



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 23 429 T3 2007.09.20

(12) Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift

(97) EP 0 894 004 B2

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 23 429.0

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US97/04177

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 917 532.0

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1997/034626

(86) PCT-Anmeldetag: 21.03.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 25.09.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 03.02.1999

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: 09.07.2003

(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: 21.02.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 20.09.2007

(51) Int Cl.⁸: A61K 38/18 (2006.01)

A61K 7/06 (2000.01)

(30) Unionspriorität:

620444 22.03.1996 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Curis, Inc., Cambridge, Mass., US; The General
Hospital Corp., Boston, Mass., US

(72) Erfinder:

CHARETTE, F., Marc, Needham, US;
FINKLESTEIN, P., Seth, Needham, US

(74) Vertreter:

Patentanwälte Wallach, Koch & Partner, 80339
München

(54) Bezeichnung: Verfahren zur verbesserten funktionellen Erholung der motorischen Koordination, der Sprache
oder Sinneswahrnehmung nach Trauma oder Ischämie des ZNS

Beschreibung**Gebiet der Erfindung**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft im allgemeinen Verfahren und Zusammensetzungen zur Behandlung von Säugetieren, einschließlich Menschen, im Anschluss an eine ischämische Verletzung des Zentralnervensystems.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Nunmehr wurden zahlreiche Proteine als morphogenetische oder Wachstumsfaktoren identifiziert und charakterisiert, die die Zellproliferation und/oder -differentiation von Geweben in Vertebraten einschließlich von Säugetieren, regulieren. Typischerweise üben diese Wachstumsfaktoren ihre Wirkungen auf spezielle Untergruppen von Zellen und/oder Geweben aus. Somit wurden beispielsweise epidermale Wachstumsfaktoren, Nervenwachstumsfaktoren, Fibroblastenwachstumsfaktoren, verschiedene Hormone und viele andere Proteine, die die Zellproliferation oder -differenzierung induzieren oder hemmen, identifiziert, und es wurde angezeigt, dass diese einige Untergruppen von Zellen oder Geweben beeinflussen.

[0003] Neurotrophe Faktoren sind Polypeptide, die für die Entwicklung des Nervensystems erforderlich sind. Es ist nunmehr bekannt, dass der erste entdeckte neurotrophe Faktor, der Nervenwachstumsfaktor (Nerve Growth Factor = NGF), Teil einer großen Familie von Wachstumsfaktoren ist, die ebenfalls BDNF, NT3 und NT4/NT5 einschließen. Die in der PCT-Offenlegung Nr. WO 94/03200 als Morphogene definierten dimeren Proteine stellen eine weitere Familie von Proteinen dar, von denen angenommen wird, dass sie eine bedeutende Rolle in der Nervenentwicklung spielen (Jones et al. (1991), Development 111: 531-542; Ozkaynak et al. (1992), J. Biol. Chem. 267: 25220-25227; Lein et al. (1995), Neuron 15: 597-605).

[0004] Diese Proteine, die hierin als "morphogene bzw. morphogenetische Proteine" oder "Morphogene" bezeichnet werden, sind dazu in der Lage, als echte Gewebsmorphogene zu dienen und sind dazu in der Lage, von sich aus die Proliferation und Differentiation von Vorläuferzellen zu funktionellem Säugetierkörpergewebe zu induzieren. Die Proteine schließen Mitglieder der Familie der Knochen-morphogenetischen Proteine (Bone Morphogenetic Proteins = BMPs) ein, die ursprünglich durch ihre Fähigkeit identifiziert wurden, eine ektopische Ersatzknochen-Morphogenese zu induzieren.

[0005] Die Morphogene werden im Allgemeinen in der Technik als eine Untergruppe der TGF- β -Superfamilie der Wachstumsfaktoren klassifiziert (Hogan (1996), Genes & Development 10, 1580-1594). Mitglieder der Morphogenfamilie von Proteinen schließen das osteogenetische Säugetierprotein-1 (Mammalian Osteogenic Protein-1 = OP-1, ebenfalls als BMP-7 bekannt, und das Drosophila-Homolog 60A), osteogenetisches Protein-2 (OP-2, ebenfalls als BMP-8 bekannt), osteogenetisches Protein-3 (OP-3, BMP-2 (ebenfalls als BMP-2A oder CBMP-2A bekannt, und das Drosophila-Homolog DPP), BMP-3, BMP-4 (ebenfalls als BMP-2B oder CBMP-2B bekannt), BMP-5, BMP-6 und dessen murines Homolog Vgr-1, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12; GDF-3 (ebenfalls als Vgr2 bekannt), GDF-8, GDF-9, GDF-10, GDF-11, GDF-12, BMP-13, BMP-14, BMP-15, GDF-5 (ebenfalls als CDMP-1 oder MP52 bekannt), GDF-6 (ebenfalls als CDMP-2 bekannt), GDF-7 (ebenfalls als CDMP-3 bekannt), das Xenopus-Homolog Vgl und NODAL, UNIVIN, SCREW, ADMP und NEURAL ein. Die Mitglieder dieser Familie codieren getrennte Polypeptid-Ketten, die gemeinsame strukturelle Merkmale teilen, einschließlich der Prozessierung aus einer Vorläufer- "Proform" zur Gewinnung einer reifen Polypeptid-Kette, die dazu in der Lage ist, zu dimerisieren, und die eine Carboxy-terminale aktive Domäne von ungefähr 97 bis 106 Aminosäuren aufweist. Alle Elemente teilen ein konserviertes Muster von Cysteinen in dieser Domäne und die aktive Form dieser Proteine kann entweder ein Disulfid-verbrücktes Homodimer eines einzigen Familienmitglieds sein oder ein Heterodimer aus zwei unterschiedlichen Mitgliedern (siehe beispielsweise Massague (1990), Annu. Rev. Cell Biol. 6: 597; Sampath et al. (1990), J. Biol. Chem. 265: 13198). Siehe ebenso US 5 011 691; US 5 266 683, Ozkaynak et al. (1990), EMBO J. 9: 2085-2093, Wharton et al. (1991), PNAS 88: 9214-9218, (Ozkaynak (1992), J. Biol. Chem. 267: 25220-25227 und US 5 266 683); (Celeste et al. (1991), PNAS 87: 9843-9847); (Lyons et al. (1989), PNAS 86: 4554-4558). Diese Offenbarungen beschreiben Aminosäure und DNA-Sequenzen ebenso wie die chemischen und physikalischen Eigenschaften dieser morphogenetischen Proteine. Siehe auch Wozney et al. (1988), Science 242: 1528-1534; BMP-9 (WO 93/00432, offen gelegt am 07. Januar 1993); DPP (Padgett et al. (1987), Nature 325: 81-84; und Vg-1 (Weeks (1987), Cell 51: 861-867). Morphogene werden natürlich in einer Vielzahl von Geweben während der Entwicklung exprimiert, einschließlich solcher des sich entwickelnden Nervensystems (Ozkaynak et al. (1990), EMBO J. 9: 2085-2093; Ozkaynak et al. (1991), Biochem. Biophys. Res. Commun., 179: 116-123; Ozkaynak et al. (1992), oben).

[0006] Gefäßerkrankungen des Nervensystems nehmen in der Häufigkeit unter allen neurologischen Erkrankungen den höchsten Rang ein; sie stellen ungefähr 50 % aller neurologischen Krankenhausinweisungen in Erwachsenen-Krankenhausabteilungen dar. Das Hauptmerkmal einer cerebrovaskulären Erkrankung ist der Schlaganfall, ein Begriff, der eine plötzliche und dramatische Entwicklung eines fokalen neurologischen Defizits bezeichnet. Die Verlegung einer Nährarterie, die einen Ort des Zentralnervensystems versorgt, durch beispielsweise einen Thrombus oder einen Embolus oder einen Fehler des systemischen Kreislaufs und Hypotension können, wenn diese ernsthaft und lang genug erfolgen, dem Gehirngewebe Blut und Sauerstoff entziehen, was zu einer Störung der physiologischen Funktion, anschließendem Tod von Nervenzellen und Nekrose (Infarkt) des betroffenen Ortes führt. Bei der hämorrhagischen Infarzierung tritt eine Extravasation von Blut in das Gehirngewebe, in den Subarachnoidalraum oder beides auf. Eine Schädigung ergibt sich aus einer physikalischen bzw. physischen Zerstörung des Bereichs, der direkt involviert ist und durch den Druck der Masse des Blutes auf das dieses umgebende Gewebe.

[0007] Das neurologische Defizit bei einem Schlaganfall spiegelt sowohl den Ort als auch die Größe des Infarktes oder der Blutung im Gehirn wider. Eine halbseitige Lähmung ist das klassische Anzeichen einer Gefäßerkrankung und tritt bei Schlaganfällen auf, die die Gehirnhemisphäre oder den Hirnstamm miteinbeziehen. Jedoch kann, abhängig von seiner Lokalisierung, ein Schlaganfall ebenfalls viele andere Manifestationen entstehen lassen, die eine halbseitige Lähmung begleiten oder unabhängig von dieser sind, einschließlich Taubheit, Empfindungsdefizit, Dysphasie, Blindheit, Diplopie, Schwindel und Dysarthrie.

[0008] Patienten, die unter einem „Schlaganfall“ oder einer anderen Form einer cerebralen ischämischen Verletzung leiden, erholen sich üblicherweise teilweise wieder, bleiben jedoch oftmals mild bis schwer gelähmt. Beispielsweise hat ein Totalinfarkt der mittleren Zerebralarterie in einem Menschen einer kontralaterale halbseitige Lähmung, Hemianästhesie, gleichseitige Hemianopie, globale oder totale sensorimotorische Aphasie (linke Hemisphäre) und Apraktagnosie (rechte Hemisphäre) zur Folge. Wenn sie einmal festgestellt wurden, bleiben die motorischen, sensorischen und Sprachdefizite üblicherweise statisch oder werden nach Verlauf von Monaten oder sogar Jahren nur sehr wenig verbessert. Selten können die Patienten wieder irgendwann effektiv kommunizieren. Gegenwärtig besteht, abgesehen von der physischen Therapie, keine Behandlung, die die Prognose eines Patienten, der einen Schlaganfall oder eine ähnliche Verletzung des Zentralnervensystems erlitten hat, zuverlässig verbessert.

Zusammenfassung der Erfindung

[0009] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines Morphogens zur Herstellung eines Medikamentes zur Verbesserung der Wiedergewinnung einer Funktion des Zentralnervensystems, wie sei in den beigefügten Ansprüchen definiert ist. Eine klinisch relevante Verbesserung kann sich von einer nachweisbaren Verbesserung bis hin zu einer vollständigen Wiederherstellung einer verschlechterten oder verlorenen Zentralnervensystem-Funktion bewegen.

[0010] Die Erfindung ist insbesondere bei der Behandlung von Säugetieren von Nutzen, bei denen Zentralnervensystem-Gewebe aufgrund eines Schlaganfalls oder einer ähnlichen Störung der Blutströmung geschädigt oder verloren ging. Die hierin bereitgestellten Anwendungen machen sich die Entdeckung zunutze, dass die Verabreichung eines Morphogens, beispielsweise an ein Säugetier, eine signifikante Verbesserung einer Funktion des Zentralnervensystems ergibt, sogar wenn es verabreicht wurde, nachdem das Zentralnervensystem-Gewebe geschädigt wurde. Die Verwendung schließt dimere Proteine ein, wie sie als Morphogene, Induktoren dieser Morphogene oder Agonisten der entsprechenden Morphogenrezeptoren definiert sind oder durch Implantation von Zellen, die durch Exposition gegenüber den Morphogenen stimuliert wurden.

[0011] Demgemäß umfasst die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Morphogens in der Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung eines Säugetiers, das eine Verletzung des Zentralnervensystems, wie beispielsweise einen Schlaganfall erlitten hat. Eine wirksame Dosis eines Medikamentes kann an das Säugetier zumindest sechs Stunden nach Beginn der Verletzung, beispielsweise 12, 24 oder 48 Stunden oder sogar länger, folgend dem Beginn der Verletzung, verabreicht werden.

[0012] Die Behandlungsvorschrift wird bezüglich der Verabreichungweise, dem Zeitpunkt der Verabreichung und der Dosierung durchgeführt, so dass die funktionelle Erholung von einer Verschlechterung des Zentralnervensystems verbessert wird. Die gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellten Medikamente enthalten therapeutisch wirksame Mengen des Morphogens, des Morphogeninduktors oder der Agonisten der Morphogenrezeptoren. Das heißt, die Medikamente werden eine Menge enthalten, die geeignete Konzentrationen des Mittels für das beeinträchtigte Gewebe des Nervensystems für eine Zeitspanne zur Verfügung stellen, die aus-

reichend ist, eine nachweisbare Erholung der Funktion des Zentralnervensystems zu stimulieren, bis zu und einschließlich einer vollständigen Wiederherstellung dessen. Die wirksame Menge des Morphogens kann in einer einzigen Verabreichung, in zwei Verabreichungen oder in einer Vielzahl von Verabreichungen bereitgestellt werden. Wenn die effektive Menge eines Morphogens in einer Vielzahl von Verabreichungen bereitgestellt wird, wird das Morphogen vorzugsweise dem Säugetier täglich verabreicht. In einer alternativen bevorzugten Ausführungsform wird das Morphogen dem Säugetier zweimal wöchentlich verabreicht (beispielsweise alle drei oder vier Tage). In einer weiteren alternativen bevorzugten Ausführungsform wird das Morphogen dem Säugetier einmal pro Woche verabreicht.

[0013] Die Erfindung kann dazu verwendet werden, nachteilige Folgen von ischämischen Verletzungen des Zentralnervensystems, die sich aus einer Vielzahl von Bedingungen ergeben können, zu behandeln. Thrombus, Embolus und systemische Hypotension zählen zu den häufigsten Ursachen von Schlaganfällen. Andere ischämische Verletzungen können durch Hypertension, hypertensive zerebrale vaskuläre Erkrankung, Ruptur eines Aneurisma, ein Angiom, Blutdyskrasie, Herzfehler, Herzstillstand, kardiogenen Schock, Nierenversagen, septischen Schock, Kopftauma, Rückenmarkstrauma, Insult, Blutungen aus einem Tumor oder einen anderen Verlust von Blutvolumen und/oder -druck einschließen. Die Verabreichung eines Morphogens gemäß der Erfindung bedeutet einen signifikanten klinischen Vorteil, sogar wenn die Verabreichung nach einer signifikanten Zeitspanne folgend der Verletzung eintritt.

[0014] Im Allgemeinen sind die in der Erfindung nützlichen Morphogene dimere Proteine, die eine Morphogenese einer oder mehrerer eukaryontischer (beispielsweise Säugetier-)Zellen, Geweben oder Organen induzieren. Hierin sind von speziellem Interesse Morphogene, die eine Morphogenese zumindest von Knochen- oder Nervengewebe induzieren. Morphogene umfassen zwei Polypeptide, die, wenn sie gefaltet sind, eine Konfiguration annehmen, die für das sich ergebende dimere Protein ausreichend sind, um morphogenetische Reaktionen in Zellen und Geweben hervorzurufen, die für dieses Morphogen spezifische Rezeptoren zeigen. Das heißt, die Morphogene induzieren im Allgemeinen eine Kaskade von Ereignissen, die all das Nachfolgende in einer morphogenetisch permissiven Umgebung einschließen: Stimulierung der Proliferation von Vorläuferzellen; Stimulierung der Differenzierung von Vorläuferzellen; Stimulierung der Proliferation differenzierter Zellen; und Unterstützung des Wachstums und der Aufrechterhaltung differenzierter Zellen. „Vorläufer“-Zellen sind nicht-festgelegte Zellen, die zur Differenzierung in ein oder mehrere spezifische Typen differenzierter Zellen in der Lage sind, abhängig von ihrem genomischen Repertoire und der Gewebsspezifität der permissiven Umgebung, in der die Morphogenese induziert wird. Die Morphogene können weiterhin den Beginn eines Seneszenz- oder Quieszenz-assoziierten Verlustes eines Phänotyps und/oder einer Gewebsfunktion verzögern oder lindern. Morphogene können noch weiter eine phänotypische Expression differenzierter Zellen stimulieren, einschließlich der Expression metabolischer und/oder funktionaler, beispielsweise sekretorischer, Eigenschaften hiervon. Zusätzlich können die Morphogene eine Redifferenzierung festgelegter Zellen unter geeigneten Umgebungsbedingungen induzieren. Wie oben erwähnt, sind Morphogene, die eine Proliferation und/oder Differenziation zumindest von neutralem Gewebe induzieren und/oder das Wachstum, die Aufrechterhaltung und/oder funktionelle Eigenschaften von Nervengewebe unterstützen, hierin von speziellem Interesse. Siehe beispielsweise WO 92/15323, WO 93/04692 und WO 94/03200 für eine ausführlichere Offenbarung bezüglich der gewebsmorphogenetischen Eigenschaften dieser Proteine.

[0015] Wie hierin verwendet, umfassen die Begriffe „Morphogen“, „Knochenmorphogen“, „Knochen-morphogenetisches Protein“, „BMPO“, „morphogenes Protein“ und „morphogenetisches Protein“ alle die Klasse von Proteinen, die durch humanes osteogenetisches Protein typifiziert wird (hOP-1). Die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen für hOP-1 werden in den SEQ ID NO: 4 bzw. 5 bereitgestellt. Zur Erleichterung der Beschreibung wird hOP-1 hierin nachstehend als ein repräsentatives osteogenetisches Protein bezeichnet. Der Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet wird jedoch erkennen, dass OP-1 lediglich für die TGF- β -Unterklasse von echten Gewebsmorphogenen repräsentativ ist, die dazu in der Lage sind, als morphogenetische Proteine zu fungieren und soll die Beschreibung nicht einschränken. Andere bekannte und nützliche Proteine schließen BMP-2, BMP-3, BMP-3b, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-15, GDF-1, GDF-2, GDF-3, GDF-5, GDF-6, GDF-7, GDF-8, GDF-9, GDF-10, GDF-11, GDF-12, NODAL, UNIVIN, SCREW, ADMP, NEURAL und morphogenetisch aktive Aminosäurevarianten hiervon ein. Somit schließen bevorzugte morphogenetische Proteine in einer Ausführungsform ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, OP-1, OP-2, BMP-2, BMP-4, BMP-5 und BMP-6. Zusätzlich, wie der Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet verstehen wird, könnte irgendeines der hierin beschriebenen morphogenetischen Proteine ebenfalls als Referenzsequenz verwendet werden.

[0016] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform innerhalb der Patentansprüchen schließen die in der Erfindung nützlichen Proteine biologisch aktive Spezies (phylogenetische) Varianten irgendeines der in den

Patentansprüchen beschriebenen morphogenetischen Proteine ein, einschließlich konservative Aminosäuresequenzvarianten, Proteine, die von degenerierten Nukleotid-Sequenzvarianten codiert werden und morphogenetisch aktive Proteine, die das konservierte 7-Cystein-Skelett teilen, wie es hierin definiert ist, und die von einer DNA-Sequenz codiert werden, die zum Hybridisieren unter Standard-Stringenzbedingungen an eine DNA-Sequenz in der Lage ist, die ein hierin offenbartes morphogenetisches Protein codiert, einschließlich, ohne Einschränkung, OP-1 und BMP-2 oder BMP-4. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Referenzsequenz OP-1.

[0017] In einer noch weiteren Ausführungsform können die in der Erfindung nützlichen Morphogene als morphogenetisch aktive Proteine definiert werden, die irgendeine der hierin definierten generischen Sequenzen aufweisen, einschließlich OPX. OPX nimmt die Homologien zwischen den verschiedenen Spezies osteogenetischer OP-1- und OP-2-Proteine auf und wird durch die hierin nachstehend beschriebene Aminosäuresequenz und in SEQ ID NO: 3 beschrieben. Zu Erläuterungszwecken ist die generische Sequenz 9 eine 96-Aminosäuresequenz, die das durch hOP-1 definierte 6-Cystein-Skelett enthält (Reste 335 bis 431 von SEQ ID NO: 5) und bei der die verbleibenden Reste die Homologien von OP-1, OP-2, OP-3, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-15, GDF-1, GDF-3, GDF-5, GDF-6, GDF-7, GDF-8, GDF-9, GDF-10, GDF-11 UNIVIN, NODAL, DORSALIN, NEURAL, SCREW und ADMP aufnehmen. Das heißt, jeder der Nicht-Cystein-Reste ist unabhängig aus dem entsprechenden Rest in dieser angesprochenen Proteingruppe ausgewählt. Zu Erläuterungszwecken ist die generische Sequenz 10 eine Sequenz von 102 Aminosäuren, die eine 5-Aminosäuresequenz einschließt, die dem N-Terminus der generischen Sequenz 9 hinzugefügt wurde und definiert das durch hOP-1 definierte 7-Cystein-Skelett (330-431 von SEQ ID NO: 5). Zu Erläuterungszwecken sind die generischen Sequenzen 7 und 8 jeweils 96 und 102 Aminosäure lange Sequenzen, die entweder das 6-Cystein-Skelett (generische Sequenz 7) oder das 7-Cystein-Skelett (generische Sequenz 8), definiert durch hOP-1 enthalten, und bei denen die verbleibenden Reste Nicht-Cystein die Homologien von OP-1, OP-2, OP-3, BMP-2, BMP-3, BMP-4, 60A, DPP, Vgl, BMP-5, BMP-6, Vgr-1 und GDF-1 aufnehmen.

[0018] Wie hierin betrachtet, schließt die Familie morphogenetischer Proteine, die hierin beschrieben sind, längere Formen eines vorgegebenen Proteins ein, ebenso wie phylogenetische, beispielsweise Spezies- und Allel-Varianten und biosynthetische Mutanten ein, einschließlich einer C-terminalen Hinzufügung und von Deletionsmutanten und -varianten wie beispielsweise solchen, die das konservierte C-terminale Cystein-Skelett verändern können, vorausgesetzt, dass die Veränderung noch ermöglicht, dass das Protein eine dimere Spezies mit einer Konformation bildet, die zum Induzieren einer Nervengewebsbildung in einem Säugetier in der Lage ist, wenn es einem Säugetier in einer morphogenetisch permissiven Stelle verabreicht wird. Zusätzlich können die in der Erfindung nützlichen morphogenetischen Proteine Formen einschließen, die variierende Glycosylierungsmuster und variierende N-Termini aufweisen, können natürlich vorkommen oder biosynthetisch gewonnen werden und können durch Expression rekombinanter DNA in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen erzeugt werden. Die Proteine sind als einzelne Spezies aktiv (beispielsweise als Homodimere, einschließlich Chimären) oder kombiniert als gemischte Spezies einschließlich von Heterodimeren.

[0019] Von speziellem Interesse hierin sind Morphogene, die, wenn sie Nervengewebe eines Säugetiers verabreicht werden, den normalen Zustand der Differenzierung und des Wachstums dieses Gewebes induzieren oder aufrechterhalten. In einer gegenwärtig bevorzugten demonstrativen Ausführungsform induzieren die vorliegenden Morphogene oder reinduzieren diese eine Entwicklungskaskade zellulärer und molekularer Ereignisse, die in der Bildung von Vertebraten-Zentralnervensystem-Gewebe gipfeln. In anderen bevorzugten demonstrativen Ausführungsformen induzieren die vorliegenden Morphogene in ähnlicher Weise die Bildung anderer Vertebraten-Körpergewebe (beispielsweise Vögel oder Säugetiere) wie beispielsweise, jedoch nicht beschränkt auf, Knochen, Knorpel, Knochenmark, Bänder, Zahndentin, Periodontium, Leber, Niere, Lunge, Herz oder gastrointestinale Auskleidung. Die vorliegenden Demonstrationen können im Kontext von sich entwickelndem embryonalem Gewebe oder an einer aseptischen, nicht vernarbenen Wundstelle in postembryonalem Gewebe ausgeführt werden. Besonders bevorzugte Morphogene induzieren oder lösen ein Muster einer Entwicklungskaskade in einem sich entwickelnden Säugetier- oder Vogelembryo aus, der in der Bildung eines oder mehrerer funktionell integrierter Elemente des Zentral- oder peripheren Nervensystems gipfelt. Solche Morphogene können dazu verwendet werden, ein Säugetier, das von einer ischämischen Verletzung des Zentralnervensystems betroffen ist, zu behandeln.

[0020] Eine „effektive“ Konzentration reicht aus, um die Regeneration oder Aufrechterhaltung von Nervengewebe zu fördern und/oder zusätzlichen Verlust hiervon zu hemmen. Endogene oder verabreichte Morphogene können als Endokrin-, Parakrin- oder Autokrinfaktoren dienen. Das heißt, endogene Morphogene können durch die Zellen synthetisiert werden, in denen die morphogenetischen Reaktionen induziert werden, durch benachbarte Zellen oder durch Zellen in einem entfernten Gewebe, und in diesem Fall wird das sezernierte en-

dogene Morphogen an die Stelle der Morphogenese transportiert, beispielsweise durch den Blutstrom des Individuums.

[0021] Die bei der Erfindung brauchbaren Morphogene, Induktoren und Agonisten können auf irgendeinem Verabreichungsweg verabreicht werden, der mit dem ausgewählten Mittel kompatibel ist, einschließlich durch intravenöse, subkutane, intramuskuläre, ophthalmische, intraperitoneale, bukale, vaginale, intraorbitale, orale, intrazerebrale, intrakraniale, intraspinale, intraventrikuläre, intrathecrale, intracisternale, intrakapsuläre, intranasale oder durch Aerosol-Verabreichung und können mit irgendeinem pharmazeutisch verträglichen Träger formuliert werden, der für den Verabreichungsweg geeignet ist. Zusätzlich können verschiedene Wachstumsfaktoren, Hormone, Enzyme, therapeutische Zusammensetzungen, Antibiotika oder andere bioaktive Mittel mit dem Morphogen gleichzeitig verabreicht werden. Somit können verschiedene Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise NGF, EGF, PDGF, IGF, FGF, TGF- α und TGF- β ebenso wie Enzyme, Enzyminhibitoren und/oder chemoattraktans/chemotatische Faktoren mit dem Morphogen kombiniert und an den defekten Ort abgegeben werden.

[0022] Die Verwendung eines Morphogens zur Herstellung eines Medikamentes gemäß der vorliegenden Erfindung stimuliert in vorteilhafter Weise die Wiederherstellung der Funktion des zentralen Nervensystems, sogar dann, wenn sie Stunden oder Tage im Anschluss an ischämische Verletzungen des Zentralnervensystems ausgeübt wird. Die Erfindung verbessert somit die Behandlungsoptionen, die verfügbar sind, wenn die ischämische Verletzung des Zentralnervensystems eintritt und vor dem Tod des involvierten Gewebes nicht diagnostiziert oder behandelt wird, signifikant.

[0023] Die bevorzugten Verfahren, Materialien und Beispiele, die nunmehr beschrieben werden, sind lediglich veranschaulichend und sollen nicht als einschränkend aufgefasst werden. Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung werden aus der nachfolgenden ausführlichen Beschreibung und aus den Ansprüchen klarer werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0024] [Fig. 1](#) präsentiert die prozentuale Aminosäuresequenzidentität und die prozentuale Aminosäuresequenzhomologie („Ähnlichkeit“), die verschiedene Mitglieder der Familie der morphogenetischen Proteine, wie hierin definiert, mit OP-1 in der C-terminalen 7-Cystein-Domäne teilen;

[0025] [Fig. 2A](#)-[Fig. 2B](#) sind graphische Liniendarstellungen, die die Anordnung der oberen Gliedmaßen ([Fig. 2A](#)) und der unteren Gliedmaßen ([Fig. 2B](#))-Scores betroffener (linker) Gliedmaßen von OP-1 behandelten Tieren darstellen (10 μ g/intracisternale) Injektion; Gesamt-OP-1 abgegeben in 8 Injektionen = 80 μ g/Tier; N=7; ausgefüllte Quadrate) und mit Vehiculum bzw. Träger behandelte Tiere (N=7, nicht-ausgefüllte Quadrate);

[0026] [Fig. 3A](#)-[Fig. 3B](#) sind graphische Liniendarstellungen, die Gleichgewichts-Balken- ([Fig. 3A](#)) und Haltungsreflex- ([Fig. 3B](#)) Scores in OP-1-behandelten Tieren (10 μ g/intracisternale Injektion; Gesamt-OP-1 abgegeben in 8 Injektionen = 80 μ g/Tier; N=7; ausgefüllte Quadrate) und Träger-behandelte Tiere (N=7 Tiere, nicht-ausgefüllte Quadrate) darstellen;

[0027] [Fig. 4](#) ist eine graphische Liniendarstellung, die das Körpergewicht von OP-1-behandelten Tieren (10 μ g/intracisternale Injektion; Gesamt-OP-1 abgegeben in 8 Injektionen = 80 μ g/Tier; N=7; ausgefüllte Quadrate) und Träger-behandelte Tiere (N=7; nicht-ausgefüllte Quadrate) darstellt;

[0028] [Fig. 5A](#)-[Fig. 5B](#) sind graphische Liniendarstellungen, die die oberen Gliedmaßen-Anordnungs-Scores ohne ([Fig. 5A](#)) und mit Barthaar-Anordnung ([Fig. 5B](#)) betroffener (linker) Gliedmaßen von Hochdosis-OP-1-behandelten Tieren (10 μ g/intracisternale Injektion; Gesamt-OP-1 abgegeben in 2 Injektionen = 20 μ g/Tier; N=9 Tiere, ausgefüllte Quadrate), von Niederdosis-OP-1-behandelten Tieren (1 μ g/intracisternale Injektion; Gesamt-OP-1 abgegeben in 2 Injektionen = 2 μ g/Tier; N=8 Tiere; nicht-ausgefüllte Quadrate) und von Träger-behandelten Tieren (N=9, nicht-ausgefüllte Kreise) darstellt;

[0029] [Fig. 6](#) ist eine graphische Liniendarstellung, die die oberen Gliedmaßen-Anordnungs-Scores von betroffenen (linken) Gliedmaßen von Hochdosis-OP-1-behandelten Tieren (10 μ g/intracisternale Injektion; Gesamt-OP-1 abgegeben in 2 Injektionen = 20 μ g/Tier; N=9 Tiere; ausgefüllte Quadrate), von Niederdosis-OP-1-behandelten Tieren (1 μ g/intracisternale Injektion; Gesamt-OP-1 abgegeben in 2 Injektionen = 2 μ g/Tier; N=8 Tiere; nicht-ausgefüllte Quadrate), und von mit Träger behandelten Tieren (N=9, nicht-ausgefüllte Kreise) darstellt;

[0030] [Fig. 7](#) ist eine graphische Darstellung, die das Körpergewicht von Hochdosis-OP-1-behandelten Tieren (10 µg/intracisternale Injektion; Gesamt-OP-1 abgegeben in 2 Injektionen = 20 µg/Tier; N=9 Tiere; ausgefüllte Quadrate), von mit niedrigen Dosen von OP-1-behandelten Tieren (1 µg/intracisternale Injektion; Gesamt-OP-1 abgegeben = 2 µg in 2 Injektionen/Tier; N=8 Tiere; nicht-ausgefüllte Quadrate) und von mit Träger behandelten Tieren (N=9, nicht-ausgefüllte Kreise) darstellt;

[0031] [Fig. 8A](#)-[Fig. 8B](#) sind graphische Liniendarstellungen, die die obere Gliedmaßen-Anordnungs-Scores ohne ([Fig. 8A](#)) und mit Barthaar-Anordnung ([Fig. 8B](#)) betroffener (linker) Gliedmaßen von OP-1-behandelten Tieren (10 µg/intracisternale Injektion; N=6 Tiere; ausgefüllte Quadrate) und von mit Trägerstoff behandelten Tieren (N=8), nicht-ausgefüllte Quadrate) darstellt;

[0032] [Fig. 9](#) ist eine graphische Liniendarstellung, die die Scores für die Anordnung unterer Gliedmaßen betroffener (linker) Gliedmaßen von betroffenen (linken) Gliedmaßen von OP-1-behandelten Tieren (10 µg/intracisternale Injektion; N=6 Tiere; ausgefüllte Quadrate) und von mit Trägerstoff behandelten Tieren (N=8), nicht-ausgefüllte Quadrate) darstellt; und

[0033] [Fig. 10](#) ist eine graphische Liniendarstellung, die das Körpergewicht von mit OP-1-behandelten Tieren darstellt (10 µg/intracisternale Injektion; N=6 Tiere; ausgefüllte Quadrate) und von mit Trägerstoff behandelten Tieren (N=8, nicht-ausgefüllte Quadrate).

Ausführliche Beschreibung bevorzugter Ausführungsformen

A. Allgemeines

[0034] Die vorliegende Erfindung hängt teilweise von der überraschenden Entdeckung ab, dass eine funktionelle Erholung im Anschluss an eine ischämische Verletzung des Zentralnervensystems durch Verabreichung eines Morphogens signifikant verbessert wird, sogar dann, wenn es verabreicht wird, nachdem das betroffene Gewebe der Verletzung unterliegt und nachdem die Zentralnervensystemfunktion verschlechtert wurde oder verlorenging. Am überraschendsten beeinflusst bzw. beeinträchtigt (beispielsweise reduziert) die Praxis der Erfindung das Volumen oder den Umfang von betroffenem (von Infarkt betroffenem) Gewebe nicht. Somit profitiert die Erfindung von der Entdeckung, dass eine funktionelle Wiederherstellung der motorischen Koordinationsfunktion des Zentralnervensystems ungeachtet des Verlustes von Gewebe erreicht werden kann, das ursprünglich von einem Schlaganfall betroffen war. Eine signifikante (nachweisbare, klinisch relevante) Wiederherstellung der motorischen ZNS-Koordinationsfunktion kann sogar mit einer einzigen Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Dosis eines Morphogens erreicht werden.

[0035] Die Erfindung umfasst die Verwendung eines Morphogens zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung eines Säugetiers, das eine ischämische Verletzung des Zentralnervensystems, wie beispielsweise einen Schlaganfall erlitten hat. Die Verabreichung eines Morphogens an das betroffene Säugetier kann zumindest 6 Stunden nach Ausbruch der Verletzung ein; beispielsweise 12, 24, 48 Stunden oder sogar länger, folgend einer Verletzung ausgeführt werden. Kein praktischer Endpunkt im therapeutischen Fenster, in dem die Erfindung ausgeübt werden kann, wurde bis jetzt etabliert. Die Erfindung kann zur Behandlung einer oder mehrerer Folgen einer ischämischen Verletzung des Zentralnervensystems verwendet werden, die sich aus einer Vielzahl von Bedingungen ergibt. Thrombus, Embolus und systemische Hypotension zählen zu den üblichsten Ursachen für einen Schlaganfall. Weitere ischämische Verletzungen können durch Hypertension, hypertensive zerebrale vaskuläre Erkrankung, durch die Ruptur eines Aneurismas, ein Angiom, Blutdyskrasie, einen Herzfehler, Herzstillstand, kardiogenen Schock, Nierenversagen, septischen Schock, Kopft trauma, Rückenmarkstrauma, Insult, Blutungen aus einem Tumor oder einem anderen Verlust eines Blutvolumens oder Blutdruckes verursacht werden. Diese Verletzungen führen zu einer Störung der physiologischen Funktion, anschließend zum Tod von Nervenzellen und einer Nekrose (Infarkt) der betroffenen Areale. Der Begriff „Schlaganfall“ bezeichnet die sich ergebenen plötzlichen und dramatischen neurologischen Defizite, die mit irgendeiner vorhergehenden Verletzung assoziiert sind.

[0036] Die Begriffe „Ischämie“ oder „ischämische Episode“, wie hierin verwendet, bedeuten jeden Umstand, der eine Mangelversorgung eines Gewebes mit Blut nach sich zieht. Somit ergibt sich eine ischämische Episode des Zentralnervensystems aus einer Insuffizienz oder Störung der Blutzufuhr zu irgendeinem Ort des Gehirns, wie beispielsweise, jedoch nicht beschränkt auf, einen Ort des Cerebrums, Cerebellums oder Gehirnstamms. Das Rückenmark, das ebenfalls Teil des Zentralnervensystems ist, ist in gleicher Weise gegen-über einer Ischämie, die sich aus einer Verminderung des Blutstroms ergibt, anfällig. Eine ischämische Episode kann durch Konstriktion oder Obstruktion eines Blutgefäßes verursacht sein, wie es im Falle eines Thrombus

oder Embolus auftritt. Alternativ kann sich die ischämische Episode aus irgendeiner Form einer verschlechterten Herzfunktion, einschließlich Herzstillstand, wie oben beschrieben, ergeben. Wenn der Mangel bzw. die Defizienz ausreichend schwerwiegend und lang anhaltend ist, kann dies zur Störung der physiologischen Funktion führen, einem anschließenden Tod von Neuronen und einer Nekrose (Infarkt) der betroffenen Areale. Das Ausmaß und der Typ der neurologischen Abnormalität, die sich aus der Verletzung ergibt, hängt vom Ort und der Größe des Infarkts und des Ortes bzw. Fokus der Ischämie ab. Wenn die Ischämie mit einem Schlaganfall assoziiert ist, kann dies entweder global oder in ihrem Umfang fokal sein.

[0037] Der Begriff „fokale Ischämie“, wie hierin in Bezug auf das zentrale Nervensystem verwendet, bedeutet den Zustand, der sich aus einer Blockade einer einzelnen Arterie ergibt, die Blut an das Hirn oder das Rückenmark liefert, was den Tod aller zellulären Elemente (Pannekrose) in dem von Arterie versorgten Territorium mit sich bringt.

[0038] Der Begriff „globale Ischämie“, wie hierin bezüglich des zentralen Nervensystems verwendet, bedeutet den Zustand, der sich aus einer allgemeinen Verringerung des Blutstroms an das gesamte Hirn, das Vorderhirn oder das Rückenmark ergibt, was den verzögerten Tod von Neuronen verursacht, insbesondere solchen, die an metabolisch aktiven Orten in diesen gesamten Geweben vorliegen. Die Pathologie jeder dieser Fälle ist sehr unterschiedlich, wie es auch die klinischen Korrelate sind. Die Modelle einer fokalen Ischämie betreffen Patienten mit einer fokalen zerebralen Infarktion, wohingegen Modelle einer globalen Ischämie dem Herzstillstand oder anderen Ursachen einer systemischen Hypotension analog sind.

B. Biochemische, strukturelle und funktionelle Eigenschaften nützlicher morphogenetischer Proteine

[0039] Wie hierin erwähnt, ist ein Protein wie hierin definiert morphogenetisch, wenn es die Entwicklungskaskade zellulärer und molekularer Ereignisse induziert, die in der Bildung von neuem, organspezifischem Gewebe kulminieren. Die Morphogene sind im Allgemeinen dazu geeignet, eine Kaskade von Ereignissen zu induzieren, die all das Folgende in einer morphogenetisch permissiven Umgebung einschließt; eine Stimulierung der Proliferation von Vorläuferzellen; eine Stimulierung der Differenzierung von Vorläuferzellen; eine Stimulierung der Proliferation differenzierter Zellen; und eine Förderung des Wachstums und der Aufrechterhaltung differenzierter Zellen. Unter geeigneten Bedingungen sind die Morphogene ebenfalls dazu in der Lage, eine Redifferenzierung festgelegter Zellen zu induzieren, insbesondere von Zellen, die von ihrem „normalen“ Differenzierungsweg abgewichen sind. Details, wie die in dieser Erfindung nützlichen Morphogene zuerst identifiziert wurden, ebenso wie eine Beschreibung, wie diese herzustellen, zu verwenden und diese auf eine morphogenetische Aktivität zu testen sind, ist in zahlreichen Publikationen offenbart, einschließlich der US 5 011 691, 5 266 683 und der internationalen Patentveröffentlichungen WO 92/15323, WO 93/04692; WO 94/03200. Wie hierin offenbart, können die Morphogene aus Material aus natürlicher Quelle oder rekombinant produziertem Material aus prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen unter Verwendung der hierin offenbarten Gensequenzen aufgereinigt werden. Alternativ können die neuen morphogenetischen Sequenzen den hierin offenbarten Verfahren folgend identifiziert werden.

[0040] Natürlich vorkommende Proteine, die hierin identifiziert wurden und/oder von denen geschätzt wird, dass sie echte gewebsmorphogenetische Proteine sind und dass sie in den Verfahren und Zusammensetzungen der Erfindung von Nutzen sind, bilden eine getrennte Untergruppe innerhalb dieser losen evolutionären Gruppierung von Sequenz-verwandten Proteinen, die als die TGF- β -Superfamilie oder Supergen-Familie bekannt ist. Die natürlich vorkommenden Morphogene teilen eine beträchtliche Aminosäure-Sequenzhomologie in ihren C-terminalen Regionen (Domänen). Typischerweise werden die oben erwähnten natürlich vorkommenden Morphogene als Vorläufer translatiert, mit einer N-terminalen Signalpeptidsequenz, die typischerweise als ungefähr 35 Reste Länge beträgt, gefolgt von einer "Pro"-Domäne, die zur Gewinnung des reifen Proteins abgespalten wird, die die biologisch aktive C-terminale Domäne einschließt. Das Signalpeptid wird rasch nach Translation abgespalten, an einer Spaltstelle, die in einer vorgegebenen Sequenz unter Verwendung des Verfahrens von Von Heijne (1986), Nucleic Acids Research 14, 4683-4691, vorhergesagt werden kann. Die Prodomäne ist typischerweise ungefähr dreimal länger als die vollständig prozessierte reife C-terminale Domäne. Unter nativen Bedingungen wird das Protein als reifes Dimer sezerniert und die gespaltene Prodomäne kann damit zur Bildung eines Proteinkomplexes gebunden werden, vermutlich um die Löslichkeit des reifen dimeren Proteins zu verbessern. Typischerweise ist die komplexe Form eines Morphogens löslicher als die reife Form unter physiologischen Bedingungen.

[0041] Morphogenetisches Protein aus natürlicher Quelle in seiner reifen, nativen Form ist typischerweise ein glykosyliertes Dimer, das typischerweise ein apparentes bzw. scheinbares Molekulargewicht bzw. eine Molekülmasse von ungefähr 30-36 kDa aufweist, wie es durch SDS-PAGE bestimmt wurde. Wenn es reduziert ist, lässt

das 30-kDA-Protein zwei glykosylierte Polypeptid-Untereinheiten mit scheinbaren Molekülmassen im Bereich von ungefähr 16 kDA und 18 kDA entstehen. Das unglykosylierte dimere Protein, das ebenfalls eine morphogenetische Aktivität aufweist, weist typischerweise ein apparentes Molekulargewicht im Bereich von ungefähr 27 kDA auf. Wenn es reduziert ist, lässt das 27-kDA-Protein zwei unglykosylierte Polypeptide mit Molekulargewichten entstehen, typischerweise in einem Bereich von ungefähr 14 kDA bis 16 kDA.

[0042] In bevorzugten Ausführungsformen umfasst jede der Polypeptidketten eines dimeren morphogenetischen Proteins, wie hierin definiert, eine Aminosäuresequenz, die eine definierte Beziehung mit einer Aminosäuresequenz eines Referenz- bzw. Bezugsmorphogens teilt. In einer Ausführungsform teilen bevorzugte morphogenetische Polypeptidketten eine definierte Beziehung mit einer Sequenz, die in morphogenetisch aktivem humanen OP-1, SEQ ID NO: 5 vorliegen. Jedoch können irgendeines oder mehrere der hierin offenbarten natürlich auftretenden oder biosynthetischen morphogenetischen Proteine in ähnlicher Weise als Bezugssequenz verwendet werden. Morphogenetische Polypeptidketten, die bei der Erfindung brauchbar sind, teilen eine definierte Beziehung mit zumindest der C-terminalen 7-Cystein-Domäne von humanem OP-1, Reste 330-431 von SEQ ID NO: 5. Das heißt, bevorzugte Polypeptidketten in einem dimeren Protein mit einer morphogenetischen Gewebsaktivität umfassen jeweils eine Sequenz, die einer Bezugssequenz entspricht oder zu dieser funktionell äquivalent ist.

[0043] Funktionell äquivalente Sequenzen schließen funktionell äquivalente Anordnungen von Cystein-Resten ein, die innerhalb der Bezugssequenz angeordnet sind, einschließlich von Aminosäureinsertionen oder -deletionen, die die lineare Anordnung dieser Cysteine ändern, die jedoch materiell die Beziehung in der gefalteten Struktur des dimeren Morphogenproteins verschlechtern, einschließlich dessen Fähigkeit, Intra- oder Inter-Ketten Disulfid-Brücken zu bilden, wie es für eine morphogenetische Aktivität notwendig sein kann. Es wurden beispielsweise natürlich vorkommende Morphogene beschrieben, bei denen zumindest eine innere bzw. interne Deletion (eines Restes; BMP2) oder eine Insertion (von vier Resten; GDF-1) vorliegen, was jedoch die biologische Aktivität nicht in Frage stellt. Funktionell äquivalente Sequenzen schließen weiterhin solche ein, bei denen ein oder mehrere Aminosäurereste sich vom entsprechenden Rest einer Bezugssequenz, beispielsweise der C-terminalen 7-Cystein-Domäne (hierin ebenfalls als konserviertes 7-Cystein-Skelett bezeichnet) von humanem OP-1 unterscheiden, vorausgesetzt, dass dieser Unterschied die gewebsmorphogenetische Aktivität nicht zerstört. Demgemäß werden konservative Substitutionen entsprechend der Aminosäure in der Referenzsequenz bevorzugt. Aminosäurereste, die „konservative Substitutionen“ für entsprechende Reste in einer Bezugssequenz sind, sind solche, die den entsprechenden Bezugsresten physikalisch oder funktionell ähnlich sind, die beispielsweise eine ähnliche Größe, Form, elektrische Ladung, chemische Eigenschaften, einschließlich der Fähigkeit zur Ausbildung kovalenter oder Wasserstoffbrücken-Bindungen oder dergleichen aufweisen. Besonders bevorzugte konservative Substitutionen sind solche, die die für eine akzeptierte Punktmutation in Dayhoff et al. (1978), 5 Atlas of Protein Sequence and Structure, Ergänzungsband 3, Kapitel 22 (Seiten 354-352), National Biomed. Res. Found., Washington, D.C. 20007, definierten Kriterien erfüllen, deren Lehren durch diese Bezugnahme hierin mit aufgenommen sind. Beispiele für konservative Substitutionen schließen ein: Konservative Substitutionen schließen typischerweise die Substitution einer Aminosäure durch eine andere mit ähnlichen Eigenschaften ein, beispielsweise Substitutionen der folgenden Gruppen: Valin, Glycin; Glycin, Alanin; Valin, Isoleucin, Leucin; Asparaginsäure, Glutaminsäure; Asparagin, Glutamin; Serin, Threonin; Lysin, Arginin; und Phenylalanin, Tyrosin. Der Begriff „konservative Variation“ schließt ebenfalls die Verwendung einer substituierten Aminosäure anstelle einer unsubstituierten Stammaminosäure ein, vorausgesetzt, dass Antikörper, die gegen das substituierte Polypeptid gezüchtet werden, ebenfalls mit dem unsubstituierten Polypeptid immunreagieren. Wie hierin an anderer Stelle beschrieben ist, wird die Klasse an morphogenetischen Proteinen, die in der Erfindung von Nutzen sind, durch humanes osteogenetisches Protein (hOP-1) typifiziert. Andere morphogenetische Proteine, die in der Praxis der Erfindung von Nutzen sind, schließen morphogenetisch aktiven Formen von OP-1, OP-2, OP-3, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6, BMP-9, DPP, Vgr-1, 60A-Protein, GDF-1, GDF-3, GDF-5, GDF-7, BMP-10, BMP-11, BMP-13, BMP-15, UNIVIN, NODAL, SCREW, ADMP oder NEURAL und Aminosäuresequenzvarianten hievon innerhalb des Schutzmangels der beigefügten Ansprüche ein. In einer gegenwärtig bevorzugten Ausführungsform schließt das osteogenetische Protein irgendeines des folgenden, innerhalb des Schutzmangels der beigefügten Ansprüche, ein: OP-1, OP-3, BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-9 und Aminosäuresequenzvarianten und Homologie hievon, einschließlich von Spezieshomologen hierfür.

[0044] Veröffentlichungen, die diese Sequenzen offenbaren, ebenso wie deren chemische und physikalische Eigenschaften schließen folgende ein:

OP-1 and OP-2: U.S. Patent Nr. 5 011 691, U.S. Patent No. 5 266 683, Ozkaynak et al. (1990) EMBO J. 9: 2085-2093; OP-3: WO 94/10203 (PCT US93/10520); BMP-2, BMP-3, BMP-4: WO 88/00205, Wozney et al. (1988) Science 242: 1528-1534); BMP-5 and BMP-6: Celeste et al. (1991) PNAS 87: 9843-9847; Vgr-1: Lyons

et al. (1989) PNAS 86: 4554-4558; DPP: Padgett et al. (1987) Nature 325: 81-84; Vg-1: Weeks (1987) Cell 51: 861-867; BMP-9: WO 95/33830 (PCT/US95/07084); BMP-10: WO 94/26893 (PCT/US94/05290); BMP-11: WO 94/26892 (PCT/US94/05288); BMP-12: WO 95/16035 (PCT/US94/14030); BMP-13: WO 95/16035 (PCT/US904/14030); GDF-1: WO 92/00382 (PCT/US91/04096) und Lee et al. (1991) PNAS 88: 4250-4254; GDF-8: WO 94/21681 (PCT/US94/03019); GDF-9: WO 94/15966 (PCT/US94/00685); GDF-10: WO 95/10539 (PCT/US94/11440); GDF-11: WO 96/01845 (PCT/US95/08543); BMP-15: WO 96/36710 (PCT/US96/06540); MP121: WO 96/01316 (PCT/EP95/02552); GDF-5 (CDMP-1, MP52): WO 94/15949 (PCT/US94/00657) und WO 96/14335 (PCT/US94/12814) und WO 93/16099 (PCT/EP93/00350); GDF-6 (CDMP-2; BMP-13): WO 95/01801 (PCT/US94/07762) und WO 96/14335 und WO 95/10635 (PCT/US94/14030); GDF-7 (CDMP-3, BMP-12): WO 95/10802 (PCT/US94/07799) und WO 95/10635 (PCT/US94/14030). In einer anderen Ausführungsform schließen nützliche Proteine biologisch aktive biosynthetische Konstrukte, einschließlich neuer biosynthetischer morphogenetischer Proteine und chimärer Proteine ein, die unter Verwendung von Sequenzen aus zwei oder mehreren bekannten Morphogenen entwickelt wurden. Siehe ebenfalls die biosynthetischen Konstrukte, offenbart im US-Patent Nr. 5 011 691 (beispielsweise COP-1, COP-3, COP-4, COP-5, COP-7 und COP-16).

[0045] In bestimmten bevorzugten Ausführungsformen schließen nützliche morphogenetische Proteine solche ein, bei denen die Aminosäuresequenzen eine Sequenz umfassen, die zumindest eine 60%ige Aminosäure-Identität mit der bevorzugten Bezugssequenz von humanem OP-1 teilen, noch mehr bevorzugt zumindest 65% Aminosäure-Identität hiermit.

[0046] In bestimmten Ausführungsformen wird ein Polypeptid, das unter dem Verdacht steht, ein funktionelles Äquivalent für ein Bezugsmorphogen-Polypeptid zu sein, hiermit aligned bzw. ausgerichtet, unter Verwendung des Verfahrens von Needleman et al. (1970), J. Mol., Biol. 48: 443-453, bequemerweise implementiert durch Computerprogramme wie beispielsweise das Align-Programm (DNAstar, Inc.). Wie oben erwähnt, werden interne Lücken und Aminosäureinsertionen in der Kandidatensequenz für die Zwecke der Berechnung der definierten Beziehung ignoriert, bequemerweise ausgedrückt als als Niveau einer Aminosäuresequenzhomologie oder -identität, zwischen den Kandidaten- und Referenzsequenzen. "Aminosäuresequenzhomologie" ist hierin so zu verstehen, dass sowohl eine Aminosäuresequenzidentität als auch -ähnlichkeit eingeschlossen ist. Homologe Sequenzen teilen identische und/oder ähnliche Aminosäurereste, wobei ähnliche Reste Konservierungs-Substitutionen für oder "erlaubte Punktmutationen" von entsprechenden Aminosäureresten in einer ausgerichteten Bezugssequenz sind. Somit ist eine Kandidatenpolypeptidsequenz, die 70 % Aminosäuresequenzhomologie mit einer Bezugssequenz teilt, eine, bei der etwa 70 % der ausgerichteten Reste mit den entsprechenden Resten einer Referenzsequenz identisch sind oder konservative Substitutionen hiervon sind. In einer gegenwärtig bevorzugten Ausführungsform ist die Bezugssequenz OP-1.

[0047] Fig. 1 betrifft die prozentuale Aminosäuresequenzhomologie (Ähnlichkeit) und die prozentuale Identität innerhalb der C-terminalen 7-Cystein-Domäne verschiedener repräsentativer Mitglieder der TGF- β -Familie unter Verwendung von OP-1 als Bezugssequenz. Die prozentualen Homologien, die in der Figur dargestellt sind, werden mit den Sequenzen berechnet, die im Wesentlichen folgend dem Verfahren von Needleman et al. (1970), J. Mol. Biol. 48: 443-453, ausgerichtet wurden, berechnet unter Verwendung des Align-Programms (DNAstar, Inc.). Insertionen und Deletionen aus der Referenzmorphogenesequenz, hier die C-terminale, biologisch aktive 7-Cystein-Domäne oder -Skelett von hOP-1, werden für die Zwecke der Berechnung ignoriert.

[0048] Wie es für den Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet offensichtlich ist, der die Sequenzen für die in Fig. 1 aufgelisteten Proteine überblickt, können signifikante Aminosäureaustausche aus der Referenzsequenz vorgenommen werden, während die morphogenetische Aktivität erhalten bleibt. Während beispielsweise die GDF-1-Proteinsequenz nur ungefähr 50 % Aminosäureidentität mit der hOP-1-Sequenz, die hierin beschrieben ist, teilt, die GDF-1-Sequenz mehr als 70% Aminosäuresequenzhomologie mit der hOP-1-Sequenz teilt, wobei „Homologie“ wie oben definiert ist. Darüber hinaus enthält GDF-1 einen 4-Aminosäure-Insert (Gly-Gly-Pro-Pro) zwischen den beiden Resten, die dem Rest 372 und 373 von OP-1 (SEQ ID NO: 5) entsprechen. In ähnlicher Weise weist BMP-3 einen „Extra“-Rest auf, nämlich ein Valin, eingefügt zwischen den beiden Resten, die den Resten 385 und 386 von hOP-1 entsprechen (SEQ ID NO: 5). Weiterhin fehlt sowohl BMP-2 als auch BMP-4 der Aminosäurerest, der dem Rest 389 von OP-1 entspricht (SEQ ID NO: 5). Keine dieser „Abweichungen“ von der Referenzsequenz scheint die biologische Aktivität zu stören.

[0049] In weiteren bevorzugten Ausführungsformen ist die Familie von morphogenetischen Polypeptiden, die in der vorliegenden Erfindung von Nutzen sind, und Mitglieder hiervon, durch eine generische Aminosäuresequenz definiert. Die generische Sequenz 7 (SEQ ID NO: 1) und die generische Sequenz 8 (SEQ ID NO: 2) werden lediglich zu Erläuterungszwecken erwähnt, und sie sind nachstehend beschrieben. Sie nehmen die

Homologie auf, die zwischen den bevorzugten Mitgliedern der Proteinfamilie, die bis jetzt identifiziert wurden, geteilt werden, einschließlich zumindest OP-1, OP-2, OP-3, CBMP-2A, CBMP-2B, BMP-3, 60A, DPP, Vgl, BMP-5, BMP-6, Vgr-1 und GDF-1. Die Aminosäuresequenzen für diese Proteine sind hierin und/oder in der Technik beschrieben, wie oben zusammengefasst ist. Die generischen Sequenzen schließen sowohl die von diesen Sequenzen in der C-terminalen Domäne geteilte Aminosäure-Identität ein, definiert durch die 6- und 7-Cystein-Skelette (generische Sequenzen 7 bzw. 8), ebenso wie alternative Reste für die variablen Positionen innerhalb der Sequenz. Die generischen Sequenzen stellen ein geeignetes Cystein-Skelett bereit, in dem sich inter- oder intramolekulare Disulfid-Brücken bilden können, und enthalten bestimmte entscheidende Aminosäuren, die wahrscheinlich die Tertiärstruktur der gefalteten Proteine beeinflussen. Zusätzlich ermöglichen die generischen Sequenzen ein zusätzliches Cystein an Position 36 (generische Sequenz 7) oder an Position 41 (generische Sequenz 8), wodurch die morphogenetisch aktiven Sequenzen von OP-2 und OP-3 umfasst sind.

Generische Sequenz 7 (SEQ ID NO: 1)

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

wobei jedes Xaa unabhängig aus einer Gruppe einer oder mehrerer spezifizierter Aminosäuren ausgewählt ist, die wie folgt definiert ist: "Res." bedeutet "Rest" und Xaa bei Res. 2 = (Tyr oder Lys); Xaa. bei Res. 3 = (Val oder Ile); Xaa bei Res. 4 = (Ser, Asp oder Glu); Xaa bei Res. 6 = (Arg, Gln, Ser, Lys oder Ala); Xaa bei Res. 7 = (Asp oder Glu); Xaa bei Res. 8 = (Leu, Val oder Ile); Xaa bei Res. 11 = (Gln, Leu, Asp, His, Asn oder Ser); Xaa bei Res. 12 = (Asp, Arg, Asn oder Glu); Xaa bei Res. 13 = (Trp oder Ser); Xaa bei Res. 14 = (De oder Val); Xaa bei Res. 15 = (Ile oder Val); Xaa bei Res. 16 = (Ala oder Ser); Xaa bei Res. 18 = (Glu, Gln, Leu, Lys, Pro oder Arg); Xaa bei Res. 19 = (Gly oder Ser); Xaa bei Res. 20 = (Tyr oder Phe); Xaa bei Res. 21 = (Ala, Ser, Asp, Met, His, Gln, Leu oder Gly); Xaa bei Res. 23 = (Tyr, Asn oder Phe); Xaa bei Res. 26 = (Glu, His, Tyr, Asp, Gln, Ala oder Ser); Xaa bei Res. 28 = (Glu, Lys, Asp, Gln oder Ala); Xaa bei Res. 30 = (Ala, Ser, Pro, Gln, Ile oder Asn); Xaa bei Res. 31 = (Phe, Leu oder Tyr); Xaa bei Res. 33 = (Leu, Val oder Met); Xaa bei Res. 34 = (Asn, Asp, Ala, Thr oder Pro); Xaa bei Res. 35 = (Ser, Asp, Glu, Leu, Ala oder Lys); Xaa bei Res. 36 = (Tyr, Cys, His, Ser oder Ile); Xaa bei Res. 37 = (Met, Phe, Gly oder Leu); Xaa bei Res. 38 = (Asn, Ser oder Lys); Xaa bei Res. 39 = (Ala, Ser, Gly oder Pro); Xaa bei Res. 40 = (Thr, Leu oder Ser); Xaa bei Res. 44 = (Ile, Val oder Thr); Xaa bei Res. 45 = (Val, Leu, Met oder Ile); Xaa bei Res. 46 = (Gln oder Arg); Xaa bei Res. 47 = (Thr, Ala oder Ser); Xaa bei Res. 48 = (Leu oder Ile); Xaa bei Res. 49 = (Val oder Met); Xaa bei Res. 50 = (His, Asn oder Arg); Xaa bei Res. 51 = (Phe, Leu, Asn, Ser, Ala oder Val); Xaa bei Res. 52 = (Ile, Met, Asn, Ala, Val, Gly oder Leu); Xaa bei Res. 53 = (Asn, Lys, Ala, Glu, Gly oder Phe); Xaa bei Res. 54 = (Pro, Ser oder Val); Xaa bei Res. 55 = (Glu, Asp, Asn, Gly, Val, Pro oder Lys); Xaa bei Res. 56 = (Thr, Ala, Val, Lys, Asp, Tyr, Ser, Gly, Ile oder His); Xaa bei Res. 57 = (Val, Ala oder Ile); Xaa bei Res. 58 = (Pro oder Asp); Xaa bei Res. 59 = (Lys, Leu oder Glu); Xaa bei Res. 60 = (Pro, Val oder Ala); Xaa bei Res. 63 = (Ala oder Val); Xaa bei Res. 65 = (Thr, Ala oder Glu); Xaa bei Res. 66 = (Gln, Lys, Arg oder Glu); Xaa bei Res. 67 = (Leu, Met oder Val); Xaa bei Res. 68 = (Asn, Ser, Asp oder Gly); Xaa bei Res. 69 = (Ala, Pro oder Ser); Xaa bei Res. 70 = (Ile, Thr, Val oder Leu); Xaa bei Res. 71 = (Ser, Ala oder Pro); Xaa bei Res. 72 = (Val, Leu, Met oder Ile); Xaa bei Res. 74 = (Tyr oder

Phe); Xaa bei Res. 75 = (Phe, Tyr, Leu oder His); Xaa bei Res. 76 = (Asp, Asn oder Leu); Xaa bei Res. 77 = (Asp, Glu, Asn, Arg oder Ser); Xaa bei Res. 78 = (Ser, Gln, Asn, Tyr oder Asp); Xaa bei Res. 79 = (Ser, Asn, Asp, Glu oder Lys); Xaa bei Res. 80 = (Asn, Thr oder Lys); Xaa bei Res. 82 = (Ile, Val oder Asn); Xaa bei Res. 84 = (Lys oder Arg); Xaa bei Res. 85 = (Lys, Asn, Gln, His, Arg oder Val); Xaa bei Res. 86 = (Tyr, Glu oder His); Xaa bei Res. 87 = (Arg, Gln, Glu oder Pro); Xaa bei Res. 88 = (Asn, Glu, Trp oder Asp); Xaa bei Res. 90 = (Val, Thr, Ala oder Ile); Xaa bei Res. 92 = (Arg, Lys, Val, Asp, Gln oder Glu); Xaa bei Res. 93 = (Ala, Gly, Glu oder Ser); Xaa bei Res. 95 = (Gly oder Ala) and Xaa bei Res. 97 = (His oder Arg).

[0050] Generische Sequenz 8 (SEQ II) NO: 2 schließt die gesamte generische Sequenz 7 (SEQ ID NO: 1) ein und schließt zusätzlich die nachfolgende Sequenz (SEQ ID NO: 8) an ihrem N-Terminus ein.

SEQ ID NO: 8

Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				\$

[0051] Demgemäß ist, beginnend mit Rest 7, jedes "Xaa" in der generischen Sequenz 8 eine spezifizierte Aminosäure, definiert wie für die generische Sequenz 7, mit dem Unterschied, dass jede Restnummer, die für die generische Sequenz 7 beschrieben ist, in der generischen Sequenz um 5 verschoben ist. Somit betrifft "Xaa bei Res. 2 = (Tyr oder Lys)" in der generischen Sequenz 7 Xaa bei Res. 7 in der generischen Sequenz 8. In der generischen Sequenz 8 ist Xaa bei Res. 2 gleich (Lys, Arg, Ala oder Gln); Xaa bei Res. 3 = (Lys, Arg oder Met), Xaa bei Res. 4 = (His, Arg oder Gln); und Xaa bei Res. 5 = (Glu, Ser, His, Gly, Arg, Pro, Thr oder Tyr).

[0052] Die generischen Sequenzen 9 und 10 sind zusammengesetzte Aminosäuresequenzen der nachfolgenden Proteine; humanes OP-1, humanes OP-2, humanes OP-3, humanes BMP-2, humanes BMP-3, humanes BMP-4, humanes BMP-5, humanes BMP-6, humanes BMP-8, humanes BMP-9, humanes BMP-10, humanes BMP-11, Drosophila 60A, Xenopus Vg-1, Seeigel-UNIVIN, humanes CDMP-1 (Maus-GDF-5), humanes CDMP-2 (Maus-GDF-6, humanes BMP-13), humanes CDMP-3 (Maus-GDF-7, humanes BMP-12), Maus-GDF-3, humanes GDF-1, Maus-GDF-1, Huhn-DORSALIN, Drosophila-dpp, Drosophila-SCREW, Maus-NODAL, Maus-GDF-8, humanes GDF-8, Maus-GDF-9, Maus-GDF-10, humanes GDF-11, Maus-GDF-11, humanes BMP-15 und Ratten-BMP-3b. Wie die generische Sequenz 7 ist die generische Sequenz 9 nur zu Erläuterungszwecken gezeigt, und sie nimmt das C-terminale 6-Cystein-Skelett auf und nimmt wie die generische Sequenz 8, die generische Sequenz 10 das 7-Cystein-Skelett auf.

Generische Sequenz 9 (SEQ ID NO: 6)

Xaa										
1				5					10	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
					15				20	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Gly	Xaa	Cys	Xaa	Xaa
				25				30		
Xaa										
					35				40	
Xaa										
					45				50	
Xaa										
					55				60	
Xaa	Cys	Xaa	Pro	Xaa						
					65				70	
Xaa	Xaa	Leu	Xaa							
					75				80	
Xaa										
					85				90	
Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Cys	Xaa				
					95					

wobei jedes Xaa unabhängig aus einer Gruppe einer oder mehrerer spezifizierter Aminosäuren ausgewählt, die wie folgt definiert sind: "Res." bedeutet "Rest" und Xaa bei Res. 1 = (Phe, Leu oder Glu); Xaa bei Res. 2 = (Try, Phe, His, Arg, Thr, Lys, Gln, Val oder Glu); Xaa bei Res. 3 = (Val, Ile, Leu oder Asp); Xaa bei Res. 4 = (Ser, Asp, Glu, Asn, oder Phe); Xaa bei Res. 5 = (Phe oder Glu); Xaa bei Res. 6 = (Arg, Gln, Lys, Ser, Ala oder Asn); Xaa bei Res. 7 = (Asp, Glu, Leu, Ala oder Gln); Xaa bei Res. 8 = (Leu, Val, Met, Ile oder Phe); Xaa bei Res. 9 = (Gly, His oder Lys); Xaa bei Res. 10 = (Trp oder Met); Xaa bei Res. 11 = (Gln, Leu, His, Glu, Asn, Asp, Ser oder Gly); Xaa bei Res. 12 = (Asp, Asn, Ser, Lys, Arg, Glu oder His); Xaa bei Res. 13 = (Trp oder Ser); Xaa bei Res. 14 = (Ile, oder Val); Xaa bei Res. 15 = (Ile oder Val); Xaa bei Res. 16 = (Ala, Ser, Tyr oder Trp); Xaa bei Res. 18 = (Glu, Lys, Gln, Met, Pro, Leu, Arg, His oder Lys); Xaa bei Res. 19 = (Gly, Glu, Asp, Lys, Ser, Gln, Arg oder Phe); Xaa bei Res. 20 = (Tyr oder Phe); Xaa bei Res. 21 = (Ala, Ser, Gly, Met, Gln, His, Glu, Asp, Ley, Asn, Lys oder Thr); Xaa bei Res. 22 = (Ala oder Pro); Xaa bei Res. 23 = (Tyr, Phe, Asn, Ala oder Arg); Xaa bei Res. 24 = (Tyr, His, Glu, Phe oder Arg); Xaa bei Res. 26 = (Glu, Asp, Ala, Ser, Tyr, His, Lys, Arg, Gln oder Gly); Xaa bei Res. 28 = (Glu, Asp, Ley, Val, Lys, Gly, Thr, Ala oder Gln); Xaa bei Res. 30 = (Ala, Ser, Ile, Asn, Pro, Glu, Asp, Phe, Gln, oder Leu); Xaa bei Res. 31 = (Phe, Tyr, Leu, Asn, Gly oder Arg); Xaa bei Res. 32 = (Pro, Ser, Ala oder Val); Xaa bei Res. 33 = (Leu, Met, Glu, Phe oder Val); Xaa bei Res. 34 = (Asn, Asp, Thr, Gly, Ala, Arg, Leu oder Pro); Xaa bei Res. 35 = (Ser, Ala, Glu, Asp, Thr, Leu, Lys, Gln oder His); Xaa bei Res. 36 = (Tyr, His, Cys, Ile, Arg, Asp, Asn, Lys, Ser, Glu oder Gly); Xaa bei Res. 37 = (Met, Leu, Phe, Val, Gly oder Tyr); Xaa bei Res. 38 = (Asn, Glu, Thr, Pro, Lys, His, Gly, Met, Val oder Arg); Xaa bei Res. 39 = (Ala, Ser, Gly, Pro oder Phe); Xaa bei Res. 40 = (Thr, Ser, Leu, Pro, His oder Met); Xaa bei Res. 41 = (Asn, Lys, Val, Thr oder Gln); Xaa bei Res. 42 = (His, Tyr oder Lys); Xaa bei Res. 43 = (Ala, Thr, Leu oder Tyr); Xaa bei Res. 44 = (Ile, Thr, Val, Phe, Tyr, Met oder Pro); Xaa bei Res. 45 = (Val, Leu, Met, Ile oder His); Xaa bei Res. 46 = (Gln, Arg oder Thr); Xaa bei Res. 47 = (Thr, Ser, Ala, Asn oder His); Xaa bei Res. 48 = (Leu, Asn oder Ile); Xaa bei Res. 49 = (Val, Met, Leu, Pro oder Ile); Xaa bei Res. 50 = (His, Asn, Arg, Lys, Tyr oder Gln); Xaa bei Res. 51 = (Phe, Leu, Ser, Asn, Met, Ala, Arg, Glu, Gly oder Gln); Xaa bei Res. 52 = (Ile, Met, Leu, Val, Lys, Gln, Ala oder Tyr); Xaa bei Res. 53 = (Asn, Phe, Lys, Glu, Asp, Ala, Gln, Gly, Leu oder Val); Xaa bei Res. 54 = (Pro, Asn, Ser, Val oder Asp); Xaa bei Res. 55 = (Glu, Asp, Asn, Lys, Arg, Ser, Gly, Thr, Gln, Pro oder His); Xaa bei Res. 56 = (Thr, His, Tyr, Ala, Ile, Lys, Asp, Ser, Gly oder Arg); Xaa bei Res. 57 = (Val, Ile, Thr, Ala, Leu oder Ser); Xaa bei Res.

58 = (Pro, Gly, Ser, Asp oder Ala); Xaa bei Res. 59 = (Lys, Leu, Pro, Ala, Ser, Glu, Arg oder Gly); Xaa bei Res. 60 = (Pro, Ala, Val, Thr oder Ser); Xaa bei Res. 61 = (Cys, Val oder Ser); Xaa bei Res. 63 = (Ala, Val oder Thr); Xaa bei Res. 65 = (Thr, Ala, Glu, Val, Gly, Asp oder Tyr); Xaa bei Res. 66 = (Gln, Lys, Glu, Arg oder Val); Xaa bei Res. 67 = (Leu, Met, Thr oder Tyr); Xaa bei Res. 68 = (Asn, Ser, Gly, Thr, Asp, Glu, Lys oder Val); Xaa bei Res. 69 = (Ala, Pro, Gly oder Ser); Xaa bei Res. 70 = (Ile, Thr, Leu oder Val); Xaa bei Res. 71 = (Ser, Pro, Ala, Thr, Asn oder Gly); Xaa bei Res. 2 = (Val, Ile, Leu oder Met); Xaa bei Res. 74 = (Tyr, Phe, Arg, Thr, Tyr oder Met); Xaa bei Res. 75 = (Phe, Tyr, His, Leu, Ile, Lys, Gln oder Val); Xaa bei Res. 76 = (Asp, Leu, Asn oder Glu); Xaa bei Res. 77 = (Asp, Ser, Arg, Asn, Glu, Ala, Lys, Gly oder Pro); Xaa bei Res. 78 = (Ser, Asn, Asp, Tyr, Ala, Gly, Gln, Met, Glu, Asn oder Lys); Xaa bei Res. 79 = (Ser, Asn, Glu, Asp, Val, Lys, Gly, Gln oder Arg); Xaa bei Res. 80 = (Asn, Lys, Thr, Pro, Val, Ile, Arg, Ser oder Gln); Xaa bei Res. 81 = (Val, Ile, Thr oder Ala); Xaa bei Res. 82 = (Ile, Asn, Val, Leu, Tyr, Asp oder Ala); Xaa bei Res. 83 = (Leu, Tyr, Lys oder Ile); Xaa bei Res. 84 = (Lys, Arg, Asn, Tyr, Phe, Thr, Glu oder Gly); Xaa bei Res. 85 = (Lys, Arg, His, Gln, Asn, Glu oder Val); Xaa bei Res. 86 = (Tyr, His, Glu oder Ile); Xaa bei Res. 87 = (Arg, Glu, Gln, Pro oder Lys); Xaa bei Res. 88 = (Asn, Asp, Ala, Glu, Gly oder Lys); Xaa bei Res. 89 = (Met oder Ala); Xaa bei Res. 90 = (Val, Ile, Ala, Thr, Ser oder Lys); Xaa bei Res. 91 = (Val oder Ala); Xaa bei Res. 92 = (Arg, Lys, Gln, Asp, Glu, Val, Ala, Ser oder Thr); Xaa bei Res. 93 = (Ala, Ser, Glu, Gly, Arg oder Thr); Xaa bei Res. 95 = (Gly, Ala oder Thr); Xaa bei Res. 97 = (His, Arg, Gly, Leu oder Ser). Weiterhin ist nach Res. 53 in rBMP-3b und mGDF-10 ein Ile; nach Res. 54 in GDF-1 ist ein T; nach Res. 54 in BMP-3 ist ein V; nach Res. 78 in BMP-8 und Dorsalin ist ein G; after Res. 37 in hGDF-1 ist Pro, Gly, Gly, Pro.

[0053] Die generische Sequenz 10 (SEQ ID NO: 7) ist zu Erläuterungszwecken gezeigt und schließt die gesamte generische Sequenz 9 (SEQ ID NO: 6) ein, und sie schließt zusätzlich die nachfolgende Sequenz (SEQ ID NO: 9) an ihrem N-Terminus ein:

SEQ ID NO: 9

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

[0054] Demgemäß ist, beginnend mit Res. 6, jedes „Xaa“ einer generischen Sequenz 10 eine spezifizierte Aminosäure, definiert wie für die generische Sequenz 9 mit dem Unterschied, dass jede Restenummer, die für die generische Sequenz 9 beschrieben ist, um 5 in der generischen Sequenz 10 verschoben ist. Somit betrifft „Xaa bei Res. 1 = (Tyr, Phe, His, Arg, Thr, Lys, Gln, Val oder Glu“) in der generischen Sequenz 9 Xaa bei Res. 6 einer generischen Sequenz 9 Xaa bei Res. 6 einer generischen Sequenz 10. In der generischen Sequenz 10 ist Xaa bei Res. 2 = (Lys, Arg, Gln, Ser, His, Glu, Ala oder Cys); Xaa bei Res. 3 = (Lys, Arg, Met, Lys, Thr, Leu, Tyr oder Ala); Xaa bei Res. 4 = (His, Gln, Arg, Lys, Thr, Leu, Val, Pro oder Tyr); und Xaa bei Res. 5 = (Gln, Thr, His, Arg, Pro, Ser, Ala, Gln, Asn, Tyr, Lys, Asp oder Leu).

[0055] Auf Grundlage des Alignments des natürlich vorkommenden Morphogens innerhalb der Definition der generischen Sequenz 10 sollte klar sein, dass Lücken und/oder Insertionen einer oder mehrerer Aminosäurereste toleriert werden können (ohne die biologische Aktivität in Frage zu stellen), zumindest zwischen oder einschließend die Reste 11-12, 42-43, 59-60, 68-69 und 83-84.

[0056] Wie oben erwähnt, weisen bestimmte gegenwärtig bevorzugte morphogenetische Polypeptidsequenzen, die in dieser Erfindung von Nutzen sind, mehr als 60% Identität, vorzugsweise mehr als 65% Identität mit der Aminosäuresequenz auf, die die bevorzugte Referenzsequenz von hOP-1 definiert. Diese speziell bevorzugten Sequenzen schließen Allel- und phylogenetische Gegenstückvarianten der OP-1 und OP-2-Proteine ein, einschließlich des Drosophila-60A-Proteins, ebenso wie die eng verwandten Proteine BMP-5, BMP-6 und Vgr-1. Demgemäß schließen innerhalb des Schutzmfangs der beigefügten Ansprüche in bestimmten besonders bevorzugten Ausführungsformen nützliche morphogenetische Proteine aktive Proteine ein, die zwei Polypeptid-Ketten innerhalb der generischen Aminosäuresequenz, die hierin als „OPX“ (SEQ ID NO: 3) bezeichnet wird, ein, die das 7-Cystein-Skelett definiert und die Homologien zwischen mehreren identifizierten Varianten von OP-1 und OP-2 aufnimmt. Demgemäß ist jedes „Xaa“ an einer vorgegebenen Position in OPX unabhängig von den Resten ausgewählt, die an der entsprechenden Position in der C-terminalen Sequenz von Maus- oder humanem OP-1 oder OP-2 auftreten. Insbesondere ist jedes „Xaa“ unabhängig aus einer Gruppe einer oder mehrerer spezifizierter Aminosäuren, wie unten definiert, ausgewählt:

Cys	Xaa	Xaa	His	Glu	Leu	Tyr	Val	Ser	Phe	Xaa	Asp	Leu	Gl	Trp	Xaa	Asp	Trp	
1				5					10					15				
Xaa	Ile	Ala	Pro	Xaa	Gly	Tyr	Xaa	Ala	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly	Glu	Cys	Xaa	Phe	Pro
	20				25						30				35			
Leu	Xaa	Ser	Xaa	Met	Asn	Ala	Thr	Asn	His	Ala	Ile	Xaa	Gln	Xaa	Leu	Val	His	Xaa
							40						50				55	
Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Val	Pro	Lys	Xaa	Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Xaa	Leu	Xaa	Ala	
							60						65			70		
Xaa	Ser	Val	Leu	Tyr	Xaa	Asp	Xaa	Ser	Xaa	Asn	Val	Ile	Leu	Xaa	Lys	Xaa	Arg	
	75						80						85			90		
Asn	Met	Val	Val	Xaa	Cys	Gly	Cys	His										
						95							100					

wobei Xaa bei Res. 2 = (Lys oder Arg); Xaa bei Res. 3 = (Lys oder Arg); Xaa bei Res. 11 = (Arg oder Gln); Xaa bei Res. 16 = (Gln oder Leu); Xaa bei Res. 19 = (Ile oder Val); Xaa bei Res. 23 = (Glu oder Gln); Xaa bei Res. 26 = (Ala oder Ser); Xaa bei Res. 35 = (Ala oder Ser); Xaa bei Res. 39 = (Asn oder Asp); Xaa bei Res. 41 = (Tyr oder Cys); Xaa bei Res. 50 = (Val oder Leu); Xaa bei Res. 52 = (Ser oder Thr); Xaa bei Res. 56 = (Phe oder Leu); Xaa bei Res. 57 = (Ile oder Met); Xaa bei Res. 58 = (Asn oder Lys); Xaa bei Res. 60 = (Glu, Asp oder Asn); Xaa bei Res. 61 = (Thr, Ala oder Val); Xaa bei Res. 65 = (Pro oder Ala); Xaa bei Res. 71 = (Gln oder Lys); Xaa bei Res. 73 = (Asn oder Ser); Xaa bei Res. 75 = (Ile oder Thr); Xaa bei Res. 80 = (Phe oder Tyr); Xaa bei Res. 82 = (Asp oder Ser); Xaa bei Res. 84 = (Ser oder Asn); Xaa bei Res. 89 = (Lys oder Arg); Xaa bei Res. 91 = (Tyr oder His); and Xaa bei Res. 97 = (Arg oder Lys).

[0057] Bei einer noch weiteren bevorzugten Ausführungsform weisen nützliche morphogenetisch aktive Proteine innerhalb des Schutzmfangs der Ansprüche Polypeptid-Ketten mit Aminosäuresequenzen auf, die eine durch eine Nukleinsäure codierte Sequenz umfassen, die unter niederstringenten, mittelstringenten oder hochstringenten Hybridisierungs-bedingungen an DNA oder RNA hybridisiert, die Referenzmorphogensequenzen codieren, beispielsweise C-terminale Sequenzen, die die konservierten 7-Cystein-Domänen von OP-1, OP-2, BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, 60A, GDF-3, GDF-5, GDF-6 GDF-7 und dergleichen definieren. Wie hierin verwendet, sind Hochstringenz-Hybridisierungs-bedingungen als Hybridisierung gemäß bekannter Techniken in 40% Formamid, 5 X SSPE, 5 X Denhardts-Lösung und 0,1 % SDS bei 37°C über Nacht und Waschen in 0,1 X SSPE, 0,1 % SDS bei 50°C definiert. Standard-Stringenzbedingungen sind in Texten zur Standard-Molekularbiologie-Klonierung wohl charakterisiert. Siehe beispielsweise Molecular Cloning a Laboratory Manual 2. Ausgabe, herausgegeben von Sambrook, Fritsch und Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Bd. 1 und 2 (D.N. Glover, Hsg., 1985), Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, Hsg., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins, Hsg., 1984); und B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984).

[0058] Demgemäß können die in den Materialien und Verfahren dieser Erfindung nützlichen morphogenetischen Proteine Proteine einschließen, die irgendeine der oben beschriebenen Polypeptid-Ketten umfassen, gleichgültig, ob sie aus natürlich vorkommenden Quellen isoliert oder durch DNA-Rekombinations- oder andere Synthese-Techniken erzeugt wurden und schließen Allel- und phylogenetische Gegenstückvarianten dieser Proteine, ebenso wie biosynthetische Varianten (Muteine) hiervon und verschiedene trunkierte und Fusionskonstrukte ein. Deletions- oder Additionsmutanten werden ebenfalls als aktiv angesehen, einschließlich solcher, die die konservierte C-terminale 6- oder 7-Cystein-Domäne verändern, vorausgesetzt, dass die Veränderung die Beziehung dieser Cysteine in der gefalteten Struktur nicht stört. Demgemäß werden solche aktiven Formen als den hierin spezifisch beschriebenen äquivalent betrachtet. Die Proteine können Formen einschließen, die variierende Glycosylierungsmuster, variierende N-Termini, eine Familie von verwandten Proteinen mit Bereichen einer Aminosäuresequenzhomologie, und die aktive trunkierte oder mutierte Formen nativer oder biosynthetischer Proteine einschließen, die durch Expression rekombinanter DNA in Wirtszellen erzeugt wird.

[0059] Die hierin betrachteten Knochen-morphogenetischen Proteine können aus intakter oder trunkierter cDNA oder aus synthetischen DNAs in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen exprimiert und aufgereinigt, gespalten, erneut gefaltet und dimerisiert werden, so dass morphogenetisch aktive Zusammensetzungen gebildet werden. Gegenwärtig schließen bevorzugte Wirtszellen ohne Einschränkung Prokaryonten,

einschließlich E.coli und Eukaryonten, einschließlich Hefe und Säugetierzellen, wie beispielsweise CHO-, COS- oder BSC-Zellen ein. Der Fachmann auf dem Gebiet wird anerkennen, dass andere Wirtszellen vorteilhaft verwendet werden können. Ausführliche Beschreibungen der morphogenetischen Proteine, die in der Ausübung dieser Erfindung von Nutzen sind, schließen ein, wie diese herzustellen, zu verwenden und diese auf eine Aktivität zu testen sind, und dies ist in zahlreichen Veröffentlichungen offenbart, einschließlich solcher, die hierin aufgeführt sind, deren Offenbarungen durch diese Bezugnahme hierin mit aufgenommen sind. Demgemäß kann der auf dem Gebiet tätige Gentechniker/Molekularbiologe unter Verwendung von molekularbiologischen Standardtexten und -verfahren und durch das in der Technik verfügbare Wissen Gene aus cDNA oder genomischen Bibliotheken verschiedener unterschiedlicher biologischer Spezies isolieren, die geeignete Aminosäuresequenzen codieren oder DNAs aus Oligonukleotiden konstruieren, kann darauf diese in verschiedenen Typen von Wirtszellen exprimieren, einschließlich sowohl Prokaryonten als auch Eukaryonten, um große Mengen aktiver Proteine zu erzeugen, die zur Stimulierung von Nervengewebsmorphogenese in einem Säugetier in der Lage sind.

C. Säugetiere, die zur Behandlung geeignet sind

[0060] Als allgemeine Angelegenheit kann die vorliegende Erfindung auf die Behandlung irgendeines Säugetiersubjektes angewendet werden, das durch eine ischämische Verletzung des Zentralnervensystems beeinträchtigt ist. Das Verfahren kann mit Säugetieren praktiziert werden, in die traumatische Verletzung sich zumindest 6 Stunden vor Beginn der Behandlung, beispielsweise 12, 24 oder 48 Stunden oder länger vor der Behandlung ereignete. Die Ausübung der Erfindung verleiht dem beeinträchtigten Säugetier einen signifikanten klinischen Vorteil dahingehend, als die Erfindung eine nachweisbare, klinisch signifikante Wiederherstellung einer motorischen Koordinationsfunktion des Zentralnervensystems wie hierin definiert, mit sich bringt. Die Erfindung ist zur Behandlung jedes Primaten, vorzugsweise eines höheren Primaten wie beispielsweise eines Menschen, geeignet. Zusätzlich kann die Erfindung bei der Behandlung domestizierter Tiere verwendet werden, die als Begleiter des Menschen gehalten werden (beispielsweise Hunde, Katzen, Pferde), die einen signifikanten kommerziellen Wert aufweisen (beispielsweise Ziegen, Schweine, Schafe, Rinder, Sport- oder Zugtiere), die einen signifikanten wissenschaftlichen Wert aufweisen (beispielsweise gefangene freie Exemplare gefährdeter Spezies oder durch Inzucht erzeugte oder gentechnisch veränderte Tierstämme), oder Tiere, die in anderer Weise einen Wert aufweisen. Ein Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet der medizinischen oder tiermedizinischen Wissenschaften ist darin trainiert zu erkennen, ob ein Tier von einer ischämischen oder traumatischen Verletzung des Zentralnervensystems beeinträchtigt ist oder nicht. Beispielsweise zeigen Routine-Tests und/oder klinische oder veterinärdiagnostische Auswertungen, ob das Tier eine Verschlechterung oder einen Verlust des Zentralnervensystems erworben hat (beispielsweise neurologische) Funktion. Klinische und nicht-klinische Indikationen, ebenso wie angehäufte Erfahrung bezüglich der offenbarten und anderer Verfahren zur Behandlung sollten den befähigten Fachmann in geeigneter Weise bei der Entscheidung informieren, ob ein vorgegebenes Individuum von einer ischämischen oder traumatischen Verletzung des Zentralnervensystems beeinträchtigt ist und ob irgendeine spezielle Behandlung für die Bedürfnisse des Subjekts am besten geeignet ist.

D. Formulierung und Verfahren der Behandlung

[0061] Die Morphogene, die bei der Erfindung brauchbar sind, können durch irgendeinen Weg verabreicht werden, der mit dem speziellen Morphogen, Induktor oder Agonisten, der verwendet wird, kompatibel ist. Somit kann, wie geeignet, die Verabreichung oral oder parenteral sein, einschließlich intravenöser und intraperitonealer Verabreichungswege. Zusätzlich kann die Verabreichung durch periodische Injektionen eines Bolus des Morphogens, Induktors oder Agonisten erfolgen oder kann kontinuierlicher durch intravenöse oder intraperitoneale Verabreichung aus einem Reservoir durchgeführt werden, das extern ist (beispielsweise ein i.v.-Beutel) oder intern ist (beispielsweise ein bioerodierbares Implantat oder eine Kolonie implantierter, Morphogen-produzierender Zellen).

[0062] Die bei der Erfindung brauchbaren therapeutischen Mittel (d.h. Morphogene) können einem Individuum durch geeignete Mittel verabreicht werden, direkt (beispielsweise lokal, wie durch Injektion, Implantation oder topische Verabreichung an einen Gewebsort) oder systemisch (beispielsweise parenteral oder oral). Wo das Mittel parenteral, beispielsweise intravenös, subkutan, intramolekular, ophthalmisch, intraperitoneal, intramuskulär, bukal, rektal, vaginal, intraorbital, intrazerebral, intracranial, intraspinal, intraventrikulär, intrathekal, intracisternal, intracapsulär, intranasal oder durch Aerosol-Verabreichung verabreicht werden soll, bildet das Mittel vorzugsweise den Teil einer wässrigen Lösung. Die Lösung ist physiologisch verträglich, so dass zusätzlich zur Abgabe des erwünschten Mittels an den Patienten die Lösung ansonsten den Elektrolyt- und/oder Volumenhaushalt des Patienten nicht nachteilig beeinflusst. Das wässrige Medium für das Mittel kann somit nor-

male bzw. physiologische Salzlösung umfassen (beispielsweise 9,85% NaCl, 0,15 M, pH 7-7,4).

[0063] Falls es erwünscht ist, kann ein vorgegebenes Morphogen oder ein anderes Mittel durch Verbindung mit einem geeigneten Molekül löslicher gemacht werden. Beispielsweise hat eine Verbindung des reifen Morphogen-Dimers mit der Pro-Domäne die Pro-Form des Morphogens zur Folge, die typischerweise in physiologischen Lösungen löslicher oder dispergierbarer als die entsprechende reife Form ist. Es wird tatsächlich angenommen, dass endogene Morphogene in dieser Form in den Säugetierkörper transportiert (beispielsweise sezerniert und im Kreislauf geführt) werden. Diese lösliche Form des Proteins kann aus einem Kulturmedium Morphogen-sezernierender Säugetierzellen gewonnen werden, beispielsweise durch Zellen, die mit einer Nukleinsäure transfiziert werden, die das Morphogen codiert, und die zu deren Expression befähigt sind. Alternativ kann eine lösliche Spezies durch Komplexieren des reifen, morphogenetisch aktiven Polypeptid-Dimers (oder eines aktiven Fragmentes hiervon) mit einer Morphogen-Prodome oder einem Löslichkeits-steigern-dem Bruchstück hiervon komplexiert werden. Die Löslichkeits-erhöhenden Prodome-Fragmente können jedes N-terminale, C-terminale oder interne Fragment der Proregion eines Elements der Morphogenfamilie sein, die mit dem reifen Polypeptid-Dimer komplexiert, um Stabilität und/oder Unlöslichkeit des sich ergebenden nicht-kovalenten oder kovalenten Komplexes zu erhöhen. Typischerweise sind nützliche Fragmente solche, die an der proteolytischen Stelle Arg-Xaa-Xaa-Arg gespalten werden. Eine ausführliche Beschreibung von löslichen Komplexformen morphogenetischer Proteine, einschließlich wie diese herzustellen, zu testen und zu verwenden sind, ist in der WO 94/03600 beschrieben (PCT/US93/07189). Im Falle von OP-1 schließen nützliche Prodome-Fragmente die intakte Pro-Domäne (Reste 30-292) und die Fragmente 48 bis 292 oder 158 bis 292 ein, alle von SEQ ID NO: 5. Ein weiteres Molekül, das zur Steigerung der Löslichkeit und insbesondere für orale Verabreichungen von Nutzen ist, ist Kasein. Beispielsweise erhöht der Zusatz von 0,2 % Kasein die Löslichkeit der reifen aktiven Formen von OP-1 um 80 %. Weitere Bestandteile, die in der Milch und/oder verschiedenen Serumproteinen zu finden sind, können ebenfalls von Nutzen sein.

[0064] Nützliche Lösungen zur parenteralen Verabreichung können durch irgendeines der in der pharmazeutischen Technik wohl bekannten Verfahren hergestellt werden, die beispielsweise in Remingtons Pharmaceutical Sciences (Gennaro, A., Hrsg.), Mack Publishing, 1990, beschrieben sind. Formulierungen für die therapeutischen Mittel der Erfindung können beispielsweise Polyalkylenglycole, wie beispielsweise Polyethylenglycol, Öle pflanzlichen Ursprungs, hydrierte Naphthalene und dergleichen einschließen. Formulierungen zur direkten Verabreichungen können insbesondere Glycerol oder andere Zusammensetzungen mit hoher Viskosität einschließen, um dabei behilflich zu sein, das Mittel am erwünschten Ort zu halten. Biokompatible, vorzugsweise bioresorbierbare Polymere, die beispielsweise Hyaluronsäure, Collagen, Tricalciumphosphat, Polybutyrat, Lactid und Glycolid-Polymere und Lactid/Glycolid-Copolymere einschließen, können nützliche Trägerstoffe sein, um die Freisetzung des Mittels in vivo zu steuern. Weitere potentiell nützliche parenterale Abgabesysteme für diese Mittel schließen Ethylenvinylacetat-Copolymerteilchen, osmotische Pumpen, implantierbare Infusionssysteme und Liposomen ein. Zubereitungen zur Inhalationsverabreichung enthalten als Trägermittel beispielsweise Lactose oder können wässrige Lösungen sein, die beispielsweise Polyoxyethylen-9-laurylether, Glycocholat und Desoxycholat enthalten oder ölige Lösungen zur Verabreichung in Form von Nasentropfen oder als Gel, das intranasal aufgebracht werden soll. Formulierungen zur parenteralen Verabreichung können ebenfalls Glycocholat zur bukalen Verabreichung, Methoxysalicylat zur rektalen Verabreichung oder Zitronensäure zur vaginalen Verabreichung einschließen. Suppositorien zur rektalen Verabreichung können ebenfalls durch Vermischen des Morphogens, Induktors oder Agonist mit einem nicht-reizenden Trägerstoff, wie beispielsweise Kakaobutter oder anderen Zusammensetzungen, hergestellt werden, die bei Raumtemperatur fest sind und bei Körpertemperatur flüssig sind.

[0065] Formulierungen zur topischen Verabreichung an die Hautoberfläche können durch Dispergieren des Morphogens, Induktors oder Agonist mit einem dermatologisch verträglichen Träger, wie beispielsweise einer Lotion, Creme, Salbe oder Seife, hergestellt werden. Besonders nützlich sind Träger, die zur Bildung eines Films oder einer Schicht über der Haut in der Lage sind, um die Aufbringung zu lokalisieren oder ein Entfernen zu hemmen. Zur topischen Verabreichung an Oberflächen von innerem Gewebe kann das Mittel in einem flüssigen Gewebs-Klebstoff oder einer anderen Substanz dispergiert werden, von der bekannt ist, dass sie die Adsorption an eine Geweboberfläche steigert. Beispielsweise können Hydroxypropylcellulose oder Fibringen/Thrombin-Lösungen in vorteilhafter Weise verwendet werden. Alternativ können Gewebs-beschichtende Lösungen, wie beispielsweise Pektin enthaltende Zubereitungen, verwendet werden.

[0066] Alternativ können die hierin beschriebenen Mittel oral verabreicht werden. Eine orale Verabreichung von Proteinen als Therapeutika wird im Allgemeinen nicht praktiziert, weil die meisten Proteine durch Verdauungsenzyme und Säuren im Säugetierverdauungssystem leicht abgebaut werden, bevor sie in den Blutstrom absorbiert werden können. Jedoch sind die hierin beschriebenen Morphogene typischerweise Säure-stabil und

Protease-beständig (siehe beispielsweise US-Patent Nr. 4 968 590). Zusätzlich wurde zumindest ein Morphogen, nämlich OP-1, in Brustdrüsenextrakt, Kolostrum und 57-Tage-Milch identifiziert. Darüber hinaus ist OP-1, aufgereinigt aus Brustdrüsenextrakt, morphogenetisch aktiv und ist ebenfalls im Blutstrom nachzuweisen. Die mütterliche Verabreichung über die aufgenommene Milch kann ein natürlicher Abgabeweg von Proteinen der TGF-β-Superfamilie sein. Letterio et al., (1994) Science 264: 1936-1938, berichten, dass TGF-β in der murinen Milch vorliegt, und dass radiomarkiertes TGF-β durch die Magenschleimhaut säugender Kleinkinder absorbiert wird. Markiertes, aufgenommenes TGF-β erscheint rasch in intakter Form in den Körpervgeweben von Jugendlichen, einschließlich der Lunge, dem Herz und der Leber. Zuletzt ist das Morphogen in löslicher Form, beispielsweise das reife Morphogen, das mit der Pro-Domäne in Verbindung steht, morphogenetisch aktiv. Diese Erkenntnisse, ebenso wie diejenigen, die in den Beispielen nachstehend offenbart sind, zeigen, dass die orale und parenterale Verabreichung mögliche Mittel zur Verabreichung von Proteinen der TGF-β-Superfamilie, einschließlich der Morphogene, an ein Individuum sind. Zusätzlich ist die in der Milch zu findende Morphogen-Form (und Brustdrüsenextrakt und Kolostrum) leicht löslich, wohingegen die reifen Formen bestimmter Morphogene, die hierin beschrieben sind, typischerweise kaum löslich sind, vielleicht durch Verbindung der reifen, morphogenetisch aktiven Form mit einem Teil oder der gesamten Pro-Domäne der exprimierten, Voller-Länge-Polypeptid-Sequenz und/oder durch Verbindung mit einem oder mehreren Milchbestandteilen. Demgemäß können die hierin bereitgestellten Verbindungen ebenfalls mit Molekülen verbunden werden, die zu deren Löslichkeit in vitro oder in vivo in der Lage sind.

[0067] Die hierin bereitgestellten Verbindungen können ebenfalls mit Molekülen verbunden werden, die zum Richten bzw. zum Ins-Ziel-Fassen der Morphogene, Induktoren oder Agonisten zum erwünschten Gewebe in der Lage sind. Beispielsweise kann ein Antikörper, Antikörperfragment oder ein anderes Bindungsprotein, das spezifisch mit einem Oberflächenmolekül auf Zellen des erwünschten Gewebes wechselwirkt, verwendet werden. Nützliche Targeting-Moleküle können entwickelt werden, beispielsweise unter Verwendung der Etiketten-Bindungsstellentechnologie, die beispielsweise im US-Patent Nr. 5 091 513 offenbart ist. Targeting-Moleküle können mit dem Morphogen, Induktor oder Agonisten kovalent oder nicht-kovalent verbunden sein.

[0068] Wie durch den Fachmann auf dem Gebiet erkannt wird, enthalten die formulierten Zusammensetzungen therapeutisch wirksame Mengen des Morphogens. Das heißt, sie enthalten eine Menge, die geeignete Konzentrationen des Mittels an das beeinträchtigte Nervensystemgewebe für eine Zeitspanne bereitstellt, die ausreichend ist, um eine nachweisbare Wiederherstellung einer Funktion des zentralen Nervensystems zu stimulieren, bis zu und einschließlich einer vollständigen Wiederherstellung dessen. Wie dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt werden wird, variieren diese Konzentrationen abhängig von mehreren Faktoren, einschließlich der biologischen Wirksamkeit des ausgewählten Mittels, der chemischen Eigenschaften (beispielsweise Hydrophobie) des speziellen Mittels, dessen Zubereitung, einschließlich eines Gemisches mit einem oder mehreren Trägerstoffen, dem Verabreichungsweg und der ins Auge gefassten Behandlung, einschließlich der Frage, ob der aktive Inhaltsstoff direkt an eine Gewebsstelle verabreicht wird oder ob er systemisch verabreicht werden wird. Die bevorzugte zu verabreichende Dosierung hängt ebenfalls wahrscheinlich von solchen Variablen ab wie dem Zustand der erkrankten oder geschädigten Gewebe und dem Gesamtgesundheitszustand des speziellen Säugetiers. Als allgemeine Regel sind einzelne, tägliche, zweimal wöchentliche oder wöchentliche Dosierungen von 0,00001 bis 1000 mg Morphogen ausreichend, wobei 0,0001 bis 100 mg bevorzugt werden und 0,001 bis 10 mg noch mehr bevorzugt sind. Alternativ kann eine einzige, tägliche, zweimal wöchentliche oder wöchentliche Dosierung von 0,01 bis 1000 µg/kg Körpergewicht, besonders bevorzugt 0,01 bis 10 mg/kg Körpergewicht in vorteilhafter Weise verwendet werden. Die vorliegende wirksame Dosis kann in Einzeldosis oder in einer Vielzahl (2 oder mehr) von Ratendosierungen verabreicht werden, wie es erwünscht ist oder wie es unter den speziellen Umständen als geeignet erscheint. Eine Bolus-Injektion oder eine diffundierbare Infusionsformulierung kann verwendet werden. Falls es erwünscht ist, wiederholte oder häufige Infusionen zu erleichtern, kann die Implantation eines semi-permanenten Stents (beispielsweise intravenös, intraperitoneal, intracisternal oder intracapsulär) ratsam sein. In Beispiel 2 nachstehend brachte eine intracisternale Verabreichung von 6 bis 240 µg/kg des Referenzmorphogens (hOP-1) in klarer Weise nachweisbare Wiederherstellungsgrade von einer verlorengegangenen oder verschlechterten Zentralnervensystem-Funktion mit sich. Es sollte erwähnt werden, dass keine offensichtlichen Morphogen-induzierten pathologischen Läsionen entstehen, wenn reifes Morphogen (beispielsweise OP-1, 20 mg) täglich normal wachsenden Ratten für 21 aufeinanderfolgende Tage verabreicht wird. Darüber hinaus erzeugen 10 mg systemische Injektionen des Morphogens (beispielsweise von OP-1), die täglich für 10 Tage normalen neugeborenen Mäusen injiziert wurden, keine groben Abnormalitäten.

[0069] Die bei der Erfindung brauchbaren Morphogene können natürlich alleine oder in Kombination mit anderen Molekülen injiziert werden, von denen bekannt ist, dass sie in der Behandlung der hierin beschriebenen Zustände von Vorteil sind. Beispielsweise können wohl bekannte Wachstumsfaktoren, Hormone, Enzyme, the-

rapeutische Zusammensetzungen, Antibiotika oder andere bioaktive Mittel ebenfalls mit dem Morphogen verabreicht werden.

[0070] Somit können verschiedene bekannte Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise NGF, EGF, PDGF, IGF, FGF, TGF- α und TGF- β , ebenso wie Enzyme, Enzyminhibitoren, Antioxidantien, antiinflammatorische Mittel, freie Radikalfänger-Mittel, Antibiotika und/oder Chemoattraktanz/chemotaktische Faktoren in die vorliegende verabreichbare Morphogen-Formulierung eingeschlossen werden. Um die Aufnahme durch das Gewebe des Zentralnervensystems zu erleichtern, können die Morphogene derivatisiert werden oder an eine lipophile Komponente oder an eine Substanz gebunden werden, die aktiv über die Blut-Hirn-Barriere hinweg transportiert wird.

[0071] Die Ausübung der Erfindung, einschließlich zusätzlich bevorzugter Aspekte und Ausführungsformen hiervon, wird durch die nachfolgenden Beispiele noch vollständiger verständlich sein, die hierin lediglich für Veranschaulichungszwecke präsentiert sind, und sollten nicht als die Erfindung in irgendeiner Weise einschränkend aufgefasst werden.

Beispiel 1: Herstellung löslicher Morphogenproteine-Lösungen für eine in-vivo-Verabreichung

A. Wässrige Lösungen

[0072] Während die hierin definierten reifen dimeren morphogenetischen Proteine typischerweise im Wesentlichen nur wenig in physiologischen Puffern löslich sind, können diese zur Bildung injizierbarer Lösungen solubilisiert werden. Eine beispielhafte wässrige Lösung, die ein Morphogen enthält, kann beispielsweise durch Lösen oder Dispergieren des Morphogens in 50% Ethanol hergestellt werden, der Acetonitril 0,1 % Trifluoresigsäure (TFA) oder 0,1% HCl, oder in einem äquivalenten Lösungsmittel enthält. Ein Volumen der sich ergebenden Lösung wird dann beispielsweise zu 10 Volumina Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) zugesetzt, die weiterhin 0,1 bis 0,2% humanes Serumalbumin (HSA) oder ein ähnliches Trägerprotein einschließen kann. Die sich ergebende Lösung wird vorzugsweise umfassend gevortexted, um eine physiologisch verträgliche Morphogen-Zubereitung zu erzeugen.

[0073] In einer weiteren Ausführungsform kann das Morphogen, einschließlich OP-1, durch Reduzieren des pHs der Lösung solubilisiert werden. In einer gegenwärtig bevorzugten Formulierung wird das Protein in 0,2 mM Acetatpuffer, pH 4,5, der 5% Mannitol enthält, solubilisiert, um die Lösung isotonischer zu machen. Weitere Standardmittel zur Erzeugung physiologisch verträglicher Formulierungen liegen innerhalb des Fachwissens.

B. Lösliche Komplex-Formulierungen

[0074] Eine weitere, gegenwärtig bevorzugte Form des Morphogens, das hierin verwendet wird und das eine verbesserte Löslichkeit in wässrigen Lösungen aufweist, ist ein dimeres morphogenetisches Protein, das zumindest die C-terminale 7-Cystein-Domäne umfasst, die für die Morphogenfamilie charakteristisch ist, komplexiert mit einem Peptid, das eine Pro-Region eines Mitglieds der Morphogenfamilie umfasst, oder ein Löslichkeits-steigerndes Fragment hiervon, oder eine Allel- oder Spezies- oder andere Sequenzvariante hiervon. Das die Löslichkeit steigernde Fragment kann irgendein N-terminales oder C-terminales Fragment der Pro-Region eines Mitglieds der Morphogenfamilie sein, das mit dem reifen Polypeptid-Dimer komplexiert, um die Stabilität des löslichen Komplexes zu steigern. Vorzugsweise wird das dimere morphogenetische Protein mit zwei Pro-region-Peptiden komplexiert.

[0075] Wie oben und in der veröffentlichten Anmeldung WO 94/03600, deren Lehren durch Bezugnahme hierin mit aufgenommen sind, beschrieben wurde, kann der lösliche Komplex aus den Zellkulturmedien (oder eine Körperflüssigkeit) unter geeigneten Bedingungen isoliert werden. Alternativ kann der Komplex in vitro formuliert werden.

[0076] Lösliche Morphogenkomplexe können aus konditionierten Medien unter Verwendung eines einfachen, Dreischrittchromatographie-Protokolls isoliert werden, das in Abwesenheit von denaturierenden Stoffen durchgeführt wird. Das Protokoll bzw. die Vorschrift schließt ein Laufenlassen des Mediums bzw. der Medien (oder der Körperflüssigkeit) über eine Affinitätssäule, gefolgt von Ionenaustausch- und Gelfiltrationschromatographien ein, die im Allgemeinen in der WO 94/03600 beschrieben sind. Die unten beschriebene Affinitätssäule ist eine Zn-IMAC-Säule. Das Beispiel verwendete OP-1 und soll nicht darauf beschränkt sein. Die vorliegende Vorschrift weist allgemeine Anwendbarkeit für die Aufreinigung einer Vielzahl von Morphogenen auf, von denen allen angenommen wird, dass sie unter Verwendung nur geringer Modifikationen der nachstehend be-

schriebenen Vorschriften isolierbar sind. Ein alternatives Protokoll, das ebenfalls als nützlich ins Auge gefasst wird, schließt eine Immunaffinitätsäule ein, die unter Verwendung von Standardverfahren erzeugt wird und beispielsweise unter Verwendung von Antikörpern, die für eine gegebene Morphogenprodome spezifisch sind (komplexiert, beispielweise an eine Protein-A-konjugierte Sepharose-Säule). Vorschriften zur Entwicklung von Immunaffinitätsäulen sind in der Technik wohl beschrieben (siehe beispielsweise Guide to Protein Purification, M. Deutscher, Hrsg. Academic Press, San Diego, 1990, insbesondere die Abschnitte VII und XI hieron).

[0077] In diesem Beispiel wurde OP-1 in Säugetier-(CHO, Chinese hamster ovary = chinesische Hamsterovar-)Zellen, wie in der Technik beschrieben, exprimiert (siehe beispielsweise internationale Anmeldung US 90/05903 (WO 91/05802). Die CHO-Zell-konditionierten Medien, die 0,5 % FBS enthalten, werden anfänglich unter Verwendung einer immobilisierten Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt. Der lösliche OP-1-Komplex aus konditionierten Medien bindet hier selektiv an das Zn-IMAC-Harz und eine hohe Konzentration an Imidazol (50 mM Imidazol, pH 8,0) ist für die effektive Elution des gebundenen Komplexes erforderlich. Das Zn-IMAC-aufgereinigte lösliche OP-1 wird als nächstes auf eine S-Sepharose-Kationen-Austauschsäule aufgebracht, die in 20 mM NaPO₄ (pH 7,0) mit 50 mM NaCl äquilibriert wurde. Das Protein wird dann auf eine Sephadryl S-200HR-Säule aufgebracht, die in TBS äquilibriert wurde. Unter Verwendung des im Wesentlichen selben Protokolls können lösliche Morphogene ebenfalls von einer oder mehreren Körperflüssigkeiten isoliert werden, einschließlich Serum, zerebrospinaler Flüssigkeit oder peritonealer Flüssigkeit.

[0078] Der lösliche OP-1-Komplex eluiert mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 110 kDa. Dies stimmt gut mit der vorhergesagten Zusammensetzung des löslichen OP-1-Komplexes mit einem reifen OP-1-Dimer (35-36 kDa) überein, das mit zwei Pro-Domänen (39 kDa jeweils) assoziiert ist. Die Reinheit des Endkomplexes kann durch Laufenlassen der geeigneten Fraktion in einem reduzierten 15%-Polyacrylamidgel verifiziert werden.

[0079] Als eine Alternative zur Aufreinigung löslicher Komplexe aus Kulturmedien oder einer Körperflüssigkeit können lösliche Komplexe aus gereinigten Pro-Domänen und reifen dimeren Spezies formuliert werden. Eine erfolgreiche Komplexbildung erfordert anscheinend die Bindung der Bestandteile unter denaturierenden Bedingungen, die ausreichend sind, um die gefaltete Struktur dieser Moleküle zu entspannen, ohne die Disulfid-Brücken zu beeinträchtigen. Vorzugsweise ahmen die Denaturierungsbedingungen die Umgebung eines intrazellulären Vesikels ausreichend nach, so dass die gespaltene Pro-Domäne eine Möglichkeit hat, sich mit der reifen dimeren Spezies unter entspannten Faltungsbedingungen zu verbinden. Die Konzentration an Denaturierungsmittel in der Lösung wird dann in einer kontrollierten, vorzugsweise schrittweisen Art gesenkt, um eine richtige erneute Faltung des Dimers und von Pro-Regionen zu ermöglichen, wohingegen die Verbindung der Pro-Domäne mit dem Dimer aufrechterhalten wird. Nützliche Denaturantien schließen 4-6 M Urea oder Guanidinhydrochlorid (GuHCl) in gepufferten Lösungen von pH 4-10, vorzugsweise 6-8, ein. Der lösliche Komplex wird dann durch kontrollierte Dialyse oder Verdünnung zu einer Lösung gebildet, die eine Enddenaturierungsmittel-Konzentration von weniger als 0,1-2 M Urea oder GuHCl aufweist, vorzugsweise 1-2 M Urea oder GuHCl, die dann vorzugsweise zu einem physiologischen Puffer verdünnt werden kann. Proteinaufreinigungs/Re-naturierungsverfahren und Erwägungen sind in der Technik wohl beschrieben und Details bezüglich der Entwicklung einer geeigneten Renaturierungsvorschrift können in einfacher Weise durch den Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet bestimmt werden. Ein nützlicher Text bezüglich dieses Gegenstandes ist Guide to Protein Purification, M. Deutscher, Hrsg. Academic Press, San Diego, 1990, insbesondere Abschnitt V. Die Komplexbildung kann ebenfalls durch Zusatz eines oder mehrerer Chaperon-Proteine unterstützt werden.

[0080] Die Stabilität des hoch gereinigten löslichen Morphogenkomplexes in einem physiologischen Puffer, beispielsweise Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) und Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) kann durch mehrere Mittel gesteigert werden, einschließlich irgendeiner oder mehrerer dreier Klassen von Zusatzstoffen bzw. Additiven. Diese Additive schließen basische Aminosäuren ein (beispielsweise L-Arginin, Lysin und Biotin); an nicht ionische Detergentien (beispielsweise Tween 80 oder Nonidet P-120); und Trägerproteine (beispielsweise Serumalbumin und Casein). Nützliche Konzentrationen dieser Additive schließen 1-100 mM, vorzugsweise 10-70 mM, einschließlich 50 mM basische Aminosäure ein; 0,01-1,0 %, vorzugsweise 0,05-0,2 %, einschließlich 0,1 % (V/V) nicht-ionisches Detergens bzw. Tensid; und 0,01-1,0 %, vorzugsweise 0,05-0,2 %, einschließlich 0,1 % (G/V) Trägerprotein.

Beispiel 2: Schlaganfallmodell, das den chirurgischen Verschluss der Gehirnarterie einschließt

[0081] Das mittlere Cerebralarterien (MCA)-Okklusionsmodell ist ein wohl akzeptiertes Modell für eine fokale ischämische Episode oder für einen Schlaganfall (Gotti et al. (1990), Brain Res. 522: 290-307). Die fokale Ischämie wird durch Obstruktion der Blutströmung durch die MCA erzeugt, was eine Infarktion des Gehirnortes,

der von dieser Arterie versorgt wird, zur Folge hat. Das MCA-Modell ergibt für die Fähigkeit oder Leistungsfähigkeit von Arzneistoffen, beispielsweise von Morphogen, eine angemessene Vorhersage, um die funktionelle Erholung bzw. Wiederherstellung bei Menschen, bei denen Zentralnervensystem-Gewebe aufgrund eines Schlaganfalls geschädigt oder verloren ging, zu ändern. Beispielsweise wird das MCA-Modell als ausreichend vorhersagekräftig für die Arzneistoffwirksamkeit zur Wiederherstellung oder nachweisbaren Verbesserung der motorischen Koordination, der Sinneswahrnehmung, der Sprachfähigkeit oder einer anderen Zentralnervensystem-Funktion angesehen, die natürlicherweise Gewebe innerhalb des Territoriums der MCA zugeschrieben wird.

[0082] Tiere, die beginnend 24 Stunden nach Verschluss der MCA mit OP-1 behandelt werden, verhielten sich in einer Vielzahl von funktionellen/Verhaltenstests signifikant besser als Träger-behandelte Tiere, wie nachstehend beschrieben wird.

I. Chirurgisches Okklusionsverfahren

[0083] Die in dieser Studie verwendeten Tiere waren männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von 250-300 g (Charles River). Für chirurgische Verfahren wurden die Tiere mit 2 % Halothan in 70 % NO₂/30 % O₂ anästhetisiert. Die Schwanzarterie wurde kanüliert, um Blutgase und Blutglukose zu überwachen. Die Körpertemperatur wurde unter Verwendung einer rektalen Sonde gemessen und wurde mit einem Heizkissen bei 37 + 0,5 °C gehalten. Die proximale rechte mittlere Cerebralarterie (MCA) wurde permanent unter Verwendung einer Modifikation des Verfahrens von Tamura et al. (1981, J. Cereb. Blood Flow Metab. 1: 53-60) verschlossen. Kurz gesagt, wurde die proximale MCA transcranial ohne Entfernung des zygomatischen Bogens oder durch Umsetzen des Gesichtsnerven exponiert. Die Arterie wurde dann unter Verwendung eines bipolaren Mikrokoagulators aus der Nähe des olfaktorischen Traktes zur unteren Gehirnvene elektrokoaguliert und wurde dann durchschnitten (Bederson, et al. (1986), Stroke 17: 472-476). Die Ratten wurden beobachtet, als sie das Bewusstsein wiedererlangten und wurden dann in ihre Heimatkäfige verbracht. Cefazolin-natrium (40 mg/kg, i.p.), ein Antibiotikum, wurde allen Tieren am Tag vor und gerade nach der Schlaganfall-Chirurgie verabreicht, um einer Infektion vorzubeugen. Während der Schlaganfall-Chirurgie existierten keine Unterschiede bezüglich der Konzentrationen an Blutgasen oder Glucose zwischen den Tieren, die danach OP-1 oder eine Träger-Behandlung empfingen.

II. Verabreichung des Morphogens

[0084] Tiere in der Behandlungsgruppe empfingen OP-1 intracisternal in einer Dosis von 1 oder 10 µg/Injektion. Kontrolltiere empfingen Trägerlösungen, denen OP-1 fehlte, jedoch mit allen anderen Bestandteilen in äquivalenten Endkonzentrationen.

[0085] Um die Injektion zu verabreichen, wurden die Tiere mit Halothan in 70 % NO₂/30 % O₂ anästhetisiert und in einem stereotaktischen Rahmen angeordnet. Das Verfahren für eine intracisternale Injektion von OP-1 enthaltenden Lösungen oder nur Trägerstoff enthaltenden Lösungen war identisch: Unter Verwendung einer aseptischen Technik wurden OP-1 (1 oder 10 µg/Injektion) oder ein äquivalentes Volumen von Träger durch perkutane Injektion (10 µg/Injektion) in die Cisterna magna unter Verwendung einer Hamilton-Spritze, die mit einer 26-Zoll-Nadel ausgestattet war (Yamada et al. (1991), J. Cereb. Blood Flow Metab. 11: 472-478) eingebracht. Vor jeder Injektion wurden 1-2 µl cerebrospinaler Flüssigkeit (cerebrospinal fluid = CSF) durch die Hamilton-Spritze zurückgezogen, um die Nadelanordnung im Subarachnoidalraum zu verifizieren. Vorläufige Studien zeigten, dass ein Farbstoff, 1 % Evans-Blau, auf diese Weise verabreicht, frei durch die basalen Cisternen und über die Hirnrinde innerhalb 1 Stunde nach Injektion diffundierte. Die Tiere wurden nach dem Zufallsprinzip entweder der OP-1-Behandlungsgruppe oder der Trägerbehandlungsgruppe zugeordnet.

[0086] In einer ersten Studie wurden intracisternale Injektionen (10 µg/Injektion OP-1 oder Träger) zweimal wöchentlich für 4 Wochen durchgeführt, startend 24 Stunden nach dem Schlaganfall (d. h. an den Post-Schlaganfalltagen 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 und 25). In einer zweiten Studie empfingen Tiere zwei intracisternale Injektionen (2 × 1 µg/Injektion OP-1, 2 × 10 µg/Injektion OP-1 oder 2 × Träger); wobei die erste Injektion 24 Stunden nach dem Schlaganfall verabreicht wurde und die zweite Injektion 4 Tage nach dem Schlaganfall verabreicht wurde. In einer dritten Studie wurde eine einzige Injektion (10 µg/Injektion OP-1 oder Trägerstoff) 24 Stunden nach dem Schlaganfall verabreicht.

III. Verhaltenstest

[0087] Um die Tiere an die Behandlung zu gewöhnen, was für ein Verhaltens-/funktionelles Testen notwendig

wäre, wurden diese drei Tage vor dem chirurgischen Eingriff für jeweils 10 Minuten/Tag behandelt. Im Anschluss an den chirurgischen Eingriff wurden diese in einzelnen bzw. individuellen Käfigen gehalten. Vier Standardfunktions-/Verhaltenstests wurden dazu verwendet, die sensorimotorische und Reflexfunktion nach Infarkt festzustellen. Die Tests wurden in der Literatur vollständig, einschließlich Bederson et al. (1986), Stroke 17: 472-476; DeRyck, et al. (1992), Brain Res. 573: 44-60; Markgraf et al. (1992), Brain Res. 575: 238-246; und Alexis et al. (1995), Stroke 26: 2338-2346, beschrieben.

A. Der Anordnungstest für die vorderen Gliedmaßen

[0088] Der vordere-Gliedmaßen-Anordnungs-Test umfasst drei Untertests. Getrennte Scores werden für jede vordere Gliedmaße erzielt. Für den visuellen Anordnungssubtest wird das Tier durch den Forscher aufrecht gehalten und in die Nähe einer Tischplatte gebracht. Eine normale Anordnung der Gliedmaße auf dem Tisch wird als "0" gescored, und eine verzögerte Anordnung (< 2 Sek.) wird als "1" gescored und keine oder eine sehr verzögerte Anordnung (> 2 Sek.) wird als "2" gescored. Getrennte Scores werden zuerst erzielt, wenn das Tier nach vorne gebracht wird, und dann wiederum, wenn das Tier seitwärts auf den Tisch gebracht wurde (maximaler Score pro Gliedmaße = 4; in jedem Fall bezeichnen höhere Zahlen größere Defizite). Für den taktilen Anordnungs-Untertest wurde das Tier so gehalten, dass es die Tischplatte nicht sehen oder mit seinen Schnurrhaaren berühren kann. Die dorsale Vorderpfote wird leicht mit der Tischplatte in Berührung gebracht, wenn das Tier zunächst nach vorne gebracht wird und dann seitwärts auf den Tisch gebracht wird. Die Anordnung wird jedesmal wie oben gescored (maximaler Score pro Gliedmaße = 4). Für den propriozeptiven Anordnungsuntertest wird das Tier nur nach vorne gebracht und ein größerer Druck wird auf die dorsale Vorderpfote ausgeübt; die Anordnung wird wie oben gescored (maximaler Score pro Gliedmaße = 2). Diese Unterscores werden hinzugefügt, um den totalen Vordergliedmaßenanordnungs-Score pro Gliedmaße anzugeben (Bereich = 0-10). Bei einigen Tieren wurde der Schnurrhaaranordnungsuntertest durchgeführt, bei dem die Fähigkeit des Tieres, die vordere Gliedmaße in Reaktion auf eine Stimulation der Schnurrhaare durch die Tischplatte anzurufen, getestet wurde (maximaler Score pro Gliedmaße = 2). Darauf wurden Unterscores zugefügt, um den Gesamtvordergliedmaßen-Anordnungsscore pro Gliedmaße zu ergeben (Bereich = 0-10, 0-12 mit Schnurrhaar-Untertest).

B. Der hintere Gliedmaßen-Anordnungstest

[0089] Der hintere Gliedmaßen-Anordnungstest wird in derselben Weise wie der vordere Gliedmaßen-Anordnungstest durchgeführt, schließt jedoch nur taktile und propriozeptive Untertests der hinteren Gliedmaßen ein (maximale Scores 4 bzw. 2; Gesamt-Scorebereich = 0-6).

C. Der modifizierte Balance-Balkentest

[0090] Der modifizierte Balance-Balkentest überprüft die Vestibulomotorreflexaktivität, wenn das Tier für 30 Sekunden auf einem schmalen Balken bzw. Stab ($30 \times 1,3$ cm) balanciert. Die Fähigkeit, auf dem Balken zu balancieren, wird wie folgt gescored: 1 – Das Tier balanciert mit allen vier Pfoten oben auf dem Balken; 2 – das Tier legt Pfoten an die Seite des Balken oder schwankt auf dem Balken; 3 – ein oder zwei Gliedmaßen rutschen vom Balken ab; 4 – drei Gliedmaßen rutschen vom Balken ab; 5 – das Tier versucht, mit den Pfoten auf dem Balken zu balancieren, fällt jedoch herunter; 6 – drapiert über dem Balken, fällt dann herunter; 7 – das Tier fällt vom Balken herab ohne einen Versuch, zu balancieren. Die Tiere durchliefen vor dem chirurgischen Eingriff drei Trainingsversuche: Der Score des letzten von diesen wurde als Baseline-Score herangezogen.

D. Der Haltungsreflextest

[0091] Der Haltungsreflextest misst sowohl die Reflex- als auch die sensorimotorische Funktion. Die Tiere wurden zunächst am Schwanz hängend über dem Boden gehalten. Tiere, die symmetrisch mit beiden Vordergliedmaßen sich hin zu Boden ausrichten, werden mit "0" gescored. Tiere, die abnormale Haltungen zeigen (Biegen einer Gliedmaße, Drehung des Körpers) werden dann auf ein Kunststoff-unterstütztes Blatt aus Papier angeordnet. Solche Tiere, die dazu in der Lage sind, einer Seite-an-Seite-Bewegung unter sanftem seitlichen Druck zu widerstehen, werden als "1" gescored, wohingegen solche, die nicht dazu in der Lage sind, einer solchen Bewegung zu widerstehen, als "2" gescored werden. Alle funktionellen/Verhaltenstests wurden gerade vor dem Schlaganfall-chirurgischen Eingriff durchgeführt und danach jeden Tag vom Zeitpunkt nach dem Schlaganfall Tag 1 bis Tag 31. Bei jeder Sitzung ließ man die Tiere sich 30 Minuten an den Testraum gewöhnen, bevor der Test begonnen wurde.

IV. Histologische Untersuchung

[0092] Am Tag 31 nach MCA-Verschluss wurden die Tiere tief mit Pentobarbital anästhetisiert und transkardial mit heparinisierter Salzlösung, gefolgt von 10 % gepuffertem Formalin perfundiert. Die Gehirne wurden entfernt, in drei Stücke geschnitten und in 10 % gepuffertem Formalin vor Dehydrierung und Einbettung in Paraffin aufbewahrt. Coronale Schnitte (5 µm) wurden auf einem Gleitmikrotom geschnitten, auf Glasobjekträgern befestigt und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Die Gegend der Hirninfarkte auf jedem der sieben Schnitte (+4,7, +2,7, +0,7, -1,3, -3,3, -5,3 und -7,3 im Vergleich zum Bregma) wurde unter Verwendung eines Computerinterface-Bildgebungssystems (Rioquant, R&M Biometrix, Inc., Nashville, TN) bestimmt. Die Gesamtinfarktfläche pro Objekträger wurde durch das "indirekte Verfahren" bestimmt als (Fläche der intakten Kontralateral-Hemisphäre) - (Fläche der intakten ipsilateralen Hemisphäre), um eine Gehirnschrumpfung während der Verarbeitung zu korrigieren (Swanson et al., (1990), J. Cereb. Blood Flow Metab. 10: 290-293). Das Infarktvolumen wurde dann als Prozentsatz des intakten kontralateralen Hemisphären-Volumens ausgedrückt. Die Volumina der Infarktion in der Rinde und im Striatum wurden ebenfalls getrennt unter Verwendung dieser Verfahren bestimmt.

[0093] Der praktische Arzt, der die intracisternalen Injektionen, den Verhaltenstest und die histologische Analyse durchführte, wurde gegenüber den zugeordneten Behandlungen verblindet, bis alle Daten gesammelt waren. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung oder Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwerts ausgedrückt und wurden durch wiederholte Messungen der Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von geeigneten ungepaarten zweiseitigen Tests mit der Bonferroni-Korrektur für multiple Vergleiche untersucht.

V. Ergebnisse

Differenz des Gesamtinfarktvolumens und des Körpergewichtes zwischen OP-1-behandelten und Träger-behandelten Tieren

[0094] Die rechte seitliche Hirnrinde und das darunterliegende Striatum sowohl von OP-1-behandelten Tieren als auch Träger-behandelten Tieren zeigten große Infarkte im Bereich des MCA. Gehirnregionen, die durch Infarkte schwer geschädigt waren, schlossen die seitliche Rinde, Flächen 1 und 2 (Parl, ParII) und die granuläre Inselrinde (GI) ein. Regionen, die durch Infarkte teilweise geschädigt waren, schlossen die vordere Rinde, die Flächen 1, 2 und 3 (FR1, FR2, FR3); eine granuläre Inselrinde (AI); die temporale Rinde, Flächen 1 und 3 (Tel1, Tel3); die laterale Hinterhauptrinde, Fläche 2 (Oc3L); die kortikale vordere Gliedmaßen-Fläche (FL) und das Caudoputamen (cPu; Paxinos und Watson, 1986) ein. Die kortikale Hintergliedmaßenfläche (HL) war im Allgemeinen frei von Infarkten.

[0095] Es existierte kein Unterschied im Gesamtinfarktvolumen zwischen Tieren, die mit einer Reihe von intracisternalen OP-1 Verabreichungen behandelt wurden ($8 \times 10 \mu\text{g}/\text{Injektion}$) und Träger-behandelten Tieren ($26,3 \pm 2,5 \%$ gegen $28,0 \pm 2,0 \%$ intaktes contralaterales Hemisphärenvolumen, $t = 0,538$, p-n.s.). Darüber hinaus existierte kein Unterschied im kortikalen oder Striatum-Infarktvolumen zwischen den OP-1-behandelten Tieren und den Träger-behandelten Tieren, wenn diese Volumina getrennt berechnet wurden (Hirnrinde: $30,9 \pm 3,1 \%$ gegen $31,9 \pm 2,9 \%$ intaktes kontralaterales Rindenvolumen, $t = 0,254$, p-n.s.; Striatum: $66,0 \pm 3,0 \%$ gegen $66,5 \pm 2,9 \%$ intaktes kontralaterales Striatum-Volumen, $t = 0,121$, p-n.s.). Weiterhin zeigte eine Inspektion von Hämatoxylin- und Eosin-gefärbten Schnitten keinen Beweis für eine abnormale Zellproliferation in den Gehirnen von OP-1-behandelten Tieren. (Daten nicht dargestellt).

[0096] Der Zeitverlauf des Körpergewichts während des Monats nach der Infarktion von Trägerbehandelten Tieren unterschied sich nicht signifikant zwischen: (a) Tieren, die mit einer Reihe ($8 \times 10 \mu\text{g}/\text{Tier}$) von OP-1-Verabreichungen behandelt wurden ([Fig. 4](#), $F = 0,56$, p-n.s.); (b) Tieren, die mit zwei Injektionen (Hochdosis = $2 \times 10 \mu\text{g}/\text{Tier}$; niedere Dosis = $2 \times 1 \mu\text{g}/\text{Tier}$) von OP-1 behandelt wurden ([Fig. 7](#), $F = 0,417$, p-n.s.); und (c) Tieren, die mit einer einzigen Injektion ($10 \mu\text{g}/\text{Tier}$) OP-1-behandelt wurden ([Fig. 10](#), $F = 0,693$, p-n.s.).

Funktionelle Leistung OP-1-behandelter Tiere und Träger-behandelter Tiere

[0097] Im Anschluss an die Infarktion zeigten alle Tiere schwere Störungen der sensorimotorischen und Reflexfunktion bei allen vier Verhaltenstests. Für die Gliedmaßenanordnungstests waren die Defizite auf die kontralateralen (linken) Gliedmaßen beschränkt. Tiere, die Träger empfingen, zeigten eine teilweise Genesung bei allen vier Verhaltenstests während des ersten Monats nach dem Schlaganfall (siehe [Fig. 2A-Fig. 2B](#), [Fig. 3A-Fig. 3B](#), [Fig. 5A-Fig. 5B](#), [Fig. 6](#), [Fig. 8A-Fig. 8B](#) und [Fig. 9](#)).

(i) Tiere, die zweimal wöchentlich OP-1-Verabreichungen erhielten

[0098] Tiere, die zweimal wöchentliche OP-1-Verabreichungen ($8 \times 10 \mu\text{g}/\text{Injektion}$) erhielten, erholten sich schneller und in einem größeren Ausmaß als Träger-behandelte Ratten. Eine verbesserte Genesung von OP-1 gegen Träger-behandelte Tiere war am auffälligsten für die vorderen Gliedmaßen (Fig. 2A; $F = 109,0$, $p = 0,0001$) und bei den hinteren Gliedmaßenanordnungsaufgaben (Fig. 2B; $F = 34,8$, $p = 0,0001$) und weniger auffällig, obwohl noch signifikant, für die Balkenbalance (Fig. 3A; $F = 11,7$, $p = 0,0051$). Es existierte jedoch keine Signifikanz zwischen den beiden Gruppen in den Haltungsreflextests (Fig. 3B; $F = 3,7$, $p\text{-n.s.}$). Eine gesteigerte Genesung war bei allen Untertests der Gliedmaßenanordnungstests ersichtlich (visuell, taktil und propriozeptiv) im Anschluss an eine OP-1-Behandlung (Daten nicht dargestellt). Eine Verbesserung der Genesung durch OP-1 war bei den Test der sensorimotorischen Funktion der betroffenen Gliedmaßen am auffälligsten und weniger bei den Tests des Reflexes und der Haltungsfunktion auffällig. Die MCA-Infarkte schädigten vordere Gliedmaßen- und hintere Gliedmaßenrinden-Areale nicht vollständig, was mit der Genesung bei den Gliedmaßenanordnungstests im Anschluss an eine fokale Infarktion im MCA-Territorium kompatibel ist.

(ii) Tiere, die zwei OP-1-Verabreichungen erhielten

[0099] Tiere, die zwei OP-1-Verabreichungen erhielten (an den Tagen 1 und 4 nach dem Schlaganfall) erholten sich schneller und in einem größeren Umfang als Träger-behandelte Ratten während des Monats des Verhaltenstestes. OP-1 (2×1 oder $10 \mu\text{g}/\text{Injektion}$) induzierte eine signifikante Verbesserung der Genesung von: (a) Vordergliedmaßenanordnung ohne Schnurrhaare (Fig. 5A; $F = 31,835$, $p = 0,0001$; Hochdosis gegen Träger, $p < 0,0001$; Niederdosis gegen Träger, $p < 0,0001$), (b) vordere Gliedmaßenanordnung mit Schnurrhaaren (Fig. 5B; $F = 27,462$, $p = 0,0001$; Hochdosis gegen Träger, $p < 0,0001$; niedere Dosis gegen Träger, $p < 0,0001$); und (c) hintere Gliedmaßenanordnung (Fig. 6; $F = 14,867$, $p = 0,0001$; hohe Dosis gegen Träger, $p < 0,0001$; niedere Dosis gegen Träger, $p = 0,0036$). Obwohl die hohe Dosis einen Trend hin zu einer besseren Genesung als die niedere Dosis in allen drei Verhaltenstests zeigte, waren die Unterschiede zwischen den beiden OP-1-behandelten Gruppen nicht signifikant.

(iii) Tiere, die eine einzige OP-1-Verabreichung empfingen

[0100] Langzeitverbesserungen der funktionellen Genesung waren ebenfalls bei einer einzigen Verabreichung von OP-1 ersichtlich. Tiere, die $10 \mu\text{g}$ OP-1 intracisternal 24 Stunden nach dem Verschluss der MCA erhielten, erholten sich schneller und in einem größeren Umfang während des Monats des Verhaltenstestes als Träger-behandelte Ratte. OP-1 induzierte eine signifikante Steigerung der Genesung von (a) vordere Gliedmaßenanordnung ohne Schnurrhaare (Fig. 8A; $F = 10,853$, $p = 0,0064$); (b) vordere Gliedmaßenanordnung mit Schnurrhaaren (Fig. 8B; $F = 10,629$, $p = 0,0068$); und (c) hintere Gliedmaßenanordnung (Fig. 9; $F = 15,343$, $p = 0,002$).

[0101] In der vorliegenden Erfindung verbessern eine Behandlung einer ischämischen Verletzung des Zentralnervensystems mit OP-1 sowohl die Rate bzw. Geschwindigkeit als auch das Ausmaß der funktionellen Erholung während des ersten Monats nach der Infarktion. Eine einzige Verabreichung einer effektiven Dosis OP-1 war ausreichend, um eine Langzeitverbesserung der funktionellen Genesung zu induzieren.

[0102] Eine verbessern Verhaltensgenesung war ohne Veränderung (beispielsweise ohne Abnahme) des Infarktvolumens bei OP-1-behandelten im Vergleich zu Träger-behandelten Tieren ersichtlich. In all diesen Gruppen begann die OP-1-Verabreichung einen Tag nach der Ischämie außerhalb des "therapeutischen Fensters", während dem OP-1 gemäß den Lehren von WO 93/04692 und/oder WO 94/03200 die Infarktgröße reduzieren kann. Die gegenwärtigen Erkenntnisse zählen zu den ersten Demonstrationen, dass ein exogen verabreichter, biologisch aktiver Faktor die Verhaltensgenesung ohne Reduktion der Infarktgröße bei einem Tiermodell des Schlaganfalls verbessern kann.

[0103] Ähnliche Routinemodifikationen können in anderen akzeptierten Modellen des Schlaganfalls durchgeführt werden, um die Leistungsfähigkeit der Morphogen-Behandlung zur Wiederherstellung einer verlorengegangenen oder verschlechterten motorischen Koordinationsfunktion des ZNS zu bestätigen.

(1) Allgemeine Information:

- (i) Anmelder: Charette, Marc F., Finklestein, Seth P.
- (ii) Titel der Erfindung: Verfahren zur verbesserten funktionellen Erholung nach einem Trauma oder Ischämie des ZNS
- (iii) Anzahl der Sequenzen: 9
- (iv) Korrespondenzadresse:
 - (A) Adressant: Creative Biomolecules, Inc.
 - (B) Straße: 45 South Street
 - (C) Stadt: Hopkinton
 - (D) Staat: MA
 - (E) Land: USA
 - (F) ZIP: 01748
- (v) Computerlesbare Form:
 - (A) Mediumtyp: Floppy disk
 - (B) Computer: IBM PC-kompatibel
 - (C) Betriebssystem: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) Software: PatentIn Release Nr. 1,0, Version Nr. 1,30
- (vi) Gegenwärtige Anmeldungsdaten:
 - (A) Anmeldenummer:
 - (B) Anmeldetag:
 - (C) Klassifikation:
- (viii) Anwalt/Vertreterinformation:
 - (A) Name: Fenton, Gillian M.
 - (B) Registrations-Nr.: 36.508

(C) Aktenzeichen: CRP-069CP

- (ix) Telekommunikationsinformation:
- (A) Telefon: (617)248-7000
 - (B) Telefax: (617)248-7100

(2) Information für SEQ ID NO: 1

- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 97 Aminosäuren
 - (B) Typ: Aminosäure
 - (C) Strängigkeit:
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: Protein
- (ix) Merkmal:
 - (A) Name/Schlüssel: Protein
 - (B) Ort: 1..97
 - (D) Weitere Information: /Markierung = Generische-Seq-7

/Bemerkung = "wobei jedes Xaa unabhängig aus einer Gruppe einer oder mehrerer spezifizierter Aminosäuren ausgewählt ist, wie in der Beschreibung definiert ist".

- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 1:

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

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

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

Xaa Cys Cys Xaa Pro
 50 55 60

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

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

Xaa

(2) Information für SEQ ID NO: 2

- (i) Sequenzeigenschaften:
- (A) Länge: 102 Aminosäuren
 - (B) Typ: Aminosäure
 - (C) Strängigkeit:
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: Protein
- (ix) Merkmal:
- (A) Name/Schlüssel: Protein
 - (B) Ort: 1..102
 - (D) Weitere Information: /Markierung = Generische-Seq-8

/Bemerkung = "wobei jedes Xaa unabhängig aus einer Gruppe einer oder mehrerer spezifizierter Aminosäuren ausgewählt ist, wie in der Beschreibung definiert ist".

- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 2:

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

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

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

Xaa
 50 55 60

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

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

Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa
 100

(2) Information für SEQ ID NO: 3

- (i) Sequenzeigenschaften:
- (A) Länge: 102 Aminosäuren
 - (B) Typ: Aminosäure
 - (C) Strängigkeit:
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: Protein
- (ix) Merkmal:
- (A) Name/Schlüssel: Protein
 - (B) Ort: 1..102
 - (D) Weitere Information: /Markierung = OPX

/Bemerkung = "wobei jedes Xaa unabhängig aus einer Gruppe einer oder mehrerer spezifizierter Aminosäuren ausgewählt ist, wie in der Beschreibung definiert ist".

- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 3:

Cys Xaa Xaa His Glu Leu Tyr Val Xaa Phe Xaa Asp Leu Gly Trp Xaa
 1 5 10 15
 Asp Trp Xaa Ile Ala Pro Xaa Gly Tyr Xaa Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly
 20 25 30
 Glu Cys Xaa Phe Pro Leu Xaa Ser Xaa Met Asn Ala Thr Asn His Ala
 35 40 45
 Ile Xaa Gin Xaa Leu Val His Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Val Pro Lys
 50 55 60
 Xaa Cys Cys Ala Pro Thr Xaa Leu Xaa Ala Xaa Ser Val Leu Tyr Xaa
 65 70 75 80
 Asp Xaa Ser Xaa Asn Val Xaa Leu Xaa Lys Xaa Arg Asn Met Val Val
 85 90 95
 Xaa Ala Cys Gly Cys His

(2) Information für SEQ ID NO: 4

- (i) Sequenzeigenschaften:
 - (A) Länge: 1822 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: cDNA
- (vi) Originalquelle:
 - (A) Organismus: Homo sapiens
 - (F) Gewebstyp: Hippocampus
- (ix) Merkmal:
 - (A) Name/Schlüssel: CDS
 - (B) Ort: 49..1341
 - (C) Identifizierungsverfahren: experimentell
 - (D) Weitere Information: /Funktion = "Osteogenetisches Protein"

/Produkt = "OP-1"

/Beweis = experimentell

/Standard_Name = "OP1"

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 4:

GGTGGGGGCC CGGAGCCCCG AGCCCGGGTA GCGCGTAGAG CGGGCGCG ATG CAC GTG Met His Val 1	57
CGC TCA CTG CGA GCT GCG GCG CCG CAC AGC TTC GTG GCG CTC TGG GCA Arg Ser Leu Arg Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala Leu Trp Ala 5 10 15	105
CCC CTG TTC CTG CTG CGC TCC GCC CTG GCC GAC TTC AGC CTG GAC AAC Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser Leu Asp Ash 20 25 30 35	153
GAG GTG CAC TCG AGC TTC ATC CAC CGG CGC CTC CGC AGC CAG GAG CGC Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser Gln Glu Arg 40 45 50	201
CGG GAG ATG CAG CGC GAG ATC CTC TCC ATT TTG GGC TTG CCC CAC CGC Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu Pro His Arg 55 60 65	249
CGG CGC CGG CAC CTC CAG GGC AAG CAC AAC TCG GCA CCC ATG TTC ATG Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro Met Phe Met 70 75 80	297
CTG GAC CTG TAC AAC Gcc ATG CGG GTG GAG GAG Gcc Gcc Gcc Gcc Gcc Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly Gly Gly Pro Gly 85 90 95	345
GGC CAG GGC TTC TCC TAC CCC TAC AAG GCC GTC TTC AGT ACC CAG GGC Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser Thr Gln Gly 100 105 110 115	393
CCC CCT CTG GCC AGC CTG CAA GAT AGC CAT TTC CTC ACC GAC GCC GAC Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr Asp Ala Asp 120 125 130	441
ATG GTC ATG AGC TTC GTC AAC CTC GTG GAA CAT GAC AAG GAA TTC TTC Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys Glu Phe Phe 135 140 145	489
CAC GCA CGG TAC CAC CAT CGA GAG TTC CGG TTT GAT CTT TCC AAG ATC His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu Ser Lys Ile 150 155 160	537
CCA GAA GGG GAA GCT GTC ACG GCA GCC GAA TTC CGG ATC TAC AAG GAC Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Asp 165 170 175	585
TAC ATC CGG GAA CGC TTC GAC ATG GAG ACG TTC CGG ATC AGC GTT TAT Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile Ser Val Tyr 180 185 190 195	633
CAG GTG CTC CAG GAG CAC TTG CGC AGG GAA TCG GAT CTC TTC CTG CTC Gln Val Leu Gln Glu His Leu Gly Arg Glu Ser Asp Leu Phe Leu Leu 200 205 210	681
GAC AGC CGT ACC CTC TGG GCC TCG GAG GAG GGC TGG CTG GTG TTT GAC	729

Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu Val Phe Asp	
215 220 225	
ATC AGA GCC ACC AGC AAC CAC TGG GTG GTC AAT CCG CGG CAC AAC CTG Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg His Asn Leu	77
230 235 240	
GGC CTG CAG CTC TCG GTG GAG ACG CTG GAT GGG CAG AGC ATC AAC CCC Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser Ile Asn Pro	825
245 250 255	
AAG TTG CGC CGC CTG ATT GGG CGG CAC GGG CCC CAG AAC AAG CAG CCC Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn Lys Gln Pro	873
260 265 270 275	
TTC ATG GTG GCT TTC TTC AAG GCC ACG GAG GTC CAC TTC CGC AGC ATC Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe Arg Ser Ile	921
280 285 290	
CGG TCC ACG GGG AGC AAA CAG CGC AGC CAG AAC CGC TCC AAG ACG CCC Arg Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro	969
295 300 305	
AAG AAC CRG GAA GCC CTG CGG ATG GCC AAC GTG GCA GAG AAC AGC AGC Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser	1017
310 315 320	
AGC GAC CAG AGG CAG GCC TGT AAG AAG CAC GAG CTG TAT GTC AGC TTC Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe	1065
325 330 335	
tGA GAC CTG GGC TGG CAG GAC TGG ATC ATC GGG CCT GAA GGC TAC GGC Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala	1115
340 345 350 355	
GCC TAC TAC TGT GAG GGG GAG TGT GCC TTC CCT CTG AAC TCC TAC ATG Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met	1161
360 365 370	
AAC GCC ACC AAC CAC GCC ATC GTG CAG ACG CTG GTC CAC TTC ATC AAC Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn	1209
375 380 385	
CCG GAA ACG GTG CCC AAG CCC TGC TGT GCG CCC ACG CAG CTC AAA GCC Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala	1257
390 395 400	
ATC TCC GTC CTC TAC TTC GAT GAC ACG TCC AAC GTC ATC CTG AAG AAA Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys	1305
405 410 415	
TAC AGA AAC ATG GTG GTC CGG GCC TGT GGC TGC CAC TAGCTCCTCC Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His	1351
420 425 430	
GAGAATTCAAG ACCCTTTGGG GCCAAGTTT TCTGGATCCT CCATTGCTCG CCTTGGCCAG	1411
GAACCAGCAG ACCAACTGCC TTTTGTGAGA CCTTCCCCCTC CCTATCCCCA ACFTTAAAGG	1471
TGTGAGAGTA TTAGGAAACA TGAGCAGCAT ATGGCTTTG ATCAGTTTT CAGTGGCAGC	1531
ATCCAATGAA CAAGATCCTA CAAGCTGTGC AGGCCAAACC TAGCAGGAAA AAAAAACAAAC	1591
GCATAAAGAA AAAAGGCCGG GCCAGGTCAAT TGGCTGGGAA GTCTCAGCCA TGCACGGACT	1651
CGTTTCCAGA GGTAATTATG AGCCCTTACCC AGCCAGGCCA CCCAGCCGTG GGAGGAAGGG	1711
GGCGTGGCAA GGGGTGGGCA CATGGTGTGC TGTGCCAAAG GAAATTGAC CCGGAAGTTC	1771
CTGTAAATAA TGTCACAATA AACCGAATGA ATGAAAAAAA AAAAAAAA A	1822

(2) Information für SEQ ID NO: 5

(i) Sequenzeigenschaften:

- (A) Länge: 431 Aminosäuren
- (B) Typ: Aminosäure
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 5:

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

Leu Trp Ala Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser
 20 25 30
 Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser
 35 40 45
 Gln Glu Arg Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu
 50 55 60
 Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro
 65 70 75 80
 Met Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly
 85 90 95
 Gly Pro Gly Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser
 100 105 110
 Thr Gln Gly Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr
 115 120 125
 Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys
 130 135 140
 Glu Phe Phe His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu
 145 150 155 160
 Ser Lys Ile Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile
 165 170 175
 Tyr Lys Asp Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile
 180 185 190
 Ser Val Tyr Gln Val Leu Gln Glu His Leu Gly Arg Glu Ser Asp Leu
 195 200 205
 Phe Leu Leu Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu
 210 215 220
 Val Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg
 225 230 235 240
 His Asn Leu Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser
 245 250 255
 Ile Asn Pro Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn
 260 265 270
 Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe
 275 280 285
 Arg Ser Ile Arg Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser
 290 295 300
 Lys Thr Pro Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu
 305 310 315 320
 Asn Ser Ser Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr
 325 330 335
 Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu
 340 345 350
 Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn
 355 360 365
 Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His
 370 375 380
 Phe Ile Asn Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln
 385 390 395 400
 Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile
 405 410 415
 Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
 420 425 430

(2) Information für SEQ ID NO: 6

- (i) Sequenzeigenschaften:
- (A) Länge: 97 Aminosäuren
 - (B) Typ: Aminosäure
 - (C) Strängigkeit: einzeln
 - (D) Topologie: linear
- (ii) Molekültyp: Protein
- (ix) Merkmal:
- (A) Name/Schlüssel: Protein
 - (B) Ort: 1..97
 - (D) Weitere Information: /Markierung = Generische-Seq-9

/Bemerkung = "wobei jedes Xaa unabhängig aus einer Gruppe einer oder mehrerer spezifizierter Aminosäuren ausgewählt ist, wie in der Beschreibung definiert ist".

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 6:

```

Xaa Xaa
1           5           10          15
Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa Xaa
20          25          30
Xaa Xaa
35          40          45
Xaa Cys Xaa Pro
~ 50          55          60
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
65          70          75          80
Xaa Cys Xaa Cys
85          90          95
Xaa

```

(2) Information für SEQ ID NO: 7

- (i) Sequenzeigenschaften:
- (A) Länge: 102 Aminosäuren

- (B) Typ: Aminosäure
- (C) Strängigkeit: einzeln
- (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Protein

(ix) Merkmal:

- (A) Name/Schlüssel: Protein
- (B) Ort: 1..102
- (D) Weitere Information: /Markierung = Generische-Seq-10

/Bemerkung = "wobei jedes Xaa unabhängig aus einer Gruppe einer oder mehrerer spezifizierter Aminosäuren ausgewählt ist, wie in der Beschreibung definiert ist".

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 7:

```

Cys Xaa Xaa
 1           5           10          15
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Gly
 20          25          30
Xaa Cys Xaa Xaa
 35          40          45
Xaa Xaa
 50          55          60
Xaa Xaa Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa
 65          70          75          80
Xaa Xaa
 85          90          95
Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa
 100

```

(2) Information für SEQ ID NO: 8

- (i) Sequenzeigenschaften:
- (A) Länge: 5 Aminosäuren
 - (B) Typ: Aminosäure
 - (C) Strängigkeit:
 - (D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Peptid

(ix) Merkmal:

(A) Name/Schlüssel: Protein

(B) Ort: 1..5

(D) Weitere Information: /Bemerkung = "wobei jedes Xaa unabhängig aus einer Gruppe einer oder mehrerer spezifizierter Aminosäuren ausgewählt ist, wie in der Beschreibung definiert ist".

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 8:

~~Cys Xaa Xaa Xaa Xaa~~
~~1 2 3 4 5~~

(2) Information für SEQ ID NO: 9

(i) Sequenzeigenschaften:

(A) Länge: 5 Aminosäuren

(B) Typ: Aminosäure

(C) Strängigkeit:

(D) Topologie: linear

(ii) Molekültyp: Peptid

(ix) Merkmal:

(A) Name/Schlüssel: Protein

(B) Ort: 1..5

(D) Weitere Information: /Bemerkung = "wobei jedes Xaa unabhängig aus einer Gruppe einer oder mehrerer spezifizierter Aminosäuren ausgewählt ist, wie in der Beschreibung definiert ist".

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 9:

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 2 3 4 5

Patentansprüche

1. Verwendung eines Morphogens zur Herstellung eines Medikamentes zur Verbesserung der Wiedererlangung einer Funktion des zentralen Nervensystems in einem Säugetier, das durch eine ischämische Episode des zentralen Nervensystems betroffen ist, wobei

die funktionelle Wiedererlangung eine Verbesserung einer motorischen Koordinationsfunktion umfasst; optional, wobei die motorische Koordinationsfunktion aus Haltung, Gleichgewicht, Griff und Gang ausgewählt ist, und wobei das Morphogen ein dimerisches Protein umfasst, das die Eigenschaft aufweist, eine gewebsspezifische Morphogenese in dem Säugetier zu induzieren, und zwei gefaltete Polypeptide umfasst, die jeweils eine Aminosäuresequenz aufweisen, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Folgendem besteht:

- a) einer Sequenz mit mehr als 60%iger Aminosäuresequenzidentität mit der C-terminalen Sieben-Cystein-Domäne von humanem OP-1, Reste 330-431 von SEQ ID NO: 5; und
- b) einer OPX-Sequenz, definiert durch SEQ ID NO: 3.

2. Verwendung eines Morphogens für die Herstellung eines Medikamentes zur Verbesserung der Wiedererlangung einer Funktion des zentralen Nervensystems in einem Säugetier, das durch eine ischämische Episode des zentralen Nervensystems betroffen ist, worin:

die funktionelle Wiedererlangung eine Verbesserung einer motorischen Koordinationsfunktion umfasst; optional, wobei die motorische Koordinationsfunktion aus Haltung, Gleichgewicht, Griff und Gang ausgewählt ist, und wobei das Morphogen ausgewählt ist aus:

OP-1, OP-2, OP-3, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-9, DPP, Vgl, Vgr, 60A-Protein, GDF-1, GDF-3, GDF-5, GDF-6, GDF-7, BMP-10, BMP-11, BMP-13, BMP-15, UNIVIN, NODAL, SCREW, ADMP und NEURAL.

3. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Morphogen mit Folgendem komplexiert ist:

zumindest einem Pro-Domänen-Peptid, umfassend ein N-terminales 18-Aminosäure-Peptid, ausgewählt aus der Gruppe, die aus den N-Termini der Pro-Domänen von OP-1, OP-2, 60A, GDF-1, BMP-2A, BMP-2B, DPP, Vgl, Vgr-1, BMP-3, BMP-5 und BMP-6 besteht; oder nicht kovalent mit zumindest einem die Löslichkeit erhöhenden Fragment eines Pro-Domänen-Polypeptids, ausgewählt aus den Pro-Domänen von natürlich vorkommenden Morphogenen.

4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem das Morphogen aus einem Kulturerstand einer Morphogen-sezernierenden Wirtszelle gewonnen wird.

5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Morphogen intracisternal, intraventrikulär, intrathekal oder intravenös verabreicht wird.

6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Morphogen:

- a) in einer einzelnen Verabreichung; oder
- b) in einer Vielzahl von Verabreichungen; oder
- c) in zwei Verabreichungen, bereitgestellt wird; und/oder
- d) das Morphogen zumindest 24 oder 48 Stunden nach dem Eintreten der Verletzung verabreicht wird.

7. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Morphogen täglich, zweimal wöchentlich oder wöchentlich verabreicht wird.

Es folgen 14 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

% Aminosäuresequenzähnlichkeit, Identität mit menschlichem OP-1 7-Cystein-Domäne		
>=70% Sequenz	% Ähnlichkeit	% Identität
hOP-1 (hBMP-7)	100	100
mOP-1 (mBMP-7)	100	99
hOP-2 (hBMP-8)	97	72
mOP-2 (mBMP-8)	97	75
hBMP-5	97	88
hBMP-6 (Vgr-1)	96	87
Vgr-1 (PT)	94	85
OP-3	91	66
d60A	90	69
BMP-4 (BMP-2b)	90	58
BMP-2 (BMP-2a)	89	60
dpp	87	57
sUNIVIN	87	63
xVg-1	86	58
hCDMP-1 (mGDF-5)	85	50
hCDMP-3 (mGDF-7, hBMP-12)	83	54
mGDF-3 (hVgr-2)	83	50
hCDMP-2 (mGDF-6, hBMP-13)	82	53
cDORSALIN	79	50
hGDF-1	78	49
mGDF-10	78	40
rBMP-3b	78	41
hBMP-10	78	47
hBMP-3	78	43
dSCREW	77	49
ADMP	77	
mGDF-1	73	50
hBMP-9	73	52
mNODAL	71	41
hBMP-15	71	41

Speziesmarkierungen:

h = human; m = Maus; x = Xenopus; c = Huhn; s = Seegurke; d = Drosophila; r = Ratte

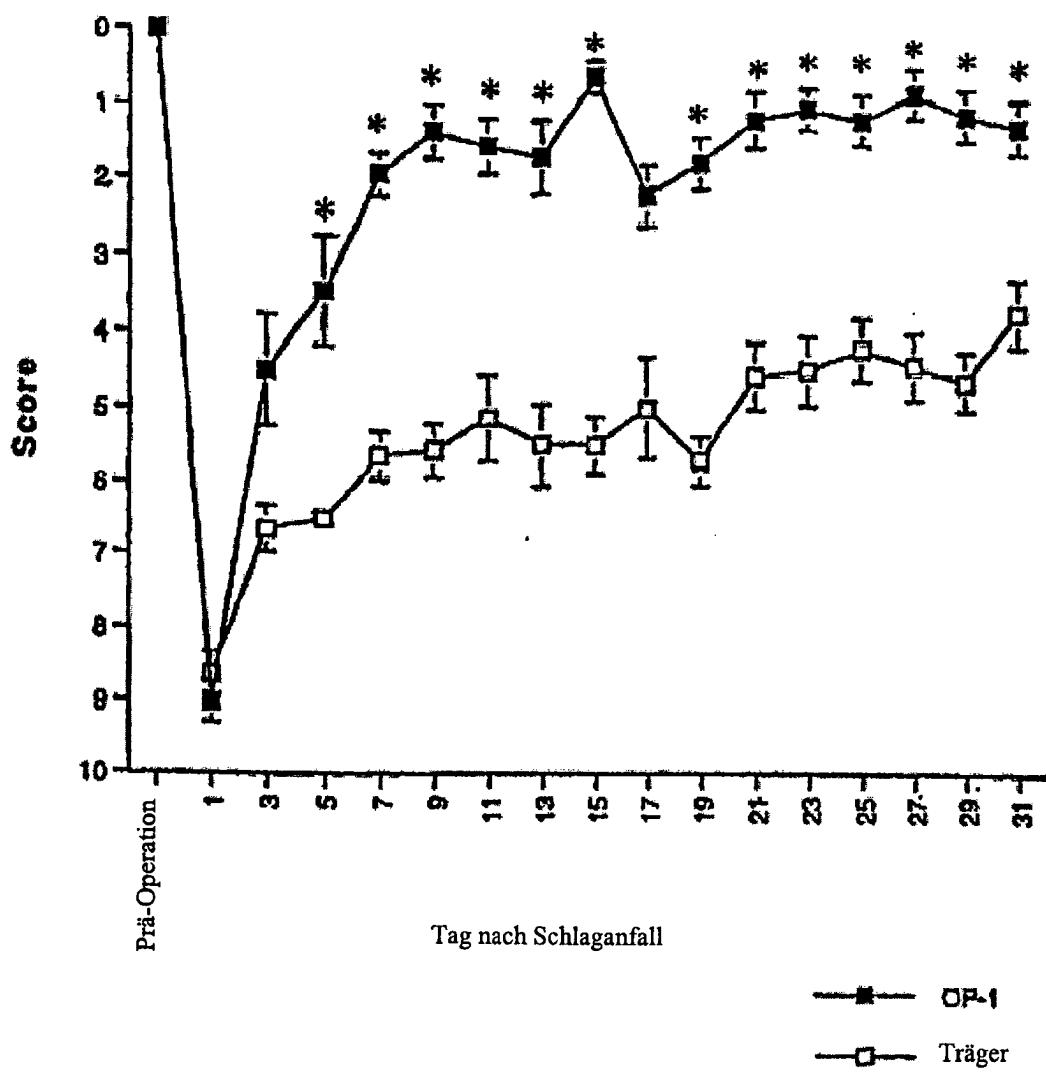


FIG. 2A

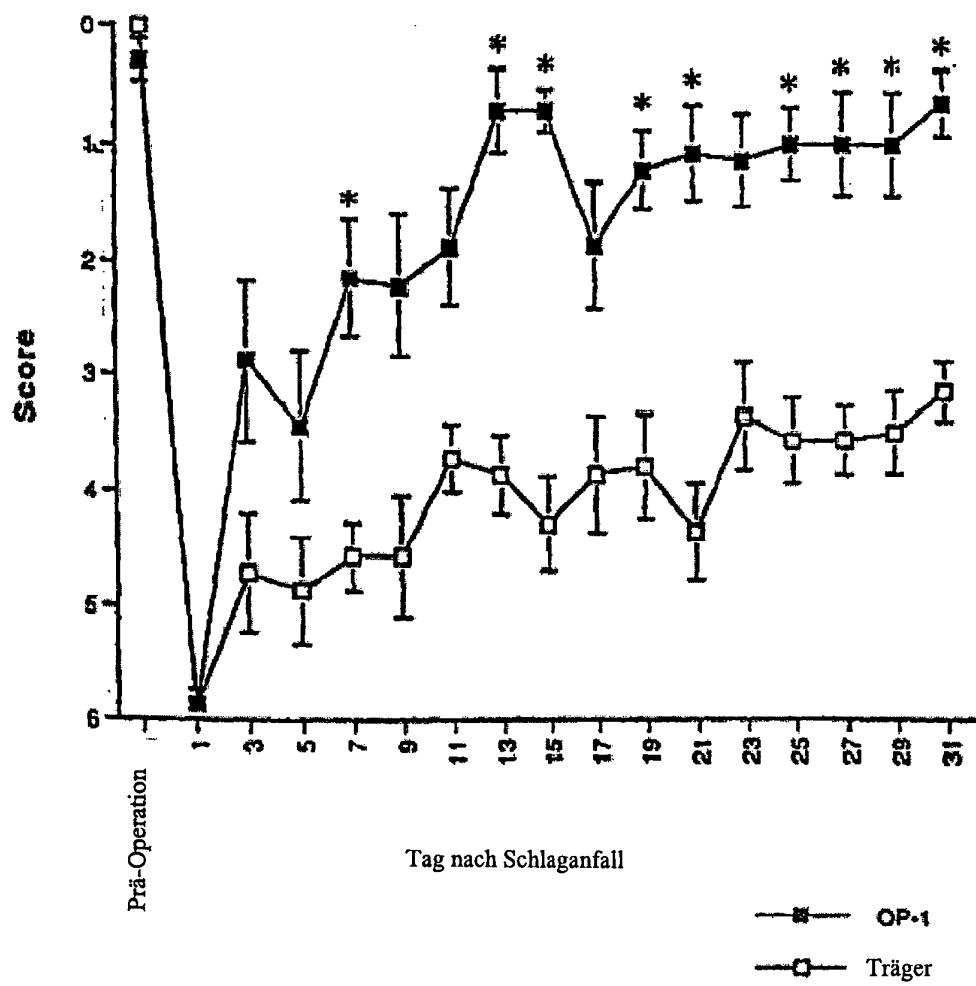


FIG. 2B

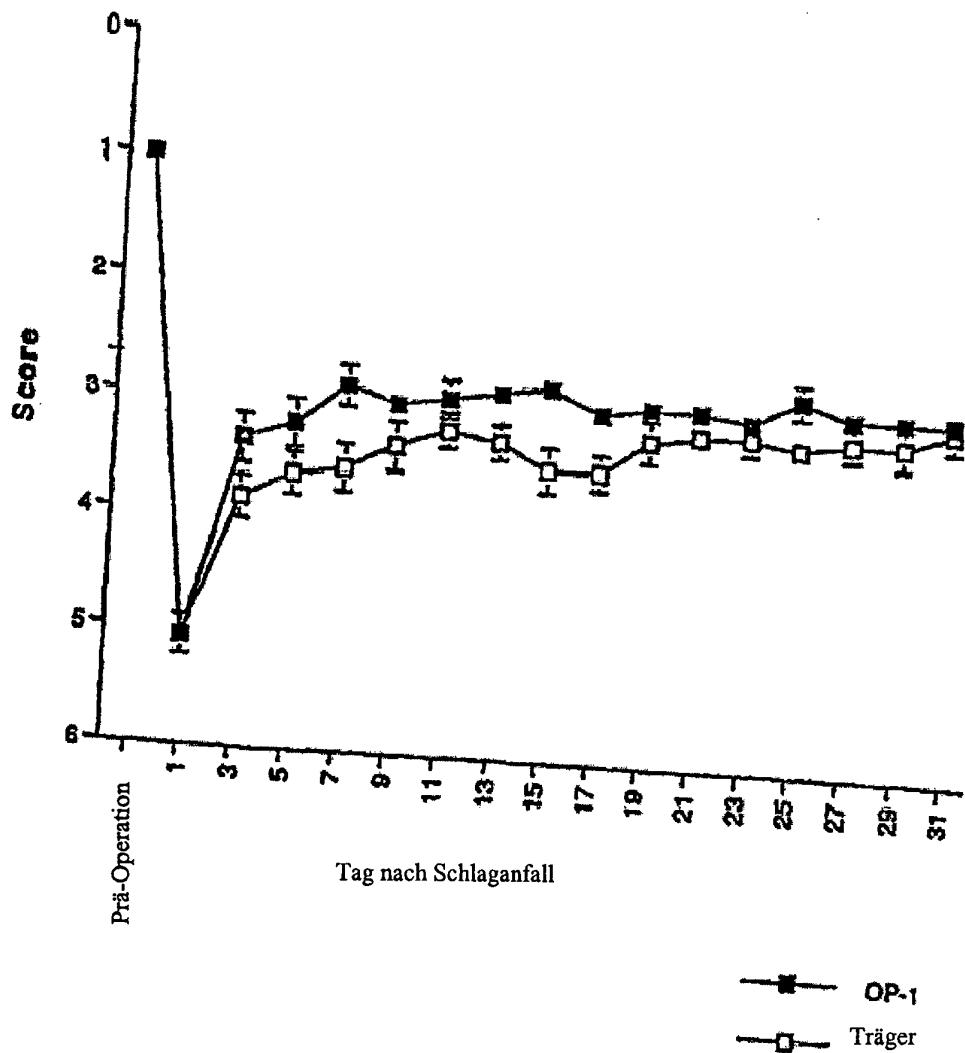


FIG. 3A

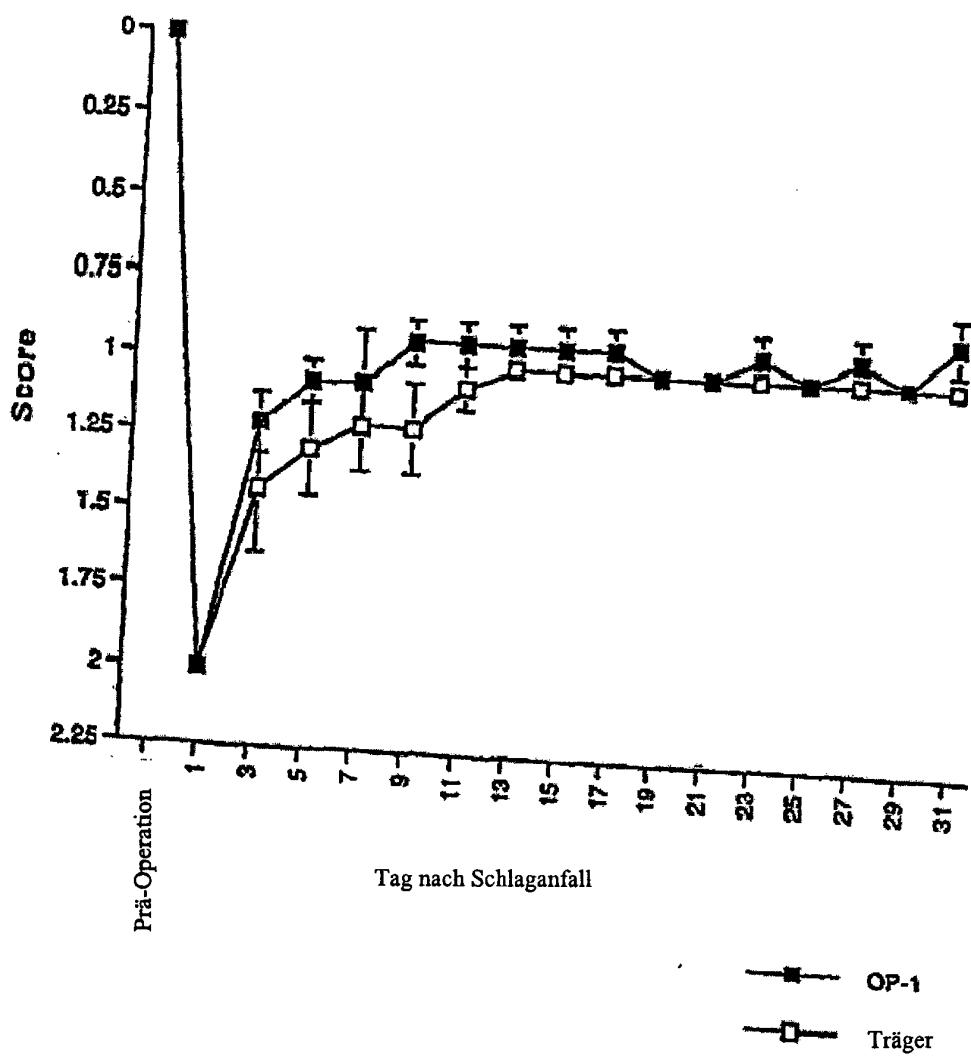


FIG. 3B

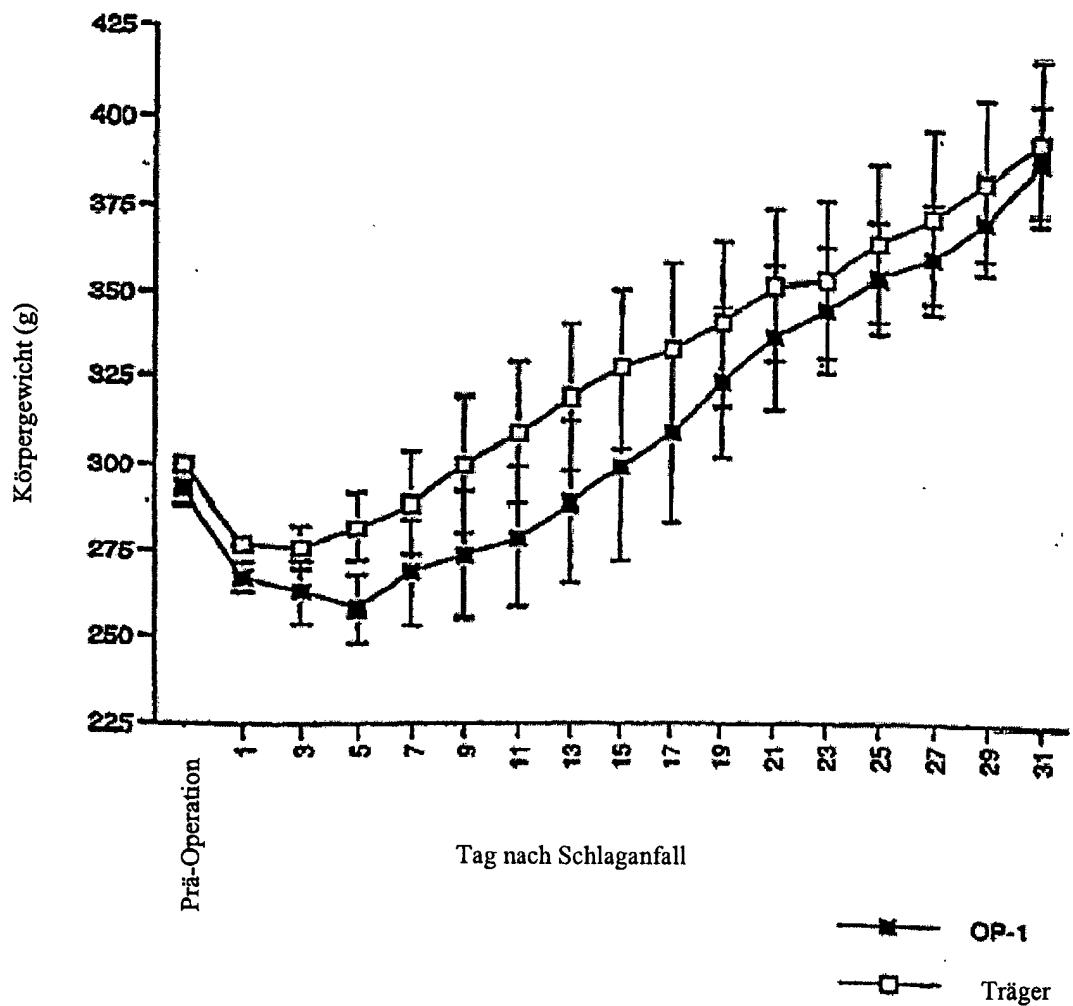


FIG. 4

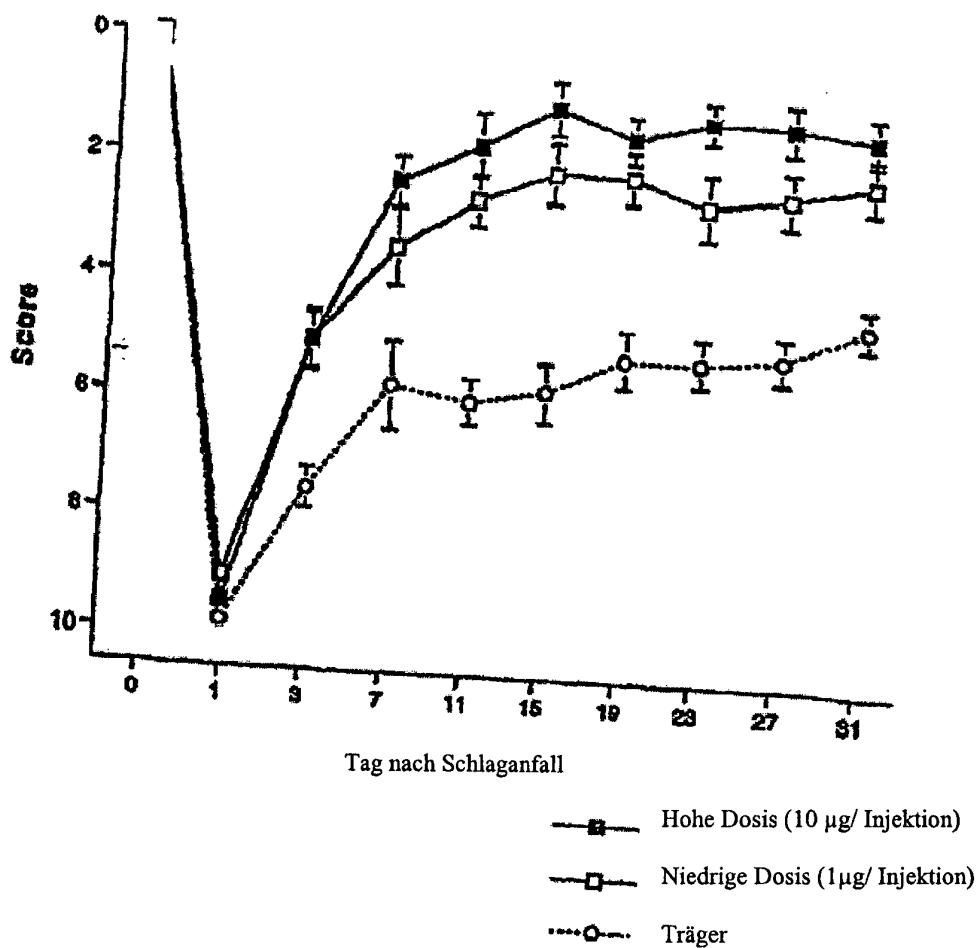


FIG. 5A

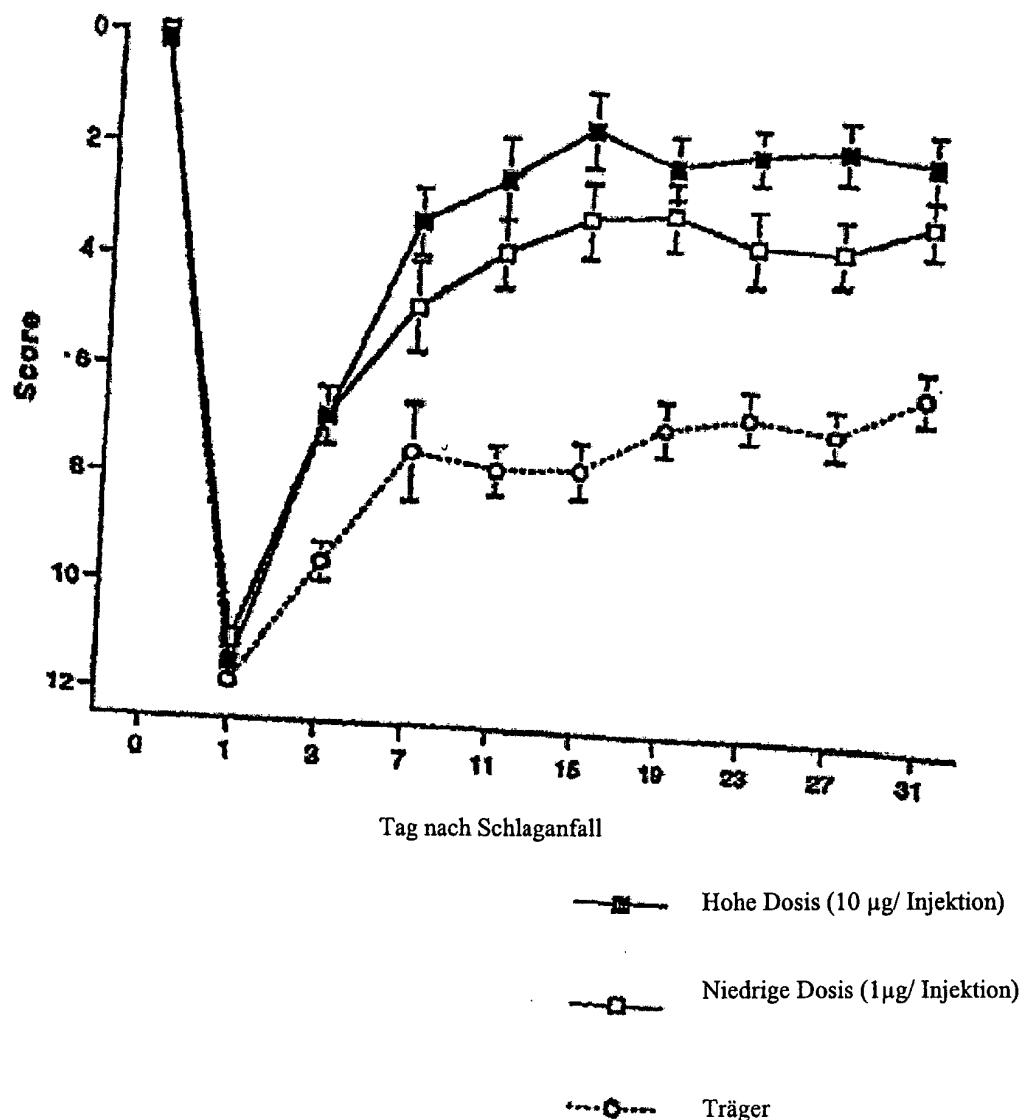


FIG. 5B

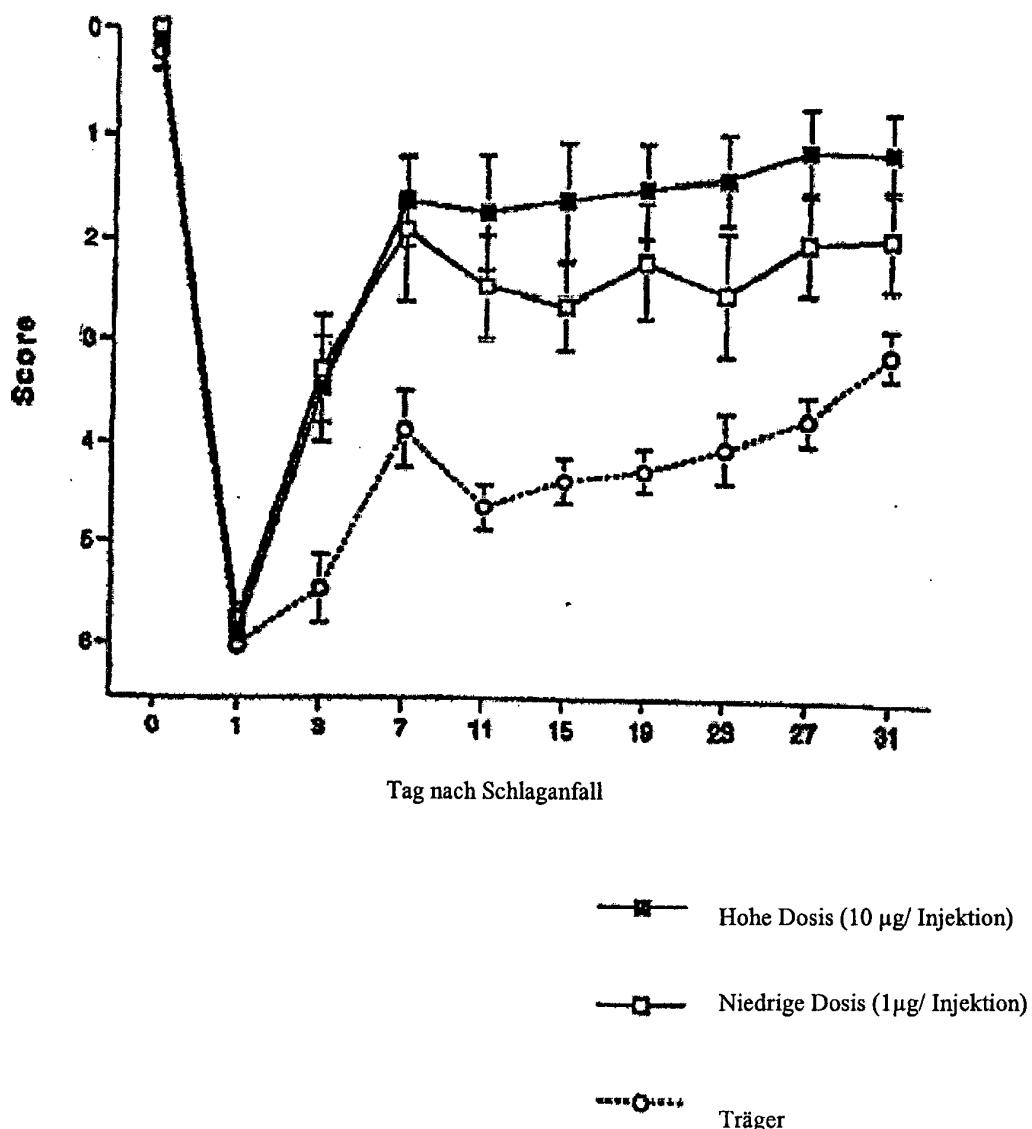


FIG. 6

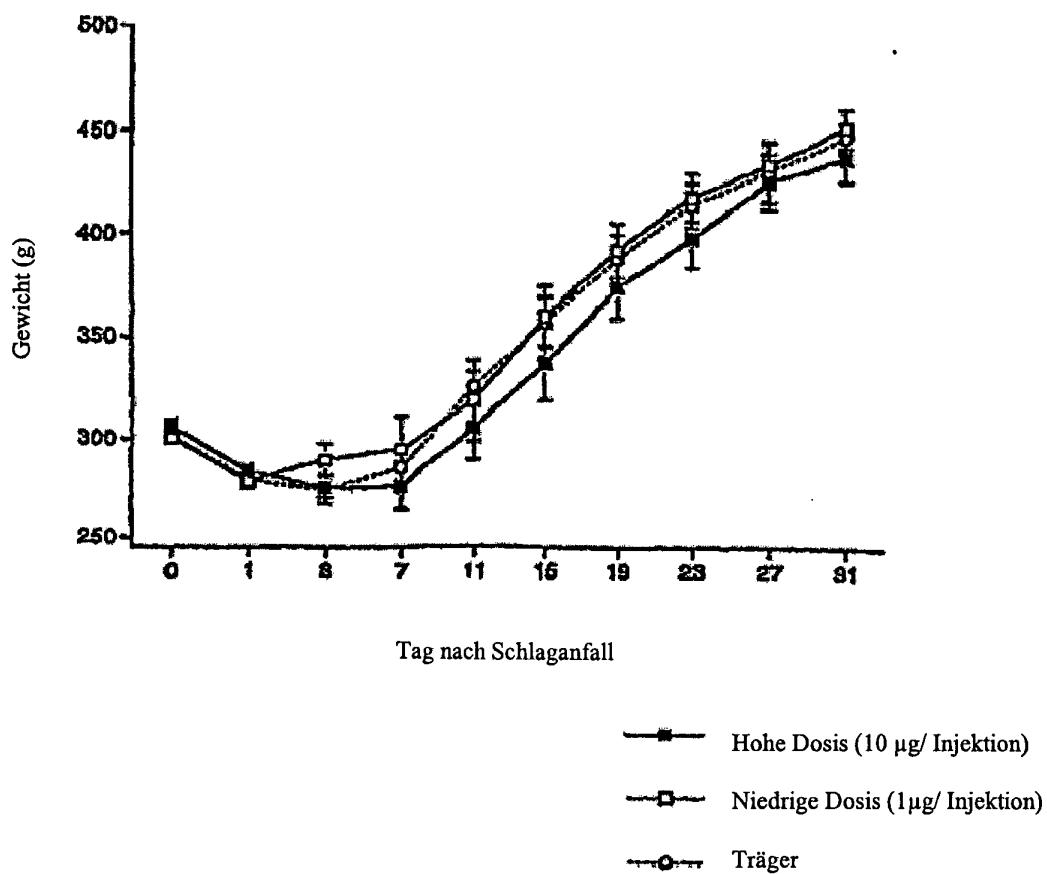


FIG. 7

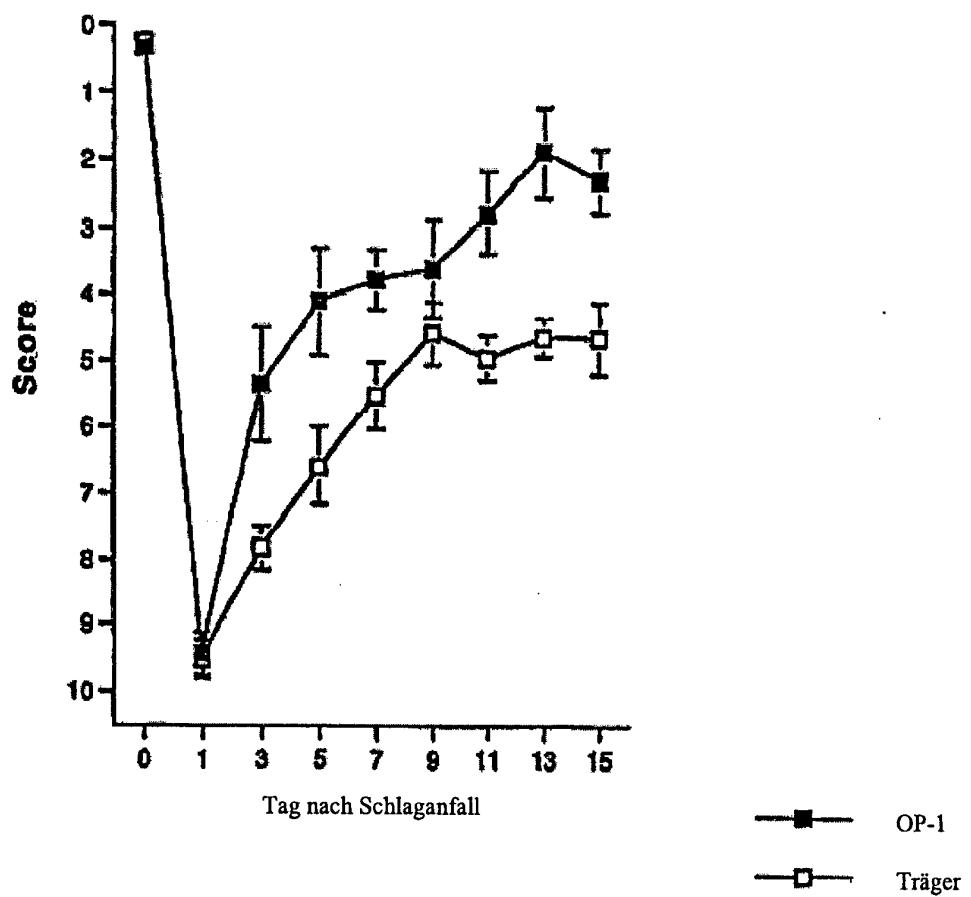


FIG. 8A

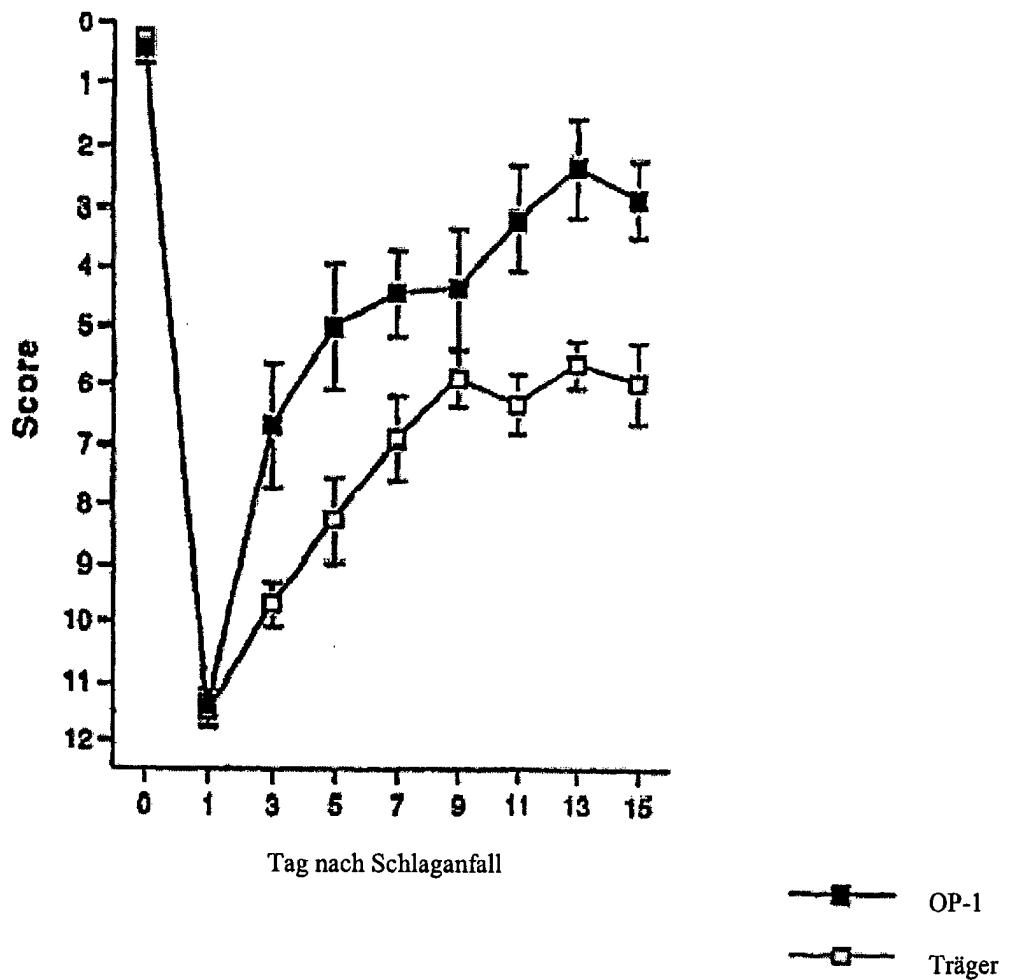


FIG. 8B

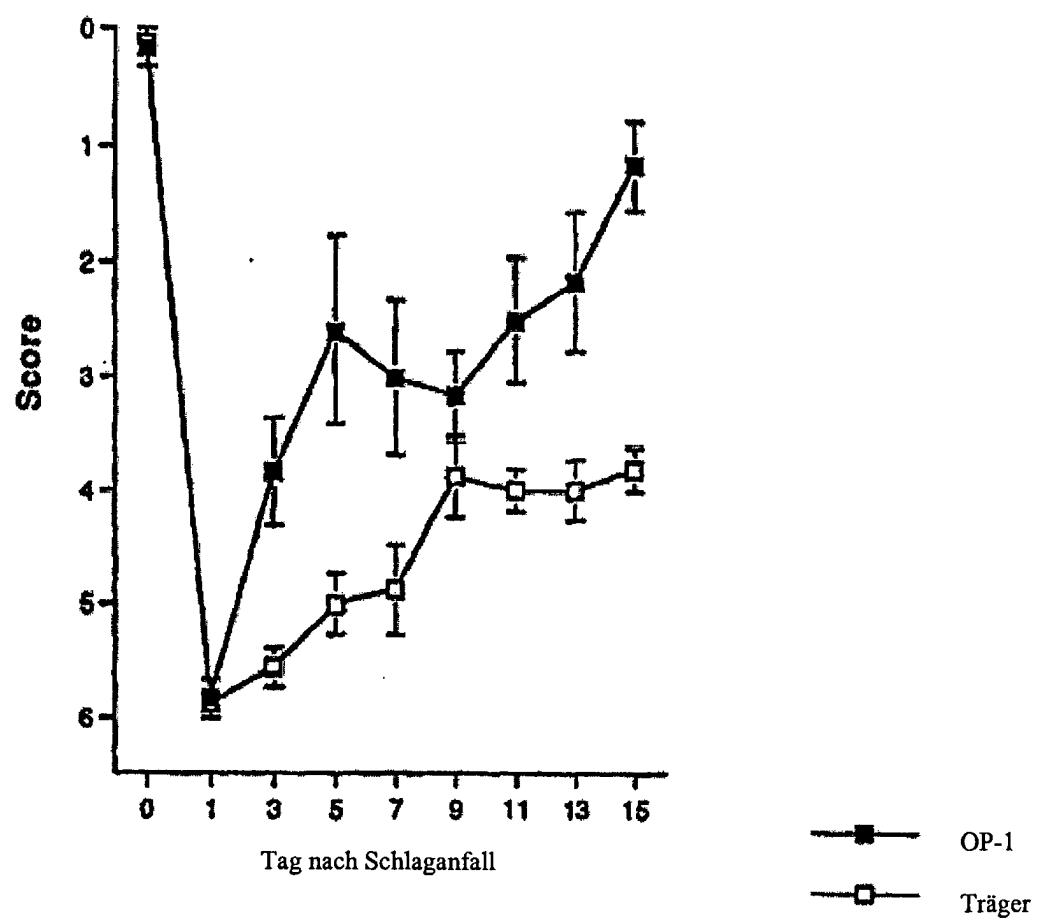


FIG. 9

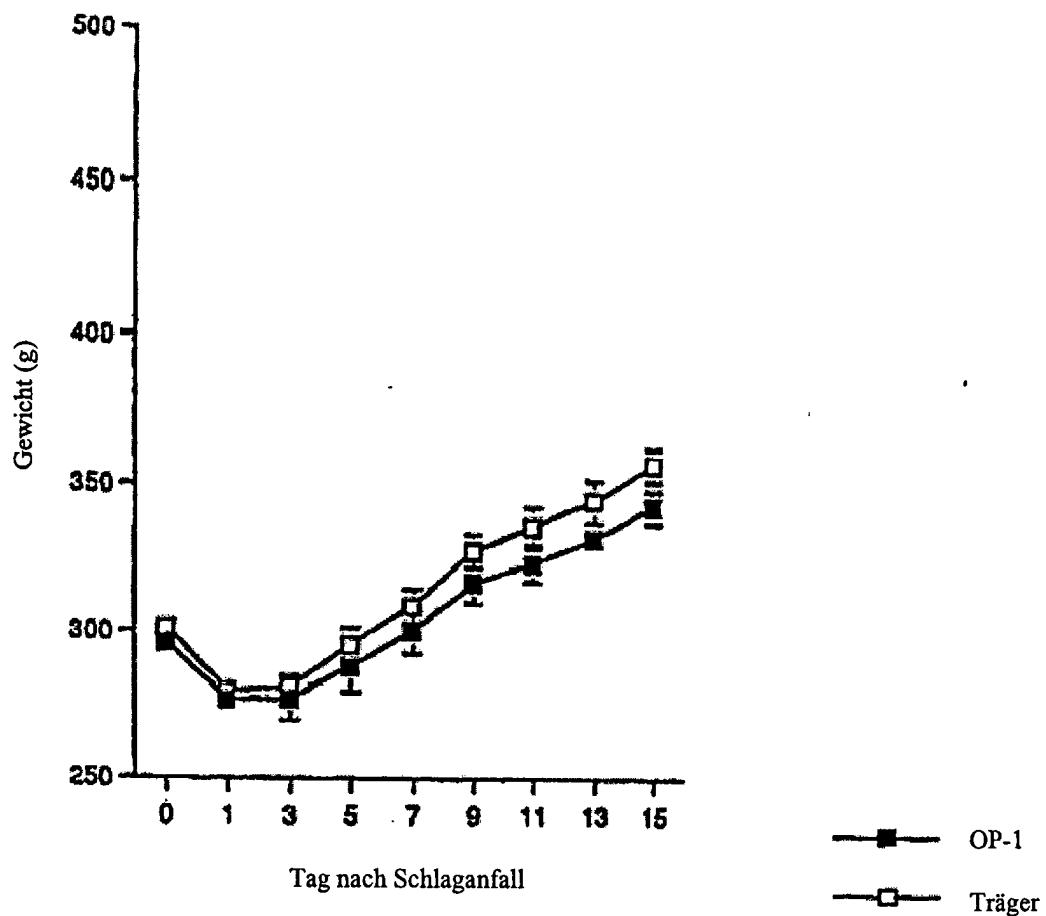


FIG. 10