebnis erhalten wird, ohne daß von dem Geist und dem Bereich der Erfindung abgewichen wird.

BLEISPIEL 1

TIERMODELL ZUM BEURTEILEN NEUER KNOCHENBILDUNG

[0301] Da verschiedene Tiermodelle zum Untersuchen der Wirkungen einer Nukleinsäureübertragung auf die Knochenbildung nicht geeignet sind, setzten die Erfinder das folgende Modellsystem ein. Die wichtigen Eigenschaften des Ratten-Osteotomie-Modells sind wie in dem folgenden Protokoll beschrieben (was im allgemeinen in 25-35 Minuten vollendet ist).

[0302] Die Osteotomie wurde an einem Oberschenkelknochen pro Tier durchgeführt. Unterschiede zwischen rechts und links sind nicht offensichtlich gewesen, aber derartige Unterschiede werden in diesen Studien verfolgt, da die die Osteotomie erhaltende Extremität randomisiert wird.

[0303] Nach der präoperativen Präparation (d.h. Rasieren und Bürsten mit Betadine®) wurden ausgewachsene männliche Sprague-Dawley-Ratten (~500 g, ehemalige männliche Züchter) unter Verwendung eines Gemischs aus 3% Halothan und 97% Sauerstoff betäubt (700 ml/min. Flußrate). Eine laterale Vorangehensweise an den Oberschenkelknochen wurde an einer Extremität durchgeführt. Unter Verwendung speziell gestalteter chirurgischer Führungen wurden vier Nägel mit einem Durchmesser von 1,2 mm nach einem Vorbohren mit

einem Hochgeschwindigkeits-Präzisionsbohrer in die Diaphyse geschraubt. Eine chirurgische Matrix sicherte das präzise und parallele Anbringen der Nägel. Die Ordnung der Nagelanordnung war immer die gleiche: außen proximal zuerst, dann außen distal, innen proximal und innen distal (wobei "außen" und "innen" den Abstand vom Hüftgelenk bezeichnen). Die Nagelanordnung in dem Zentrum des Oberschenkelknochens wurde durch fluoroskopisches Abbilden während des Anbringens der Nägel sichergestellt. Der externe Fixator wurde an den Nägeln befestigt und ein segmentaler Defekt von 1 mm oder 2 mm wurde in der zentralen Diaphyse durch einen Einschnitt unter Verwendung einer Hall Micro 100 oszillierenden Säge (#5053-60 Hall chirurgische Klingen) unter konstanter Ausspülung gebildet. Anders als die Größe des segmentalen Defekts gibt es keinen Unterschied zwischen den Osteotomie-Protokollen von 5 mm und 2 mm (**Fig. 5A**, **Fig. 5B**, **Fig. 6A**, **Fig. 6B**, **Fig. 6C**, **Fig. 6D**, **Fig. 7A**, **Fig. 7B**, **Fig. 8A**, **Fig. 8B**, **Fig. 8C**).

[0304] Die Inhalte der Osteotomiestellen wurden mit steriler Salzlösung ausgespült und das fibröse Collagen-Implantatmaterial, das gegebenenfalls zuvor in eine Lösung von Plasmid-DNA oder anderem DNA-Konstrukt eingetaucht wurde, wurde dann in situ eingebracht. Die Wunde wurde dann in Schichten verschlossen. Da der Fixator die notwendige Stabilität bereitstellte, bestanden keine Begrenzungen in bezug auf das Gehen des Tieres, und andere Stützen waren nicht erforderlich. Das chirurgische Protokoll ist bis heute bei 53 Tieren erfolgreich durchgeführt worden, einschließlich 35 Kontrollen (Tabelle 2 und **Fig. 24**). Keines dieser Tiere ist gestorben und es wurden keine signifikanten nachteiligen Wirkungen beobachtet, anders als Komplikationen, die mit der chirurgischen Bruchreparatur verbunden sein könnten. Kleinere auftretende Komplikationen schlossen ein Tier ein, das eine postoperative Osteomyelitis entwickelte und ein Tier, bei dem sich 2/4 Nägel als eine Folge eines postoperativen Knochenbruchs lockerten.

BEISPIEL II

IMPLANTATMATERIAL ZUR VERWENDUNG BEI DER KNOCHEN-GENÜBERTRAGUNG

[0305] Verschiedene Implantatmaterialien können zum Übertragen von Genen in die Stelle der Knochenreparatur und/oder -regeneration in vivo eingesetzt werden. Diese Materialien werden in eine Lösung eingetaucht, die die DNA oder das Gen enthält, das in die Stelle des erneuten Knochenwachstums zu überführen ist. Alternativ dazu kann als bevorzugtes Verfahren der Herstellung die DNA in die Matrix aufgenommen sein.

[0306] Ein besonderes Beispiel für ein geeignetes Material ist fibröses Collagen, das im Anschluß an eine Extraktion und teilweise Reinigung aus dem Gewebe lyophilisiert und dann sterilisiert werden kann. Ein besonders bevorzugtes Collagen ist das UltraFiber™ genannte fibröse Collagen-Implantatmaterial, wie es von der Norian Corp. (Mountain View, CA) erhalten werden kann. Ausführliche-Beschreibungen der Zusammensetzung und Verwendung von UltraFiber™ werden in Gunasekaran et al., 1993a, 1993b (jeweils hierin durch Bezugnahme aufgenommen) gegeben.

[0307] Ein besonders bevorzugtes Collagen ist Typ II-Collagen, wobei das am stärksten bevorzugte Collagen entweder rekombinantes Typ II-Collagen oder mineralisiertes Typ II-Collagen ist. Vor dem Einbringen in die Osteotomiestelle werden die Implantatmaterialien in Lösungen von DNA (oder Virus) unter sterilen Bedingungen eingetaucht. Das Eintauchen kann für jede geeignete und übliche Zeitdauer sein, z.B. von 6 Minuten bis über Nacht. Die DNA- (z.B. Plasmid-) Lösung wird eine sterile wäßrige Lösung sein, wie steriles Wasser oder ein verträglicher Puffer, wobei die Konzentration im allgemeinen ungefähr 0,5-0,1 mg/ml ist. Gegenwärtig bevorzugte Plasmide sind solche wie pGL2 (Promega), pSV40β-gal, pAd.CMVlacZ und pLJ.

BEISPIEL III

PARATHYROIDHORMON-GENKONSTRUKTE

[0308] Das aktive Fragment des menschlichen Parathyroidhormon-Gens (hPTH1-34) wurde als das erste der osteotropen Gene ausgewählt, die in einen Expressionsvektor zur Verwendung bei einer Genübertragung eingebaut werden, um neue Knochenbildung in dem Ratten-Osteotomie-Modell zu fördern.

[0309] Die Erfinder haben die Wahl getroffen, das hPTH1-34-Transgen in dem pLJ-Expressionsvektor (**Fig. 10**) zu konstruieren, da dieser Vektor für Studien der Funktion des Transgens sowohl in vitro als in vivo geeignet war. Ein Schema des pLJ-hPTH1-34-Transgens ist in **Fig. 10** gezeigt. Die DNA- und Aminosäuresequenzen von hPTH1-34 sind wohlbekannt, siehe z.B. Hendy et al., 1981, hierin durch Bezugnahme aufgenommen. Um das Transgen in den pLJ-Expressionsvektor zu insertieren, wurde PCR™ eines rekombinanten PTH-Klons mit voller Länge eingesetzt, gefolgt durch übliche molekularbiologische Manipulation.

[0310] Dann wurde ein retroviraler Vorrat gebildet, gefolgt von $CaPO_4$-vermittelter Transfektion von ϕ-Crip-Zellen mit dem pLJ-hPTH1-34-Konstrukt, alles gemäß Standardprotokollen (Sambrook et al., 1989). Unabhängig transduzierte Rat-1-Klone wurden durch Standardinfektions- und Selektions-Verfahren erhalten (Sambrook et al., 1989).

[0311] Ein Klon (YZ-15) wurde durch Southern-Analyse analysiert, die zeigte, daß das pLJ-hPTH1-34-Transgen stabil in das Rat-1-Genom integriert worden war (Fig. 11). Eine Northern-Analyse wurde als nächstes durchgeführt, um zu zeigen, daß der YZ-15-Klon das pLJ-hPTH1-34-Transgen exprimierte, wie durch das Auftreten von spezifischen pLJ-hPTH1-34-Transkripten bewiesen wurde (Fig. 12).

BEISPIEL IV

PARATHYROIDHORMON-POLYPEPTIDEXPRESSION UND -AKTIVITÄT

[0312] Ein sensitiver und spezifischer Radioimmunoassay wurde durchgeführt, um zu zeigen, daß die YZ-15-Zellen ein rekombinantes hPTH1-34-Molekül exprimierten und sekretierten (Tabelle 2). Der Radioimmunoassay wurde an Medien von transduzierten Rat-1-Klonen durchgeführt. Um die Sekretion des von den YZ-15-Zellen erzeugten rekombinanten hPTH-1-34-Peptids zu quantifizieren, wurde das Kulturmedium von einer konfluenten Schalte von 100 mm über einen Zeitraum von 24 Stunden gesammelt und mit dem NH_2-terminalen hPTH-RIA-Kit (Nichols Institute Diagnostics) gemäß dem Protokoll des Herstellers untersucht. PLJ-hPTH1-84-Zellen und BAG-Zellen dienten als Positiv- bzw. Negativ-Kontrollen.

[0313] Die Proteinkonzentrationen in Tabelle 2 sind als das Mittel von drei Assays plus die Standardabweichung (in Klammern) ausgedrückt. Die Konzentration des 1-34-Peptids und des Peptids mit Gesamtlänge (1-84) wurde relativ zu einer Standardkurve bestimmt, die mit im Handel erhältlichen Reagenzien gebildet wurde (Nichols Institute Diagnostics).

Tebelle 2

ZELLINIEN	PTH (pg/ml)
YZ-15	247 (± 38)
PLJ-hPTH1-84	2616 (± 372)
BAG	13 (± 3)

[0314] Wie in Tabelle 2. gezeigt, wurde die PTH-Expression sowohl in YZ-15-Zellen als auch PLJ-hPTH1-84-Zellen nachgewiesen. BAG-Zellen erzeugten kein nachweisbares PTH und dienten als Basislinie für den RIA. Diese Ergebnisse zeigen, daß YZ-15-Zellen das rekombinante hPTH1-34-Protein exprimierten.

[0315] Das rekombinante hPTH1-34-Molekül wurde zu Ratten-Osteosarcoma-Zellen zugegeben und ein cAMP-Reaktionsassay durchgeführt, um zu bestimmen, ob das sekretierte Molekül biologische Aktivität besaß. Unkonzentrierte Medien wurden von YZ-15-Zellen, PLJ-hPTH1-84-Zellen und BAG-Zellen gesammelt und verwendet, um ROS17/2.8-Zellen für 10 Minuten zu behandeln, wie beschrieben (Majmudar et al., 1991). cAMP wurde dann aus den behandelten Zellen extrahiert und durch RIA quantifiziert (Tabelle 3). Die gezeigte Menge an cAMP ist das Mittel von drei Assays. Die Standardabweichung vom Mittel wird in Klammer gezeigt.

Tabelle 3

ZELLINIEN	PTH (pmol)
YZ-15	20,3 (± 0,25)
PLJ-hPTH1-84	88,5 (± 4,50)
BAG	7,6 (± 0,30)

[0316] Eine cAMP-Antwort wurde durch das rekombinante PTH induziert, das durch die YZ-15-Zellen und durch PLJ-hPTH1-84-Zellen sekretiert wurde. BAG-Zellen erzeugten kein PTH und dienten als Basislinie für den cAMP-Assay. Diese Ergebnisse bieten den direkten in vitro-Beweis, daß das PLJ-hPTH1-34-Transgen die Expression und Sekretion eines funktionellen osteotropen Agens lenkt.

BEISPIEL V

BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-(BMP)-GENKONSTRUKTE

[0317] Das Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4) der Maus wurde als nächstes der osteotropen Gene für einen Einbau in einen Expressionsvektor zur Verwendung beim Fördern von Knochenreparatur und -regeneration ausgewählt.

[0318] Eine Maus-BMP-4-cDNA mit voller Länge wurde durch Durchmustern einer Maus-3T3-Zell-cDNA-Genbank (Stratagene) gebildet. Die menschliche Sequenz für BMP-4 ist dem Fachmann wohlbekannt und ist in der Genbank hinterlegt worden. Es wurden degenerierte Oligonukleotid-Primer hergestellt und in einer Standard-PCR™ eingesetzt, um eine Maus-cDNA-Sequenz zu erhalten.

[0319] Die Enden des cDNA-Klons wurden weiter modifiziert unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion, so daß die cDNA gesamter Länge (5'→3'-Richtung) das natürliche Maus-Initiator-Met-Codon, die vollständige Maus-kodierende Sequenz, eine neun Aminosäuren umfassende Markierung (bekannt als das HA-Epitop) und das natürliche Maus-Stopcodon kodiert. Die Aminosäuresequenz, die durch das Maus-BMP-4-Transgen kodiert wird, ist in Fig. 24 gezeigt; diese gesamte Sequenz einschließlich der Markierung wird durch SEQ ID NO:1 dargestellt.

[0320] Das Plazieren des HA-Epitops an dem extremen Carboxylende sollte nicht mit der Funktion der rekombinanten Molekülsequenz in vitro oder in vivo interferieren. Der Vorteil des Epitops ist es, bei Benutzung in immunhistochemischen Verfahren auf spezifische Weise das rekombinante Maus-BMP-4-Molekül in Osteotomiegeweben in vivo zu identifizieren, z.B. kann das Epitop unter Verwendung eines im Handel erhältlichen monoklonalen Antikörpers (Boehringer-Mannheim), wie hierin beschrieben wird, identifiziert werden.

[0321] Studien zum Nachweis, daß das Maus-BMP-4-Transgen für ein funktionelles osteotropes Agens kodiert, schließen beispielsweise ein: (a) Transfektion von COS-Zellen und Immunpräzipitation einer Proteinbande der richtigen Größe unter Verwendung eines monoklonalen Anti-HA-Antikörpers (Boehringer-Mannheim); und (b) einen quantitativen in vivo-Knocheninduktions-Bioassay (Sampath und Reddi, 1981), der das Implantieren von Proteinen aus dem Medium von transfizierten COS-Zellen unter die Haut von männlichen Ratten und das Auszählen auf neue Knochenbildung in dieser ektopischen Stelle/Region beinhaltet.

BEISPIEL VI

NACHWEIS VON mRNA DURCH GEWEBE-IN SITU-HYBRIDISIERUNG

[0322] Das folgende Verfahren beschreibt den Nachweis von mRNA in Gewebe, das aus der Region der Knochenregenerierung erhalten wurde. Dies kann zum Nachweis der Expression der Transgen-mRNA selbst nützlich sein und auch beim Nachweis der Expression von Hormon- oder Wachstumfaktor-Rezeptoren oder anderen Molekülen. Dieses Verfahren kann anstelle oder zusätzlich zu Northern-Analysen, wie denen in Fig. 13 beschriebenen, eingesetzt werden.

[0323] DNA von einem Plasmid, das das Gen, für welches die mRNA nachzuweisen ist, enthält, wird linearisiert, extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Sense- und Antisense-Transkripte werden von 1 mg Matrize mit T3- und T7-Polymerasen gebildet, z.B. in Gegenwart von [^{35}S]-UTP bei >6 mCi/ml (Amersham Corp., >1.200 Ci/mmol) und 1,6 U/ml RNasin (Promega), wobei die übrigen in vitro-Transkriptionsreagenzien in einem Kit bereitgestellt werden (SureSite, Novagen Inc.). Nach einer Transkription bei 37°C für 1 Stunde werden die DNA-Matrizen durch einen 15-minütigen Verdau bei 37°C mit 0,5 U/ml RNase-freier DNase I entfernt, extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Ribosonden werden hydrolysiert zu einer mittleren endgültigen Länge von 150 bp durch Inkubieren in 40 mM $NaHCO_3$, 60 mM Na_2CO_3, 80 mM DTT bei 60°C, gemäß der zuvor bestimmten Formel. Die Hydrolyse wird durch Zugabe von Natriumacetat, pH 6,0, und Eisessigsäure auf 0,09 M bzw. 0,005% (v/v) beendet, und die Sonden werden dann Ethanol-präzipitiert, in 0,1 M DTT gelöst, gezählt und bei –20°C bis zur Verwendung gelagert.

[0324] RNase-Vorkehrungen werden bei allen Stufen der Objektträger-Herstellung getroffen. Bouins-fixierte, Paraffin-eingebettete Gewebeschnitte werden auf 65°C für 10 Minuten erhitzt, deparaffinisiert in 3 Austauschen von Xylen für 5 Minuten, und rehydriert in einer absteigenden Ethanolreihe, endend in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS). Die Objektträger werden in 0,2 N HCl für 5 min. eingetaucht, in PBS gespült, mit 0,0002% Proteinase K in PBS für 30 Minuten bei 37°C verdaut, und kurz mit DEPC-behandeltem Wasser gespült. Nach einem Equilibrieren für 3 Minuten in 0,1 M Triethanolamin-HCl (TEA-HCl), pH 8,0, werden die Schnitte in 0,25% (v/v) Essigsäureanhydrid in 0,1 M TEA-HCl für 10 Minuten bei Raumtemperatur acetyliert, in PBS gespült und in einer ansteigenden Ethanolreihe dehydratisiert. Jeder Schnitt enthält 100-200 ml Prähybridisierungslösung (0,5 mg/ml denaturierte RNase-freie tRNA (Boehringer-Mannheim), 10 mM DTT, 5 mg/ml denaturierte, sulfurylierte Lachssperma-DNA, 50% Formamid, 10% Dextransulfat, 300 mM NaCl, 1x RNase-freie Denhardt's Lösung (hergestellt mit RNase-freiem Rinderserumalbumin, Sigma), 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA), und wird dann auf einem 50°C warmen Objektträgerwärmer in einer befeuchteten Umhüllung für 2 Stunden inkubiert. Das Blocking-Reagens aus sulfurylierter Lachssperma-DNA wird sowohl in Prähybridisierungs- als auch Hybridisierungs-Lösungen eingesetzt, um das unspezifische Binden von ^{35}SH-Gruppen an der Sonde an Gewebe verringern zu helfen. Es wird hergestellt durch Markieren von RNase-freier Lachssperma-DNA (Sigma) mit nicht radioaktivem α-Thio-dCTP und α-Thio-dATP (Amersham) in einer Standard-Zufalls-Oligonukleotid-geprimten DNA-Markierungsreaktion. Überschüssige Prähybridisierungslösung wird durch ein kurzes Waschen in 4 × SSC vor Aufbringen der Sonde entfernt.

[0325] Ribosonden, frische tRNA und sulfurylierte Lachssperma-DNA werden für 10 Minuten bei 70°C denaturisiert und auf Eis gekühlt werden. Hybridisierungslösung, identisch mit der Prähybridisierungslösung mit Ausnahme der denaturierten Sonde, die auf 5 × 10^6 CPM/ml zugesetzt wurde, wird aufgebracht und die Objektträger werden bei 50°C in verschlossenen feuchten Kammern auf einem Objektträgerwärmer inkubiert. Sense- und Antisense-Sonden werden auf die Serienschnitte aufgebracht. Die Objektträger werden dreimal in 4 × SSC gespült, mit 2 × SSC, 1 mM DTT für 30 min. bei 50°C gewaschen, mit RNase A (20 mg/ml RNase A, 0,5 M NaCl, 10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0) für 30 min. bei 37°C verdaut und kurz mit 2 × SSC, 1 mM DTT gespült. Drei zusätzliche Waschschritte werden durchgeführt, jeder bei 50°C für 30 Minuten: einmal in 2 × SSC, 50% Formamid, 1 mM DTT und zweimal in 1 × SSC, 0,13% (w/v) Natriumpyrophosphat, 1 mM DTT.

[0326] Die Objektträger werden in einer ansteigenden Ethanolreihe dehydratisiert (mit Ergänzung von verdünntem Ethanol (50% und 70% mit SSC und DTT auf 0,1x bzw. 1 mM). Die Objektträger werden für 20-60 Stunden einem Röntgenfilm zum Sichtbarmachen der gesamten Hybridisierungsmuster ausgesetzt, in eine autoradiographische Emulsion (Kodak NTB-2, verdünnt auf 50% mit 0,3 M Ammoniumacetat) getaucht, langsam für 2 Stunden getrocknet und für Zeiträume, die von 8 Tagen bis 8 Wochen reichen, exponiert (4°C). Nach dem Entwickeln der Emulsion werden die Schnitte gegengefärbt mit Hämatoxylin und Eosin, dehydratisiert und mit Xylen-basiertem Medium aufgezogen. Das Hybridisierungssignal wird unter Dunkelfeld-Mikroskopie sichtbar gemacht.

[0327] Das vorangehende in situ-Hybridisierungsprotokoll kann zum Beispiel beim Nachweisen der zeitlichen und räumlichen Muster der PTH/PTHrP-Rezeptorexpression eingesetzt werden. Eine geeignete Ratten-PTH/PTHrP-Rezeptor-cDNA-Sonde (R15B) ist eine, die aus einer 1810 bp umfassenden Region besteht, die den vollständigen Ratten-Knochen-PTH/PTHrP-Rezeptor kodiert (Abou-Samra et al., 1992). Das cDNA-Fragment wird in pcDNA 1 (Invitrogen Corp., San Diego; CA) subkloniert und wird unter Verwendung von XbaI und BamHI ausgeschnitten. Diese Sonde. stellt positive Signale für Northern-Blot-Analysen von osteoblastischen Zellinien der Ratte, der Maus und des Menschen, primären Schädeldeckenzellen der Ratte, und Maus-Knochengewebe bereit. Das pcDNA 1-Plasmid enthält einen T7- und SP6-Promoter, der die Bildung von cRNA-Sonden für eine in situ-Hybridisierung erleichtert. Das vollständige Transkript ist eingesetzt worden, um den PTH/PTHrP-Rezeptor in Knochenschnitten nachzuweisen (Lee et al., 1994). Die PTHrP-cDNA-Sonde (Ya-

suda et al., 1989) ist ein 400 bp umfassendes subkloniertes Fragment in pBluescript (Stratagene). Diese Sonde ist für in situ-Hybridisierung eingesetzt worden, wobei sie eine Antisense-cRNA-Sonde unter Einsatz einer BamHI-Spaltung und des T3-Primers, und eine Sense-cRNA-Sonde unter Verwendung einer EcoRI-Spaltung und des T7-Primers bildet.

BEISPIEL VII

IN VIVO-PROTEINNACHWEIS NACH TRANSGEN-EXPRESSION

1. β-Galactosidase-Transgen

[0328] Die bakterielle β-Galactosidase kann immunhistochemisch nachgewiesen werden. Osteotomie-Gewebeproben werden in Bouins' Fixiermittel fixiert, demineralisiert und dann entlang der Längsfläche in zwei Teile gespalten. Eine Hälfte jeder Probe wird für eine anschließende immunhistochemische Identifizierung des bakteriellen β-Galactosidase-Proteins in Paraffin eingebettet.

[0329] Für die Immunhistochemie wurden Querschnitte (2-3 mm dick) auf poly-L-Lysinbeschichtete Mikroskopobjektträger übertragen und bei 0°C für mindestens 20 min. in Aceton fixiert. Die Schnitte wurden in PBS rehydratisiert. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde durch Eintauchen der Gewebeschnitte in 0,1% Wasserstoffperoxid (in 95% Methanol) für 10 min. bei Raumtemperatur gequenscht, und die gequenschten Schnitte wurden 3x in PBS gewaschen. In einigen Fällen wurden geschnittene Schädeldecken durch Eintauchen in 4% EDTA, 5% Polyvinylpyrrolidon und 7% Sucrose, pH 7,4, für 24 h bei 4°C demineralisiert. Die demineralisierten Schnitte wurden vor dem Anwenden für Antikörper 3x gewaschen. Primäre Antikörper wurden ohne Verdünnung in Form von Hybridomüberstand verwendet. Gereinigte Antikörper wurden bei einer Konzentration von 5 mg/ml auf Gewebeschnitte aufgebracht. Primäre Antikörper wurden mit biotinyliertem Kaninchen-Anti-Maus-IgG und Peroxidase-konjugiertem Strepavidin (Zymed Histostain-SPkit) nachgewiesen. Nach der Peroxidase-Anfärbung wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt.

[0330] Bakterielle β-Gal kann ebenfalls durch Substrat-Verwendungsassays nachgewiesen werden. Dies wird unter Verwendung im Handel erhältlicher Kits (z.B. Promega) gemäß den Instruktionen des Herstellers durchgeführt.

2. Luciferase-Transgen

[0331] Die Luziferase kann durch Substrat-Verwendungsassays nachgewiesen werden. Dies wird unter Verwendung im Handel erhältlicher Kits (z.B. Promega) gemäß den Instruktionen des Herstellers durchgeführt.

3. PTH-Transgene

[0332] Rekombinantes PTH, wie das hPTH1-34-Peptid wird in Homogenaten von Osteotomiespaltgewebe mittels eines Assays untersucht, zum Beispiel unter Verwendung von zwei im Handel erhältlichen Radioimmunoassay-Kits gemäß den Protokollen des Herstellers (Nichols Institute Diagnostics, San Juan, Capistrano, CA).

[0333] Ein Kit ist der Intakt PTH-Parathyroid Hormon 100T-Kit. Dieser Radioimmunoassays verwendet einen Antikörper gegen das Carboxylende des intakten Hormons und wird auf diese Weise verwendet, um die endogenen Hormonspiegel in Osteotomiespaltgewebe zu messen. Dieser Assay kann eingesetzt werden, um in dem Ratten-Osteotomie-Modell einen Basislinienwert für die PTH-Expression zu ermitteln.

[0334] Der zweite Kit ist ein Zwei-Stellen-immunoradiometrischer Kit für die Messung von Ratten-PTH. Dieser Kit benutzt affinitätsgereinigte Antikörper, die für das aminoterminale Ende des intakten Rattenhormons (PTH1-34) spezifisch sind und wird somit die Erzeugung von endogenem PTH sowie des rekombinanten Proteins messen. Vorangehende Studien haben gezeigt, daß diese Antikörper mit menschlichem PTH kreuzreagieren und somit in der Lage sind, rekombinante Moleküle in vivo zu erkennen.

[0335] Die Werte, die mit Kit #1 (Antikörper gegen das Carboxylende) erhalten wurden, wurden von den Werten, die mit Kit #2 (Antikörper gegen das aminoterminale Ende) erhalten wurden, subtrahiert, um genaue und sensitive Messungen zu erhalten. Der Spiegel an rekombinantem Peptid wird so mit dem Grad der neuen Knochenbildung korreliert.

4. BMP-Transgen

[0336] Vorzugsweise werden BMP-Proteine wie das Maus-BMP-4-Transgen-Peptidprodukt immunhistochemisch unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen, der das HA-Epitop erkennt (Majmudar et al. 1991), wie der von Boehringer-Mannheim erhältliche monoklonale Antikörper. Antikörper gegen BMP-Proteine selbst können ebenfalls eingesetzt werden. Derartige Antikörper sowie verschiedene Immunoassay-Verfahren werden in US-Patent 4,857,456 beschrieben, das hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird.

[0337] Osteotomie-Gewebeproben werden in Bouins' Fixiermittel fixiert, demineralisiert und dann entlang der Längsfläche in zwei Teile gespalten. Die eine Hälfte der Probe wird für eine anschließende immunhistochemische Identifizierung des rekombinanten Maus-BMP-4-Moleküls in Paraffin eingebettet.

BEISPIEL VIII

DIREKTE GENÜBERTRAGUNG IN REGENERIERENDEN KNOCHEN IN VIVO

[0338] Um die Machbarkeit einer direkten Genübertragung in regenerierenden Knochen in vivo zu beurteilen, wurde eine Markergenübertragung in Zellen in dem Ratten-Osteotomie-Modell eingesetzt. Diese Studien beinhalten zwei Markergene: Bakterielle β-Galactosidase und Insektenluziferase.

[0339] Aliquots eines fibrösen Collagen-Implantatmaterials wurden in Lösungen von reiner Markergen-DNA eingetaucht. Die Implantatmaterialien wurden dann in die Osteotomiestelle eingebracht und ihre Expression, wie vorstehend beschrieben, bestimmt.

[0340] Es wurde festgestellt, daß beide Markergene ohne irgendwelche Fehler übertragen und exprimiert wurden, wie durch Substratverwendungsassays gezeigt wurde (**Fig. 5A**, **Fig. 5B**, **Fig. 6A**, **Fig. 6B**, **Fig. 6C** und **Fig. 6D**). Da Säugetierzellen normalerweise nicht eines dieser Markergenprodukte synthetisieren, bietet dies den direkten Nachweis, daß Osteotomie-Reparaturzellen in vivo transfiziert wurden und dann die β-Galactosidase- und Luziferase-Transgene als funktionelle Enzyme exprimierten.

BEISPIEL IX

ADENOVIRALE GENÜBERTRAGUNG IN REGENERIERENDEN KNOCHEN IN VIVO

[0341] Eines der alternativen Verfahren, um in vivo eine Genübertragung in regenerierenden Knochen zu erzielen, ist es, ein Adenovirus-vermitteltes Übertragungsereignis einzusetzen. Eine erfolgreiche adenovirale Genübertragung eines Markergenkonstrukts in Knochenreparaturzellen in dem Ratten-Osteotomie-Modell ist erzielt worden (**Fig. 23A**, **Fig. 23B** und **Fig. 23C**).

[0342] Die Erfinder benutzten den adenoviralen Vektor pAd.CMVlacZ, der ein Beispiel eines replikationsdefekten adenoviralen Vektors ist, der in permissiven Zellen repliziert werden kann (Stratford-Perricaudet et al., 1992). In pAd.CMVlacZ wird der frühe Enhancer/Promoter des Cytomegalovirus (CMV) zum Treiben der Transkription von lacZ mit einer SV40-Polyadenylierungssequenz verwendet, die stromabwärts von diesem Reporter kloniert ist (Davidson et al., 1993).

[0343] Der Vektor pAd.RSV4 wird ebenfalls von den Erfindern eingesetzt. Dieser Vektor besitzt im wesentlichen das gleiche Rückgrat wie pAd.CMVlacZ, jedoch sind der CMV-Promoter und die einzelne BglII-Klonierungsstelle auf eine kassettenartige Weise mit einem BglII-Fragment ersetzt worden, das aus einem RSV-Promoter, einer Mehrfach-Klonierungsstelle und einer poly(A^+)-Stelle besteht. Es wird erwartet, daß die größere Flexibilität dieses Vektors bei dem Subklonieren von osteotropen Genen, wie dem hPTH1-34-cDNA-Fragment zur Verwendung in weiteren Studien nützlich ist.

[0344] Um rekombinanten PTH-Adenovirus zu erzeugen, wird eine Schale von 100 mm von 293-Zellen transfiziert unter Verwendung von Calciumphosphat mit 20 mg eines Plasmidkonstrukts, z.B. dem das hPTH1-34-Insert, linearisiert mit NheI, enthaltenden Plasmid, plus 2 mg Wildtyp-Adenovirus-DNA, die mit XbaI und ClaI verdaut wurde. Die Adenovirus-DNA stammt vom Adenovirus-Typ 5, der nur eine einzelne XbaI- und ClaI-Schnittstelle enthält und eine teilweise Deletion der E3-Region besitzt. Annäherungsweise 7 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen und Medien geerntet und ein Lysat durch wiederholte Einfrier-Auftau-Zyklen hergestellt. Dieses Lysat wird verdünnt und eingesetzt, um 60 mm Schalen von konfluenten 293-Zellen für 1 Stunde zu

infizieren. Die Zellen werden dann überschichtet mit 0,8% Agar/1x MEM/2% Kalbserum/12,5 mM $MgCl_2$. Zehn Tage nach der Infektion werden einzelne Plaques gepickt und eingesetzt, um 60 mm Schalen von 293-Zellen zu infizieren, um die Virusmenge auszudehnen. Positive Plaques werden für die weitere Reinigung und Bildung von adenoviralen Vorräten selektiert.

[0345] Um rekombinanten Adenovirus zu reinigen, werden 150 mm-Schalen von 75-90% konfluenten 293-Zellen mit 2-5 PFU/Zelle infiziert, ein Titer, der potentielle cytotoxische Wirkungen von Adenovirus vermeidet. Dreißig Stunden nach der Infektion werden die Zellen gespült, von den Schalen entfernt, pellettiert und in 10 mM Tris-HCl, pH 8,1, resuspendiert. Ein virales Lysat wird durch drei Einfrier-Auftau-Zyklen hergestellt, die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation für 10 min. bei 2.000 Upm entfernt und der Adenovirus wird durch Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt. Die Adenovirusbande wird bei –20°C in sterilem Glycerin-BSA bis zum Bedarf gelagert.

[0346] Die Lösung von Viruspartikeln wurde sterilisiert und mit dem Implantatmaterial inkubiert (von 6 min. bis über Nacht), und das Virus-imprägnierte Material wurde in den Osteotomiespalt implantiert, wo eine virale Infektion von Zellen klar stattfand. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen deutlich die ausgezeichnete Spezifität des Anti-β-Gal-Antikörpers (Sambrook et al., 1989), und zeigten schlüssig die Expression des Markergenprodukts in Chondrocyten-artigen Zellen des Osteotomiespalts. Das Signal mit dem Kern als Ziel ist ebenfalls in Präosteoblasten beobachtet worden.

BEISPIEL X

DIE ÜBERTRAGUNG EINES OSTEOTROPEN GENS STIMULIERT DIE KNOCHENREGENERATION-/REPARATUR IN VIVO

[0347] Damit ein Parathyroidhormen (PTH)-Transgen als ein osteotropes Agens wirken kann, ist es wahrscheinlich, daß es das Erfordernis gibt, daß der PTH/PTHrP-Rezeptor in dem Knochenreparaturgewebe selbst exprimiert wird. Deshalb untersuchten die Erfinder die PTH/PTHrP-Rezeptorexpression in dem Ratten-Osteotomie-Modell.

[0348] Eine Northern-Analyse von poly-(A^+)-RNA wurde durchgeführt, die zeigte, daß der PTH/PTHrP-Rezeptor in dem Osteotomie-Reparturgewebe exprimiert wurde (**Fig. 13**).

[0349] Die Erfinder untersuchten als nächstes, ob eine Genübertragung eingesetzt werden konnte, um transfizierte Zellen zu bilden, die auf konstitutive Weise rekombinanten hPTH1-34 in vivo exprimieren, und ob dieses Transgen die Knochenbildung stimulieren kann. Die Rate der neuen Knochenbildung wird wie folgt analysiert. Eine Autopsie der Osteotomiestelle wird vorsichtig für eine histomorphometrische Analyse präpariert. Die A-P- und M-L-Dimensionen des Kallusgewebes werden unter Verwendung von Schienen gemessen. Die Proben werden dann in Bouins' Fixiermittel durch Eintauchen fixiert, in Ethanol gewaschen und in gepufferter Ameisensäure demineralisiert. Ein Einbetten der entkalkten Materialien in Kunststoff wird dann eingesetzt aufgrund der überlegenen Dimensionsstabilität von Methacrylat während der Herstellung und dem Schneiden von Proben.

[0350] Gewerbeblöcke werden in ansteigenden Alkoholkonzentrationen entwässert und eingebettet. 5 mm dicke Schnitte werden unter Verwendung eines Reichert-Polycut-Mikrotoms in der koronalen Ebene geschnitten. Schnitte werden hergestellt von der Mitte bis zu der Weite der Markhöhle, um sich gegen eine Neigung bei der Probennahme zu schützen. Die Schnitte für die Lichtmikroskopie werden unter Verwendung eines modifizierten Goldner's Trichrom-Farbstoffs angefärbt, um Knochen-, Osteoid-, Knorpel- und fibröses Gewebe zu differenzieren. Die Schnitte werden unter Verwendung von Eukitt's Mounting Medium (Calibrated Instruments, Ardsley, NY) eingedeckelt. Histomorphometrische Analysen werden unter Hellfeld eines Nikon Optiphot Research-Mikroskops durchgeführt. Es werden Standard-Punktzahl-Stereologie-Verfahren unter Verwendung eines Gitternetz-Okulars von 10 mm × 10 mm verwendet.

[0351] Die gesamte Kallusfläche wird bei 125-facher Vergrößerung als ein Index der Gesamtintensität der Heilungsreaktion gemessen. Flächenschnitte von Knochen-, Knorpel- und fibrösem Gewebe werden bei 250-facher Vergrößerung gemessen, um die relative Verteilung jeden Gewebes zu der Kallusbildung zu untersuchen. Da die Dimensionen des Osteotomiespalts die Grundlinie (Zeit 0) wiederspiegelt, wird eine Messung der Knochenfläche bei anschließenden Zeitintervallen eingesetzt, um die Rate des Knochenauffüllens anzuzeigen. Die statistische Signifikanz wird unter Einsatz von Varianzanalyse beurteilt, wobei post-hoc-Vergleiche zwischen Gruppen unter Verwendung von Tukey's Studentized Range t-Test durchgeführt wurde.

[0352] In dem vorangehend beschriebenen 5 mm-Ratten-Osteotomie-Modell wurde festgestellt, daß die Expression des PTH-Transgens die Knochenregeneration/-reparatur in lebenden Tieren stimulieren kann (Fig. 6A, Fig. 6B, Fig. 6C und Fig. 6D). Dies ist ein besonders wichtiger Befund, da bekannt ist, daß das hPTH1-34 ein stärkeres anabolisches Agens ist, wenn es periodisch, im Gegensatz zu andauernd, verabreicht wird, und es die Zufuhr der andauernden Art ist, die aus den hierin angewendeten Genübertragungsverfahren resultiert.

[0353] Obwohl die Erfinder der vorliegenden Erfindung bereits den Erfolg der direkten Genübertragung in regenerierenden Knochen in vivo gezeigt haben, wird die Verwendung von ex vivo-Behandlungsprotokollen ebenfalls in Erwägung gezogen. In derartigen Ausführungsformen würden die Knochenvorläuferzellen von einem bestimmten Tier oder menschlichen Subjekt isoliert werden und in einer in vitro-Umgebung gehalten werden. Geeignete Flächen des Körpers, von denen Knochenvorläuferzellen zu erhalten sind, sind Flächen wie das Knochengewebe und die einen Bruch oder anderen skelettalen Defekt umgebenden Flüssigkeiten (unabhängig davon, ob dies eine künstlich erzeugte Stelle ist) und das Knochenmark. Die isolierten Zellen würden dann mit der DNA- (oder rekombinanten viralen) Zusammensetzung kontaktiert, mit oder vorzugsweise ohne eine Matrix, wenn die Zellen die DNA aufnehmen würden (oder durch den rekombinanten Virus infiziert werden). Die stimulierten Zellen würden dann an die Stelle in dem Tier oder Patienten zurückgeführt, wo die Knochenreparatur zu stimulieren ist.

BEISPIEL XI

ÜBERTRAGUNG VON GENEN AUF DIE ACHILLES-FERSE UND DIE KREUZBÄNDER IN VIVO

[0354] Die vorangehend beschriebenen Studien beim regenerierenden Knochen ergänzen andere von den Erfindern durchgeführte, bei denen eine Genübertragung erfolgreich eingesetzt wurde, um Gene in die Achillessehne (Fig. 3A, Fig. 3B, Fig. 3C, Fig. 3D und Fig. 3E) und das Kreuzband (Fig. 4) einzuführen.

[0355] Die Achillessehne besteht aus Zellen und extrazellulärer Matrix, die in einer charakteristischen Gewebearchitektur organisiert ist. Die Verletzung des Gewebes kann diese Architektur zerstören und eine Wundheilungsreaktion stimulieren. Die verwundete Sehne wird regenerieren, im Gegensatz zum Vernarben, wenn ihre Bindegewebselemente annähernd intakt bleiben. Die Regeneration ist vorteilhaft, weil Narbengewebe nicht optimal ausgestaltet ist, um die normale mechanische Funktion zu unterstützen. Segmentale Defekte in der Sehne infolge einer traumatischen Verletzung können mit biologischen oder synthetischen Implantaten behandelt werden, die eine Neo-Sehnenbildung unterstützen. Diese Strategie ist jedoch durch die Verfügbarkeit von wirksamen (autologen) biologischen Transplantaten, die Langzeitstabilität und die Verträglichkeit von synthetischen Prothesen und die langsame Einbaurate, die oft bei beiden Implantatarten beobachtet wird, begrenzt.

[0356] Die Erfinder stellen die Hypothese auf, daß die Wirksamkeit von biologischen Transplantaten durch die Überexpression von Molekülen verstärkt werden kann, die die Gewebe-Regenerationsantwort regulieren. Dahingehend haben sie ein Modellsystem entwickelt, bei dem segmentale Defekte in der Achillessehne gebildet werden und ein neues Biomaterial als ein Sehnen-Implantat/Molekularzufuhr-Agens verwendet wird. In dem vorliegenden Beispiel wird die Fähigkeit zum Zuführen und Exprimieren von Markergen-Konstrukten in regenerierendes Sehnengewebe gezeigt.

[0357] Es wurden Plasmid-(pSVβgal, Promega) Stocklösungen gemäß Standardprotokollen hergestellt (Sambrook et al., 1989). SIS-Transplantatmaterial wurde aus einem Segment des Jejunums adulter Schweine hergestellt (Badylak et al., 1989). Bei der Ernte wurden mesenterische Gewebe entfernt, das Segment invertiert und die Mucosa und oberflächliche Submucosa durch ein mechanisches Abrasionsverfahren entfernt. Nach dem Zurückführen des Segments in seine ursprüngliche Orientierung wurden die Serosa- und Muskelschichten gespült, durch Behandlung mit verdünnter Peressigsäure sterilisiert und bei 4°C bis zur Verwendung gelagert.

[0358] Bastard-Hunde (alle Studien) wurden betäubt, intubiert, in eine rechtslaterale liegende Stellung auf einem Heizkissen gebracht, und mit inhalierendem Betäubungsmittel gehalten. Ein lateraler Einschnitt von der Muskel-Sehnenverbindung bis zu der Fußsohlen-Fascie wurde eingesetzt, um die Achillessehne zu exponieren. Ein SIS-Blatt doppelter Dicke wurde um den zentralen Teil der Sehne gewickelt, beide Enden wurden vernäht, ein 1,5 cm großes Segment der Sehne wurde durch eine laterale Öffnung in dem Implantatmaterial entfernt und das Implantat und die chirurgische Stelle wurden geschlossen. Das Bein wurde für 6 Wochen ruhig gestellt und dann frei für 6 Wochen verwendet. Implantatgewebe wurde zu den unten angegebenen Zeitpunkten geerntet, in Bouins' Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Gewebeschnitte (8 µm) wurden geschnitten

und für die Immunhistochemie eingesetzt.

[0359] In einer anfänglichen Studie wurde SIS-Material allein (SIS-Allein-Transplantat) transplantiert und förderte die Regeneration der Achillessehne im Anschluß an die Bildung eines segmentalen Defekts in den Bastardhunden, solange wie 6 Monate nach dem chirurgischen Eingriff Der Umbauprozeß beinhaltete die schnelle Bildung von Granulationsgewebe und schließlich den Abbau des Transplantats. Narbengewebe bildete sich nicht und ein Hinweis auf eine immunvermittelte Abstoßung wurde nicht beobachtet.

[0360] Bei einer zweiten Studie wurde SIS in eine Plasmid-DNA-Lösung (SIS + Plasmid-Transplantat) eingetaucht und anschließend als ein Achillessehnen-Transplantat (n=2 Hunde) oder ein Kreuzband-Transplantat (n=2 Hunde) in normale Bastardhunde implantiert. Ein pSVβ-gal-Plasmid, das die regulatorischen Sequenzen des Affenvirus 40 benutzt, um die β-Galactosidase (β-Gal)-Aktivität anzutreiben, war durch Immunhistochemie unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers in 4/4 Tieren nachweisbar. Als eine Negativkontrolle wurde eine β-Gal-Aktivität nicht in der unoperierten Achillessehne und dem Kreuzband dieser Tiere nachgewiesen. Es schien deshalb, daß SIS die Aufnahme und anschließende Expression von Plasmid-DNA durch die Wundheilungszellen in sowohl Sehne wie Kreuzband erleichterte.

[0361] Eine dritte Studie wurde gestaltet, um den Zeitverlauf der β-Gal-Transgen-Expression zu beurteilen. SIS + Plasmid-Transplantate wurden für 3, 6, 9 und 12 Wochen implantiert (n=2 Hunde pro Zeitpunkt) und die Transgen-Expression wurde durch Immunhistochemie und durch in situ-Hybridisierung untersucht. Querschnitte (8 µm) von Bouins-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe wurden geschnitten und auf ProbeOn Plus-Objektträger (Fisher) aufgezogen. Immunhistochemie wurde gemäß dem mit dem Histostain-SP-Kit (Zymed) gelieferten Protokoll durchgeführt. Kurz gesagt, wurden Objektträger mit einem gut charakterisierten Anti-β-Galactosidase-Antikörper inkubiert (1:200)-Verdünnung, 5'→3'), in PBS gewaschen, mit einem biotinylierten zweiten Antikörper inkubiert, gewaschen, mit dem Enzymkonjugat plus einem Substrat-Chromogen-Gemisch gefärbt und dann gegengefärbt mit Hämatoxylin und Eosin.

[0362] Die bakterielle β-Gal-Aktivität wurde in Sehnen nachgewiesen, die das SIS+Plasmid-Transplantat erhielten (8/8 Tiere). Obwohl dies nicht streng quantitativ ist, schien die Transgen-Expression bei 9-12 Wochen einen Höhepunkt zu erreichen. Die bakterielle β-Gal-Genexpression wurde nicht in Tieren nachgewiesen, die SIS-Allein-Transplantate erhielten (n=2, 3 Wochen und 12 Wochen). Wiederum formte sich kein Narbengewebe und ein Hinweis auf eine immunvermittelte Abstoßung wurde nicht beobachtet.

[0363] Diese Studie zeigte, daß das mucosale Biomaterial SIS als ein autologes Transplantat wirken kann, das die Regeneration von Geweben, wie der Achillessehne und dem vorderen Kreuzband fördert. SIS kann ebenfalls verwendet werden, um ein Markergenkonstrukt dem regenerierenden Gewebe zuzuführen.

BEISPIEL XIII

MECHANISCHE EIGENSCHAFTEN DER NEUEN KNOCHENBILDUNG

[0364] Die mechanischen Eigenschaften des während der Genübertragung gebildeten neuen Knochens können gemessen werden unter Verwendung von z.B. Gesamtknochen-Torsionstests, die einen Spannungszustand erzeugen, bei dem maximale Zugspannung auftreten wird in Ebenen, die schräg/schief zu der Längsachse des Knochen liegen. Derartige Tests stellen wichtige Interferenzen über die mechanische Anisotropie von Kallusgewebe und dem Grad an Knochenintegration von neuem Knochengewebe bereit. Diese Tests sind insbesondere vorteilhaft bei der Bewertung von Bruchproben, z.B. der unregelmäßigen Form von Kallusgewebe, die typischerweise die Anwendung von Gesamtknochen-4-Punkt-Biegetests ausschließt, weil es unmöglich ist, die Punkte von Probe zu Probe reproduzierbar auszurichten.

[0365] Oberschenkelknochen wurden auf einer MTS Servohydraulik Testing-Machine getestet, während sie feucht und bei Raumtemperatur waren. Ein Drehmomentsensor und ein rotationsvariabler Verdrängungsmeßwandler stellen Daten für Drehmomentwinkel-Verdrängungskurven bereit. Speziell ausgestaltete Fixiervorrichtungen stützen jeden Knochen nahe der metaphysialen-diaphysialen Verbindungen, und bringen eine 2-Punkt-Belastung auf die Diaphyse auf. Tests werden bei einer konstanten Verdrängungsrate, die gleich 20°/s ist, durchgeführt. Eine 250 Inch-Unze-Belastungszelle mißt die insgesamt aufgebrachte Kraft. Alle Knochen werden getestet, während sie feucht und bei Raumtemperatur sind. Drehmoment- und Winkelverdrängungsdaten werden erhalten unter Verwendung eines A/D-Wandlers und einem Macintosh-Computer und Software. Aus diesen Daten werden die folgenden Variablen berechnet: a) maximales Drehmoment, b) Torsionssteifigkeit, die Neigung des Anteils vor der Torsionsgrenze der Kurve, die aus einer linearen Regression der Daten

bestimmt wird, c) die Energie bis zum Bruch, die Fläche unter der Drehmoment-Winkelabweichungs-Kurve bis zum Bruch und d) dem Winkelabweichungsverhältnis, dem Verhältnis der Abweichung beim Bruch zu der Abweichung der Torsionsgrenze. Die statistische Signifikanz wird durch Varianzanalyse, gefolgt von mehreren Vergleichen mit geeigneten Berichtigungen bestimmt (z.B., Bonferroni).

[0366] Diese Erfindung stellt ebenfalls ein Mittel zum Anwenden der Osteotrapen-Genübertragung in Verbindung mit der rekonstruktiven Chirurgie und verschiedenen Verfahren zum Knochenumbau bereit. Die hierin beschriebenen Verfahren können somit in Verbindung mit der Technologie, die von Yasko et al., 1992; Chen et al., 1991 und Beck et al., 1991, die jeweils hierin durch Bezugnahme aufgenommen werden, beschrieben wurde, eingesetzt werden.

BEISPIEL XIV

TYPE II-COLLAGEN FÖRDERT NEUES KNOCHENWACHSTUM

[0367] Bestimmte Matrixmaterialien sind in der Lage, von sich aus mindestens etwas neues Wachstum zu stimulieren, d.h. sie sind "osteokonduktive Materialien". Mögliche Beispiele derartiger Materialien sind in dem Gebiet der orthopädischen Forschung wohlbekannt und schließen Zubereitungen von Hydroxylapatit; Zubereitungen von zermahlenem Knochen und mineralisiertem Collagen; PLGA-Blockcopolymere und Polyanhydride ein. Die Fähigkeit dieser Materialien, neue Knochenbildung zu stimulieren, unterscheidet sie von inerten Implantatmaterialien, wie Methylcellulose, die in der Vergangenheit eingesetzt worden sind, um BMPs an Stellen der Bruchtemperatur zu liefern.

[0368] Dieses Beispiel betrifft eine Studie unter Verwendung des Ratten-Osteotomie-Modells mit Implantaten, die aus Collagen Typ I (Sigma), Collagen Typ II (Sigma) und UltraFiber™ (Norian Corp.) hergestellt wurden. Diese Materialien sind in situ ohne DNA irgendeiner Art eingebracht worden. Fünf Tiere erhielten eine Osteotomie mit 10 mg eines Typ II-Collagenimplantats allein (10 mg bezeichnet die ursprüngliche Menge an lyophilisiertem Collagen). Fünf von fünf Kontrolltieren erhielten eine Osteotomie mit 10 mg eines Typ I-Collagenimplantats allein. Die Tiere wurden für drei Wochen nach dem chirurgischen Eingriff gehalten und dann getötet. Die Ergebnisse dieser Studien waren, daß SIS die neue Knochenbildung zu verlangsamen schien; Typ I-Collagen regte eine mäßig intensive inflammatorische Antwort an; und UltraFiber™ wirkte als ein osteokonduktives Agens. Die Studien mit einem Typ-II Collagenimplantat ergaben die überraschenden Ergebnisse, daß festgestellt wurde, daß 10 mg dieses Collagens die neue Knochenbildung in einem 5 mm-Osteotomie-Modell fördert (**Fig. 22A**, **Fig. 22B** und **Fig. 22C**). Neuer Knochen, der den Osteotomiespalt überbrückt, wurde drei Wochen nach dem chirurgischen Eingriff in 5/5. Tieren identifiziert, die ein Typ II-Collagenimplantat allein erhielten (d.h. minus DNA irgendeines Typs). Im Gegensatz dazu wurde fibröses Granulationsgewebe, aber kein Hinweis auf neue Knochenbildung bei 5/5 Tieren erhalten, die ein Typ I-Collagenimplantat allein erhielten.

[0369] Eine radiographische Analyse zeigte schlüssig, daß sämtliche Tiere, die eine Osteotomie mit einem Typ II-Collagenimplantat erhielten, ohne Ausnahme radiodichtes Material in dem Osteotomiespalt zeigten (**Fig. 22A**). Im scharfen Gegensatz dazu enthüllte eine radiographische Analyse aller Tiere, die ein Typ I-Collagenimplantat erhielten, kein radiodichtes Material, das sich in dem Osteotomiespalt bildete (**Fig. 22B**). Der Pfeil in **Fig. 22A** zeigt auf neues Knochenwachstum, das in dem Osteotomiespalt von Tieren mit Typ II-Collagenimplantaten gebildet wurde. Kein derartiges neues Knochenwachstum wurde bei Tieren beobachtet, die Typ I-Collagenimplantate erhielten (**Fig. 22B**).

[0370] **Fig. 22C** zeigt die Ergebnisse der Osteotomie mit einem Typ II-Collagenimplantat. Der Pfeil zeigt auf die Region von neuem Knochen, der in dem Osteotomiespalt gebildet wurde. Im Gegensatz dazu wurde nur fibröses Granulationsgewebe in dem Typ I-Collagenspalt identifiziert.

[0371] Vorangehende Studien haben vermuten lassen, daß Typ II-Collagen nur eine strukturelle Rolle in der extrazellulären Matrix spielt. Die Ergebnisse der Studien mit dem Typ II-Collagenimplantat sind interessant, weil sie eine neue und osteokonduktive Rolle für Typ II-Collagen während der endochontralen Knochenreparatur zeigen. Um das osteokonduktive Potential von Typ II-Collagen weiter zu optimieren, wird ein Hefeexpressionsvektor, der Typ II-Collagen kodiert (vollständiges α1 (II)-Collagen), eingesetzt werden, um rekombinantes α1 (II)-Collagenprotein zu erzeugen.

BEISPIEL XV

IDENTIFIZIERUNG VON WEITEREN OSTEOTROPEN GENEN:

ISOLIERUNG EINES NEUEN LATENT TGF-β BINDING PROTEIN-ARTIGEN (LTBP-3) GENS

[0372] Die TGF-βs stellen eine Familie von strukturell verwandten Molekülen mit vielfältigen Wirkungen auf die Form, das Wachstum und die Differenzierung von Säugetierzellen dar (Roberts und Sporn, 1990). Anfänglich synthetisiert als ein Vorläufer, der aus einem aminoterminalen Propeptid, gefolgt von maturiertem TGF-β besteht, assoziieren die beiden Ketten von entstehendem pro-TGF-β in den meisten Geweben unter Bildung eines inaktiven Disulfid-verbundenem Dimers mit einem Mr 106.000. Homodimere sind die häufigsten, aber auch Heterodimere sind beschrieben worden (Cheifetz et al., 1987; Ogawa et al., 1992). Während der Biosynthese wird das maturierte TGF-β-Dimer von dem Propeptid-Dimer gespalten. Die TGF-β-Latenz resultiert teilweise auf der nichtkovalenten Assoziierung von Propeptid- und maturiertem TGF-β-Dimeren (Pircher et al., 1984 und 1986; Wakefield et al., 1987; Millan et al., 1992; siehe auch Miyazono und Heldin, 1989). Folglich wird das Propetiddimer oft als das Latenz-assoziierte Protein ("latency associated protein"; LAP) bezeichnet und LAP plus das Disulfid-verknüpfte TGF-β-Dimer sind auch als der kleine latente Komplex bekannt ("small latent complex"). In dem extrazellulären Raum müssen die kleinen latenten Komplexe zur Aktivierung von maturiertem TGF-β dissoziieren. Der Aktivierungsmechanismus des latenten Komplexes wird als einer der wichtigsten Schritte, die die TGF-β-Wirkungen bestimmen, vermutet (Lyons et al., 1988; Antonelli-Orlidge et al., 1989; Twardzik et al., 1990; Sato et al., 1993).

[0373] In bestimmten Linien von gezüchteten Zellen können kleine latente Wachstumsfaktorkomplexe zusätzliche Proteine mit hohem Molekulargewicht enthalten. Das am besten charakterisierte dieser Proteine mit hohem Molekulargewicht ist das Latent TGF-β Binding Protein oder LTBP (Miyazono et al., 1988; Kanzaki et al., 1990; Tsuji et al., 1990; Olofsson et al., 1992; Taketazu et al., 1994). Das durch verschiedene Zellarten erzeugte LTBP ist heterogen in Größe, vielleicht aufgrund von alternativem Spleißen oder aufgrund von gewebespezifischem proteolytischem Prozessieren (Miyazono et al., 1988; Wakefield et al., 1988; Kanzaki et al., 1990; Tsuji et al., 1990). Latente TGF-β-Komplexe, die LTBP enthalten, sind als "Large Latent Complexes" bekannt. LTBP besitzt keine bekannte kovalente Bindung zu maturiertem TGF-β, sondern ist vielmehr durch eine Disulfid-Bindung an LAP gebunden.

[0374] Zwei LTBPs sind bis heute isoliert worden. Die abgeleitete menschliche LTBP-1-Aminosäuresequenz besteht aus einem Signalpeptid, 16 Epidermal Growth Factor-artigen Sequenzwiederholungen mit dem Potential zur Calciumbindung (EGF-CB-Sequenzwiederholungen), 2 Kopien eines einzigartigen Motivs, das 8 Cysteinreste enthält, einem RGD-Zellbefestigungs-Motiv und einem 8 Aminosäuren umfassenden Motiv, das identisch zu der zellbindenden Domäne der Laminin B2-Kette ist (Kanzaki et al., 1990). Es gibt Hinweise darauf, daß LTBP-1 Calcium bindet, was wiederum eine Strukturveränderung induziert, die LTBP vor einem proteolytischen Angriff schützt (Colosetti et al., 1993). LTBP-2 zeigt 41% Sequenzidentität mit LTBP-1 und seine strukturellen Domänen zeigen eine ähnliche Gesamtorganisation (Moren et al., 1994).

[0375] Während die Funktionen von LTBP-1 und LTBP-2 gegenwärtig unbekannt sind, sind in der Literatur mehrere Ideen dargelegt worden. Zunächst könnte LTBP die intrazelluläre Biosynthese von latenten TGF-β-Vorläufern regulieren. Gezüchtete Erythroleukämie-Zellen sammeln und sekretieren auf wirksame Weise "Large Latent TGF-β Complexes", während sie nur langsam "Small Latent TGF-β Complexes", die anormale Disulfidbrücken enthalten, sekretieren (Miyazono et al., 1991; Miyazono et al., 1992). Deshalb kann LTBP das normale Ansammeln/den Zusammenbau und die Sekretion von "Latent TGF-β Complexes" erleichtern. Zweitens kann LTBP latentes TGF-β zu spezifischen Typen von Bindegewebe führen. Jüngere Hinweise legen nahe, daß der "Large Latent TGF-β Complex" über LTBP kovalent an die extrazelluläre Matrix gebunden ist (Taipale et al., 1994).

[0376] Basierend auf diesen Beobachtungen wurde LTBP als ein "Matrixrezeptor" bezeichnet, d.h. ein sekretiertes Protein, das latente Wachstumsfaktoren wie TGF-β zu der extrazellulären Matrix führt und speichert. Drittens kann LTBP die Aktivierung von latenten Komplexen modulieren. Diese Idee basiert in Teilen auf jüngsten Hinweisen, die nahelegen, daß maturierter TGF-β aus den extrazellulären Speicherorten durch Proteasen wie Plasmin und Thrombin freigesetzt wird, und daß LTBP "Small Latent Complexes" vor einem proteolytischen Angriff schützen kann (Falcone et al., 1993; Benezra et al., 1993; Taipale et al., 1994), d.h. die Proteaseaktivität kann die Wirkung von TGF-β in Geweben bestimmen, aber LTBP kann diese Aktivität modulieren. Viertens kann LTBP eine wichtige Rolle bei dem Hinführen des "Latent TGF-β Complex" zu der Zelloberfläche spielen, was latentem TGF-β erlaubt, auf wirksame Weise aktiviert zu werden (Flaumenhaft et al., 1993).

A. MATERIAL UND METHODEN

1. cDNA-Klonierung

[0377] Aliquots (typischerweise 40-50.000 PFU) von Phagenpartikeln aus einer cDNA-Genbank in dem λZAP II®-Vektor, hergestellt aus NIH 3T3-Zell-mRNA (Stratagene), und frischen, über Nacht gezüchteten XL1-Blue™-Zellen (gewachsen in Luria-Nährmedium, das mit 0,4% Maltose in 10 mM $MgSO_4$ ergänzt wurde) wurden gemischt, für 15 min. bei 37°C inkubiert, wiederum mit 9 ml flüssiger (50°C) Top-Agarose (NZY-Nährmedium plus 0,75% Agarose) gemischt und dann gleichmäßig über frisch gegossene NZY-Agarplatten von 150 mm ausgebreitet. Standardverfahren wurden zur Herstellung von Plaque-Abzügen und Filterhybridisierung angewendet (42°C, in Puffer enthaltend 60% Formamid, 5 × SSPE, 1 × Denhardt's, 0,1% SDS, 100 mg/ml Lachssperma-DNA, 100 mg/ml Heparin). Die Filter wurden fortschreitend zu hoher Stringenz gewaschen (0,1 × SSC/0,1% SDS, 65°C). cDNA-Sonden wurden durch das Nick-Translationsverfahren unter Verwendung im Handel erhältlicher Reagenzien und Protokolle radiomarkiert (Nick Translation Kit, Boehringer-Mannheim). Gereinigte Phagenklone wurden in pBluscript®-Plasmidklone umgewandelt, welche unter Verwendung von Sequenase (v2.0) wie beschrieben (Chen et al., 1993; Yin et al., 1995) sequenziert wurden. Die Sequenzausrichtung und -identität wurden unter Verwendung von Sequenzanalyseprogrammen der Genetics Computer Group (MacVector) bestimmt.

2. Gewebe-In Situ-Hybridisierung

[0378] Um normale Sense- und Antisense-Sonden herzustellen, wurde ein einzigartiges 342 bp umfassendes Fragment von der 3'-untranslatierten Region (+3973 bis +4314, wobei das "A" des Initiator-Met-Codons als +1 gezählt wurde; siehe "ish", Fig. 1) in das pBSKS+-Plasmid (Stratagene, Inc.) subkloniert. Matrizen-DNA wurde mit entweder EcoRI oder BamHI linearisiert und extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Sense- und Antisense-Transkripte wurden aus 1 mg Matrize mit T3- und T7-Polymerasen in Gegenwart von [^{35}S]-UTP mit >6 mCi/ml (Amersham, >1200 Ci/mmol) und 1,6 U/ml RNasin (Promega) hergestellt, wobei die übrigen Reagenzien für die in vitro-Transkription in einem Kit bereitgestellt wurden (SureSite, Novagen, Inc.). Nach Transkription bei 37°C für 1 h, wurden die DNA-Matrizen entfernt durch einen 15 min. Verdau bei 37°C mit 0,5 U/ml RNase-freier DNase I, extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Ribosonden wurden hydrolysiert auf eine mittlere Gesamtlänge von 150 bp durch Inkubieren in 40 mM $NaHCO_3$, 60 mM Na_2CO_3, 80 mM DTT für ~40 min. bei 60°C. Die Hydrolyse wurde durch Zugabe von Natriumacetat, pH 6,0, und Eisessigsäure auf 0,09 M bzw. 0,56% (v/v) beendet und die Sonden wurden dann Ethanol-präzipitiert, in 0,1 M DTT gelöst, gezählt und bei –20°C bis zur Verwendung gelagert. Maus-Embryogewebe-Schnitte (Novagen) von Tag 8,5-9,0, Tag 13,5 und Tag 16,5 und das in situ-Hybridisierungsprotokoll waren exakt wie beschrieben (Chen et al., 1993; Yin et al., 1995).

3. Northern-Analyse

[0379] MC3T3-E1-Zell-Poly(A^+)-RNA (2-10 mg umfassende Aliquots) wurde einer Elektrophorese auf einem 1,25% Agarose/2,2 M Formaldehyd-Gel unterzogen und dann auf eine Nylonmembran übertragen (Hybond-N, Amersham). Die RNA wurde an die Membran kreuzvernetzt durch Exposition mit einer UV-Lichtquelle (1,2 × 10^6 mJ/cm^2, UV Stratalinker 2400, Stratagene) und dann für >15 min. bei 65°C in Rapid-Hyb-Puffer (Amersham, Inc.) prähybridisiert. Eine spezifische cDNA-Sonde, bestehend allein aus untranslatierter Sequenz vom 3'-Ende des Transkripts, wurde durch Zufallspriming ^{32}P-markiert und zur Hybridisierung eingesetzt (2 h bei 65°C). Die Blots wurden fortschreitend zu hoher. Stringenz gewaschen (0,1 × SSC/0,1% SDS, 65°C) und dann gegen einen Röntgenfilm mit Verstärkungsschirm (XAR, Kodak) bei –86°C gelegt.

4. Antikörper-Herstellung

[0380] LTBP-3-Antikörper wurden gegen eine einzigartige Peptidsequenz, die in Domäme #2 (Aminosäuren 155-167) gefunden wurde, hervorgerufen. Peptid #274 (GESVASKHAIYAVC) (SEQ ID NO:16) wurde unter Verwendung einer ABI-Synthesevorrichtung, Modell 431A synthetisiert unter Einsatz der FastMoc-Chemie. Die Sequenz wurde unter Verwendung einer Protein-Sequenziervorrichtung Typ ABI473 bestätigt, ein Cysteinrest wurde dem Carboxylende hinzugefügt, um die Vernetzung mit Trägerproteinen zu erleichtern. Zur Antikörperherstellung wurde das synthetische Peptid mit Rattenserumalbumin (RSA) unter Verwendung von MBS (m-Maleimidobenzoesäure-N-hydroxysuccinimidester) mit einer Substitution von 7,5 mg Peptid pro mg RSA gekoppelt. Ein mg des Peptid-RSA-Konjugats in 1 ml Freunds' kompletten Adjuvants wurde subkutan an 10 verschiedene Stellen entlang des Rückens der Kaninchen injiziert. Mit Beginn von 3 Wochen nach der anfänglichen Immunisierung wurden den Kaninchen zweiwöchentliche Verstärkungsinjektionen von 1 mg Peptid/RSA in 100 µl Freunds' inkompletten Adjuvants gegeben. IgG wurde hergestellt durch Vermischen des Immunse-

rums mit n-Caprylsäure (0,7 ml n-Caprylsäure pro ml Serum), Rühren für 30 min. und Zentrifugieren bei 5.000 × g für 10 min. Der Überstand wurde dekantiert und gegen zwei Wechsel von Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) über Nacht bei 4°C dialysiert. Die Antikörperlösung wurde dann affinitätsgereinigt, indem sie über eine Säule laufengelassen wurde, die das immunisierende Peptid enthielt, das an einen Affi-Gel 10-Affinitätsträger gekoppelt war. Gebundene Antikörper wurden mit 0,2 M Glycin (pH 2,3) eluiert, direkt gegen PBS dialysiert und vor Lagerung bei 70°C auf 1 mg/ml konzentriert.

5. Transfektion

[0381] Eine transiente Transfektion wurde unter Verwendung von Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Kurz gesagt, wurden subkonfluente Zellen (die ~20% einer Kunststoff Gewebekulturplatte von 100 mm bedecken) 2x in DMEM-Gewebekulturmedium (GIBCO) gewaschen und dann für 3h bei 37°C in einem sterilen Gemisch von DEAE-Dextran (0,25 mg/ml), Chloroquin (55 mg/ml) und 15 mg Plasmid-DNA inkubiert (Courey und Tjian, 1988). Die Zellen wurden dann durch eine Inkubation mit 10% DMSO in sterilem PBS für 2 min, bei 37°C geschockt, 2x gewaschen mit DMEM (Sambrook et al., 1989) und in DMEM plus 10% fötalem Kalbserum und Antibiotika für 72 h bei 37°C inkubiert.

6. Immunpräzipitation

[0382] Für die Immunpräzipitation wurde 1 ml Antikörper (1:400 Endkonzentration in PBS-TDS-PUFFER: 0,38 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, 1% Triton X-100, 0,5% Desoxycholsäure und 0,1% SDS) zu 1 ml radiomarkierten Mediumproteinen gegeben. Das Gemisch wurde unter Schütteln bei 4°C für 1 h inkubiert, Protein A-Sepharose CL-4B-Kügelchen wurden zugegeben (200 ml, 10% Suspension) und dieses Gemisch wurde unter Schütteln für eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden durch kurze Zentrifugation pellettiert, das Pellet wurde 6x mit PBS-TDS-Puffer gewaschen, es wurde 2x Proteinladungs-Farbstoff zugesetzt und die Proben wurden für 5 min. gekocht und dann über eine 4-18% Gradienten-SDS-PAGE aufgetrennt (Bonadio et al., 1985). Kalte Molekulargewichtsmarker (200 kDa-14,3 kDa, Rainbox Mix, Amersham) wurden zum Schätzen des Molekulargewichts eingesetzt. Das Gel wurde getrocknet und für die angegebene Zeit bei Raumtemperatur mit einem Film exponiert.

7. Western-Analyse

[0383] Fraktionierte Proteine in den SDS-Polyacrylamid-Gelen wurden auf einen Nitrocellulose-Filter für 2 h unter Verwendung eines Tris-Glycin-Methanol-Puffers, pH 8,3, bei 0,5 mA/cm^2 übertragen. Die Filter wurden blockiert, mit entfetteter Milch plus Antikörper (1:1000 Verdünnung) für 2 h inkubiert und gewaschen. Die Antikörperfärbung wurde unter Verwendung des ECL Western Blotting Reagent (Amersham) gemäß den Protokollen des Herstellers sichtbar gemacht.

B. ERGEBNISSE

[0384] In dieser Studie isolierten und charakterisierten die Erfinder eine neue Maus-Fibrillin-artige cDNA, die LTBP-3 kodiert. Um das Maus-LTBP-3-Gen zu klonieren, wurde cDNA aus einer 3T3-Zell-cDNA-Genbahn amplifiziert unter Verwendung menschlicher Fibrillin-1-PCR™-Primer unter Bedingungen niedriger Stringenz (d.h. Paaren durch Aneinanderlagern bei 37°C, anfänglich für 10 Zyklen, gefolgt durch Paaren durch Aneinanderlagern bei 60°C für 30 Zyklen). Die Ergebnisse zeigten, daß ein Maus-DNA-Fragment von unerwartet niedriger Homologie (~50%) zu dem menschlichen Fibrillin-1-Gen erhalten wurde. Das molekulare Klonieren des echten Maus-Fibrillin-1-Transkripts wurde ebenfalls durchgeführt, was bestätigte, daß die Fibrillin-1-kodierenden Sequenzen von Mensch und Maus >95% Sequenzidentität teilen. Die Maus-Fibrillin-1 und PCR™-Sequenzen waren unterschiedlich, was nahelegte, daß das PCR™-Produkt von einer verwandten, Fibrillin-artigen cDNA stammen könnte. Die 3T3-Zell-cDNA-Genbank wurde bei hoher Stringenz unter Verwendung des Maus-PCR™-Produkts als Sonde durchgemustert, um diese Hypothese zu testen. Eine "cDNA Walking Strategy" ergab schließlich sieben überlappende cDNA-Klone (Fig. 14). Dies stellt eine einzigartige mRNA von 4.314 Nukleotiden mit einem offenen Leserahmen von 3,753 Nukleotiden (SEQ ID NO:2) bereit. Das abgeleitete Molekül ist ein einzigartiges Polypeptid von 1.251 Aminosäuren (SEQ ID NO:3). Wenn man das Signalpeptid (21 Aminosäuren) ausschließt, besteht das neue Fibrillin-artige Molekül aus fünf strukturell unterschiedlichen Regionen. (Region 1–Region 5), und obwohl ähnlich zu dem Maus-Fibrillin-1 (Fig. 15A), ist seine Domänenstruktur einzigartig, wie durch die schematische Darstellung von LTBP-3, die in Fig. 15B gezeigt wird, bewiesen wird.

[0385] Domäne #1 ist ein Aminosäuresegment von 28 Aminosäuren mit einer basischen Nettoladung (ge-

schätzter pI, 12,36), die das Binden von sauren Molekülen in der extrazellulären Matrix (z.B. sauren Proteoglycanen) erlauben würde. Sequenzen, die reich an basischen Aminosäuren sind, können ebenfalls als endoproteolytische Prozessierungssignale dienen (Barr, 1991; Steiner et al., 1992), was nahelegt, daß das NH_2-terminale Ende proteolytisch prozessiert werden kann. Domäne #2, die sich auf 390 Aminosäuren ausdehnt, besteht aus einer EGF-artigen Sequenzwiederholung, einem Segment von 135 Aminosäuren, das Prolin-reich (20,7%) und Glycin-reich (11,8%) war, aber nicht Cystein-reich, einem Fib-Motiv (Pereira et al., 1993), einer EGF-CB-Sequenzwiederholung und einer TGF-bp-Sequenzwiederholung. Domäne #3 ist ein Segment von 113 Aminosäuren, das durch seinen hohen Prolingehalt (21%) gekennzeichnet ist. Domäne #4 dehnt sich auf 678 Aminosäuren aus und besteht aus 14 aufeinanderfolgenden Cystein-reichen Sequenzwiederholungen. Basierend auf strukturellen Homologien waren 12/14 Sequenzwiederholungen Epidermal Growth Factor-Calcium Binding (EGF-CB)-Motive (Handford et al., 1991), während 2/14 Transforming Growth Factor-β-Binding Protein-(TGF-bp)-Motive waren (Kanzaki et al., 1990). Schließlich ist Domäne #5 ein Segment von 22 Aminosäuren an dem Carboxyl-terminalen Ende. Die begriffliche Aminosäuresequenz, die durch den offenen Leserahmen kodiert wird, bestand aus 1251 Aminosäuren (**Fig. 15B**) mit einem geschätzten pI von 5,92, einer vorausgesagten molekularen Masse von 134.710 Da und fünf potentiellen N-verknüpften Glycosylierungsstellen. Es lag keine RGD-Sequenz vor.

[0386] Eine Northern-Blot-Analyse von Maus-Embryo-RNA unter Verwendung einer Sonde aus der 3'-untranslatierten Region identifizierte eine Transkriptbande von ~4,6 kb. In dieser Hinsicht sind 4.310 nt durch cDNA-Klonierung isoliert worden, einschließlich einer 3'-untranslatierten Region von 401 nt und einer 5' stromaufwärts gelegenen Sequenz von 156 nt. Die offensichtliche Diskrepanz zwischen dem Ergebnis der Northern-Analyse und der Analyse der cDNA-Sequenz legt nahe, daß die 5' stromaufwärts gelegene Sequenz ~300 nt zusätzlicher stromaufwärts gelegener Sequenz enthalten kann. Diese Schätzung ist in Übereinstimmung mit den vorläufigen "Primer Extension Mapping"-Studien, die andeuten, daß die 5' stromaufwärts gelegene Sequenz 400-500 nt lang ist.

[0387] Insgesamt wurden 19 Cystein-reiche Sequenzwiederholungen in Domänen #2 und #4 des Maus-LTBP-artigen (LTBP-3)-Polypeptids festgestellt. Dreizehn waren EGF-artig und 11/13 enthielten die Calciumbindungs-Konsensus-Sequenz. Dieser Konsensus stammt aus einer Analyse von 154 EGF-CB-Sequenzwiederholungen in 23 verschiedenen Proteinen und aus Strukturanalysen der EGF-CB-Sequenzwiederholungen, sowohl an Calciumionen gebunden wie nichtgebunden (Selander-Sunnerhagen et al., 1992). Es sind zuvor Variationen von diesem Konsensus festgestellt worden und einer dieser, D-L-N/D-E-C_1, wurde in der dritten EGF-artigen Sequenzwiederholung von Domäne #4 identifiziert. Zusätzlich wurde eine potentielle Calcium-bindende Sequenz, über die zuvor nicht berichtet worden ist (E-T-N/D-E-C_1), in der ersten EGF-artigen Sequenzwiederholung von Domäne #4 identifiziert. Zehn von dreizehn EGF-CB-Sequenzwiederholungen enthielten ebenfalls eine zweite Konsensussequenz, die eine Erkennungssequenz für eine Asp/Asn-Hydroxylase darstellt, die co- und posttranslational D/N-Reste modifiziert (Stenflo et al., 1987; Gronke et al., 1989).

[0388] Das abgeleitete Polypeptid war wie Fibrillin-1 organisiert, obwohl es ungefähr die Hälfte der Größe umfaßt, dahingehend, daß es aus einem Signalpeptid, gefolgt von 5 strukturell unterschiedlichen Domänen besteht, d.h. zwei Domänen mit vielen EGF-artigen, EGF-CB- und Fib-Sequenzwiederholungen und eine dritte mit einer Prolin-reichen Sequenz (Pereira et al., 1993). Jedoch hat ein Vergleich jeder dieser Domänen unter Verwendung des GAP- und BESTFIT-Programme (Genetics Computer Group) einen niedrigen Wert der Aminosäurehomologie von nur 27% über die fünf strukturellen Domänen enthüllt, die von dem abgeleiteten Maus-Polypeptid und dem menschlichen Fibrillin-2 geteilt werden. Diese Werte sind für ein mögliches Fibrillin-Familienmitglied gering, weil Fibrillin-1 und Fibrillin-2 ~50% Identität teilen (Zhang et al., 1994).

[0389] Eine Recherche in zur Verfügung stehenden Datenbanken enthüllte, daß das abgeleitete Maus-Polypeptid dem "Latent TGF-β Binding Protein" der Ratte und des Menschen am ähnlichsten war (Kanzaki et al., 1990; Tsuji et al., 1990). In dieser Hinsicht wurde festgestellt, daß LTBP Fibrillin dahingehend ähnlich ist, daß es ebenfalls in fünf strukturelle unterschiedliche Domänen geteilt werden konnte (**Fig. 15A**, **Fig. 15B** und **Fig. 15C**). Diese schließen eine relativ kurze Domäne stromabwärts des Signalpeptids mit einer basischen Nettoladung ein (Aminosäuren 21-31, geschätzter pI, 11,14); eine Domäne, die aus EGF-artigen, EGF-CB-, TGF-bp- und Fib-Motiven plus einer Prolin-reichen und Glycin-reichen Sequenz (Aminosäuren 34-407) besteht; einer Prolin-reichen Domäne (Aminosäuren 408-545); einer großen Domäne, die aus EGF-CB-, TGF-bp- und TGF-bp-artigen Sequenzwiederholungsmotiven besteht (Aminosäuren 546-1379); und einer relativ kurzen Domäne an dem Carboxyl-Ende (Aminosäuren 1380-1394). Ein Aminosäuresequenzvergleich der abgeleiteten Maus- und Mensch-Polypeptide zeigte 60% Identität für Domäne #1, 52% Identität für Domäne #2, 30% Identität für Domäne #3, 43% Identität für Domäne #4 und 7% Identität für Domäne #5. Die mittlere Identität über die fünf Domänen, die von dem Maus-Polypeptid und dem menschlichen LTBP geteilt werden, beträgt

38,4%. Auf signifikante Weise sind die Cysteinreste in beiden Polypeptidsequenzen hoch konserviert.

[0390] Die Fibrilline werden ausschließlich durch Bindegewebszellen in entwickelnden Geweben exprimiert (Zhang et al., 1994), während LTBP zusammen mit TGF-β sowohl durch epitheliale als auch Bindegewebszellen exprimiert werden sollte (Tsuji et al., 1990). Die strukturellen Homologiedaten sagen daher voraus, daß das in Fig. 15B gezeigte Maus-LTBP-3-Gen sowohl in epithelialen als auch Bindegewebszellen exprimiert wird. Gewebe-in situ-Hybridisierung wurde eingesetzt, um diese Hypothese zu testen.

[0391] Eine Übersicht über die Expressionsmuster, wie sie durch Gewebe-in situ-Hybridisierung bestimmt wurden, ist in Fig. 17A, Fig. 17B, Fig. 17C und Fig. 17D wiedergegeben. Annähernd mittel-sagittale Schnitte von normalen Maus-Embryos an Tag 8,5, 9,0, 13,5 und 16,5 p.c. der Entwicklung wurden mit einer ^{35}S-markierten einzelsträngigen normalen Sense-Ribosonde aus dem gleichen cDNA-Konstrukt, das verwendet wurde, hybridisiert. Am Tag 8,5-9,0 der Entwicklung wurde eine intensive Genexpression in den mesometrialen und anti-mesometrialen Uterusgeweben, dem ectoplacentalen Konus, der Placenta und den placentalen Membranen beobachtet. Das Transkript schien an Tag 8,5, 9,0, 13,5 und 16,5 der Entwicklung weithin in mesenchymalen/Bindegewebs-Kompartimenten des Maus-Embryos, einschließlich des facialen Mesenchyms, exprimiert zu werden. Besonders intensive Expression des Transkripts wurde in der Leber festgestellt.

[0392] Eine Mikroskopie von Embryos an Tag 8,5-9,0 bestätigte die weit verbreitete Expression des Maus-Gens durch mesenchymale Zellen. Eine signifikante Expression des Transkripts durch Zellen des sich entwickelnden zentralen Nervensystems, der Somiten und des kardiovaskulären Gewebes (Myocardium plus Endocardium) wurde ebenfalls beobachtet.

[0393] Mikroskopie von Embryos an Tag 13,5 und Tag 16,5 zeigten eine Expression des Maus-Gens durch Skelettmuskelzellen und durch Zellen, die an der intramembranösen und endochondralen Knochenbildung beteiligt sind. Das Transkript wurde durch Osteoblasten exprimiert und durch periosteale Zellen der Schädeldecke, des Unterkiefers und des Oberkiefers. Das Transkript wurde ebenfalls in sowohl Knorpel wie Knochen der unteren Extremität identifiziert. Ein positives Signal wurde in perichondrialen Zellen und Chondrocyten (proliferierend > entwickelt > hypertroph) von Gelenkknorpel, der mutmaßlichen Wachstumsplatte und dem Knochenmodell innerhalb des Zentralkanals nachgewiesen. Das positive Signal wurde ebenfalls durch endotheliale Zellen der Blutgefäße innerhalb der mittleren Diaphyse und den umgebenden Muskelzellen exprimiert (Fig. 18A, Fig. 18B, Fig. 18C, Fig. 18D, Fig. 18E, Fig. 18F, Fig. 18G, Fig. 18H, Fig. 18I, Fig. 18J, Fig. 18K, Fig. 18L, Fig. 18M, Fig. 18N, Fig. 18O und Fig. 18P).

[0394] Respiratorische epitheliale Zellen, die die entwickelnden kleinen Luftwege auskleiden, und Bindegewebszellen in dem pulmonären Interstitium exprimierten das Maus-Transkript, wie es auch myocardiale Zellen (Atrium und Ventrikel) und endocardiales Kissengewebe tun. Zellen innerhalb der Wände von großen Arterien exprimierten ebenfalls das Transkript. Die Expression des Maus-Gens wurde in mehreren Organen des Ernährungssystems identifiziert, einschließlich der Zunge, des Ösophagus, des Magens, des Dünn- und Dickdarm, des Pankreas und der Leber. Mucosale epitheliale Zellen, die den unteren und oberen Verdauungstrakt auskleiden, plus die Zellen von glattem Muskel und Bindegewebe, die in der Submucosa gefunden wurden, exprimierten das Transkript, wie es auch die acinösen Zellen des exocrinen Pankreas taten. Trotz des hohen Spiegels der Expression des Transkripts in der Leber lassen diese Ergebnisse vermuten, daß beide Zellpopulationen das LTBP-3-Transkript exprimieren.

[0395] In der Niere wurde eine Expression oberhalb des Grundwertes in Zellen von sich entwickelnden Nephronen, der Uretaknospe ("ureteric bud"), dem Nierenblastem und dem Niereninterstitium beobachtet. In der Haut exprimierten epidermale und adnexale Keratinocyten, dermale Bindegewebszellen und braune Fettzellen innerhalb der dorsalen Subcutis das Maus-Transkript. In dem zentralen und peripheren Nervensystem exprimierten Ganglionzellen in dem Cerebrum, Hirnstamm, Rückenmark und in den peripheren Nerven das Maus-Transkript. Das Transkript wurde ebenfalls intensiv durch Zellen der sich entwickelnden Mausretina exprimiert.

[0396] Somit wird das Maus-Gen sowohl durch epitheliale als auch Bindegewebszellen weit exprimiert, ein Muster, das man für ein "Latent TGF-β Binding Protein" erwarten würde. Die drei letzten Beobachtungen sind ein Argument dafür, daß die LTBP-artige (LTBP-3)-Sequenz, die in **Fig.** 25 dargestellt ist, nicht einfach das Maus-Homolog von menschlichem LTBP ist. Erstens besitzt Domäne #4 der LTBP-artigen (LTBP-3)-Sequenz der Maus eine kleinere Anzahl von EGF-artigen Sequenzwiederholungsmotiven als Mensch- und Ratten-LTBP (8 gegenüber 11). Zweitens wurden Anteile der LTBP-artigen kodierenden Sequenz des Menschen und der Ratte charakterisiert und es wurde festgestellt, daß sie ~90% Identität mit Mensch- und Ratten-LTBP teilen,

aber nur 65% mit dem LTBP-artigen Gen der Maus. Drittens sind die LTBP- und LTBP-artigen Gene des Menschen auf getrennten Chromosomen lokalisiert. Menschliches LTBP wurden dem menschlichen Chromosom 2 zugeordnet, basierend auf der Analyse von somatischen Mensch × Nagetier-Zellhybridlinien (Stenman et al., 1994). Die vorliegende Erfindung stellt das erste Kartieren eines LTBP-Gens in der Maus dar. Die menschlichen LTBP-artigen Gene wurden kürzlich auf Chromosom 11, Bande q12, lokalisiert, während das Maus-Gen auf Maus-Chromosom 19, Bande B (eine Region konservierter Syntänie) kartiert wurde, wobei verschiedene unabhängige Herangehensweisen einschließlich der Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung eingesetzt wurden.

[0397] Der erste Hinweis auf ein alternatives Spließen stammt aus molekularen Klonierungsstudien in der Maus, bei denen unabhängige cDNA-Klone isoliert wurden mit einer Deletion von 51 bp aus der kodierenden Sequenz. Eine PCR™/Southern Blot-Analyse bot zusätzliche Hinweise darauf, daß die homologe 51 bp umfassende Sequenz in normalen embryonalen Geweben der Maus alternativ gespleißt wurde.

[0398] Die Northern Blot-Analyse zeigte ebenfalls, daß das neue Fibrillin-Gen ebenfalls in Rattenkallus drei Wochen nach Osteotomie, nachdem die Mineralisierung begonnen hatte, exprimiert wurde. Die Genexpression im normalen Knochengewebe von ausgewachsener Ratten war unbedeutend, was nahelegt, daß die Mikrofibrillen ein wichtiger Teil der Knochenbruch-Heilungsantwort sind. Das neue Fibrillin-artige Gen wurde im Kallus als ein Paar von alternativ gespleißten Transkripten exprimiert. Dieses Ergebnis ist unabhängig voneinander bei drei Gelegenheiten reproduziert worden. Das molekulare Klonieren des neuen Fibrillins in sowohl der Maus als auch der Ratte hat mögliche Spleißstellen für die alternativen Spleißereignisse identifiziert.

[0399] Maus-Präosteoblasten MC3T3-E1 wurden eingesetzt, um zu zeigen, daß das Maus-Genprodukt TGF-β binden kann. MC3T3-E1-Zellen wurden verwendet, weil sie TGF-β synthetisieren und sekretieren, der als ein autokriner Regulator der Osteoblastenproliferation wirken kann (Amarnani et al., 1993; Van Vlasselaer et al., 1994; Lopez-Casillas et al., 1994).

[0400] Um zu bestimmen, ob MC3T3-E1-Zellen das Maus-Genprodukt von TGF-β coexprimieren oder nicht, wurden Zellen auf Schalen von 100 mm unter differenzierenden Bedingungen plattiert (Quarles et al., 1992) und das Medium wurde zweimal wöchentlich ausgetauscht. Parallele Platten wurden plattiert und auf Zellzahl und Aktivität der Alkalischen Phosphatase hin untersucht, was bestätigte, daß die Osteoblasten-Differenzierung tatsächlich stattfand. Gleiche Aliquots von gesamter zellulärer RNA wurde aus diesen MC3T3-E1-Zellen nach 5, 14 und 28 Tagen in Kultur für eine Northern Blot-Analyse hergestellt. Wie in **Fig. 19** gezeigt, erreicht die Expression des neuen Maus-Gens an Tag 14 der Kultur einen Höhepunkt. Da MC3T3-E1-Zellen ebenfalls einen Peak bei der Aktivität der Alkalischen Phosphatase an Tag 14 der Kultur zeigen (Quarles et al., 1992), lassen die Ergebnisse erstmals vermuten, daß die Expression des LTBP-2-Gens ein früher Marker der Osteoblasten-Differenzierung ist.

C. DISKUSSION

[0401] Diese Studie berichtet über das molekulare Klonieren eines neuen LTBP-artigen Gens, das zahlreiche EGF-artige Sequenzwiederholungen enthält. Die Northern-Analyse zeigt, daß das Gen ein einzelnes Transkript von ~4,6 kb in Geweben von Maus-Embryos kodiert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Maus-Genprodukts scheint ein sekretiertes Polypeptid von 1.251 Aminosäuren zu sein. Obwohl es ähnlich zu Fibrillin ist, ähneln die Gesamtstrukturorganisation und das Expressionsmuster dieses Genprodukts am stärksten LTBP, einem "Latent TGF-β Binding Protein", das ursprünglich von Heldin und Mitarbeitern (Kanzaki et al., 1990) isoliert worden war. Mehrere Beobachtungen lassen stark vermuten, daß das LTBP-Genprodukt und das Maus-LTBP-artige Genprodukt deshalb von verwandten, aber unterschiedlichen genetischen Loci stammen. Erstens teilen die LTBP- und die LTBP-artige kodierende Sequenz ~40% Identität und es bestehen Unterschiede hinsichtlich der Anzahl von EGF-CB-Sequenzwiederholungen in der abgeleiteten Polypeptidsequenz der beiden Moleküle. Zweitens ist ein Teil des Maus-LTBP-Gens kloniert worden und zeigt, daß es ~90% Identität mit Mensch- und Ratten-LTBP teilt. Umgekehrt sind Teile der LTBP-artigen Gene von Mensch und Ratte kloniert worden und zeigen, daß sie ~90% Identität mit dem LTBP-artigen Gen der Maus teilen. Drittens liegen das LTBP- und das LTBP-artige Gen auf verschiedenen menschlichen Chromosomen (Stenman et al., 1994). Zusammengenommen legen diese Daten nahe, daß eine Familie von mindestens zwei LTBP-Genen existiert.

[0402] Ähnlichkeiten in der strukturellen Organisation von LTBP-1 und den Fibrillin-1-und Fibrillin-2-Polypeptiden sind zuvor festgestellt worden (Pereira et al., 1993; Zhang et al., 1994; Taipale et al., 1994). Beispielsweise sind LTBP-1 und die Fibrilline alle sekretierte Bestandteile der extrazellulären Matrix. Darüber hinaus kann jedes Polypeptid in fünf Domänen organisiert werden, von denen zwei hauptsächlich aus EGF-CB- und TGF-bp-Sequenzwiederholungsmotiven bestehen. LTBP-1 und Fibrillin-1 teilen ebenfalls eine Domäne, die

Prolin-reich ist, und LTBP besitzt eine 8-Cystein-Sequenzwiederholung, die zuvor als das "Fib-Motiv" bezeichnet wurde, weil es vermutet wurde, daß sie einzigartig für Fibrillin ist (Pereira et al., 1993). Diese Ähnlichkeiten erklären wahrscheinlich die anfängliche Isolierung und Klonierung des LTBP-2-PCR™-Produkts, insbesondere, da die menschlichen Oligonukleotidprimer, die zum anfänglichen Amplifizieren der Maus-cDNA eingesetzt wurden, entworfen waren, um die Synthese einer EGF-CB-Sequenzwiederholung in Domäne #4 zu lenken.

[0403] Ein anderer Unterscheidungspunkt zwischen LTBP-2 und Fibrillin betrifft den Abstand der konservierten Cysteine C4 und C5 in den EGF-artigen Sequenzwiederholungen. Fibrillin-1 und Fibrillin-2 enthalten jeweils >50 derartiger Sequenzwiederholungen, und in jeder ist der Abstand C_4-X-C_5. Während dieses Muster in einer Mehrzahl der EGF-artigen Sequenzwiederholungen in LTBP-1 und LTBP-2 wiederholt wird, enthalten beide Gene ebenfalls Sequenzwiederholungen mit dem Abstand C_4-X-X-C_5. Obwohl die Bedeutung dieser Beobachtung unklar ist, würde man nicht erwarten, daß die Variation in der Anzahl von Aminosäuren zwischen C_4 und C_5 die Funktion der EGF-artigen Sequenzwiederholung ändert. Maturierter EGF ist ein sekretiertes Polypeptid von 48 Aminosäuren, das aus zwei Subdomänen besteht, die wenige Interdomänen-Kontakte besitzen (Engel, 1989; Davis, 1990). Die größere NH_2-terminale Subdomäne besteht aus den Resten 1-32 und wird durch ein Paar von Disulfidbrücken stabilisiert (C_1-C_3 und C_2-C_4), während die kleinere COOH-terminale Subdomäne (Aminosäuren 33-48) durch eine einzelne Disulfidbrücke stabilisiert wird (C_5-C_6). Die COOH-terminale Subdomäne besitzt eine hoch-konservierte Konformation, die nur möglich ist, wenn bestimmte Reste und die Distanzen zwischen ihnen gut konserviert sind, während die Konformation-Sequenz-Erfordernisse für die NH_2-terminale Subdomäne relativ locker sind. Man würde nicht erwarten, daß eine Variation in dem C_4-C_5-Abstand die Konformation ändert, weil diese Reste normalerweise nicht eine Disulfidbrücke bilden und die Abstandsvariation an der Grenzfläche der Subdomänen stattfindet, von der man nicht voraussagen würde, daß sie interagiert. Die Klonierung von zusätzlichen Genen wird entscheiden, ob eine Variation in dem C_4-C_5-Abstand ein verläßliches Unterscheidungsmerkmal zwischen Mitgliedern der LTBP- und Fibrillin-Genfamilien ist.

[0404] Das LTBP-2-Gen wird breiter während der Entwicklung exprimiert als das Fibrillin-1- oder Fibrillin-2-Gen. Studien in sich entwickelnden Maus-Geweben haben gezeigt, daß das Fbn-1-Gen durch mesenchymale Zellen von sich entwickelndem Bindegewebe exprimiert wird, während das Maus-LTBP-artige Gen intensiv durch epitheliale, parenchymale und stromale Zellen exprimiert wird. Jüngere Berichte haben nahegelegt, daß TGF-β eine Rolle bei der Differenzierung und Morphogenese während der Maus-Entwicklung spielt (Lyons und Moses, 1990), wenn TGF-β durch epitheliale, parenchymale und stromale Zellen erzeugt wird. Tsuji et al., (1990) und andere haben vorgeschlagen, daß die Expression von TGF-β-bindenden Proteinen, die von TGF-β selbst spiegeln sollte; das Expressionsmusters des LTBP-2-Gens über den Zeitverlauf der Maus-Entwicklung ist in Übereinstimmung mit dieser Erwartung. Jedoch kann das LTBP-2-Gen nicht vollständig mit TGF-β co-reguliert sein. Die TGF-β-Gen- und Protein-Expression während der Maus-Entwicklung ist ausgiebig untersucht worden (Heine et al., 1987; Lehnert und Akhurst, 1988; Pelton et al., 1989; Pelton et al., 1990a, b; Millan et al., 1991); diese Studien haben nicht eine Expression durch Skelettmuskelzellen, Chondrocyten, Hepatocyten, Ganglionzellen, mucosalen Zellen, die den Darm auskleiden, und epithelialen Zellen der sich entwickelnden Nephrons identifiziert. Es ist vorstellbar, daß das LTBP-2-Molekül neben dem Targeting von TGF-β eine zusätzliche Funktion in bestimmten Bindegeweben besitzt.

[0405] Die Bindungseigenschaften des LTBP-2-Genprodukts werden derzeit untersucht. Formell gesehen kann das LTBP-2-Polypeptid eine spezifische TGF-β-I soform binden, ein anderes Mitglied der TGF-β-Superfamilie (z.B. ein Bone Morphogenetic Protein, Inhibin, Aktivin oder Mullerian Inhibiting Factor) oder einen mit TGF-β nicht verwandten Wachstumsfaktor. Antipeptid-Antikörper gegen das LTBP-2-Polypeptid der Maus sind gebildet worden, und es sind Osteoblasten-Zellinien identifiziert worden, die das Molekül mit relativ hohen Spiegeln exprimieren. Studien mit diesen Reagenzien legen nahe, daß sich LTBP-2 interzellulär in "Large Latent Complexes" ansammelt mit einem Wachstumsfaktor, der durch immunologische Verfahren charakterisiert wird.

[0406] Das Vorkommen von dibasischen Aminosäuren in der LTBP-2-Sequenz legt nahe, daß es eine Zell- und Gewebe-spezifische Proteolyse durchlaufen kann. TGF-β reguliert die Erzeugung extrazellulärer Matrix durch Unterdrücken des Abbaus (durch eine Herabsetzung bei der Expression von Proteasen wie Collagenase, Plasminogen-Aktivator und Stromelysin plus eine Zunahme bei der Expression von Protease-Inhibitoren wie Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 und dem Gewebe-Inhibitor der Metalloproteinase-1) und durch Stimulieren der Synthese von Matrix-Makromolekülen (als jüngeren Übersichtsartikel siehe Lyons und Moses, 1990; Massague, 1990; Laiho und Keski-Oja, 1992; Miyazono et al., 1992). Umgekehrt ist gezeigt worden, daß die Erzeugung von extrazellulärer Matrix die TGF-β-Genexpression herabreguliert (Streuli et al., 1993). TGF-β kann deshalb die Erzeugung extrazellulärer Matrix durch eine ausgeklügelte Rückkoppelungsschleife regulieren, die die Expression einer relativ großen Anzahl von Genen beeinflußt. LTBP-1 und LTBP-2 können zu die-

ser Regulierung beitragen durch Erleichtern des Ansammeln und der Sekretion von großen latenten Wachstumsfaktor-Komplexen und anschließendes Hinleiten des Komplexes zu spezifischen Bindegeweben (Taipale et al., 1994). Wenn LTBP-3 wie LTBP-1 ist, besitzt es das Potential, als ein sekretiertes, extrazelluläres Strukturprotein zu wirken. Wie hierin gezeigt, scheint die Domäne #1 von LTBP-3 eine einzigartige Sequenz zu sein, die wahrscheinlich eine globuläre Konformation besitzt. Die Domäne #1 ist ebenfalls stark basisch und kann das Binden von LTBP-2 an saure Moleküle (z.B. saure Proteoglycane) innerhalb des extrazellulären Raums erleichtern. Es ist auch gezeigt worden, daß Sequenzen, die reich an basischen Aminosäuren sind, als Signale für das endoproteolytische Prozessieren für mehrere Peptidhormone wirken (Barr, 1991; Steiner et al., 1992). Es ist deshalb möglich, daß das NH_2-terminale Ende von LTBP-3 auf eine gewebespezifische Weise proteolytisch prozessiert wird. Die Domänen #2 und #4 bestehen aus aufeinanderfolgenden Cystein-reichen Sequenzwiederholungen, von denen die Mehrheit vom EGF-CB-Typ ist. Neben der Calciumbindung (Corson et al., 1993) können diese Sequenzwiederholungen LTBP-3 mit Regionenkonformation bereitstellen, die mit anderen Matrix-Makromolekülen wechselwirken kann (Engel, 1989). Domäne #3 ist Prolin-reich und kann in der Lage sein, sich im dreidimensionalen Raum zu biegen (oder wie ein Gelenk zu wirken) (MacArthur und Thornton, 1991). (In dieser Hinsicht ist Domäne #2 von Interesse, weil sie ein ähnliches Stück von 135 Aminosäuren besitzt, das sowohl Prolin- als auch Glycin-reich ist. Da man annimmt, daß Glycin-reiche Sequenzen sich biegen können oder wie ein Gelenk im dreidimensionalen Raum wirken können, kann diese Aminosäuresequenz die ausgedehnte Konformation von Domäne #2 unterbrechen, wodurch sie es mit einem gewissen Grad an Flexibilität in dem dreidimensionalen Raum versorgt.) Domäne #5 scheint ebenfalls eine einzigartige Sequenz mit einer globulären Konformation zu sein. Die Abwesenheit eines bekannten Zellbefestigungs-Motivs kann andeuten, daß das LTBP-3-Molekül im Gegensatz zu LTBP-1 eine stärker begrenzte Rolle bei der extrazellulären Matrix (d.h. die eines Strukturproteins) zusätzlich zu seiner Fähigkeit besitzt, die "Latent TGF-β Complexes" zu spezifischen Bindegeweben zu leiten.

[0407] MC3T3-E1-Präosteoblasten co-exprimieien LTBP-3 und TGF-β-1 und diese Proteine bilden in dem Kulturmedium einen Komplex. Diese Ergebnisse sind besonders interessant, weil der Knochen eines der größten bekannten Quellen von latentem TGF-β darstellt (200 µg/kg Knochen; Seyedin et al., 1986 und 1987), und weil dieser Wachstumsfaktor eine kritische Rolle bei der Determinierung von Knochenstruktur und -funktion spielt. Es wird zum Beispiel angenommen, daß TGF-β (i) einen starken Stimulus für die Knochenbildung in sich entwickelnden Geweben bietet, (ii) als ein möglicher "Kopplungsfaktor" während des Umbaus von Knochen wirkt (ein Prozeß, der die Knochenresorption und -bildung koordiniert), und (iii) im Anschluß an einen Bruch einen starken Knochen-induktiven Stimulus ausübt. Die Aktivierung des latenten Komplexes kann ein wichtiger Schritt zum Regulieren der Wirkungen von TGF-β sein und LTBP kann den Aktivierungsprozeß modulieren (z.B. kann sie "Small Latent Complexes" vor einem proteolytischen Angriff "schützen").

[0408] Die Expression von "Large Latent TGF-β Complexes", die LTBP tragen, kann physiologisch relevant für die Differenzierungskaskade vom Präosteoblasten zum Osteoblasten sein, d.h. kann Teil des Mechanismus sein. Dies basiert auf dem Nachweis, daß MC3T3-E1-Zellen "Large Latent TGF-β1 Complexes", die LTBP-2 tragen, genau zu der Zeit des Übergangs von dem Präosteoblasten- zum Osteoblasten-Phänotyp exprimieren (Tag 14 in Kultur oder zu Beginn der Expression der Alkalischen Phosphate; siehe Quarles et al., 1992). Das Organkulturmodell beispielsweise besteht wahrscheinlich aus differenzierten Osteoblasten, aber wenigen gebundenen Vorläuferzellen, was es bestenfalls zu einem schwierigen Modell zum Studieren der Differenzierungskaskade macht (Dallas et al., 1984), Es ist auch wohlbekannt, daß sich MG63-, ROS17/2.8- und UMR 106-Zellen rasch teilen und sie den Osteoblasten-Phänotyp exprimieren. Somit zeigen diese Osteoblasten-artigen Zellinien nicht das Entkoppeln von Zellproliferation und Zelldifferenzierung, das den normalen (physiologisch relevanten) Übergang vom Präosteoblasten zum Osteoblasten kennzeichnet (Gerstenfeld et al, 1984; Stein und Lian, 1993). Deshalb kann die Erzeugung von "Small" versus "Large Latent TGF-β Complexes" mit spezifischen Stufen bei der Reifung von Knochenzellen assoziiert sein.

[0409] LTBP-3 kann Calcium binden, da gezeigt worden ist, daß EGF-CB-Sequenzwiederholungen ein Calciumbinden mit hoher Affinität bei LTBP-1 und anderen Proteinen vermitteln (Colosetti et al., 1993). Die Calciumbindung kann wiederum zu der molekularen Konformation beitragen und die Regulation ihrer Wechselwirkung mit anderen Molekülen. Die Gegenwart von dibasischen Aminosäuren legt nahe, daß LTBP-3 auch eine zell- und gewebespezifische Proteolyse durchlaufen kann. TGF-β reguliert die Erzeugung extrazellulärer Matrix durch Unterdrückung des Matrixabbaus (durch eine Abnahme bei der Expression von Proteasen wie Collagenase, Plasminogen-Aktivator und Stromelysin plus einer Zunahme bei der Expression von Proteinaseinhibitoren wie Plasminogen Activator Inhibitor-1 und dem Gewebeinhibitor der Metalloproteinase-1) und durch Stimulieren der Synthese von Matrix-Makromolekülen (als jüngste Übersichtsartikel siehe Lyons und Moses, 1990; Massague, 1990; Laiho und Keski-Oja, 1992; und Miyazono et al., 1993). Umgekehrt ist gezeigt worden, daß die Erzeugung extrazellulärer Matrix durch die TGF-Genexpression herabreguliert wird (Streuli et al,

1993). Deshalb kann TGF-β die Erzeugung extrazellulärer Matrix durch eine ausgeklügelte Rückkoppelungsschleife regulieren, die die Expression einer relativ großen Anzahl von Genen beeinflußt. LTBP-1, LTBP-2 und LTBP-3 können zu dieser Regulation beitragen durch Erleichtern des Ansammelns und der Sekretion von großen latenten Wachstumsfaktorkomplexen und das Leiten dieses Komplexes zu spezifischen Bindegeweben (Taipale et al., 1994).

BEISPIEL XVI

HERSTELLUNG VON ANTIKÖRPERN GEGEN DAS LTBP-3-GENPRODUKT

[0410] Ein affinitätsgereinigter Antikörper (#274), der immunpräzipitieren kann, wurde gegen das LTBP-3-Genprodukt der Maus hergestellt. Eine vollständige Maus-cDNA wurde in den Säugetier-Expressionsvektor pcDNA3 zusammengefügt (Invitrogen) und anschließend an eine transiente Transfektion von 293T-Zellen exprimiert. Entstehende Polypeptide, die durch Zugabe von ^{35}S-Cys zu dem Medium von transfizierten Zellen radiomarkiert waren, wurden unter Verwendung des affinitätsgereinigten Antikörpers #274 immunpräzipitiert. Wie in **Fig. 20** gezeigt, wurde geschätzt, daß das neue Maus-Polypeptid 180-190 kDa groß ist. Um die Spezifität der Bindung von #274 sicherzustellen, zeigten wir, daß eine Präinkubation mit 10 µg synthetischem Peptid die Immunpräzipitation der Bande mit 180-190 kDa hemmt.

[0411] Schließlich wurden MC3T3-E1 Zellen für 7 Tage unter differenzierenden Bedingungen gezüchtet und mit 30 µCi/ml ^{35}S-Cystein und ^{35}S-Methionin in Mangelmedium doppelmarkiert. Das radiomarkierte Medium wurde in kaltem PBS mit Proteaseinhibitoren dialysiert. Aliquots der dialysierten Mediumprobe (10^6 eingebaute CPM) wurden durch ein kombiniertes Immunopräzipitations-/Western-Analyse-Protokoll analysiert. Das Maus-Polypeptid wurde deutlich und reproduzierbar durch MC3T3-E1-Zellen sekretiert, wobei es unter reduzierenden Bedingungen als eine einzelne Bande von 180-190 kDa wanderte (**Fig. 21**). Übereinstimmend mit den Ergebnissen vorangegangener Studien (z.B. Miyazono et al., 1988; Dallas et al., 1994; Moren et al., 1994) wurden Banden von 70 und 50 kDa, die dem TGF-β1-Vorläufer entsprechen, mit dem LTBP-3-Protein von 180 kDa co-immunpräzipitiert. Schwache Banden von 40 und 12 kDa wurden ebenfalls in Experimenten identifiziert, bei denen nur eine Immunpräzipitation durchgeführt worden war. Die letzteren sind nicht in **Fig. 21** enthalten, da sie in einem Teil des Gels wanderten, der in der Western-Analyse enthalten ist. Proteinbanden von 70-12,5 kDa sind nicht abweichende Formen von LTBP-3; **Fig. 20** zeigt, daß LTBP-3 als eine einzelne Bande von 180-190 kDa im Anschluß an eine transiente Transfektion von 293T-Zellen wandert, die nicht TGF-β1 erzeugen können. Durch Immunpräzipitation wurde eine einzigartige Bande in dem LTBP-2-Immunpräzipitat festgestellt, die mit dem maturierten TGF-β1-Monomeren in Übereinstimmung steht. Der Antikörper #274 ist nicht in der Lage, TGF-β1 zu binden, wie durch einen Radioimmunoassay unter Verwendung im Handel erhältlicher Reagenzien (R & D Systems) und den von dem Hersteller vorgeschlagenen Protokollen bestimmt wurde. Diese Ergebnisse sind in sechs unabhängigen Experimenten reproduziert worden, die drei getrennte Chargen von MC3T3-E1-Medium verwendeten. Somit bindet das neue LTBP-3-Polypeptid der Maus TGF-β in vitro.

BEISPIEL XVII

ISOLIERUNG EINES GENS, DAS MAUS-LTBP-2 KODIERT

[0412] Zusätzlich zum Bestimmen der DNA- und entsprechenden Polypeptid-Sequenz des LTBP-Gens der Maus wurde auch das LTBP-2-Gen der Maus kloniert und sequenziert.

[0413] Die vollständige cDNA-Nukleotidsequenz von Maus-LTBP-2 wird in **Fig.** 27 gezeigt (SEQ ID NO:17). Die abgeleitete Aminosäuresequenz wird in **Fig. 28** gezeigt (SEQ ID NO:18).

BEISPIEL XVIII

EXPRESSION VON REKOMBINANTEM TYP II-COLLAGEN

[0414] Der Pichia-Expressions-Kit (Invitrogen, Inc.) kann zur Herstellung von rekombinantem Typ II-Collagen eingesetzt werden. Dieser auf der methylotrophen Hefe Pichia pastoris basierende Kit erlaubt eine Expression von rekombinantem Protein auf einem hohen Niveau in einem einfach zu handhabenden und relativ billigen System. In Abwesenheit der bevorzugten Kohlenstoffquelle, Glucose, benutzt P. pastoris Methanol als Kohlenstoffquelle. Der AOXI-Promoter kontrolliert das Gen, das für die Expression des Enzyms Alkoholoxidase kodiert, das den ersten Schritt in dem Metabolismus von Methanol katalysiert. Dieser Promoter, der durch Methanol induziert wird, ist charakterisiert worden und in eine Reihe von Pichia-Expressionsvektoren eingebaut

worden. Diese Eigenschaft von Pichia ist ausgenutzt worden, um große Mengen an rekombinanten Proteinen, oft in dem Bereich von Gramm pro Liter, zu exprimieren. Weil sie ein Eukaryont ist, verwendet P. pastoris Wege der posttranslationalen Modifikation, die ähnlich denen von Säugetierzellen verwendeten sind. Dies bedeutet, daß das rekombinante Typ II-Collagen glycosyliert sein wird und Disulfidbrücken enthalten wird.

[0415] Die Erfinder sehen voraus, daß die folgenden besonderen Elemente bei der Expression von rekombinantem Typ II-Collagen nützlich sein werden: die DNA-Sequenz von menschlichem Typ II-Collagen (SEQ ID NO:11) (Lee et al., 1989); Ratten-Typ II-Collagen (SEQ ID NO:13) (Michaelson et al., 1994); und/oder Maus-Typ II-Collagen (SEQ ID NO:15) (Ortman et al., 1994). Da andere Quellen an Typ II-Collagen kodierenden DNA-Sequenzen zur Verfügung stehen, sind die diese drei Beispiele für viele Sequenzelemente, die bei der vorliegenden Erfindung nützlich sein können.

[0416] Zur Herstellung von rekombinantem Typ II-Collagen wird native Typ II-Collagen-cDNA durch die Zugabe einer im Handel erhältlichen Epitop-Markierung (das HA-Epitop, Pharmacia, LKB Biotechnology, Inc.) modifiziert. Derartige Fragmente können leicht durch zum Beispiel direktes Synthetisieren des Fragments durch chemische Mittel, durch Anwendung von Nukleinsäurereproduktionstechnologie, wie der PCR™-Technologie von US-Patent 4,603,102 (hierin durch Bezugnahme aufgenommen) oder durch Einführen ausgewählter Sequenzen in rekombinante Vektoren zur rekombinanten Herstellung hergestellt werden (PCR™ ist eine eingetragene Marke von Hoffmann-LaRoche, Inc.). Dem folgt eine Klonierung in den Pichia-Expressionsvektor. Das resultierende Plasmid wird durch DNA-Sequenzanalyse charakterisiert, durch Verdau mit NotI linearisiert, und es werden Sphäroplasten hergestellt und mit dem linearisierten Konstrukt gemäß den Empfehlungen des Herstellers transformiert.

[0417] Die Transformation erleichtert ein Rekombinationsereignis in vivo zwischen den 5'- und 3'-AOXI-Sequenzen in dem Pichia-Vektor und denen in dem Pichia-Genom. Das Ergebnis ist der Austausch von AOXI durch das interessierende Gen.

[0418] Die Transformanten werden dann auf Histidin-defizientem Medium plattiert, das auf erfolgreich transformierte Zellen selektieren wird. Die Transformanten werden weiterhin gegen langsames Wachstum auf Wachstumsmedium, das Methanol enthält, selektiert. Positive Transformanten werden für 2 Tage in Flüssigkultur wachsen gelassen und dann für 2-6 Tage in Nährmedium, das Methanol als die einzige Kohlenstoffquelle einsetzt. Die Proteinexpression wird durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Hybridisierung unter Verwendung von im Handel erhältlichen polyklonalen Antiseren gegen das HA-Epitop (Pharmacia) beurteilt.

[0419] Rekombinantes Typ II-Collagenprotein kann gemäß den Empfehlungen des Herstellers gereinigt, gegen doppelt-destilliertes, deionisiertes Wasser dialysiert und in Aliquots von 10 mg lyophilisiert werden. Die Aliquots werden sterilisiert und als Implantatmaterial für die osteokonduktiven Matrices verwendet.

[0420] Sämtliche der hierin offenbarten und beanspruchten Zusammensetzungen und Verfahren können angesichts der vorliegenden Offenbarung ohne unzumutbares Experimentieren hergestellt und durchgeführt werden. Während die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen und Verfahren als bevorzugte Ausführungsform beschrieben worden sind, wird es dem Fachmann klar sein, daß Abweichungen in bezug auf die Zusammensetzung, die Verfahren und in den Schritten und in der Abfolge von Schritten vorgenommen werden können, ohne von dem Konzept, dem Geist und dem Bereich der Erfindung abzuweichen. Genauer gesagt wird es offensichtlich sein, daß bestimmte Agenzien, die sowohl chemisch wie physiologisch verwandt sind, andere hierin beschriebene Agenzien ersetzen können, während die gleichen oder ähnliche Ergebnisse erhalten werden würden. Alle derartigen ähnlichen Ersatzstoffe und Modifikationen, die dem Fachmann offensichtlich sind, werden als innerhalb des Geistes, des Bereichs und des Konzepts der Erfindung, wie sie durch die angefügten Patentansprüche definiert ist, befindlich gehalten.

Druckschriften

[0421] Die folgenden Literaturzitate sowie die zuvor zitierten werden zu einem bedeutenden Teil durch Bezugnahme aus den in dem vorangehenden Text angegebenen Gründen hierin aufgenommen.

Abou-Samra et al., "Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol triphosphates and increases intracellular free Calcium," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:2732-2736, 1992.

Agarwala and Gay, J. Bone Min. Res., 7:531, 1992.

Alper, "Boning up: newly isolated proteins heal bad breaks," Science, 263:324-325, 1994.
Amarnani et al., J. Bone Min. Res., 8:157-164, 1993.
Antonelli-Olridge et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:4544-4548, 1989.
Badylak et al., J. Surg. Res., 47:74-80, 1989.
Bandara et al., "Gene Transfer to Synoviocytes: Prospects for Gene Treatment of Arthritis," DNA Cell Biol., 11:(3):227-231, 1992.
Barr, Cell, 66:1-3, 1991.
Beck et al., "TGF-beta 1 induces bone closure of skull defects," J. Bone Miner. Res., 11:1257-65, 1991.
Benezra et al., Blood, 81:3324-3331, 1993.
Benvenisty and Reshef, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83:9551, 1986.
Boden et al., "Estrogen receptor mRNA expression in callus during fracture healing in the rat," Calcif. Tissue Int., 45:34-325, 1989.
Bonadio et al., "An adaptive response by murine skeletal tissues that significantly increases the mechanical properties of cortical bone: implications for the treatment of skeletal fragility," J. Clin. Invest., 92:1697-1705, 1993.
Bonadio et al., J. Biol. Chem., 260:1734-1742, 1985.
Bondaio and Goldstein, "Our understanding of inherited skeletal fragility and what this has taught us about bone structure and function, In: Molecular and Cellular Biology of Bone," Noda, M., ed., Academic Press, Inc., San Diego, CA. S. 169-189, 1993.
Bonewald et al., Mol. Endocrinol., 5:741-751, 1991.
Bonnarens and Einhorn, "Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone," J. Orthop. Res., 2:97-101, 1984.
Burch and Lebovitz, "Parathyroid hormone stimulates growth of embryonic chick pelvic cartilage in vitro, " Calcif. Tissue Int., 35:526-532, 1983.
Byers and Steiner, "Osteogenesis imperfecta," Annu. Rev. Med., 43:269-289, 1992.
Campbell, in Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Vol. 13, Burden and Von Knippenberg, Eds. S. 75-83, Amsterdam, Elseview, 1984
Canalis et al., "Insulin-like growth factor-1 mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone culture," J. Clin. Invest., 83:60-65, 1989.
Carrington et al., "Accumulation, localization, and compartmentation of transforming growth factor b during endochondral bone development," J. Cell Biol., 107:1969-1975, 1988.
Centrella et al., "Skeletal tissue and transforming growth factor-b," FASEB J., 22:23066-3073, 1988.
Cheifetz et al., Cell, 48:409-415, 1987.
Chen et al., "Bone morphogenetic protein-2b stimulation of growth and osteogenic phenotypes in rat osteoblast-like cells: comparison with TGF-beta 1," J. Bone Miner. Res., 6:1387-93, 1991.
Chen et al., "Structure, chromosomal localization, and expression pattern of the murine Magp gene," J. Biol. Chem., 268:27381-27389, 1993.
Colosetti et al., FEBS Letters, 320:140-144, 1993.
Compston et al., "Elevated serum intact parathyroid hormone levels in elderly patients with hip fracture," Clin. Endo., 31:667-672, 1989.
Courey and Tjian, Cell, 55:887-898, 1988.
Cunningham et al., "Osteogenic and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor b1 mRNA expression," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89:11740-11744, 1992.
Dallas et al., J. Biol. Chem., 269:6815-6822, 1994.
Davidson et al., "A model system for in vivo gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector," Nature Genetics, 3:219-223, 1993.
Davis, New Biologist, 2:410-419, 1990.
Ejersted et al., "Human parathyroid hormone (1-34) and (1-84) increase the mechanical strength and thickness of cortical bone in rats," J. Bone Min. Res., 8:1097-1101, 1993.
Endo et al., "Vitamin D3 metabolites and PTH synergistically stimulate bone formation of chick embryonic femur in vitro," Nature, 286:262-264, 1980.
Engel, FEBS Letters, 251:1-7, 1989.
Falcone et al., J. Biol. Chem., 268:11951-11958, 1993.
Flaumenhaft et al., J. Cell Biol., 120:995-1002, 1993.
Franseschi and Iyer, J. Bone Min. Res., 7:235-246, 1992.
Gefter et al., Somatic Cell Genet. 3:231-236 (1977)
Gerstenfeld et al., Dev. Biol., 122:49-60, 1987.
Goding, 1986, in Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed., Orlando, Fla., Academic Press, 1986, pp. 60-61, 65-66, 71-74.

Gronke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:3609-3613, 1989.
Gunasekaran et al., "Mineralized Collagen As A Substitute for Autograft Bone That Can Deliver Bone Morphogenic Protein," The 19th Annual Meeting of the SOCIETY FOR BIOMATERIALS, 28. April, S. 253, 1993a.
Gunasekaran et al., Norian Corporation, Mountain View, CA. Abstract V7.5, 5. 426, 1993b. The 19th Annual Meeting of the SOCIETY FOR BIOMATERIALS, 28. April.
Gunness-Hey and Hock, "Increased trabecular bone mass in rats treated with human synthetic parathyroid hormone," Metabl. Bone Dis., 5:177-180, 1984.
Gunness-Hey and Hock, "Loss of the anabolic effect of parathyroid hormone on bone after discontinuation of hormone in rats," Bone, 10:447-452, 1989.
Handford et al., EMBO J., 9:475-480, 1990.
Hardy et al., "Serum ionized calcium and its relationship to parathyroid hormone after tibial fracture," J. Bone Jt. Surg., 75:645-649, 1993.
Hefti et al., Clin. Sci., 62:389-396, 1982.
Heine et al., J. Cell Biol., 105:2861-2876, 1987.
Hendy et al., "Nucleotide sequence of cloned cDNAs encoding human preproparathyroid hormone," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78:7365-7369, 1981.
Herrmann-Erlee et al., "Effects on bone in vitro of bovine parathyroid hormone and synthetic fragments representing residues 1-34, 2-34 and 3-34," Endocrine Research Communications, 3:21-35, 1976.
Hock and Fonseca, "Anabolic effect of human synthetic parathyroid hormone (1-34) depends on growth hormone," Endocrinology, 127:1804, 1990.
Hock and Gera, "Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to parathyroid hormone," J. Bone and Min. Res., 7:65-72, 1992.
Hock et al., "Human parathyroid hormone- (1-34) increases bone mass in ovariectomized and orchidectomized rats," Endocrinology, 122:2899-2904, 1988.
Hori et al., "Effect of human parathyroid hormone [PTH (1-34)] on experimental osteopenia of rats induced by ovariectomy," J. Bone Min. Res., 3:193-199, 1988.
Horowitz et al., "Functional and molecular changes in colony stimulating factor secretion by osteoblasts," Connective Tissue Res., 20:159-168, 1989.
Huggins et al., "Experiments on the theory of osteogenesis. The influence of local calcium deposits on ossification; the osteogenic stimulus of epithelium," Arch. Surg., 32:915, 1936.
Izumi et al., "Transforming growth factor b1 stimulates type II collagen expression in cultured periostealderived cells, " J. Bone Min. Res., 7:115-11, 1992.
Jingushi et al., "Acidic fibroblast growth factor injection stimulates cartilage enlargement and inhibits cartilage gene expression in rat fracture healing," J. Orthop. Res., 8:364-371, 1990.
Jingushi et al., "Genetic expression of extracellular matrix proteins correlates with histologic changes during fracture repair," J. Bone Min. Res., 7:1045-1055, 1992.
Johnston et al., "Heterogeneity of fracture syndromes in postmenopausal women," J. Clin. Endo. Metab., 61:551-556, 1985.
Joyce et al., "Transforming growth factor-β and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur," J. Cell Biol., 110:195-2007, 1990.
Juppner et al., "A G-protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide," Science, 254:1024-1026, 1991.
Kanzaki et al., Cell, 61:1051-1061, 1990.
Kawashima, "Growth stimulative effect of parathyroid hormone, cahcitonin and N^6, 02'-dibutyryl adenosine 3', 5'-cyclic monophosphoric acid on chick embryonic cartilage cultivated in a chemically defined medium," Endocrinol. Jpn., 27:349-356, 1980.
Klein-Nulend et al., "Comparison of the effects of synthetic human parathyroid hormone-related peptide of malignancy and bovine PTH-(1-34) on bone formation and resorption in organ culture," Endocrinology, 126:223-227, 1990.
Kohler and Milstein, Nature 256:495-497 (1975)
Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol. 6:511-519 (1976)
Kovacina et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 160:393-403, 1989.
Kozak, J. Biol. Chem., 266:19867-19870, 1991.
Kream et al., "Parathyroid hormone represses a1(I) collagen promoter activity in cultured calvariae from neonatal transgenic mice," Mol. Endocrinology, 7:399-408, 1993.
Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol., 157:105-132, 1982.
Laiho and Keski-Oja, 1992.
Langer and Folkman, "Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules." Nature, 263:797-800, 1976.
Ledley, J. Pediatrics, 110:1, 1987.

Lee et al., "Identification of the molecular defect in a family with spondyloepiphyseal dysplasia," Science, 244:978-980, 1989.
Lee et al., "Parathyroid hormone induces sequential c-fos expression in bone cells in vivo: in situ localization of its receptor and c-fos mRNAs," Endocrinology,
Lehnert and Akhurst, Development, 104:263-273, 1988.
Lewinson and Silbermann, "Parathyroid hormone stimulates proliferation of chondroprogenitor cells in vitro," Calcif. Tissue Int. 38:155-162, 1986.
Li et al., Mammalian Genome, in Druck, 1994.
Linkhart and Mohan, "Parathyroid hormone stimulates release of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-II from neonatal mouse calvaria in organ culture," Endocrinology, 125:1484-1491, 1989.
Liu and Kau, "Human parathyroid hormone (1-34) prevents bone loss and augments bone formation in sexually mature ovariectomized rats," J. Bone Min. Res., 5:973-982, 1990.
Liu et al., "Preexisting bone loss associated with ovariectomy in rats is reversed by parathyroid hormone," J. Bone and Mins. Res., 6:1071-1080, 1991.
Lopez-Casillas et al., J. Cell Biol., 124:557-568, 1994.
Luyten et al., "Purification and partial amino acid sequence of osteogenic, a protein initiating bone differentiation," J. Biol. Chem., 264:13377-13380, 1989.
Lyons and Moses, Eur. J. Biochem., 187;467-473, 1990.
Lyons et al., J. Cell Biol., 106:1549-1665, 1988.
Lyons et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86:4554-4558, 1989.
MacArthur and Thornton, J. Mol. Biol., 218:397-412, 1991.
Majmudar et al., "Bone cell culture in a threedimensional polymer bead stabilizes the differentiated phenotype and provides evidence that osteoblastic cells synthesize type III collagen and fibronectin," J. Bone and Min. Res., 6:869-881, 1991.
Malluche et al., "1,25-dihydroxyvitamin D maintains bone cell activity, and parathyroid hormone modulates bone cell number in dogs," Endocrinology, 119:1298-1304, 1986.
Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
Massague, Annu. Rev. Cell Biol., 6:597-641, 1990.
Meller et al., "Mineral and endocrine metabolism during fracture healing in dogs," Clin. Orthop. Rel. Res., 187:289-295, 1984.
Michaelson et al., "T-cell recognition of carbohydrates on type II collagen," J. Exp. Med., 180:745-749, 1994.
Millan et al., Development, 111:131-144, 1991.
Mitlak et al., "Intermittent administration of bovine PTH-(1-34) increases serum 1,25-dihydroxyvitamin D concentrations and spinal bone density in senile (23 month) rats," J. Bone Min. Res., 7:479-484, 1992.
Miyazono and Heldin, Nature, 338:158-160, 1989.
Miyazono et al., EMBO J., 10:1091-1101, 1991.
Miyazono et al., J. Biol. Chem., 267:5668-5675, 1992.
Miyazono et al., J. Biol. Chem., 263:6407-6415, 1988.
Nicolau et al., Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:1068, 1983.
Ogawa et al., J. Biol. Chem., 267:2325-2328, 1992.
Ohlin et al., J. Biol. Chem., 263:7411-7414, 1988.
Olofsson et al., J. Biol. Chem., 267:19482-19488, 1992.
Ortman et al., "BUB/BnJ (H-2q) is a TCR deletion mutant mouse strain (TCR V beta a KJ16-) that is susceptible to type II collagen-induced arthritis," J. Immunol., 152:4175-4182, 1994.
Ozkaynak et al., "OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-b famil." EMBO J., 9:2085-2093, 1990.
Paralkar et al., "Identification and characterization of cellular binding proteins (receptors) for recombinant human bone morphogenetic protein 2B, an initiator of bone differentiation cascade," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 88:3397-3401, 1991.
Parsons and Reit, "Chronic response of dogs to parathyroid hormone infusion," Nature, 250:254-257, 1974.
Pelton et al., Development, 106:759-767, 1989.
Pelton et al., Dev. Biol., 141:456-460, 1990a.
Pelton et al., Development, 110:609-620, 1990b.
Pereira et al., Human Mol. Genet., 2:961-968, 1993.
Persson et al., J. Biol. Chem., 264:16897-16904, 1989.
Pircher et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 136:30-37, 1986.
Pircher et al., Cancer Res., 44:5538-5543, 1984.
Podbesek et al., "Effects of two treatment regimes with synthetic human parathyroid hormone fragment on bone formation and the tissue balance of trabecular bone in greyhounds," Endocrinology, 112:1000-1006, 1983.

Prockop, "Mutations that alter the primary structure of type I collagen. The perils of a system for generating large structures by the principle of nucleated growth," J. Biol. Chem., 265:15349-15352, 1990.
Quarles et al., J. Bone Min. Res., 7:683-692, 1992.
Raisz and Kream, Regulation of bone formation," N. Engl. J. Med., 309:29-35, 1983.
Reeve et al., "Anabolic effect of human parathyroid hormone fragment on trabecular bone in involutional osteoporosis: a multicentre trial," Br. Med. J., 1340-1344, 7. Juni, 1980.
Reeve et al., Anabolic effect of low doses of a fragment of human parathyroid hormone ont he skeleton in postmenopausal osteoporosis," Lancet, 1035-1038, 15. Mai, 1980.
Riond, Modulation of the anabolic effect of synthetic human parathyroid hormone fragment (1-34) in the bone of growing rats by variations in dosage regimen," Clin. Sci., 85:223-228, 1993.
Rizzoli et al., "Binding of radioiodinated parathyroid hormone to cloned bone cells," Endocrinology, 113:1832, 1983.
Roberts and Sporn, "The transforming growth factor-betas. In: Handbook of Experimental Pharmacology: Peptide Growth Factors and Their Receptors," M.B. Sporn and A.B. Roberts, Eds., Springer-Verlag, Heidelberg, 95 (Part 1): 419-472, 1990.
Roessler et al., "Adenoviral-mediated Gene Transfer to Rabbit Synovium In Vivo., " J. Clin. Invest., 92:1085-1092, 1993.
Rosen et al., "Purification and molecular cloning of a novel group of BMPs and localization of BMP mRNA in developing bone," Connect. Tissue Res., 20:313-319, 1989.
Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, S. 18.60, 1989.
Sampath and Reddi, "Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78:7599-7603, 1981.
Sampath et al., "In vitro transformation of mesenchymal cells derived from embryonic muscle into cartilage in response to extracellular matrix components of bone," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:3419-3423, 1984.
Sato et al., J. Cell Biol., 123:1249-1254, 1993.
Schluter et al., "The central part of parathyroid hormone stimulates thymidine incorporation of chondrocytes," J. Biol. Chem., 264:11087-11092, 1989.
Schnieke et al., "Embryonic lethal mutation in mice induced by retrovirus insertion into the a1(I) collagen gene," Nature, 304:315-320, 1983.
Seeger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:5849, 1984.
Seitz et al., "Effect of transforming growth factor b on parathyroid hormone receptor binding and cAMP formation in rat osteosarcoma cells," J. Bone Min. Res., 7:541-546, 1992.
Selander-Sunnerhagen et al., J. Biol. Chem., 267:19642-19649, 1992.
Selye, Endocrinology, 16:547, 1932.
Seyedin et al., J. Biol. Chem., 261:5693-5695, 1986.
Seyedin et al., J. Biol. Chem., 262:1946-1949, 1987.
Shimell et al., "The Drosophila dorsal-ventral patterning gene tolloid is related to human bone morphogenetic protein 1," Cell, 67:469-481, 1991.
Silve et al., "Parathyroid hormone receptor in intact embryonic chicken bone: characterization and cellular localization," J. Cell. Biol., 94:379, 1982.
Simons et al., "Antisense c-myb oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation in vivo, Nature, 359:67-70, 1992.
Slovik et al., "Restoration of spinal bone in osteoporotic men by treatment with human parathyroid hormone (1-34) and 1,25-dihydroxyvitamin D," J. Bone Min. Res., 1:377-381, 1986.
Somjen et al., "Stimulation of cell proliferation in skeletal tissues of the rat by defined parathyroid hormone fragments," Biochem J., 272:781-785, 1990.
Spencer et al., "Parathyroid hormone potentiates the effect of insulin-like growth factor-I on bone formation, " Acta Endocrinological (Kopenh), 121:435-442, 1989.
Stenflo et al., 1987.
Stein and Lian, Enddocr. Rev., 14:424-442, 1993.
Steiner et al., J. Biol. Chem., 267:23435-23438, 1992.
Stenflo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:368-372, 1987.
Stenman et al., Cytogenet. Cell Genet., 66:117-119, 1994.
Stevenson and Parsons, "Effects of parathyroid hormone and the synthetic 1-34 amino-terminal fragment in rats and dogs," J. Endocr., 97:21-30, 1983.
Stratford-Perricaudet et al., "Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart," J. Clin. Invest., 90:626-630, 1992.
Streuli et al., J. Cell Biol., 120:253-260, 1993.
Tada et al., Bone, 11:163-169, 1988.

Taipale et al., J. Cell Biol., 124:171-181, 1994.
Taketazu et al., Lab. Invest., 70:620-630, 1994.
Tam et al., "Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: differential effects of intermittent and continuous administration," Endocrinology, 110:506-512, 1982.
Toriumi et al., "Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor, Arch. Otolaryngol. Xead Neck Surg., 117:1101-1112, 1991.
Tregear et al., "Bovine parathyroid hormone: minimum chain length of," Endocrinology, 93:1349-1353, 1973.
Tsuji et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:8835-8839, 1990.
Twardzik et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 593:276-284, 1990.
Ulmer et al., "Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein," Science, 259:1745-1749, 1993.
Urist, "Bone formation by autoinduction," Science, 150:893-899, 1965.
Urist et al., "Bone cell differentiation and growth factors," Science, 220:680-686, 1983.
van der Plas, "Direct effect of parathyroid hormone on the proliferation of osteoblast-like cells; a possible involvement of cyclic AMP," Biochem. Biophys. Res. Comm., 129:918-925, 1985.
Van Vlasselaer et al., J. Cell Biol., 124:579-577, 1994.
Vukicevic et al., "Stimulation of the expression of osteogenic and chondrogenic phenotypes in vitro by osteogenic," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86:8793-8797, 1989.
Wakefield et al., J. Cell Biol., 105:965-975, 1987.
Wakefield et al., J. Biol. Chem., 263:7646-7654, 1988.
Wang et al., "Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation," Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:2220-2224, 1990.
Wilson et al., "Somatic gene transfer in the development of an animal model for primary hyperparathyroidism," Endocrinology, 130:2947-2954, 1992.
Wolff et al., "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo," Science, 247:1465-1468, 1990.
Wozney et al., "Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities," Science, 242:1528-1534, 1988.
Yasko et al., "The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats," J. Bone Joint Surg., 5:659-70, 1992.
Yasuda et al., "Rat parathyroid hormonelike peptide: Comparison with the human homologue and expression malignant and normal tissue," Mol. Endocrinol., 3:518-525, 1989.
Zhang et al., J. Cell Biol., 124:855-863, 1994.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN

(B) STRASSE: 3003 S. State Street
The Wolverine Tower, Room 2071

(C) ORT: Ann Arbor

(D) BUNDESLAND: Michigan

(E) LAND: United States of America

(F) POSTLEITZAHL: 48109-1280

(ii) ERFINDER: BONADIO, Jeffrey
ROESSLER, Blake J.
GOLDSTEIN, Steven A.
LIN, Wushan

(iii) TITEL DER ERFINDUNG: VERFAHREN UND ZUSAMMENSETZUNGEN FÜR DIE STIMULIERUNG VON KNOCHENZELLEN

(iv) ANZAHL DER SEQUENZEN: 18

(v) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT: Arnold, White & Durkee

(B) STRASSE: P.O. Box 4433

(C) ORT: Houston

(D) BUNDESLAND: United States of America

(F) POSTLEITZAHL: 77210

(vi) COMPUTERLESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Diskette

(B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel

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

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(vii) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: UNBEKANNT

(B) ANMELDETAG: GLEICHZEITIG HIERMIT

(C) KLASSIFICATION: UNBEKANNT

(viii) DATEN DER VORANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: US 08/316,650

(B) ANMELDETAG: 30. September 1994

(C) KLASSIFIKATION: UNBEKANNT

(A) ANMELDENUMMER: US 08/199,780

(B) ANMELDETAG: 18. Februar 1994

(C) KLASSIFIKATION: UNBEKANNT

(ix) ANGABEN ZUM VERTRETER

(A) NAME: Parker, David L.

(B) VERTRETERNUMMER: 32,165

(C) AKTENZEICHEN: UMIC009P--

(x) TELEKOMMUNIKATION:

(A) TELEFON: (512) 418-3000

(B) TELEFAX: (713) 789-2679

(C) TELEX: 79-0924

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 417 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

```
Met Ile Pro Gly Asn Arg Met Leu Met Val Val Leu Leu Cys Gln Val
 1               5                  10                  15

Leu Leu Gly Gly Ala Thr Asp Ala Ser Leu Met Pro Glu Thr Gly Lys
            20                  25                  30

Lys Lys Val Ala Glu Ile Gln Gly His Ala Gly Gly Arg Arg Ser Gly
        35                  40                  45

Gln Ser His Glu Leu Leu Arg Asp Phe Glu Ala Thr Leu Leu Gln Met
    50                  55                  60

Phe Gly Leu Arg Arg Arg Pro Gln Pro Ser Lys Ser Ala Val Ile Pro
65                  70                  75                  80

Asp Tyr Met Ser Asp Leu Tyr Arg Leu Gln Ser Gly Glu Glu Glu Glu
                85                  90                  95

Glu Glu Gln Ser Gln Gly Thr Gly Leu Glu Tyr Pro Glu Arg Pro Ala
            100                 105                 110
```

Ser Ser Ala Asn Thr Val Ser Ser Phe His His Glu Glu Glu His Leu Glu
115 120 125

Asn Ile Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ser Ala Phe Arg Phe Phe Phe Asn
130 135 140

Leu Ser Ser Ile Pro Glu Asn Glu Val Ile Ser Ser Ala Glu Leu Arg
145 150 155 160

Leu Phe Arg Glu Gln Val Asp Gln Gly Pro Asp Trp Glu Gln Gly Phe
165 170 175

His Arg Met Asn Ile Tyr Glu Val Met Lys Pro Pro Ala Glu Met Val
180 185 190

Pro Gly His Leu Ile Thr Arg Leu Leu Asp Thr Ser Leu Val Arg His
195 200 205

Asn Val Thr Arg Trp Glu Thr Phe Asp Val Ser Pro Ala Val Leu Arg
210 215 220

Trp Thr Arg Glu Lys Gln Pro Asn Tyr Gly Leu Ala Ile Glu Val Thr
225 230 235 240

His Leu His Gln Thr Arg Thr His Gln Gly Gln His Val Ser Ile Ser
245 250 255

Arg Ser Leu Pro Gln Gly Ser Gly Asn Trp Ala Gln Leu Arg Pro Leu
260 265 270

Leu Val Thr Phe Gly His Asp Gly Arg Gly His Thr Leu Thr Arg Arg
275 280 285

Ser Ala Lys Arg Ser Pro Lys His His Pro Gln Arg Ser Ser Lys Lys
290 295 300

Asn Lys Asn Cys Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val
305 310 315 320

Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr Gln Ala Phe Tyr
325 330 335

Cys His Gly Asp Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr
340 345 350

Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Ser Ile
355 360 365

```
Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu
370                 375                 380

Tyr Leu Asp Glu Tyr Asp Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Glu Met
385                 390                 395                 400

Val Val Glu Gly Cys Gly Cys Arg Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr
                405                 410                 415

Ala
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 3753 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1..3753

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

```
ATG CGC CAG GCC GCA TTG GGG CTG CTG GCA CTA CTC CTG CTG GCG CTG        48
Met Arg Gln Ala Ala Leu Gly Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Leu
  1               5                  10                  15

CTG GGC CCC GGC GGC CGA GGG GTG GGC CGG CCG GGC AGC GGG GCA CAG        96
Leu Gly Pro Gly Gly Arg Gly Val Gly Arg Pro Gly Ser Gly Ala Gln
            20                  25                  30

GCG GGG GCG GGG CGC TGG GCC CAA CGC TTC AAG GTG GTC TTT GCG CCT       144
Ala Gly Ala Gly Arg Trp Ala Gln Arg Phe Lys Val Val Phe Ala Pro
        35                  40                  45

GTG ATC TGC AAG CGG ACC TGT CTG AAG GGC CAG TGT CGG GAC AGC TGT       192
Val Ile Cys Lys Arg Thr Cys Leu Lys Gly Gln Cys Arg Asp Ser Cys
    50                  55                  60
```

```
CAG CAG GGC TCC AAC ATG ACG CTC ATC GGA GAG AAC GGC CAC AGC ACC      240
Gln Gln Gly Ser Asn Met Thr Leu Ile Gly Glu Asn Gly His Ser Thr
 65                  70                  75                  80

GAC ACG CTC ACC GGT TCT GCC TTC CGC GTG GTG GTG TGC CCT CTA CCC      288
Asp Thr Leu Thr Gly Ser Ala Phe Arg Val Val Val Cys Pro Leu Pro
                 85                  90                  95

TGC ATG AAC GGT GGC CAG TGC TCT TCC CGA AAC CAG TGC CTG TGT CCC      336
Cys Met Asn Gly Gly Gln Cys Ser Ser Arg Asn Gln Cys Leu Cys Pro
            100                 105                 110

CCG GAT TTC ACG GGG CGC TTC TGC CAG GTG CCT GCT GCA GGA ACC GGA      384
Pro Asp Phe Thr Gly Arg Phe Cys Gln Val Pro Ala Ala Gly Thr Gly
        115                 120                 125

GCT GGC ACC GGG AGT TCA GGC CCC GGC TGG CCC GAC CGG GCC ATG TCC      432
Ala Gly Thr Gly Ser Ser Gly Pro Gly Trp Pro Asp Arg Ala Met Ser
    130                 135                 140

ACA GGC CCG CTG CCG CCC CTT GCC CCA GAA GGA GAG TCT GTG GCT AGC      480
Thr Gly Pro Leu Pro Pro Leu Ala Pro Glu Gly Glu Ser Val Ala Ser
145                 150                 155                 160
```

```
AAA CAC GCC ATT TAC GCG GTG CAG GTG ATC GCA GAT CCT CCC GGG CCG      528
Lys His Ala Ile Tyr Ala Val Gln Val Ile Ala Asp Pro Pro Gly Pro
                165                 170                 175

GGG GAG GGT CCT CCT GCA CAA CAT GCA GCC TTC TTG GTG CCC CTG GGG      576
Gly Glu Gly Pro Pro Ala Gln His Ala Ala Phe Leu Val Pro Leu Gly
            180                 185                 190

CCA GGA CAA ATC TCG GCA GAA GTG CAG GCT CCG CCC CCC GTG GTG AAC      624
Pro Gly Gln Ile Ser Ala Glu Val Gln Ala Pro Pro Pro Val Val Asn
        195                 200                 205

GTG CGT GTC CAT CAC CCT CCT GAA GCT TCC GTT CAG GTG CAC CGC ATC      672
Val Arg Val His His Pro Pro Glu Ala Ser Val Gln Val His Arg Ile
    210                 215                 220

GAG GGG CCG AAC GCT GAA GGC CCA GCC TCT TCC CAG CAC TTG CTG CCG      720
Glu Gly Pro Asn Ala Glu Gly Pro Ala Ser Ser Gln His Leu Leu Pro
225                 230                 235                 240

CAT CCC AAG CCC CCG CAC CCG AGG CCA CCC ACT CAA AAG CCA CTG GGC      768
His Pro Lys Pro Pro His Pro Arg Pro Pro Thr Gln Lys Pro Leu Gly
                245                 250                 255
```

```
CGC TGC TTC CAG GAC ACA TTG CCC AAG CAG CCT TGT GGC AGC AAC CCT      816
Arg Cys Phe Gln Asp Thr Leu Pro Lys Gln Pro Cys Gly Ser Asn Pro
            260                 265                 270

TTG CCT GGC CTT ACC AAG CAG GAA GAT TGC TGC GGT AGC ATC GGT ACT      864
Leu Pro Gly Leu Thr Lys Gln Glu Asp Cys Cys Gly Ser Ile Gly Thr
        275                 280                 285

GCC TGG GGA CAA AGC AAG TGT CAC AAG TGC CCA CAG CTT CAG TAT ACA      912
Ala Trp Gly Gln Ser Lys Cys His Lys Cys Pro Gln Leu Gln Tyr Thr
    290                 295                 300

GGG GTG CAG AAG CCT GTA CCT GTA CGT GGG GAG GTG GGT GCT GAC TGC      960
Gly Val Gln Lys Pro Val Pro Val Arg Gly Glu Val Gly Ala Asp Cys
305                 310                 315                 320

CCC CAG GGC TAC AAG AGG CTC AAC AGC ACC CAC TGC CAG GAT ATC AAC     1008
Pro Gln Gly Tyr Lys Arg Leu Asn Ser Thr His Cys Gln Asp Ile Asn
                325                 330                 335

GAA TGT GCG ATG CCC GGG AAT GTG TGC CAT GGT GAC TGC CTC AAC AAC     1056
Glu Cys Ala Met Pro Gly Asn Val Cys His Gly Asp Cys Leu Asn Asn
            340                 345                 350
```

```
CCT GGC TCT TAT CGC TGT GTC TGC CCG CCC GGT CAT AGC TTG GGT CCC      1104
Pro Gly Ser Tyr Arg Cys Val Cys Pro Pro Gly His Ser Leu Gly Pro
        355                 360                 365

CTC GCA GCA CAG TGC ATT GCC GAC AAA CCA GAG GAG AAG AGC CTG TGT      1152
Leu Ala Ala Gln Cys Ile Ala Asp Lys Pro Glu Glu Lys Ser Leu Cys
    370                 375                 380

TTC CGC CTT GTG AGC ACC GAA CAC CAG TGC CAG CAC CCT CTG ACC ACA      1200
Phe Arg Leu Val Ser Thr Glu His Gln Cys Gln His Pro Leu Thr Thr
385                 390                 395                 400

CGC CTA ACC CGC CAG CTC TGC TGC TGT AGT GTG GGT AAA GCC TGG GGT      1248
Arg Leu Thr Arg Gln Leu Cys Cys Cys Ser Val Gly Lys Ala Trp Gly
                405                 410                 415

GCC CGG TGC CAG CGC TGC CCG GCA GAT GGT ACA GCA GCC TTC AAG GAG      1296
Ala Arg Cys Gln Arg Cys Pro Ala Asp Gly Thr Ala Ala Phe Lys Glu
            420                 425                 430

ATC TGC CCC GGC TGG GAA AGG GTA CCA TAT CCT CAC CTC CCA CCA GAC      1344
Ile Cys Pro Gly Trp Glu Arg Val Pro Tyr Pro His Leu Pro Pro Asp
        435                 440                 445
```


DE 695 13 149 T3 2006.07.20

```
GCT CAC CAT CCA GGG GGA AAG CGA CTT CTC CCT CTT CCT GCA CCC GAC      1392
Ala His His Pro Gly Gly Lys Arg Leu Leu Pro Leu Pro Ala Pro Asp
    450                 455                 460

GGG CCA CCC AAA CCC CAG CAG CTT CCT GAA AGC CCC AGC CGA GCA CCA      1440
Gly Pro Pro Lys Pro Gln Gln Leu Pro Glu Ser Pro Ser Arg Ala Pro
465                 470                 475                 480

CCC CTC GAG GAC ACA GAG GAA GAG AGA GGA GTG ACC ATG GAT CCA CCA      1488
Pro Leu Glu Asp Thr Glu Glu Glu Arg Gly Val Thr Met Asp Pro Pro
                485                 490                 495

GTG AGT GAG GAG CGA TCG GTG CAG CAG AGC CAC CCC ACT ACC ACC ACC      1536
Val Ser Glu Glu Arg Ser Val Gln Gln Ser His Pro Thr Thr Thr Thr
            500                 505                 510

TCA CCC CCC CGG CCT TAC CCA GAG CTC ATC TCT CGC CCC TCC CCA CCT      1584
Ser Pro Pro Arg Pro Tyr Pro Glu Leu Ile Ser Arg Pro Ser Pro Pro
        515                 520                 525

ACC TTC CAC CGG TTC CTG CCA GAC TTG CCC CCA TCC CGA AGT GCA GTG      1632
Thr Phe His Arg Phe Leu Pro Asp Leu Pro Pro Ser Arg Ser Ala Val
    530                 535                 540
```


DE 695 13 149 T3 2006.07.20

```
GAG ATC GCC CCC ACT CAG GTC ACA GAG ACC GAT GAG TGC CGA TTG AAC   1680
Glu Ile Ala Pro Thr Gln Val Thr Glu Thr Asp Glu Cys Arg Leu Asn
545                 550                 555                 560

CAG AAT ATC TGT GGC CAT GGA CAG TGT GTG CCT GGC CCC TCG GAT TAC   1728
Gln Asn Ile Cys Gly His Gly Gln Cys Val Pro Gly Pro Ser Asp Tyr
                565                 570                 575

TCC TGC CAC TGC AAC GCT GGC TAC CGG TCA CAC CCG CAG CAC CGC TAC   1776
Ser Cys His Cys Asn Ala Gly Tyr Arg Ser His Pro Gln His Arg Tyr
            580                 585                 590

TGT GTT GAT GTG AAC GAG TGC GAG GCA GAG CCC TGC GGC CCC GGG AAA   1824
Cys Val Asp Val Asn Glu Cys Glu Ala Glu Pro Cys Gly Pro Gly Lys
        595                 600                 605

GGC ATC TGT ATG AAC ACT GGT GGC TCC TAC AAT TGT CAC TGC AAC CGA   1872
Gly Ile Cys Met Asn Thr Gly Gly Ser Tyr Asn Cys His Cys Asn Arg
    610                 615                 620

GGC TAC CGC CTC CAC GTG GGT GCA GGG GGC CGC TCG TGC GTG GAC CTG   1920
Gly Tyr Arg Leu His Val Gly Ala Gly Gly Arg Ser Cys Val Asp Leu
625                 630                 635                 640
```

```
AAC GAG TGC GCC AAG CCT CAC CTG TGT GGG GAC GGT GGC TTC TGC ATC      1968
Asn Glu Cys Ala Lys Pro His Leu Cys Gly Asp Gly Gly Phe Cys Ile
                645                 650                 655

AAC TTC CCT GGT CAC TAC AAA TGC AAC TGC TAT CCT GGC TAC CGG CTC      2016
Asn Phe Pro Gly His Tyr Lys Cys Asn Cys Tyr Pro Gly Tyr Arg Leu
            660                 665                 670

AAG GCC TCC CGA CCG CCC ATT TGC GAA GAC ATC GAC GAG TGT CGC GAC      2064
Lys Ala Ser Arg Pro Pro Ile Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Asp
        675                 680                 685

CCT AGC ACC TGC CCT GAT GGC AAA TGT GAA AAC AAA CCT GGC AGC TTC      2112
Pro Ser Thr Cys Pro Asp Gly Lys Cys Glu Asn Lys Pro Gly Ser Phe
    690                 695                 700

AAG TGC ATC GCC TGC CAG CCT GGC TAC CGT AGC CAG GGG GGC GGG GCC      2160
Lys Cys Ile Ala Cys Gln Pro Gly Tyr Arg Ser Gln Gly Gly Gly Ala
705                 710                 715                 720

TGT CGT GAT GTC AAC GAA TGC TCC GAA GGT ACC CCC TGC TCT CCT GGA      2208
Cys Arg Asp Val Asn Glu Cys Ser Glu Gly Thr Pro Cys Ser Pro Gly
                725                 730                 735
```

```
TGG TGT GAG AAA CTT CCG GGT TCT TAC CGT TGC ACG TGT GCC CAG GGG      2256
Trp Cys Glu Lys Leu Pro Gly Ser Tyr Arg Cys Thr Cys Ala Gln Gly
            740                 745                 750

ATA CGA ACC CGC ACA GGA CGC CTC AGT TGC ATA GAC GTG GAT GAC TGT      2304
Ile Arg Thr Arg Thr Gly Arg Leu Ser Cys Ile Asp Val Asp Asp Cys
        755                 760                 765

GAG GCT GGG AAA GTG TGC CAA GAT GGC ATC TGC ACG AAC ACA CCA GGC      2352
Glu Ala Gly Lys Val Cys Gln Asp Gly Ile Cys Thr Asn Thr Pro Gly
    770                 775                 780

TCT TTC CAG TGT CAG TGC CTC TCC GGC TAT CAT CTG TCA AGG GAT CGG      2400
Ser Phe Gln Cys Gln Cys Leu Ser Gly Tyr His Leu Ser Arg Asp Arg
785                 790                 795                 800

AGC CGC TGT GAG GAC ATT GAT GAA TGT GAC TTC CCT GCG GCC TGC ATC      2448
Ser Arg Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys Asp Phe Pro Ala Ala Cys Ile
                805                 810                 815

GGG GGT GAC TGC ATC AAT ACC AAT GGT TCC TAC AGA TGT CTC TGT CCC      2496
Gly Gly Asp Cys Ile Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Arg Cys Leu Cys Pro
            820                 825                 830
```

```
CTG GGT CAT CGG TTG GTG GGC GGC AGG AAG TGC AAG AAA GAT ATA GAT      2544
Leu Gly His Arg Leu Val Gly Gly Arg Lys Cys Lys Lys Asp Ile Asp
        835                 840                 845

GAG TGC AGC CAG GAC CCA GGC CTG TGC CTG CCC CAT GCC TGC GAG AAC      2592
Glu Cys Ser Gln Asp Pro Gly Leu Cys Leu Pro His Ala Cys Glu Asn
    850                 855                 860

CTC CAG GGC TCC TAT GTC TGT GTC TGT GAT GAG GGT TTC ACA CTC ACC      2640
Leu Gln Gly Ser Tyr Val Cys Val Cys Asp Glu Gly Phe Thr Leu Thr
865                 870                 875                 880

CAG GAC CAG CAT GGG TGT GAG GAG GTG GAG CAG CCC CAC CAC AAG AAG      2688
Gln Asp Gln His Gly Cys Glu Glu Val Glu Gln Pro His His Lys Lys
                885                 890                 895

GAG TGC TAC CTT AAC TTC GAT GAC ACA GTG TTC TGT GAC AGC GTA TTG      2736
Glu Cys Tyr Leu Asn Phe Asp Asp Thr Val Phe Cys Asp Ser Val Leu
            900                 905                 910

GCT ACC AAT GTC ACT CAG CAG GAA TGC TGT TGC TCT CTG GGA GCT GGC      2784
Ala Thr Asn Val Thr Gln Gln Glu Cys Cys Cys Ser Leu Gly Ala Gly
        915                 920                 925
```


DE 695 13 149 T3 2006.07.20

```
TGG GGA GAC CAC TGC GAA ATC TAT CCC TGT CCA GTC TAC AGC TCA GCC      2832
Trp Gly Asp His Cys Glu Ile Tyr Pro Cys Pro Val Tyr Ser Ser Ala
    930                 935                 940

GAA TTT CAC AGC CTG GTG CCT GAT GGG AAA AGG CTA CAC TCA GGA CAA      2880
Glu Phe His Ser Leu Val Pro Asp Gly Lys Arg Leu His Ser Gly Gln
945                 950                 955                 960

CAA CAT TGT GAA CTA TGC ATT CCT GCC CAC CGT GAC ATC GAC GAA TGC      2928
Gln His Cys Glu Leu Cys Ile Pro Ala His Arg Asp Ile Asp Glu Cys
                965                 970                 975

ATA TTG TTT GGG GCA GAG ATC TGC AAG GAG GGC AAG TGT GTG AAC TCG      2976
Ile Leu Phe Gly Ala Glu Ile Cys Lys Glu Gly Lys Cys Val Asn Ser
            980                 985                 990

CAG CCC GGC TAC GAG TGC TAC TGC AAG CAG GGC TTC TAC TAC GAT GGC      3024
Gln Pro Gly Tyr Glu Cys Tyr Cys Lys Gln Gly Phe Tyr Tyr Asp Gly
        995                 1000                1005

AAC CTG CTG GAG TGC GTG GAC GTG GAC GAG TGC TTG GAT GAG TCT AAC      3072
Asn Leu Leu Glu Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Leu Asp Glu Ser Asn
    1010                1015                1020
```

```
TGC AGG AAC GGA GTG TGT GAG AAC ACG TGG CGG CTA CCG TGT GCC TGC      3120
Cys Arg Asn Gly Val Cys Glu Asn Thr Trp Arg Leu Pro Cys Ala Cys
1025                1030                1035                1040

ACT CCG CCG GCA GAG TAC AGT CCC GCA CAG GCC CAG TGT CTG ATC CCG      3168
Thr Pro Pro Ala Glu Tyr Ser Pro Ala Gln Ala Gln Cys Leu Ile Pro
                1045                1050                1055

GAG AGA TGG AGC ACG CCC CAG AGA GAC GTG AAG TGT GCT GGG GCC AGC      3216
Glu Arg Trp Ser Thr Pro Gln Arg Asp Val Lys Cys Ala Gly Ala Ser
            1060                1065                1070

GAG GAG AGG ACG GCA TGT GTA TGG GGC CCC TGG GCG GGA CCT GCC CTC      3264
Glu Glu Arg Thr Ala Cys Val Trp Gly Pro Trp Ala Gly Pro Ala Leu
        1075                1080                1085

ACT TTT GAT GAC TGC TGC TGC CGC CAG CCG CGG CTG GGT ACC CAG TGC      3312
Thr Phe Asp Asp Cys Cys Cys Arg Gln Pro Arg Leu Gly Thr Gln Cys
    1090                1095                1100

AGA CCG TGC CCG CCA CGT GGC ACC GGG TCC CAG TGC CCG ACT TCA CAG      3360
Arg Pro Cys Pro Pro Arg Gly Thr Gly Ser Gln Cys Pro Thr Ser Gln
1105                1110                1115                1120
```


DE 695 13 149 T3 2006.07.20

```
AGT GAG AGC AAT TCT TTC TGG GAC ACA AGC CCC CTG CTA CTG GGG AAG      3408
Ser Glu Ser Asn Ser Phe Trp Asp Thr Ser Pro Leu Leu Leu Gly Lys
                1125                1130                1135

TCT CCG CGA GAC GAA GAC AGC TCA GAG GAG GAT TCA GAT GAG TGC CGT      3456
Ser Pro Arg Asp Glu Asp Ser Ser Glu Glu Asp Ser Asp Glu Cys Arg
            1140                1145                1150

TGT GTG AGC GGA CCG TGT GTG CCA CGG CCA GGC GGG GCG GTA TGC GAG      3504
Cys Val Ser Gly Pro Cys Val Pro Arg Pro Gly Gly Ala Val Cys Glu
        1155                1160                1165

TGT CCT GGA GGC TTT CAG CTG GAC GCC TCC CGT GCC CGC TGC GTG GAC      3552
Cys Pro Gly Gly Phe Gln Leu Asp Ala Ser Arg Ala Arg Cys Val Asp
    1170                1175                1180

ATT GAT GAG TGC CGA GAA CTG AAC CAG CGG GGA CTG CTG TGT AAG AGC      3600
Ile Asp Glu Cys Arg Glu Leu Asn Gln Arg Gly Leu Leu Cys Lys Ser
1185                1190                1195                1200

GAG CGG TGC GTG AAC ACC AGT GGA TCC TTC CGC TGT GTC TGC AAA GCT      3648
Glu Arg Cys Val Asn Thr Ser Gly Ser Phe Arg Cys Val Cys Lys Ala
                1205                1210                1215
```


DE 695 13 149 T3 2006.07.20

```
GGC TTC ACG CGC AGC CGC CCT CAC GGG CCT GCG TGC CTC AGC GCC GCC      3696
Gly Phe Thr Arg Ser Arg Pro His Gly Pro Ala Cys Leu Ser Ala Ala
          1220                1225                1230

GCT GAT GAT GCA GCC ATA GCC CAC ACC TCA GTG ATC GAT CAT CGA GGG      3744
Ala Asp Asp Ala Ala Ile Ala His Thr Ser Val Ile Asp His Arg Gly
      1235                1240                1245

TAT TTT CAC                                                         3753
Tyr Phe His
    1250
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1251 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

```
Met Arg Gln Ala Ala Leu Gly Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Leu
 1               5                  10                  15

Leu Gly Pro Gly Gly Arg Gly Val Gly Arg Pro Gly Ser Gly Ala Gln
            20                  25                  30

Ala Gly Ala Gly Arg Trp Ala Gln Arg Phe Lys Val Val Phe Ala Pro
        35                  40                  45

Val Ile Cys Lys Arg Thr Cys Leu Lys Gly Gln Cys Arg Asp Ser Cys
    50                  55                  60

Gln Gln Gly Ser Asn Met Thr Leu Ile Gly Glu Asn Gly His Ser Thr
65                  70                  75                  80

Asp Thr Leu Thr Gly Ser Ala Phe Arg Val Val Val Cys Pro Leu Pro
                85                  90                  95

Cys Met Asn Gly Gly Gln Cys Ser Ser Arg Asn Gln Cys Leu Cys Pro
            100                 105                 110

Pro Asp Phe Thr Gly Arg Phe Cys Gln Val Pro Ala Ala Gly Thr Gly
        115                 120                 125
```

```
Ala Gly Thr Gly Ser Ser Gly Pro Gly Trp Pro Asp Arg Ala Met Ser
 130                 135                 140

Thr Gly Pro Leu Pro Pro Leu Ala Pro Glu Gly Glu Ser Val Ala Ser
145                 150                 155                 160

Lys His Ala Ile Tyr Ala Val Gln Val Ile Ala Asp Pro Pro Gly Pro
                165                 170                 175

Gly Glu Gly Pro Pro Ala Gln His Ala Ala Phe Leu Val Pro Leu Gly
            180                 185                 190

Pro Gly Gln Ile Ser Ala Glu Val Gln Ala Pro Pro Pro Val Val Asn
        195                 200                 205

Val Arg Val His His Pro Pro Glu Ala Ser Val Gln Val His Arg Ile
    210                 215                 220

Glu Gly Pro Asn Ala Glu Gly Pro Ala Ser Ser Gln His Leu Leu Pro
225                 230                 235                 240

His Pro Lys Pro Pro His Pro Arg Pro Pro Thr Gln Lys Pro Leu Gly
                245                 250                 255
```

Arg Cys Phe Gln Asp Thr Leu Pro Lys Gln Pro Cys Gly Ser Asn Pro
260 265 270

Leu Pro Gly Leu Thr Lys Gln Glu Asp Cys Cys Gly Ser Ile Gly Thr
275 280 285

Ala Trp Gly Gln Ser Lys Cys His Lys Cys Pro Gln Leu Gln Tyr Thr
290 295 300

Gly Val Gln Lys Pro Val Pro Val Arg Gly Glu Val Gly Ala Asp Cys
305 310 315 320

Pro Gln Gly Tyr Lys Arg Leu Asn Ser Thr His Cys Gln Asp Ile Asn
325 330 335

Glu Cys Ala Met Pro Gly Asn Val Cys His Gly Asp Cys Leu Asn Asn
340 345 350

Pro Gly Ser Tyr Arg Cys Val Cys Pro Pro Gly His Ser Leu Gly Pro
355 360 365

Leu Ala Ala Gln Cys Ile Ala Asp Lys Pro Glu Glu Lys Ser Leu Cys
370 375 380

Phe Arg Leu Val Ser Thr Glu His Gln Cys Gln His Pro Leu Thr Thr
385 390 395 400

Arg Leu Thr Arg Gln Leu Cys Cys Cys Ser Val Gly Lys Ala Trp Gly
405 410 415

Ala Arg Cys Gln Arg Cys Pro Ala Asp Gly Thr Ala Ala Phe Lys Glu
420 425 430

Ile Cys Pro Gly Trp Glu Arg Val Pro Tyr Pro His Leu Pro Pro Asp
435 440 445

Ala His His Pro Gly Gly Lys Arg Leu Leu Pro Leu Pro Ala Pro Asp
450 455 460

Gly Pro Pro Lys Pro Gln Gln Leu Pro Glu Ser Pro Ser Arg Ala Pro
465 470 475 480

Pro Leu Glu Asp Thr Glu Glu Glu Arg Gly Val Thr Met Asp Pro Pro
485 490 495

Val Ser Glu Glu Arg Ser Val Gln Gln Ser His Pro Thr Thr Thr Thr
500 505 510

```
Ser Pro Pro Arg Pro Tyr Pro Glu Leu Ile Ser Arg Pro Ser Pro Pro
515                 520                 525

Thr Phe His Arg Phe Leu Pro Asp Leu Pro Pro Ser Arg Ser Ala Val
530                 535                 540

Glu Ile Ala Pro Thr Gln Val Thr Glu Thr Asp Glu Cys Arg Leu Asn
545                 550                 555                 560

Gln Asn Ile Cys Gly His Gly Gln Cys Val Pro Gly Pro Ser Asp Tyr
                565                 570                 575

Ser Cys His Cys Asn Ala Gly Tyr Arg Ser His Pro Gln His Arg Tyr
            580                 585                 590

Cys Val Asp Val Asn Glu Cys Glu Ala Glu Pro Cys Gly Pro Gly Lys
        595                 600                 605

Gly Ile Cys Met Asn Thr Gly Gly Ser Tyr Asn Cys His Cys Asn Arg
    610                 615                 620

Gly Tyr Arg Leu His Val Gly Ala Gly Arg Ser Cys Val Asp Leu
625                 630                 635                 640
```

Asn Glu Cys Ala Lys Pro His Leu Cys Gly Asp Gly Gly Phe Cys Ile
645 650 655

Asn Phe Pro Gly His Tyr Lys Cys Asn Cys Tyr Pro Gly Tyr Arg Leu
660 665 670

Lys Ala Ser Arg Pro Pro Ile Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys Arg Asp
675 680 685

Pro Ser Thr Cys Pro Asp Gly Lys Cys Glu Asn Lys Pro Gly Ser Phe
690 695 700

Lys Cys Ile Ala Cys Gln Pro Gly Tyr Arg Ser Gln Gly Gly Gly Ala
705 710 715 720

Cys Arg Asp Val Asn Glu Cys Ser Glu Gly Thr Pro Cys Ser Pro Gly
725 730 735

Trp Cys Glu Lys Leu Pro Gly Ser Tyr Arg Cys Thr Cys Ala Gln Gly
740 745 750

Ile Arg Thr Arg Thr Gly Arg Leu Ser Cys Ile Asp Val Asp Asp Cys
755 760 765

```
Glu Ala Gly Lys Val Cys Gln Asp Gly Ile Cys Thr Asn Thr Pro Gly
 770                 775                 780

Ser Phe Gln Cys Gln Cys Leu Ser Gly Tyr His Leu Ser Arg Asp Arg
785                 790                 795                 800

Ser Arg Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys Asp Phe Pro Ala Ala Cys Ile
                805                 810                 815

Gly Gly Asp Cys Ile Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Arg Cys Leu Cys Pro
            820                 825                 830

Leu Gly His Arg Leu Val Gly Gly Arg Lys Cys Lys Lys Asp Ile Asp
        835                 840                 845

Glu Cys Ser Gln Asp Pro Gly Leu Cys Leu Pro His Ala Cys Glu Asn
    850                 855                 860

Leu Gln Gly Ser Tyr Val Cys Val Cys Asp Glu Gly Phe Thr Leu Thr
865                 870                 875                 880

Gln Asp Gln His Gly Cys Glu Glu Val Glu Gln Pro His His Lys Lys
                885                 890                 895
```

Glu Cys Tyr Leu Asn Phe Asp Asp Thr Val Phe Cys Asp Ser Val Leu
900 905 910

Ala Thr Asn Val Thr Gln Gln Glu Cys Cys Cys Ser Leu Gly Ala Gly
915 920 925

Trp Gly Asp His Cys Glu Ile Tyr Pro Cys Pro Val Tyr Ser Ser Ala
930 935 940

Glu Phe His Ser Leu Val Pro Asp Gly Lys Arg Leu His Ser Gly Gln
945 950 955 960

Gln His Cys Glu Leu Cys Ile Pro Ala His Arg Asp Ile Asp Glu Cys
965 970 975

Ile Leu Phe Gly Ala Glu Ile Cys Lys Glu Gly Lys Cys Val Asn Ser
980 985 990

Gln Pro Gly Tyr Glu Cys Tyr Cys Lys Gln Gly Phe Tyr Tyr Asp Gly
995 1000 1005

Asn Leu Leu Glu Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Leu Asp Glu Ser Asn
1010 1015 1020

Cys Arg Asn Gly Val Cys Glu Asn Thr Trp Arg Leu Pro Cys Ala Cys
1025 1030 1035 1040

Thr Pro Pro Ala Glu Tyr Ser Pro Ala Gln Ala Gln Cys Leu Ile Pro
1045 1050 1055

Glu Arg Trp Ser Thr Pro Gln Arg Asp Val Lys Cys Ala Gly Ala Ser
1060 1065 1070

Glu Glu Arg Thr Ala Cys Val Trp Gly Pro Trp Ala Gly Pro Ala Leu
1075 1080 1085

Thr Phe Asp Asp Cys Cys Cys Arg Gln Pro Arg Leu Gly Thr Gln Cys
1090 1095 1100

Arg Pro Cys Pro Pro Arg Gly Thr Gly Ser Gln Cys Pro Thr Ser Gln
1105 1110 1115 1120

Ser Glu Ser Asn Ser Phe Trp Asp Thr Ser Pro Leu Leu Leu Gly Lys
1125 1130 1135

Ser Pro Arg Asp Glu Asp Ser Ser Glu Glu Asp Ser Asp Glu Cys Arg
1140 1145 1150

Cys Val Ser Gly Pro Cys Val Pro Arg Pro Gly Gly Ala Val Cys Glu
1155 1160 1165

Cys Pro Gly Gly Phe Gln Leu Asp Ala Ser Arg Ala Arg Cys Val Asp
1170 1175 1180

Ile Asp Glu Cys Arg Glu Leu Asn Gln Arg Gly Leu Leu Cys Lys Ser
1185 1190 1195 1200

Glu Arg Cys Val Asn Thr Ser Gly Ser Phe Arg Cys Val Cys Lys Ala
1205 1210 1215

Gly Phe Thr Arg Ser Arg Pro His Gly Pro Ala Cys Leu Ser Ala Ala
1220 1225 1230

Ala Asp Asp Ala Ala Ile Ala His Thr Ser Val Ile Asp His Arg Gly
1235 1240 1245

Tyr Phe His
1250

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

AACATGACGC TCATCGGAGA GAAC 24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 18 Basenpaare
(C) ART: Nukleinsäure
(D) STRANGFORM: Einzelstrang
(E) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

AGGTGATCGC AGATCCTC 18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

TACCGATGCT ACCGCAGCAA TCTT 24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 22 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

ATGCCTAAAC TCTACCAGCA CG 22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:8

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 22 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

GAGTCACGTC ATCCATTCCA CA 22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 22 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:

CGTCCAAGTT GTGTCTTAGC AG 22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 53 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:

```
Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Ala Thr Gly Pro Leu Gly Pro Lys Gly
1               5                  10                  15

Gln Thr Gly Glu Pro Gly Ile Ala Gly Phe Lys Gly Glu Gln Gly Pro
            20                  25                  30

Lys Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly Pro Gln Gly Ala Pro Gly Pro Ala
        35                  40                  45

Gly Glu Glu Gly Lys
    50
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 159 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:11:

```
GGCCCTCCCG GTCCTCAAGG TGCAACTGGT CCTCTGGGCC CCAAAGGTCA GACGGGTGAG    60

CCCGGCATCG CTGGCTTCAA AGGTGAACAA GGCCCCAAGG GAGAGACTGG ACCTGCTGGG   120

CCCCAGGGAG CCCCTGGCCC TGCTGGTGAA GAAGGAAAA                        159
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 1442 Basenpaare
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:12:

```
Met Ile Arg Leu Gly Ala Pro Gln Ser Leu Val Leu Leu Thr Leu Leu
 1               5                  10                  15

Ile Ala Ala Val Leu Arg Cys Gln Gly Gln Asp Ala Gln Glu Ala Gly
            20                  25                  30

Ser Cys Leu Gln Asn Gly Gln Arg Tyr Lys Asp Lys Asp Val Trp Lys
        35                  40                  45

Pro Ser Ser Cys Arg Ile Cys Val Cys Asp Thr Gly Asn Val Leu Cys
    50                  55                  60

Asp Asp Ile Ile Cys Glu Asp Pro Asp Cys Leu Asn Pro Glu Ile Pro
65                  70                  75                  80

Phe Gly Glu Cys Cys Pro Ile Cys Pro Pro Ala Asp Leu Ala Thr Ala Ser
                85                  90                  95

Gly Arg Lys Leu Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Glu Pro Gly Asp Ile
            100                 105                 110

Arg Asp Gly Pro Ala Gly Glu Gln Gly Pro Arg Gly Asp Arg Gly Asp
        115                 120                 125
```

```
Lys Gly Glu Lys Asn Phe Ala Ala Gln Met Ala Gly Gly Tyr Asp Glu
 130                 135                 140

Lys Ala Gly Gly Ala Gln Met Gly Val Met Gln Gly Pro Met Gly Pro
145                 150                 155                 160

Met Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Ala Pro Gly Pro Gln
                165                 170                 175

Gly Phe Gln Gly Asn Pro Gly Glu Pro Gly Glu Pro Gly Val Ser Gly
            180                 185                 190

Pro Met Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Lys Pro Gly Asp
        195                 200                 205

Asp Gly Glu Ala Gly Lys Pro Gly Lys Ser Gly Glu Arg Gly Leu Pro
    210                 215                 220

Gly Pro Met Gly Ala Arg Gly Phe Pro Gly Thr Pro Gly Leu Pro Gly
225                 230                 235                 240

Val Lys Gly His Arg Gly Tyr Pro Gly Leu Asp Gly Ala Lys Gly Glu
                245                 250                 255
```

Ala Gly Ala Pro Gly Val Lys Gly Glu Ser Gly Ser Pro Gly Glu Asn
260 265 270

Gly Ser Pro Gly Pro Met Gly Pro Arg Gly Leu Pro Gly Glu Arg Gly
275 280 285

Arg Thr Gly Pro Ala Gly Ala Ala Gly Ala Arg Gly Asn Asp Gly Gln
290 295 300

Pro Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Pro Val Gly Pro Ala Gly Gly Pro
305 310 315 320

Gly Phe Pro Gly Ala Pro Gly Ala Lys Gly Glu Ala Gly Pro Thr Gly
325 330 335

Ala Arg Gly Pro Glu Gly Ala Gln Gly Ser Arg Gly Glu Pro Gly Asn
340 345 350

Pro Gly Ser Pro Gly Pro Ala Gly Ala Ser Gly Asn Pro Gly Thr Asp
355 360 365

Gly Ile Pro Gly Ala Lys Gly Ser Ala Gly Ala Pro Gly Ile Ala Gly
370 375 380

Ala Pro Gly Phe Pro Gly Pro Arg Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Ala
385 390 395 400

Thr Gly Pro Leu Gly Pro Lys Gly Gln Ala Gly Glu Pro Gly Ile Ala
405 410 415

Gly Phe Lys Gly Asp Gln Gly Pro Lys Gly Glu Thr Gly Pro Ala Gly
420 425 430

Pro Gln Gly Ala Pro Gly Pro Ala Gly Glu Glu Gly Lys Arg Gly Ala
435 440 445

Arg Gly Glu Pro Gly Gly Ala Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Glu Arg
450 455 460

Gly Ala Pro Gly Asn Arg Gly Phe Pro Gly Gln Asp Gly Leu Ala Gly
465 470 475 480

Pro Lys Gly Ala Pro Gly Glu Arg Gly Pro Ser Gly Leu Ala Gly Pro
485 490 495

Lys Gly Ala Asn Gly Asp Pro Gly Arg Pro Gly Glu Pro Gly Leu Pro
500 505 510

Gly Ala Arg Gly Leu Thr Gly Arg Pro Gly Asp Ala Gly Pro Gln Gly
515 520 525

Lys Val Gly Pro Ser Gly Ala Pro Gly Glu Asp Gly Arg Pro Gly Pro
530 535 540

Pro Gly Pro Gln Gly Ala Arg Gly Gln Pro Gly Val Met Gly Phe Pro
545 550 555 560

Gly Pro Lys Gly Ala Asn Gly Glu Pro Gly Lys Ala Gly Glu Lys Gly
565 570 575

Leu Ala Gly Ala Pro Gly Leu Arg Gly Leu Pro Gly Lys Asp Gly Glu
580 585 590

Thr Gly Ala Ala Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly Pro Ala Gly Glu Arg
595 600 605

Gly Glu Gln Gly Ala Pro Gly Pro Ser Gly Phe Gln Gly Leu Pro Gly
610 615 620

Pro Pro Gly Pro Pro Gly Glu Gly Gly Lys Gln Gly Asp Gln Gly Ile
625 630 635 640

Pro Gly Glu Ala Gly Ala Pro Gly Leu Val Gly Pro Arg Gly Glu Arg
645 650 655

Gly Phe Pro Gly Glu Arg Gly Ser Pro Gly Ala Gln Gly Leu Gln Gly
660 665 670

Pro Arg Gly Leu Pro Gly Thr Pro Gly Thr Asp Gly Pro Lys Gly Ala
675 680 685

Ala Gly Pro Asp Gly Pro Pro Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Leu Gln
690 695 700

Gly Met Pro Gly Glu Arg Gly Ala Ala Gly Ile Ala Gly Pro Lys Gly
705 710 715 720

Asp Arg Gly Asp Val Gly Glu Lys Gly Pro Glu Gly Ala Pro Gly Lys
725 730 735

Asp Gly Gly Arg Gly Leu Thr Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Ala
740 745 750

Gly Ala Asn Gly Glu Lys Gly Glu Ala Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly
755 760 765

```
Ser Thr Gly Ala Arg Gly Ala Pro Gly Glu Pro Gly Glu Thr Gly Pro
 770                 775                 780

Pro Gly Pro Ala Gly Phe Ala Gly Pro Pro Gly Ala Asp Gly Gln Pro
785                 790                 795                 800

Gly Ala Lys Gly Asp Gln Gly Glu Ala Gly Gln Lys Gly Asp Ala Gly
                805                 810                 815

Ala Pro Gly Pro Gln Gly Pro Ser Gly Ala Pro Gly Pro Gln Gly Pro
            820                 825                 830

Thr Gly Val Thr Gly Pro Lys Gly Ala Arg Gly Ala Gln Gly Pro Pro
        835                 840                 845

Gly Ala Thr Gly Phe Pro Gly Ala Ala Gly Arg Val Gly Pro Pro Gly
    850                 855                 860

Ala Asn Gly Asn Pro Gly Pro Ala Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Lys
865                 870                 875                 880

Asp Gly Pro Lys Gly Val Arg Gly Asp Ser Gly Pro Pro Gly Arg Ala
                885                 890                 895
```

Gly Asp Pro Gly Leu Glu Gly Pro Ala Gly Ala Pro Gly Glu Lys Gly
900 905 910

Glu Pro Gly Asp Asp Gly Pro Ser Gly Leu Asp Gly Pro Pro Gly Pro
915 920 925

Gln Gly Leu Ala Gly Gln Arg Gly Ile Val Gly Leu Pro Gly Gln Arg
930 935 940

Gly Glu Arg Gly Phe Pro Gly Leu Pro Gly Pro Ser Gly Glu Pro Gly
945 950 955 960

Lys Gln Gly Ala Pro Gly Ala Ser Gly Asp Arg Gly Pro Pro Gly Pro
965 970 975

Val Gly Pro Pro Gly Leu Thr Gly Pro Ala Gly Glu Pro Gly Arg Glu
980 985 990

Gly Ser Pro Gly Ala Asp Gly Pro Pro Gly Arg Asp Gly Ala Ala Gly
995 1000 1005

Val Lys Gly Asp Arg Gly Glu Thr Gly Ala Leu Gly Ala Pro Gly Ala
1010 1015 1020

Pro Gly Pro Pro Gly Ser Pro Gly Pro Ala Gly Pro Thr Gly Lys Gln
1025 1030 1035 1040

Gly Asp Arg Gly Glu Ala Gly Ala Gln Gly Pro Met Gly Pro Ser Gly
1045 1050 1055

Pro Ala Gly Ala Arg Gly Ile Ala Gly Pro Gln Gly Pro Arg Gly Asp
1060 1065 1070

Lys Gly Glu Ser Gly Glu Gln Gly Glu Arg Gly Leu Lys Gly His Arg
1075 1080 1085

Gly Phe Thr Gly Leu Gln Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly Pro Ser Gly
1090 1095 1100

Asp Gln Gly Ala Ser Gly Pro Ala Gly Pro Ser Gly Pro Arg Gly Pro
1105 1110 1115 1120

Pro Gly Pro Val Gly Pro Ser Gly Lys Asp Gly Ser Asn Gly Ile Pro
1125 1130 1135

Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Arg Ser Gly Glu Thr Gly
1140 1145 1150

Pro Val Gly Pro Pro Gly Ser Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro
1155 1160 1165

Pro Gly Pro Gly Ile Asp Met Ser Ala Phe Ala Gly Leu Gly Gln Arg
1170 1175 1180

Glu Lys Gly Pro Asp Pro Met Gln Tyr Met Arg Ala Asp Glu Ala Asp
1185 1190 1195 1200

Ser Thr Leu Arg Gln His Asp Val Glu Val Asp Ala Thr Leu Lys Ser
1205 1210 1215

Leu Asn Asn Gln Ile Glu Ser Ile Arg Ser Pro Asp Gly Ser Arg Lys
1220 1225 1230

Asn Pro Ala Arg Thr Cys Gln Asp Leu Lys Leu Cys His Pro Glu Trp
1235 1240 1245

Lys Ser Gly Asp Tyr Trp Ile Asp Pro Asn Gln Gly Cys Thr Leu Asp
1250 1255 1260

Ala Met Lys Val Phe Cys Asn Met Glu Thr Gly Glu Thr Cys Val Tyr
1265 1270 1275 1280

Pro Asn Pro Ala Thr Val Pro Arg Lys Asn Trp Trp Ser Ser Lys Ser
1285 1290 1295

Lys Glu Lys Lys His Ile Trp Phe Gly Glu Thr Met Asn Gly Gly Phe
1300 1305 1310

His Phe Ser Tyr Gly Asp Gly Asn Leu Ala Pro Asn Thr Ala Asn Val
1315 1320 1325

Gln Met Thr Phe Leu Arg Leu Leu Ser Thr Glu Gly Ser Gln Asn Ile
1330 1335 1340

Thr Tyr His Cys Lys Asn Ser Ile Ala Tyr Leu Asp Glu Ala Ala Gly
1345 1350 1355 1360

Asn Leu Lys Lys Ala Leu Leu Ile Gln Gly Ser Asn Asp Val Glu Met
1365 1370 1375

Arg Ala Glu Gly Asn Ser Arg Phe Thr Tyr Thr Ala Leu Lys Asp Gly
1380 1385 1390

Cys Thr Lys His Thr Gly Lys Trp Gly Lys Thr Val Ile Glu Tyr Arg
1395 1400 1405

Ser Gln Lys Thr Ser Arg Leu Pro Ile Ile Asp Ile Ala Pro Met Asp
1410 1415 1420

Ile Gly Gly Ala Glu Gln Glu Phe Gly Val Asp Ile Gly Pro Val Cys
1425 1430 1435 1440

Phe Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 267 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:13:

ATAGGCCCTT TGGAGACGGC TGTTTTCCAG ACTCCAAACT ATCGTGTCAC ACGTGTGGGA 60

AATGAAGTGT CTTTCAATTG TGAGCAAACC CTGGACCACA ATACTATGTA CTGGTACAAG 120

CAAGACTCTA AGAAATTGCT GAAGATTATG TTTAGCTACA ATAATAAGCA ACTCATTGTA 180

AACGAAACAG TTCCAAGGCG CTTCTCACCT CAGTCTTCAG ATAAAGCTCA TTTGAATCTT 240

CGAATCAAGT CTGTAGAGCT GGAGGAC 267

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 54 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:14:

```
Gly Pro Ser Gly Asp Gln Gly Ala Ser Gly Pro Ala Gly Pro Ser Gly
1               5                  10                  15

Pro Arg Gly Pro Pro Gly Pro Val Gly Pro Ser Gly Lys Asp Gly Ala
            20                  25                  30

Asn Gly Ile Pro Gly Pro Ile Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Arg Ser
        35                  40                  45

Gly Glu Thr Gly Pro Ala
    50
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 731 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:15:

AGAATATAGA TAGATATGTC TGTGCTGACC GTGGCCTTTT GCCTCTTCCT TCTACACAGG 60

GTCCTTCTGG AGACCAAGGT GCTTCTGGTC CTGCTGGTCC TTCTGGCCCT AGAGTAAGTG 120

ACATGGAGTT GGAAGATGGA GGGGGCCCTT CAGAGAGTGT GGGCCTGTGT TCCCATGGGG 180

AGGGAAATGC TGCTGCTTCT GGGGAAGCTG TGGGCTCAGG GGTCCTCACT CAGTAATGGG 240

GGCAGGACTG GCTCATGTGC CTATGGCCAG AAAAGCGCCT GAGGCCACAA TGGCTGTAAG 300

ACAAACATGA ATCAGCCTCT CGCTGTCAGA CAGAACAGCA TTTTACAAAG AGGAGCTTAG 360

GAGGGTAGGC AAGCCATGGA GCTATCCTGC TGGTTCTTGG CCAAATAGAG ACCAACTTAG 420

GGTTCCATGA CTGAGCATGT GAAGAACTGG GGGCGGAGTG GCTGGTGCTA TCAGGACAGC 480

CACCTACCCA GCCCCAGCGA CTCCCCAGCC TTCCCTGTGG TGACCACTCT TTCCTCACGA 540

CCTCTCTCTC TTGCAGGGTC CTCCTGGCCC CGTCGGTCCC TCTGGCAAAG ATGGTGCTAA 600

TGGAATCCCT GGCCCCATTG GGCCTCCTGG TCCCCGTGGA CGATCAGGCG AAACCGGCCC 660

DE 695 13 149 T3 2006.07.20

TGCTGTAAGT GTCCTGACTC CTTCCCTGCT GTCGAGGTGT CCCTACCATC CGGGAGGCTT 720

GAGCTCTTTT T 731

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:16:

Gly Glu Ser Val Ala Ser Lys His Ala Ile Tyr Ala Val Cys
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 5502 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: sonstige Nukleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA"

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 1..5502

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:17:

```
ATG GAG AGC ACC TCC CCG CGA GGT CTC CGG TGC CCA CAG CTC TGC AGC      48
Met Glu Ser Thr Ser Pro Arg Gly Leu Arg Cys Pro Gln Leu Cys Ser
            1255                1260                1265
```

```
CAC TCT GGC GCC ATG AGA GCG CCG ACC ACC GCT CGC TGC TCC GGA TGC      96
His Ser Gly Ala Met Arg Ala Pro Thr Thr Ala Arg Cys Ser Gly Cys
        1270                1275                1280

ATC CAA CGG GTG CGT TGG AGG GGC TTC CTG CCA CTT GTC CTG GCT GTC     144
Ile Gln Arg Val Arg Trp Arg Gly Phe Leu Pro Leu Val Leu Ala Val
    1285                1290                1295

TTG ATG GGG ACA AGT CAT GCC CAA CGG GAT TCC ATA GGG AGA TAC GAA     192
Leu Met Gly Thr Ser His Ala Gln Arg Asp Ser Ile Gly Arg Tyr Glu
1300                1305                1310                1315

CCA GCT AGC AGG GAT GCG AAT CGG TTG TGG CAC CCC GTG GGC AGC CAC     240
Pro Ala Ser Arg Asp Ala Asn Arg Leu Trp His Pro Val Gly Ser His
                1320                1325                1330

CCC GCA GCG GCT GCA GCC AAG GTG TAC AGT CTG TTC CGA GAG CCT GAC     288
Pro Ala Ala Ala Ala Ala Lys Val Tyr Ser Leu Phe Arg Glu Pro Asp
            1335                1340                1345

GCG CCG GTC CCC GGC TTG TCG CCC TCT GAG TGG AAC CAG CCG GCC CAG     336
Ala Pro Val Pro Gly Leu Ser Pro Ser Glu Trp Asn Gln Pro Ala Gln
        1350                1355                1360
```


DE 695 13 149 T3 2006.07.20

```
GGG AAC CCG GGA TGG CTC GCA GAG GCC GAG GCC AGG AGG CCA CCT CGA      384
Gly Asn Pro Gly Trp Leu Ala Glu Ala Glu Ala Arg Arg Pro Pro Arg
    1365                1370                1375

ACC CAG CAG CTG CGT CGA GTC CAG CCA CCT GTC CAG ACT CGG AGA AGC      432
Thr Gln Gln Leu Arg Arg Val Gln Pro Pro Val Gln Thr Arg Arg Ser
1380                1385                1390                1395

CAT CCC CGG GGC CAG CAG CAG ATA GCA GCC CGG GCT GCA CCT TCT GTC      480
His Pro Arg Gly Gln Gln Gln Ile Ala Ala Arg Ala Ala Pro Ser Val
                1400                1405                1410

GCG CGC CTG GAA ACC CCT CAG CGA CCC GCG GCT GCA CGG CGA GGG CGG      528
Ala Arg Leu Glu Thr Pro Gln Arg Pro Ala Ala Ala Arg Arg Gly Arg
            1415                1420                1425

CTC ACT GGG AGA AAT GTC TGC GGG GGA CAG TGC TGC CCA GGA TGG ACA      576
Leu Thr Gly Arg Asn Val Cys Gly Gly Gln Cys Cys Pro Gly Trp Thr
        1430                1435                1440

ACA TCA AAC AGC ACC AAC CAC TGT ATC AAA CCT GTG TGT CAG CCT CCC      624
Thr Ser Asn Ser Thr Asn His Cys Ile Lys Pro Val Cys Gln Pro Pro
    1445                1450                1455
```


DE 695 13 149 T3 2006.07.20

TGT CAG AAC CGA GGC TCC TGC AGC AGG CCC CAG GTC TGC ATC TGC CGT 672
Cys Gln Asn Arg Gly Ser Cys Ser Arg Pro Gln Val Cys Ile Cys Arg
1460 1465 1470 1475

TCT GGC TTC CGT GGG GCG CGC TGT GAG GAG GTC ATC CCT GAG GAG GAA 720
Ser Gly Phe Arg Gly Ala Arg Cys Glu Glu Val Ile Pro Glu Glu Glu
1480 1485 1490

TTT GAC CCT CAG AAT GCC AGG CCT GTG CCC AGA CGC TCA GTG GAG AGA 768
Phe Asp Pro Gln Asn Ala Arg Pro Val Pro Arg Arg Ser Val Glu Arg
1495 1500 1505

GCA CCC GGT CCT CAC AGA AGC AGT GAG GCC AGA GGA AGT CTA GTG ACC 816
Ala Pro Gly Pro His Arg Ser Ser Glu Ala Arg Gly Ser Leu Val Thr
1510 1515 1520

AGA ATA CAG CCG CTG GTA CCA CCA CCA TCA CCA CCT CCA TCT CGG CGC 864
Arg Ile Gln Pro Leu Val Pro Pro Pro Ser Pro Pro Pro Ser Arg Arg
1525 1530 1535

CTC AGC CAG CCC TGG CCC CTG CAG CAG CAC TCA GGG CCG TCC AGG ACA 912
Leu Ser Gln Pro Trp Pro Leu Gln Gln His Ser Gly Pro Ser Arg Thr
1540 1545 1550 1555

DE 695 13 149 T3 2006.07.20

GTT CGT CGG TAT CCG GCC ACT GGT GCC AAT GGC CAG CTG ATG TCC AAC 960
Val Arg Arg Tyr Pro Ala Thr Gly Ala Asn Gly Gln Leu Met Ser Asn
1560 1565 1570

GCT TTG CCT TCA GGA CTC GAG CTG AGA GAC AGC AGC CCA CAG GCA GCA 1008
Ala Leu Pro Ser Gly Leu Glu Leu Arg Asp Ser Ser Pro Gln Ala Ala
1575 1580 1585

CAT GTG AAC CAT CTC TCA CCC CCC TGG GGG CTG AAC CTC ACC GAG AAA 1056
His Val Asn His Leu Ser Pro Pro Trp Gly Leu Asn Leu Thr Glu Lys
1590 1595 1600

ATC AAG AAA ATC AAA GTC GTC TTC ACC CCC ACC ATC TGC AAG CAG ACC 1104
Ile Lys Lys Ile Lys Val Val Phe Thr Pro Thr Ile Cys Lys Gln Thr
1605 1610 1615

TGT GCC CGG GGA CGC TGT GCC AAC AGC TGT GAG AAG GGT GAC ACC ACC 1152
Cys Ala Arg Gly Arg Cys Ala Asn Ser Cys Glu Lys Gly Asp Thr Thr
1620 1625 1630 1635

ACC TTG TAC AGT CAG GGT GGC CAT GGG CAT GAC CCC AAG TCT GGC TTC 1200
Thr Leu Tyr Ser Gln Gly Gly His Gly His Asp Pro Lys Ser Gly Phe
1640 1645 1650

DE 695 13 149 T3 2006.07.20

```
CGT ATC TAT TTC TGC CAA ATC CCC TGC CTG AAT GGT GGC CGC TGC ATC      1248
Arg Ile Tyr Phe Cys Gln Ile Pro Cys Leu Asn Gly Gly Arg Cys Ile
                1655                1660                1665

GGC CGG GAC GAG TGC TGG TGT CCA GCC AAC TCC ACA GGA AAG TTC TGC      1296
Gly Arg Asp Glu Cys Trp Cys Pro Ala Asn Ser Thr Gly Lys Phe Cys
        1670                1675                1680

CAT CTG CCT GTC CCG CAG CCA GAC AGG GAA CCT GCA GGG CGA GGT TCC      1344
His Leu Pro Val Pro Gln Pro Asp Arg Glu Pro Ala Gly Arg Gly Ser
    1685                1690                1695

CGG CAC AGA ACC CTG CTG GAA GGT CCC CTG AAG CAA TCC ACC TTC ACG      1392
Arg His Arg Thr Leu Leu Glu Gly Pro Leu Lys Gln Ser Thr Phe Thr
1700                1705                1710                1715

CTG CCT CTC TCT AAC CAG CTC GCC TCT GTG AAC CCC TCG CTG GTG AAG      1440
Leu Pro Leu Ser Asn Gln Leu Ala Ser Val Asn Pro Ser Leu Val Lys
                1720                1725                1730

GTG CAA ATT CAT CAC CCG CCT GAG GCC TCT GTG CAG ATT CAC CAG GTG      1488
Val Gln Ile His His Pro Pro Glu Ala Ser Val Gln Ile His Gln Val
                1735                1740                1745
```

GCC CGG GTC CGG GGT GAG CTG GAC CCC GTG CTG GAG GAC AAC AGT GTG 1536
Ala Arg Val Arg Gly Glu Leu Asp Pro Val Leu Glu Asp Asn Ser Val
1750 1755 1760

GAG ACC AGA GCC TCT CAT CGC CCC CAC GGC AAC CTA GGC CAC AGC CCC 1584
Glu Thr Arg Ala Ser His Arg Pro His Gly Asn Leu Gly His Ser Pro
1765 1770 1775

TGG GCC AGC AAC AGC ATA CCC GCT CGG GCC GGA GAG GCC CCT CGG CCA 1632
Trp Ala Ser Asn Ser Ile Pro Ala Arg Ala Gly Glu Ala Pro Arg Pro
1780 1785 1790 1795

CCA CCA GTG CTG TCT AGG CAT TAT GGA CTT CTG GGC CAG TGT TAC CTG 1680
Pro Pro Val Leu Ser Arg His Tyr Gly Leu Leu Gly Gln Cys Tyr Leu
1800 1805 1810

AGC ACG GTG AAT GGA CAG TGT GCT AAC CCC CTA GGT AGT CTG ACT TCT 1728
Ser Thr Val Asn Gly Gln Cys Ala Asn Pro Leu Gly Ser Leu Thr Ser
1815 1820 1825

CAG GAG GAC TGC TGT GGC AGT GTG GGG ACC TTC TGG GGG GTG ACC TCC 1776
Gln Glu Asp Cys Cys Gly Ser Val Gly Thr Phe Trp Gly Val Thr Ser
1830 1835 1840

DE 695 13 149 T3 2006.07.20

```
TGT GCT CCC TGC CCA CCC AGA CAA GAG GGT CCA GCC TTC CCA GTG ATT      1824
Cys Ala Pro Cys Pro Pro Arg Gln Glu Gly Pro Ala Phe Pro Val Ile
    1845                1850                1855

GAA AAT GGC CAG CTG GAG TGT CCC CAA GGA TAC AAG AGA CTG AAC CTC      1872
Glu Asn Gly Gln Leu Glu Cys Pro Gln Gly Tyr Lys Arg Leu Asn Leu
1860                1865                1870                1875

AGC CAC TGC CAA GAT ATC AAT GAG TGC CTG ACC CTG GGC CTC TGC AAG      1920
Ser His Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Leu Thr Leu Gly Leu Cys Lys
                1880                1885                1890

GAC TCG GAG TGC GTG AAC ACC AGG GGC AGC TAC CTG TGC ACC TGC AGG      1968
Asp Ser Glu Cys Val Asn Thr Arg Gly Ser Tyr Leu Cys Thr Cys Arg
            1895                1900                1905

CCT GGC CTC ATG CTG GAT CCG TCA AGG AGC CGC TGC GTA TCG GAC AAG      2016
Pro Gly Leu Met Leu Asp Pro Ser Arg Ser Arg Cys Val Ser Asp Lys
        1910                1915                1920

GCT GTC TCC ATG CAG CAG GGA CTA TGC TAC CGG TCA CTG GGG TCT GGT      2064
Ala Val Ser Met Gln Gln Gly Leu Cys Tyr Arg Ser Leu Gly Ser Gly
    1925                1930                1935
```


DE 695 13 149 T3 2006.07.20

```
ACC TGC ACC CTG CCT TTG GTT CAT CGG ATC ACC AAG CAG ATA TGC TGC      2112
Thr Cys Thr Leu Pro Leu Val His Arg Ile Thr Lys Gln Ile Cys Cys
1940                1945                1950                1955

TGC AGC CGT GTG GGC AAA GCC TGG GGT AGC ACA TGT GAA CAG TGT CCC      2160
Cys Ser Arg Val Gly Lys Ala Trp Gly Ser Thr Cys Glu Gln Cys Pro
                1960                1965                1970

CTG CCT GGC ACA GAA GCC TTC AGG GAG ATC TGC CCT GCT GGC CAT GGC      2208
Leu Pro Gly Thr Glu Ala Phe Arg Glu Ile Cys Pro Ala Gly His Gly
            1975                1980                1985

TAC ACC TAC TCG AGC TCA GAC ATC CGC CTG TCT ATG AGG AAA GCC GAA      2256
Tyr Thr Tyr Ser Ser Ser Asp Ile Arg Leu Ser Met Arg Lys Ala Glu
        1990                1995                2000

GAA GAG GAA CTG GCT AGC CCC TTA AGG GAG CAG ACA GAG CAG AGC ACT      2304
Glu Glu Glu Leu Ala Ser Pro Leu Arg Glu Gln Thr Glu Gln Ser Thr
    2005                2010                2015

GCA CCC CCA CCT GGG CAA GCA GAG AGG CAA CCA CTC CGG GCA GCC ACC      2352
Ala Pro Pro Pro Gly Gln Ala Glu Arg Gln Pro Leu Arg Ala Ala Thr
2020                2025                2030                2035
```

GCC ACC TGG ATT GAG GCT GAG ACC CTC CCT GAC AAA GGT GAC TCT CGG 2400
Ala Thr Trp Ile Glu Ala Glu Thr Leu Pro Asp Lys Gly Asp Ser Arg
2040 2045 2050

GCT GTT CAG ATC ACA ACC AGT GCT CCC CAC CTA CCT GCC CGG GTA CCA 2448
Ala Val Gln Ile Thr Thr Ser Ala Pro His Leu Pro Ala Arg Val Pro
2055 2060 2065

GGG GAT GCC ACT GGA AGA CCA GCA CCA TCC TTG CCT GGA CAG GGC ATT 2496
Gly Asp Ala Thr Gly Arg Pro Ala Pro Ser Leu Pro Gly Gln Gly Ile
2070 2075 2080

CCA GAG AGT CCA GCA GAA GAG CAA GTG ATT CCC TCC AGT GAT GTC TTG 2544
Pro Glu Ser Pro Ala Glu Glu Gln Val Ile Pro Ser Ser Asp Val Leu
2085 2090 2095

GTG ACA CAC AGC CCC CCA GAC TTT GAT CCA TGT TTT GCT GGA GCC TCC 2592
Val Thr His Ser Pro Pro Asp Phe Asp Pro Cys Phe Ala Gly Ala Ser
2100 2105 2110 2115

AAC ATC TGT GGC CCT GGG ACC TGT GTG AGC CTC CCA AAT GGA TAC AGA 2640
Asn Ile Cys Gly Pro Gly Thr Cys Val Ser Leu Pro Asn Gly Tyr Arg
2120 2125 2130

DE 695 13 149 T3 2006.07.20

TGT GTC TGC AGC CCT GGC TAC CAG CTA CAC CCC AGC CAA GAC TAC TGT 2688
Cys Val Cys Ser Pro Gly Tyr Gln Leu His Pro Ser Gln Asp Tyr Cys
2135 2140 2145

ACT GAT GAC AAC GAG TGT ATG AGG AAC CCC TGT GAA GGA AGA GGG CGC 2736
Thr Asp Asp Asn Glu Cys Met Arg Asn Pro Cys Glu Gly Arg Gly Arg
2150 2155 2160

TGT GTC AAC AGT GTG GGC TCC TAC TCC TGC CTC TGC TAT CCT GGC TAC 2784
Cys Val Asn Ser Val Gly Ser Tyr Ser Cys Leu Cys Tyr Pro Gly Tyr
2165 2170 2175

ACA CTA GTC ACC CTC GGA GAC ACA CAG GAG TGC CAA GAT ATC GAT GAG 2832
Thr Leu Val Thr Leu Gly Asp Thr Gln Glu Cys Gln Asp Ile Asp Glu
2180 2185 2190 2195

TGT GAG CAG CCC GGG GTG TGC AGT GGT GGG CGA TGC AGC AAC ACG GAG 2880
Cys Glu Gln Pro Gly Val Cys Ser Gly Gly Arg Cys Ser Asn Thr Glu
2200 2205 2210

GGC TCG TAC CAC TGC GAG TGT GAT CGG GGC TAC ATC ATG GTC AGG AAA 2928
Gly Ser Tyr His Cys Glu Cys Asp Arg Gly Tyr Ile Met Val Arg Lys
2215 2220 2225

DE 695 13 149 T3 2006.07.20

```
GGA CAC TGT CAA GAT ATC AAC GAA TGC CGT CAC CCT GGT ACC TGC CCT      2976
Gly His Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Arg His Pro Gly Thr Cys Pro
        2230                2235                2240

GAT GGG AGA TGC GTC AAC TCC CCT GGC TCC TAC ACT TGT CTG GCC TGT      3024
Asp Gly Arg Cys Val Asn Ser Pro Gly Ser Tyr Thr Cys Leu Ala Cys
    2245                2250                2255

GAG GAG GGC TAT GTA GGC CAG AGT GGG AGC TGT GTA GAT GTC AAT GAG      3072
Glu Glu Gly Tyr Val Gly Gln Ser Gly Ser Cys Val Asp Val Asn Glu
2260                2265                2270                2275

TGT CTG ACC CCT GGG ATA TGT ACC CAT GGA AGG TGC ATC AAC ATG GAA      3120
Cys Leu Thr Pro Gly Ile Cys Thr His Gly Arg Cys Ile Asn Met Glu
                2280                2285                2290

GGC TCC TTT AGA TGC TCC TGT GAG CCG GGC TAT GAG GTC ACC CCA GAC      3168
Gly Ser Phe Arg Cys Ser Cys Glu Pro Gly Tyr Glu Val Thr Pro Asp
            2295                2300                2305

AAG AAG GGC TGC CGA GAT GTG GAC GAG TGT GCC AGC CGA GCC TCG TGC      3216
Lys Lys Gly Cys Arg Asp Val Asp Glu Cys Ala Ser Arg Ala Ser Cys
        2310                2315                2320
```


DE 695 13 149 T3 2006.07.20

```
CCC ACG GGC CTC TGC CTC AAC ACG GAG GGC TCC TTC ACC TGC TCA GCC      3264
Pro Thr Gly Leu Cys Leu Asn Thr Glu Gly Ser Phe Thr Cys Ser Ala
    2325                2330                2335

TGT CAG AGC GGG TAC TGG GTG AAC GAA GAT GGC ACT GCC TGT GAA GAC      3312
Cys Gln Ser Gly Tyr Trp Val Asn Glu Asp Gly Thr Ala Cys Glu Asp
2340                2345                2350                2355

TTG GAT GAA TGT GCC TTC CCT GGA GTC TGC CCC ACA GGC GTC TGC ACC      3360
Leu Asp Glu Cys Ala Phe Pro Gly Val Cys Pro Thr Gly Val Cys Thr
                2360                2365                2370

AAT ACT GTA GGC TCC TTC TCC TGC AAG GAC TGT GAC CAG GGC TAC CGG      3408
Asn Thr Val Gly Ser Phe Ser Cys Lys Asp Cys Asp Gln Gly Tyr Arg
            2375                2380                2385

CCC AAC CCC CTG GGC AAC AGA TGC GAA GAT GTG GAT GAG TGT GAA GGT      3456
Pro Asn Pro Leu Gly Asn Arg Cys Glu Asp Val Asp Glu Cys Glu Gly
        2390                2395                2400

CCC CAA AGC AGC TGC CGG GGA GGC GAA TGC AAG AAC ACA GAA GGT TCC      3504
Pro Gln Ser Ser Cys Arg Gly Gly Glu Cys Lys Asn Thr Glu Gly Ser
    2405                2410                2415
```


DE 695 13 149 T3 2006.07.20

TAC CAA TGC CTC TGT CAC CAG GGC TTC CAG CTG GTC AAT GGC ACC ATG 3552
Tyr Gln Cys Leu Cys His Gln Gly Phe Gln Leu Val Asn Gly Thr Met
2420 2425 2430 2435

TGT GAG GAC GTG AAT GAG TGT GTT GGG GAA GAG CAT TGT GCT CCT CAC 3600
Cys Glu Asp Val Asn Glu Cys Val Gly Glu Glu His Cys Ala Pro His
2440 2445 2450

GGC GAG TGC CTC AAC AGC CTG GGC TCC TTC TTC TGC CTC TGT GCA CCC 3648
Gly Glu Cys Leu Asn Ser Leu Gly Ser Phe Phe Cys Leu Cys Ala Pro
2455 2460 2465

GGC TTT GCT AGT GCT GAG GGG GGC ACC AGA TGC CAG GAT GTT GAT GAA 3696
Gly Phe Ala Ser Ala Glu Gly Gly Thr Arg Cys Gln Asp Val Asp Glu
2470 2475 2480

TGT GCA GCC ACA GAC CCG TGT CCG GGA GGA CAC TGT GTC AAC ACA GAG 3744
Cys Ala Ala Thr Asp Pro Cys Pro Gly Gly His Cys Val Asn Thr Glu
2485 2490 2495

GGC TCC TTC AGC TGT CTG TGT GAG ACT GCT TCC TTC CAG CCC TCC CCA 3792
Gly Ser Phe Ser Cys Leu Cys Glu Thr Ala Ser Phe Gln Pro Ser Pro
2500 2505 2510 2515

DE 695 13 149 T3 2006.07.20

```
GAC AGC GGA GAA TGT TTG GAT ATT GAT GAG TGT GAG GAC CGT GAA GAC      3840
Asp Ser Gly Glu Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asp Arg Glu Asp
                2520                2525                2530

CCG GTG TGC GGA GCC TGG AGG TGT GAG AAC AGT CCT GGT TCC TAC CGC      3888
Pro Val Cys Gly Ala Trp Arg Cys Glu Asn Ser Pro Gly Ser Tyr Arg
            2535                2540                2545

TGC ATC CTG GAC TGC CAG CCT GGA TTC TAT GTG GCG CCA AAT GGA GAC      3936
Cys Ile Leu Asp Cys Gln Pro Gly Phe Tyr Val Ala Pro Asn Gly Asp
        2550                2555                2560

TGC ATT GAC ATA GAT GAA TGT GCC AAT GAC ACT GTG TGT GGG AAC CAT      3984
Cys Ile Asp Ile Asp Glu Cys Ala Asn Asp Thr Val Cys Gly Asn His
    2565                2570                2575

GGC TTC TGT GAC AAC ACG GAC GGC TCC TTC CGC TGC CTG TGT GAC CAG      4032
Gly Phe Cys Asp Asn Thr Asp Gly Ser Phe Arg Cys Leu Cys Asp Gln
2580                2585                2590                2595

GGC TTC GAG ACC TCA CCA TCA GGC TGG GAG TGT GTT GAT GTG AAC GAG      4080
Gly Phe Glu Thr Ser Pro Ser Gly Trp Glu Cys Val Asp Val Asn Glu
                2600                2605                2610
```


DE 695 13 149 T3 2006.07.20

```
TGT GAG CTC ATG ATG GCA GTG TGT GGG GAT GCG CTC TGT GAG AAC GTG      4128
Cys Glu Leu Met Met Ala Val Cys Gly Asp Ala Leu Cys Glu Asn Val
            2615                2620                2625

GAA GGC TCC TTC CTG TGC CTT TGC GCC AGT GAC CTT GAG GAG TAC GAC      4176
Glu Gly Ser Phe Leu Cys Leu Cys Ala Ser Asp Leu Glu Glu Tyr Asp
        2630                2635                2640

GCA GAA GAA GGA CAC TGC CGT CCT CGG GTG GCT GGA GCT CAG AGA ATC      4224
Ala Glu Glu Gly His Cys Arg Pro Arg Val Ala Gly Ala Gln Arg Ile
    2645                2650                2655

CCA GAG GTC CGG ACA GAG GAC CAG GCT CCA AGC CTT ATC CGC ATG GAA      4272
Pro Glu Val Arg Thr Glu Asp Gln Ala Pro Ser Leu Ile Arg Met Glu
2660                2665                2670                2675

TGC TAC TCT GAA CAC AAT GGT GGT CCT CCC TGC TCT CAA ATC CTG GGC      4320
Cys Tyr Ser Glu His Asn Gly Gly Pro Pro Cys Ser Gln Ile Leu Gly
                2680                2685                2690

CAG AAC TCC ACA CAG GCC GAG TGC TGC TGC ACT CAG GGT GCC AGA TGG      4368
Gln Asn Ser Thr Gln Ala Glu Cys Cys Cys Thr Gln Gly Ala Arg Trp
            2695                2700                2705
```


DE 695 13 149 T3 2006.07.20

```
GGA AAG GCC TGT GCG CCC TGC CCA TCT GAG GAC TCA GTT GAA TTC AGT      4416
Gly Lys Ala Cys Ala Pro Cys Pro Ser Glu Asp Ser Val Glu Phe Ser
        2710                2715                2720

CAG CTC TGC CCC AGT GGT CAA GGT TAC ATC CCA GTG GAA GGA GCC TGG      4464
Gln Leu Cys Pro Ser Gly Gln Gly Tyr Ile Pro Val Glu Gly Ala Trp
    2725                2730                2735

ACA TTT GGA CAA ACC ATG TAT ACA GAT GCC GAT GAA TGT GTA CTG TTT      4512
Thr Phe Gly Gln Thr Met Tyr Thr Asp Ala Asp Glu Cys Val Leu Phe
2740                2745                2750                2755

GGG CCT GCT CTC TGC CAG AAT GGC CGA TGC TCA AAC ATA GTG CCT GGC      4560
Gly Pro Ala Leu Cys Gln Asn Gly Arg Cys Ser Asn Ile Val Pro Gly
                2760                2765                2770

TAC ATT TGC CTG TGC AAC CCT GGC TAC CAC TAT GAT GCC TCC AGC AGG      4608
Tyr Ile Cys Leu Cys Asn Pro Gly Tyr His Tyr Asp Ala Ser Ser Arg
            2775                2780                2785

AAG TGC CAG GAT CAC AAC GAA TGC CAG GAC TTG GCC TGT GAG AAC GGT      4656
Lys Cys Gln Asp His Asn Glu Cys Gln Asp Leu Ala Cys Glu Asn Gly
        2790                2795                2800
```


DE 695 13 149 T3 2006.07.20

GAG TGT GTG AAC CAA GAA GGC TCC TTC CAT TGC CTC TGC AAT CCC CCC 4704
Glu Cys Val Asn Gln Glu Gly Ser Phe His Cys Leu Cys Asn Pro Pro
2805 2810 2815

CTC ACC CTA GAC CTC AGT GGG CAG CGC TGT GTG AAC ACG ACC AGC AGC 4752
Leu Thr Leu Asp Leu Ser Gly Gln Arg Cys Val Asn Thr Thr Ser Ser
2820 2825 2830 2835

ACG GAG GAC TTC CCT GAC CAT GAC ATC CAC ATG GAC ATC TGC TGG AAA 4800
Thr Glu Asp Phe Pro Asp His Asp Ile His Met Asp Ile Cys Trp Lys
2840 2845 2850

AAA GTC ACC AAT GAT GTG TGC AGC CAG CCC TTG CGT GGG CAC CAT ACC 4848
Lys Val Thr Asn Asp Val Cys Ser Gln Pro Leu Arg Gly His His Thr
2855 2860 2865

ACC TAT ACA GAA TGC TGC TGC CAA GAT GGG GAG GCC TGG AGC CAG CAA 4896
Thr Tyr Thr Glu Cys Cys Cys Gln Asp Gly Glu Ala Trp Ser Gln Gln
2870 2875 2880

TGC GCT CTG TGC CCG CCC AGG AGC TCT GAG GTC TAC GCT CAG CTG TGC 4944
Cys Ala Leu Cys Pro Pro Arg Ser Ser Glu Val Tyr Ala Gln Leu Cys
2885 2890 2895

```
AAC GTG GCT CGG ATT GAG GCA GAG CGC GGA GCA GGG ATC CAC TTC CGG      4992
Asn Val Ala Arg Ile Glu Ala Glu Arg Gly Ala Gly Ile His Phe Arg
2900                2905                2910                2915

CCA GGC TAT GAG TAT GGC CCT GGC CTG GAC GAT CTG CCT GAA AAC CTC      5040
Pro Gly Tyr Glu Tyr Gly Pro Gly Leu Asp Asp Leu Pro Glu Asn Leu
                2920                2925                2930

TAC GGC CCA GAT GGG GCT CCC TTC TAT AAC TAC CTA GGC CCC GAG GAC      5088
Tyr Gly Pro Asp Gly Ala Pro Phe Tyr Asn Tyr Leu Gly Pro Glu Asp
            2935                2940                2945

ACT GCC CCT GAG CCT CCC TTC TCC AAC CCA GCC AGC CAG CCG GGA GAC      5136
Thr Ala Pro Glu Pro Pro Phe Ser Asn Pro Ala Ser Gln Pro Gly Asp
        2950                2955                2960

AAC ACA CCT GTC CTT GAG CCT CCT CTG CAG CCC TCT GAA CTT CAG CCT      5184
Asn Thr Pro Val Leu Glu Pro Pro Leu Gln Pro Ser Glu Leu Gln Pro
    2965                2970                2975

CAC TAT CTA GCC AGC CAC TCA GAA CCC CCT GCC TCC TTC GAA GGC CTT      5232
His Tyr Leu Ala Ser His Ser Glu Pro Pro Ala Ser Phe Glu Gly Leu
2980                2985                2990                2995
```


DE 695 13 149 T3 2006.07.20

```
CAG GCT GAG GAA TGT GGC ATC CTG AAT GGC TGT GAG AAT GGC CGC TGC      5280
Gln Ala Glu Glu Cys Gly Ile Leu Asn Gly Cys Glu Asn Gly Arg Cys
                3000                3005                3010

GTG CGT GTG CGG GAG GGC TAC ACT TGC GAC TGC TTT GAG GGC TTC CAG      5328
Val Arg Val Arg Glu Gly Tyr Thr Cys Asp Cys Phe Glu Gly Phe Gln
            3015                3020                3025

CTG GAT GCG CCC ACA TTG GCC TGT GTG GAT GTG AAC GAG TGT GAA GAC      5376
Leu Asp Ala Pro Thr Leu Ala Cys Val Asp Val Asn Glu Cys Glu Asp
        3030                3035                3040

TTG AAC GGG CCT GCA CGA CTC TGT GCA CAC GGT CAC TGT GAG AAC ACA      5424
Leu Asn Gly Pro Ala Arg Leu Cys Ala His Gly His Cys Glu Asn Thr
    3045                3050                3055

GAG GGT TCC TAT CGC TGC CAC TGT TCG CCA GGT TAC GTG GCA GAG CCA      5472
Glu Gly Ser Tyr Arg Cys His Cys Ser Pro Gly Tyr Val Ala Glu Pro
3060                3065                3070                3075

GGC CCC CCA CAC TGT GCG GCC AAG GAG TAG                              5502
Gly Pro Pro His Cys Ala Ala Lys Glu  *
                3080                3085
```


DE 695 13 149 T3 2006.07.20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 1834 Aminosäure
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:18:

```
Met Glu Ser Thr Ser Pro Arg Gly Leu Arg Cys Pro Gln Leu Cys Ser
 1               5                  10                  15

His Ser Gly Ala Met Arg Ala Pro Thr Thr Ala Arg Cys Ser Gly Cys
            20                  25                  30

Ile Gln Arg Val Arg Trp Arg Gly Phe Leu Pro Leu Val Leu Ala Val
        35                  40                  45

Leu Met Gly Thr Ser His Ala Gln Arg Asp Ser Ile Gly Arg Tyr Glu
    50                  55                  60
```


DE 695 13 149 T3 2006.07.20

```
Pro Ala Ser Arg Asp Ala Asn Arg Leu Trp His Pro Val Gly Ser His
 65                  70                  75                  80

Pro Ala Ala Ala Ala Lys Val Tyr Ser Leu Phe Arg Glu Pro Asp
                85                  90                  95

Ala Pro Val Pro Gly Leu Ser Pro Ser Glu Trp Asn Gln Pro Ala Gln
            100                 105                 110

Gly Asn Pro Gly Trp Leu Ala Glu Ala Glu Ala Arg Arg Pro Pro Arg
        115                 120                 125

Thr Gln Gln Leu Arg Arg Val Gln Pro Pro Val Gln Thr Arg Arg Ser
    130                 135                 140

His Pro Arg Gly Gln Gln Gln Ile Ala Ala Arg Ala Ala Pro Ser Val
145                 150                 155                 160

Ala Arg Leu Glu Thr Pro Gln Arg Pro Ala Ala Ala Arg Arg Gly Arg
                165                 170                 175

Leu Thr Gly Arg Asn Val Cys Gly Gly Gln Cys Cys Pro Gly Trp Thr
            180                 185                 190
```

```
Thr Ser Asn Ser Thr Asn His Cys Ile Lys Pro Val Cys Gln Pro Pro
        195                 200                 205

Cys Gln Asn Arg Gly Ser Cys Ser Arg Pro Gln Val Cys Ile Cys Arg
    210                 215                 220

Ser Gly Phe Arg Gly Ala Arg Cys Glu Glu Val Ile Pro Glu Glu Glu
225                 230                 235                 240

Phe Asp Pro Gln Asn Ala Arg Pro Val Pro Arg Arg Ser Val Glu Arg
                245                 250                 255

Ala Pro Gly Pro His Arg Ser Ser Glu Ala Arg Gly Ser Leu Val Thr
            260                 265                 270

Arg Ile Gln Pro Leu Val Pro Pro Pro Ser Pro Pro Pro Ser Arg Arg
        275                 280                 285

Leu Ser Gln Pro Trp Pro Leu Gln Gln His Ser Gly Pro Ser Arg Thr
    290                 295                 300

Val Arg Arg Tyr Pro Ala Thr Gly Ala Asn Gly Gln Leu Met Ser Asn
305                 310                 315                 320
```

Ala Leu Pro Ser Gly Leu Glu Leu Arg Asp Ser Ser Pro Gln Ala Ala
325 330 335

His Val Asn His Leu Ser Pro Pro Trp Gly Leu Asn Leu Thr Glu Lys
340 345 350

Ile Lys Lys Ile Lys Val Val Phe Thr Pro Thr Ile Cys Lys Gln Thr
355 360 365

Cys Ala Arg Gly Arg Cys Ala Asn Ser Cys Glu Lys Gly Asp Thr Thr
370 375 380

Thr Leu Tyr Ser Gln Gly Gly His Gly His Asp Pro Lys Ser Gly Phe
385 390 395 400

Arg Ile Tyr Phe Cys Gln Ile Pro Cys Leu Asn Gly Gly Arg Cys Ile
405 410 415

Gly Arg Asp Glu Cys Trp Cys Pro Ala Asn Ser Thr Gly Lys Phe Cys
420 425 430

His Leu Pro Val Pro Gln Pro Asp Arg Glu Pro Ala Gly Arg Gly Ser
435 440 445

```
Arg His Arg Thr Leu Leu Glu Gly Pro Leu Lys Gln Ser Thr Phe Thr
 450                 455                 460

Leu Pro Leu Ser Asn Gln Leu Ala Ser Val Asn Pro Ser Leu Val Lys
 465                 470                 475                 480

Val Gln Ile His His Pro Pro Glu Ala Ser Val Gln Ile His Gln Val
                 485                 490                 495

Ala Arg Val Arg Gly Glu Leu Asp Pro Val Leu Glu Asp Asn Ser Val
            500                 505                 510

Glu Thr Arg Ala Ser His Arg Pro His Gly Asn Leu Gly His Ser Pro
        515                 520                 525

Trp Ala Ser Asn Ser Ile Pro Ala Arg Ala Gly Glu Ala Pro Arg Pro
    530                 535                 540

Pro Pro Val Leu Ser Arg His Tyr Gly Leu Leu Gly Gln Cys Tyr Leu
545                 550                 555                 560

Ser Thr Val Asn Gly Gln Cys Ala Asn Pro Leu Gly Ser Leu Thr Ser
                565                 570                 575
```

```
Gln Glu Asp Cys Cys Gly Ser Val Gly Thr Phe Trp Gly Val Thr Ser
580                 585                 590

Cys Ala Pro Cys Pro Pro Arg Gln Glu Gly Pro Ala Phe Pro Val Ile
595                 600                 605

Glu Asn Gly Gln Leu Glu Cys Pro Gln Gly Tyr Lys Arg Leu Asn Leu
610                 615                 620

Ser His Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Leu Thr Leu Gly Leu Cys Lys
625                 630                 635                 640

Asp Ser Glu Cys Val Asn Thr Arg Gly Ser Tyr Leu Cys Thr Cys Arg
                645                 650                 655

Pro Gly Leu Met Leu Asp Pro Ser Arg Ser Arg Cys Val Ser Asp Lys
            660                 665                 670

Ala Val Ser Met Gln Gln Gly Leu Cys Tyr Arg Ser Leu Gly Ser Gly
        675                 680                 685

Thr Cys Thr Leu Pro Leu Val His Arg Ile Thr Lys Gln Ile Cys Cys
    690                 695                 700
```

```
Cys Ser Arg Val Gly Lys Ala Trp Gly Ser Thr Cys Glu Gln Cys Pro
705                 710                 715                 720

Leu Pro Gly Thr Glu Ala Phe Arg Glu Ile Cys Pro Ala Gly His Gly
                725                 730                 735

Tyr Thr Tyr Ser Ser Ser Asp Ile Arg Leu Ser Met Arg Lys Ala Glu
            740                 745                 750

Glu Glu Glu Leu Ala Ser Pro Leu Arg Glu Gln Thr Glu Gln Ser Thr
        755                 760                 765

Ala Pro Pro Pro Gly Gln Ala Glu Arg Gln Pro Leu Arg Ala Ala Thr
    770                 775                 780

Ala Thr Trp Ile Glu Ala Glu Thr Leu Pro Asp Lys Gly Asp Ser Arg
785                 790                 795                 800

Ala Val Gln Ile Thr Thr Ser Ala Pro His Leu Pro Ala Arg Val Pro
                805                 810                 815

Gly Asp Ala Thr Gly Arg Pro Ala Pro Ser Leu Pro Gly Gln Gly Ile
            820                 825                 830
```

```
Pro Glu Ser Pro Ala Glu Glu Gln Val Ile Pro Ser Ser Asp Val Leu
835                 840                 845

Val Thr His Ser Pro Pro Asp Phe Asp Pro Cys Phe Ala Gly Ala Ser
850                 855                 860

Asn Ile Cys Gly Pro Gly Thr Cys Val Ser Leu Pro Asn Gly Tyr Arg
865                 870                 875                 880

Cys Val Cys Ser Pro Gly Tyr Gln Leu His Pro Ser Gln Asp Tyr Cys
                885                 890                 895

Thr Asp Asp Asn Glu Cys Met Arg Asn Pro Cys Glu Gly Arg Gly Arg
            900                 905                 910

Cys Val Asn Ser Val Gly Ser Tyr Ser Cys Leu Cys Tyr Pro Gly Tyr
        915                 920                 925

Thr Leu Val Thr Leu Gly Asp Thr Gln Glu Cys Gln Asp Ile Asp Glu
    930                 935                 940

Cys Glu Gln Pro Gly Val Cys Ser Gly Gly Arg Cys Ser Asn Thr Glu
945                 950                 955                 960
```

Gly Ser Tyr His Cys Glu Cys Asp Arg Gly Tyr Ile Met Val Arg Lys
965 970 975

Gly His Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Arg His Pro Gly Thr Cys Pro
980 985 990

Asp Gly Arg Cys Val Asn Ser Pro Gly Ser Tyr Thr Cys Leu Ala Cys
995 1000 1005

Glu Glu Gly Tyr Val Gly Gln Ser Gly Ser Cys Val Asp Val Asn Glu
1010 1015 1020

Cys Leu Thr Pro Gly Ile Cys Thr His Gly Arg Cys Ile Asn Met Glu
1025 1030 1035 1040

Gly Ser Phe Arg Cys Ser Cys Glu Pro Gly Tyr Glu Val Thr Pro Asp
1045 1050 1055

Lys Lys Gly Cys Arg Asp Val Asp Glu Cys Ala Ser Arg Ala Ser Cys
1060 1065 1070

Pro Thr Gly Leu Cys Leu Asn Thr Glu Gly Ser Phe Thr Cys Ser Ala
1075 1080 1085

Cys Gln Ser Gly Tyr Trp Val Asn Glu Asp Gly Thr Ala Cys Glu Asp
1090 1095 1100

Leu Asp Glu Cys Ala Phe Pro Gly Val Cys Pro Thr Gly Val Cys Thr
1105 1110 1115 1120

Asn Thr Val Gly Ser Phe Ser Cys Lys Asp Cys Asp Gln Gly Tyr Arg
1125 1130 1135

Pro Asn Pro Leu Gly Asn Arg Cys Glu Asp Val Asp Glu Cys Glu Gly
1140 1145 1150

Pro Gln Ser Ser Cys Arg Gly Gly Glu Cys Lys Asn Thr Glu Gly Ser
1155 1160 1165

Tyr Gln Cys Leu Cys His Gln Gly Phe Gln Leu Val Asn Gly Thr Met
1170 1175 1180

Cys Glu Asp Val Asn Glu Cys Val Gly Glu Glu His Cys Ala Pro His
1185 1190 1195 1200

Gly Glu Cys Leu Asn Ser Leu Gly Ser Phe Phe Cys Leu Cys Ala Pro
1205 1210 1215

Gly Phe Ala Ser Ala Glu Gly Gly Thr Arg Cys Gln Asp Val Asp Glu
1220 1225 1230

Cys Ala Ala Thr Asp Pro Cys Pro Gly Gly His Cys Val Asn Thr Glu
1235 1240 1245

Gly Ser Phe Ser Cys Leu Cys Glu Thr Ala Ser Phe Gln Pro Ser Pro
1250 1255 1260

Asp Ser Gly Glu Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asp Arg Glu Asp
1265 1270 1275 1280

Pro Val Cys Gly Ala Trp Arg Cys Glu Asn Ser Pro Gly Ser Tyr Arg
1285 1290 1295

Cys Ile Leu Asp Cys Gln Pro Gly Phe Tyr Val Ala Pro Asn Gly Asp
1300 1305 1310

Cys Ile Asp Ile Asp Glu Cys Ala Asn Asp Thr Val Cys Gly Asn His
1315 1320 1325

Gly Phe Cys Asp Asn Thr Asp Gly Ser Phe Arg Cys Leu Cys Asp Gln
1330 1335 1340

Gly Phe Glu Thr Ser Pro Ser Gly Trp Glu Cys Val Asp Val Asn Glu
1345 1350 1355 1360

Cys Glu Leu Met Ala Val Cys Gly Asp Ala Leu Cys Glu Asn Val
1365 1370 1375

Glu Gly Ser Phe Leu Cys Leu Cys Ala Ser Asp Leu Glu Glu Tyr Asp
1380 1385 1390

Ala Glu Glu Gly His Cys Arg Pro Arg Val Ala Gly Ala Gln Arg Ile
1395 1400 1405

Pro Glu Val Arg Thr Glu Asp Gln Ala Pro Ser Leu Ile Arg Met Glu
1410 1415 1420

Cys Tyr Ser Glu His Asn Gly Gly Pro Pro Cys Ser Gln Ile Leu Gly
1425 1430 1435 1440

Gln Asn Ser Thr Gln Ala Glu Cys Cys Cys Thr Gln Gly Ala Arg Trp
1445 1450 1455

Gly Lys Ala Cys Ala Pro Cys Pro Ser Glu Asp Ser Val Glu Phe Ser
1460 1465 1470

Gln Leu Cys Pro Ser Gly Gln Gly Tyr Ile Pro Val Glu Gly Ala Trp
1475 1480 1485

Thr Phe Gly Gln Thr Met Tyr Thr Asp Ala Asp Glu Cys Val Leu Phe
1490 1495 1500

Gly Pro Ala Leu Cys Gln Asn Gly Arg Cys Ser Asn Ile Val Pro Gly
1505 1510 1515 1520

Tyr Ile Cys Leu Cys Asn Pro Gly Tyr His Tyr Asp Ala Ser Ser Arg
1525 1530 1535

Lys Cys Gln Asp His Asn Glu Cys Gln Asp Leu Ala Cys Glu Asn Gly
1540 1545 1550

Glu Cys Val Asn Gln Glu Gly Ser Phe His Cys Leu Cys Asn Pro Pro
1555 1560 1565

Leu Thr Leu Asp Leu Ser Gly Gln Arg Cys Val Asn Thr Thr Ser Ser
1570 1575 1580

Thr Glu Asp Phe Pro Asp His Asp Ile His Met Asp Ile Cys Trp Lys
1585 1590 1595 1600

Lys Val Thr Asn Asp Val Cys Ser Gln Pro Leu Arg Gly His His Thr
1605 1610 1615

Thr Tyr Thr Glu Cys Cys Cys Gln Asp Gly Glu Ala Trp Ser Gln Gln
1620 1625 1630

Cys Ala Leu Cys Pro Pro Arg Ser Ser Glu Val Tyr Ala Gln Leu Cys
1635 1640 1645

Asn Val Ala Arg Ile Glu Ala Glu Arg Gly Ala Gly Ile His Phe Arg
1650 1655 1660

Pro Gly Tyr Glu Tyr Gly Pro Gly Leu Asp Asp Leu Pro Glu Asn Leu
1665 1670 1675 1680

Tyr Gly Pro Asp Gly Ala Pro Phe Tyr Asn Tyr Leu Gly Pro Glu Asp
1685 1690 1695

Thr Ala Pro Glu Pro Pro Phe Ser Asn Pro Ala Ser Gln Pro Gly Asp
1700 1705 1710

Asn Thr Pro Val Leu Glu Pro Pro Leu Gln Pro Ser Glu Leu Gln Pro
1715 1720 1725

```
His Tyr Leu Ala Ser His Ser Glu Pro Pro Ala Ser Phe Glu Gly Leu
 1730                1735                1740
Gln Ala Glu Glu Cys Gly Ile Leu Asn Gly Cys Glu Asn Gly Arg Cys
1745                1750                1755                1760
Val Arg Val Arg Glu Gly Tyr Thr Cys Asp Cys Phe Glu Gly Phe Gln
                1765                1770                1775
Leu Asp Ala Pro Thr Leu Ala Cys Val Asp Val Asn Glu Cys Glu Asp
            1780                1785                1790
Leu Asn Gly Pro Ala Arg Leu Cys Ala His Gly His Cys Glu Asn Thr
        1795                1800                1805
Glu Gly Ser Tyr Arg Cys His Cys Ser Pro Gly Tyr Val Ala Glu Pro
    1810                1815                1820
Gly Pro Pro His Cys Ala Ala Lys Glu *
1825                1830
```

Patentansprüche

1. Zusammensetzung, umfassend ein isoliertes Nukleinsäuresegment und eine Knochen-verträgliche Matrix, zur Verwendung in der Human- und Tiermedizin, wobei das isolierte Nukleinsäuresegment für ein osteotropes Protein, Polypeptid oder Peptid codiert, und wobei die Matrix eine collagenöse Matrix, eine Metallmatrix, eine Hydroxylapatitmatrix, eine Hydroxylapatit-beschichtete Metallmatrix, eine Bioglasmatrix, eine Aluminatmatrix, eine Biokeramikmatrix, eine Acrylesterpolymermatrix, eine Milchsäurepolymermatrix, eine Glycolsäurepolymermatrix, eine Milchsäure/Glycolsäure-Polymermatrix, ein PLGA-Blockcopolymer, ein biologisch abbaubares und chemisch definiertes Calciumsulfat, Tricalciumphosphat, Polyanhydrid, eine Matrix aus gereinigten Proteinen, eine Zusammensetzung aus einer halbgereinigten extracellulären Matrix, Calcium-Aluminat-Phosphat, ein Polymer von Orthoestern, Anhydriden oder Propylen-Cofumaraten ist.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Nukleinsäuresegment ein isoliertes osteotropes Gen ist, wobei die Zusammensetzung die Expression des Gens in Knochen-Vorläuferzellen fördern und die Zellen stimulieren kann.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 2, wobei die Zusammensetzung das Wachstum von Knochengewebe fördern kann.

4. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Zusammensetzung hergestellt wird durch Inkontaktbringen des Nukleinsäuresegments oder des Gens mit der Knochen-verträglichen Matrix

unter Bildung einer Zusammensetzung aus Matrix-Nukleinsäuresegment/Gen.

5. Zusammensetzung nach Anspruch 4, wobei die Zusammensetzung das Segment oder Gen in Assoziation mit der Knochen-verträglichen Matrix und einem pluronischen Mittel zur Bildung einer einspritzbaren Zusammensetzung aus Matrix-Nukleinsäuresegment/Gen umfaßt.

6. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Zusammensetzung weiterhin ein nachweisbares Mittel zur Verwendung in einer Abbildungsmodalität umfaßt.

7. Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei die Zusammensetzung weiterhin ein radiographisches Mittel umfaßt.

8. Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei die Zusammensetzung weiterhin ein paramagnetisches Ion umfaßt.

9. Zusammensetzung nach Anspruch 6, wobei die Zusammensetzung weiterhin ein radioaktives Ion umfaßt.

10. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Zusammensetzung weiterhin Calciumphosphat umfaßt.

11. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 10, wobei das Nukleinsäuresegment ein DNA-Molekül oder ein RNA-Molekül ist.

12. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die Matrix eine Titanmatrix oder ein Collagen-Präparat ist.

13. Zusammensetzung nach Anspruch 12, wobei die Matrix eine Titan-Matrix ist, die mit Hydroxylapatit, gesintertem Hydroxylapatit beschichtet ist, oder wobei die Matrix ein Collagen-Typ I- oder Collagen-Typ II-Präparat ist.

14. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei die Knochen-verträgliche Matrix eine Milchsäure/Glycolsäure-Polymermatrix ist.

15. Zusammensetzung nach Anspruch 13, wobei das Typ II-Collagenpräparat aus Hyalinknorpel erhalten wird, ein Präparat eines rekombinanten Typ II-Collagens oder ein Präparat eines mineralisierten Typ II-Collagens ist.

16. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 15, wobei das Nukleinsäuresegment ein lineares Nukleinsäuremolekül, ein Plasmid, ein rekombinantes Insert innerhalb des Genoms eines rekombinanten Virus, oder ein Nukleinsäuresegment ist, das mit einem Liposom assoziiert ist, oder wobei das osteotrope Gen in Form von Plasmid-DNA, eines DNA-Inserts innerhalb des Genoms eines rekombinanten Adenovirus, eines DNA-Inserts innerhalb des Genoms eines rekombinanten Adeno-assoziierten Virus (AAV), eines DNA-Inserts innerhalb des Genoms eines rekombinanten Retrovirus oder eines mit einem Liposom assoziierten DNA-Segments vorliegt.

17. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 2 bis 16, wobei die Knochen-Vorläuferzellen Stammzellen, Makrophagen, Fibroblasten, Gefäßzellen, Osteoblasten, Chondroblasten oder Osteoklasten sind.

18. Zusammensetzung nach Anspruch 17, wobei die Knochen-Vorläuferzellen Fibroblasten sind.

19. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 18, wobei das Nukleinsäuresegment oder osteotrope Gen in der Knochen-verträglichen Matrix absorbiert ist, an diese adsorbiert ist oder in diese imprägniert ist.

20. Zusammensetzung nach Anspruch 19, wobei das osteotrope Gen ein Parathormon(PTH)-Gen, ein BMP(Bone Morphogenetic Protein)-Gen, ein Wachstumsfaktor-Gen, ein Wachstumfaktor-Rezeptor-Gen, ein Cytokin-Gen oder ein Chemotaxis-Faktor-Gen ist.

21. Zusammensetzung nach Anspruch 20, wobei das osteotrope Gen ein PTH1-34-Gen, ein BMP-2- oder

BMP-4-Gen, ein TGF (Transforming Growth Factor)-Gen, ein FGF (Fibroblast Growth Factor)-Gen, ein GMCSF (Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor)-Gen, ein EGF(Epidermal Growth Factor)-Gen, ein PDGF(Platelet Derived GrowthFactor)-Gen, ein IGF(Insulin-like Growth Factor)-Gen, ein LIF(Leukemia Inhibitory Factor)-Gen, ein LTBP-2 oder ein LTBP 3-Gen ist.

22. Zusammensetzung nach Anspruch 20 oder 21, wobei das osteotrope Gen ein TGF-α-, ein TGF-β1-, ein TGF-β2- oder ein LTBP-3-Gen ist.

23. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 22, wobei die Zusammensetzung eine Knochen-verträgliche Matrix und zwei oder drei Nukleinsäuresegmente oder zwei oder drei osteotrope Gene umfaßt.

24. Zusammensetzung nach Anspruch 23, wobei die Zusammensetzung ein PTH-Gen und ein BMP-Gen umfaßt.

25. Zusammensetzung nach Anspruch 24, wobei die Zusammensetzung ein PTH1-34-Gen oder ein BMP-4-Gen umfaßt.

26. Verwendung der Zusammensetzung nach irgendeinem der vorausgehenden Ansprüche bei der Herstellung einer Formulierung oder eines Medikaments zur Übertragung eines Nukleinsäuresegments in Knochen-Vorläuferzellen.

27. Verwendung der Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 2 bis 25 bei der Herstellung einer Formulierung oder eines Medikaments zum Fördern der Expression eines osteotropen Gens in, und zum Stimulieren von, Knochen-Vorläuferzellen.

28. Verwendung nach Anspruch 26 oder 27, wobei derartige Knochen-Vorläuferzellen sich innerhalb einer Knochenvorläufer-Gewebestelle eines Tieres befinden.

29. Verwendung nach Anspruch 27, wobei die Formulierung oder das Medikament auf die Stelle einer Knochenfraktur aufgebracht wird oder in der Stelle einer Knochenhöhle implantiert wird, um Knochengewebe-Wachstum bei dem Tier zu fördern.

30. Verwendung nach Anspruch 29, wobei die Knochenhöhle eine Knochenhöhlenstelle ist, die das Ergebnis einer dentalen oder periodontalen Chirurgie oder der Entfernung eines Osteosarkoms ist.

31. Verwendung nach irgendeinem der Ansprüche 26 bis 30, wobei die Knochen-Vorläuferzellen Fibroblasten sind.

32. Verwendung der Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 25 bei der Herstellung eines Medikaments zur Bewirkung einer Wundheilung und einer verwandten Gewebereparatur.

33. In-vitro Verfahren zum Übertragen eines Nukleinsäuresegments oder Gens in Knochen-Vorläuferzellen, wobei das Verfahren den Schritt des Inkontaktbringens von Knochen-Vorläuferzellen mit der Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 25 umfaßt.

34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei die Knochen-Vorläuferzellen Fibroblasten sind.

35. Kit, der, in geeigneten Behältermitteln, die Knochen-verträgliche Matrix und das isolierte Nukleinsäuresegment oder Gen, wie in einem der Ansprüche 1 bis 25 definiert, in einer pharmazeutisch verträglichen Form umfaßt.

36. Kit nach Anspruch 35, wobei das Nukleinsäuresegment ein lyophilisiertes Genpräparat umfaßt.

37. Osteotrope Vorrichtung, die ein isoliertes osteotropes Gen, wie es in irgendeinem der Ansprüche 2 bis 25 definiert wird, umfaßt, wobei die Vorrichtung in der Lage ist, die Knochenbildung zu stimulieren, wenn sie innerhalb einer Knochenvorläufer-Gewebestelle eines Tiers implantiert ist.

38. Vorrichtung nach Anspruch 37, die eine osteotrope Vorrichtung aus Hydroxylapatitbeschichtetem Titan ist.

39. Vorrichtung nach Anspruch 37 oder 38, wobei die Vorrichtung so geformt ist, daß sie einer Knochenfrakturstelle angepaßt ist oder so geformt ist, daß sie eine Knochenhöhlenstelle bei dem Tier ausfüllt, oder wobei die Vorrichtung ein künstliches Gelenk ist.

Es folgen 45 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

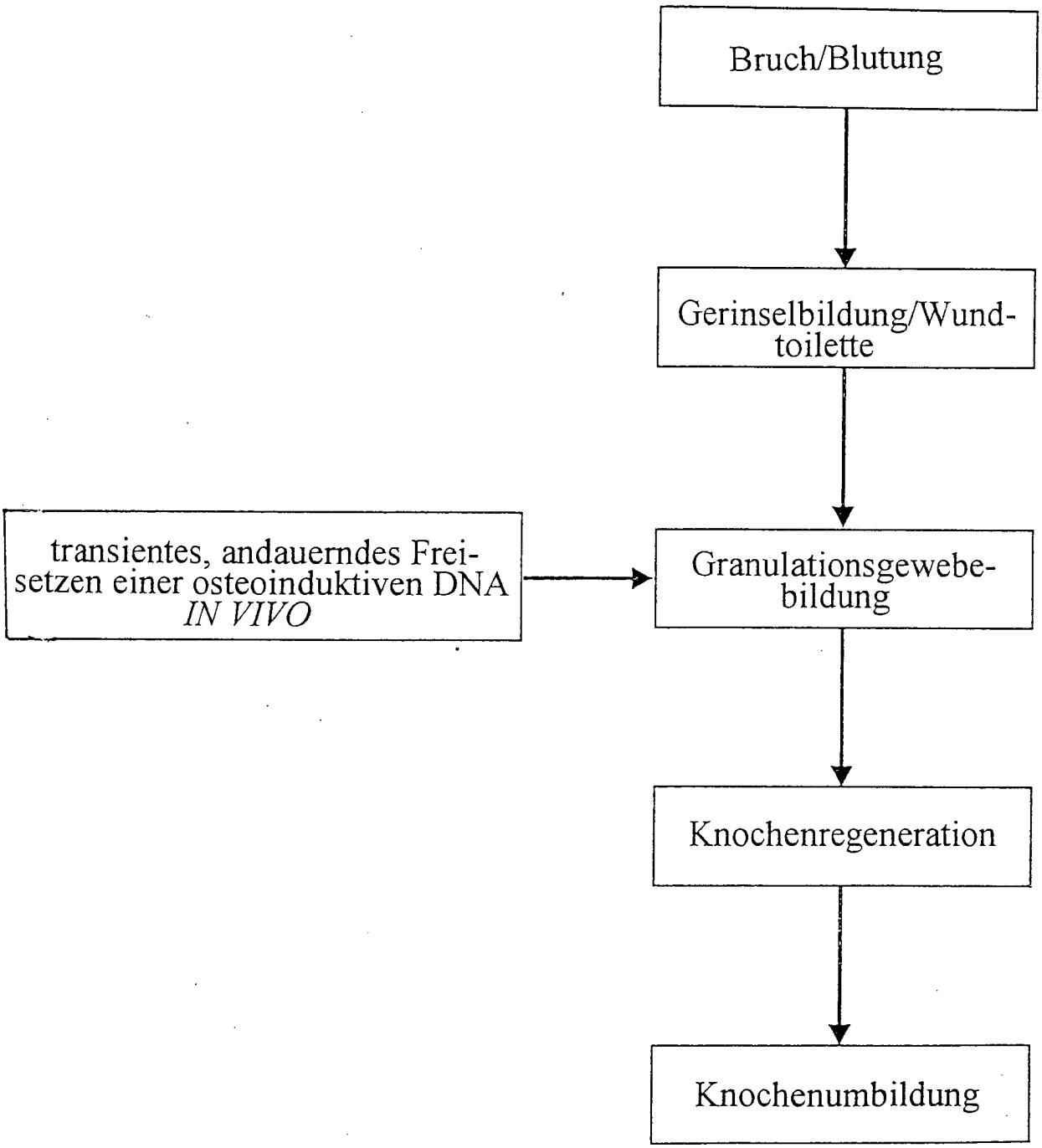


FIG. 1

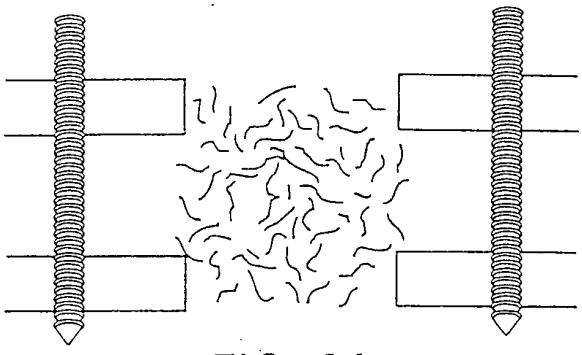


FIG. 2A

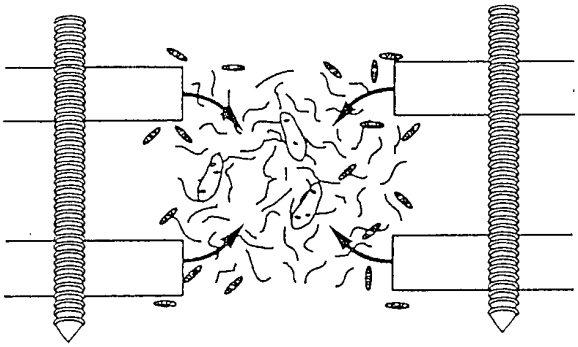


FIG. 2B

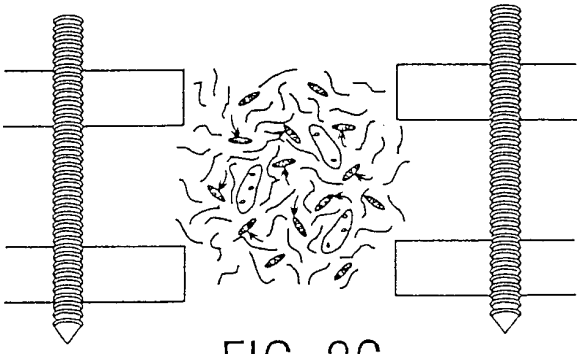


FIG. 2C

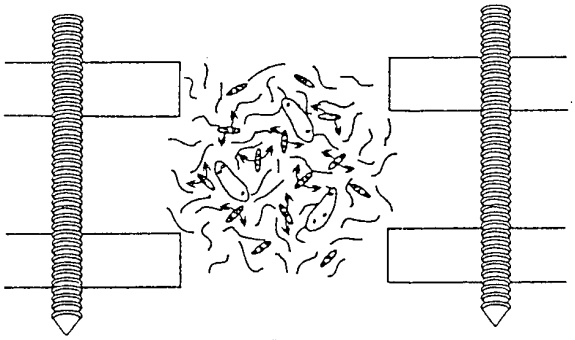


FIG. 2D

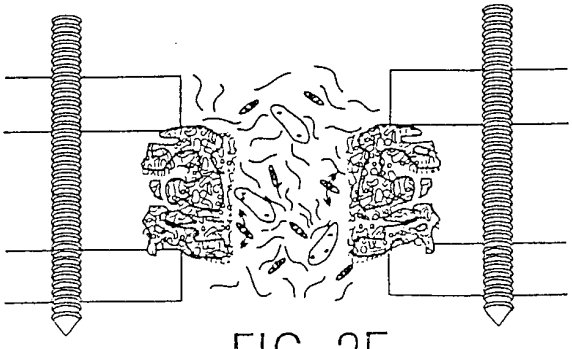


FIG. 2E



FIG. 3A

FIG. 3B



FIG. 3C

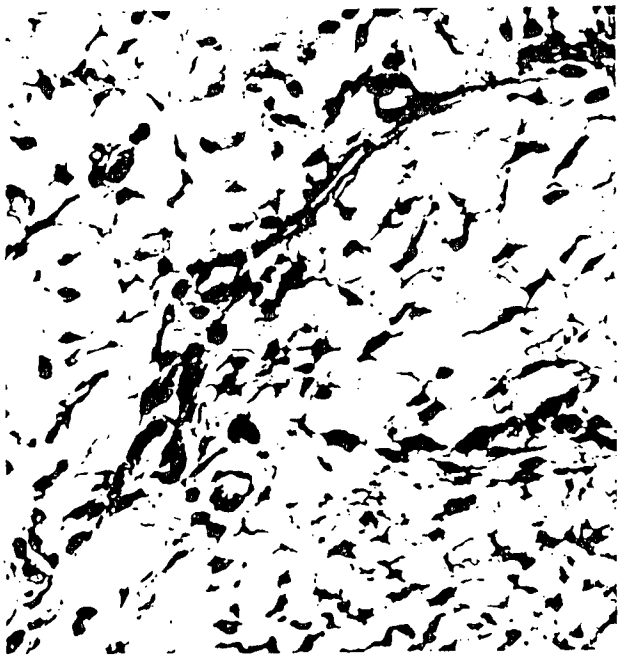


FIG.3D



FIG. 3E



FIG. 4

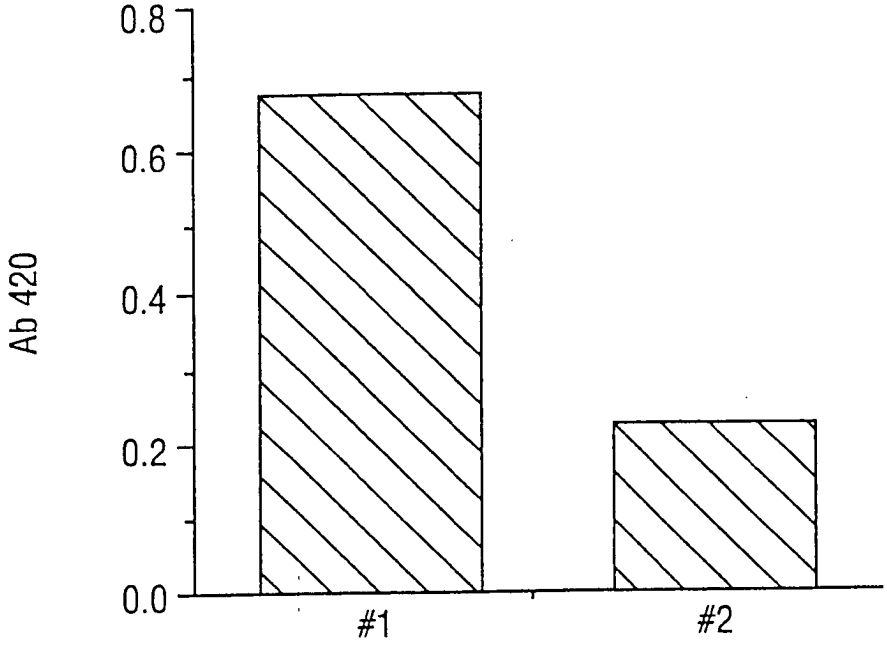

Ab 420
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
#1
#2

FIG. 5A

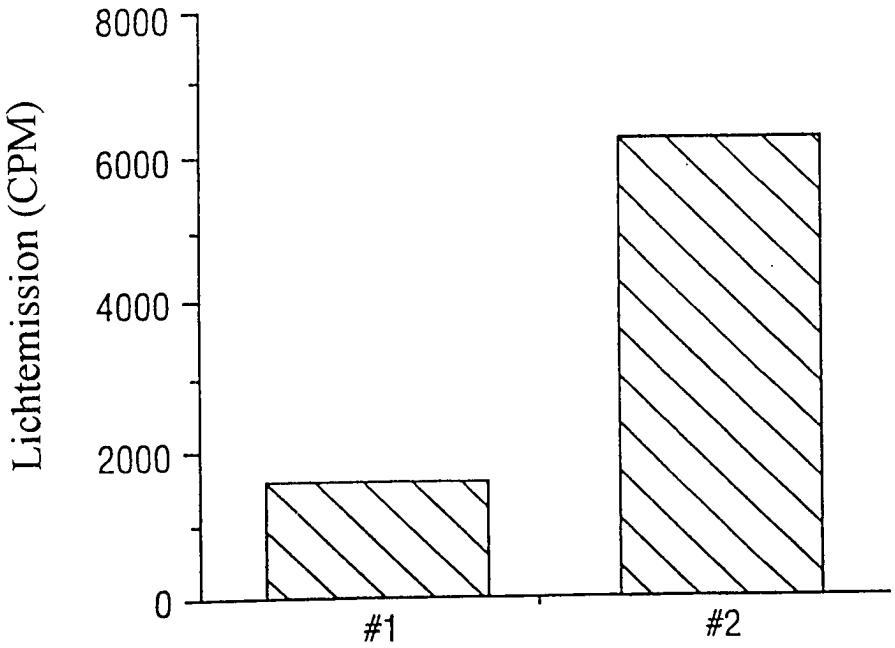

Lichtemission (CPM)
8000
6000
4000
2000
0
#1
#2

FIG. 5B



FIG. 6A

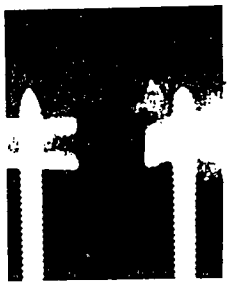


FIG. 6B

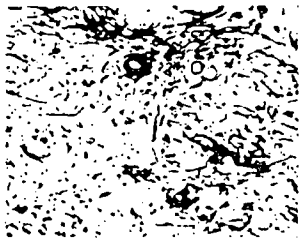


FIG. 6C



FIG. 6D

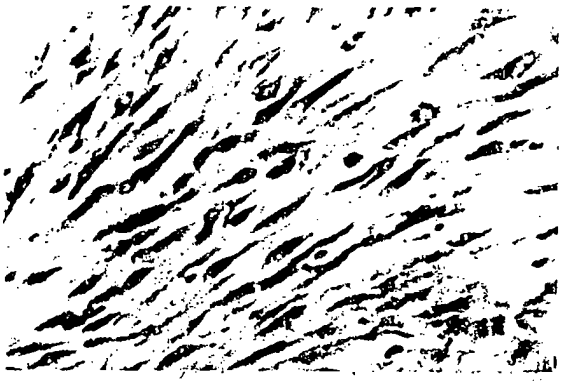


FIG. 7A



FIG. 7B



FIG. 8A

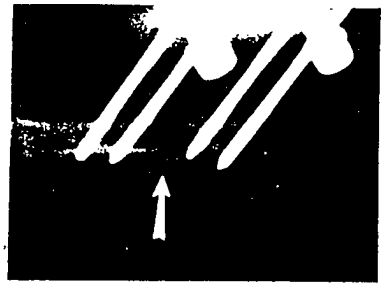


FIG. 8B

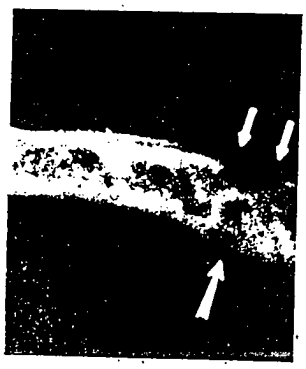


FIG. 8C

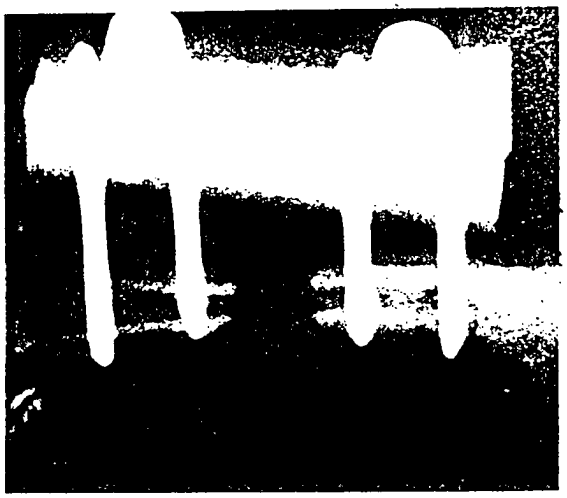


FIG. 9A

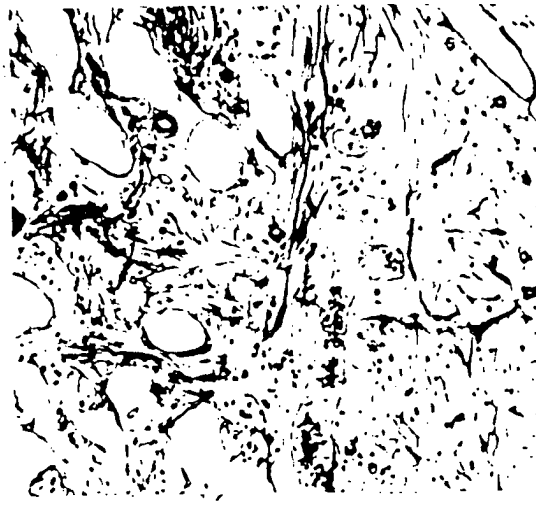


FIG. 9B

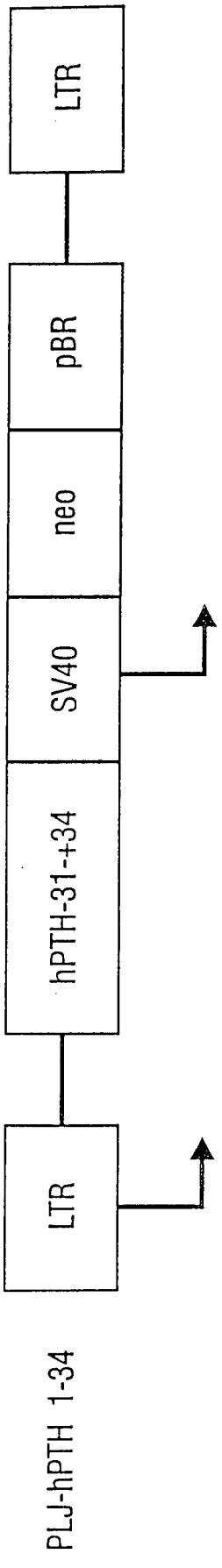


FIG. 10

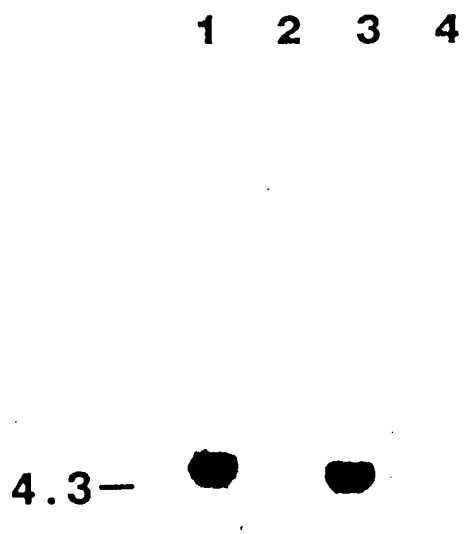


FIG. 11

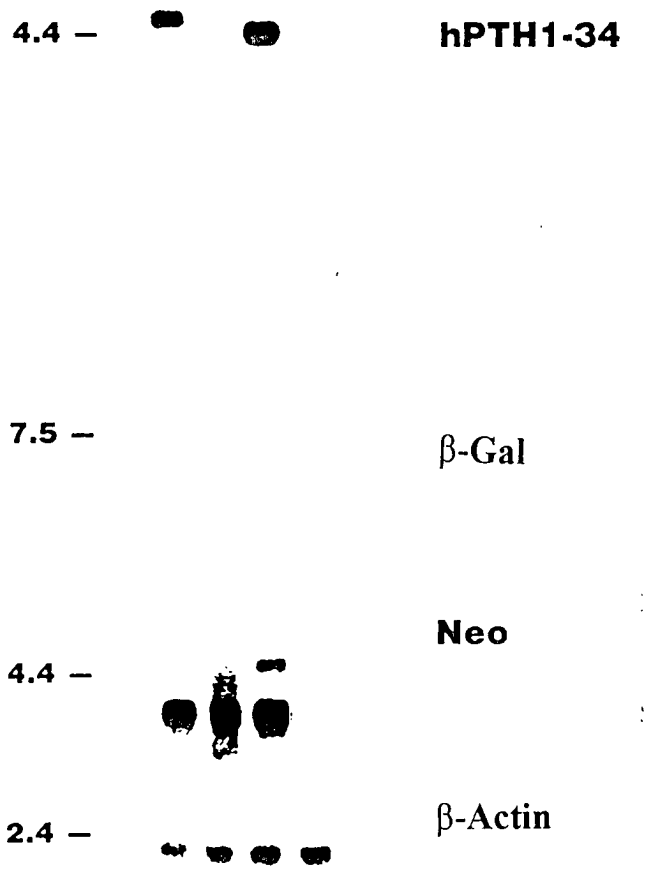


FIG. 12


Kontrolle
Oberschenkelknochen
Osteotomie
Oberschenkelknochen

FIG. 13

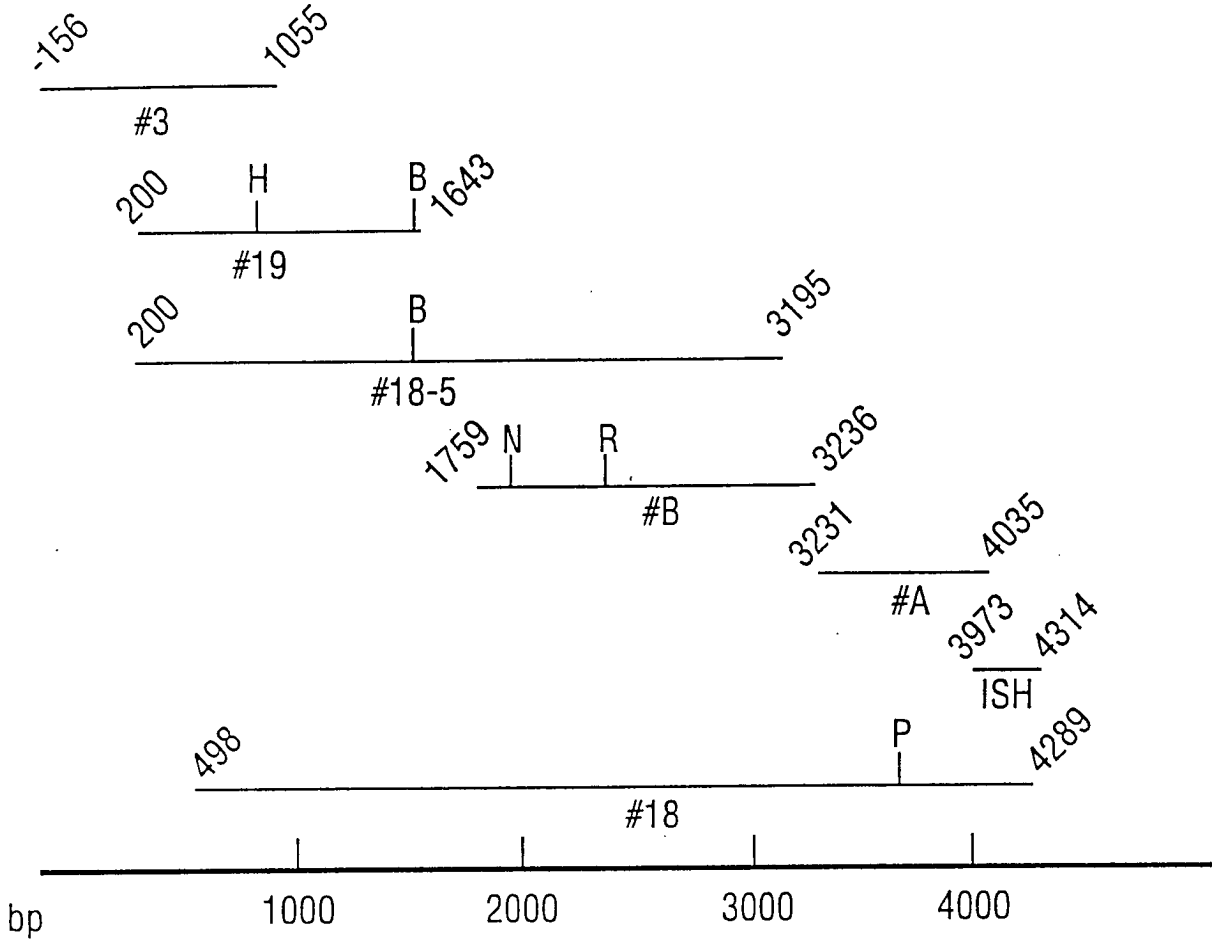

-156
1055
#3
200
H
B
1643
#19
200
B
3195
#18-5
1759
N
R
3236
#B
3231
4035
#A
3973
4314
ISH
498
P
4289
#18
bp
1000
2000
3000
4000

FIG. 14

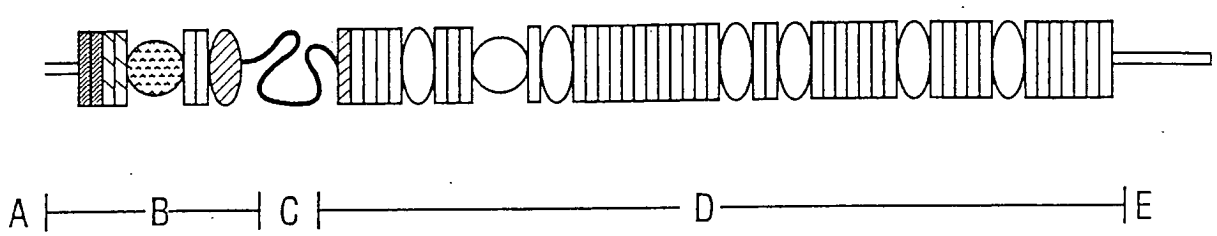


FIG. 15A

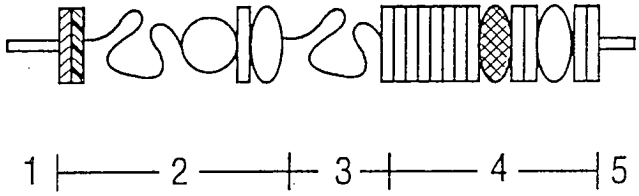


FIG. 15B

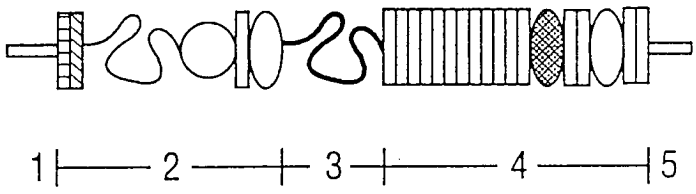


FIG. 15C

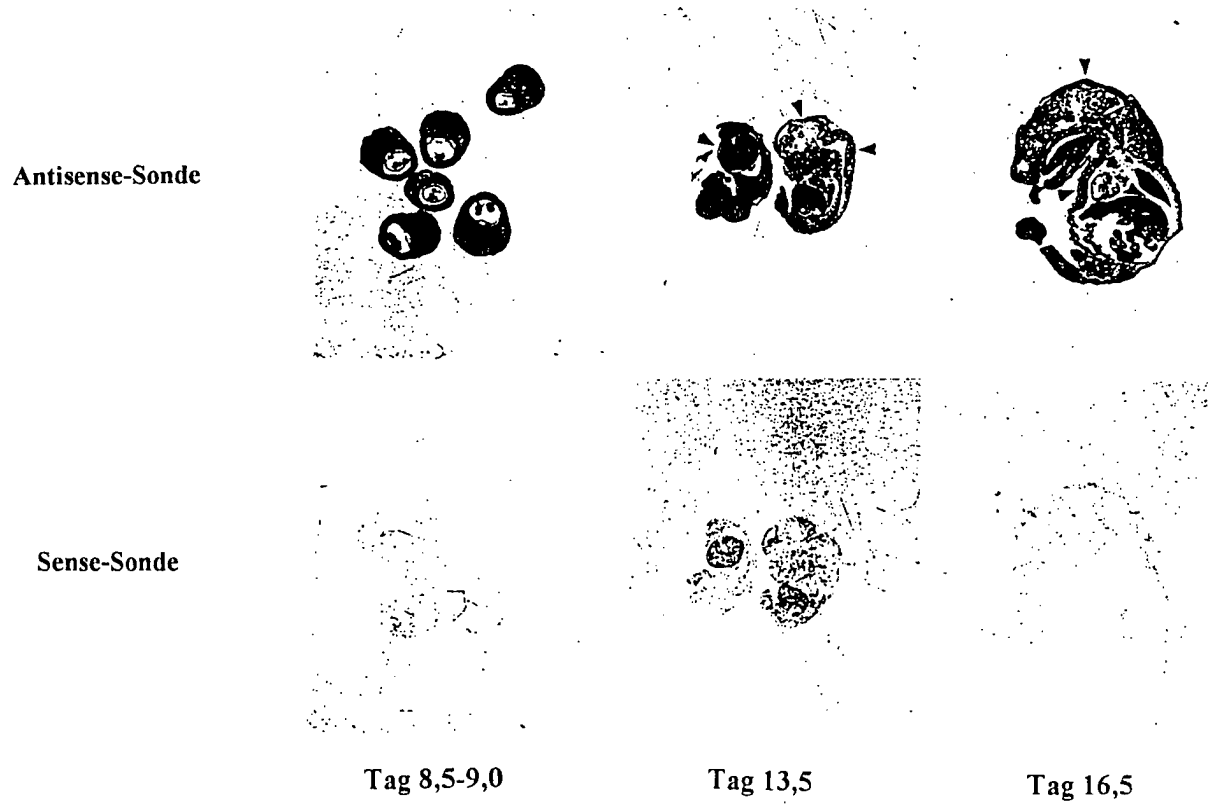


FIG. 16

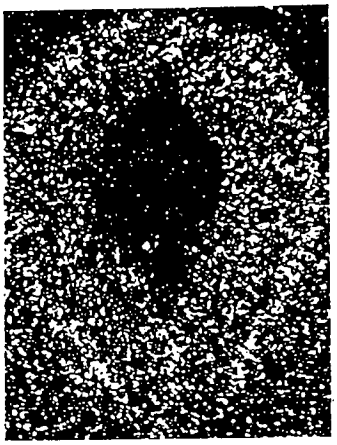


FIG. 17A



FIG. 17B



FIG. 17C



FIG. 17D

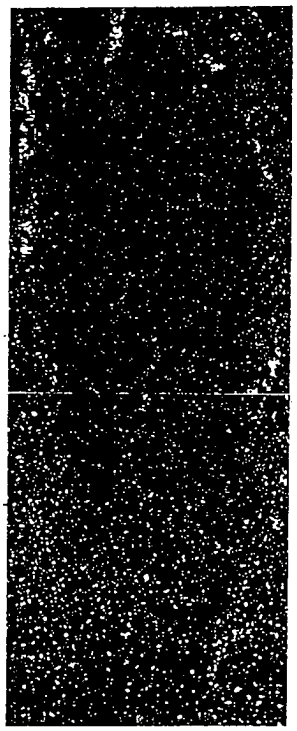


FIG. 18A

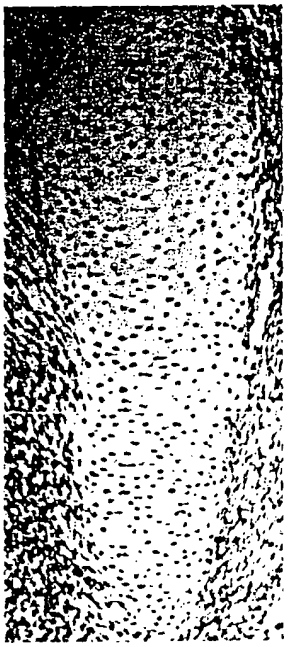


FIG. 18B

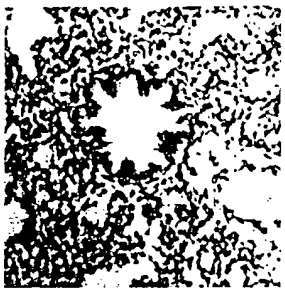


FIG. 18C

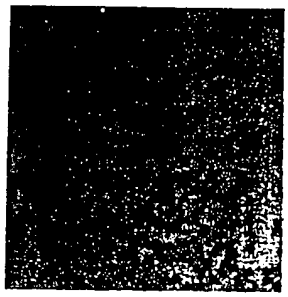


FIG. 18D

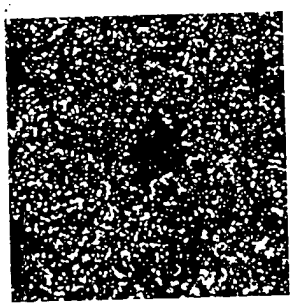


FIG. 18E

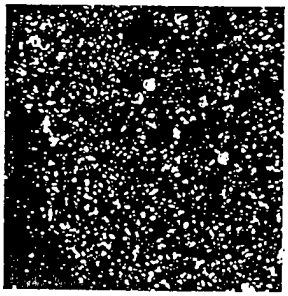


FIG. 18F



FIG. 18G



FIG. 18H

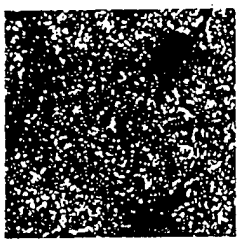


FIG. 18I

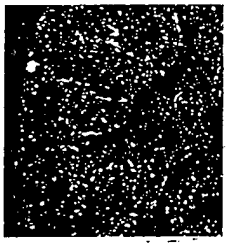


FIG. 18J



FIG. 18K



FIG. 18L

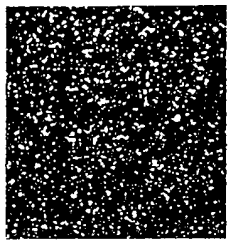


FIG. 18M



FIG. 18N



FiG. 180

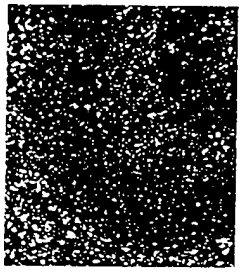
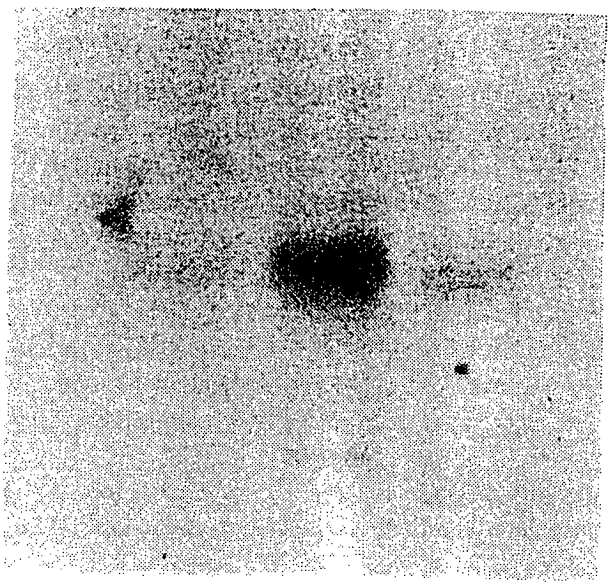


FIG. 18P



TAG 5 14 28

FIG. 19

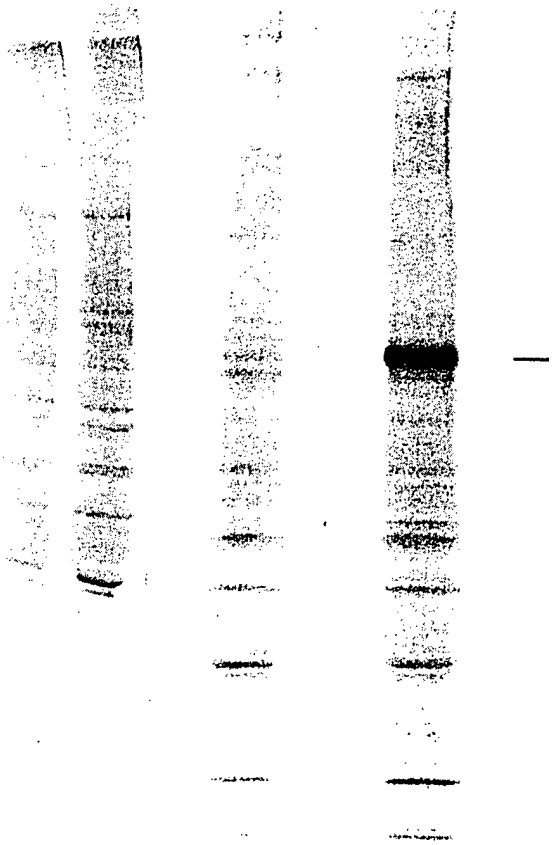


FIG. 20

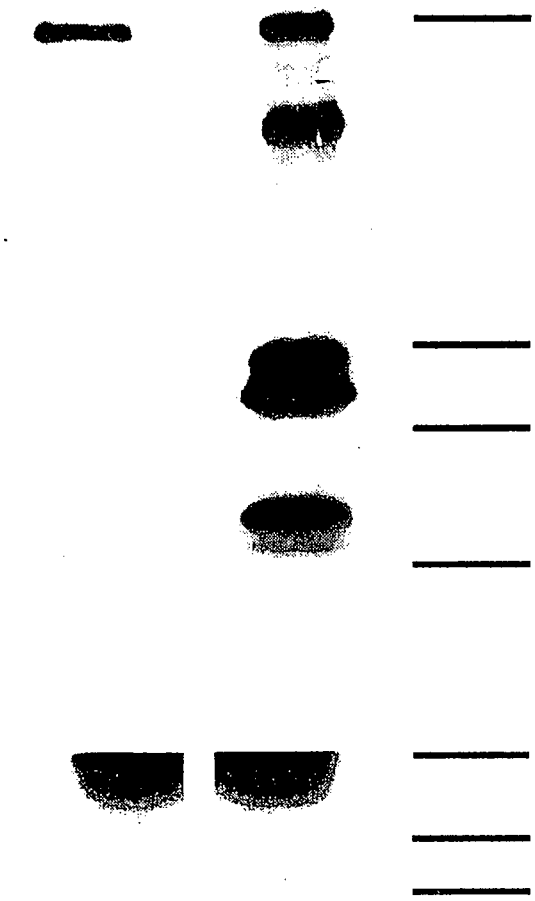


FIG. 21

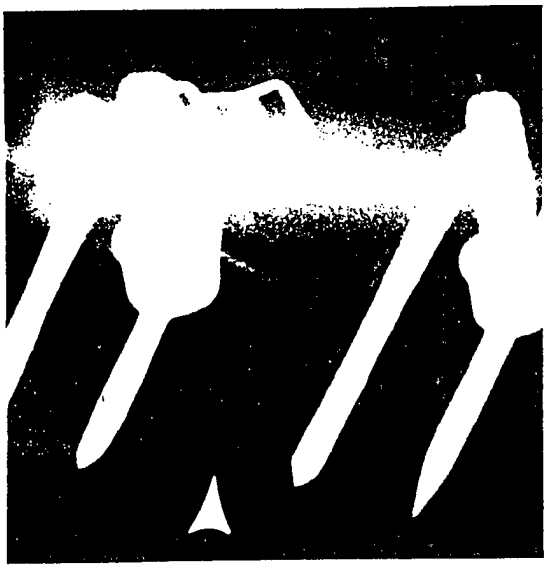


FIG. 22A



FIG. 22B



FIG. 22C



FIG. 23A



FIG. 23B

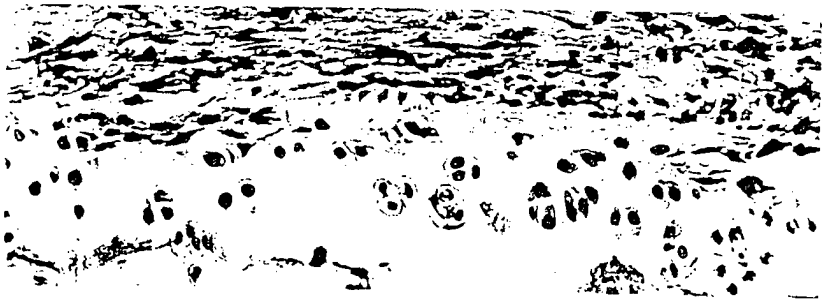


FIG. 23C

```
MIPGNRMLMV VLLCQVLLGG ATDASLMPET GKKKVAEIQG HAGGRRSGQS HELLRDFEAT LLQMFGLRRR
PQPSKSAVIP DYMSDLYRLQ SGEEEEEEQS QGTGLEYPER PASSANTVSS FHHEEHLENI PGTSESSAFR
FFFNLSSIPE NEVISSAELR LFREQVDQGP DWEQGFHRMN IYEVMKPPAE MVPGHLITRL LDTSLVRHNV
TRWETFDVSP AVLRWTREKQ PNYGLAIEVT HLHQTRTHQG QHVSISRSLP QGSGNWAQLR PLLVTFGHDG
RGHTLTRRSA KRSPKHHPQR SSKKNKNCRR HSLYVDFSDV GWNDWIVAPP GYQAFYCHGD CPFPLADHLN
STNHAIVQTL VNSVNSSIPK ACCVPTELSA ISMLYLDEYD KVVLKNYQEM VVEGCGCRYP YDVPDYA
```

FIG. 24

```
ATG CGC CAG GCC GCA TTG GGG CTG CTG GCA CTA CTC CTG CTG GCG CTG CTG GGC 54
 M   R   Q   A   A   L   G   L   L   A   L   L   L   L   A   L   L   G  18

CCC GGC GGC CGA GGG GTG GGC CGG CCG GGC AGC GGG GCA CAG GCG GGG GCG GGG 108
 P   G   G   R   G   V   G   R   P   G   S   G   A   Q   A   G   A   G  36

CGC TGG GCC CAA CGC TTC AAG GTG GTC TTT GCG CCT GTG ATC TGC AAG CGG ACC 162
 R   W   A   Q   R   F   K   V   V   F   A   P   V   I   C   K   R   T  54

TGT CTG AAG GGC CAG TGT CGG GAC AGC TGT CAG CAG GGC TCC AAC ATG ACG CTC 216
 C   L   K   G   Q   C   R   D   S   C   Q   Q   G   S   N   M   T   L  72

ATC GGA GAG AAC GGC CAC AGC ACC GAC ACG CTC ACC GGT TCT GCC TTC CGC GTG 270
 I   G   E   N   G   H   S   T   D   T   L   T   G   S   A   F   R   V  90

GTG GTG TGC CCT CTA CCC TGC ATG AAC GGT GGC CAG TGC TCT TCC CGA AAC CAG 324
 V   V   C   P   L   P   C   M   N   G   G   Q   C   S   S   R   N   Q 108

TGC CTG TGT CCC CCG GAT TTC ACG GGG CGC TTC TGC CAG GTG CCT GCT GCA GGA 378
 C   L   C   P   P   D   F   T   G   R   F   C   Q   V   P   A   A   G 126

ACC GGA GCT GGC ACC GGG AGT TCA GGC CCC GGC TGG CCC GAC CGG GCC ATG TCC 432
 T   G   A   G   T   G   S   S   G   P   G   W   P   D   R   A   M   S 144

ACA GGC CCG CTG CCG CCC CTT GCC CCA GAA GGA GAG TCT GTG GCT AGC AAA CAC 486
 T   G   P   L   P   P   L   A   P   E   G   E   S   V   A   S   K   H 162

GCC ATT TAC GCG GTG CAG GTG ATC GCA GAT CCT CCC GGG CCG GGG GAG GGT CCT 540
 A   I   Y   A   V   Q   V   I   A   D   P   P   G   P   G   E   G   P 180

CCT GCA CAA CAT GCA GCC TTC TTG GTG CCC CTG GGG CCA GGA CAA ATC TCG GCA 594
 P   A   Q   H   A   A   F   L   V   P   L   G   P   G   Q   I   S   A 198

GAA GTG CAG GCT CCG CCC CCC GTG GTG AAC GTG CGT GTC CAT CAC CCT CCT GAA 648
 E   V   Q   A   P   P   P   V   V   N   V   R   V   H   H   P   P   E 216

GCT TCC GTT CAG GTG CAC CGC ATC GAG GGG CCG AAC GCT GAA GGC CCA GCC TCT 702
 A   S   V   Q   V   H   R   I   E   G   P   N   A   E   G   P   A   S 234

TCC CAG CAC TTG CTG CCG CAT CCC AAG CCC CAG CAC CCG AGG CCA CCC ACT CAA 756
 S   Q   H   L   L   P   H   P   K   P   Q   H   P   R   P   P   T   Q 252

AAG CCA CTG GGC CGC TGC TTC CAG GAC ACA TTG CCC AAG CAG CCT TGT GGC AGC 810
 K   P   L   G   R   C   F   Q   D   T   L   P   K   Q   P   C   G   S 270

AAC CCT TTG CCT GGC CTT ACC AAG CAG GAA GAT TGC TGC GGT AGC ATC GGT ACT 864
 N   P   L   P   G   L   T   K   Q   E   D   C   C   G   S   I   G   T 288

GCC TGG GGA CAA AGC AAG TGT CAC AAG TGC CCA CAG CTT CAG TAT ACA GGG GTG 918
 A   W   G   Q   S   K   C   H   K   C   P   Q   L   Q   Y   T   G   V 306

CAG AAG CCT GTA CCT GTA CGT GGG GAG GTG GGT GCT GAC TGC CCC CAG GGC TAC 972
 Q   K   P   V   P   V   R   G   E   V   G   A   D   C   P   Q   G   Y 324

AAG AGG CTC AAC AGC ACC CAC TGC CAG GAT ATC AAC GAA TGT GCG ATG CCC GGG 1026
 K   R   L   N   S   T   H   C   Q   D   I   N   E   C   A   M   P   G 342
```

FIG. 25-1

```
AAT GTG TGC CAT GGT GAC TGC CTC AAC AAC CCT GGC TCT TAT CGC TGT GTC TGC 1080
 N   V   C   H   G   D   C   L   N   N   P   G   S   Y   R   C   V   C 360

CCG CCC GGT CAT AGC TTG GGT CCC CTC GCA GCA CAG TGC ATT GCC GAC AAA CCA 1134
 P   P   G   H   S   L   G   P   L   A   A   Q   C   I   A   D   K   P 378

GAG GAG AAG AGC CTG TGT TTC CGC CTT GTG AGC ACC GAA CAC CAG TGC CAG CAC 1188
 E   E   K   S   L   C   F   R   L   V   S   T   E   H   Q   C   Q   H 396

CCT CTG ACC ACA CGC CTA ACC CGC CAG CTC TGC TGC TGT AGT GTG GGT AAA GCC 1242
 P   L   T   T   R   L   T   R   Q   L   C   C   C   S   V   G   K   A 414

TGG GGT GCC CGG TGC CAG CGC TGC CCG GCA GAT GGT ACA GCA GCC TTC AAG GAG 1296
 W   G   A   R   C   Q   R   C   P   A   D   G   T   A   A   F   K   E 432

ATC TGC CCC GGC TGG GAA AGG GTA CCA TAT CCT CAC CTC CCA CCA GAC GCT CAC 1350
 I   C   P   G   W   E   R   V   P   Y   P   H   L   P   P   D   A   H 450

CAT CCA GGG GGA AAG CGA CTT CTC CCT CTT CCT GCA CCC GAC GGG CCA CCC AAA 1404
 H   P   G   G   K   R   L   L   P   L   P   A   P   D   G   P   P   K 468

CCC CAG CAG CTT CCT GAA AGC CCC AGC CGA GCA CCA CCC CTC GAG GAC ACA GAG 1458
 P   Q   Q   L   P   E   S   P   S   R   A   P   P   L   E   D   T   E 486

GAA GAG AGA GGA GTG ACC ATG GAT CCA CCA GTG AGT GAG GAG CGA TCG GTG CAG 1512
 E   E   R   G   V   T   M   D   P   P   V   S   E   E   R   S   V   Q 504

CAG AGC CAC CCC ACT ACC ACC ACC TCA CCC CCC CGG CCT TAC CCA GAG CTC ATC 1566
 Q   S   H   P   T   T   T   T   S   P   P   R   P   Y   P   E   L   I 522

TCT CGC CCC TCC CCA CCT ACC TTC CAC CGG TTC CTG CCA GAC TTG CCC CCA TCC 1620
 S   R   P   S   P   P   T   F   H   R   F   L   P   D   L   P   P   S 540

CGA AGT GCA GTG GAG ATC GCC CCC ACT CAG GTC ACA GAG ACC GAT GAG TGC CGA 1674
 R   S   A   V   E   I   A   P   T   Q   V   T   E   T   D   E   C   R 558

TTG AAC CAG AAT ATC TGT GGC CAT GGA CAG TGT GTG CCT GGC CCC TCG GAT TAC 1728
 L   N   Q   N   I   C   G   H   G   Q   C   V   P   G   P   S   D   Y 576

TCC TGC CAC TGC AAC GCT GGC TAC CGG TCA CAC CCG CAG CAC CGC TAC TGT GTT 1782
 S   C   H   C   N   A   G   Y   R   S   H   P   Q   H   R   Y   C   V 594

GAT GTG AAC GAG TGC GAG GCA GAG CCC TGC GGC CCC GGG AAA GGC ATC TGT ATG 1836
 D   V   N   E   C   E   A   E   P   C   G   P   G   K   G   I   C   M 612

AAC ACT GGT GGC TCC TAC AAT TGT CAC TGC AAC CGA GGC TAC CGC CTC CAC GTG 1890
 N   T   G   G   S   Y   N   C   H   C   N   R   G   Y   R   L   H   V 630

GGT GCA GGG GGC CGC TCG TGC GTG GAC CTG AAC GAG TGC GCC AAG CCT CAC CTG 1944
 G   A   G   G   R   S   C   V   D   L   N   E   C   A   K   P   H   L 648

TGT GGG GAC GGT GGC TTC TGC ATC AAC TTC CCT GGT CAC TAC AAA TGC AAC TGC 1998
 C   G   D   G   G   F   C   I   N   F   P   G   H   Y   K   C   N   C 666

TAT CCT GGC TAC CGG CTC AAG GCC TCC CGA CCG CCC ATT TGC GAA GAC ATC GAC 2052
 Y   P   G   Y   R   L   K   A   S   R   P   P   I   C   E   D   I   D 684

GAG TGT CGC GAC CCT AGC ACC TGC CCT GAT GGC AAA TGT GAA AAC AAA CCT GGC 2106
 E   C   R   D   P   S   T   C   P   D   G   K   C   E   N   K   P   G 702
```

FIG. 25-2

```
AGC TTC AAG TGC ATC GCC TGC CAG CCT GGC TAC CGT AGC CAG GGG GGC GGG GCC 2160
 S   F   K   C   I   A   C   Q   P   G   Y   R   S   Q   G   G   G   A  720

TGT CGT GAT GTC AAC GAA TGC TCC GAA GGT ACC CCC TGC TCT CCT GGA TGG TGT 2214
 C   R   D   V   N   E   C   S   E   G   T   P   C   S   P   G   W   C  738

GAG AAA CTT CCG GGT TCT TAC CGT TGC ACG TGT GCC CAG GGG ATA CGA ACC CGC 2268
 E   K   L   P   G   S   Y   R   C   T   C   A   Q   G   I   R   T   R  756

ACA GGA CGC CTC AGT TGC ATA GAC GTG GAT GAC TGT GAG GCT GGG AAA GTG TGC 2322
 T   G   R   L   S   C   I   D   V   D   D   C   E   A   G   K   V   C  774

CAA GAT GGC ATC TGC ACG AAC ACA CCA GGC TCT TTC CAG TGT CAG TGC CTC TCC 2376
 Q   D   G   I   C   T   N   T   P   G   S   F   Q   C   Q   C   L   S  792

GGC TAT CAT CTG TCA AGG GAT CGG AGC CGC TGT GAG GAC ATT GAT GAA TGT GAC 2430
 G   Y   H   L   S   R   D   R   S   R   C   E   D   I   D   E   C   D  810

TTC CCT GCG GCC TGC ATC GGG GGT GAC TGC ATC AAT ACC AAT GGT TCC TAC AGA 2484
 F   P   A   A   C   I   G   G   D   C   I   N   T   N   G   S   Y   R  828

TGT CTC TGT CCC CTG GGT CAT CGG TTG GTG GGC GGC AGG AAG TGC AAG AAA GAT 2538
 C   L   C   P   L   G   H   R   L   V   G   G   R   K   C   K   K   D  846

ATA GAT GAG TGC AGC CAG GAC CCA GGC CTG TGC CTG CCC CAT GCC TGC GAG AAC 2592
 I   D   E   C   S   Q   D   P   G   L   C   L   P   H   A   C   E   N  864

CTC CAG GGC TCC TAT GTC TGT GTC TGT GAT GAG GGT TTC ACA CTC ACC CAG GAC 2646
 L   Q   G   S   Y   V   C   V   C   D   E   G   F   T   L   T   Q   D  882

CAG CAT GGG TGT GAG GAG GTG GAG CAG CCC CAC CAC AAG AAG GAG TGC TAC CTT 2700
 Q   H   G   C   E   E   V   E   Q   P   H   H   K   K   E   C   Y   L  900

AAC TTC GAT GAC ACA GTG TTC TGT GAC AGC GTA TTG GCT ACC AAT GTC ACT CAG 2754
 N   F   D   D   T   V   F   C   D   S   V   L   A   T   N   V   T   Q  918

CAG GAA TGC TGT TGC TCT CTG GGA GCT GGC TGG GGA GAC CAC TGC GAA ATC TAT 2808
 Q   E   C   C   C   S   L   G   A   G   W   G   D   H   C   E   I   Y  936

CCC TGT CCA GTC TAC AGC TCA GCC GAA TTT CAC AGC CTG GTG CCT GAT GGG AAA 2862
 P   C   P   V   Y   S   S   A   E   F   H   S   L   V   P   D   G   K  954

AGG CTA CAC TCA GGA CAA CAA CAT TGT GAA CTA TGC ATT CCT GCC CAC CGT GAC 2916
 R   L   H   S   G   Q   Q   H   C   E   L   C   I   P   A   H   R   D  972

ATC GAC GAA TGC ATA TTG TTT GGG GCA GAG ATC TGC AAG GAG GGC AAG TGT GTG 2970
 I   D   E   C   I   L   F   G   A   E   I   C   K   E   G   K   C   V  990

AAC TCG CAG CCC GGC TAC GAG TGC TAC TGC AAG CAG GGC TTC TAC TAC GAT GGC 3024
 N   S   Q   P   G   Y   E   C   Y   C   K   Q   G   F   Y   Y   D   G 1008

AAC CTG CTG GAG TGC GTG GAC GTG GAC GAG TGC TTG GAT GAG TCT AAC TGC AGG 3078
 N   L   L   E   C   V   D   V   D   E   C   L   D   E   S   N   C   R 1026

AAC GGA GTG TGT GAG AAC ACG TGG CGG CTA CCG TGT GCC TGC ACT CCG CCG GCA 3132
 N   G   V   C   E   N   T   W   R   L   P   C   A   C   T   P   P   A 1044

GAG TAC AGT CCC GCA CAG GCC CAG TGT CTG AGC CCG GAG GAG ATG GAG CAC GCC 3186
 E   Y   S   P   A   Q   A   Q   C   L   S   P   E   E   M   E   H   A 1062
```

FIG. 25-3

```
CCA GAG AGA CGT GAA GTG TGC TGG GGC CAG CGA GGA GAG GAC GGC ATG TGT ATG 3240
 P   E   R   R   E   V   C   W   G   Q   R   G   E   D   G   M   C   M  1080

GGG CCC CTG GCG GGA CCT GCC CTC ACT TTT GAT GAC TGC TGC TGC CGC CAG CCG 3294
 G   P   L   A   G   P   A   L   T   F   D   D   C   C   C   R   Q   P  1098

CGG CTG GGG TAC CAG TGC AGA CCG TGC CCG CCA CGT GGC ACC GGG TCC CAG TGC 3348
 R   L   G   Y   Q   C   R   P   C   P   P   R   G   T   G   S   Q   C  1116

CCG ACT TCA CAG AGT GAG AGC AAT TCT TTC TGG GAC ACA AGC CCC CTG CTA CTG 3402
 P   T   S   Q   S   E   S   N   S   F   W   D   T   S   P   L   L   L  1134

GGG AAG TCT CCG CGA GAC GAA GAC AGC TCA GAG GAG GAT TCA GAT GAG TGC CGT 3456
 G   K   S   P   R   D   E   D   S   S   E   E   D   S   D   E   C   R  1152

TGT GTG AGC GGA CCG TGT GTG CCA CGG CCA GGC GGG GCG GTA TGC GAG TGT CCT 3510
 C   V   S   G   P   C   V   P   R   P   G   G   A   V   C   E   C   P  1170

GGA GGC TTT CAG CTG GAC GCC TCC CGT GCC CGC TGC GTG GAC ATT GAT GAG TGC 3564
 G   G   F   Q   L   D   A   S   R   A   R   C   V   D   I   D   E   C  1188

CGA GAA CTG AAC CAG CGG GGA CTG CTG TGT AAG AGC GAG CGG TGC GTG AAC ACC 3618
 R   E   L   N   Q   R   G   L   L   C   K   S   E   R   C   V   N   T  1206

AGT GGA TCC TTC CGC TGT GTC TGC AAA GCT GGC TTC ACG CGC AGC CGC CCT CAC 3672
 S   G   S   F   R   C   V   C   K   A   G   F   T   R   S   R   P   H  1224

GGG CCT GCG TGC CTC AGC GCC GCC GCT GAT GAT GCA GCC ATA GCC CAC ACC TCA 3726
 G   P   A   C   L   S   A   A   A   D   D   A   A   I   A   H   T   S  1242

GTG ATC GAT CAT CGA GGG TAT TTT CAC TGA
 V   I   D   H   R   G   Y   F   H   *
```

FIG. 25-4

Met Arg Gln Ala Ala Leu Gly Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Pro Gly Gly Arg 22
Gly Val Gly Arg Pro Gly Ser Gly Ala Gln Ala Gly Ala Gly Arg Trp Ala Gln Arg Phe Lys Val 44
Val Phe Ala Pro Val Ile Cys Lys Arg Thr Cys Leu Lys Gly Gln Cys Arg Asp Ser Cys Gln Gln 66
Gly Ser Asn Met Thr Leu Ile Gly Glu Asn Gly His Ser Thr Asp Thr Leu Thr Gly Ser Ala Phe 88
Arg Val Val Val Cys Pro Leu Pro Cys Met Asn Gly Gly Gln Cys Ser Ser Arg Asn Gln Cys Leu 110
Cys Pro Pro Asp Phe Thr Gly Arg Phe Cys Gln Val Pro Ala Ala Gly Thr Gly Ala Gly Thr Gly 132
Ser Ser Gly Pro Gly Trp Pro Asp Arg Ala Met Ser Thr Gly Pro Leu Pro Pro Leu Ala Pro Glu 154
Gly Glu Ser Val Ala Ser Lys His Ala Ile Tyr Ala Val Gln Val Ile Ala Asp Pro Pro Gly Pro 176
Gly Glu Gly Pro Pro Ala Gln His Ala Ala Phe Leu Val Pro Leu Gly Pro Gly Gln Ile Ser Ala 198
Glu Val Gln Ala Pro Pro Pro Val Val Asn Val Arg Val His His Pro Pro Glu Ala Ser Val Gln 220
Val His Arg Ile Glu Gly Pro Asn Ala Glu Gly Pro Ala Ser Ser Gln His Leu Leu Pro His Pro 242
Lys Pro Pro His Pro Arg Pro Pro Thr Gln Lys Pro Leu Gly Arg Cys Phe Gln Asp Thr Leu Pro 264
Lys Gln Pro Cys Gly Ser Asn Pro Leu Pro Gly Leu Thr Lys Gln Glu Asp Cys Cys Gly Ser Ile 286
Gly Thr Ala Trp Gly Gln Ser Lys Cys His Lys Cys Pro Gln Leu Gln Tyr Thr Gly Val Gln Lys 308
Pro Val Pro Val Arg Gly Glu Val Gly Ala Asp Cys Pro Gln Gly Tyr Lys Arg Leu Asn Ser Thr 330
His Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Ala Met Pro Gly Asn Val Cys His Gly Asp Cys Leu Asn Asn 352
Pro Gly Ser Tyr Arg Cys Val Cys Pro Pro Gly His Ser Leu Gly Pro Leu Ala Ala Gln Cys Ile 374
Ala Asp Lys Pro Glu Glu Lys Ser Leu Cys Phe Arg Leu Val Ser Thr Glu His Gln Cys Gln His 396
Pro Leu Thr Thr Arg Leu Thr Arg Gln Leu Cys Cys Cys Ser Val Gly Lys Ala Trp Gly Ala Arg 418
Cys Gln Arg Cys Pro Ala Asp Gly Thr Ala Ala Phe Lys Glu Ile Cys Pro Gly Trp Glu Arg Val 440
Pro Tyr Pro His Leu Pro Pro Asp Ala His His Pro Gly Gly Lys Arg Leu Leu Pro Leu Pro Ala 462
Pro Asp Gly Pro Pro Lys Pro Gln Gln Leu Pro Glu Ser Pro Ser Arg Ala Pro Pro Leu Glu Asp 484

FIG. 26-1

DE 695 13 149 T3 2006.07.20

Thr Glu Glu Glu Arg Gly Val Thr Met Asp Pro Pro Val Ser Glu Glu Arg Ser Val Gln Gln Ser 506
His Pro Thr Thr Thr Thr Ser Pro Pro Arg Pro Tyr Pro Glu Leu Ile Ser Arg Pro Ser Pro Pro 528
Thr Phe His Arg Phe Leu Pro Asp Leu Pro Pro Ser Arg Ser Ala Val Glu Ile Ala Pro Thr Gln 550
Val Thr Glu Thr Asp Glu Cys Arg Leu Asn Gln Asn Ile Cys Gly His Gly Gln Cys Val Pro Gly 572
Pro Ser Asp Tyr Ser Cys His Cys Asn Ala Gly Tyr Arg Ser His Pro Gln His Arg Tyr Cys Val 594
Asp Val Asn Glu Cys Glu Ala Glu Pro Cys Gly Pro Gly Lys Gly Ile Cys Met Asn Thr Gly Gly 616
Ser Tyr Asn Cys His Cys Asn Arg Gly Tyr Arg Leu His Val Gly Ala Gly Gly Arg Ser Cys Val 638
Asp Leu Asn Glu Cys Ala Lys Pro His Leu Cys Gly Asp Gly Gly Phe Cys Ile Asn Phe Pro Gly 660
His Tyr Lys Cys Asn Cys Tyr Pro Gly Tyr Arg Leu Lys Ala Ser Arg Pro Pro Ile Cys Glu Asp 682
Ile Asp Glu Cys Arg Asp Pro Ser Thr Cys Pro Asp Gly Lys Cys Glu Asn Lys Pro Gly Ser Phe 704
Lys Cys Ile Ala Cys Gln Pro Gly Tyr Arg Ser Gln Gly Gly Gly Ala Cys Arg Asp Val Asn Glu 726
Cys Ser Glu Gly Thr Pro Cys Ser Pro Gly Trp Cys Glu Lys Leu Pro Gly Ser Tyr Arg Cys Thr 748
Cys Ala Gln Gly Ile Arg Thr Arg Thr Gly Arg Leu Ser Cys Ile Asp Val Asp Asp Cys Glu Ala 770
Gly Lys Val Cys Gln Asp Gly Ile Cys Thr Asn Thr Pro Gly Ser Phe Gln Cys Gln Cys Leu Ser 792
Gly Tyr His Leu Ser Arg Asp Arg Ser Arg Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys Asp Phe Pro Ala Ala 814
Cys Ile Gly Gly Asp Cys Ile Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Arg Cys Leu Cys Pro Leu Gly His Arg 836
Leu Val Gly Gly Arg Lys Cys Lys Lys Asp Ile Asp Glu Cys Ser Gln Asp Pro Gly Leu Cys Leu 858
Pro His Ala Cys Glu Asn Leu Gln Gly Ser Tyr Val Cys Val Cys Asp Glu Gly Phe Thr Leu Thr 880
Gln Asp Gln His Gly Cys Glu Glu Val Glu Gln Pro His His Lys Lys Glu Cys Tyr Leu Asn Phe 902
Asp Asp Thr Val Phe Cys Asp Ser Val Leu Ala Thr Asn Val Thr Gln Gln Glu Cys Cys Cys Ser 924
Leu Gly Ala Gly Trp Gly Asp His Cys Glu Ile Tyr Pro Cys Pro Val Tyr Ser Ser Ala Glu Phe 946
His Ser Leu Val Pro Asp Gly Lys Arg Leu His Ser Gly Gln Gln His Cys Glu Leu Cys Ile Pro 968

FIG. 26-2

DE 695 13 149 T3 2006.07.20

```
Ala His Arg Asp Ile Asp Glu Cys Ile Leu Phe Gly Ala Glu Ile Cys Lys Glu Gly Lys Cys Val   990
Asn Ser Gln Pro Gly Tyr Glu Cys Tyr Cys Lys Gln Gly Phe Tyr Tyr Asp Gly Asn Leu Leu Glu  1012
Cys Val Asp Val Asp Glu Cys Leu Asp Glu Ser Asn Cys Arg Asn Gly Val Cys Glu Asn Thr Trp  1034
Arg Leu Pro Cys Ala Cys Thr Pro Pro Ala Glu Tyr Ser Pro Ala Gln Ala Gln Cys Leu Ile Pro  1056
Glu Arg Trp Ser Thr Pro Gln Arg Asp Val Lys Cys Ala Gly Ala Ser Glu Glu Arg Thr Ala Cys  1078
Val Trp Gly Pro Trp Ala Gly Pro Ala Leu Thr Phe Asp Asp Cys Cys Cys Arg Gln Pro Arg Leu  1100
Gly Thr Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro Arg Gly Thr Gly Ser Gln Cys Pro Thr Ser Gln Ser Glu  1122
Ser Asn Ser Phe Trp Asp Thr Ser Pro Leu Leu Leu Gly Lys Ser Pro Arg Asp Glu Asp Ser Ser  1144
Glu Glu Asp Ser Asp Glu Cys Arg Cys Val Ser Gly Pro Cys Val Pro Arg Pro Gly Gly Ala Val  1166
Cys Glu Cys Pro Gly Gly Phe Gln Leu Asp Ala Ser Arg Ala Arg Cys Val Asp Ile Asp Glu Cys  1188
Arg Glu Leu Asn Gln Arg Gly Leu Leu Cys Lys Ser Glu Arg Cys Val Asn Thr Ser Gly Ser Phe  1210
Arg Cys Val Cys Lys Ala Gly Phe Thr Arg Ser Arg Pro His Gly Pro Ala Cys Leu Ser Ala Ala  1232
Ala Asp Asp Ala Ala Ile Ala His Thr Ser Val Ile Asp His Arg Gly Tyr Phe His              1251
```


FIG. 26-3

```
ATGGAGAGCA CCTCCCCGCG AGGTCTCCGG TGCCCACAGC TCTGCAGCCA CTCTGGCGCC ATGAGAGCGC CGACCACCGC   80
TCGCTGCTCC GGATGCATCC AACGGGTGCG TTGGAGGGGC TTCCTGCCAC TTGTCCTGGC TGTCTTGATG GGGACAAGTC  160
ATGCCCAACG GGATTCCATA GGGAGATACG AACCAGCTAG CAGGGATGCG AATCGGTTGT GGCACCCCGT GGGCAGCCAC  240
CCCGCAGCGG CTGCAGCCAA GGTGTACAGT CTGTTCCGAG AGCCTGACGC GCCGGTCCCC GGCTTGTCGC CCTCTGAGTG  320
GAACCAGCCG GCCCAGGGGA ACCCGGGATG GCTCGCAGAG GCCGAGGCCA GGAGGCCACC TCGAACCCAG CAGCTGCGTC  400
GAGTCCAGCC ACCTGTCCAG ACTCGGAGAA GCCATCCCCG GGGCCAGCAG CAGATAGCAG CCCGGGCTGC ACCTTCTGTC  480
GCGCGCCTGG AAACCCCTCA GCGACCCGCG GCTGCACGGC GAGGGCGGCT CACTGGGAGA AATGTCTGCG GGGGACAGTG  560
CTGCCCAGGA TGGACAACAT CAAACAGCAC CAACCACTGT ATCAAACCTG TGTGTCAGCC TCCCTGTCAG AACCGAGGCT  640
CCTGCAGCAG GCCCCAGGTC TGCATCTGCC GTTCTGGCTT CCGTGGGGCG CGCTGTGAGG AGGTCATCCC TGAGGAGGAA  720
TTTGACCCTC AGAATGCCAG GCCTGTGCCC AGACGCTCAG TGGAGAGAGC ACCCGGTCCT CACAGAAGCA GTGAGGCCAG  800
AGGAAGTCTA GTGACCAGAA TACAGCCGCT GGTACCACCA CCATCACCAC CTCCATCTCG GCGCCTCAGC CAGCCCTGGC  880
CCCTGCAGCA GCACTCAGGG CCGTCCAGGA CAGTTCGTCG GTATCCGGCC ACTGGTGCCA ATGGCCAGCT GATGTCCAAC  960
GCTTTGCCTT CAGGACTCGA GCTGAGAGAC AGCAGCCCAC AGGCAGCACA TGTGAACCAT CTCTCACCCC CCTGGGGGCT 1040
GAACCTCACC GAGAAAATCA AGAAAATCAA AGTCGTCTTC ACCCCCACCA TCTGCAAGCA GACCTGTGCC CGGGGACGCT 1120
GTGCCAACAG CTGTGAGAAG GGTGACACCA CCACCTTGTA CAGTCAGGGT GGCCATGGGC ATGACCCCAA GTCTGGCTTC 1200
CGTATCTATT TCTGCCAAAT CCCCTGCCTG AATGGTGGCC GCTGCATCGG CCGGGACGAG TGCTGGTGTC CAGCCAACTC 1280
CACAGGAAAG TTCTGCCATC TGCCTGTCCC GCAGCCAGAC AGGGAACCTG CAGGGCGAGG TTCCCGGCAC AGAACCCTGC 1360
TGGAAGGTCC CCTGAAGCAA TCCACCTTCA CGCTGCCTCT CTCTAACCAG CTCGCCTCTG TGAACCCCTC GCTGGTGAAG 1440
GTGCAAATTC ATCACCCGCC TGAGGCCTCT GTGCAGATTC ACCAGGTGGC CCGGGTCCGG GGTGAGCTGG ACCCCGTGCT 1520
GGAGGACAAC AGTGTGGAGA CCAGAGCCTC TCATCGCCCC CACGGCAACC TAGGCCACAG CCCCTGGGCC AGCAACAGCA 1600
TACCCGCTCG GGCCGGAGAG GCCCCTCGGC CACCACCAGT GCTGTCTAGG CATTATGGAC TTCTGGGCCA GTGTTACCTG 1680
AGCACGGTGA ATGGACAGTG TGCTAACCCC CTAGGTAGTC TGACTTCTCA GGAGGACTGC TGTGGCAGTG TGGGGACCTT 1760
CTGGGGGGTG ACCTCCTGTG CTCCCTGCCC ACCCAGACAA GAGGGTCCAG CCTTCCCAGT GATTGAAAAT GGCCAGCTGG 1840
AGTGTCCCCA AGGATACAAG AGACTGAACC TCAGCCACTG CCAAGATATC AATGAGTGCC TGACCCTGGG CCTCTGCAAG 1920
```

FIG. 27-1

GACTCGGAGT GCGTGAACAC CAGGGGCAGC TACCTGTGCA CCTGCAGGCC TGGCCTCATG CTGGATCCGT CAAGGAGCCG 2000
CTGCGTATCG GACAAGGCTG TCTCCATGCA GCAGGGACTA TGCTACCGGT CACTGGGGTC TGGTACCTGC ACCCTGCCTT 2080
TGGTTCATCG GATCACCAAG CAGATATGCT GCTGCAGCCG TGTGGGCAAA GCCTGGGGTA GCACATGTGA ACAGTGTCCC 2160
CTGCCTGGCA CAGAAGCCTT CAGGGAGATC TGCCCTGCTG GCCATGGCTA CACCTACTCG AGCTCAGACA TCCGCCTGTC 2240
TATGAGGAAA GCCGAAGAAG AGGAACTGGC TAGCCCCTTA AGGGAGCAGA CAGAGCAGAG CACTGCACCC CCACCTGGGC 2320
AAGCAGAGAG GCAACCACTC CGGGCAGCCA CCGCCACCTG GATTGAGGCT GAGACCCTCC CTGACAAAGG TGACTCTCGG 2400
GCTGTTCAGA TCACAACCAG TGCTCCCCAC CTACCTGCCC GGGTACCAGG GGATGCCACT GGAAGACCAG CACCATCCTT 2480
GCCTGGACAG GGCATTCCAG AGAGTCCAGC AGAAGAGCAA GTGATTCCCT CCAGTGATGT CTTGGTGACA CACAGCCCCC 2560
CAGACTTTGA TCCATGTTTT GCTGGAGCCT CCAACATCTG TGGCCCTGGG ACCTGTGTGA GCCTCCCAAA TGGATACAGA 2640
TGTGTCTGCA GCCCTGGCTA CCAGCTACAC CCCAGCCAAG ACTACTGTAC TGATGACAAC GAGTGTATGA GGAACCCCTG 2720
TGAAGGAAGA GGGCGCTGTG TCAACAGTGT GGGCTCCTAC TCCTGCCTCT GCTATCCTGG CTACACACTA GTCACCCTCG 2800
GAGACACACA GGAGTGCCAA GATATCGATG AGTGTGAGCA GCCCGGGGTG TGCAGTGGTG GGCGATGCAG CAACACGGAG 2880
GGCTCGTACC ACTGCGAGTG TGATCGGGGC TACATCATGG TCAGGAAAGG ACACTGTCAA GATATCAACG AATGCCGTCA 2960
CCCTGGTACC TGCCCTGATG GGAGATGCGT CAACTCCCCT GGCTCCTACA CTTGTCTGGC CTGTGAGGAG GGCTATGTAG 3040
GCCAGAGTGG GAGCTGTGTA GATGTCAATG AGTGTCTGAC CCCTGGGATA TGTACCCATG GAAGGTGCAT CAACATGGAA 3120
GGCTCCTTTA GATGCTCCTG TGAGCCGGGC TATGAGGTCA CCCCAGACAA GAAGGGCTGC CGAGATGTGG ACGAGTGTGC 3200
CAGCCGAGCC TCGTGCCCCA CGGGCCTCTG CCTCAACACG GAGGGCTCCT TCACCTGCTC AGCCTGTCAG AGCGGGTACT 3280
GGGTGAACGA AGATGGCACT GCCTGTGAAG ACTTGGATGA ATGTGCCTTC CCTGGAGTCT GCCCCACAGG CGTCTGCACC 3360
AATACTGTAG GCTCCTTCTC CTGCAAGGAC TGTGACCAGG GCTACCGGCC CAACCCCCTG GGCAACAGAT GCGAAGATGT 3440
GGATGAGTGT GAAGGTCCCC AAAGCAGCTG CCGGGGAGGC GAATGCAAGA ACACAGAAGG TTCCTACCAA TGCCTCTGTC 3520
ACCAGGGCTT CCAGCTGGTC AATGGCACCA TGTGTGAGGA CGTGAATGAG TGTGTTGGGG AAGAGCATTG TGCTCCTCAC 3600
GGCGAGTGCC TCAACAGCCT GGGCTCCTTC TTCTGCCTCT GTGCACCCGG CTTTGCTAGT GCTGAGGGGG GCACCAGATG 3680
CCAGGATGTT GATGAATGTG CAGCCACAGA CCCGTGTCCG GGAGGACACT GTGTCAACAC AGAGGGCTCC TTCAGCTGTC 3760
TGTGTGAGAC TGCTTCCTTC CAGCCCTCCC CAGACAGCGG AGAATGTTTG GATATTGATG AGTGTGAGGA CCGTGAAGAC 3840

FIG. 27-2

```
CCGGTGTGCG GAGCCTGGAG GTGTGAGAAC AGTCCTGGTT CCTACCGCTG CATCCTGGAC TGCCAGCCTG GATTCTATGT 3920
GGCGCCAAAT GGAGACTGCA TTGACATAGA TGAATGTGCC AATGACACTG TGTGTGGGAA CCATGGCTTC TGTGACAACA 4000
CGGACGGCTC CTTCCGCTGC CTGTGTGACC AGGGCTTCGA GACCTCACCA TCAGGCTGGG AGTGTGTTGA TGTGAACGAG 4080
TGTGAGCTCA TGATGGCAGT GTGTGGGGAT GCGCTCTGTG AGAACGTGGA AGGCTCCTTC CTGTGCCTTT GCGCCAGTGA 4160
CCTTGAGGAG TACGACGCAG AAGAAGGACA CTGCCGTCCT CGGGTGGCTG GAGCTCAGAG AATCCCAGAG GTCCGGACAG 4240
AGGACCAGGC TCCAAGCCTT ATCCGCATGG AATGCTACTC TGAACACAAT GGTGGTCCTC CCTGCTCTCA AATCCTGGGC 4320
CAGAACTCCA CACAGGCCGA GTGCTGCTGC ACTCAGGGTG CCAGATGGGG AAAGGCCTGT GCGCCCTGCC CATCTGAGGA 4400
CTCAGTTGAA TTCAGTCAGC TCTGCCCCAG TGGTCAAGGT TACATCCCAG TGGAAGGAGC CTGGACATTT GGACAAACCA 4480
TGTATACAGA TGCCGATGAA TGTGTACTGT TTGGGCCTGC TCTCTGCCAG AATGGCCGAT GCTCAAACAT AGTGCCTGGC 4560
TACATTTGCC TGTGCAACCC TGGCTACCAC TATGATGCCT CCAGCAGGAA GTGCCAGGAT CACAACGAAT GCCAGGACTT 4640
GGCCTGTGAG AACGGTGAGT GTGTGAACCA AGAAGGCTCC TTCCATTGCC TCTGCAATCC CCCCCTCACC CTAGACCTCA 4720
GTGGGCAGCG CTGTGTGAAC ACGACCAGCA GCACGGAGGA CTTCCCTGAC CATGACATCC ACATGGACAT CTGCTGGAAA 4800
AAAGTCACCA ATGATGTGTG CAGCCAGCCC TTGCGTGGGC ACCATACCAC CTATACAGAA TGCTGCTGCC AAGATGGGGA 4880
GGCCTGGAGC CAGCAATGCG CTCTGTGCCC GCCCAGGAGC TCTGAGGTCT ACGCTCAGCT GTGCAACGTG GCTCGGATTG 4960
AGGCAGAGCG CGGAGCAGGG ATCCACTTCC GGCCAGGCTA TGAGTATGGC CCTGGCCTGG ACGATCTGCC TGAAAACCTC 5040
TACGGCCCAG ATGGGGCTCC CTTCTATAAC TACCTAGGCC CCGAGGACAC TGCCCCTGAG CCTCCCTTCT CCAACCCAGC 5120
CAGCCAGCCG GGAGACAACA CACCTGTCCT TGAGCCTCCT CTGCAGCCCT CTGAACTTCA GCCTCACTAT CTAGCCAGCC 5200
ACTCAGAACC CCCTGCCTCC TTCGAAGGCC TTCAGGCTGA GGAATGTGGC ATCCTGAATG GCTGTGAGAA TGGCCGCTGC 5280
GTGCGTGTGC GGGAGGGCTA CACTTGCGAC TGCTTTGAGG GCTTCCAGCT GGATGCGCCC ACATTGGCCT GTGTGGATGT 5360
GAACGAGTGT GAAGACTTGA ACGGGCCTGC ACGACTCTGT GCACACGGTC ACTGTGAGAA CACAGAGGGT TCCTATCGCT 5440
GCCACTGTTC GCCAGGTTAC GTGGCAGAGC CAGGCCCCCC ACACTGTGCG GCCAAGGAGT AG                    5502
```

FIG. 27-3

MESTSPRGLRCPQLCSHSGAMRAPTTARCSGCIQRVRWRGFLPLVLAVLMGTSHAQRDSIGRYEPASRDANRLWHPVGSHPAAAAAKVYS 90
LFREPDAPVPGLSPSEWNQPAQGNPGWLAEAEARRPPRTQQLRRVQPPVQTRRSHPRGQQQIAARAAPSVARLETPQRPAAARRGRLTGR 180
NVCGGQCCPGWTTSNSTNHCIKPVCQPPCQNRGSCSRPQVCICRSGFRGARCEEVIPEEEFDPQNARPVPRRSVERAPGPHRSSEARGSL 270
VTRIQPLVPPPSPPPSRRLSQPWPLQQHSGPSRTVRRYPATGANGQLMSNALPSGLELRDSSPQAAHVNHLSPPWGLNLTEKIKKIKVVF 360
TPTICKQTCARGRCANSCEKGDTTTLYSQGGHGHDPKSGFRIYFCQIPCLNGGRCIGRDECWCPANSTGKFCHLPVPQPDREPAGRGSRH 450
RTLLEGPLKQSTFTLPLSNQLASVNPSLVKVQIHHPPEASVQIHQVARVRGELDPVLEDNSVETRASHRPHGNLGHSPWASNSIPARAGE 540
APRPPPVLSRHYGLLGQCYLSTVNGQCANPLGSLTSQEDCCGSVGTFWGVTSCAPCPPRQEGPAFPVIENGQLECPQGYKRLNLSHCQDI 630
NECLTLGLCKDSECVNTRGSYLCTCRPGLMLDPSRSRCVSDKAVSMQQGLCYRSLGSGTCTLPLVHRITKQICCCSRVGKAWGSTCEQCP 720
LPGTEAFREICPAGHGYTYSSSDIRLSMRKAEEEELASPLREQTEQSTAPPPGQAERQPLRAATATWIEAETLPDKGDSRAVQITTSAPH 810
LPARVPGDATGRPAPSLPGQGIPESPAEEQVIPSSDVLVTHSPPDFDPCFAGASNICGPGTCVSLPNGYRCVCSPGYQLHPSQDYCTDDN 900
ECMRNPCEGRGRCVNSVGSYSCLCYPGYTLVTLGDTQECQDIDECEQPGVCSGGRCSNTEGSYHCECDRGYIMVRKGHCQDINECRHPGT 990
CPDGRCVNSPGSYTCLACEEGYVGQSGSCVDVNECLTPGICTHGRCINMEGSFRCSCEPGYEVTPDKKGCRDVDECASRASCPTGLCLNT 1080
EGSFTCSACQSGYWVNEDGTACEDLDECAFPGVCPTGVCTNTVGSFSCKDCDQGYRPNPLGNRCEDVDECEGPQSSCRGGECKNTEGSYQ 1170
CLCHQGFQLVNGTMCEDVNECVGEEHCAPHGECLNSLGSFFCLCAPGFASAEGGTRCQDVDECAATDPCPGGHCVNTEGSFSCLCETASF 1260
QPSPDSGECLDIDECEDREDPVCGAWRCENSPGSYRCILDCQPGFYVAPNGDCIDIDECANDTVCGNHGFCDNTDGSFRCLCDQGFETSP 1350
SGWECVDVNECELMMAVCGDALCENVEGSFLCLCASDLEEYDAEEGHCRPRVAGAQRIPEVRTEDQAPSLIRMECYSEHNGGPPCSQILG 1440
QNSTQAECCCTQGARWGKACAPCPSEDSVEFSQLCPSGQGYIPVEGAWTFGQTMYTDADECVLFGPALCQNGRCSNIVPGYICLCNPGYH 1530
YDASSRKCQDHNECQDLACENGECVNQEGSFHCLCNPPLTLDLSGQRCVNTTSSTEDFPDHDIHMDICWKKVTNDVCSQPLRGHHTTYTE 1620
CCCQDGEAWSQQCALCPPRSSEVYAQLCNVARIEAERGAGIHFRPGYEYGPGLDDLPENLYGPDGAPFYNYLGPEDTAPEPPFSNPASQP 1710
GDNTPVLEPPLQPSELQPHYLASHSEPPASFEGLQAEECGILNGCENGRCVRVREGYTCDCFEGFQLDAPTLACVDVNECEDLNGPARLC 1800
AHGHCENTEGSYRCHCSPGYVAEPGPPHCAAKE 1833

FIG. 28