



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 21 793 T2** 2004.12.30

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 028 744 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 21 793.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/23827**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 957 711.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/24058**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.11.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **20.05.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.08.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **18.02.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **30.12.2004**

(51) Int Cl.⁷: **A61K 38/18**
C12N 5/06, C12N 5/08

(30) Unionspriorität:
966297 07.11.1997 US

(73) Patentinhaber:
Genetics Institute, LLC, Cambridge, Mass., US

(74) Vertreter:
FROHWITTER Patent- und Rechtsanwälte, 81679 München

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

(72) Erfinder:
CELESTE, J., Anthony, Hudson, US; WOZNEY, M., John, Hudson, US; THIES, R., Scott, Andoner, US

(54) Bezeichnung: **NEURONALE VERWENDUNGEN DES BMP-11**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

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**HINTERGRUND DER ERFINDUNG**

[0001] Diese Anmeldung ist eine Continuation-in-part der Anmeldung USSN 08/452,772, eingereicht am 30. Mai 1995; die eine Teilanmeldung von USSN 08/247,907 ist, eingereicht am 20. Mai 1994 und am 17. Juni 1997 als US Patent Nr. 5,639,638 erteilt; die eine Continuation-in-part-Anmeldung von USSN 08/061,464 ist, eingereicht am 12. Mai 1993 und nunmehr fallengelassen.

[0002] Die Erfinder haben früher die BMP-11-Proteine als Activin WC bezeichnet. Die BMP-11-Proteine können nützlich sein, um die Bildung von Knochen und/oder Knorpel zu induzieren und bei Wundheilung und Gewebereparatur, oder um die Aktivität von anderen Knochen-morphogenetischen Proteinen zu steigern. Die BMP-11-Proteine können auch nützlich sein für die Regulation der Produktion von Follikel-stimulierendem Hormon, für die Empfängnisverhütung, die Förderung des Überlebens von Nervenzellen, die Stimulation der Hätopoese, und die Unterdrückung der Entwicklung von Gonadentumoren. Das US Patent Nr. 4,798,885 offenbart DNA, welche für die α - und β -Ketten von Präproinhibin kodiert. Das US Patent Nr. 5,071,834 offenbart pharmazeutische Zusammensetzungen von Activin mit zwei β -Ketten, formuliert in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger. Das US Patent Nr. 5,102,807 offenbart ein gereinigtes Inhibin-Protein, welches die Produktion von FSH supprimiert ohne die Produktion von luteinisierendem Hormon zu supprimieren.

[0003] Zusätzlich sind die BMP-11-Proteine der vorliegenden Erfindung nützlich um alle Aspekte der Nervenzellentwicklung zu modulieren, insbesondere die Bildung, das Wachstum, die Differenzierung und die Proliferation von Nervenzellen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0004] Das Protein BMP-11 ist ein Mitglied der TGF- β -Proteinsuperfamilie. Die TGF- β -Superfamilie umfasst die Familie der Proteine, die als Knochen-morphogenetische Proteine (BMP, bone morphogenetic proteins) bekannt sind sowie eine Gruppe von Proteinen, die als Inhibin- β bezeichnet werden. Wie weiter hierin diskutiert wird erwartet, dass das Protein BMP-11, wenn es mit einem anderen BMP-11 dimerisiert ist (Homodimer), BMP-11-Aktivität zeigt, wie weiter hierin beschrieben, wie gemäß den in den Beispielen hierin beschriebenen Assays gemessen werden kann. Wenn es als ein Heterodimer mit Inhibin- α -Proteinen oder mit anderen Inhibin- β -Proteinen dimerisiert ist, wird erwartet, dass das Inhibin- β /BMP-11-Heterodimer Wirkungen auf die Produktion von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) zeigt, wie weiter hierin beschrieben. Es wird weiter erwartet, dass BMP-11 in homodimerer Form oder in heterodimerer Form mit einem anderen Mitglied der Familie der Knochen-morphogenetischen Proteine BMP-Aktivität zeigt, d. h. die Fähigkeit, die Bildung von Knochen, Knorpel und/oder anderem Bindegewebe zu induzieren. Somit kann es in Abhängigkeit von der Umgebung von BMP-11 Dimere bilden, die entweder Activin- oder Inhibin-Aktivität zeigen, oder eine induzierende Aktivität von Knochen, Knorpel und/oder anderem Bindegewebe. Demgemäß ist die Aktivität von BMP-11 definiert als die Fähigkeit, die Produktion von FSH zu regulieren, in dem in Beispiel 8 hierin beschriebenen Assay, oder die Fähigkeit, die Bildung von Knochen, Knorpel und/oder anderem Bindegewebe zu induzieren, in den in den Beispielen 5 bis 7 hierin beschriebenen Assays, sowie die Zellentwicklung zu modulieren, insbesondere die Bildung, das Wachstum, die Differenzierung und die Proliferation von Nervenzellen, und insbesondere die Erhaltung von Nervenzellen (Beispiel 9).

[0005] Proteine, die als Inhibine oder Activine bezeichnet werden, werden in der Gonade produziert und sind in der Natur im Follikelfluid vorhanden. Diese Proteine wirken auf der Ebene der vorderen Hypophyse, wobei sie die Freisetzung von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) inhibieren (Inhibine) oder stimulieren (Activine) [siehe für Übersichten z. B. Ying, S.-Y., Endocr. Rev. 9: 267–293 (1988) oder Ling, N. et al., Vitamins and Hormones 44: 1–46 (Academic Press 1988)]. In kurzen Worten werden dimere Proteine, die eine Inhibin- α -Kette und eine Inhibin- β -Kette (β_A oder β_B) umfassen, als Inhibine bezeichnet und sind durch ihre Fähigkeit, die Freisetzung von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) zu inhibieren, gekennzeichnet, während andere dimere Proteine, die zwei Inhibin- β -Ketten (β_A oder β_B) umfassen, als Activine bezeichnet werden und durch ihre Fähigkeit, die Freisetzung von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) zu stimulieren, gekennzeichnet sind [siehe z. B. Ling et al., Nature 321: 779–782 (1986) oder Vale et al., Nature 321: 776–779 (1986) oder Mason et al., Nature 318: 659–663 (1985) oder Forage et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3091–3095 (1986)].

[0006] Anerkanntermaßen stimuliert FSH die Entwicklung von Eiern in Eierstöcken von Säugern (Ross et al., in Textbook of Endocrinology, Hrsg. Williams, Seite 355 (1981)), und führt eine exzessive Stimulation der Eierstöcke mit FSH zu multiplen Ovulationen. FSH ist auch für die Funktion der Hoden von Bedeutung. Somit kann

BMP-11 in Heterodimeren mit einem Mitglied der Inhibin- α -Familie als ein empfängnisverhütendes Mittel nützlich sein, auf Basis der Fähigkeit von Inhibinen, in weiblichen Säugern die Fruchtbarkeit zu verringern und in männlichen Säugern die Spermatogenese zu verringern. Die Verabreichung von ausreichenden Mengen anderer Inhibine kann in diesen Säugern Unfruchtbarkeit induzieren. BMP-11 als ein Homodimer oder ein Heterodimer mit anderen Proteinuntereinheiten der Inhibin- β -Gruppe, kann als ein therapeutisches Mittel, das Fruchtbarkeit induziert, nützlich sein, auf Basis der Fähigkeit von Activinmolekülen die Freisetzung von FSH aus Zellen der vorderen Hypophyse zu stimulieren. Siehe beispielsweise US Patent Nr. 4,798,885. BMP-11 kann auch für ein früheres Einsetzen der Fruchtbarkeit in sexuell unreifen Säugern nützlich sein, um so die Lebensreproduktionsfähigkeit von Haustieren wie etwa von Kühen, Schafen und Schweinen zu verlängern. Es wird ebenfalls erwartet, dass BMP-11 nützlich sei kann für die Förderung des Überlebens von Nervenzellen [siehe z. B. Schubert et al., *Nature* 344: 868–870 (1990)], für die Modulation der Haemopoese durch Induzieren der Differenzierung von erythroiden Zellen [siehe z. B. Broxmeyer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9052–9056 (1988) oder Eto et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 142: 1095–1103 (1987)], für die Suppression der Entwicklung von Gonadentumoren [siehe z. B. Matzuk et al., *Nature* 360: 313–319 (1992)] oder für die Steigerung der Aktivität von Knochen-morphogenetischen Proteinen [siehe z. B. Ogawa et al., *J. Biol. Chem.* 267: 14233–14237 (1992)].

[0007] BMP-11-Proteine können weiter gekennzeichnet sein durch ihre Fähigkeit, die Freisetzung von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) zu modulieren, in etablierten in vitro Bioassays unter Verwendung von Ratenzellen der vorderen Hypophyse, wie beschrieben [siehe z. B. Vale et al., *Endocrinology* 91: 562–572 (1972); Ling et al., *Nature* 321: 779–782 (1986); oder Vale et al., *Nature* 321: 776–779 (1986)]. Es wird erwartet, dass das BMP-11-Protein der Erfindung, wenn als ein Homodimer oder ein Heterodimer mit anderen Inhibin- β -Ketten zusammengesetzt, stimulierende Wirkungen auf die Freisetzung von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) von Zellen der vorderen Hypophyse zeigen wird, wie beschrieben [Ling et al., *Nature* 321: 779–782 (1986); oder Vale et al., *Nature* 321: 776–779 (1986)].

[0008] Zusätzlich wird erwartet, dass das BMP-11-Protein der Erfindung, wenn als ein Heterodimer mit der Inhibin- α -Kette zusammengesetzt, die Freisetzung von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) von Zellen der vorderen Hypophyse inhibieren wird, wie beschrieben [siehe z. B. Vale et al., *Endocrinology* 91: 562–572 (1972)]. Daher wird erwartet, dass das BMP-11-Protein der Erfindung in Abhängigkeit von der besonderen Zusammensetzung kontrastierende und gegensätzliche Wirkungen auf die Freisetzung von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) aus der vorderen Hypophyse haben kann.

[0009] Es ist gezeigt worden, dass Activin A (die homodimere Zusammensetzung von Inhibin β_A) eine erythropoetisch-stimulierende Aktivität aufweist [siehe z. B. Eto et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 142: 1095–1103 (1987); und Murata et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2434–2438 (1988); und Yu et al., *Nature* 330: 765–767 (1987)]. Es wird erwartet, dass das BMP-11-Protein der Erfindung eine ähnliche erythropoetisch-stimulierende Aktivität hat. Diese Aktivität des BMP-11-Proteins kann weiter gekennzeichnet sein durch die Fähigkeit des BMP-11-Proteins, eine Erythropoetin-Aktivität in den biologischen Assays zu zeigen, welche unter Verwendung der humanen K-562-Zelllinie durchgeführt werden, wie von Lozzio et al., *Blood* 45: 321–334 (1975) und in US Patent Nr. 5,071,834 beschrieben.

[0010] Die Strukturen von mehreren Proteinen, bezeichnet als BMP-1 bis BMP-9, wurden früher entschlüsselt. Die einzigartigen induzierenden Aktivitäten dieser Proteine, zusammen mit ihrer Gegenwart in Knochen, legen nahe, dass sie wichtige Regulatoren von Knochenreparaturprozessen sind, und an der normalen Erhaltung von Knochengewebe beteiligt sein können. Das BMP-11-Protein der vorliegenden Erfindung ist mit den vorstehenden BMP-Proteinen verwandt, und es wird erwartet, dass es BMP-Aktivitäten gemeinsam hat, wie etwa die Fähigkeit, Knochen, Knorpel und/oder anderes Bindegewebe, wie etwa Sehnen oder Ligamente zu induzieren, und Wundheilungsaktivitäten der BMP. Zusätzlich wird erwartet, dass die erfindungsgemäßen Proteine zusammen mit oder möglicherweise synergistisch mit anderen verwandten Proteinen und Wachstumsfaktoren wirken könnten. Weitere therapeutische Methoden und Zusammensetzungen der Erfindung umfassen daher eine therapeutische Menge von mindestens einem erfindungsgemäßen BMP-11-Protein mit einer therapeutischen Menge von mindestens einem der anderen BMP-Proteine, welche in den nachstehend beschriebenen Patenten und Anmeldungen der Anmelderin offenbart sind. Derartige Kombinationen können separate Moleküle der BMP-Proteine oder Heteromoleküle, die aus zwei verschiedenen BMP-Resten zusammengesetzt sind, umfassen. Weiterhin können BMP-11-Proteine mit anderen Mitteln kombiniert werden, die für die Behandlung des Knochen- und/oder Knorpeldefekts, der Wunde oder des fraglichen Gewebes günstig sind. Diese Mittel umfassen verschiedene Wachstumsfaktoren, wie etwa den Epidermiswachstumsfaktor (EGF), den Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), den von Plättchen abgeleiteten Wachstumsfaktor (PDGF), die transformierenden Wachstumsfaktoren (TGF- α und TGF- β) und den K-Fibroblastenwachstumsfaktor (KFGF), Pa-

rathyroidhormon (PTH), den Leukämie-inhibierenden Faktor (LIF/HILDA/DIA), die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF-I und IGF-II). Abschnitte dieser Mittel können in Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung auch verwendet werden.

[0011] Die DNA-Sequenz (SEQ ID NO: 1) und Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 2) von BMP-11 aus Rind und die humane DNA-Sequenz (SEQ ID NO: 10) und Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 11) von BMP-11 sind im Sequenzprotokoll hierin angegeben. Activin-Proteine sind fähig, die Produktion von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) zu regulieren, und somit kann BMP-11 als ein Mittel zur Empfängnisverhütung oder als ein Fruchtbarkeit-induzierendes Therapeutikum nützlich sein. Es wird erwartet, dass gereinigtes BMP-11 in homodimerer Form oder in Heterodimeren mit Proteinen der Inhibin- β -Gruppe Activin-Aktivität zeigen wird, und für die Stimulierung von FSH verwendet werden kann. Zusätzlich wird erwartet, dass das gereinigte BMP-11-Protein für die Induzierung von Knochen, Knorpel und/oder anderem Bindegewebe nützlich sein kann.

[0012] BMP-11 aus Rind kann produziert werden durch das Kultivieren einer Zelle, welche mit einer DNA-Sequenz, umfassend Nukleotid #375 bis Nukleotid #704, wie in SEQ ID NO: 1 gezeigt, transformiert ist, und das Gewinnen und Reinigen aus dem Kulturmedium eines Proteins, welches gekennzeichnet ist durch die Aminosäuresequenz, umfassend die Aminosäuren #1 bis #109 wie in SEQ ID NO: 2 gezeigt, im Wesentlichen frei von anderen proteinhaltigen Materialien, mit denen es zusammen produziert wird.

[0013] Es wird erwartet, dass humanes BMP-11 zu BMP-11 aus Rind homolog ist. Die Erfindung umfasst daher Methoden, um die für humanes BMP-11 kodierenden DNA-Sequenzen zu erhalten, die mittels dieser Methoden erhaltenen DNA-Sequenzen, und das von diesen DNA-Sequenzen kodierte humane Protein. Diese Methode umfasst die Verwendung der BMP-11-Nukleotidsequenz aus Rind oder Abschnitten davon, um Sonden zum Screening von Banken auf das humane Gen oder Fragmente davon, unter Verwendung von Standardtechniken, zu entwerfen. Eine DNA-Sequenz, welche für einen Teil des humanen BMP-11-Proteins kodiert (SEQ ID NO: 3) und die entsprechende Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 4) sind im Sequenzprotokoll angegeben. Diese Sequenzen können auch verwendet werden, um mittels Standardtechniken das vollständige humane BMP-11-Gen zu erhalten. Humanes BMP-11 kann produziert werden durch das Kultivieren einer mit der BMP-11-DNA-Sequenz transformierten Zelle und das Gewinnen und Reinigen von BMP-11 aus dem Kulturmedium. Das gereinigte exprimierte Protein ist im Wesentlichen frei von anderen proteinhaltigen Materialien, mit denen es zusammen produziert wird, sowie von anderen Verunreinigungen.

[0014] Es wird erwartet, dass das gewonnene, gereinigte Protein die Fähigkeit zeigt, die Produktion von FSH zu regulieren. Die erfindungsgemäßen Proteine können weiter gekennzeichnet sein durch die Fähigkeit, die Produktion von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) in etablierten in vitro Bioassays unter Verwendung von Rattenzellen der vorderen Hypophyse zu stimulieren. BMP-11-Proteine können auch gekennzeichnet sein durch die Fähigkeit, die Bildung von Knochen, Knorpel und/oder anderem Bindegewebe zu induzieren, beispielsweise in dem nachstehend beschriebenen Rattenknochen-Bildungsassay. Sie sind auch nützlich für die Modulation von Zellentwicklung, insbesondere für die Bildung, das Wachstum, die Differenzierung, die Proliferation von Nervenzellen, und insbesondere die Erhaltung von Nervenzellen.

[0015] Ein weiterer Aspekt der Erfindung stellt pharmazeutische Zusammensetzungen bereit, welche eine therapeutisch wirksame Menge eines BMP-11-Proteins in einem pharmazeutisch akzeptablen Vehikel oder Träger enthalten. BMP-11-Zusammensetzungen der Erfindung können nützlich sein für die Regulation von Follikel-stimulierendem Hormon, und können bei der Empfängnisverhütung nützlich sein. Zusammensetzungen der Erfindung können weiter mindestens ein anderes therapeutisch nützlich Mittel umfassen, wie etwa die BMP-Proteine BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6 und BMP-7, beispielsweise offenbart in den US Patenten Nr. 5,108,922; 5,013,649; 5,116,738; 5,106,748; 5,187,076; und 5,141,905; BMP-8, offenbart in der PCT-Veröffentlichung WO 91/18098; und BMP-9, offenbart in der PCT-Veröffentlichung WO 93/00432; und BMP-10, offenbart in der ebenfalls anhängigen Patentanmeldung mit der Seriennummer 08/061,695, eingereicht am 12. Mai 1993. Die BMP-11-Zusammensetzungen können auch für eine Reihe von Verwendungen nützlich sein, umfassend die Regulation der Produktion von Follikel-stimulierendem Hormon, einschließlich der Empfängnisverhütung. Diese Methoden umfassen erfindungsgemäß das Verabreichen einer wirksamen Menge von BMP-11 einem Patienten, welcher einer derartigen Behandlung bedarf.

[0016] Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können zusätzlich zu einem BMP-11-Protein andere Mitglieder der Gruppe von Inhibin- β -Proteinen oder Inhibin- α -Proteine umfassen, sowie andere therapeutisch nützliche Mittel, umfassend Wachstumsfaktoren wie etwa Epidermiswachstumsfaktor (EGF), Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), transformierenden Wachstumsfaktor (TGF- α und TGF- β) und Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor (IGF).

Beschreibung der Sequenzen

[0017] SEQ ID NO: 1 ist eine partielle Nukleotidsequenz von BMP-11 aus Rind, welche für das reife BMP-11-Polypeptid aus Rind kodiert.

[0018] SEQ ID NO: 2 ist die Aminosäuresequenz eines partiellen Propeptids und des vollständigen reifen BMP-11-Polypeptids aus Rind, kodiert von SEQ ID NO: 1.

[0019] SEQ ID NO: 3 ist eine partielle Nukleotidsequenz von humanem BMP-11.

[0020] SEQ ID NO: 4 ist eine partielle Aminosäuresequenz für humanes BMP-11-Polypeptid, kodiert von SEQ ID NO: 3.

[0021] SEQ ID NO: 5 und 6 sind Primer gegen BMP-11 aus Rind, verwendet zur Isolierung des humanen BMP-11 oder anderer BMP-11-Proteine.

[0022] SEQ ID NO: 7 ist eine DNA-Sequenz, die in pMT2 CXM inseriert wurde, um eine XhoI-Erkennungsstelle in Nähe des SV40-Replikationsursprungs hinzuzufügen.

[0023] SEQ ID NO: 8 ist eine DNA-Sequenz, die in pMT21 inseriert wurde, um stromaufwärts des DHFR-Gens eine XhoI-Erkennungsstelle zu inserieren.

[0024] SEQ ID NO: 9 ist eine DNA-Sequenz, umfassend einen Abschnitt der EMC-Virus-Leadersequenz.

[0025] SEQ ID NO: 10 ist eine DNA-Sequenz, die für ein partielles Propeptid und das vollständige reife humane BMP-11-Protein kodiert.

[0026] SEQ ID NO: 11 ist die Aminosäuresequenz eines partiellen Propeptids und des vollständigen reifen humanen BMP-11-Proteins, kodiert von SEQ ID NO: 11.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

BMP-11

[0027] Die Nukleotidsequenz von BMP-11 aus Rind (SEQ ID NO: 1) und die davon kodierte Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 2) und die Nukleotidsequenz von humanem BMP-11 (SEQ ID NO: 10) und die davon kodierte Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 11) sind im Sequenzprotokoll hierin abgebildet. Gereinigte BMP-11-Proteine aus Rind der vorliegenden Erfindung werden produziert durch das Kultivieren einer Wirtszelle, welche mit einer DNA-Sequenz transformiert ist, umfassend die kodierende DNA-Sequenz von SEQ ID NO: 1 von Nukleotid #375 bis #704 oder die kodierende DNA-Sequenz von SEQ ID NO: 10 von Nukleotid #760 bis #1086, und das Gewinnen und Reinigen aus dem Kulturmedium eines Proteins, welches die Aminosäuresequenz, wie durch die Aminosäuren #1 bis #109 von SEQ ID NO: 2 oder die Aminosäuren #1 bis #109 von SEQ ID NO: 11 dargestellt, oder eine im Wesentlichen homologe Sequenz enthält. Für die Produktion von BMP-11-Proteinen in Säugerzellen umfasst die DNA-Sequenz weiter ein geeignetes Propeptid, das im Leseraster mit den vorstehenden kodierenden DNA-Sequenzen für BMP-11 verknüpft ist. Das Propeptid kann das natürliche Propeptid von BMP-11 oder ein Propeptid von einem anderen Mitglied der TGF- β -Superfamilie sein.

[0028] Die humane BMP-11-Sequenz der vorliegenden Erfindung wird erhalten unter Verwendung der gesamten BMP-11-DNA-Sequenz aus Rind oder von Fragmenten davon, oder der partiellen humanen BMP-11-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 3 als eine Sonde. Somit umfasst die humane BMP-11-DNA-Sequenz die DNA-Sequenz der Nukleotide #28 bis #185 von SEQ ID NO: 3. Das humane BMP-11-Protein umfasst die Aminosäuresequenz der Aminosäuren #1 bis #52 von SEQ ID NO: 4.

[0029] Es wird erwartet, dass BMP-11, wie von Säugerzellen wie etwa CHO-Zellen exprimiert, als eine heterogene Population von aktiven Spezies von BMP-11-Protein mit variierenden N-Termini vorliegt. Es wird erwartet, dass aktive Spezies eine Aminosäuresequenz umfassen, die mindestens mit dem Cysteinrest an Aminosäure #6 von SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 10 beginnt, oder weiter in der N-terminalen Richtung. Somit wird erwartet, dass DNA-Sequenzen, die für aktive BMP-11-Proteine kodieren, die Nukleotide #375 oder #390 bis #701 von SEQ ID NO: 1 oder die Nukleotide #760 oder #775 bis #1086 von SEQ ID NO: 10 umfassen, und zusätzliche Nukleotide in 5'-Richtung von SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 10 umfassen können.

[0030] Der N-Terminus von humanem BMP-11 wurde experimentell durch Expression in *E. coli* als wie folgt bestimmt: [M]NLGLDXDEHSSE; wobei X einen Aminosäurerest ohne klares Signal bezeichnet, konsistent mit der Gegenwart von Cystein an dieser Position. Somit wird erwartet, dass diese Spezies von BMP-11 einen N-Terminus an Aminosäure #1 von SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 10 haben wird, und dass DNA-Sequenzen, die für diese Spezies kodieren, die Nukleotide #375 bis #701 von SEQ ID NO: 1 (aus Rind) oder die Nukleotide #760 bis #1086 von SEQ ID NO: 10 (human) umfassen. Das scheinbare Molekulargewicht von humanem BMP-11-Monomer wurde mittels SDS-PAGE mit annähernd 12 kD bestimmt. Das humane BMP-11-Protein liegt in 0,1% Trifluoressigsäure als eine klare, farblose Lösung vor.

[0031] Die aus dem Kulturmedium gewonnenen BMP-11-Proteine werden gereinigt, indem sie von anderen proteinhaltigen Materialien, mit denen zusammen sie produziert werden, und von anderen vorhandenen Kontaminationen isoliert werden.

[0032] BMP-11-Proteine können gekennzeichnet sein durch die Fähigkeit, die Produktion von FSH zu regulieren. BMP-11-Proteine können weiter gekennzeichnet sein durch die Fähigkeit, die Freisetzung von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) in etablierten *in vitro* Bioassays unter Verwendung von Rattenzellen der vorderen Hypophyse zu modulieren, wie beschrieben [siehe z. B. Vale et al., *Endocrinology* 91: 562–572 (1972); Ling et al., *Nature* 321: 779–782 (1986); oder Vale et al., *Nature* 321: 776–779 (1986)]. BMP-11-Proteine können auch gekennzeichnet sein durch die Fähigkeit, die Bildung von Knochen, Knorpel und/oder anderem Bindegewebe zu induzieren. Eine derartige Gewebe-induzierende Aktivität von BMP-11 kann weiter gekennzeichnet sein durch die Fähigkeit, die Bildung von Knochen, Knorpel und/oder anderem Bindegewebe in den in den nachstehenden Beispielen beschriebenen Assays zu induzieren.

[0033] Die hierin bereitgestellten BMP-11-Proteine umfassen auch Faktoren, welche durch Sequenzen kodiert werden, die zu denjenigen von SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 10 ähnlich sind, aber in denen auf natürliche Weise Modifikationen vorhanden sind (z. B. allelische Variationen in der Nukleotidsequenz, die Aminosäureaustausche im Polypeptid zur Folge haben können) oder absichtlich eingeführt worden sind. Beispielsweise können synthetische Polypeptide vollständig oder partiell kontinuierliche Sequenzen der Aminosäurereste von SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 11 duplizieren. Diese Sequenzen könnten, indem sie gemeinsame primäre, sekundäre oder tertiäre Struktur und Konformationscharakteristika mit Inhibin- β -Polypeptiden gemäß SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 11 aufweisen, damit gemeinsame BMP-11-Aktivitäten besitzen. Sie können somit als biologisch aktive Ersatzsubstanzen für natürlich vorkommende BMP-11-Polypeptide in therapeutischen Verfahren verwendet werden.

[0034] Andere spezifische Mutationen der hierin beschriebenen BMP-11-Proteine umfassen Modifikationen von Glykosilierungsstellen. Diese Modifikationen können O-verknüpfte oder N-verknüpfte Glykosilierungsstellen umfassen. Beispielsweise resultiert das Fehlen von Glykosilierung oder eine nur partielle Glykosilierung aus einer Aminosäuresubstitution oder -deletion an Asparagin-verknüpften Glykosilierungserkennungstellen. Die Asparagin-verknüpften Glykosilierungserkennungstellen umfassen Tripeptidsequenzen, die von entsprechenden zellulären Glykosilierungsenzymen spezifisch erkannt werden. Diese Tripeptidsequenzen sind entweder Asparagin-X-Threonin oder Asparagin-X-Serin, wobei X üblicherweise jede Aminosäure ist. Eine Reihe von Aminosäuresubstitutionen oder -deletionen an der ersten und/oder der dritten Aminosäureposition einer Glykosilierungserkennungstelle (und/oder eine Aminosäuredeletion an der zweiten Position) resultiert in einer nicht-Glykosilierung an der modifizierten Tripeptidsequenz. Zusätzlich führt die Expression des BMP-11-Proteins in Bakterienzellen zu einem nicht-glykosilierten Protein, ohne eine Veränderung der Glykosilierungserkennungstellen.

[0035] Die vorliegende Erfindung umfasst auch die neuen DNA-Sequenzen, frei von Assoziation mit DNA-Sequenzen, die für andere proteinhaltige Materialien kodieren, und welche für die Expression von BMP-11-Proteinen kodieren. Diese DNA-Sequenzen umfassen die in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 10 abgebildeten in 5'- nach 3'-Richtung und diejenigen Sequenzen, welche unter stringenten Hybridisierungsbedingungen daran hybridisieren, beispielsweise $0,1 \times \text{SSC}$, 0,1% SDS bei 65°C [siehe Maniatis et al., *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, Cold Spring Harbor Laboratory (1982), Seiten 387 bis 389], und für ein Protein mit BMP-11-Aktivität kodieren. Diese DNA-Sequenzen umfassen auch diejenigen, welche die DNA-Sequenz von SEQ ID NO: 3 umfassen und diejenigen, welche unter stringenten Hybridisierungsbedingungen daran hybridisieren und für ein Protein mit BMP-11-Aktivität kodieren.

[0036] DNA-Sequenzen, die für BMP-11-Proteine kodieren, welche von den Sequenzen von SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 10 kodiert werden, aber die sich in der Codonsequenz unterscheiden, aufgrund von Degeneriertheit des genetischen Codes oder allelischer Variationen (natürlich vorkommende Basenaustausche in

der Speziespopulation, die einen Aminosäureaustausch zur Folge haben können oder nicht), kodieren in ähnlicher Weise ebenfalls für die neuen, hierin beschriebenen Faktoren. Variationen in den DNA-Sequenzen von SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 10, die verursacht werden durch Punktmutationen oder induzierte Modifikationen (umfassend Insertion, Deletion und Substitution), um die Aktivität, Halbwertszeit oder Produktion der kodierten Polypeptide zu verstärken, sind von der vorliegenden Erfindung ebenfalls umfasst.

[0037] Geeignete Zellen oder Zelllinien können Säugerzellen sein, wie etwa Eierstockzellen aus chinesischem Hamster (CHO). Die Selektion von geeigneten Säugerwirtszellen und Methoden für die Transformation, Kultivierung, Vermehrung, das Screening, die Produktion und Reinigung von Produkt sind in der Technik bekannt. Siehe z. B. Gething und Sambrook, *Nature* 293: 620–625 (1981), oder alternativ, Kaufman et al., *Mol. Cell. Biol.* 5(7): 1750–1759 (1985), oder Howley et al., US Patent Nr. 4,419,446. Eine andere geeignete Säugerzelllinie, die in den beigefügten Beispielen beschrieben wird, ist die Affenzelllinie COS-1. Die Säugerzelllinie CV-1 kann ebenfalls geeignet sein.

[0038] Bakterienzellen können ebenfalls geeignete Wirte sein. Beispielsweise sind die verschiedenen Stämme von *E. coli* (z. B. HB101, MC1061) auf dem Gebiet der Biotechnologie als Wirtszellen gut bekannt. Verschiedene Stämme von *B. subtilis*, *Pseudomonas*, andere Bazillen und dergleichen können in diesem Verfahren ebenfalls verwendet werden.

[0039] Viele Stämme von Hefezellen, die dem Fachmann bekannt sind, können als Wirtszellen für die Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide verfügbar sein. Zusätzlich können, falls gewünscht, Insektenzellen im Verfahren der vorliegenden Erfindung als Wirtszellen verwendet werden. Siehe z. B. Miller et al., *Genetic Engineering* 8: 277–298 (Plenum Press, 1986) und darin angegebene Literaturstellen.

[0040] Für eine Expression in Säugerwirtszellen kann der Vektor eine kodierende Sequenz umfassen, welche für ein Propeptid kodiert, das für die Sezernierung von Proteinen durch die Wirtszelle geeignet ist, und im richtigen Leseraster mit der für reifes BMP-11-Protein kodierenden Sequenz verknüpft ist. Geeignete für Propeptid kodierende Sequenzen können aus DNA erhalten werden, welche für Proteine der Superfamilie der TGF- β -Proteine kodiert, umfassend beispielsweise BMP-2 bis BMP-9. Siehe beispielsweise das US Patent Nr. 5,168,150, dessen Offenbarung durch Bezugnahme hierin aufgenommen ist, worin eine DNA, welche für den Precursorabschnitt eines von BMP-2 verschiedenen Säugerproteins kodiert, an die für ein reifes BMP-2 kodierende DNA fusioniert ist. Somit umfasst die vorliegende Erfindung chimäre DNA-Moleküle, umfassend eine DNA-Sequenz, die für ein Propeptid eines Mitglieds der Superfamilie der TGF- β -Proteine kodiert, und die im richtigen Leseraster mit einer für ein BMP-11-Polypeptid kodierenden DNA-Sequenz verknüpft ist. Der Begriff "chimär" wird in der Bedeutung verwendet, dass das Propeptid von einem von BMP-11 verschiedenen Polypeptid stammt.

[0041] Die BMP-11-Proteine der vorliegenden Erfindung sind nützlich, um alle Aspekte der Entwicklung von Nervenzellen zu modulieren, insbesondere die Bildung, das Wachstum, die Differenzierung und Proliferation von Nervenzellen.

[0042] Die BMP-11-Proteine der Erfindung induzieren die Bildung von Nervenzellen und finden eine Anwendung bei der Heilung, dem Schutz, der Erhaltung und/oder der Reparatur von Nervengewebe. BMP-11-Proteine sind nützlich für eine Reihe von neuronalen Defekten, umfassend beispielsweise Neuropathien, Neurodegenerationen, und Denervierung. Diese Erkrankungen können mit dem Zellkörper der Nervenzelle (der Signale direkt empfangen kann), mit den Axonen der Nervenzelle (die im Allgemeinen Signale vom Zellkörper weg leiten) und/oder mit den Dendriten der Nervenzelle (die Signale von den Axonen anderer Nervenzellen empfangen) assoziiert sein. Die Verzweigung des Axons ermöglicht die Leitung eines Signals zu vielen Zielzellen gleichzeitig. In ähnlicher Weise können Dendriten so stark verzweigt sein, so dass sie die Größenordnung von 100.000 eingehenden Signalen auf eine einzige Nervenzelle empfangen. Die immense Vielschichtigkeit des Verzweigungsmusters von Axonen und Dendriten ist für verschiedene funktionale Klassen von Nervenzellen charakteristisch.

[0043] Nervengewebe ist entweder als peripher oder zentral klassifiziert. Das zentrale Nervensystem (ZNS) umfasst das Hirn und das Rückenmark, das über die Nerven mit einer großen Anzahl von peripheren Strukturen verbunden ist, wie etwa den Sinnesorganen für eingehende Signale und den Muskeln und Drüsen für ausgehende Signale. Nervenzellcluster des peripheren Nervensystems (PNS) werden als Ganglien bezeichnet und sind ebenfalls über Nerven mit dem zentralen Nervensystem verbunden. Alles Nervengewebe, sowohl das periphere als auch das zentrale, besteht aus zwei Hauptklassen von Zellen: Neuronen und Gliazellen. Im Allgemeinen teilt sich ein Neuron nicht mehr, wenn es ausgereift ist.

[0044] Infolgedessen wird, wenn ein Neuron abstirbt, das resultierende funktionale Defizit nicht typischerweise repariert, und die resultierende Pathologie ist irreversibel. Der Tod von Nervenzellen kann in neurodegenerativen Erkrankungen, Neuropathien und bei Denervierung auftreten.

[0045] Der Tod von Nervenzellen tritt in neurodegenerativen Erkrankungen auf, wie etwa Alzheimer, Huntington, Parkinson und amyotrophische Lateralsklerose (ALS). Diese neurodegenerativen Erkrankungen sind alle durch den Tod von Nervenzellen in unterschiedlichen Bereichen des ZNS gekennzeichnet, und sie können einen oder mehrere Typen von Neuronen betreffen. Beispielsweise ist die Parkinson-Krankheit durch den Verlust von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra und dem Locus ceruleus gekennzeichnet, während ALS mit dem Tod von motorischen Neuronen assoziiert ist. Strategien für eine Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen umfassen die Prävention von neuronalem Tod mit neurotrophen Mitteln, die Induktion von neuronaler Regeneration in vivo mit Mitteln, welche endogene Stammzellen beeinflussen, und Zellersatztherapie mit ex vivo Manipulation von Nervenstammzellen. BMP-11 kann Anwendungen in allen diesen Therapie-strategien zur Verhinderung von neuronalem Tod haben.

[0046] Periphere Neuropathie, umfassend Denervierung, resultiert aus einer Schädigung von Neuronen im PNS. In diesem Fall können die Nervenzellen, wenn sie einmal geschädigt sind, absterben oder nicht. Typischerweise sind die Axonen der Nervenzellen betroffen, mit der Zerstörung des Axons selbst oder der das Axon umgebenden Myelinhülle. Wenn der Zellkörper der Nervenzelle nach axonaler Degeneration und/oder Demyelierung am Leben bleibt, kann sich die Nervenzelle manchmal selbst reparieren. Wenn der Zellkörper jedoch stirbt, erfordert eine funktionale Reparatur ein kollaterales Nervenwachstum, um den Schaden zu kompensieren. Übliche Ursachen für periphere Neuropathie umfassen beispielsweise Diabetes mellitus, chronischen Alkoholmissbrauch, Ernährungsmängel (wie etwa der Vitamine B und E), chronisches Nierenversagen, Strahlentherapie, HIV-Infektion, und Trauma oder Aufhaltung (wie Karpaltunnelsyndrom). Aufhaltung von Nervenzellen kann auftreten, wenn umgebende Strukturen auf die Nervenzelle stoßen, z. B. infolge einer Entzündung in dem Bereich.

[0047] Periphere Neuropathie kann durch Mittel behandelt werden, welche die Reparatur von Axonen beschleunigen, neuronalen Tod verhindern und kollaterales Nervenwachstum induzieren. BMP-11 kann in allen diesen Behandlungen verwendet werden.

[0048] Denervierung kann bei Verletzung oder Trauma am Körper auftreten und kann auch bei chirurgischen Eingriffen auftreten, wie etwa wenn der Nerv unabsichtlich durchgeschnitten wird. BMP-11 kann verwendet werden um die Verletzung zu reparieren. Alleine oder in Kombination mit anderen Faktoren wird derjenige Abschnitt des Nerven, der verletzt ist, am Leben gehalten (vom Absterben abgehalten) bis die verletzte Verbindung wieder hergestellt worden ist.

[0049] BMP-11 kann verwendet werden um die Differenzierung von Stammzellen zu Nervenzellen zu fördern, und kann auch verwendet werden, um die Produktion von Axonen und Dendriten zu stimulieren, sowohl an Nervenzellen, die noch keine Neuriten entwickelt haben als auch an Nervenzellen, welche diese Fortsätze infolge der vorstehend genannten Erkrankungen verloren haben.

[0050] Eine Nervenstammzelle ist eine Zelle, aus der eine Vielzahl von Neuronen und Gliazellen entstehen kann. Bestimmte Nervenerkrankungen können behandelt werden durch die ex vivo Manipulation von Nervenstammzellen zur Transplantation oder die in vivo Aktivierung von ruhenden Nervenstammzellen, um eine Heilung von innen heraus zu erzeugen. Aus regionalen Unterschieden im Nervensystem kann ein Vorteil gezogen werden, um dadurch das Verhalten von Nervenstammzellen zu beeinflussen. Neurogenese kann durch BMP-11 alleine oder in Kombination mit anderen Faktoren induziert werden, und kann Nervenstammzellen in eine differenzierte Nachkommenschaft überführen. Es können auch andere geeignete Faktoren zusammen mit dem BMP-11 bereitgestellt werden, damit eine Stammzelle ein bestimmten Typ Neuron oder Gliazelle produziert.

[0051] Klinische Versuche zeigen, dass Neuronenaustauschtherapien für neurodegenerative Erkrankungen wie etwa Parkinson- und Huntington-Krankheit machbar sind. Primäre, in vitro expandierte Zellen können für die Transplantation von Nerven verwendet werden und dies führt zu einer vollkommenen Integration der transplantierten Zellen. In vitro Expansion und Manipulation aus dem Neuralepithel liefern ein Spektrum von gut charakterisierten Zellen für Strategien auf Basis von Transplantation für neurodegenerative Erkrankungen.

[0052] Ein weiterer Aspekt der Erfindung umfasst Methoden zur Behandlung von Nervengewebedefekten, umfassend das Aufbringen einer pharmazeutischen Zusammensetzung, umfassend ein BMP-11-Protein allei-

ne oder in Kombination mit anderen Faktoren auf einen Patienten, an einer Stelle derartiger Defekte, sowie Methoden zur Induzierung der Produktion von Nervengewebe, umfassend das Aufbringen einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die BMP-11-Protein enthält, auf einen Patienten, welcher der Produktion von Nervengewebe bedarf. Das Aufbringen der Zusammensetzung kann mittels Injektion an der Stelle erfolgen, sowie mittels Implantation während Chirurgie, oder einem anderen Aufbringen, welches dazu führt, dass das BMP-11-Protein die gewünschten Wirkungen zeigt. Derartige Zusammensetzungen können Anwendung beim Schutz oder der Reparatur von Nervengewebe in verschiedenen Neuropathien, Neurodegenerationen und bei Denervierung finden. Beispielsweise umfasst eine Methode das Verabreichen eines BMP-11-Proteins direkt zum Zeitpunkt von Trauma um dadurch Zelltod zu verhindern. Eine nochmals andere Methode umfasst die prophylaktische Verabreichung von BMP-11 an Patienten mit einer genetischen Prädisposition für neurodegenerative Erkrankungen.

[0053] Eine derartige Präparation, die ein BMP-11-Protein umfasst, kann auch das Überleben von Nerven erhöhen und daher bei Transplantation und der Behandlung von Zuständen, die eine Verringerung des Überlebens von Nerven zeigen, nützlich sein.

[0054] Es wird erwartet, dass die erfindungsgemäßen BMP-11-Proteine zusammen mit oder möglicherweise synergistisch mit anderen verwandten Proteinen und Wachstumsfaktoren wirken könnten. Weitere therapeutische Methoden und Zusammensetzungen der Erfindung umfassen daher eine therapeutische Menge von mindestens einem BMP-11-Protein der Erfindung mit einer therapeutischen Menge von mindestens einem der BMP-Proteine oder anderen Wachstumsfaktoren, die in vorstehend beschriebenen Patenten und Anmeldungen der gleichen Anmelderin offenbart sind. Derartige Kombinationen können separate Moleküle umfassen, oder Heteromoleküle, die aus unterschiedlichen Resten zusammengesetzt sind. Beispielsweise kann eine Methode und Zusammensetzung der Erfindung ein Disulfid-verknüpftes Dimer umfassen, umfassend eine Untereinheit eines BMP-11-Proteins und eine Untereinheit aus einem Inhibin- α -Protein, einem Inhibin- β -Protein oder einem BMP-Protein, wie etwa BMP-1 bis BMP-10. Die Mittel, die zusammen mit BMP-11 nützlich sind, könnten verschiedene Wachstumsfaktoren wie etwa den Epidermiswachstumsfaktor (EGF), den von Plättchen abgeleiteten Wachstumsfaktor (PDGF), die transformierenden Wachstumsfaktoren (TGF- α und TGF- β) und den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor (IGF) umfassen. Weitere therapeutische Methoden und Zusammensetzungen der Erfindung umfassen eine therapeutische Menge von mindestens einem BMP-11-Protein der Erfindung mit einer therapeutischen Menge von mindestens einem der BMP-Proteine, die in vorstehend beschriebenen Patenten und Anmeldungen der gleichen Anmelderin offenbart sind. Derartige Kombinationen könnten separate Moleküle der BMP-11-Proteine oder Heteromoleküle, die aus unterschiedlichen BMP-Resten zusammengesetzt sind, umfassen. Beispielsweise kann eine Methode und Zusammensetzung der Erfindung ein Disulfid-verknüpftes Dimer umfassen, umfassend eine Untereinheit eines BMP-11-Proteins und eine Untereinheit von einem der vorstehend beschriebenen "BMP"-Proteine. Somit umfasst die vorliegende Erfindung ein gereinigtes BMP-11-Polypeptid, das ein Heterodimer ist, wobei eine Untereinheit mindestens die Aminosäuresequenz von Aminosäure #1 bis Aminosäure #109 von SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 11 umfasst, und eine Untereinheit eine Aminosäuresequenz für ein Knochen-morphogenetisches Protein umfasst, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8 und BMP-9. Eine weitere Ausführungsform kann ein Heterodimer aus BMP-11-Resten umfassen. Diese Mittel umfassen verschiedene Wachstumsfaktoren, wie etwa den Epidermiswachstumsfaktor (EGF), den Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), den von Plättchen abgeleiteten Wachstumsfaktor (PDGF), die transformierenden Wachstumsfaktoren (TGF- α und TGF- β) und den K-Fibroblastenwachstumsfaktor (KFGF), Parathyroidhormon (PTH), den Leukämie-inhibierenden Faktor (LIF/HILDA/DIA), die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF-I und IGF-II). Abschnitte dieser Mittel können ebenfalls in Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0055] Die BMP-11-Proteine der vorliegenden Erfindung können auch in Zusammensetzungen verwendet werden, kombiniert mit anderen Knochen-morphogenetischen Proteinen. Siehe beispielsweise Ogawa et al., WO 92/14481 (1992); Ogawa et al., J. Biol. Chem. 267: 14233–14237 (1992). Die in derartigen Zusammensetzungen nützlichen Knochen-morphogenetischen Proteine umfassen BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6 und BMP-7, beispielsweise offenbart in den US Patenten Nr. 5,108,922; 5,013,649; 5,116,738; 5,106,748; 5,187,076; und 5,141,905; BMP-8, offenbart in der PCT-Veröffentlichung WO 91/18098; und BMP-9, offenbart in der PCT-Veröffentlichung WO 93/00432; und BMP-10, offenbart in der ebenfalls anhängigen Patentanmeldung mit der Seriennummer 08/061,695, eingereicht am 12. Mai 1993.

[0056] Die Herstellung und Formulierung von derartigen physiologisch akzeptablen Proteinzusammensetzungen, unter angemessener Berücksichtigung von pH-Wert, Isotonie, Stabilität und dergleichen, gehört zum Fachwissen. Die therapeutischen Zusammensetzungen sind derzeit auch wertvoll für veterinäre Anwendun-

gen, aufgrund des Fehlens von Speziespezifität von BMP- und TGF-Proteinen.

[0057] Zusätzlich zu Menschen sind insbesondere Haustiere und reinrassige Pferde erwünschte Patienten für eine derartige Behandlung mit BMP-11 der vorliegenden Erfindung.

[0058] Das therapeutische Verfahren umfasst das Verabreichen der Zusammensetzung topisch, systemisch oder lokal als ein Implantat oder eine Vorrichtung. Bei Verabreichung ist die therapeutische Zusammensetzung zur Verwendung in dieser Erfindung natürlich in einer pyrogenfreien, physiologisch akzeptablen Form. Weiter kann die Zusammensetzung wünschenswert eingekapselt sein oder in einer viskosen Form injiziert werden, zur Ablieferung an der Stelle des Knochens, Knorpels oder Gewebeschadens. Topische Verabreichung kann für Wundheilung und Gewebereparatur geeignet sein. Von den BMP-11-Proteinen verschiedene therapeutische Mittel, die wie vorstehend beschrieben ebenfalls in den Zusammensetzungen vorhanden sein können, können alternativ gleichzeitig oder zeitlich versetzt mit der BMP-11-Zusammensetzung in den erfindungsge-
mäßigen Verfahren verabreicht werden.

[0059] Bevorzugt umfasst die Zusammensetzung für die Bildung von Knochen, Knorpel oder anderem Bindegewebe eine Matrix, welche BMP-11 oder andere BMP-Proteine an der Stelle des Gewebeschadens, der einer Reparatur bedarf, abliefern kann, womit eine Struktur für die Entwicklung von Knochen und Knorpel bereitgestellt wird, und die optimal im Körper resorbiert werden kann. Diese Matrix kann für eine langsame Freisetzung von BMP-11 und/oder anderem Knochen-induzierenden Protein sorgen, sowie für eine angemessene Präsentation und eine entsprechende Umgebung für zelluläre Infiltration. Derartige Matrices können aus Materialien gebildet sein, die derzeit für andere medizinische Implantationsanwendungen verwendet werden.

[0060] Die Auswahl des Matrixmaterials basiert auf Biokompatibilität, biologischer Abbaubarkeit, mechanischen Eigenschaften, kosmetischem Aussehen, und Schnittstelleneigenschaften. Die besondere Anwendung der BMP-11-Zusammensetzungen wird die entsprechende Formulierung definieren. Mögliche Matrices für die Zusammensetzungen können biologisch abbaubar sein und können chemisch definiert sein als Calciumsulfat, Tricalciumphosphat, Hydroxyapatit, Polymilchsäure und Polyanhydride. Andere mögliche Materialien sind biologisch abbaubar und biologisch gut definiert, wie etwa Knochen, Sehne oder Hautkollagen. Weitere Matrices umfassen reine Proteine oder extrazelluläre Matrixkomponenten. Andere mögliche Matrices sind nicht biologisch abbaubar und chemisch definiert, wie etwa gesinterter Hydroxyapatit, Bioglas, Aluminate oder andere Keramiken. Matrices können Kombinationen von jedem der vorstehend genannten Materialtypen umfassen, wie etwa Polymilchsäure und Hydroxyapatit oder Kollagen und Tricalciumphosphat. Die Zusammensetzung der Biokeramiken kann abgeändert werden, wie etwa zu Calcium-Aluminat-Phosphat, und sie können prozessiert werden, um die Porengröße, Partikelgröße, Partikelgestalt und die biologische Abbaubarkeit zu ändern.

[0061] Der Fortschritt kann überwacht werden durch Beurteilung des Wachstums und/oder der Reparatur von Knochen in regelmäßigen Zeitabständen. Der Fortschritt kann beispielsweise mittels Röntgenstrahlung, histomorphometrischer Bestimmungen und Tetracyclinmarkierung überwacht werden.

[0062] Der Dosierungsplan wird vom behandelnden Arzt bestimmt, unter Berücksichtigung verschiedener Faktoren, welche die Wirkung des BMP-11-Proteins modifizieren, z. B. das Alter, Geschlecht und die Ernährung des Patienten, die Schwere einer Infektion, der Verabreichungszeitraum und andere klinische Faktoren. Die Dosierung kann mit dem Typ des in der Zusammensetzung vorhandenen BMP-11-Proteins oder Wachstumsfaktors variieren. Die Dosierung kann auch mit dem Typ der verwendeten Matrix variieren.

[0063] Die nachfolgenden Beispiele veranschaulichen die Praxis der vorliegenden Erfindung hinsichtlich der Gewinnung und Charakterisierung von BMP-11-Protein aus Rind, und dessen Verwendung zur Gewinnung des humanen und anderer BMP-11-Proteine, dem Erhalt der humanen Proteine und der Expression der Proteine mittels rekombinanter Techniken. Ebenfalls ausführlich erläutert sind neuronale Verwendungen von BMP-11-Proteinen.

BEISPIEL 1

BMP-11 aus Rind

[0064] 800.000 Rekombinanten einer genomischen Bank aus Rind, konstruiert im Vektor λ EMBL3, werden in einer Dichte von 8.000 rekombinanten Bakteriophagenplaques pro Platte auf 100 Platten plattiert. Von diesen Platten werden doppelte Nitrocellulose-Repliken der rekombinanten Bakteriophagenplaques hergestellt und amplifiziert. Ein Fragment von humaner BMP-7-DNA, entsprechend den Nukleotiden #1081 bis #1403 (**Fig. 4**,

US Patent Nr. 5,141,905) wird mittels der Randomprimingmethode von Feinberg et al. [Anal. Biochem. 132: 6–13 (1983)] mit ^{32}P -markiert 2 bis 3 Tage bei 60°C in Standardhybridisierungspuffer (SHB) (5 × SSC, 0,170 SDS, 5 × Denhardt-Lösung, 100 µg/ml Lachssperma-DNA) an einen Satz Filter hybridisiert. Die Filter werden unter niedrig stringenten Bedingungen gewaschen (4 × SSC, 0,1% SDS, bei 60°C). Es wird eine Vielzahl von positiv hybridisierenden Rekombinanten festgestellt. 52 positiv hybridisierende rekombinante Bakteriophagenplaques werden ausgewählt und auf Sekundärplatten erneut plattiert. Es werden doppelte Nitrocellulose-Repliken der rekombinanten Plaques von diesen 52 Sekundärplatten hergestellt und amplifiziert. Ein Satz Nitrocellulosefilter wird mit der humanen BMP-7-DNA-Sonde hybridisiert, wie vorstehend beschrieben, und unter den gleichen niedrig stringenten Bedingungen gewaschen. Der andere Satz Filter wird mit einem Sondengemisch von BMP-5, BMP-6 und BMP-7 über Nacht bei 65°C in SHB hybridisiert und mit 0,1 × SSC, 0,1% SDS bei 65°C gewaschen (stringente Hybridisierungs- und Waschbedingungen). Das Sondengemisch besteht aus relativ gleichen Mengen von ^{32}P -markierten DNA-Fragmenten, umfassend die Nukleotide #1452 bis #2060 (**Fig. 4**, US Patent Nr. 5,106,748) der humanen BMP-5-Sequenz, die Nukleotide #1395 bis #1698 (**Fig. 4**, US Patent Nr. 5,187,076) der humanen BMP-6-Sequenz, und die Nukleotide #1081 bis #1403 (**Fig. 4**, US Patent Nr. 5,141,905) der humanen BMP-7-Sequenz. Die BMP-5-, BMP-6- und BMP-7-DNA-Fragmente werden mittels der Randomprimingmethode mit ^{32}P -markiert und gleiche Beträge von Zählimpulsen pro Minute (cpm) jeder Probe werden kombiniert und zu dem SHB, enthaltend den anderen Satz von Nitrocellulosefilter-Repliken der 52 Sekundärplatten zugegeben. 14 Rekombinanten, die unter den niedrig stringenten Bedingungen mit der humanen BMP-7-Sonde positiv hybridisierten, und eine schwache oder keine Hybridisierung mit dem BMP-5/6/7-Sondengemisch unter den hoch stringenten Bedingungen zeigten, werden für eine weitere Analyse ausgewählt. Alle 14 Rekombinanten, welche diese Hybridisierungscharakteristika zeigen, werden Plaque-gereinigt, und Bakteriophagen-DNA wird von jeder präpariert. Der positiv hybridisierende Bereich von einer der 14 Rekombinanten, welche diese vorstehend beschriebenen Hybridisierungscharakteristika zeigt, bezeichnet als $\lambda 7r-30$, wird auf ein 0,5 kb SacI-Restriktionsfragment kartiert. Dieses Fragment wird in einen Plasmidvektor (pGEM-3) subkloniert und eine DNA-Sequenzanalyse wird durchgeführt. Die partielle DNA-Sequenz (SEQUENZ ID NO: 1) und die abgeleitete Aminosäuresequenz (SEQUENZ ID NO: 2) von Klon $\lambda 7r-30$ sind im Sequenzprotokoll gezeigt.

[0065] Der Bakteriophage $\lambda 7r-30$ wurde am 7. April 1993 bei der ATCC hinterlegt, und ihm wurde die Zugangsnummer ATCC 75439 zugeteilt. Diese Hinterlegung erfüllt die Erfordernisse des Budapester Vertrags über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für die Zwecke von Patentverfahren und die darunter fallenden Regelungen.

[0066] Dieser Klon $\lambda 7r-30$ kodiert für mindestens einen Teil des BMP-11-Proteins aus Rind der vorliegenden Erfindung. Die Nukleotidsequenz von Klon $\lambda 7r-30$ enthält einen offenen Leserahmen von 456 Nukleotiden, #246–701 von SEQ ID NO: 1. Die Nukleotidsequenz von #324 bis #701 von SEQ ID NO: 1 definiert einen offenen Leserahmen von 378 Nukleotiden, der für mindestens 126 Aminosäuren des C-terminalen Bereichs eines BMP-11-Proteins aus Rind kodiert, wie bestimmt mittels Ausrichtung mit anderen BMP-Proteinen und anderen Proteinen aus der TGF- β -Familie. Die Nukleotidsequenz #246 bis #323 definiert einen offenen Leserahmen, der mit der Sequenz, welche für das vorhergesagte 126-Aminosäuren-BMP-11-Peptid kodiert, kontinuierlich ist, ein geringerer Grad an Aminosäureidentität des von diesem DNA-Sequenzbereich (#246 bis #323) abgeleiteten Peptids zu anderen BMP-Proteinen und anderen Proteinen der TGF- β -Familie, und die Gegenwart von mehreren möglichen Spleißakzeptor-Konsensussequenzen macht es jedoch schwierig, die 5'-Grenze dieses Exons des BMP-11-Gens aus Rind zu definieren. Die Gegenwart eines Stopcodons im Leserahmen an den Nukleotidpositionen #243 bis #245 deutet darauf hin, dass die Nukleotidsequenz von Klon $\lambda 7r-30$ mindestens einen Exon/Intron-Übergang des BMP-11-Gens aus Rind enthält.

[0067] Basierend auf der Kenntnis von anderen Proteinen innerhalb der TGF- β -Familie wird vorhergesagt, dass das BMP-11-Vorläuferpolypeptid an der mehrbasischen Sequenz ARG-SER-ARG-ARG gespalten werden würde, in Übereinstimmung mit einer vorgeschlagenen proteolytischen Prozessierungskonsensussequenz ARG-X-X-ARG. Es wird erwartet, dass die Spaltung des BMP-11-Vorläuferpolypeptids ein reifes Peptid von 109 Aminosäuren erzeugt, beginnend mit der Aminosäure ASN an Position #1. Es wird erwartet, dass die Prozessierung von BMP-11 zu der reifen Form die Dimerisierung und die Entfernung des N-terminalen Bereichs beinhaltet, in einer zu der Prozessierung des verwandten Proteins TGF- β analogen Weise [Gentry et al., Molec. & Cell. Biol. 8: 4162 (1988); Derynck et al., Nature 316: 701 (1985)].

[0068] Es wird daher erwartet, dass die reife, aktive Spezies von BMP-11 ein Homodimer aus zwei Polypeptid-Untereinheiten umfasst, wobei jede Untereinheit die Aminosäuren #1 bis #109 umfasst, mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von annähernd 12.000 Dalton. Von weiteren aktiven Spezies wird erwartet, dass sie die Aminosäuren #6 bis #109 umfassen, damit den ersten konservierten Cysteinrest umfassen. Wie bei an-

deren Mitgliedern der TGF- β -Proteinfamilie weist der carboxyterminale Bereich des BMP-11-Proteins eine höhere Sequenzkonservierung auf als der aminoternale Abschnitt. Die prozentuale Aminosäureidentität des BMP-11-Proteins in der Cystein-reichen C-terminalen Domäne (Aminosäuren #6 bis #109) zum entsprechenden Bereich von anderen Proteinen innerhalb der TGF- β -Familie ist wie folgt: BMP-2, 39%; BMP-3, 37%; BMP-4, 37%; BMP-5, 42%; BMP-6, 45%; BMP-7, 42%; BMP-8, 39%; BMP-9, 40%; Vg1, 39%; GDF-1, 34%; TGF- β 1, 36%; TGF- β 2, 38%; TGF- β 3, 38%; Inhibin β (B), 41%; Inhibin β (A), 39%.

BEISPIEL 2

Humanes BMP-11

[0069] Es wird angenommen, dass die Gene für BMP-11 aus Rind und Mensch signifikant homolog sind, daher wird die kodierende Sequenz aus Rind oder ein Abschnitt davon als eine Sonde verwendet, um eine humane genomische Bank zu screenen, oder als eine Sonde, um eine humane Zelllinie oder ein Humangewebe zu identifizieren, welche bzw. welches das analoge humane Protein synthetisiert. Eine humane genomische Bank, wie etwa Stratagene Katalognr. #944201, kann mit einer derartigen Sonde gescreent werden, und mutmaßliche Positive isoliert und DNA-Sequenzen erhalten werden. Ein Nachweis, dass diese Rekombinante für einen Abschnitt des humanen BMP-11 kodiert, beruht auf den Strukturhomologien des Proteins und Gens aus Rind/Mensch.

[0070] Sobald ein rekombinanter Bakteriophage erhalten worden ist, der DNA enthält, welche für einen Abschnitt des humanen BMP-11-Moleküls kodiert, kann die humane kodierende Sequenz als eine Sonde verwendet werden, um eine humane Zelllinie oder ein Humangewebe zu identifizieren, welche bzw. welches BMP-11-mRNA synthetisiert. Alternativ kann die für BMP-11 kodierende Sequenz aus Rind als eine Sonde verwendet werden, um eine derartige humane Zelllinie oder ein derartiges Humangewebe zu identifizieren. In kurzen Worten wird RNA aus einer ausgewählten Zelle oder Gewebequelle extrahiert und entweder auf einem Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert oder direkt mit Formaldehyd reagiert und auf Nitrocellulose aufgetüpfelt. Die Nitrocellulose wird danach an eine Sonde hybridisiert, welche von einer kodierenden Sequenz von BMP-11 aus Rind oder Mensch abgeleitet ist. Alternativ wird die für BMP-11 kodierende Sequenz aus Rind dazu verwendet, um Oligonukleotidprimer zu entwerfen, die spezifisch einen Abschnitt der für BMP-11 kodierenden Sequenz amplifizieren, welcher im Bereich zwischen den Primern, die zur Durchführung der spezifischen Amplifikationsreaktion verwendet werden, gelegen ist. Es wird erwartet, dass die BMP-11-Sequenzen aus Rind und Mensch es ermöglichen würden, entsprechende humane, für BMP-11 kodierende Sequenzen aus mRNA, cDNA oder genomischen DNA-Templaten spezifisch zu amplifizieren. Sobald durch eines der vorstehend beschriebenen Verfahren eine positive Quelle identifiziert worden ist, wird mittels Oligo(dT)cellulose-Chromatographie mRNA selektiert und cDNA synthetisiert und mittels etablierter Techniken (Toole et al., vorstehend) in λ gt10 oder andere λ -Bakteriophagenvektoren, die dem Fachmann bekannt sind (d. h. λ ZAP), kloniert. Es ist auch möglich, die Oligonukleotidprimergerichtete Amplifikationsreaktion, vorstehend beschrieben, direkt an einer zuvor etablierten humanen cDNA-Bank oder genomischen Bank durchzuführen, die in einem λ -Bakteriophagenvektor kloniert ist. In diesen Fällen könnte eine Bank, welche ein spezifisch amplifiziertes, für einen Abschnitt des humanen BMP-11-Proteins kodierendes DNA-Produkt ergibt, direkt gescreent werden, unter Verwendung des Fragments der amplifizierten, für BMP-11 kodierenden DNA als eine Sonde.

[0071] Es wird vorhergesagt, dass Oligonukleotidprimer, die auf Basis der DNA-Sequenz für Rinder-BMP-11 aus dem genomischen Klon λ 7r-30 entworfen wurden, die spezifische Amplifikation von humanen, für BMP-11 kodierenden Sequenzen ermöglichen. Der nachfolgende Oligonukleotidprimer wird auf Basis der Nukleotide #501 bis #521 der in SEQ ID NO: 1 angegebenen DNA-Sequenz entworfen und auf einem automatisierten DNA-Synthesizer synthetisiert.

Primer C: TAGTCTAGATGCTCCGGCCAGTGCGAGTAC

[0072] Die ersten neun Nukleotide von Primer C (unterstrichen) umfassen die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease XbaI, welche verwendet werden kann um die Manipulation einer spezifisch amplifizierten, für das erfindungsgemäße BMP-11-Protein kodierenden DNA-Sequenz zu erleichtern, und sind somit nicht von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten DNA-Sequenz abgeleitet.

[0073] Der nachfolgende Oligonukleotidprimer wird auf Basis der Nukleotide #701 bis #678 der in SEQ ID NO: 1 angegebenen DNA-Sequenz entworfen und auf einem automatisierten DNA-Synthesizer synthetisiert.

Primer D: TGCGGATCCGGAGCAGCCACAGCGATCCAC

[0074] Die ersten neun Nukleotide von Primer D (unterstrichen) umfassen die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease BamHI, welche verwendet werden kann um die Manipulation einer spezifisch amplifizierten, für das erfindungsgemäße BMP-11-Protein kodierenden DNA-Sequenz zu erleichtern, und sind somit nicht von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten DNA-Sequenz abgeleitet.

[0075] Die Standardnukleotidsymbole in den vorstehend identifizierten Primern sind wie folgt: A, Adenosin; C, Cytosin; G, Guanin; und T, Thymin.

[0076] Die vorstehend identifizierten Primer C und D werden als Primer verwendet um die Amplifikation einer spezifischen Nukleotidsequenz aus humaner genomischer DNA zu ermöglichen. Die Amplifikationsreaktion wird wie folgt durchgeführt:

[0077] Humane genomische DNA (Quelle: periphere Blutlymphozyten) wird fünf Minuten bei 100°C denaturiert und danach auf Eis gekühlt, vor Zugabe eines Reaktionsgemisches, enthaltend jeweils 200 µM Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP und dTTP), 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,001% Gelatine, 1,25 Einheiten Taq DNA-Polymerase, 100 pM Oligonukleotidprimer C und 100 pM Oligonukleotidprimer D. Dieses Reaktionsgemisch wird danach einem thermischen Zyklisieren in der nachfolgenden Weise unterzogen: 3 Minuten bei 94°C, 1 Minute bei 50°C, 1 Minute bei 72°C, während eines Zyklus, danach neununddreißig Zyklen 1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei 50°C, 1 Minute bei 72°C.

[0078] Die DNA, welche durch diese Reaktion spezifisch amplifiziert wurde, wird von den überschüssigen Oligonukleotidprimern C und D, die zur Initiierung der Amplifikation verwendet wurden, unter Verwendung eines auf DNA-Reinigungsharz basierten Protokolls abgetrennt, unter den vom Hersteller vorgeschlagenen Bedingungen. Das resultierende DNA-Produkt wird mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und BamHI verdaut, mit Phenol extrahiert, mit Chloroform extrahiert. Pufferwechsel und die Entfernung kleiner DNA-Fragmente, die aus dem XbaI/BamHI Restriktionsverdau resultieren, wird bewirkt durch Verdünnung des verdauten DNA-Produkts in 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, gefolgt von Zentrifugation durch eine Centricon™ 30 Mikrokonzentrationsvorrichtung (W. R. Grace & Co., Beverly, Ma., Produkt #4209). Das resultierende, XbaI/BamHI-verdaute amplifizierte DNA-Produkt wird in einen Plasmidvektor (pBluescript) subkloniert, zwischen XbaI und BamHI Restriktionsstellen der Polylinkerregion. DNA-Sequenzanalyse der resultierenden Subklone deutet darauf hin, dass das spezifisch amplifizierte DNA-Sequenzprodukt für einen Abschnitt des humanen BMP-11-Proteins dieser Erfindung kodiert. Die DNA-Sequenz (SEQ ID NO: 3) und die abgeleitete Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 4) dieses spezifisch amplifizierten DNA-Fragments sind im Sequenzprotokoll angegeben.

[0079] Die Nukleotide #1 bis #27 dieser Sequenz umfassen einen Abschnitt von Oligonukleotidprimer C und die Nukleotide #186 bis #213 umfassen einen Abschnitt von Oligonukleotidprimer D, die zur Durchführung der spezifischen Amplifikationsreaktion verwendet worden waren. Aufgrund der Funktion der Oligonukleotidprimer C und D (entworfen auf Basis der BMP-11 DNA-Sequenz aus Rind) bei der Initiierung der Amplifikationsreaktion müssen sie nicht exakt der tatsächlichen für ein humanes BMP-11 kodierenden Sequenz entsprechen und sind daher in der obigen abgeleiteten Aminosäuresequenz nicht translatiert. Die spezifisch von dem humanen genomischen DNA-Templat amplifizierte DNA-Sequenz von Nukleotid #28 bis #185 von SEQ ID NO: 3, oder Abschnitte davon, können als eine Sonde verwendet werden um zusätzliche humane, für BMP-11 kodierende Sequenzen aus humanen genomischen Banken oder humanen cDNA-Banken zu identifizieren, mittels Hybridisierung/Screening-Standardtechniken, die dem Fachmann bekannt sind.

[0080] Eine Millionzweihunderttausend Rekombinanten aus einer humanen fötalen Hirn-cDNA-Bank (Stratagene Katalognr. #936206), konstruiert im Vektor λZAPII werden in einer Dichte von 24.000 rekombinanten Bakteriophagenplaques pro Platte auf 50 Platten plattiert. Doppelte Nitrocellulose-Repliken der rekombinanten Bakteriophagenplaques werden von diesen Platten hergestellt. Eine Oligonukleotidsonde, entworfen auf Basis der Nukleotide #53–#82 von SEQ ID NO: 3, wird auf einem automatisierten DNA-Synthesizer synthetisiert. Diese Oligonukleotidsonde wird mit γ³²P-ATP radioaktiv markiert und an beide Sätze der doppelten Nitrocellulose-Repliken bei 65°C in SHB hybridisiert. Es werden neun positiv hybridisierende Rekombinanten festgestellt. Eine der positiv hybridisierenden Rekombinanten, bezeichnet als λFB30.5, wird Plaque-gereinigt. Bakteriophage-Vorratsplatten des gereinigten cDNA-Klons λFB30.5 werden hergestellt und Bakteriophagen-DNA wird isoliert. Ein Bakterienplasmid mit der Bezeichnung FB30.5, erzeugt durch das vom Hersteller (Stratagene) beschriebene Exzisionsprotokoll, welches das gesamte Insert des cDNA-Bakteriophagenklons λFB30.5 enthält, wurde bei der ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, USA, gemäß den Erfordernissen des Budapester Vertrags hinterlegt, und ist bezeichnet als ATCC #69619. Ein Abschnitt der DNA-Sequenz von Klon FB30.5 ist in SEQ ID NO: 10 angegeben.

[0081] Eine Million Rekombinanten einer humanen genomischen Bank (Stratagene Katalognr. #944201), konstruiert im Vektor λ FIX, werden in einer Dichte von 20.000 rekombinanten Bakteriophagenplaques pro Platte auf 50 Platten plattiert. Doppelte Nitrocellulose-Repliken der rekombinanten Bakteriophagenplaques werden von diesen Platten hergestellt. Eine Oligonukleotidsonde, entworfen auf Basis der Nukleotide #57–#86 von SEQ ID NO: 10, mit Ausnahme eines unbeabsichtigten Austausches von GCG nach CAC an den Nukleotiden #59–#61 von SEQ ID NO: 10, wird auf einem automatisierten DNA-Synthesizer synthetisiert. Diese Oligonukleotidsonde wird mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP radioaktiv markiert und an beide Sätze der doppelten Nitrocellulose-Repliken bei 65°C in SHB hybridisiert. Es werden fünf positiv hybridisierende Rekombinanten festgestellt. Eine der positiv hybridisierenden Rekombinanten, bezeichnet als 30GEN.4, wird Plaque-gereinigt. Bakteriophage-Vorratsplatten des gereinigten genomischen Klon 30GEN.4 werden hergestellt und Bakteriophagen-DNA wird isoliert. Ein Bakteriophagenvorrat dieses genomischen Klon 30GEN.4 wurde bei der ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, USA, gemäß den Erfordernissen des Budapester Vertrags hinterlegt, und ist bezeichnet als ATCC #75775. Ein Abschnitt der DNA-Sequenz von Klon 30GEN.4 ist in SEQ ID NO: 10 angegeben. Es wurde nachgewiesen, dass ein Abschnitt der DNA-Sequenz des genomischen Klon 30GEN.4 mit einem Abschnitt der DNA-Sequenz des cDNA-Klon FB30.5 identisch ist. Der überlappende Bereich (Nukleotide #1–#198) von SEQ ID NO: 10 wurde als eine Basis verwendet um die partielle kodierende Sequenz des BMP-11-Proteins zu kompilieren. Es wird erwartet, dass der genomische Klon 30GEN.4 zusätzliche 5'-kodierende Sequenzen des humanen BMP-11-Proteins enthält, welche erwartungsgemäß für den Rest des BMP-11-Vorläuferpolypeptids kodieren, einschließlich des Initiator-Methionins. Die Partialsequenz von humanem BMP-11 ist in SEQ ID NO: 10 dargestellt, und es sollte bemerkt werden, dass die Gegenwart der Nukleotide #1–198 sowohl in dem genomischen Klon 30GEN.4 als auch dem cDNA-Klon FB30.5 nachgewiesen worden ist, während die Nukleotide #199–#1270 ausschließlich von dem cDNA-Klon FB30.5 stammen. SEQ ID NO: 10 sagt ein humanes BMP-11-Vorläuferprotein von mindestens 362 Aminosäuren voraus. Auf Basis der Kenntnis anderer BMP-Proteine und anderer Proteine innerhalb der TGF- β -Familie wird vorausgesagt, dass das Vorläuferpolypeptid an der mehrbasischen Sequenz ARG-SER-ARG-ARG (Aminosäuren #4 bis #-1 von SEQ ID NO: 11) gespalten werden würde, in Übereinstimmung mit der vorgeschlagenen proteolytischen Prozessierungskonsensussequenz ARG-X-X-ARG. Die Spaltung des humanen BMP-11-Vorläuferpolypeptids an dieser Stelle würde ein reifes Peptid von 109 Aminosäuren erzeugen, beginnend mit der Aminosäure ASN an Position #1 von SEQ ID NO: 11. Es wird erwartet, dass die Prozessierung von humanem BMP-11 zu der reifen Form die Dimerisierung und die Entfernung des N-terminalen Bereichs beinhaltet, in einer zu der Prozessierung des verwandten Proteins TGF- β analogen Weise [L. E. Gentry et al., *Molec. & Cell. Biol.* 8: 4162 (1988); R. Derynck et al., *Nature* 316: 701 (1985)]. Es wird erwartet, dass die reife, aktive Spezies von humanem BMP-11 ein Homodimer aus zwei Polypeptid-Untereinheiten umfasst, wobei jede Untereinheit die Aminosäuren #1 bis #108 von SEQ ID NO: 11 umfasst, mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von annähernd 12.000 Dalton. Von weiteren aktiven Spezies wird erwartet, dass sie die Aminosäuren #7 bis #108 von SEQ ID NO: 11 umfassen, damit den ersten konservierten Cysteinrest umfassen. Heterodimere Moleküle, die eine Untereinheit aus BMP-11 und eine andere Untereinheit eines anderen Mitglieds der BMP/TGF- β -Superfamilie umfassen, werden ebenfalls erwartet.

BEISPIEL 3

Expression von BMP-11

[0082] Um BMP-11-Proteine aus Rind, Mensch oder anderen Säugern zu produzieren wird die dafür kodierende DNA in einen entsprechenden Expressionsvektor transferiert und in Säugerzellen oder andere bevorzugte eukaryontische oder prokaryontische Wirte eingebracht, mittels herkömmlicher gentechnischer Techniken. Es wird erwartet, dass das bevorzugte Expressionssystem für biologisch aktives rekombinantes humanes BMP-11 stabil transformierte Säugerzellen sind.

[0083] Ein Fachmann kann Säugerexpressionsvektoren konstruieren, indem er die Sequenz von SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 10, oder andere für BMP-11-Proteine kodierende Sequenzen oder andere modifizierte Sequenzen, und bekannte Vektoren, wie etwa pCD [Okayama et al., *Mol. Cell. Biol.* 2: 161–170 (1982)], pJL3, pJL4 [Gough et al., *EMBO J.* 4: 645–653 (1985)] und pMT2 CXM, verwendet.

[0084] Der Säugerexpressionsvektor pMT2 CXM ist ein Derivat von p91023(b) (Wong et al., *Science* 228: 810–815, 1985), der sich vom letzteren darin unterscheidet, dass er das Ampicillinresistenzgen anstelle des Tetracyclinresistenzgens enthält und weiter eine XhoI-Stelle für die Insertion von cDNA-Klonen enthält. Die funktionalen Elemente von pMT2 CXM wurden beschrieben (Kaufman, R. J., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 689–693) und umfassen die Adenovirus VA-Gene, den SV40 Replikationsursprung, umfassend den 72 bp Enhancer, den späten Adenovirus-Hauptpromoter (major late promoter), umfassend eine 5'-Spleißstelle und

den Großteil der dreigeteilten Adenovirus-Leadersequenz, die in späten Adenovirus-mRNA vorhanden ist, eine 3'-Spleißakzeptorstelle, ein DHFR-Insert, die frühe SV40-Polyadenylierungsstelle (SV40), und pBR322-Sequenzen, die zur Propagation in *E. coli* notwendig sind.

[0085] Das Plasmid pMT2 CXM wird erhalten durch EcoRI-Verdau von pMT2-VWF, das bei der American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD (USA), unter der Zugangsnummer ATCC 67122 hinterlegt ist. Der EcoRI-Verdau schneidet das in pMT2-VWF vorhandene cDNA-Insert heraus, wobei pMT2 in linearer Form erhalten wird, die ligiert werden kann und zur Transformation von *E. coli* HB 101 oder DH-5 auf Ampicillinresistenz verwendet werden kann. DNA von Plasmid pMT2 kann mittels herkömmlicher Methoden präpariert werden. Danach wird Plasmid pMT2 CXM konstruiert, unter Verwendung von Loopout/in-Mutagenese [Morinaga et al., *Biotechnology* 84: 636 (1984)]. Dies entfernt die Basen 1075 bis 1145, bezogen auf die HindIII-Stelle in Nähe vom SV40 Replikationsursprung und Enhancersequenzen von pMT2. Zusätzlich insertiert dies die nachfolgende Sequenz:

5'-PO-CATGGGCAGCTCGAG-3'

an Nukleotid 1145. Diese Sequenz enthält die Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease XhoI. Ein Derivat von pMT2 CXM, bezeichnet als pMT23, enthält Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen PstI, EcoRI, Sall und XhoI. DNA der Plasmide pMT2 CXM und pMT23 kann mittels herkömmlicher Methoden präpariert werden.

[0086] pEMC2b1, das von pMT21 abgeleitet ist, kann in der Praxis der Erfindung ebenfalls geeignet sein. pMT21 ist von pMT2 abgeleitet, das wiederum von pMT-VWF abgeleitet ist. Wie vorstehend beschrieben schneidet ein Verdau mit EcoRI das in pMT-VWF vorhandene cDNA-Insert heraus, wobei pMT2 in linearer Form erhalten wird, die ligiert werden kann und zur Transformation von *E. coli* HB 101 oder DH-5 auf Ampicillinresistenz verwendet werden kann. DNA von Plasmid pMT2 kann mittels herkömmlicher Methoden präpariert werden.

[0087] pMT21 ist durch die nachfolgenden zwei Modifikationen von pMT2 abgeleitet. Erstens sind 76 bp der 5'- nicht translatierten Region der DHFR-cDNA, umfassend einen Abschnitt von 19 G-Resten aus G/C-Tailing für die cDNA-Klonierung, deletiert. In diesem Vorgang wird eine XhoI-Stelle insertiert, wobei unmittelbar stromaufwärts von DHFR die nachfolgende Sequenz erhalten wird:

5'-CTGCAGGCGAGCCTGAATTCCTCGAGCCATCATG-3'
 PstI EcoRI XhoI

[0088] Zweitens ist eine einzige ClaI-Stelle eingeführt, durch Verdau mit EcoRV und XbaI, Behandlung mit dem Klenow-Fragment von DNA-Polymerase I, und Ligierung mit einem ClaI-Linker (CATCGATG). Dies deletiert ein 250 bp Segment aus der Adenovirus-assoziierten RNA (VAI) Region, aber stört die VAI RNA-Genexpression oder Funktion nicht. pMT21 wird mit EcoRI und XhoI verdaut, und verwendet um den Vektor pEMC2B1 abzuleiten.

[0089] Ein Abschnitt des EMCV-Leaders wird durch Verdau von pMT2-ECAT1 [S. K. Jung et al., *J. Virol.* 63: 1651-1660 (1989)] mit EcoRI und PstI erhalten, was zu einem Fragment von 2752 bp führt. Dieses Fragment wird mit TaqI verdaut, was ein EcoRI-TaqI-Fragment von 508 bp ergibt, welches durch Elektrophorese auf einem niedrig schmelzenden Agarosegel gereinigt wird. Ein Adapter mit 68 bp und dessen komplementärer Strang werden synthetisiert, mit einem 5'-TaqI-überhängendem Ende und einem 3'-XhoI-überhängendem Ende, mit der nachfolgenden Sequenz:

5'-CGAGGTTAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTTCCTTT
 TaqI

GAAAAACACGATTGC-3'
 XhoI

[0090] Diese Sequenz entspricht der EMC-Virus-Leadersequenz von Nukleotid 763 bis 827. Sie verändert auch das ATG an Position 10 innerhalb des EMC-Virus-Leaders zu einem ATT, gefolgt von einer XhoI-Stelle. Eine Dreifachligierung des EcoRI-XhoI-Fragments aus pMT21, des EcoRI-TaqI-Fragments aus EMC-Virus und des 68 bp Oligonukleotidadapters TaqI-XhoI-Adapter resultiert in dem Vektor pEMC2B1.

[0091] Dieser Vektor enthält den SV40-Replikationsursprung und Enhancer, den späten Adenovirus Hauptpromoter, eine cDNA-Kopie des Großteils der dreigeteilten Adenovirus-Leadersequenz, eine kurze Hybridwi-

schensequenz, ein SV40-Polyadenylierungssignal und das Adenovirus VA I-Gen, DHFR- und β -Lactamase-Marker und eine EMC-Sequenz, in geeigneten Beziehungen, um die Expression der gewünschten cDNA in Säugerzellen in hohen Gehalten zu steuern.

[0092] Die Konstruktion von Vektoren kann eine Modifizierung der BMP-11-DNA-Sequenzen beinhalten. Beispielsweise kann BMP-11-DNA modifiziert werden durch Entfernen der nicht kodierenden Nukleotide am 5'-Ende und 3'-Ende der kodierenden Region. Die deletierten nicht kodierenden Nukleotide können durch andere Sequenzen, die bekanntermaßen für die Expression günstig sind, ersetzt werden oder nicht. Diese Vektoren werden für die Expression von BMP-11-Proteinen in geeignete Wirtszellen transformiert. Zusätzlich könnten die Sequenz von SEQ ID NO: 1 oder von SEQ ID NO: 10 oder andere, für BMP-11-Proteine kodierende Sequenzen manipuliert werden, so dass sie ein reifes BMP-11 exprimieren, indem man für BMP-11-Propeptid kodierende Sequenzen deletiert und sie durch Sequenzen ersetzt, die für die vollständigen Propeptide von anderen BMP-Proteinen, Activin-Proteinen oder anderen Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie kodieren.

[0093] Ein Fachmann kann die Sequenzen von SEQ ID NO: 1 oder von SEQ ID NO: 10 manipulieren, indem er die regulatorischen Säugersequenzen, welche die kodierende Region flankieren, entfernt oder sie durch Bakteriensequenzen ersetzt, wobei Bakterienvektoren für eine intrazelluläre oder extrazelluläre Expression durch Bakterienzellen erzeugt werden. Beispielsweise könnten die kodierenden Sequenzen weiter manipuliert werden (z. B. an andere bekannte Linker ligiert werden oder durch Deletion von nicht kodierenden Sequenzen daraus oder durch Veränderung von Nukleotiden darin oder durch andere bekannte Techniken modifiziert werden). Die modifizierte, für BMP-11 kodierende Sequenz könnte danach in einen bekannten Bakterienvektor inseriert werden, unter Verwendung von Verfahren, wie etwa in T. Taniguchi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5230–5233 (1980) beschrieben. Dieser beispielhafte Bakterienvektor könnte danach in Bakterienwirtszellen transformiert werden und dadurch ein BMP-11-Protein exprimiert werden. Hinsichtlich einer Strategie, um eine extrazelluläre Expression von BMP-11-Proteinen in Bakterienzellen zu bewirken, siehe z. B. die europäische Patentanmeldung EPA 177 343.

[0094] Ähnliche Manipulationen können für die Konstruktion eines Insektenvektors, für eine Expression in Insektenzellen, durchgeführt werden [siehe z. B. die in der veröffentlichten europäischen Patentanmeldung 155 476 beschriebenen Vorgehensweisen]. Ein Hefevektor könnte ebenfalls konstruiert werden, für die intrazelluläre oder extrazelluläre Expression der Faktoren der vorliegenden Erfindung durch Hefezellen unter Verwendung regulatorischer Hefesequenzen [siehe z. B. die in der veröffentlichten PCT Anmeldung WO 86/00639 und der europäischen Patentanmeldung EPA 123 289 beschriebenen Vorgehensweisen].

[0095] Eine Methode, um hohe Gehalte eines erfindungsgemäßen BMP-11-Proteins in Säugerzellen zu produzieren, kann die Konstruktion von Zellen umfassen, die mehrere Kopien des heterologen BMP-11-Gens enthalten. Das heterologe Gen wird mit einem amplifizierbaren Marker verknüpft, z. B. dem Gen für die Dihydrofolatreductase (DHFR), für welches Zellen, die eine erhöhte Anzahl von Kopien des Gens enthalten, durch Propagation in steigenden Konzentrationen an Methotrexat (MTX) selektiert werden können, gemäß den Verfahren von Kaufman und Sharp, J. Mol. Biol. 159: 601–629 (1982). Dieser Ansatz kann mit einer Reihe von verschiedenen Zelltypen angewandt werden.

[0096] Beispielsweise können ein Plasmid, enthaltend eine DNA-Sequenz für ein erfindungsgemäßes BMP-11 in operativer Assoziation mit anderen Plasmidsequenzen, welche dessen Expression ermöglichen, und das DHFR-Expressionsplasmid pAdA26SV(A)3 [Kaufman und Sharp, Mol. Cell. Biol. 2: 1304 (1982)] zusammen in DHFR-defiziente CHO-Zellen, DUKX-BII, eingebracht werden, durch verschiedene Methoden, umfassend Calciumphosphat-Copräzipitation und Transfektion, Elektroporation oder Protoblastenfusion. DHFR-exprimierende Transformanten werden auf Wachstum in alpha-Medium mit dialysiertem fötalen Kälberserum selektiert, und danach durch Wachstum in steigenden MTX-Konzentrationen (z. B. in Schritten von nacheinander 0,02, 0,2, 1,0 und 5 μ M MTX) auf Amplifikation selektiert, wie beschrieben von Kaufman et al., Mol. Cell. Biol. 5: 1750 (1983). Transformanten werden kloniert, und die Expression von biologisch aktivem BMP-11 wird mittels eines der in den Beispielen 5 bis 8 nachstehend beschriebenen BMP-11-Aktivitätsassays überwacht. Die BMP-11-Expression sollte mit steigenden Niveaus der MTX-Resistenz steigen. BMP-11-Polypeptide werden charakterisiert unter Verwendung von in der Technik bekannten Standardtechniken, wie etwa gepulste Markierung mit [35 S]-Methionin oder -Cystein und Polyacrylamidgelelektrophorese. Ähnliche Vorgehensweisen können verfolgt werden um andere verwandte BMP-11-Proteine zu produzieren.

BEISPIEL 4

Biologische Aktivität von exprimiertem BMP-11

[0097] Um die biologische Aktivität der in Beispiel 3, vorstehend, erhaltenen BMP-11-Proteine zu messen, werden die Proteine aus der Zellkultur gewonnen und gereinigt, indem die BMP-11-Proteine von anderen proteinhaltigen Materialien, mit denen zusammen sie produziert werden, und von anderen Kontaminationen isoliert werden. Das gereinigte Protein kann gemäß den in den Beispielen 5 bis 8 nachstehend beschriebenen BMP-11-Aktivitätsassays getestet werden.

BEISPIEL 5

W-20 BIOASSAYS

A. Beschreibung von W-20-Zellen

[0098] Die Verwendung von W-20 Knochenmarkstromazellen als eine Indikatorzelllinie basiert auf der Überführung dieser Zellen zu Osteoblast-ähnlichen Zellen nach Behandlung mit einem BMP-Protein [Thies et al., Journal of Bone and Mineral Research 5: 305 (1990); und Thies et al., Endocrinology 130: 1318 (1992)]. In genaueren Worten sind W-20-Zellen eine klonierte Knochenmarkstromazelllinie, die von Forschern im Labor von Dr. D. Nathan, Children's Hospital, Boston, MA, von erwachsenen Mäusen abgeleitet wurde. Eine Behandlung von W-20-Zellen mit bestimmten BMP-Proteinen führt zu (1) erhöhter Produktion von alkalischer Phosphatase, (2) Induktion von PTH-stimuliertem cAMP, und (3) Induktion der Osteocalcinsynthese durch die Zellen. Während (1) und (2) Charakteristika darstellen, die mit dem Osteoblast-Phänotyp assoziiert sind, ist die Fähigkeit, Osteocalcin zu synthetisieren eine phänotypische Eigenschaft, die nur reife Osteoblasten aufweisen. Weiterhin haben wir bisher eine Überführung von W-20-Stromazellen zu Osteoblast-ähnlichen Zellen nur nach Behandlung mit BMP beobachtet. Auf diese Weise korrelieren die in vitro Aktivitäten, welche von BMP-behandelten W-20-Zellen gezeigt werden, mit der für BMP bekannten in vivo Knochenbildungsaktivität.

[0099] Nachfolgend werden zwei in vitro Assays beschrieben, die nützlich sind für den Vergleich von BMP-Aktivitäten von neuen Knochen-induzierenden Molekülen.

B. W-20-alkalische Phosphatase-Assay Protokoll

[0100] W-20-Zellen werden in Gewebekulturplatten mit 96 Vertiefungen plattiert, in einer Dichte von 10.000 Zellen pro Vertiefung, in 200 µl Medium (DME mit 10 wärmeinaktiviertem fötalen Kälberserum, 2 mM Glutamin und 100 Einheiten/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin). Die Zellen werden in einer Inkubationsvorrichtung in 95% Luft, 5% CO₂, bei 37°C über Nacht anhaften gelassen.

[0101] Die 200 µl Medium werden mit einer Mehrkanalpipette aus jeder Vertiefung entfernt und durch ein gleiches Volumen Testprobe in DME mit 10% wärmeinaktiviertem fötalen Kälberserum, 2 mM Glutamin und 1% Penicillin-Streptomycin ersetzt. Testsubstanzen werden in drei Ansätzen getestet.

[0102] Die Testproben und Standards werden während eines Zeitraums von 24 Stunden mit den W-20-Indikatorzellen inkubieren gelassen. Nach den 24 Stunden werden die Platten aus der 37°C Inkubationsvorrichtung entfernt und die Testmedien werden von den Zellen entfernt.

[0103] Die W-20-Zellschichten werden dreimal mit 200 µl Calcium/Magnesium-freier Phosphat-gepufferter Salzlösung pro Vertiefung gewaschen und diese Waschlösungen werden verworfen.

[0104] 50 µl Glas-destilliertes Wasser werden zu jeder Vertiefung zugegeben und die Assayplatten werden danach zum raschen Gefrieren auf ein Trockeneis/Ethanolbad gegeben. Sobald sie gefroren sind werden die Assayplatten von dem Trockeneis/Ethanolbad entfernt und bei 37°C aufgetaut. Dieser Schritt wird zwei weitere Male wiederholt, für insgesamt 3 Gefrier-Auftau-Vorgänge. Nach Vollendung ist die membrangebundene alkalische Phosphatase zur Messung verfügbar.

[0105] 50 µl Assaygemisch (50 mM Glycin, 0.05% Triton® X-100, 4 mM MgCl₂, 5 mM p-Nitrophenolphosphat, pH = 10,3) werden zu jeder Assayvertiefung zugegeben und die Assayplatten werden danach 30 Minuten bei 37°C in einem Schüttelwasserbad bei 60 Schwingungen pro Minute inkubiert.

[0106] Am Ende der 30-minütigen Inkubation wird die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 0,2 N NaOH zu jeder Vertiefung, und Stellen der Platten auf Eis gestoppt.

[0107] Die spektrophotometrische Absorption für jede Vertiefung wird bei einer Wellenlänge von 405 Nanometern ausgelesen. Diese Werte werden danach mit bekannten Standards verglichen, um eine Abschätzung der Aktivität von alkalischer Phosphatase in jeder Probe zu erhalten. Beispielsweise wird unter Verwendung bekannter Mengen an p-Nitrophenolphosphat eine Standardkurve für Absorptionswerte erstellt.

[0108] Die Absorptionswerte für bekannte Mengen von BMP werden bestimmt und auf pro Zeiteinheit gespartene µMol p-Nitrophenolphosphat umgerechnet.

[0109] Diese Werte werden danach verwendet um die Aktivitäten von bekannten Mengen von BMP-11 mit BMP-2 zu vergleichen.

C. Osteocalcin-RIA Protokoll

[0110] W-20-Zellen werden in einer Konzentration von 10^6 Zellen pro Vertiefung in Gewebekulturschalen mit 24 Vertiefungen plattiert, in 2 ml DME, enthaltend 10 wärmeinaktiviertes fötales Kälberserum, 2 mM Glutamin. Die Zellen werden in einer Atmosphäre von 95% Luft, 5% CO₂, bei 37°C über Nacht anhaften gelassen.

[0111] Am nächsten Tag wird das Medium geändert zu DME, enthaltend 10% fötales Kälberserum, 2 mM Glutamin und die Testsubstanz in einem Gesamtvolumen von 2 ml. Jede Testsubstanz wird drei Vertiefungen zugegeben. Die Testsubstanzen werden insgesamt 96 Stunden mit den W-20-Zellen inkubiert, mit einem Medienwechsel durch die gleichen Medien nach 48 Stunden.

[0112] Am Ende der 96 Stunden werden 50 µl Testmedium aus jeder Vertiefung entfernt und unter Verwendung eines Radioimmunoassays für Maus-Osteocalcin auf die Produktion von Osteocalcin getestet. Die Details des Assays sind in dem Kit beschrieben, der von Biomedical Technologies Inc., 378 Page Street, Stoughton, MA 02072, hergestellt wird. Reagenzien für den Assay sind zu finden als Produktnummern BT-431 (Maus-Osteocalcin-Standard), BT-432 (Ziege-anti-Maus-Osteocalcin), BT-431R (jodiertes Maus-Osteocalcin), BT-415 (normales Ziegenserum) und BT-414 (Esel-anti-Ziege-IgG). Der RIA für Osteocalcin, das von W-20-Zellen in Reaktion auf eine BMP-Behandlung synthetisiert worden ist, wird durchgeführt wie in dem vom Hersteller bereitgestellten Protokoll beschrieben.

[0113] Die für die Testproben, z. B. BMP-11, erhaltenen Werte werden mit Werten für bekannte Standards von Maus-Osteocalcin verglichen, und mit der Menge an Osteocalcin, welche von W-20-Zellen in Reaktion auf die Exposition mit bekannten Mengen an BMP-2 produziert wird. Die Werte für die BMP-2-induzierte Osteocalcinsynthese durch W-20-Zellen sind in Tabelle I gezeigt.

Tabelle I

Osteocalcinsynthese durch W-20-Zellen	
<u>BMP-2-Konzentration ng/ml</u>	<u>Osteocalcinsynthese ng/Vertiefung</u>
0	0,8
2	0,9
4	0,8
8	2,2
16	2,7
31	3,2
62	5,1
125	6,5
250	8,2
500	9,4
1000	10,0

BEISPIEL 6

Rosen-modifizierter Sampath-Reddi-Assay

[0114] Eine modifizierte Version des in Sampath und Reddi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6591–6595 (1983) beschriebenen Rattenknochen-Bildungsassays wird verwendet um die induzierende Aktivität von BMP-11-Proteinen auf Knochen, Knorpel und/oder anderes Bindegewebe zu bewerten. Dieser modifizierte Assay wird hierin als der Rosen-modifizierte Sampath-Reddi-Assay bezeichnet. Der Ethanolpräzipitationsschritt des Sampath-Reddi-Verfahrens wird durch Dialyse (wenn die Zusammensetzung eine Lösung ist) oder Diafiltration (wenn die Zusammensetzung eine Suspension ist) der gegen Wasser zu testenden Fraktion ersetzt. Die Lösung oder Suspension wird danach auf 0,1% TFA äquilibriert. Die resultierende Lösung wird zu 20 mg Rattenmatrix zugegeben. Eine nicht mit dem Protein behandelte Rattenmatrix-Scheinprobe dient als eine Kontrolle. Dieses Material wird eingefroren und lyophilisiert und das resultierende Pulver wird in #5 Gelatine kapseln eingeschlossen. Die Kapseln werden subkutan in den abdominalen Thoraxbereich von männlichen Long Evans Ratten mit einem Alter von 21–49 Tagen implantiert. Die Implantate werden nach 7–14 Tagen entfernt. Eine Hälfte jedes Implantats wird für die alkalische Phosphatase-Analyse [siehe Reddi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1601 (1972)] verwendet.

[0115] Die andere Hälfte jedes Implantats wird fixiert und für die histologische Analyse verarbeitet. 1 µm Glykolmethacrylat-Schnitte werden mit Von Kossa und saurem Fuchsin (acid fuchsin) angefärbt, um die in jedem Implantat vorhandene Menge einer induzierten Knochen- und Knorpelbildung zu bewerten. Die Begriffe +1 bis +5 stellen die Fläche jedes histologischen Schnitts eines Implantats dar, welche von neuen Knochen- und/oder Knorpelzellen und Matrix eingenommen wird. Eine Bewertung von +5 zeigt an, dass mehr als 50% des Implantats neuer Knochen und/oder Knorpel ist, produziert als eine direkte Folge von Protein im Implantat. Eine Bewertung von +4, +3, +2 bzw. +1 würde anzeigen, dass mehr als 40%, 30%, 20% bzw. 10% des Implantats neuen Knorpel und/oder Knochen enthalten.

[0116] Die BMP-11-Proteine dieser Erfindung können in diesem Assay auf Aktivität getestet werden.

BEISPIEL 7

Biologische Aktivität von exprimiertem BMP-11

[0117] Um die biologische Aktivität der vorstehend in Beispiel 3 erhaltenen exprimierten BMP-11-Proteine zu messen, werden die Proteine aus der Zellkultur gewonnen und gereinigt, indem die BMP-11-Proteine von anderen proteinhaltigen Materialien, mit denen zusammen sie produziert werden, und von anderen Kontamina-

tionen isoliert werden. Das gereinigte Protein kann gemäß dem in Beispiel 6 beschriebenen Rattenknochen-Bildungsassay getestet werden.

[0118] Die Reinigung wird unter Verwendung von Standardtechniken, die dem Fachmann bekannt sind, durchgeführt.

[0119] Die Proteinanalyse wird unter Verwendung von Standardtechniken durchgeführt, wie etwa SDS-PAGE Acrylamid [Laemmli, Nature 227: 680 (1970)], Anfärbung mit Silber [Oakley et al., Anal. Biochem. 105: 361 (1980)] und durch Immunblot [Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350 (1979)].

BEISPIEL 8

Tests zur Bestimmung der Activin-Aktivität von BMP-11

[0120] Die Reinigung wird unter Verwendung von Standardtechniken, die dem Fachmann bekannt sind, durchgeführt. Es wird erwartet, dass die Reinigung wie bei anderen Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie die Verwendung von Heparinsepharose umfassen kann.

[0121] Die Proteinanalyse wird unter Verwendung von Standardtechniken durchgeführt, wie etwa SDS-PAGE Acrylamid [Laemmli, Nature 227: 680 (1970)], Anfärbung mit Silber [Oakley et al., Anal. Biochem. 105: 361 (1980)] und durch Immunblot [Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350 (1979)].

[0122] BMP-11-Proteine können weiter gekennzeichnet sein durch ihre Fähigkeit, die Freisetzung von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) in etablierten in vitro Bioassays unter Verwendung von Rattenzellen der vorderen Hypophyse zu stimulieren, wie beispielsweise beschrieben in Vale et al., Endocrinology 91: 562–572 (1972); Ling et al., Nature 321: 779–782 (1986); oder Vale et al., Nature 321: 776–779 (1986), deren Offenbarungen durch Bezugnahme hierin aufgenommen sind.

[0123] Alternativ kann BMP-11 gekennzeichnet sein durch seine Fähigkeit, die Erythropoetin-Aktivität in der humanen K-562 Zelllinie zu stimulieren, wie von Luzzio et al., Blood 45: 321–334 (1975) und in US Patent Nr. 5,071,834 in Spalte 15 beschrieben, deren Offenbarungen durch Bezugnahme hierin aufgenommen sind.

[0124] Zusätzlich kann BMP-11 gekennzeichnet sein durch seine Aktivität in Assays bezüglich des Überlebens von Zellen, wie von Schubert, Nature 344: 868–870 (1990) beschrieben, dessen Offenbarung durch Bezugnahme hierin aufgenommen ist.

BEISPIEL 9

Verwendung von BMP-11 als ein neuronaler Differenzierungs- und Wachstumsfaktor

[0125] BMP-11 kann verwendet werden, um alle Aspekte der Nervenzellentwicklung, insbesondere die Bildung, das Wachstum, die Differenzierung und Proliferation von Nerven zu modulieren.

[0126] Das Überleben von primären Neuronen oder Nervenzelllinien in Kultur, wie etwa einer Nervenzelllinie PC12, wird häufig als ein in vitro Assay für die Identifizierung von neurotrophen Faktoren verwendet. PC12-Zellen sind von einem Nebennierenphäochromozytomtumor aus Ratte abgeleitet, und werden oftmals verwendet, um periphere sympathische Nerven in Kultur zu modellieren. BMP-11 fördert das Überleben von PC-12-Zellen unter serumfreien Bedingungen.

[0127] PC12-Zellen werden subkonfluent in Platten mit 96 Vertiefungen plattiert, 24 h mit 10% fötalem Kälberserum, danach auf ein serumfreies Medium gewechselt, mit oder ohne 200 ng/ml BMP-11, und 3–6 Tage kultiviert. Das Überleben von Zellen wird abgeschätzt durch die Zugabe von "CellTiter 96 Aqueous One Solution", einem auf MTS basierenden Produkt der Promega Corporation, zu den behandelten PC12-Zellen während der letzten 3 h am letzten Behandlungstag. MTS wird durch zelluläres NADH und NADPH aus lebenden Zellen zu einem gefärbten Formazanprodukt reduziert. Das Formazanprodukt wird spektrophotometrisch mittels Absorption bei 490 nm unter Verwendung einer Standardmikroplattenlesevorrichtung gemessen. Wie nachstehend in Tabelle II gezeigt, fördert BMP-11 das Überleben von PC12-Zellen.

Tabelle II
MTS Reduktion (Abs⁴⁹⁰)

Experiment	Tage Behandlung	MTS Reduktion (Abs ⁴⁹⁰)	
		Kontrolle	200 ng/ml BMP-11
1	3	0,543 ± 0,022	0,828 ± 0,049
2	4	0,143 ± 0,012	0,276 ± 0,021
3	6	0,039 ± 0,006	0,196 ± 0,019

(Werte sind Mittelwerte von replizierten Proben ± Standardabweichung)

[0128] Zusätzlich zu ihrer Verwendung, um Faktoren für die Erhaltung/das Überleben von Nerven zu charakterisieren, wurden PC12-Zellen auch verwendet, um neuronale Differenzierungsfaktoren zu identifizieren, auf Basis von morphologischen Veränderungen in den Zellen. Bei Kultivierung unter serumfreien Bedingungen haben unbehandelte PC12-Zellen ein rundliches Aussehen, während PC12-Zellen, die mit Nervenwachstumsfaktor (NGF) behandelt worden sind, die Bildung von neuronalen Fortsätzen oder Neuriten zeigen. Somit werden PC12-Zellen in einem anderen Assay 3 Tage lang mit BMP-11 behandelt, was eine Bildung von Neuriten zur Folge hat, wie mittels Phasenkontrastmikroskopie nachgewiesen. BMP-11 induziert somit die neuronale Differenzierung. Weiterhin steigert BMP-11, wenn PC12-Zellen 2 Tage lang zusammen mit BMP-11 und NGF behandelt werden, die durch NGF induzierte Bildung von Neuriten synergistisch.

[0129] BMP-11 stimuliert auch die Proliferation von PC12-Zellen. Unter serumfreien Bedingungen werden PC12-Zellen subkonfluent in Platten mit 96 Vertiefungen plattiert, 24 h mit 10% fötalem Kälberserum, danach auf ein serumfreies, [³H]Thymidin enthaltendes Medium gewechselt, mit oder ohne BMP-11 während 24 Stunden. [³H]Thymidin, das in DNA eingebaut wurde, wird von nicht eingebautem [³H]Thymidin mittels Ethanolpräzipitation abgetrennt und mittels Flüssigkeits-Szintillationszählung quantifiziert, als ein Indikator der Zellproliferation. Wie nachstehend in Tabelle III gezeigt, stimuliert BMP-11 den Einbau von [³H]Thymidin in einer Dosis-Wirkung-Beziehung.

Tabelle III
Einbau von [³H]Thymidin (cpm)

Kontrolle	10193 ± 1458
1 ng/ml BMP-11	12169 ± 1449
10 ng/ml BMP-11	16129 ± 2134*
100 ng/ml BMP-11	18830 ± 2473*
1000 ng/ml BMP-11	19802 ± 2748*

n = 7, ± Standardabweichung

*P < 0,05

[0130] Um die neuronalen Aktivitäten von BMP-11 weiter zu charakterisieren, wird BMP-11 in vivo verabreicht, in Tiermodellen für periphere Neuropathie (Eliasson, "Nerve Conduction Changes in Experimental Diabetes", J. Clin. Invest. 43: 2353–2358 (1964)), ZNS Neurodegeneration (Mitsumoto und Bradley, "Murine Motor Neuron Disease (the Wobbler Mouse). Degeneration and Regeneration of the Lower Motor Neuron", Brain 105: 811–834 (1982)) (Steiner et al., "Neurotrophic Immunophilin Ligands Stimulate Structural and Functional Recovery in Neurodegenerative Animal Models", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 2019–2024 (1997)), periphere Denervierung (Eriksson et al., "BDNF and NT-3 Rescue Sensory But Not Motor Neurons Following Axotomy in the Neonate", Neuroreport 5: 1445–1448 (1994)), und Rückenmarkdenervierung (Oudega und Hagg, "Nerve Growth Factor Promotes Regeneration of Sensory Axons into Adult Rat Spinal Cord", Exp. Neurol. 140: 218–229 (1996)).

[0131] Die erfindungsgemäßen BMP-11-Proteine induzieren die Bildung von Nervenzellen und schützen, heilen und reparieren Nervengewebe in diesen Erkrankungen.

[0132] Die vorstehenden Beschreibungen geben detailliert derzeitig bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung an. Es wird erwartet, dass in der Praxis davon dem Fachmann nach Erwägung dieser Beschreibungen zahlreiche Modifikationen und Variationen einfallen werden. Es wird angenommen, dass diese Modifikationen und Variationen von den hierzu beigefügten Ansprüchen umfasst sind.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER: WOZNEY, John
CELESTE, Anthony, J.
THIES, R. Scott
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: BMP-11-ZUSAMMENSETZUNGEN
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 11
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
 - (A) ADRESSAT: GENETICS INSTITUTE. INC.
 - (B) STRASSE: 87 CambridgePark Drive
 - (C) ORT: Cambridge
 - (D) BUNDESLAND: MA
 - (E) LAND: USA
 - (F) POSTLEITZAHL: 02140
- (v) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
 - (A) DATENTRÄGER: Diskette
 - (B) COMPUTER: IBM PC kompatibel
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC DOS/MS DOS
 - (D) PROGRAMM: PatentIn Release #1.0, Version #1.25
- (vi) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:
 - (A) ANMELDENUMMER:
 - (B) ANMELDETAG:
 - (C) KLASSIFIKATION:
- (viii) ANGABEN ZU ANWALT/AGENT:
 - (A) NAME: LAZAR, Steven R.
 - (B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 32,618
 - (C) REFERENZ/VERZEICHNIS NUMMER: GI5205B-PCT
- (ix) ANGABEN ZU TELEKOMMUNIKATION:
 - (A) TELEFON: 617 498-8260
 - (B) TELEFAX: 617 876-5851

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 789 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Doppelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
- (vi) ORIGINALQUELLE:
 - (A) ORGANISMUS: Bos Taurus
 - (B) STAMM: Rind-Activin WC
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LOKALISIERUNG: 324...704
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: diverses Merkmal
 - (B) LOKALISIERUNG: 322...323
 - (D) ANDERE ANGABEN: /Bemerkung= "mutmaßliches 3'-Ende von Intron"
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: reifes Peptid
 - (B) LOKALISIERUNG: 375...701

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```

AAACTGTATT TTGGGGTGAA GGTGTGAGTT AATAGATTCA CGGGACAACA AAGATGGGCT      60
GTTGTTGAGA CCTTGGGCCA AGGGGCTGAT GAGGGTCAGG TTGCCAAGAG AGAGAGAATT      120
AGGGAAGGTG AGTTTAGGGA GACATGGCTA GCTGGCAAGA AAAGTGGGTA GAAAACAGGG      180
GTTGGGGAGG GGAGCACTGG AGAAGCTCAG AAATCACTTG GTCTCTGTTC TCCTGCCCCCT      240
ACTGAGGGGC AGGTGAGAAG AAACAGGGAG TAGGAGCTCC TCGAGGCTCT ATTACATCTC      300
TTTCTCCTCT CCCTCACCCC CAG CAT CCT TTT ATG GAG CTT CGA GTC CTA      350
                His Pro Phe Met Glu Leu Arg Val Leu
                -17   -15                   -10

GAG AAC ACA AAA CGG TCC CGG CGG AAC CTG GGC CTG GAC TGC GAT GAA      398
Glu Asn Thr Lys Arg Ser Arg Arg Asn Leu Gly Leu Asp Cys Asp Glu
                -5                   1                   5

CAT TCA AGT GAG TCC CGC TGT TGC CGC TAC CCC CTC ACT GTG GAC TTT      446
His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe
                10                   15                   20

GAG GCT TTT GGC TGG GAC TGG ATC ATC GCT CCT AAA CGC TAC AAG GCC      494
Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala
                25                   30                   35                   40

AAC TAC TGC TCC GGC CAG TGC GAG TAC ATG TTT ATG CAA AAG TAT CCG      542
Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu Tyr Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro
                45                   50                   55

CAC ACC CAC TTG GTG CAA CAG GCT AAC CCA AGA GGC TCT GCG GGG CCC      590
His Thr His Leu Val Gln Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro
                60                   65                   70

TGC TGC ACA CCC ACC AAG ATG TCC CCA ATC AAC ATG CTC TAC TTC AAT      638
Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn
                75                   80                   85

GAC AAG CAG CAG ATT ATC TAC GGC AAG ATC CCT GGC ATG GTG GTG GAT      686
Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Gly Met Val Val Asp
                90                   95                   100

CGC TGT GGC TGC TCC TAAGGTGGGG GACAGCGGAT GCCTCCCCAA CAGACCCTGC      741
Arg Cys Gly Cys Ser
105                   110

CCCTAGACTC CCCCAGCCCT GACCCCCTGC TCCCCGGCCC TAGAGCTC      789

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 126 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```

His Pro Phe Met Glu Leu Arg Val Leu Glu Asn Thr Lys Arg Ser Arg
-17      -15              -10              -5

Arg Asn Leu Gly Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys
  1              5              10              15

Cys Arg Tyr Pro Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp
              20              25              30

Ile Ile Ala Pro Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys
              35              40              45

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

Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met
              65              70              75

Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr
  80              85              90              95

Gly Lys Ile Pro Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
              100              105

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 213 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(vi) ORIGINALQUELLE:

- (A) ORGANISMUS: Homo Sapiens
- (B) STAMM: Human-Activin WC

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LOKALISIERUNG: 28...183

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: diverses Merkmal
- (B) LOKALISIERUNG: 184...185
- (D) ANDERE ANGABEN: /Bemerkung= "zwei Drittel eines Codons
am Ende von Partialklon"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

```

TCTAGATGCT CCGGCCAGTG CGAGTAC ATG TTC ATG CAA AAA TAT CCG CAT      51
                Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro His
                  1                      5

ACC CAT TTG GTG CAG CAG GCC AAT CCA AGA GGC TCT GCT GGG CCC TGT      99
Thr His Leu Val Gln Gln Ala Asn Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys
    10                      15                      20

TGT ACC CCC ACC AAG ATG TCC CCA ATC AAC ATG CTC TAC TTC AAT GAC      147
Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp
    25                      30                      35                      40

AAG CAG CAG ATT ATC TAC GGC AAG ATC CCT GGC ATG GTGGTGGATC      193
Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro Gly Met
                45                      50

GCTGTGGCTG CTCCGGATCC      213

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 52 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

```

Met Phe Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala Asn
  1                      5                      10                      15

Pro Arg Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro
                20                      25                      30

Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Lys
    35                      40                      45

Ile Pro Gly Met
    50

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(vi) ORIGINALQUELLE:

(A) ORGANISMUS: Primer C für Rind-Activin WC

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: diverses Merkmal

(B) LOKALISIERUNG: 1...9

(D) ANDERE ANGABEN: /Bemerkung= "Restriktionsstelle für XbaI"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TAGTCTAGAT GCTCCGGCCA GTGCGAGTAC

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(vi) ORIGINALQUELLE:

(A) ORGANISMUS: Primer D für Rind-Activin WC

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: diverses Merkmal

(B) LOKALISIERUNG: 1...9

(D) ANDERE ANGABEN: /Bemerkung= "Restriktionsstelle für BamHI"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

TGCGGATCCG GAGCAGCCAC AGCGATCCAC

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 15 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
- (vi) ORIGINALQUELLE:
 - (A) ORGANISMUS: DNA, insertiert in pMT2 CXM
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CATGGGCAGC TCGAG

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)
- (vi) ORIGINALQUELLE:
 - (A) ORGANISMUS: DNA, insertiert in pMT21
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: diverses Merkmal
 - (B) LOKALISIERUNG: 1...6
 - (D) ANDERE ANGABEN: /Bemerkung= "PstI-Restriktionsstelle"
- (ix) MERKMAL:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: diverses Merkmal
 - (B) LOKALISIERUNG: 15...26
 - (D) ANDERE ANGABEN: /Bemerkung= "EcoRI-und XhoI-Restriktionsstellen"
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

CTGCAGGCGA GCCTGAATTC CTCGAGCCAT CATG

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 68 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(vi) ORIGINALQUELLE:

(A) ORGANISMUS: Abschnitt der EMC-Virus Leadersequenz

(x) ANGABEN ZU VERÖFFENTLICHUNG:

(A) AUTOREN: Jung, S. K.

(C) ZEITSCHRIFT: J. Virol.

(D) NUMMER: 63

(F) SEITEN: 1651-1660

(G) DATUM: 1989

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

CGAGGTAA AAACGTCTAG GCCCCCCGAA CCACGGGGAC GTGGTTTCC TTTGAAAAAC 60
ACGATTGC 68

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 1270 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: DNA (genomisch)

(vi) ORIGINALQUELLE:

(A) ORGANISMUS: Humanes BMP-11

(vii) UNMITTELBARE QUELLE:

(B) KLON: FB30.5

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LOKALISIERUNG: 1...1086

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: reifes Peptid

(B) LOKALISIERUNG: 760...1086

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

GAG CGC TCC AGC CGG CCA GCC CCG TCC GTG GCG CCC GAG CCG GAC GGC Glu Arg Ser Ser Arg Pro Ala Pro Ser Val Ala Pro Glu Pro Asp Gly -253 -250 -245 -240	48
TGC CCC GTG TGC GTT TGG CGG CAG CAC AGC CGC GAG CTG CGC CTA GAG Cys Pro Val Cys Val Trp Arg Gln His Ser Arg Glu Leu Arg Leu Glu -235 -230 -225	96
AGC ATC AAG TCG CAG ATC TTG AGC AAA CTG CGG CTC AAG GAG GCG CCC Ser Ile Lys Ser Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Lys Glu Ala Pro -220 -215 -210	144
AAC ATC AGC CGC GAG GTG GTG AAG CAG CTG CTG CCC AAG GCG CCG CCG Asn Ile Ser Arg Glu Val Val Lys Gln Leu Pro Lys Ala Pro Pro -205 -200 -195 -190	192
CTG CAG CAG ATC CTG GAC CTA CAC GAC TTC CAG GGC GAC GCG CTG CAG Leu Gln Gln Ile Leu Asp Leu His Asp Phe Gln Gly Asp Ala Leu Gln -185 -180 -175	240
CCC GAG GAC TTC CTG GAG GAG GAC GAG TAC CAC GCC ACC ACC GAG ACC Pro Glu Asp Phe Leu Glu Glu Asp Glu Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr -170 -165 -160	288
GTC ATT AGC ATG GCC CAG GAG ACG GAC CCA GCA GTA CAG ACA GAT GGC Val Ile Ser Met Ala Gln Glu Thr Asp Pro Ala Val Gln Thr Asp Gly -155 -150 -145	336
AGC CCT CTC TGC TGC CAT TTT CAC TTC AGC CCC AAG GTG ATG TTC ACA Ser Pro Leu Cys Cys His Phe His Phe Ser Pro Lys Val Met Phe Thr -140 -135 -130	384
AAG GTA CTG AAG GCC CAG CTG TGG GTG TAC CTA CGG CCT GTA CCC CGC Lys Val Leu Lys Ala Gln Leu Trp Val Tyr Leu Arg Pro Val Pro Arg -125 -120 -115 -110	432
CCA GCC ACA GTC TAC CTG CAG ATC TTG CGA CTA AAA CCC CTA ACT GGG Pro Ala Thr Val Tyr Leu Gln Ile Leu Arg Leu Lys Pro Leu Thr Gly -105 -100 -95	480
GAA GGG ACC GCA GGG GGA GGG GGC GGA GGC CGG CGT CAC ATC CGT ATC Glu Gly Thr Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Arg His Ile Arg Ile -90 -85 -80	528
CGC TCA CTG AAG ATT GAG CTG CAC TCA CGC TCA GGC CAT TGG CAG AGC Arg Ser Leu Lys Ile Glu Leu His Ser Arg Ser Gly His Trp Gln Ser -75 -70 -65	576
ATC GAC TTC AAG CAA GTG CTA CAC AGC TGG TTC CGC CAG CCA CAG AGC Ile Asp Phe Lys Gln Val Leu His Ser Trp Phe Arg Gln Pro Gln Ser -60 -55 -50	624
AAC TGG GGC ATC GAG ATC AAC GCC TTT GAT CCC AGT GGC ACA GAC CTG Asn Trp Gly Ile Glu Ile Asn Ala Phe Asp Pro Ser Gly Thr Asp Leu -45 -40 -35 -30	672
GCT GTC ACC TCC CTG GGG CCG GGA GCC GAG GGG CTG CAT CCA TTC ATG Ala Val Thr Ser Leu Gly Pro Gly Ala Glu Gly Leu His Pro Phe Met -25 -20 -15	720
GAG CTT CGA GTC CTA GAG AAC ACA AAA CGT TCC CGG CGG AAC CTG GGT Glu Leu Arg Val Leu Glu Asn Thr Lys Arg Ser Arg Arg Asn Leu Gly -10 -5 1	768

CTG GAC TGC GAC GAG CAC TCA AGC GAG TCC CGC TGC TGC CGA TAT CCC Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro 5 10 15	816
CTC ACA GTG GAC TTT GAG GCT TTC GGC TGG GAC TGG ATC ATC GCA CCT Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro 20 25 30 35	864
AAG CGC TAC AAG GCC AAC TAC TGC TCC GGC CAG TGC GAG TAC ATG TTC Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu Tyr Met Phe 40 45 50	912
ATG CAA AAA TAT CCG CAT ACC CAT TTG GTG CAG CAG GCC AAT CCA AGA Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala Asn Pro Arg 55 60 65	960
GGC TCT GCT GGG CCC TGT TGT ACC CCC ACC AAG ATG TCC CCA ATC AAC Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn 70 75 80	1008
ATG CTC TAC TTC AAT GAC AAG CAG CAG ATT ATC TAC GGC AAG ATC CCT Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro 85 90 95	1056
GGC ATG GTG GTG GAT CGC TGT GGC TGC TCT TAAGGTGGGG GATAGAGGAT Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser 100 105	1106
GCCTCCCCCA CAGACCCTAC CCCAAGACCC CTAGCCCTGC CCCCATCCCC CCAAGCCCTA	1166
GAGCTCCCTC CACTCTTCCC GCGAACATCA CACCGTTCCC CGACCAAGCC GTGTGCAATA	1226
CAACAGAGGG AGGCAGGTGG GAATTGAGGG TGAGGGGTTT GGGG	1270

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 362 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Glu Arg Ser Ser Arg Pro Ala Pro Ser Val Ala Pro Glu Pro Asp Gly -253 -250 -245 -240	
Cys Pro Val Cys Val Trp Arg Gln His Ser Arg Glu Leu Arg Leu Glu -235 -230 -225	
Ser Ile Lys Ser Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Lys Glu Ala Pro -220 -215 -210	
Asn Ile Ser Arg Glu Val Val Lys Gln Leu Leu Pro Lys Ala Pro Pro -205 -200 -195 -190	
Leu Gln Gln Ile Leu Asp Leu His Asp Phe Gln Gly Asp Ala Leu Gln -185 -180 -175	

```

Pro Glu Asp Phe Leu Glu Glu Asp Glu Tyr His Ala Thr Thr Glu Thr
-170                                -165                                -160

Val Ile Ser Met Ala Gln Glu Thr Asp Pro Ala Val Gln Thr Asp Gly
-155                                -150                                -145

Ser Pro Leu Cys Cys His Phe His Phe Ser Pro Lys Val Met Phe Thr
-140                                -135                                -130

Lys Val Leu Lys Ala Gln Leu Trp Val Tyr Leu Arg Pro Val Pro Arg
-125                                -120                                -115                                -110

Pro Ala Thr Val Tyr Leu Gln Ile Leu Arg Leu Lys Pro Leu Thr Gly
-105                                -100                                -95

Glu Gly Thr Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Arg Arg His Ile Arg Ile
-90                                -85                                -80

Arg Ser Leu Lys Ile Glu Leu His Ser Arg Ser Gly His Trp Gln Ser
-75                                -70                                -65

Ile Asp Phe Lys Gln Val Leu His Ser Trp Phe Arg Gln Pro Gln Ser
-60                                -55                                -50

Asn Trp Gly Ile Glu Ile Asn Ala Phe Asp Pro Ser Gly Thr Asp Leu
-45                                -40                                -35                                -30

Ala Val Thr Ser Leu Gly Pro Gly Ala Glu Gly Leu His Pro Phe Met
-25                                -20                                -15

Glu Leu Arg Val Leu Glu Asn Thr Lys Arg Ser Arg Arg Asn Leu Gly
-10                                -5                                1

Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Ser Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro
5                                10                                15

Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro
20                                25                                30                                35

Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Gln Cys Glu Tyr Met Phe
40                                45                                50

Met Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val Gln Gln Ala Asn Pro Arg
55                                60                                65

Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn
70                                75                                80

Met Leu Tyr Phe Asn Asp Lys Gln Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro
85                                90                                95

Gly Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
100                                105

```

Patentansprüche

1. Verfahren zum Induzieren von Nervenzellentwicklung, umfassend den Schritt, Nervenzellen in vitro gereinigtes BMP-11 Polypeptid zu verabreichen, wobei das BMP-11 Polypeptid eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 11 umfasst.

2. Verfahren zum Induzieren von Bildung, Wachstum, Differenzierung oder/und Proliferation von Nervenzellen, umfassend den Schritt, neuronalen Zellen in vitro ein BMP-11 Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 11, zu verabreichen.

3. Verfahren zum Induzieren von Nervengewebebildung, umfassend den Schritt, Nervenzellen in vitro eine Zusammensetzung, umfassend ein BMP-11 Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 11, zu verabreichen.

4. Verfahren nach Anspruch 3, umfassend den weiteren Schritt, das Gewebe zu gewinnen.

5. Verwendung eines BMP-11 Polypeptids, umfassend eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO: 11, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Induzierung von Nervenzellentwicklung.

6. Verwendung nach Anspruch 5 zur Induzierung von Bildung, Wachstum, Differenzierung oder/und Proliferation von Nervenzellen.

7. Verwendung nach Anspruch 5 zur Induzierung von Nervengewebebildung.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen