

(12) **Übersetzung der neuen europäischen
Patentschrift**

(97) Veröffentlichungsnummer: EP 1133558

(96) Anmeldenummer: 1999963986
(96) Anmeldetag: 24.11.1999
(45) Ausgabetag: 04.07.2019

(51) Int. Cl.: **C12N 15/12** (2006.01)
C07K 14/51 (2006.01)
C07K 14/495 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)

(30) **Priorität:**
27.11.1998 US 110283 P beansprucht.

(97) **Veröffentlichungstag der Anmeldung:**
19.09.2001 Patentblatt 01/38

(97) **Bekanntmachung des Hinweises auf die
Patenterteilung:**
30.08.2006 Patentblatt 06/35

(97) **Hinweis auf Einspruchsentscheidung:**
13.04.2016 Patentblatt 16 /15

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

(56) **Entgegenhaltungen:**
Die Entgegenhaltungen entnehmen Sie bitte der
entsprechenden europäischen Druckschrift.

(73) **Patentinhaber:**
UCB, S.A.
1070 BRUXELLES (BE)

(72) **Erfinder:**
BRUNKOW, MARY, E.
SEATTLE, WA 98117 (US)
GALAS, DAVID, J.
CLAREMONT, CA 91711 (US)
KOVACEVICH, BRIAN
RENTON, WA 98059 (US)
MULLIGAN, JOHN, T.
SEATTLE, WA 98105 (US)
PAEPER, BRYAN, W.
SEATTLE, WA 98122 (US)
VAN NESS, JEFFREY
SEATTLE, WA 98125 (US)
WINKLER, DAVID, G.
SEATTLE, WA 98115 (US)

(74) **Vertreter:**
BARGER W. DIPL.ING., PISO E. DR., ISRAILOFF
P. DIPL.ING. DR.TECHN.
WIEN

(54) **ZUSAMMENSETZUNGEN UND VERFAHREN ZUR ERHÖHUNG DER KNOCHENMINERALISIERUNG**

EP 99 963 986.7 (1 133 558)
UCB, S.A.

TECHNISCHES GEBIET

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein pharmazeutische Produkte und Verfahren, und insbesondere die Herstellung von Medikamenten und Zusammensetzungen, die zur Steigerung des Mineralgehaltes von Knochen geeignet sind. Solche Zusammensetzungen und Medikamente können verwendet werden, um eine große Vielzahl von Zuständen, einschließlich zum Beispiel Osteopenie, Osteoporose, Brüche und anderer Störungen, in welchen die niedrige Knochenmineraldichte ein Kennzeichen der Erkrankung ist, zu behandeln.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Zwei oder drei verschiedene Phasen von Veränderungen der Knochenmasse treten im Leben eines Individuums auf (siehe Riggs, *West J. Med.* 154:63-77, 1991). Die erste Phase tritt sowohl bei Männern als auch bei Frauen auf und führt zur Erlangung einer Spitzen-Knochenmasse. Diese erste Phase wird durch lineares Wachstum der endochondralen Wachstumsplatten und durch radiales Wachstum aufgrund einer Rate periostealer Apposition erreicht. Die zweite Phase beginnt ungefähr im Alter von 30 Jahren für trabekuläre Knochen (flache Knochen, wie die Wirbel und das Becken) und ungefähr im Alter von 40 Jahren für kortikale Knochen (z. B. lange Knochen, die in den Gliedmaßen vertreten sind), und dauert bis ins hohe Alter an. Diese Phase ist durch langsamen Knochenverlust gekennzeichnet und tritt sowohl bei Männern als auch bei Frauen auf. Bei Frauen tritt zusätzlich eine dritte Phase von Knochenverlust auf, höchst wahrscheinlich aufgrund von Östrogendefiziten nach der Menopause. Allein während dieser Phase können Frauen zusätzliche 10% der Knochenmasse an kortikalen Knochen und 25% vom trabekulären Kompartiment verlieren (siehe Riggs, *supra*).

Verlust an Knochenmineralgehalt kann durch eine breite Vielfalt von Zuständen verursacht werden und kann zu signifikanten medizinischen Problemen führen. Zum

Beispiel ist Osteoporose eine schwächende Krankheit beim Menschen, die durch ausgeprägte Abnahmen der Masse und der Mineraleichte des Skelett-Knochens, strukturelle Verschlechterung der Knochen, einschließlich Abbau der Mikroarchitektur der Knochen und entsprechender Erhöhungen der Knochenfragilität und Anfälligkeit für Frakturen bei betroffenen Individuen gekennzeichnet ist. Bei Menschen geht der Osteoporose die klinische Osteopenie voraus (Knochenmineraleichte, die mehr als eine Standardabweichung, aber weniger als 2,5 Standardabweichungen unter dem mittleren Wert von Knochen junger Erwachsener ist), ein Zustand, der ungefähr 25 Millionen Menschen in den Vereinigten Staaten betrifft. Bei weiteren 7-8 Millionen Patienten in den Vereinigten Staaten wurde klinische Osteoporose diagnostiziert (definiert als Knochenmineraleicht mehr als 2,5 Standardabweichungen unter dem von reifen Knochen junger Erwachsener). Osteoporose ist eine der teuersten Erkrankungen für das System der Gesundheitsfürsorge, welche in den Vereinigten Staaten jährlich mehrere zehn Milliarden Dollar kostet. Zusätzlich zu Kosten in Zusammenhang mit der Krankheitsfürsorge tragen langfristige stationäre Betreuung und verlorene Arbeitstage zu den finanziellen und sozialen Kosten dieser Erkrankung bei. Weltweit sind ungefähr 75 Millionen Menschen durch Osteoporose gefährdet.

Die Häufigkeit der Osteoporose in der menschlichen Bevölkerung erhöht sich mit dem Alter, und überwiegt unter Kaukasiern bei Frauen (welche 80% des Osteoporose-Patientenpools in den Vereinigten Staaten ausmachen). Die erhöhte Gebrechlichkeit und Anfälligkeit für Frakturen des Knochenskeletts im Alter wird durch die größere Gefahr von versehentlichen Fällen in dieser Population verschlimmert. Mehr als 1,5 Millionen osteoporosebedingte Knochenbrüche werden jedes Jahr in den Vereinigten Staaten gemeldet. Gebrochene Hüften, Handgelenke und Wirbel gehören zu den häufigsten Verletzungen, die mit Osteoporose assoziiert sind. Besonders Hüftfrakturen sind für den Patienten extrem unbequem und kostspielig und korrelieren bei Frauen mit hohen Sterblichkeits- und Morbiditätsraten.

Obgleich Osteoporose als eine Erhöhung der Gefahr für Frakturen aufgrund verringerter Knochenmasse definiert worden ist, kann keine der momentan vorhandenen Behandlungen für Skelett-Erkrankungen die Knochendichte bei Erwachsenen wesentlich erhöhen. Unter allen Medizinern ist die Meinung stark

vertreten, dass Arzneimittel benötigt werden, welche die Knochendichte bei Erwachsenen erhöhen könnten, besonders in den Knochen des Handgelenks, der Wirbelsäule und der Hüfte, die durch Osteopenie und Osteoporose gefährdet sind.

Gegenwärtige Strategien für die Prävention von Osteoporose können einen gewissen Vorteil für Einzelpersonen bieten, können jedoch eine Beseitigung der Krankheit nicht sicherstellen. Diese Strategien schließen Mäßigung körperlicher Aktivität (besonders bei gewichtsbelasteten Aktivitäten) mit Beginn des fortgeschrittenen Alters, einschließlich ausreichenden Calciums in der Diät und Vermeidung des Konsums von Produkten, die Alkohol oder Tabak beinhalten, ein. Für Patienten, die klinische Osteopenie oder Osteoporose aufweisen, zielen alle gegenwärtigen therapeutischen Arzneimittel und Strategien auf das Verringern weiteren Verlustes an Knochenmasse, indem sie den Prozess der Knochenabsorption inhibieren, ein natürlicher Bestandteile des Prozesses der Knochen-Remodellierung, der konstitutiv auftritt.

Zum Beispiel wird Östrogen heutzutage verordnet, um den Knochenverlust zu verzögern. Es besteht jedoch eine gewisse Kontroverse darüber, ob überhaupt ein langfristiger Vorteil für Patienten und ob überhaupt ein Effekt für Patienten mit einem Alter über 75 Jahren vorhanden ist. Außerdem glaubt man, dass die Anwendung von Östrogen das Risiko für Brust- und endometrialen Krebs erhöht.

Hohe Dosierungen von Calcium in der Nahrung, mit oder ohne Vitamin D ist ebenfalls vorgeschlagen worden für Frauen nach der Menopause. Jedoch können hohe Dosierungen von Calcium häufig unangenehme gastrointestinale Nebenwirkungen haben, und Serum- und Urin-Calciumspiegel müssen durchgehend unter Beobachtung sein (siehe Khosla und Riggs, *Mayo Clin. Proc.* 70:978-982, 1995).

Andere Therapeutika, die vorgeschlagen worden sind, schließen Calcitonin, Bisphosphonate, anabolische Steroide und Natriumfluorid ein. Solche Therapeutika haben jedoch unerwünschte Nebenwirkungen (z. B. können Calcitonin und Steroide Übelkeit verursachen und eine Immunreaktion hervorrufen, Bisphosphonate und

Natriumfluorid können die Reparatur von Frakturen inhibieren, selbst obwohl die Knochendichte leicht steigt), was von ihrem Gebrauch abhalten könnte (siehe Khosla und Riggs, *supra*).

Die EMBL-Datenbankeintragungen AA393939 und AI11311 befassen sich mit Expressed Sequence Tags (ESTs), für die keine Funktion angegeben ist.

Keine zurzeit angewandte therapeutische Strategie bezieht ein Arzneimittel ein, welches das Wachstum neuer Knochenmasse anregt oder steigert. Die vorliegende Erfindung stellt Zusammensetzungen und die Herstellung von Medikamenten bereit, die genutzt werden können, um die Knochenmineralisierung zu erhöhen, und somit genutzt werden können, um eine breite Vielfalt von Zuständen zu behandeln, bei welchen eine Erhöhung der Knochenmasse erwünscht ist. Ferner sieht die vorliegende Erfindung weitere, damit zusammenhängende Vorteile vor.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

Die vorliegende Offenbarung sieht eine neue Klasse oder Familie von TGF-Beta-Bindungsproteinen sowie Assays zur Auswahl von Verbindungen, welche den Knochenmineralgehalt und die Knochenmineraldichte erhöhen, Verbindungen, welche den Knochenmineralgehalt und die Knochenmineraldichte erhöhen, und die Verwendung solcher Verbindungen bei der Herstellung von Medikamenten zur Behandlung oder Vorbeugung einer großen Vielzahl von Zuständen vor.

Die Erfindung stellt eine isolierte Nukleinsäure bereit, welche die Sequenz ID Nr. 1, 5, 9, 11, 13 oder 15 oder eine komplementäre Sequenz davon umfasst.

Innerhalb verwandter Aspekte der vorliegenden Offenbarung werden isolierte Nukleinsäuremoleküle bereitgestellt, basierend auf der Hybridisierung zu nur einem Abschnitt von einer der oben identifizierten Sequenzen (z. B. für (a) kann die Hybridisierung zu einer Sonde von mindestens 20, 25, 50 oder 100 Nukleotiden vorliegen, ausgewählt aus den Nukleotiden 156 bis 539 oder 555 bis 687 der Sequenz ID Nr. 1). Wie leicht offensichtlich sein sollte, kann die notwendige

Stringenz, die für die Hybridisierung zu verwenden ist, variieren, basierend auf der Größe der Sonde. Zum Beispiel könnten für eine 25-mer-Sonde hohe Stringenzbedingungen 60 mM Tris pH 8,0, 2 mM EDTA, 5x Denhardts, 6x SSC, 0,1% (w/v) N-Laurylsarkosin, 0,5% (w/v) NP-40 (Nonidet P-40) über Nacht bei 45 Grad C einschließen, gefolgt von zwei Waschvorgängen mit 0,2x SSC/0,1% SDS bei 45-50 Grad. Für eine 100-mer-Sonde unter niedrigen Stringenzbedingungen könnten geeignete Bedingungen folgendes einschließen: 5x SSPE, 5x Denhardts und 0,5% SDS über Nacht bei 42-50 Grad, gefolgt von zwei Waschvorgängen mit 2x SSPE (oder 2x SSC)/0,1% SDS bei 42-50 Grad.

Es werden isolierte Nukleinsäuremoleküle offenbart, welche Homologie zu Sequenz ID Nr. 1, 5, 7, 9, 11, 13 oder 15 auf einem 50%-, 60%-, 75%-, 80%-, 90%-, 95%- oder 98%-Homologiespiegel aufweisen, unter Anwendung eines Wilbur-Lipman Algorithmus. Repräsentative Beispiele solcher isolierter Moleküle schließen zum Beispiel Nukleinsäuremoleküle ein, die ein Protein codieren, umfassend die Sequenz ID Nr. 2, 6, 10, 12, 14 oder 16, oder Homologie zu diesen Sequenzen bei einem Spiegel von 50%-, 60%-, 75%-, 80%-, 90%-, 95%- oder 98%-Homologieniveau aufweisen, unter Anwendung eines Lipman-Pearson Algorithmus.

Isolierte Nukleinsäuremoleküle sind gewöhnlich kleiner als 100kb in der Größe und, innerhalb bestimmter Ausführungsformen, kleiner als 50kb, 25kb, 10kb oder sogar 5kb hinsichtlich der Größe. Ferner existieren isolierte Nukleinsäuremoleküle innerhalb anderer Ausführungsformen nicht in einer "Bibliothek" anderer nicht-verwandter Nukleinsäuremoleküle (z. B. ein Subklon BAC, wie in der GenBank Zugangs-Nr. AC003098 und EMB Nr. AQ171546 beschrieben). Es können jedoch isolierte Nukleinsäuremoleküle in Bibliotheken verwandter Moleküle gefunden werden (z. B. zum Shuffling bzw. Teilaustausch, wie im U.S.-Patent Nr. 5 837 458; 5 830 721 und 5 811 238 beschrieben ist). Schließlich schließen isolierte Nukleinsäuremoleküle, wie hierin beschrieben, nicht Nukleinsäuremoleküle ein, die Dan, Cerberus, Gremlin oder SCGF codieren (U.S.-Patent Nr. 5 780 263).

Ebenfalls von der vorliegenden Offenbarung bereitgestellt werden Kloniervektoren, welche die oben erwähnten Nukleinsäuremoleküle enthalten, und Expressions-

vektoren, die einen Promotor (z. B. eine regulatorische Sequenz) umfassen, der funktionsfähig an eines der oben erwähnten Nukleinsäuremoleküle verknüpft ist. Repräsentative Beispiele für geeignete Promotoren schließen gewebespezifische Promotoren und viral-basierte Promotoren ein (z. B. CMV-basierte Promotoren, wie CMV I-E, SV40-early-Promotor und MuLV-LTR). Expressionsvektoren können auch auf Viren basieren oder von Viren stammen (z. B. ein "viraler Vektor"). Repräsentative Beispiele für virale Vektoren schließen virale Herpes-Simplex-Vektoren, adenovirale Vektoren, Adenovirus-assoziierte virale Vektoren und retrovirale Vektoren ein. Ebenfalls bereitgestellt werden Wirtszellen, die jeden beliebigen der oben genannten Vektoren enthalten oder umfassen (einschließlich zum Beispiel Wirtszellen, die von Mensch, Affe, Hund, Ratte oder Maus stammen).

Innerhalb anderer Aspekte der vorliegenden Erfindung werden Verfahren zur Produktion von TGF-beta-Bindungsproteinen bereitgestellt, die den Schritt des Kultivierens der vorstehend erwähnten Wirtszelle, die einen Vektor enthält, umfassen, unter Bedingungen und für einen Zeitraum, ausreichend, um das TGF-beta-Bindungsprotein zu produzieren. Innerhalb weiterer Ausführungsformen kann das Protein, das durch dieses Verfahren hergestellt wurde, weiter gereinigt werden (z. B. durch Säulenchromatographie, Affinitätsreinigung und dergleichen). Folglich können isolierte Proteine, die durch die oben genannten Nukleinsäuremoleküle codiert werden (z. B. Sequenz ID Nr. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 oder 16), leicht produziert werden angesichts der vorliegenden Anmeldung.

Es wird auch offenbart, dass die bereits erwähnten Proteine oder Fragmente davon als Fusionsproteine produziert werden können. Zum Beispiel werden innerhalb eines Aspektes Fusionsproteine offenbart, die ein erstes Polypeptidsegment, das ein TGF-beta-Bindungsprotein umfasst, codiert durch ein Nukleinsäuremolekül, wie oben beschrieben, oder einem Abschnitt davon von mindestens 10, 20, 30, 50 oder 100 Aminosäuren in der Länge, und ein zweites Polypeptidsegment umfassen, das ein Nicht-TGF-beta-Bindungsprotein umfasst. Das zweite Polypeptid kann ein "tag", geeignet zur Reinigung oder Erkennung (z. B. ein Polypeptid, das mehrfache anionische Aminosäurereste umfasst – siehe U.S.-Patent Nr. 4 851 341), ein Marker

(z. B. grün fluoreszierendes Protein oder alkalische Phosphatase) oder ein toxisches Molekül (z. B. Ricin) sein.

Innerhalb eines weiteren Aspektes stellt die Erfindung einen monoklonalen Antikörper oder ein Fragment desselben bereit, der/das an ein TGF-beta-Bindungsprotein, das durch eine Nukleinsäure von Sequenz ID Nr. 1, 5, 9, 11, 13 oder 15 codiert ist, mit einem K_a von größer oder gleich 10^8 M^{-1} bindet und nicht das Protein Dan oder das Protein Gremlin bindet. Der Antikörper kann zum Beispiel humanen oder murinen Ursprungs sein. Innerhalb weiterer Ausführungsformen ist der Antikörper ein Fragment eines Antikörpers, der die Bindungscharakteristika eines ganzen Antikörpers behält (z. B. ein $F(ab')_2$ -, $F(ab)_2$ -, Fab' -, Fab - oder Fv -Fragment, oder sogar ein CDR). Von der Offenbarung werden ebenfalls Hybridome und andere Zellen, die zur Produktion und Expression der vorangehend erwähnten Antikörper in der Lage sind, bereitgestellt.

Innerhalb verwandter Aspekte der Erfindung werden Verfahren bereitgestellt, die ein TGF-beta-Bindungsprotein nachweisen, umfassend die Schritte der Inkubation eines Antikörpers, wie oben beschrieben, unter Bedingungen und für einen Zeitraum, ausreichend, um dem Antikörper zu ermöglichen, an ein TGF-beta-Bindungsprotein zu binden, und des Nachweisens der Bindung. Innerhalb verschiedener Ausführungsformen kann der Antikörper an einen festen Träger gebunden sein, um das Waschen oder Abtrennen zu erleichtern, und/oder markiert sein (z. B. mit einem Marker, gewählt aus der Gruppe, bestehend aus Enzymen, fluoreszierenden Proteinen und Radioisotopen).

Innerhalb anderer Aspekte der vorliegenden Offenbarung werden isolierte Oligonukleotide bereitgestellt, die an ein Nukleinsäuremolekül gemäß der Sequenz ID Nr. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 oder 18 oder das Komplement dazu, unter Bedingungen hoher Stringenz zu hybridisieren. Innerhalb weiterer Ausführungsformen der Offenbarung kann das Oligonukleotid in der Sequenz gefunden werden, welche die Sequenz ID Nr. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 oder 16 codiert. Innerhalb bestimmter Ausführungsformen der Offenbarung ist das Oligonukleotid von mindestens 15, 20, 30, 50 oder 100 Nukleotiden Länge. Innerhalb weiterer Ausführungsformen der

Offenbarung ist das Oligonukleotid mit einem anderen Molekül markiert (z. B. ein Enzym, ein fluoreszierendes Molekül oder ein Radioisotop). Von der Offenbarung werden ebenfalls Primer bereitgestellt, die zur spezifischen Amplifikation der Gesamtheit oder eines Abschnitts der oben erwähnten Nukleinsäuremoleküle in der Lage sind, welche TGF-beta-Bindungsproteine codieren. Wie hierin verwendet, sollte der Ausdruck "spezifische Amplifikation" so verstanden werden, dass er sich auf Primer bezieht, welche die vorangehend erwähnten TGF-beta-Bindungsproteine amplifizieren und nicht andere TGF-beta-Bindungsproteine, wie Dan, Cerberus, Gremlin oder SCGF (U.S.-Patent Nr. 5 780 263).

Innerhalb verwandter Aspekte der vorliegenden Offenbarung werden Verfahren zum Nachweisen eines Nukleinsäuremoleküls bereitgestellt, das ein TGF-beta-Bindungsprotein codiert, umfassend die Schritte der Inkubation eines Oligonukleotids, wie oben beschrieben, unter Bedingungen hoher Stringenz, und des Nachweisens der Hybridisierung des Oligonukleotids. Innerhalb bestimmter Ausführungsformen kann das Oligonukleotid markiert und/oder an einen festen Träger gebunden sein.

Innerhalb anderer Aspekte der vorliegenden Offenbarung werden Ribozyme bereitgestellt, die zur Spaltung der RNA in der Lage sind, welche eines der oben erwähnten TGF-beta-Bindungsproteine codiert (z. B. Sequenz ID Nr. 2, 6, 8, 10, 12, 14 oder 16). Solche Ribozyme können aus DNA, RNA (einschließlich 2'-O-Methyl-Ribonukleinsäuren), Nukleinsäureanalogen (z. B. Nukleinsäuren, die Phosphor-thioatverknüpfungen aufweisen) oder Mischungen davon bestehen. Von der Offenbarung werden ebenfalls Nukleinsäuremoleküle (z. B. DNA oder cDNA), die diese Ribozyme codieren, und Vektoren, die zur Expression oder Produktion der Ribozyme in der Lage sind, bereitgestellt. Repräsentative Beispiele für Vektoren schließen Plasmide, Retrotransposons, Cosmide und viral-basierte Vektoren ein (z. B. virale Vektoren, erzeugt mindestens zum Teil aus einem Retrovirus, Adenovirus oder adeno-assoziierten Virus). Ebenfalls bereitgestellt werden von der Offenbarung Wirtszellen (z. B. Menschen-, Hunde-, Ratten- oder Mauszellen), die diese Vektoren enthalten. In bestimmten Ausführungsformen kann die Wirtszelle mit dem Vektor stabil transformiert sein.

Innerhalb weiterer Aspekte der Offenbarung werden Verfahren zur Produktion von Ribozymen, entweder synthetisch oder durch *in vitro*- oder *in vivo*-Transkription bereitgestellt. Innerhalb weiterer Ausführungsformen der Offenbarung können die so produzierten Ribozyme weiter gereinigt und/oder zu pharmazeutischen Zusammensetzungen formuliert werden (z. B. das Ribozym oder Nukleinsäuremolekül, welches das Ribozym codiert, zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Verdünnungsmittel). In entsprechender Weise können die Antisinn-Oligonukleotide und Antikörper oder andere ausgewählte Moleküle, die hierin beschrieben wurden, zu pharmazeutischen Zusammensetzungen formuliert werden.

Innerhalb anderer Aspekte der vorliegenden Offenbarung werden Antisinn-Oligonukleotide bereitgestellt, die ein Nukleinsäuremolekül umfassen, das an ein Nukleinsäuremolekül gemäß der Sequenz ID Nr. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 oder 15, oder das Komplement dazu hybridisiert, und wobei das Oligonukleotid die Expression des TGF-beta-Bindungsproteins inhibiert, wie hierin beschrieben (z. B. humanes BEER). Innerhalb verschiedener solcher Aspekte weist das Oligonukleotid 15, 20, 25, 30, 35, 40 oder 50 Nukleotide Länge auf. Vorzugsweise ist das Oligonukleotid kleiner als 100, 75 oder 60 Nukleotide in der Länge. Wie leicht offensichtlich sein sollte, kann das Oligonukleotid aus einem oder mehreren Nukleinsäureanalogen, Ribonukleinsäuren oder Desoxyribonukleinsäuren bestehen. Ferner kann das Oligonukleotid durch eine oder mehrere Verknüpfungen modifiziert sein, einschließlich zum Beispiel kovalenter Verknüpfungen, wie eine Phosphorothioatverknüpfung, eine Phosphotriesterverknüpfung, eine Methylphosphonatverknüpfung, eine Methylen(methylimino)verknüpfung, eine Morpholinoverknüpfung, eine Amidverknüpfung, eine Polyamidverknüpfung, eine kurzkettiges-Alkyl-Interzucker-Verknüpfung, eine Cycloalkyl-Interzucker-Verknüpfung, eine kurzkettige heteroatomische Interzucker-Verknüpfung und heterozyklische Interzucker-Verknüpfung. Ein repräsentatives Beispiel eines chimären Oligonukleotids wird im U.S.-Patent Nr. 5 989 912 bereitgestellt.

Noch ein anderer Aspekt der vorliegenden Offenbarung sieht die Verwendung eines Ribozyms, wie oben beschrieben, bei der Herstellung eines Medikaments zur

Erhöhung der Knochenmineralisierung in einem warmblütigen Tier vor, wobei das Medikament eine effektive Ribozymmenge in das Tier einführt. Innerhalb verwandter Aspekte führen solche Medikamente eine effektive Menge des Nukleinsäuremoleküls oder Vektors in einen Patienten, wie hierin beschrieben, ein, welche zur Produktion des erwünschten Ribozyms in der Lage ist, wobei das Medikament unter Bedingungen eingeführt wird, welche die Transkription des Nukleinsäuremoleküls zur Herstellung des Ribozyms favorisieren.

Innerhalb anderer Aspekte der Erfindung werden transgene, nicht-humane Tiere vorgesehen. Innerhalb einer Ausführungsform ist ein transgenes Tier vorgesehen, dessen Keimzellen und somatische Zellen ein Nukleinsäuremolekül beinhalten, das ein TGF-beta-Bindungsprotein codiert, wobei die Nukleinsäure ein Nukleinsäuremolekül ist, welches die Sequenz ID Nr. 1, 5, 9, 11, 13 oder 15 umfasst, das mit einem für die Expression des Gens effektiven Promotor funktionsfähig verknüpft ist, wobei das Gen in das Tier oder einen Vorfahren des Tieres in einem embryonalen Stadium eingeführt worden ist, mit der Maßgabe, dass das Tier kein Mensch ist. Innerhalb anderer Ausführungsformen sind transgene Knockout-Tiere vorgesehen, die ein Tier umfassen, dessen Keimzellen und somatische Zellen eine Zerstörung von mindestens einem Allel eines endogenen Nukleinsäuremoleküls umfassen, welches an ein Nukleinsäuremolekül hybridisiert, das ein TGF-Bindungsprotein codiert, wobei die endogene Nukleinsäure eine Nukleinsäure mit der Sequenz ID Nr. 1, 5, 9, 11, 13 oder 15 ist, wobei die Zerstörung eine Transkription von Messenger-RNA von dem Allel verhindert, verglichen mit einem Tier ohne die Zerstörung, mit der Maßgabe, dass das Tier kein Mensch ist. Innerhalb verschiedener Ausführungsformen ist die Zerstörung eine Nukleinsäuredeletion, -substitution oder -insertion. Innerhalb anderer Ausführungsformen ist das transgene Tier eine Maus, eine Ratte, ein Schaf, ein Schwein oder ein Hund.

Innerhalb weiterer Aspekte der Offenbarung werden Kits zum Nachweisen der TGF-beta-Bindungsprotein-Genexpression bereitgestellt, die einen Behälter umfassen, der ein Nukleinsäuremolekül umfasst, wobei das Nukleinsäuremolekül gewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus (a) einem Nukleinsäuremolekül, das die Nukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 oder 15 umfasst; (b) einem Nuklein-

säuremolekül, welches das Komplement der Nukleotidsequenz von (a) umfasst; (c) einem Nukleinsäuremolekül, das ein Fragment von (a) oder (b) von mindestens 15, 20, 30, 50, 75 oder 100 Nukleotiden Länge ist. Ebenfalls bereitgestellt werden Kits für das Nachweisen eines TGF-beta-Bindungsproteins, die einen Behälter umfassen, der einen der hierin beschriebenen TGF-beta-Bindungsprotein-Antikörper umfasst.

Zum Beispiel werden innerhalb eines Aspektes der vorliegenden Offenbarung Verfahren bereitgestellt, um zu bestimmen, ob ein ausgewähltes Molekül zur Erhöhung des Knochenmineralgehaltes in der Lage ist, umfassend die Schritte des (a) Mischens eines oder mehrerer Molekülkandidaten mit TGF-beta-Bindungsprotein, codiert durch das Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, und einem ausgewählten Vertreter der TGF-beta-Proteinfamilie (z. B. BMP 5 oder 6), (b) Bestimmens, ob der Molekülkandidat die Signalgebung des TGF-beta-Familienvertreters verändert oder das Binden des TGF-beta-Bindungsproteins an den TGF-beta-Familienvertreter verändert. Innerhalb bestimmter Ausführungsformen der Offenbarung verändert das Molekül die Fähigkeit von TGF-beta, als ein positiver Regulator mesenchymaler Zelldifferenzierung zu funktionieren. Innerhalb dieses Aspektes der vorliegenden Offenbarung kann der Molekülkandidat(en) die Signalgebung oder das Binden, durch zum Beispiel entweder Verminderung (z. B. Inhibition) oder Erhöhung (z. B. Verstärkung) der Signalgebung oder des Bindens, verändern.

Innerhalb noch eines weiteren Aspektes der Offenbarung werden Verfahren bereitgestellt, um zu bestimmen, ob ein ausgewähltes Molekül zur Erhöhung des Knochenmineralgehaltes in der Lage ist, umfassend den Schritt des Bestimmens, ob ein ausgewähltes Molekül das Binden von TGF-beta-Bindungsprotein an Knochen oder ein Analog davon inhibiert. Repräsentative Beispiele für Knochen oder Analoge davon schließen Hydroxyapatit und primäre menschliche Knochenproben ein, die durch Biopsie erhalten wurden.

Innerhalb bestimmter Ausführungsformen der oben zitierten Verfahren ist das ausgewählte Molekül innerhalb einer Mischung von Molekülen enthalten, und die Verfahren können ferner den Schritt der Isolierung eines oder mehrerer Moleküle umfassen, welche innerhalb des Assays funktionell sind. Innerhalb noch anderer

Ausführungsformen der Offenbarung wird die TGF-beta-Proteinfamilie an einen festen Träger gebunden, und das Binden des TGF-beta-Bindungsproteins wird gemessen, oder TGF-beta-Bindungsprotein(e) sind an einen festen Träger gebunden, und das Binden der TGF-beta-Proteine wird gemessen.

Durch Anwendung von Verfahren wie die, die oben offenbart wurden, kann eine breite Vielfalt von Molekülen auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, den Knochenmineralgehalt durch Inhibition des Bindens des TGF-beta-Bindungsproteins an die TGF-beta-Proteinfamilie zu erhöhen. Repräsentative Beispiele für solche Moleküle schließen Proteine oder Peptide, organische Moleküle und Nukleinsäuremoleküle ein.

Innerhalb anderer verwandter Aspekte sieht die Offenbarung die Verwendung eines aus den hierin zitierten Assays identifizierten Moleküls bei der Herstellung eines Medikamentes zur Erhöhung des Knochenmineralgehaltes in einem warmblütigen Tier vor, wobei die Medikamente an ein warmblütiges Tier eine therapeutisch effektive Menge eines aus den hierin zitierten Assays identifizierten Moleküls verabreichen. Innerhalb eines weiteren Aspektes sieht die Erfindung die Verwendung eines Antikörpers oder Antikörperfragments der Erfindung bei der Herstellung eines Medikaments zur Erhöhung der Knochenmineralisierung in einem warmblütigen Tier vor. Die Medikamente liefern eine therapeutisch effektive Menge des Moleküls. Repräsentative Beispiele für geeignete Moleküle schließen Antikörper (z. B. einen humanisierten Antikörper) ein, welche die Aktivität des TGF-beta-Bindungsproteins spezifisch erkennen und verändern.

Innerhalb eines weiteren Aspektes sieht die vorliegende Offenbarung die Verwendung von Zellen, die zum Knochen wandern und bei denen ein Vektor eingeführt worden ist, der die Expression eines Moleküls steuert, welches das Binden des TGF-beta-Bindungsproteins an die TGF-beta-Proteinfamilie und knochenmorphogene Proteine (BMPs) inhibiert, bei der Herstellung eines Medikaments zur Erhöhung des Knochenmineralgehaltes in einem warmblütigen Tier vor. Wie hierin verwendet, sollte sich verstehen, dass Zellen "zum Knochen wandern", wenn sie sich nach peripherer Verabreichung innerhalb der

Knochenmatrix ansiedeln bzw. lokalisieren. Innerhalb einer Ausführungsform umfasst die Erfindung ferner, vor dem Schritt der Einführung, das Isolieren von Zellen aus dem Knochenmark, die zum Knochen wandern. Innerhalb einer weiteren Ausführungsform sind die zum Knochen wandernden Zellen gewählt aus der Gruppe, bestehend aus CD34+ Zellen und Osteoblasten.

Innerhalb anderer Aspekte der vorliegenden Offenbarung werden Moleküle bereitgestellt (vorzugsweise isolierte), die das Binden des TGF-beta-Bindungsproteins an die TGF-beta-Protein-Superfamilie inhibieren.

Innerhalb weiterer Aspekte können die Moleküle als eine Zusammensetzung bereitgestellt werden, und können ferner einen Knochenresorptionsinhibitor umfassen. Repräsentative Beispiele für solche Inhibitoren schließen Calcitonin, Östrogen, ein Bisphosphonat, einen Wachstumsfaktor mit anti-resorptiver Aktivität und Tamoxifen ein.

Repräsentative Beispiele für Moleküle, die in den oben erwähnten therapeutischen Kontexten verwendet werden können, schließen Antikörper (z. B. humanisierte Antikörper) ein. Solche Moleküle können, abhängig von ihrer Auswahl, verwendet werden, um die Signalgebung oder das Binden eines TGF-beta-Bindungsprotein-Familienvertreters, wie hierin beschrieben, zu verändern, zu antagonisieren oder zu fördern.

Innerhalb verschiedener Aspekte der Offenbarung können die oben beschriebenen Moleküle und Behandlungs- oder Präventionsmedikamente verwendet werden für Zustände wie Osteoporose, Osteomalazie, periodontale Erkrankung, Skorbut, Cushing-Erkrankung, Knochenfraktur und Zustände aufgrund von Gliedmaßenimmobilisierung und Steroidanwendung.

Diese und andere Aspekte der vorliegenden Offenbarung werden offensichtlich unter Bezug auf die folgende ausführliche Beschreibung und die beigelegten Zeichnungen. Zusätzlich werden verschiedene Druckschriften hierin dargelegt, die bestimmte

Verfahrensweisen oder Zusammensetzungen (z. B. Plasmide etc.) ausführlicher beschreiben.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

Die Figur 1 ist eine schematische Veranschaulichung, welche die Aminosäuresequenz von humanem Dan; humanem Gremlin; humanem Cerberus und humanem Beer vergleicht. Pfeile weisen auf das Cystein-Grundgerüst hin.

Die Figur 2 fasst die Ergebnisse zusammen, die durch die Untersuchung einer Vielfalt von humanen Geweben hinsichtlich Expression eines TGF-beta-Bindungsprotein-Gens, speziell des humanen Beer-Gens, erhalten wurden. Eine semiquantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktions-Prozedur (RT-PCR) wurde angewendet, um einen Abschnitt des Gens aus Erst-Strang-cDNA, synthetisiert aus Gesamt-RNA, zu amplifizieren (ausführlicher beschrieben in BEISPIEL 2A).

Die Figur 3 fasst die Ergebnisse zusammen, die durch RNA-*in situ*-Hybridisierung von Mausembryo-Schnitten erhalten wurden, wobei eine cRNA-Sonde verwendet wird, die komplementär zum Maus-Beer-Transkript ist (ausführlicher beschrieben in BEISPIEL 2B). Die Tafel A ist ein Querschnitt von einem 10,5 dpc-Embryo. Die Tafel B ist ein sagittaler Schnitt von einem 12,5 dpc-Embryo, und die Tafeln C und D sind sagittale Schnitte von 15,5 dpc-Embryos.

Die Figur 4 veranschaulicht durch Western-Blot-Analyse, die Spezifität von drei unterschiedlichen polyklonalen Antikörpern für ihre jeweiligen Antigene (ausführlicher beschrieben in BEISPIEL 4). Die Figur 4A zeigt die spezifische Reaktivität eines Anti-H. Beer-Antikörpers für das H. Beer-Antigen, aber nicht H. Dan oder H. Gremlin. Die Figur 4B zeigt die Reaktivität eines Anti-H. Gremlin-Antikörpers für das H. Gremlin-Antigen, aber nicht H. Beer oder H. Dan. Figur 4C zeigt die Reaktivität eines Anti-H. Dan-Antikörpers für H. Dan, aber nicht H. Beer oder H. Gremlin.

Die Figur 5 veranschaulicht durch Western-Blot-Analyse, die Selektivität des TGF-beta-Bindungsproteins Beer für BMP-5 und BMP-6, aber nicht BMP-4 (ausführlicher beschrieben in BEISPIEL 5).

Die Figur 6 verdeutlicht, dass die ionische Wechselwirkung zwischen dem TGF-beta-Bindungsprotein Beer und BMP-5 eine Dissoziationskonstante im Bereich von 15-30 nM aufweist.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

DEFINITIONEN

Vor der ausführlichen Darlegung der Erfindung kann es zum Verständnis dieser hilfreich sein, Definitionen bestimmter Termini darzulegen und die Abkürzungen aufzulisten und zu definieren, die nachstehend hierin verwendet werden.

"Molekül" sollte sich so verstehen, dass es Proteine oder Peptide (z. B. Antikörper, rekombinante Bindungspartner, Peptide mit einer gewünschten Bindungsaffinität), Nukleinsäuren (z. B. DNA, RNA, chimäre Nukleinsäuremoleküle und Nukleinsäureanalogue, wie PNA); und organische oder anorganische Verbindungen einschließt.

"TGF-beta" sollte sich so verstehen, dass es alle bekannten oder neuen Vertreter der TGF-beta-Superfamilie, die auch knochenmorphogene Proteine (BMPs) einschließt, beinhaltet.

"TGF-beta-Rezeptor" sollte sich so verstehen, dass er sich auf den Rezeptor bezieht, der spezifisch ist für einen bestimmten Vertreter der TGF-beta-Superfamilie (einschließlich knochenmorphogener Proteine (BMPs)).

"TGF-beta-Bindungsprotein" sollte sich so verstehen, dass es sich auf ein Protein mit spezifischer Bindungsaffinität für einen bestimmten Vertreter oder eine Untergruppe von Vertretern der TGF-beta-Superfamilie (einschließlich knochenmorphogener Proteine (BMPs)) bezieht. Spezifische Beispiele für TGF-beta-Bindungsproteine schließen Proteine ein, die durch die Sequenz ID Nr. 1, 5, 7, 9, 11, 13 und 15 codiert werden.

Inhibition des "Bindens des TGF-beta-Bindungsproteins an die TGF-beta-Proteinfamilie und knochenmorphogene Proteine (BMPs)" sollte sich so verstehen, dass sie

sich auf Moleküle bezieht, welche die Aktivierung von TGF-beta oder knochenmorphogenen Proteine (BMPs) zulassen, oder das Binden von TGF-beta-Familienvertretern, einschließlich knochenmorphogenen Proteinen (BMPs), an ihre jeweiligen Rezeptoren zulassen, durch Entfernen von TGF-beta oder indem es am Binden an TGF-Bindungsprotein gehindert wird. Eine solche Inhibition kann erreicht werden zum Beispiel durch Moleküle, die das Binden des TGF-beta-Bindungsproteins an spezifische Vertreter der TGF-beta-Superfamilie inhibieren.

"Vektor" bezieht sich auf eine Baugruppe, die in der Lage ist, die Expression des gewünschten Proteins zu lenken. Der Vektor muss transkriptionelle Promotorelemente einschließen, die funktionsfähig mit dem Gen(en) von Interesse verknüpft sind. Der Vektor kann entweder aus Desoxyribonukleinsäuren ("DNA"), Ribonukleinsäuren ("RNA"), oder einer Kombination aus den beiden (z. B. ein DNA-RNA-Chimär) bestehen. Optional kann der Vektor eine Polyadenylierungssequenz, eine oder mehrere Restriktionsstellen, sowie einen oder mehrere selektierbare Marker, wie Neomycin-Phosphotransferase oder Hygromycin-Phosphotransferase, einschließen. Zusätzlich, abhängig von der ausgewählten Wirtszelle und dem angewandten Vektor, können andere genetische Elemente, wie ein Replikationsursprung, zusätzliche Nukleinsäure-Restriktionsstellen, Enhancer, die Induzierbarkeit von Transkription vermittelnde Sequenzen und selektierbare Marker ebenfalls in den hierin beschriebenen Vektoren eingebracht werden.

Ein "isoliertes Nukleinsäuremolekül" ist ein Nukleinsäuremolekül, das nicht in der genomischen DNA eines Organismus integriert ist. Zum Beispiel ist ein DNA-Molekül, das ein TGF-Bindungsprotein codiert, das von der genomischen DNA einer eukaryotischen Zelle getrennt wurde, ein isoliertes DNA-Molekül. Ein weiteres Beispiel eines isolierten Nukleinsäuremoleküls ist ein chemisch synthetisiertes Nukleinsäuremolekül, das nicht im Genom eines Organismus integriert ist. Das isolierte Nukleinsäuremolekül kann genomische DNA, cDNA, RNA sein oder mindestens zum Teil aus Nukleinsäureanalogen bestehen.

Ein "isoliertes Polypeptid" ist ein Polypeptid, das im Wesentlichen frei von kontaminierenden zellulären Komponenten ist, wie Kohlenhydrat, Lipid oder anderen

proteinhaltigen Verunreinigungen, die mit dem Polypeptid in der Natur assoziiert sind. Innerhalb bestimmter Ausführungsformen beinhaltet eine spezielle Proteinpräparation ein isoliertes Polypeptid, wenn es nominell als eine Einzelbande auf einem SDS-PAGE-Gel mit Coomassie-Blaufärbung erscheint. Wenn es sich auf organische Moleküle bezieht, bedeutet "isoliert", dass die Verbindungen zu mehr als 90 Prozent rein sind, unter Anwendung von Verfahren, die im Fachbereich allgemein bekannt sind (z. B. NMR, Schmelzpunkt).

"Sklerosteose" Sklerosteose ist ein Terminus, der von Hansen (1967) (Hansen, H. G., Sklerosteose. In: Opitz, H., Schmid, F., Handbuch der Kinderheilkunde. Berlin: Springer (Hrsg.) 6 1967, S. 351-355) für eine Störung verwendet wurde, die ähnlich zu der van Buchem'schen Hyperostosis corticalis generalisata ist, sich aber möglicherweise in der radiologischen Erscheinung der Knochenveränderungen und im Auftreten asymmetrischer kutaner Syndaktylie der Zeige- und Mittelfinger in vielen Fällen unterscheidet. Der Kiefer hat ein ungewöhnlich quadratisches Aussehen bei diesem Leiden.

"Humanisierte Antikörper" sind rekombinante Proteine, in welchen murine Komplementaritäts-bestimmende Regionen monoklonaler Antikörper von schweren und leichten variablen Ketten des murinen Immunoglobulins in eine humane variable Domäne transferiert worden sind.

Wie hierin verwendet, ist ein "Antikörperfragment" ein Abschnitt eines Antikörpers, wie $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab und dergleichen. Unabhängig von der Struktur, bindet ein Antikörperfragment an dasselbe Antigen, das vom intakten Antikörper erkannt wird. Zum Beispiel bindet ein monoklonales Anti-TGF-beta-Bindungsprotein-Antikörperfragment an ein Epitop des TGF-beta-Bindungsproteins.

Der Terminus "Antikörperfragment" schließt auch jedes synthetisch oder gentechnisch konstruierte Protein ein, das wie ein Antikörper fungiert, indem es an ein spezifisches Antigen bindet, um einen Komplex zu bilden. Zum Beispiel schließen Antikörperfragmente isolierte Fragmente, die aus der variablen Region der leichten Ketten bestehen, "Fv"-Fragmente, die aus den variablen Regionen der schweren und

leichten Ketten bestehen, rekombinante einzelkettige Polypeptidmoleküle, in welchen leichte und schwere variable Regionen durch einen Peptid-Linker verbunden sind ("sFv-Proteine"), und Minimal-Erkennungseinheiten, die aus den Aminosäureresten bestehen, welche die hypervariable Region nachahmen, ein.

Eine "nachweisbare Markierung" ist ein Molekül oder Atom, das an einem Antikörperrest konjugiert werden kann, um ein für Diagnose nützliches Molekül zu produzieren. Beispiele für nachweisbare Markierungen schließen Chelatoren, photoaktive Mittel, Radioisotope, fluoreszente Mittel, paramagnetische Ionen, Enzyme und andere Markerreste ein.

Wie hierin verwendet, ist ein "Immunokonjugat" ein Molekül, das einen Anti-TGF-beta-Bindungsprotein-Antikörper oder ein Antikörperfragment und eine nachweisbare Markierung umfasst. Ein Immunokonjugat hat ungefähr die gleiche oder eine nur leicht reduzierte Fähigkeit, das TGF-beta-Bindungsprotein nach der Konjugation zu binden, wie vor der Konjugation.

Abkürzungen: TGF-beta – "Transformierender Wachstumsfaktor-beta"; TGF-bBP – "Transformierender-Wachstumsfaktor-beta-Bindungsprotein" (ein repräsentatives TGF-bBP wird als "H. Beer" bezeichnet); BMP – "knochenmorphogenes Protein"; PCR – "Polymerasekettenreaktion"; RT-PCR – PCR-Verfahren, in welchem RNA zuerst in DNA transkribiert wird, im ersten Schritt unter Verwendung reverser Transkriptase (RT); cDNA – jede DNA, die durch Kopieren einer RNA-Sequenz zur DNA-Form hergestellt wird.

Wie oben angemerkt, stellt die vorliegende Erfindung eine neue Klasse von TGF-beta-Bindungsproteinen, ebenso wie Medikamente und Zusammensetzungen, zur Erhöhung des Knochenmineralgehaltes in warmblütigen Tieren bereit. Kurz gesagt, basieren die vorliegenden Erfindungen auf der unerwarteten Erkenntnis, dass eine Mutation in dem Gen, das einen neuen Vertreter der TGF-beta-Bindungsproteinfamilie codiert, zu einem seltenen Zustand (Sklerosteose) führt, gekennzeichnet durch Knochenmineralgehalte, die um das ein- bis vierfache höher sind als in normalen Individuen. Somit, wie unten ausführlicher diskutiert wird, hat diese Erkenntnis

zur Entwicklung von Assays, die angewendet werden können, um Moleküle zu selektieren, die das Binden von TGF-beta-Bindungsproteinen an die TGF-beta-Proteinfamilie und morphogene Knochenproteine (BMPs) inhibieren, und von Medikamenten, die solche Moleküle zur Erhöhung des Knochenmineralgehaltes von warmblütigen Tieren (einschließlich zum Beispiel Menschen) verwenden, geführt.

DISKUSSION DER ALS SKLEROSTEOSE BEKANNTEN KRANKHEIT

Sklerosteose ist ein Begriff, der von Hansen (1967) (Hansen, H. G., Sklerosteose. In: Opitz, H., Schmid, F., Handbuch der Kinderheilkunde. Berlin: Springer (Pub.) 6 1967. S. 351-355) für eine Störung verwendet wurde, die ähnlich der van Buchem'schen Hyperostosis corticalis generalisata ist, sich aber möglicherweise in der radiologischen Erscheinung der Knochenveränderungen und im Auftreten asymmetrischer kutaner Syndaktylie der Zeige- und Mittelfinger in vielen Fällen unterscheidet.

Die Sklerosteose ist heutzutage als eine autosomale semidominante Störung bekannt, die durch weit verstreute sklerotische Läsionen des Knochens beim Erwachsenen gekennzeichnet ist. Der Zustand ist progressiv. Die Sklerosteose hat auch einen Entwicklungsaspekt, der mit Syndaktylie assoziiert ist (zwei oder mehrere Finger sind miteinander verschmolzen). Das Sklerosteose-Syndrom ist mit einer großen Statur assoziiert, und viele betroffene Individuen erreichen eine Größe von sechs Fuß oder mehr. Der Knochenmineralgehalt von Homozygoten kann um das 1- bis 6fache über normalen Individuen sein, und die Knochenmineraldichte kann um das 1- bis 4fache über normalen Werten sein (z. B. von unbetroffenen Geschwistern).

Das Sklerosteose-Syndrom tritt primär bei Afrikanern holländischer Abstammung in Südafrika auf. Ungefähr 1/140 Individuen in der 'Afrikaaner'-Population sind Träger des mutierten Gens (Heterozygoten). Die Mutation zeigt 100% Penetranz. Es existieren anekdotische Berichte über erhöhte Knochenmineraldichte in Heterozygoten mit nicht-assoziierten Pathologien (Syndaktylie oder übermäßiges Schädelwachstum).

Es scheint derzeitig, dass keine Abnormalität der Hypophysen-Hypothalamus-Achse in Sklerosteose vorhanden ist. Insbesondere scheint keine Überproduktion von Wachstumshormon und Kortison vorhanden zu sein. Zusätzlich sind Geschlechtshormonspiegel in betroffenen Individuen normal. Jedoch deuten Knochenumsatz-Marker (Osteoblasten-spezifische alkalische Phosphatase, Osteocalcin, Typ 1-Prokollagen-C'-Propeptid (PICP)) und gesamte Alkalische-Phosphatase; (siehe Comier, C., *Curr. Opin. in Rheu.* 7:243, 1995) darauf hin, dass mit der Krankheit assoziierte hyperosteoblastische Aktivität vorhanden ist, aber normale bis leicht verringerte Osteoklastenaktivität vorhanden ist, wie durch Marker der Knochenresorption gemessen wurde (Pyridinolin, Desoxypyridinolin, N-Telopeptid, Harn-Hydroxyprolin, Tartrat-resistente saure Phosphatasen des Plasmas und Galaktosylhydroxylysin (siehe Comier, *supra*)).

Sklerosteose ist gekennzeichnet durch die ständige Deposition von Knochen im ganzen Skelett während der Lebensdauer der betroffenen Individuen. In Homozygoten führt die ständige Deposition von Knochenmineral zu einem übermäßigen Knochenwachstum in Bereichen des Skeletts, in denen eine Abwesenheit von Mechanorezeptoren vorhanden ist (Schädel, Kiefer, Kraniaum). In Homozygoten mit Sklerosteose führt das übermäßige Wachstum der Schädelknochen zu kranialer Kompression und eventuell zum Tode aufgrund übermäßigen hydrostatischen Drucks auf den Hirnstamm. In allen anderen Teilen des Skeletts ist eine verallgemeinerte und diffuse Sklerose vorhanden. Kortikale Bereiche der langen Knochen sind sehr verdickt, was zu einer beträchtlichen Erhöhung der Knochenstärke führt. Trabekuläre Verbindungen sind erhöht hinsichtlich der Dicke, was wiederum die Stärke der trabekulären Knochen erhöht. Sklerotisierte Knochen scheinen bzgl. Röntgenstrahlen ungewöhnlich opak.

Wie oben in Beispiel 1 ausführlicher beschrieben, ist die seltene genetische Mutation, die für das Sklerosteose-Syndrom verantwortlich ist, in der Region des humanen Chromosoms 17 lokalisiert worden, die einen neuen Vertreter der TGF-beta-Bindungsproteinfamilie codiert (ein repräsentatives Beispiel davon wird als "H. Beer" bezeichnet). Wie unten ausführlicher beschrieben, wurde basierend auf dieser Erkenntnis der Knochenmineralisierungsmechanismus vollständiger verstanden, was

die Entwicklung von Assays für Moleküle, welche die Knochenmineralisierung erhöhen, und die Verwendung solcher Moleküle bei der Herstellung von Medikamenten, um den Knochenmineralgehalt zu erhöhen, und bei der Behandlung oder Prävention einer großen Anzahl von Erkrankungen erlaubt.

TGF-BETA-SUPERFAMILIE

Die 'Transformierender Wachstumsfaktor beta'(TGF-beta)-Superfamilie beinhaltet eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, die gemeinsame Sequenzelemente und Struktur-Motive (auf beidem, den sekundären und tertiären Ebenen) gemeinsam haben. Von dieser Proteinfamilie ist bekannt, ein breites Spektrum von biologischen Reaktionen auf eine große Vielfalt von Zelltypen auszuüben. Viele von ihnen haben wichtige Funktionen während der Embryonalentwicklung, in der Musterbildung und Gewebespezifikation; bei Erwachsenen sind sie z. B. in der Wundheilung und Knochenreparatur und Knochenremodellierung, und in der Modulation des Immunsystems involviert. Zusätzlich zu den drei TGF-betas schließt die Superfamilie die knochenmorphogenen Proteine (BMPs), Activine, Inhibine, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (GDFs) und glial-abstammende neurotrophe Faktoren (GDNFs) ein. Eine primäre Klassifizierung besteht durch allgemeine Sequenzmerkmale, die ein spezifisches Protein in eine allgemeine Unterfamilie eingruppiert. Zusätzliche Schichtenbildung bzw. Stratifizierung innerhalb der Unterfamilie ist aufgrund strengerer Sequenzkonservierung zwischen Vertretern der kleineren Gruppe möglich. In bestimmten Fällen, wie mit BMP-5, BMP-6 und BMP-7, kann diese so groß wie 75 Prozent Aminosäurehomologie zwischen Vertretern der kleineren Gruppe sein. Dieser Identitätsspiegel ermöglicht einer einzigen repräsentativen Sequenz, die biochemischen Schlüsselemente der Untergruppe zu veranschaulichen, was sie von anderen Vertretern der größeren Familie trennt.

TGF-beta signalisiert, indem er die Bildung hetero-oligomerer Komplexe von Typ I- und Typ II-Rezeptoren induziert. Die kristalline Struktur von TGF-beta2 ist bestimmt worden. Die allgemeine Faltung des TGF-beta2-Monomeren beinhaltet eine stabile, kompakte, Cystein-Knoten-ähnliche Struktur, die durch drei Disulfidbrücken gebildet wird. Dimerisierung, stabilisiert durch eine Disulfidbrücke, ist antiparallel.

TGF-beta-Familienvertreter initiieren ihre zelluläre Wirkung durch Binden an Rezeptoren mit intrinsischer Serin-/Threoninkinase-Aktivität. Diese Rezeptorfamilie besteht aus zwei Unterfamilien, bezeichnet als Typ I- und Typ II-Rezeptoren. Jeder Vertreter der TGF-beta-Familie bindet an eine charakteristische Kombination von Typ I- und Typ II-Rezeptoren, welche beide zur Signalgebung benötigt werden. Im derzeitigen Modell für TGF-beta-Rezeptoraktivierung bindet TGF-beta erst an den Typ II-Rezeptor (TbR-II), der in der Zellmembran in einer oligomeren Form mit aktivierter Kinase vorkommt. Danach wird der Typ I-Rezeptor (TbR-I), der den Liganden in Abwesenheit von TbR-II nicht binden kann, in den Komplex rekrutiert. TbR-II phosphoryliert dann TbR-I vorwiegend in einer Domäne, die reich an Glycin- und Serinresten ist (GS-Domäne), in der Juxtamembranregion und aktiviert dabei TbR-I.

Bisher sind sieben Typ I-Rezeptoren und fünf Typ II-Rezeptoren identifiziert worden.

KNOCHENMORPHOGENE PROTEINE (BMPs) SIND REGULATORISCHE SCHLÜSSELPROTEINE IN DER BESTIMMUNG DER KNOCHENMINERALDICHTHE BEI MENSCHEN

Ein großer Fortschritt im Verständnis der Knochenbildung war die Identifizierung der knochenmorphogenen Proteine (BMPs), auch bekannt als osteogene Proteine (OPs), welche Knorpel- und Knochendifferenzierung in vivo regulieren. BMPs/OPs induzieren endochondrale Knochendifferenzierung durch eine Kaskade von Ereignissen, die Knorpelbildung, Hypertrophie und Kalzifizierung des Knorpels, vaskuläre Invasion, Osteoblastendifferenzierung und Knochenbildung einschließen. Wie oben beschrieben, sind die BMPs/OPs (BMP 2-14 und osteogenes Protein 1 und -2, OP-1 und OP-2) Vertreter der TGF-beta-Superfamilie. Die auffällige evolutionäre Konservierung zwischen Vertretern der BMP/OP-Unterfamilie deutet darauf hin, dass sie für die normale Entwicklung und das Funktionieren von Tieren kritisch sind. Außerdem wirft das Vorliegen multipler Formen von BMPs/OPs eine wichtige Frage über die biologische Relevanz dieser scheinbaren Redundanz auf. Zusätzlich zur postfötalen Chondrogenese und Osteogenese spielen die BMPs/OPs mehrere Rollen in der Skeletogenese (einschließlich der Entwicklung kraniofazialer und dentaler Gewebe) und in der Embryonalentwicklung und Organogenese parenchymatöser Organe, einschließlich der Niere. Es ist heutzutage verstanden worden, dass die Natur auf gemeinsame (und wenige) molekulare Mechanismen

zurückgreift, die maßgeschneidert sind, um für die Entstehung spezialisierter Gewebe und Organe zu sorgen. Die BMP/OP-Superfamilie ist ein elegantes Beispiel für die Sparsamkeit der Natur in der Programmierung multipler spezialisierter Funktionen, welche molekulare Isoformen mit minimaler Variation in den Aminosäuremotiven innerhalb hoch konservierter Carboxyl-terminaler Regionen einsetzt.

BMP-ANTAGONISMUS

Die BMP- und Activin-Unterfamilien unterliegen einer signifikanten post-translationalen Regulation. Es existiert ein kompliziertes extrazelluläres Kontrollsystem, wodurch ein Antagonist hoher Affinität synthetisiert und exportiert wird, und anschließend mit BMPs oder Activinen selektiv komplexiert, um ihre biologische Aktivität zu unterbrechen (W.C. Smith (1999) *TIG* 15(1) 3-6). Eine Anzahl von diesen natürlichen Antagonisten ist identifiziert worden, und, basierend auf Sequenzdivergenz, scheinen sie sich unabhängig entwickelt zu haben, aufgrund des Fehlens von Primärsequenz-Konservierung. Es hat bis heute keine strukturelle Arbeit über diese Klasse von Proteinen gegeben. Untersuchungen dieser Antagonisten haben eine deutliche Präferenz für die Interaktion und Neutralisierung von BMP-2 und BMP-4 hervorgehoben. Weiterhin scheint der Inhibitionsmechanismus sich bei den verschiedenen Antagonisten zu unterscheiden (S. Iemura et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95 9337-9342).

NEUE TGF-BETA-BINDUNGSPROTEINE

1. Nochmals Hintergrund: TGF-beta-Bindungsproteine

Wie oben angemerkt, stellt die vorliegende Erfindung eine neue Klasse von TGF-beta-Bindungsproteinen bereit, die ein annähernd identisches Cystein-(Disulfid)-Gerüst, verglichen mit humanem DAN, humanem Gremlin und humanem Cerberus, und SCGF (U.S.-Patent Nr. 5 780 263), aber fast keine Homologie auf dem Nukleotidlevel besitzen (für Hintergrundinformation siehe allgemein Hsu, D.R., Economides, A.N., Wang, X., Eimon, P.M., Harland, R.M., "The *Xenopus* Dorsalizing Factor Gremlin Identifies a Novel Family of Secreted Proteins that Antagonize BMP Activities", *Molecular Cell* 1:673-683, 1998).

Ein repräsentatives Beispiel für die neue Klasse von TGF-beta-Bindungsproteinen wird in den Sequenz ID Nr. 1, 5, 9, 11, 13 und 15 offen gelegt. Repräsentative Vertreter dieser Klasse von Bindungsproteinen sollten sich auch so verstehen, dass sie Varianten des TGF-beta-Bindungsproteins (z. B. Sequenz ID Nr. 5 und 7) einschließen. Wie hierin verwendet, bezieht sich ein "TGF-beta-Bindungsprotein-Varianten-Gen" auf Nukleinsäuremoleküle, die ein Polypeptid codieren, das eine Aminosäuresequenz hat, die eine Modifikation der SEQ ID Nr. 2, 10, 12, 14 oder 16 ist. Solche Varianten schließen natürlich vorkommende Polymorphismen oder Allel-Varianten von TGF-beta-Bindungsprotein-Genen, ebenso wie synthetische Gene, die konservative Aminosäuresubstitutionen dieser Aminosäuresequenzen beinhalten, ein. Zusätzliche variante Formen eines TGF-beta-Bindungsprotein-Gens sind Nukleinsäuremoleküle, die Insertionen oder Deletionen der hierin beschriebenen Nukleotidsequenzen beinhalten. TGF-beta-Bindungsprotein-Varianten-Gene können identifiziert werden, indem bestimmt wird, ob die Gene mit einem Nukleinsäuremolekül unter stringenten Bedingungen hybridisieren, das die Nukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 1, 5, 7, 9, 11, 13 oder 15 aufweist. Zusätzlich sollten TGF-beta-Bindungsprotein-Varianten-Gene ein Protein codieren, das ein Cystein-Grundgerüst hat.

Alternativ dazu können TGF-beta-Bindungsprotein-varianten-Gene durch Sequenzvergleich identifiziert werden. Wie hierin verwendet, haben zwei Aminosäuresequenzen "100%-Aminosäuresequenz-Identität", sofern die Aminosäurereste der zwei Aminosäuresequenzen gleich sind, wenn sie hinsichtlich maximaler Übereinstimmung aligniert werden. In entsprechender Weise haben zwei Nukleotidsequenzen "100%-Nukleotidsequenz-Identität", sofern die Nukleotidreste der zwei Nukleotidsequenzen gleich sind, wenn sie hinsichtlich maximaler Übereinstimmung aligniert werden. Sequenzvergleiche können unter Anwendung von Standard-Softwareprogrammen durchgeführt werden, wie denjenigen, die im LASERGENE Bioinformatik-EDV-Paket eingeschlossen sind, welches von DNASTAR (Madison, Wisconsin) hergestellt wird. Andere Verfahren für den Vergleich von zwei Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen durch Bestimmung der optimalen Alignierung, sind dem Fachmann allgemein bekannt (siehe z. B. Peruski und Peruski, *The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research* (ASM Press, Inc. 1997), Wu et al. (Hrsg.), "Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic

Acids and Proteins", in *Methods in Gene Biotechnology*, Seiten 123-151 (CRC Press, Inc. 1997), und Bishop (Hrsg.), *Guide to Human Genome Computing*, 2te Ausgabe (Academic Press, Inc. 1998)).

Ein variantes TGF-beta-Bindungsprotein sollte mindestens 50% Aminosäuresequenz-Identität zu den SEQ ID Nr. 2, 6, 10, 12, 14 oder 16 und vorzugsweise mehr als 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% oder 95% Identität haben. Alternativ dazu können TGF-beta-Bindungsprotein-Varianten identifiziert werden, dadurch dass sie mindestens 70% Nukleotidsequenz-Identität zu SEQ ID Nr. 1, 5, 9, 11, 13 oder 15 haben. Außerdem zieht die vorliegende Offenbarung TGF-beta-Bindungsprotein-Genvarianten in Betracht, die mehr als 75%, 80%, 85%, 90% oder 95% Identität zur SEQ ID Nr. 1 haben. Ungeachtet des speziellen Verfahrens, das angewandt wurde, um ein TGF-beta-Bindungsprotein-Varianten-Gen oder variantes TGF-beta-Bindungsprotein zu identifizieren, kann ein variantes TGF-beta-Bindungsprotein oder ein Polypeptid, codiert durch ein variantes TGF-beta-Bindungsprotein-Gen, funktionell gekennzeichnet sein zum Beispiel durch seine Fähigkeit, an einen ausgewählten Vertreter der TGF-beta-Proteinfamilie zu binden und/oder dessen Signalgebung zu inhibieren, oder durch seine Fähigkeit, spezifisch an einen Anti-TGF-beta-Bindungsprotein-Antikörper zu binden.

Die vorliegende Offenbarung schließt funktionelle Fragmente von TGF-beta-Bindungsprotein-Genen ein. Innerhalb des Kontexts dieser Erfindung bezieht sich ein "funktionelles Fragment" eines TGF-beta-Bindungsprotein-Gens auf ein Nukleinsäuremolekül, das einen Abschnitt eines TGF-beta-Bindungsprotein-Polypeptids codiert, das entweder (1) die oben genannte Funktionsaktivität besitzt, oder (2) spezifisch an einen Anti-TGF-beta-Bindungsprotein-Antikörper bindet. Zum Beispiel umfasst ein funktionelles Fragment eines hierin beschriebenen TGF-beta-Bindungsprotein-Gens einen Abschnitt der Nukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 1, 5, 9, 11, 13 oder 15.

2. Isolierung des TGF-beta-Bindungsprotein-Gens

DNA Moleküle, die ein Bindungsprotein-Gen codieren, können durch Screenen einer humanen cDNA oder einer genomischen Bibliothek unter Verwendung von Polynukleotidsonden erhalten werden, die zum Beispiel auf der SEQ ID Nr. 1 basieren.

Zum Beispiel ist der erste Schritt in der Präparation einer cDNA-Bibliothek, RNA zu isolieren, wobei Verfahren verwendet werden, die dem Fachmann allgemein bekannt sind. Im Allgemeinen müssen RNA-Isolierungstechniken ein Verfahren zur Zellerstörung, ein Mittel zur Hemmung von RNase-gelenktem RNA-Abbau und ein Verfahren zur Trennung der RNA von DNA-, Protein- und Polysaccharidverunreinigungen vorsehen. Zum Beispiel kann eine Gesamt-RNA durch Gefrieren von Gewebe in flüssigem Stickstoff, Zermahlen des gefrorenen Gewebes mit einem Mörser und Pistil, um die Zellen zu lysieren, Extraktion des gemahlten Gewebes mit einer Lösung aus Phenol/Chloroform, um Proteine zu entfernen, und Trennung der RNA von den übrigen Unreinheiten durch selektive Ausfällung mit Lithiumchlorid isoliert werden (siehe zum Beispiel Ausubel et al. (Hrsg.), *Short Protocols in Molecular Biology, 3te Ausgabe*, Seiten 4-1 to 4-6 (John Wiley & Sons 1995) ["Ausubel (1995)"]; Wu et al., *Methods in Gene Biotechnology*, Seiten 33-41 (CRC Press, Inc. 1997) ["Wu (1997)"]).

Alternativ dazu kann Gesamt-RNA durch Extraktion gemahlten Gewebes mit Guanidiniumisothiocyanat, Extraktion mit organischen Lösemitteln und Trennung der RNA von Verunreinigungen unter Verwendung von Differentialzentrifugation isoliert werden (siehe zum Beispiel Ausubel (1995) auf den Seiten 4-1 bis 4-6; Wu (1997) auf den Seiten 33-41).

Um eine cDNA-Bibliothek zu konstruieren, muss Poly(A)⁺-RNA aus einer Gesamt-RNA-Präparation isoliert werden. Poly(A)⁺-RNA kann aus der Gesamt-RNA unter Verwendung der Standardtechnik der Oligo(dT)-Cellulose-Chromatographie isoliert werden (siehe zum Beispiel Ausubel (1995) auf den Seiten 4-11 bis 4-12).

Doppelsträngige cDNA-Moleküle werden von Poly(A)⁺-RNA synthetisiert, wobei Techniken verwendet werden, die dem Fachmann allgemein bekannt sind (siehe zum Beispiel Wu (1997) auf den Seiten 41-46). Außerdem können kommerziell

erhältliche Kits verwendet werden, um doppelsträngige cDNA-Moleküle zu synthetisieren. Zum Beispiel sind solche Kits von Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, Maryland), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Kalifornien), Promega Corporation (Madison, Wisconsin) und Stratagene Cloning Systems (La Jolla, Kalifornien) erhältlich.

Die grundlegende Herangehensweise, um TGF-beta-Bindungsprotein-cDNA-Klone zu erhalten, kann durch Konstruieren einer subtrahierten cDNA-Bibliothek modifiziert werden, die bzgl. TGF-Bindungsprotein-spezifischer cDNA-Moleküle angereichert ist. Techniken zur Konstruierung von subtrahierten Bibliotheken sind dem Fachmann allgemein bekannt (siehe zum Beispiel Sargent, "Isolation of Differentially Expressed Genes", in *Meth. Enzymol.* 152:423, 1987, und Wu et al. (Hrsg.), "Construction and Screening of Subtracted and Complete Expression cDNA Libraries", in *Methods in Gene Biotechnology*, Seiten 29-65 (CRC Press, Inc. 1997)).

Verschiedene Klonierungsvektoren sind für das Konstruieren einer cDNA-Bibliothek geeignet. Zum Beispiel kann eine cDNA-Bibliothek in einem Vektor hergestellt werden, der von einem Bakteriophagen stammt, wie ein λ gt10-Vektor (siehe zum Beispiel Huynh et al., "Constructing and Screening cDNA Libraries in λ gt10 and λ gt11", in *DNA Cloning: A Practical Approach, Band I*, Glover (Hrsg.), Seite 49 (IRL Press, 1985); Wu (1997) auf den Seiten 47-52).

Alternativ dazu können doppelsträngige cDNA-Moleküle in einen Plasmidvektor eingeführt werden, wie einen pBluescript-Vektor (Stratagene Cloning Systems; La Jolla, Kalifornien), ein LambdaGEM-4 (Promega Corp.; Madison, Wisconsin) oder andere kommerziell erhältliche Vektoren. Geeignete Kloniervektoren können auch von der American Type Culture Collection (Rockville, Maryland) erhalten werden.

Um die klonierten cDNA-Moleküle zu amplifizieren, wird die cDNA-Bibliothek in einen prokaryotischen Wirt unter Anwendung von Standardtechniken eingeführt. Zum Beispiel kann eine cDNA-Bibliothek in kompetente *E. coli*-DH5-Zellen eingeführt werden, die von Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, Maryland) erhalten werden können.

Eine humane genomische DNA-Bibliothek kann mit Mitteln hergestellt werden, die im Fachbereich allgemein bekannt sind (siehe zum Beispiel Ausubel (1995) auf den Seiten 5-1 bis 5-6; Wu (1997) auf den Seiten 307-327). Genomische DNA kann durch Lysieren von Gewebe mit dem Detergenz Sarkosyl, Verdauen des Lysats mit Proteinase K, Entfernung unlöslicher Trümmer aus dem Lysat durch Zentrifugation, Ausfällung von Nukleinsäure aus dem Lysat unter Verwendung von Isopropanol, und Reinigung resuspendierter DNA auf einem Cäsiumchlorid-Dichtegradienten isoliert werden.

DNA-Fragmente, die für die Erzeugung einer genomischen Bibliothek geeignet sind, können durch das statistische Scheren genomischer DNA oder durch partiellen Verdau genomischer DNA mit Restriktionsendonukleasen erhalten werden. Genomische DNA-Fragmente können in einen Vektor, wie einen Bakteriophagen- oder Cosmid-Vektor, eingeführt werden, gemäß konventioneller Techniken, wie der Anwendung von Restriktionsenzymverdau, um geeignete Termini bereitzustellen, der Anwendung der Behandlung mit alkalischer Phosphatase, um unerwünschte Verknüpfung von DNA-Molekülen zu vermeiden, und Ligation mit geeigneten Ligasen. Techniken für eine solche Manipulation sind im Fachbereich allgemein bekannt (siehe zum Beispiel Ausubel (1995) auf den Seiten 5-1 bis 5-6; Wu (1997) auf den Seiten 307-327).

Nukleinsäuremoleküle, die ein TGF-beta-Bindungsprotein-Gen codieren, können auch unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Oligonukleotidprimern erhalten werden, die Nukleotidsequenzen haben, welche auf den Nukleotidsequenzen des humanen TGF-beta-Bindungsprotein-Gens, wie hierin beschrieben, basieren. Allgemeine Verfahren zum Screenen von Bibliotheken mit PCR werden bereitgestellt zum Beispiel von Yu et al., "Use of the Polymerase Chain Reaction to Screen Phage Libraries", in *Methods in Molecular Biology, Band 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications*, White (Hrsg.), Seiten 211-215 (Humana Press, Inc. 1993). Außerdem werden Techniken zur Verwendung von PCR, um verwandte Gene zu isolieren, zum Beispiel von Preston, "Use of Degenerate Oligonucleotide Primers and the Polymerase Chain Reaction to Clone Gene Family Members", in

Methods in Molecular Biology, Band 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications, White (Hrsg.), Seiten 317-337 (Humana Press, Inc. 1993) beschrieben.

Alternativ dazu können humane genomische Bibliotheken von kommerziellen Quellen erhalten werden, wie Research Genetics (Huntsville, AL) und der American Type Culture Collection (Rockville, Maryland).

Eine Bibliothek, die cDNA oder genomische Klone enthält, kann mit einer oder mehreren Polynukleotidsonden gescreent werden, basierend auf der SEQ ID Nr. 1, unter Verwendung von Standardverfahren (*siehe zum Beispiel* Ausubel (1995) auf den Seiten 6-1 bis 6-11).

Anti-TGF-beta-Bindungsprotein-Antikörper, die wie unten beschrieben produziert wurden, können auch verwendet werden, um DNA-Sequenzen, die TGF-beta-Bindungsprotein-Gene codieren, aus cDNA-Bibliotheken zu isolieren. Zum Beispiel können die Antikörper verwendet werden, um λ gt11-Expressionsbibliotheken zu screenen, oder die Antikörper können zum Immunoscreenen verwendet werden, im Anschluß an Hybridselektion und Translation (*siehe zum Beispiel* Ausubel (1995) auf den Seiten 6-12 bis 6-16; Margolis et al., "Screening λ expression libraries with antibody and protein probes", in *DNA Cloning 2: Expression Systems, 2. Ausgabe*, Glover et al. (Hrsg.), Seiten 1-14 (Oxford University Press 1995)).

Die Sequenz einer TGF-beta-Bindungsprotein-cDNA oder eines genomischen TGF-beta-Bindungsprotein-Fragments kann unter Verwendung von Standardverfahren bestimmt werden. Außerdem kann die Identifizierung genomischer Fragmente, die einen TGF-beta-Bindungsprotein-Promotor oder ein regulatorisches Element enthalten, unter Verwendung allgemein etablierter Techniken, wie der Deletionsanalyse (*siehe allgemein* Ausubel (1995)), erreicht werden.

Als eine Alternative kann ein TGF-beta-Bindungsprotein-Gen durch Synthese von DNA-Molekülen unter Verwendung sich wechselseitig primender langer Oligonukleotide und der hierin beschriebenen Nukleotidsequenzen erhalten werden (*siehe zum Beispiel* Ausubel (1995) auf den Seiten 8-8 bis 8-9). Etablierte Techniken,

welche die Polymerase-Kettenreaktion verwenden, stellen die Fähigkeit bereit, DNA-Moleküle von mindestens zwei Kilobasen Länge zu synthetisieren (Adang et al., *Plant Molec. Biol.* 21:1131, 1993; Bambot et al., *PCR Methods and Applications* 2:266, 1993; Dillon et al., "Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes", in *Methods in Molecular Biology, Band 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications*, White (Hrsg.), Seiten 263-268, (Humana Press, Inc. 1993); Holowachuk et al., *PCR Methods Appl.* 4:299, 1995).

3. Produktion von TGF-beta-Bindungsprotein-Genen

Nukleinsäuremoleküle, die variante TGF-beta-Bindungsprotein-Gene codieren, können durch Screenen verschiedener cDNA- oder genomischer Bibliotheken mit Polynukleotidsonden, die Nukleotidsequenzen haben, welche auf den SEQ ID Nr. 1, 5, 9, 11, 13 oder 15 basieren, unter Verwendung der oben beschriebenen Verfahrensweisen erhalten werden. TGF-beta-Bindungsprotein-Genvarianten können auch synthetisch konstruiert werden. Zum Beispiel kann ein Nukleinsäuremolekül entwickelt werden, welches ein Polypeptid codiert, das einen konservativen Aminosäureaustausch aufweist, verglichen mit der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 2, 6, 8, 10, 12, 14 oder 16. Das heißt, dass Varianten erhalten werden können, die eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen der SEQ ID Nr. 2, 6, 8, 10, 12, 14 oder 16 enthalten, in welchen eine Alkyl-Aminosäure für eine Alkyl-Aminosäure in einer TGF-beta-Bindungsprotein-Aminosäuresequenz substituiert bzw. ersetzt wurde, eine aromatische Aminosäure für eine aromatische Aminosäure in einer TGF-beta-Bindungsprotein-Aminosäuresequenz ersetzt wurde, eine schwefelhaltige Aminosäure für eine schwefelhaltige Aminosäure in einer TGF-beta-Bindungsprotein-Aminosäuresequenz ersetzt wurde, eine hydroxy-haltige Aminosäure für eine hydroxy-haltige Aminosäure in einer TGF-beta-Bindungsprotein-Aminosäuresequenz ersetzt wurde, eine saure Aminosäure für eine saure Aminosäure in einer TGF-beta-Bindungsprotein-Aminosäuresequenz ersetzt wurde, eine basische Aminosäure für eine basische Aminosäure in einer TGF-beta-Bindungsprotein-Aminosäuresequenz ersetzt wurde oder eine dibasische Monocarboxyl-Aminosäure für eine dibasische Monocarboxyl-Aminosäure in einer TGF-beta-Bindungsprotein-Aminosäuresequenz ersetzt wurde.

Unter den gewöhnlichen Aminosäuren zum Beispiel, wird eine "konservative Aminosäuresubstitution" veranschaulicht durch eine Substitution unter Aminosäuren, innerhalb jeder der folgenden Gruppen: (1) Glycin, Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin, (2) Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, (3) Serin und Threonin, (4) Aspartat und Glutamat, (5) Glutamin und Asparagin, und (6) Lysin, Arginin und Histidin. Beim Vornehmen solcher Substitutionen ist es wichtig, das Cystein-Grundgerüst, dargelegt in Figur 1, möglichst zu bewahren.

Konservative Aminosäureaustausche in einem TGF-beta-Bindungsprotein-Gen können durch das Ersetzen von Nukleotiden für die in der SEQ ID Nr. 1 zitierten Nukleotide eingeführt werden. Solche "konservativen Aminosäure"-Varianten können zum Beispiel durch Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese, Linker-Scanning-Mutagenese, die Polymerase-Kettenreaktion verwendende Mutagenese und dergleichen erhalten werden (siehe Ausubel (1995) auf den Seiten 8-10 bis 8-22; und McPherson (Hrsg.), *Directed Mutagenesis: A Practical Approach* (IRL Press 1991)). Die funktionelle Fähigkeit solcher Varianten kann unter Verwendung eines Standardverfahrens, wie des hierin beschriebenen Assays, bestimmt werden. Alternativ dazu kann ein variantes TGF-beta-Bindungsprotein-Polypeptid durch die Fähigkeit, Anti-TGF-beta-Bindungsprotein-Antikörper spezifisch zu binden, identifiziert werden.

Routinemäßige Deletionsanalyse von Nukleinsäuremolekülen kann durchgeführt werden, um "funktionelle Fragmente" eines Nukleinsäuremoleküls zu erhalten, das ein TGF-beta-Bindungsprotein-Polypeptid codiert. Zur Veranschaulichung können DNA-Moleküle, welche die Nukleotidsequenz von SEQ ID Nr. 1 haben, durch *Ba*31-Nuklease verdaut werden, um eine Serie von verschachtelten Deletionen zu erhalten. Die Fragmente werden dann in Expressionsvektoren im richtigen Leserahmen eingesetzt, und die exprimierten Polypeptide werden isoliert und auf Aktivität getestet oder auf die Fähigkeit hin, an Anti-TGF-beta-Bindungsprotein-Antikörper zu binden. Eine Alternative zum Exonukleaseverdau ist es, Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese anzuwenden, um Deletionen oder Stopcodons einzuführen, um die Produktion eines gewünschten Fragments festzulegen. Alternativ dazu können bestimmte Fragmente eines TGF-beta-Bindungsprotein-Gens unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion synthetisiert werden.

Standardtechniken für die funktionelle Analyse von Proteinen werden beschrieben zum Beispiel durch Treuter et al., *Molec. Gen. Genet.* 240:113, 1993; Content et al., "Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by human interferon", in *Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems*, Cantell (Hrsg.), Seiten 65-72 (Nijhoff 1987); Herschman, "The EGF Receptor", in *Control of Animal Cell Proliferation, Band 1*, Boynton et al., (Hrsg.) Seiten 169-199 (Academic Press 1985); Coumilleau et al., *J. Biol. Chem.* 270:29270, 1995; Fukunaga et al., *J. Biol. Chem.* 270:25291, 1995; Yamaguchi et al., *Biochem. Pharmacol.* 50:1295, 1995; und Meisel et al., *Plant Molec. Biol.* 30:1, 1996.

Die vorliegende Offenbarung zieht auch funktionelle Fragmente eines TGF-beta-Bindungsprotein-Gens, die konservative Aminosäureveränderungen aufweisen, in Betracht.

Ein TGF-beta-Bindungsprotein-Varianten-Gen kann auf der Strukturbasis durch Bestimmung des Identitäts-Spiegels mit Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der SEQ ID Nr. 1, 5, 9, 11, 13 oder 15, und 2, 6, 10, 12, 14 oder 16 identifiziert werden, wie oben diskutiert. Eine alternative Herangehensweise, um ein variantes Gen auf Basis der Struktur zu identifizieren, besteht darin, zu bestimmen, ob ein Nukleinsäuremolekül, das ein potentiell variantes TGF-beta-Bindungsprotein-Gen codiert, unter stringenten Bedingungen an ein Nukleinsäuremolekül hybridisieren kann, das die Nukleotidsequenz der SEQ ID Nr. 1, 5, 9, 11, 13 oder 15 oder einen Abschnitt davon mit mindestens 15 oder 20 Nukleotiden Länge aufweist. Zur Veranschaulichung stringenter Hybridisierungsbedingungen kann sich ein Nukleinsäuremolekül, das eine variante TGF-beta-Bindungsprotein-Sequenz hat, mit einem Fragment eines Nukleinsäuremoleküls, das eine Sequenz von SEQ ID Nr. 1 hat, in einem Puffer binden, enthaltend zum Beispiel 5 x SSPE (1 x SSPE = 180 mM Natriumchlorid, 10 mM Natriumphosphat, 1 mM EDTA (pH 7,7), 5 x Denhardts Lösung (100xDenhardts = 2% (w/v) Rinderserum-Albumin, 2% (w/v) Ficoll, 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon) und 0,5% SDS, inkubiert über Nacht bei 55-60°C. Post-Hybridisierungswaschvorgänge bei hoher Stringenz werden typischerweise in 0,5 x

SSC (1 x SSC = 150 mM Natriumchlorid, 15mM Trinatriumcitrat) oder in 0,5 x SSPE bei 55-60°C durchgeführt.

Ungeachtet der besonderen Nukleotidsequenz eines varianten TGF-beta-Bindungsprotein-Gens, codiert das Gen ein Polypeptid, das durch seine funktionelle Aktivität oder durch die Fähigkeit, spezifisch an einen Anti-TGF-beta-Bindungsprotein-Antikörper zu binden, gekennzeichnet werden kann. Insbesondere codieren variante TGF-beta-Bindungsprotein-Gene Polypeptide, die mindestens 50% und bevorzugt mehr als 60, 70, 80 oder 90% der Aktivität der Polypeptide aufweisen, die durch das hierin beschriebene humane TGF-beta-Bindungsprotein-Gen codiert werden.

4. Herstellung von TGF-beta-Bindungsprotein in kultivierten Zellen

Um ein TGF-beta-Bindungsprotein-Gen zu exprimieren, muss ein Nukleinsäuremolekül, welches das Polypeptid codiert, funktionsfähig mit regulatorischen Sequenzen verknüpft sein, welche die transkriptionelle Expression in einem Expressionsvektor steuern, und dann in eine Wirtszelle eingeführt werden. Zusätzlich zu transkriptionsregulatorischen Sequenzen, wie Promotoren und Enhancern, können Expressionsvektoren translationsregulatorische Sequenzen und ein Markergen einschließen, welches für die Selektion von Zellen geeignet ist, die den Expressionsvektor tragen.

Expressionsvektoren, die zur Produktion eines Fremdproteins in eukaryotischen Zellen geeignet sind, beinhalten typischerweise (1) prokaryotische DNA-Elemente, codierend für einen bakteriellen Replikationsursprung und einen Antibiotikum-Resistenzmarker, um für das Wachstum und die Selektion des Expressionsvektors in einem bakteriellen Wirt zu sorgen; (2) eukaryotische DNA-Elemente, welche die Transkriptionsinitiation steuern, wie einen Promotor; und (3) DNA-Elemente, welche die Prozessierung von Transkripten steuern, wie eine Transkriptionsterminations-/Polyadenylierungs-Sequenz.

TGF-beta-Bindungsproteine der vorliegenden Erfindung werden vorzugsweise in Säugerzellen exprimiert. Beispiele für Säugerwirtszellen schließen Nierenzellen der Afrikanischen Grünmeerkatze (Vero; ATCC CRL 1587), humane embryonale Nierenzellen (293-HEK; ATCC CRL 1573), Babyhamsternierenzellen (BHK-21;

ATCC CRL 8544), Hundenierenzellen (MDCK; ATCC CCL 34), Ovarzellen des Chinesischen Hamsters (CHO-K1; ATCC CCL61), Rattenhypophysenzellen (GH1; ATCC CCL82), HeLa S3-Zellen (ATCC CCL2.2), Rattenhepatomzellen (H-4-II-E; ATCC CRL 1548), SV40-transformierte Affennierenzellen (COS-1; ATCC CRL 1650) und murine Embryonalzellen (NIH-3T3; ATCC CRL 1658) ein.

Für einen Säugerwirt können die transkriptionell- und translationell-regulatorischen Signale von viralen Quellen stammen, wie Adenovirus, Rinderpapillomvirus, Simian-Virus oder dergleichen, in welchen die regulatorischen Signale mit einem besonderen Gen assoziiert sind, das einen hohen Expressionslevel hat. Geeignete transkriptionsregulatorische Sequenzen können auch von Säugergenen, wie Actin-, Kollagen-, Myosin- und Metallothionein-Genen, erhalten werden.

Transkriptionsregulatorische Sequenzen schließen eine Promotorregion ein, die ausreicht, um die Initiierung von RNA-Synthese zu leiten. Geeignete eukaryotische Promotoren schließen den Promotor des Maus-Metallothionein-I-Gens [Hamer et al., *J. Molec. Appl. Genet.* 1:273, 1982], den TK-Promotor des Herpes-Virus [McKnight, *Cell* 31:355, 1982], den SV40-early-Promotor [Benoist et al., *Nature* 290:304, 1981], den Rous-Sarcomvirus-Promotor [Gorman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6777, 1982], den Cytomegalovirus-Promotor [Foecking et al., *Gene* 45:101, 1980] und den Maus-'Mammary-Tumor-Virus'-Promotor ein (siehe allgemein Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture", in *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland et al. (Hrsg.), Seiten 163-181 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)).

Alternativ dazu kann ein prokaryotischer Promotor, wie der Bakteriophage T3-RNA-Polymerase-Promotor, verwendet werden, um die TGF-beta-Bindungsprotein-Genexpression in Säugerzellen zu steuern, wenn der prokaryotische Promotor durch einen eukaryotischen Promotor reguliert wird (Zhou et al., *Mol. Cell. Biol.* 10:4529, 1990; Kaufman et al., *Nucl. Acids Res.* 19:4485, 1991).

TGF-beta-Bindungsprotein-Gene können auch in bakteriellen, Hefe-, Insekten- oder pflanzlichen Zellen exprimiert sein. Geeignete Promotoren, die verwendet werden

können, um TGF-beta-Bindungsprotein-Polypeptide in einem prokaryotischen Wirt zu exprimieren, sind dem Fachmann allgemein bekannt und schließen Promotoren, die in der Lage sind, die T4-, T3-, Sp6- und T7-Polymerasen zu erkennen, die P_R- und P_I-Promotoren des Bakteriophagen Lambda, die *trp*-, *recA*-, Hitzeschock-, *lacUV5*-, *tac*-, *lpp-lacSpr*-, *phoA*- und *lacZ*-Promotoren von *E. coli*, Promotoren von *B. subtilis*, die Promotoren der Bakteriophagen von *Bacillus*, *Streptomyces*-Promotoren, den *int*-Promotor des Bakteriophagen Lambda, den *bla*-Promotor von pBR322 und den CAT-Promotor des Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gens ein. Prokaryotische Promotoren sind in Überblickartikel beschrieben worden von Glick, *J. Ind. Microbiol.* 1:277, 1987, Watson et al., *Molecular Biology of the Gene, 4te Ausg.* (Benjamin Cummins 1987) und von Ausubel et al. (1995).

Bevorzugte prokaryotische Wirte schließen *E. coli* und *Bacillus subtilis* ein. Geeignete Stämme von *E. coli* schließen BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysE, DH1, DH4I, DH5, DH5I, DH5IF', DH5IMCR, DH10B, DH10B/p3, DH11S, C600, HB101, JM101, JM105, JM109, JM110, K38, RR1, Y1088, Y1089, CSH18, ER1451 und ER1647 ein (siehe zum Beispiel Brown (Hrsg.), *Molecular Biology Labfax* (Academic Press 1991)). Geeignete Stämme von *Bacillus subtilis* schließen BR151, YB886, M1119, MI120 und B170 ein (siehe zum Beispiel Hardy, "Bacillus Cloning Methods", in *DNA Cloning: A Practical Approach*, Glover (Hrsg.) (IRL Press 1985)).

Verfahren zur Expression von Proteinen in prokaryotischen Wirten sind dem Fachmann allgemein bekannt (siehe zum Beispiel Williams et al., "Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies", in *DNA Cloning 2: Expression Systems, 2te Ausgabe*, Glover et al. (Hrsg.), Seite 15 (Oxford University Press 1995); Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Seite 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995); und Georgiou, "Expression of Proteins in Bacteria", in *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland et al. (Hrsg.), Seite 101 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)).

Das Baculovirus-System stellt einen effizienten Weg bereit, um klonierte *TGF-beta-Bindungsprotein*-Gene in Insektenzellen einzuführen. Geeignete Expressionsvektoren basieren auf dem *Autographa californica*-Multiple-Nuclear-Polyhedrosis-Virus (AcMNPV) und beinhalten allgemein bekannte Promotoren, wie einen *Drosophila*-Hitzeschockprotein(hsp)-70-Promotor, *Autographa californica*-Nuclear-Polyhedrosis-Virus-immediate-early-Gen-Promotor (*ie-1*) und den delayed-early-39K-Promotor, Baculovirus-p10-Promotor, und den *Drosophila*-Metallothionein-Promotor. Geeignete Insektenwirtszellen schließen Zelllinien, die von IPLB-*Sf*-21 stammen, eine Ovar-Zelllinie aus der Puppe von *Spodoptera frugiperda*, wie *Sf*9 (ATCC CRL 1711), *Sf*21AE und *Sf*21 (Invitrogen Corporation; San Diego, CA), ebenso wie *Drosophila*-Schneider-2-Zellen ein. Etablierte Techniken zur Produktion rekombinanter Proteine in Baculovirus-Systemen werden bereitgestellt von Bailey et al., "Manipulation of Baculovirus Vectors", in *Methods in Molecular Biology, Band 7: Gene Transfer and Expression Protocols*, Murray (Hrsg.), Seiten 147-168 (The Humana Press, Inc. 1991), von Patel et al., "The baculovirus expression system", in *DNA Cloning 2: Expression Systems, 2te Ausgabe*, Glover et al. (Hrsg.), Seiten 205-244 (Oxford University Press 1995), von Ausubel (1995) auf den Seiten 16-37 bis 16-57, von Richardson (Hrsg.), *Baculovirus Expression Protocols* (The Humana Press, Inc. 1995) und von Lucknow, "Insect Cell Expression Technology", in *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland et al. (Hrsg.), Seiten 183-218 (John Wiley & Sons, Inc. 1996).

Promotoren zur Expression in Hefe schließen Promotoren von *GAL1* (Galaktose), *PGK* (Phosphoglycerat-Kinase), *ADH* (Alkoholdehydrogenase), *AOX1* (Alkoholoxidase), *HIS4* (Histidinoldehydrogenase) und dergleichen ein. Viele Hefe-Kloniervektoren sind erstellt worden und sind leicht erhältlich. Diese Vektoren schließen Ylp-basierte Vektoren, wie Ylp5, YRp-Vektoren, wie YRp17, YEp-Vektoren, wie YEp13, und YCp-Vektoren, wie YCp19, ein. Ein Fachmann wird es richtig einschätzen, dass eine breite Vielfalt von geeigneten Vektoren zur Expression in Hefezellen vorhanden ist.

Expressionsvektoren können auch in pflanzliche Protoplasten, intakte pflanzliche Gewebe oder isolierte pflanzliche Zellen eingeführt werden. Allgemeine Verfahren

zur Kultivierung pflanzlicher Gewebe werden bereitgestellt zum Beispiel von Miki et al., "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants", in *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick et al. (Hrsg.), Seiten 67-88 (CRC Press, 1993).

Ein Expressionsvektor kann in Wirtszellen eingeführt werden unter Verwendung einer Vielfalt von Standardtechniken, einschließlich Calciumphosphat-Transfektion, Liposom-vermittelter Transfektion, Mikroprojektil-vermittelter Einführung, Elektroporation und dergleichen. Vorzugsweise werden die transfizierten Zellen selektiert und vermehrt, um rekombinante Wirtszellen bereitzustellen, die den im Wirtszellgenom stabil integrierten Expressionsvektor umfassen. Techniken zur Einführung von Vektoren in eukaryotischen Zellen und Techniken zur Selektion solcher stabiler Transformanten unter Verwendung eines dominanten selektierbaren Markers werden beschrieben zum Beispiel von Ausubel (1995) und von Murray (Hrsg.), *Gene Transfer and Expression Protocols* (Humana Press 1991). Verfahren zur Einführung von Expressionsvektoren in bakteriellen, Hefe-, Insekten- und pflanzlichen Zellen werden auch bereitgestellt von Ausubel (1995).

Allgemeine Verfahren zur Expression und Gewinnung von Fremdproteinen, produziert durch ein Säugerzellensystem, werden bereitgestellt zum Beispiel von Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture", in *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland et al. (Hrsg.), Seiten 163 (Wiley-Liss, Inc. 1996). Standardtechniken zur Gewinnung von Protein, das durch ein bakterielles System produziert wurde, werden bereitgestellt zum Beispiel von Grisshammer *et al.*, "Purification of over-produced proteins from *E. coli* cells", in *DNA Cloning 2: Expression Systems, 2te Ausgabe*, Glover *et al.* (Hrsg.), Seiten 59-92 (Oxford University Press 1995). Etablierte Verfahren zur Isolierung rekombinanter Proteine aus einem Baculovirus-System werden beschrieben durch Richardson (Hrsg.), *Baculovirus Expression Protocols* (The Humana Press, Inc., 1995).

Im Allgemeinen kann ein TGF-beta-Bindungsprotein durch Standardtechniken, wie Affinitätschromatographie, Größenausschlusschromatographie, Ionenaustauschchromatographie, HPLC und dergleichen, isoliert werden. Zusätzliche Variationen in

der TGF-beta-Bindungsprotein-Isolierung und -Reinigung können vom Fachmann auf dem Gebiet entwickelt werden. Zum Beispiel kann ein Anti-TGF-beta-Bindungsprotein-Antikörper, erhalten wie unten beschrieben, verwendet werden, um große Mengen an Protein durch Immunoaffinitätsreinigung zu isolieren.

5. Produktion von Antikörpern gegen TGF-beta-Bindungsproteine

Antikörper gegen ein TGF-beta-Bindungsprotein können zum Beispiel unter Verwendung des Produktes eines Expressionsvektors als ein Antigen erhalten werden. Besonders nützliche Anti-TGF-beta-Bindungsprotein-Antikörper "binden spezifisch" an das TGF-beta-Bindungsprotein der Sequenz ID Nr. 2, 6, 10, 12, 14 oder 16, aber nicht an andere TGF-beta-Bindungsproteine, wie Dan, Cerberus, SCGF oder Gremlin. Die Antikörper der vorliegenden Erfindung (einschließlich Fragmente davon) sind monoklonal. Der Antikörper kann zu jeder Immunoglobulinklasse gehören und kann zum Beispiel ein IgG-, zum Beispiel IgG₁-, IgG₂-, IgG₃-, IgG₄-; IgE-; IgM-; oder IgA-Antikörper sein. Er kann von tierischem, zum Beispiel Säugerursprung sein, und kann zum Beispiel ein Maus-, Ratten-, Mensch- oder anderer Primatenantikörper sein. Sofern erwünscht, kann der Antikörper ein internalisierender Antikörper sein.

Polyklonale Antikörper gegen ein rekombinantes TGF-beta-Bindungsprotein können unter Verwendung von Verfahren hergestellt werden, die dem Fachmann allgemein bekannt sind (siehe zum Beispiel Green et al., "Production of Polyclonal Antisera", in *Immunochemical Protocols* (Manson, Hrsg.), Seiten 1-5 (Humana Press 1992); Williams et al., "Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies", in *DNA Cloning 2: Expression Systems, 2te Ausgabe*, Glover et al. (Hrsg.), Seite 15 (Oxford University Press 1995)). Obwohl polyklonale Antikörper typischerweise in Tieren, wie Ratten, Mäusen, Kaninchen, Ziegen oder Schafen herangezogen werden, kann ein Anti-TGF-beta-Bindungsprotein-Antikörper der vorliegenden Erfindung auch von einem subhumanen Primatenantikörper stammen. Allgemeine Techniken zum Heranzüchten diagnostisch und therapeutisch nützlicher Antikörper in Pavianen können zum Beispiel in Goldenberg et al., Internationale Patentveröffentlichung Nr. WO 91/11465 (1991), und in Losman et al., *Int. J. Cancer* 46:310, 1990, gefunden werden.

Der Antikörper sollte mindestens eine Domäne der variablen Region umfassen. Die Domäne der variablen Region kann jede Größe oder Aminosäurezusammensetzung haben und wird allgemein mindestens eine hypervariable Aminosäuresequenz umfassen, die für die Antigenbindung verantwortlich ist, eingebettet in einer Framework-Sequenz. Im Allgemeinen kann die Domäne der variablen (V) Region jede geeignete Anordnung von variablen Domänen von Immunglobulin-Schwer- (V_H) und/oder –Leicht- (V_L) –Ketten sein. Somit kann zum Beispiel die Domäne der V-Region monomer sein, und eine V_H - oder V_L -Domäne sein, wobei diese in der Lage sind, ein Antigen mit akzeptabler Affinität unabhängig zu binden. Alternativ dazu kann die Domäne der V-Region dimer sein und V_H - V_H -, V_H - V_L - oder V_L - V_L -Dimere beinhalten, in welchen die V_H - und V_L -Ketten nicht-kovalent assoziiert sind (abgekürzt hierin nachfolgend als F_V). Sofern jedoch erwünscht, können die Ketten kovalent gekoppelt sein, entweder direkt, zum Beispiel über eine Disulfidbindung zwischen den zwei variablen Domänen, oder über einen Linker, zum Beispiel einen Peptidlinker, um eine Einzelkettendomäne zu formen (abgekürzt hierin nachfolgend als scF_V).

Die Domäne der variablen Region kann jede natürlich vorkommende variable Domäne oder eine konstruierte Version davon sein. Mit konstruierter Version ist eine Domäne der variablen Region gemeint, die unter Verwendung rekombinanter DNA-Konstruktionstechniken erschaffen wurde. Solche konstruierten Versionen schließen diejenigen ein, die zum Beispiel aus natürlichen variablen Antikörper-Regionen durch Insertionen, Deletionen oder Veränderungen in oder an den Aminosäuresequenzen der natürlichen Antikörper erschaffen wurden. Spezielle Beispiele dieser Art schließen diejenigen konstruierten Domänen der variablen Region ein, die mindestens eine CDR und optional eine oder mehrere Framework-Aminosäuren aus einem Antikörper und den Rest der Domäne der variablen Region aus einem zweiten Antikörper beinhalten.

Die Domäne der variablen Region kann an einer C-terminalen Aminosäure kovalent mit mindestens einer anderen Antikörper-Domäne oder einem Fragment davon verbunden sein. Somit kann zum Beispiel dort wo eine V_H -Domäne in der variablen

Region vorhanden ist, diese mit einer Immunoglobulin-C_H1-Domäne oder einem Fragment davon verknüpft sein. In entsprechender Weise kann eine V_L-Domäne mit einer C_K-Domäne oder einem Fragment davon verknüpft sein. In dieser Weise kann zum Beispiel der Antikörper ein Fab-Fragment sein, wobei die Antigen-bindende Domäne assoziierte V_H- und V_L-Domänen enthält, kovalent verknüpft an ihren C-Termini mit einer CH1- bzw. C_K-Domäne. Die CH1-Domäne kann um weitere Aminosäuren erweitert sein, um zum Beispiel eine Gelenkregionsdomäne bereitzustellen, wie sie in einem Fab'-Fragment zu finden ist, oder um weitere Domänen bereitzustellen, wie die CH2- und CH3-Antikörper-Domänen.

Eine andere Form eines Antikörperfragments ist ein Peptid, das eine einzige Komplementaritäts-bestimmende Region (CDR) codiert. CDR-Peptide ("Minimum-Erkennungseinheiten") können durch Konstruieren von Genen erhalten werden, welche die CDR eines Antikörpers codieren, der von Interesse ist. Solche Gene werden zum Beispiel unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion hergestellt, um die variable Region aus RNA von Antikörper-produzierenden Zellen zu synthetisieren (siehe zum Beispiel Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106, 1991; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", in *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (Hrsg.), Seite 166 (Cambridge University Press 1995); und Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al., (Hrsg.), Seite 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995)).

Monoklonale Antikörper zur Verwendung in der Erfindung können durch konventionelle Immunisierungs- und Zellfusionsprozeduren hergestellt sein. Fragmente können unter Verwendung einer beliebigen geeigneten Standardchemikalie, z. B. Reduktions- oder enzymatischen Spaltungs- und/oder Verdauungstechniken, zum Beispiel durch Behandlung mit Pepsin, abgeleitet sein.

Insbesondere können monoklonale Anti-TGF-beta-Bindungsprotein-Antikörper unter Anwendung einer Vielfalt von Techniken erzeugt werden. Monoklonale Nagetierantikörper gegen spezifische Antigene können durch Verfahren erhalten werden, die

dem Fachmann bekannt sind (siehe zum Beispiel Kohler et al., *Nature* 256:495, 1975; und Coligan et al. (Hrsg.), *Current Protocols in Immunology*, 1:2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991) ["Coligan"]; Picksley et al., "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in *E. coli*", in *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2te Ausgabe, Glover et al. (Hrsg.), Seite 93 (Oxford University Press 1995)).

Kurz gesagt, können monoklonale Antikörper durch Injektionsbehandlung von Mäusen mit einer Zusammensetzung, die ein TGF-beta-Bindungsprotein-Genprodukt umfasst, Bestätigen des Vorhandenseins von Antikörperproduktion durch Entnahme einer Serumprobe, Entnahme der Milz, um B-Lymphozyten zu erhalten, Fusion der B-Lymphozyten mit Myelomzellen, um Hybridome zu produzieren, Klonen der Hybridome, Selektion positiver Klone, die Antikörper gegen das Antigen produzieren, Kultivierung der Klone, die Antikörper gegen das Antigen produzieren, und Isolierung der Antikörper aus den Hybridomkulturen erhalten werden.

Zusätzlich kann ein Anti-TGF-beta-Bindungsprotein-Antikörper der vorliegenden Erfindung von einem humanen monoklonalen Antikörper stammen. Humane monoklonale Antikörper werden von transgenen Mäusen erhalten, die konstruiert worden sind, um spezifische humane Antikörper in Antwort auf eine antigene Herausforderung zu produzieren. Bei dieser Technik werden Elemente des humanen Schwer- und Leichtketten-Locus in Mäusestämme eingeführt, die von embryonalen Stammzelllinien stammen, die gezielte Zerstörungen der endogenen Schwerketten- und Leichtketten-Loci beinhalten. Die transgenen Mäuse können humane Antikörper synthetisieren, die spezifisch für humane Antigene sind, und die Mäuse können verwendet werden, um humane Antikörper sezernierende Hybridome zu produzieren. Verfahren zum Erhalt humaner Antikörper aus transgenen Mäusen werden beschrieben zum Beispiel von Green et al., *Nature Genet.* 7:13, 1994; Lonberg et al., *Nature* 368:856, 1994; und Taylor et al., *Int. Immun.* 6:579, 1994.

Monoklonale Antikörper können aus Hybridomkulturen durch eine Vielfalt von gut-etablierten Techniken isoliert und gereinigt werden. Solche Isolierungstechniken schließen Affinitätschromatographie mit Protein-A-Sepharose, Größenausschlußchromatographie und Ionenaustauschchromatographie ein (siehe zum Beispiel

Coligan auf den Seiten 2.7.1-2.7.12 und Seiten 2.9.1-2.9.3; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", in *Methods in Molecular Biology, Band 10*, Seiten 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992)).

Für spezielle Anwendungen könnte es wünschenswert sein, Fragmente von Anti-TGF-beta-Bindungsprotein-Antikörpern herzustellen. Solche Antikörperfragmente können zum Beispiel durch proteolytische Hydrolyse des Antikörpers erhalten werden. Antikörperfragmente können durch Pepsin- oder Papainverdau ganzer Antikörper mittels konventioneller Verfahren erhalten werden. Zur Veranschaulichung können Antikörperfragmente durch enzymatische Spaltung von Antikörpern mit Pepsin produziert werden, um ein 5S-Fragment, gekennzeichnet als F(ab')₂, bereitzustellen. Dieses Fragment kann weiter gespalten werden, unter Verwendung eines Thiol-reduzierenden Mittels, um monovalente 3,5S-Fab'-Fragmente zu produzieren. Optional kann die Spaltungsreaktion unter Verwendung einer blockierenden Gruppe für die Sulfhydryl-Gruppen, die aus der Spaltung von Disulfidverknüpfungen resultieren, durchgeführt werden. Als eine Alternative erzeugt eine Pepsin-verwendende enzymatische Spaltung direkt zwei monovalente Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment. Diese Verfahren werden beschrieben zum Beispiel von Goldenberg, U.S.-Patent Nr. 4 331 647, Nisonoff et al., *Arch Biochem. Biophys.* 89:230, 1960, Porter, *Biochem. J.* 73:119, 1959, Edelman et al., in *Methods in Enzymology* 1:422 (Academic Press 1967), und von Coligan auf den Seiten 2.8.1-2.8.10 und 2.10-2.10.4.

Andere Verfahren zur Spaltung von Antikörpern, wie die Separation von schweren Ketten, um monovalente Leicht-Schwerketten-Fragmente zu bilden, weitere Spaltung von Fragmenten oder andere enzymatische, chemische oder genetische Techniken, können ebenfalls verwendet werden, solange die Fragmente an das Antigen binden, das von dem intakten Antikörper erkannt wird.

Alternativ dazu kann der Antikörper ein rekombinanter oder konstruierter Antikörper sein, der durch die Verwendung von rekombinanten DNA-Techniken erhalten wurde, involvierend die Manipulation und Reexpression von DNA, welche variable und/oder konstante Antikörperregionen codiert. Solch eine DNA ist bekannt und/oder leicht

erhältlich aus DNA-Bibliotheken, einschließlich zum Beispiel Phagen-Antikörper-Bibliotheken (siehe Chiswell, D J und McCafferty, J. *Tibtech.* 10 80-84 (1992)), oder kann, sofern erwünscht, synthetisiert werden. Standardmäßige molekularbiologische und/oder chemische Prozeduren können angewendet werden, um die DNA zu sequenzieren und zu manipulieren, um zum Beispiel Codons einzuführen, zur Erschaffung von Cysteinresten, zur Modifikation, Addition oder Deletion anderer Aminosäuren oder Domänen, wie erwünscht.

Hieraus können ein oder mehrere replizierbare Expressionsvektoren, welche die DNA enthalten, hergestellt und verwendet werden, um eine geeignete Zelllinie zu transformieren, z. B. eine nicht-produzierende Myelom-Zelllinie, wie eine Maus-NSO-Linie oder eine bakterielle, z. B. *E. coli*-Linie, in welcher die Produktion des Antikörpers stattfinden wird. Um eine effiziente Transkription und Translation zu erhalten, sollte die DNA-Sequenz in jedem Vektor geeignete regulatorische Sequenzen einschließen, besonders eine Promotor- und Leader-Sequenz, funktionsfähig verknüpft mit der Sequenz der variablen Domäne. Spezielle Verfahren zur Herstellung von Antikörpern in dieser Art, sind allgemein gut bekannt und werden routinemäßig verwendet. Zum Beispiel werden grundlegende Prozeduren der Molekularbiologie von Maniatis *et al.* (*Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989) beschrieben; DNA-Sequenzierung kann durchgeführt werden, wie in Sanger *et al.* (*PNAS* 74, 5463, (1977)) und dem Amersham International plc Sequenzierungshandbuch beschrieben; und ortsgerichtete Mutagenese kann durchgeführt werden gemäß des Verfahrens von Kramer *et al.* (*Nucl. Acids Res.* 12, 9441, (1984)) und dem Handbuch von Anglian Biotechnology Ltd. Zusätzlich sind zahlreiche Publikationen vorhanden, die Techniken genau schildern, welche geeignet sind für die Herstellung von Antikörpern durch DNA-Manipulation, Erzeugung von Expressionsvektoren und Transformation geeigneter Zellen, zum Beispiel wie von Mountain, A., und Adair, J. R., in *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* (Hrsg. Tombs, M P, 10, Kapitel 1, 1992, Intercept, Andover, GB) und in der internationalen Patentschrift Nr. WO 91/09967 als Überblick beschrieben.

Sofern erwünscht, kann der Antikörper gemäß der Erfindung ein oder mehrere an ihm angeheftete Effektor- oder Reporter-moleküle aufweisen, und die Erfindung erstreckt sich auf solche modifizierten Proteine. Die Effektor- oder Reporter-moleküle können an den Antikörper mittels jeder verfügbaren Aminosäure-Seitenkette, terminalen Aminosäure oder, sofern vorhanden, funktionellen Kohlenhydratgruppe, lokalisiert im Antikörper, angeheftet sein, immer natürlich vorausgesetzt, dass dies die Bindungseigenschaften und eventuelle Verwendbarkeit des Moleküls nicht nachteilig beeinflusst. Spezielle funktionelle Gruppen schließen zum Beispiel jede freie Amino-, Imino-, Thiol-, Hydroxyl-, Carboxyl- oder Aldehydgruppe ein. Anheften des Antikörpers und des Effektor- und/oder Reporter-moleküls kann durch solche Gruppen und eine geeignete funktionelle Gruppe im Effektor- oder Reporter-molekül erreicht werden. Die Verknüpfung kann direkt oder indirekt sein, durch Abstands- oder Brückengruppen.

Effektormoleküle schließen zum Beispiel antineoplastische Mittel, Toxine (wie enzymatisch aktive Toxine bakteriellen oder pflanzlichen Ursprungs und Fragmente davon, z. B. Ricin und Fragmente davon), biologisch aktive Proteine, zum Beispiel Enzyme, Nukleinsäuren und Fragmente davon, z. B. DNA, RNA und Fragmente davon, natürlich vorkommende und synthetische Polymere, z. B. Polysaccharide und Polyalkylen-Polymere, wie Poly(ethylenglykol) und Derivate davon, Radionuklide, besonders Radioiodid, und chelatisierte Metalle ein. Geeignete Reportergruppen schließen chelatisierte Metalle, fluoreszierende Verbindungen und Verbindungen, die durch NMR- oder ESR-Spektroskopie detektiert werden können, ein.

Spezielle antineoplastische Wirkstoffe schließen zytotoxische und zytostatische Wirkstoffe, zum Beispiel alkylierende Mittel, wie Stickstofflose (z. B. Chlorambucil, Melphalan, Mechlorethamin, Cyclophosphamid oder Uracillost) und Derivate davon, Triethylenphosphoramid, Triethylthiophosphoramid, Busulphan oder Cisplatin; Antimetabolite, wie Methotrexat, Fluoruracil, Floxuridin, Cytarabin, Mercaptopurin, Thioguanin, Fluoressigsäure oder Fluorcitronensäure, Antibiotika, wie Bleomycine (z. B. Bleomycinsulfat), Doxorubicin, Daunorubicin, Mitomycine (z. B. Mitomycin C), Actinomycine (z. B. Dactinomycin), Plicamycin, Calichaemicin und Derivate davon oder Esperamicin und Derivate davon; mitotische Inhibitoren, wie Etoposid, Vincristin

oder Vinblastin und Derivate davon; Alkaloide, wie Ellipticin; Polyole, wie Taxicin-I oder Taxicin-II; Hormone, wie Androgene (z. B. Dromostanon oder Testolacton), Progestine (z. B. Megestrolacetat oder Medroxyprogesteronacetat), Östrogene (z. B. Dimethylstilbestroidphosphat, Polyestradiolphosphat oder Estramustinphosphat) oder Antiöstrogene (z. B. Tamoxifen); Anthrachinone, wie Mitoxantron, Harnstoffe, wie Hydroxyharnstoff; Hydrazine, wie Procarbazin; oder Imidazole, wie Dacarbazin, ein.

Besonders nützliche Effektorgruppen sind das Calichaemicin und Derivate davon (siehe zum Beispiel die Südafrikanischen Patentschriften Nr. 85/8794, 88/8127 und 90/2839).

Chelatisierte Metalle schließen Chelate di- oder tripositiver Metalle mit einer Koordinationszahl von 2 bis 8 einschließlich ein. Spezielle Beispiele für solche Metalle schließen Technetium (Tc), Rhenium (Re), Kobalt (Co), Kupfer (Cr), Gold (Au), Silber (Ag), Blei (Pb), Bismut (Bi), Indium (In), Gallium (Ga), Yttrium (Y), Terbium (Tb), Gadolinium (Gd) und Scandium (Sc) ein. Im Allgemeinen ist das Metall vorzugsweise ein Radionuklid. Spezielle Radionuklide schließen ^{99m}Tc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{58}Co , ^{60}Co , ^{67}Cu , ^{195}Au , ^{199}Au , ^{110}Ag , ^{203}Pb , ^{206}Bi , ^{207}Bi , ^{111}In , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{160}Tb , ^{153}Gd und ^{47}Sc ein.

Das chelatisierte Metall kann zum Beispiel einer der oben genannten Metalltypen sein, chelatisiert mit jedem beliebigen geeigneten mehrzähligen Chelatisierungsmittel, zum Beispiel azyklische oder zyklische Polyamine, Polyether (z. B. Kronenether und Derivate davon); Polyamide; Porphyrine und carbozyklische Derivate.

Im Allgemeinen wird der Typ des Chelatisierungsmittels vom verwendeten Metall abhängen. Eine besonders nützliche Gruppe von Chelatisierungsmitteln in Konjugaten gemäß der Erfindung sind jedoch azyklische und zyklische Polyamine, besonders Polyaminocarbonsäuren, zum Beispiel Diethylentriaminpentaessigsäure und Derivate davon, und makrozyklische Amine, z. B. zyklische Tri-Aza- und Tetra-Aza-Derivate (zum Beispiel, wie in der Internationalen Patentschrift Nr. WO 92/22583 beschrieben); und Polyamide, besonders Desferrioxamin und Derivate davon.

Somit, wenn es zum Beispiel erwünscht ist eine Thiolgruppe im Antikörper als Anknüpfungspunkt zu verwenden, kann dies durch die Reaktion mit einer Thiolreaktiven Gruppe erreicht werden, die im Effektor- oder Reportermolekül vorhanden ist. Beispiele für solche Gruppen schließen eine(n) α -Halocarbonsäure oder -ester, z. B. Iodoacetamid, ein Imid, z. B. Maleimid, ein Vinylsulfon oder Disulfid ein. Diese und andere geeignete Verknüpfungsprozeduren sind im Allgemeinen und im Besonderen in den Internationalen Patentschriften Nr. WO 93/06231, WO 92/22583, WO 90/091195 und WO 89/01476 beschrieben.

ASSAYS ZUR AUSWAHL VON MOLEKÜLEN, WELCHE DIE KNOCHENDICHTE ERHÖHEN

Wie oben diskutiert, stellt die vorliegende Offenbarung Verfahren zur Auswahl und/oder Isolation von Verbindungen bereit, die in der Lage sind, die Knochendichte zu erhöhen. Zum Beispiel werden innerhalb eines Aspekts der vorliegenden Offenbarung Verfahren bereitgestellt, um zu bestimmen, ob ein ausgewähltes Molekül zur Erhöhung des Knochenmineralgehaltes in der Lage ist, umfassend die Schritte (a) des Mischens eines ausgewählten Moleküls mit TGF-beta-Bindungsprotein und einem ausgewählten Vertreter der TGF-beta-Proteinfamilie, (b) der Bestimmung, ob das ausgewählte Molekül eine Signalgebung durch die TGF-beta-Proteinfamilie stimuliert oder das Binden des TGF-beta-Bindungsproteins an die TGF-beta-Proteinfamilie inhibiert. Innerhalb bestimmter Aspekte steigert das Molekül die Fähigkeit von TGF-beta, als ein positiver Regulator mesenchymaler Zelldifferenzierung zu funktionieren.

Innerhalb anderer Aspekte der Offenbarung werden Verfahren bereitgestellt, um zu bestimmen, ob ein ausgewähltes Molekül zur Erhöhung des Knochenmineralgehaltes in der Lage ist, umfassend die Schritte (a) der Exposition eines ausgewählten Moleküls an Zellen, die das TGF-beta-Bindungsprotein exprimieren und (b) der Bestimmung, ob die Expression (oder Aktivität) des TGF-beta-Bindungsproteins von den exponierten Zellen abnimmt, und daher der Bestimmung, ob die Verbindung zur Erhöhung des Knochenmineralgehaltes in der Lage ist. Innerhalb eines Aspekts werden die Zellen aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus dem spontan transformierten oder untransformierten normalen humanen Knochen aus

Knochenbiopsien, und Osteoblasten von Rattenparietalknochen. Solche Verfahren können in einer breiten Vielfalt von Assayformaten ausgeführt werden, einschließlich zum Beispiel Gegenstromimmunoelktrophorese (CIEP), Radioimmunoassays, Radioimmunopräzipitationen, enzymgekoppeltes Immunosorptionsassay (ELISA), Dot-Blot-Assays, Inhibitions- oder Kompetitionsassays und Sandwichassays (*siehe* U.S.-Patent Nr. 4 376 110 und 4 486 530; *siehe auch Antibodies: A Laboratory Manual, supra*).

Repräsentative Ausführungsformen solcher Assays werden unten in den Beispielen 5 und 6 bereitgestellt. Kurz gesagt, ein Familienvertreter der TGF-beta-Superfamilie oder ein TGF-beta-Bindungsprotein wird erst an eine feste Phase gebunden, gefolgt von Zugabe eines Molekülkandidaten. Der markierte Familienvertreter der TGF-beta-Superfamilie oder ein TGF-beta-Bindungsprotein wird dann dem Assay hinzugefügt, die feste Phase gewaschen und die Menge an gebundenem oder markiertem TGF-beta-Superfamilienvertreter oder TGF-beta-Bindungsprotein auf dem festen Träger bestimmt. Moleküle, die geeignet sind zur Verwendung in der Erhöhung des Knochenmineralgehaltes, wie hierin beschrieben, sind die Moleküle, die das Binden von TGF-beta-Bindungsprotein an einen Vertreter oder Vertretern der TGF-beta-Superfamilie in einer statistisch signifikanten Weise reduzieren. Offensichtlich sollten Assays, geeignet zur Verwendung innerhalb der vorliegenden Offenbarung, nicht auf die innerhalb der Beispiele 2 und 3 beschriebenen Ausführungsformen limitiert sein. Insbesondere können zahlreiche Parameter verändert werden, wie durch Binden von TGF-beta an eine feste Phase oder durch gänzliche Eliminierung einer festen Phase.

Innerhalb anderer Aspekte der Offenbarung werden Verfahren bereitgestellt, um zu bestimmen, ob ein ausgewähltes Molekül zur Erhöhung des Knochenmineralgehaltes in der Lage ist, umfassend die Schritte (a) der Exposition eines ausgewählten Moleküls an Zellen, die TGF-beta exprimieren, und (b) der Bestimmung, ob die Aktivität von TGF-beta von den exponierten Zellen verändert wird, und daher des Bestimmens, ob die Verbindung zur Erhöhung des Knochenmineralgehaltes in der Lage ist. Ähnlich zu den oben beschriebenen Verfahren kann eine breite Vielfalt von

Verfahren angewendet werden, um die Veränderungen der TGF-beta-Bindungsprotein-Expression aufgrund einer ausgewählten Testverbindung festzustellen.

Zum Beispiel werden innerhalb eines Aspektes der vorliegenden Offenbarung Verfahren bereitgestellt, um zu bestimmen, ob ein ausgewähltes Molekül zur Erhöhung des Knochenmineralgehaltes in der Lage ist, umfassend die Schritte (a) des Mischens eines ausgewählten Moleküls mit TGF-beta-Bindungsprotein und einem ausgewählten Vertreter der TGF-beta-Proteinfamilie, (b) der Bestimmung, ob das ausgewählte Molekül die Signalgebung der TGF-beta-Proteinfamilie hochreguliert oder das Binden des TGF-beta-Bindungsproteins an die TGF-beta-Proteinfamilie inhibiert. Innerhalb bestimmter Ausführungsformen der Offenbarung steigert das Molekül die Fähigkeit von TGF-beta, als ein positiver Regulator mesenchymaler Zelldifferenzierung zu funktionieren.

Ähnlich zu den oben beschriebenen Verfahren kann eine breite Vielfalt von Verfahren angewendet werden, um die Stimulierung von TGF-beta aufgrund einer gewählten Testverbindung festzustellen. Ein solches repräsentatives Verfahren wird unten in Beispiel 6 bereitgestellt (siehe auch Durham et al., *Endo.* 136:1374-1380).

Innerhalb noch anderer Aspekte der vorliegenden Offenbarung werden Verfahren bereitgestellt, um zu bestimmen, ob ein ausgewähltes Molekül zur Erhöhung des Knochenmineralgehaltes in der Lage ist, umfassend den Schritt der Bestimmung, ob ein ausgewähltes Molekül das Binden von TGF-beta-Bindungsprotein an Knochen oder ein Analog davon inhibiert. Wie hierin verwendet, sollte sich verstehen, dass Knochen oder Analoge davon sich auf Hydroxyapatit oder eine Oberfläche, zusammengesetzt aus einer Pulverform von Knochen, zermahlene Knochen oder intakten Knochen, bezieht. Ähnlich zu den oben beschriebenen Verfahren kann eine breite Vielfalt von Verfahren angewendet werden, um die Inhibition der TGF-beta-Bindungsprotein-Lokalisierung zu der Knochenmatrix festzustellen. Ein solches repräsentatives Verfahren wird unten in Beispiel 7 bereitgestellt.

Es sollte angemerkt werden, dass während die hierin rezipierten Verfahren sich auf die Analyse eines individuellen Testmoleküls beziehen können, die vorliegende

Offenbarung nicht so limitiert sein sollte. Insbesondere kann das ausgewählte Molekül innerhalb einer Mischung von Verbindungen beinhaltet sein. Folglich können die rezierten Verfahren weiter den Schritt der Isolierung eines Moleküls umfassen, welches das Binden von TGF-beta-Bindungsprotein an einen TGF-beta-Familienvertreter inhibiert.

KANDIDATENMOLEKÜLE

Eine breite Vielfalt von Molekülen kann auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, das Binden von TGF-beta-Bindungsprotein an einen TGF-beta-Familienvertreter zu inhibieren. Repräsentative Beispiele, die unten ausführlicher diskutiert werden, schließen organische Moleküle, Proteine oder Peptide und Nukleinsäuremoleküle ein. Obwohl es aus der untenstehenden Diskussion offensichtlich sein sollte, dass die hierin beschriebenen Kandidaten-Moleküle in den hierin beschriebenen Assays verwendet werden können, sollte es ebenfalls leicht ersichtlich sein, dass solche Moleküle auch in einer Vielzahl diagnostischer und therapeutischer Situationen verwendet werden können.

1. Organische Moleküle

Zahlreiche organische Moleküle können auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, das Binden von TGF-beta-Bindungsprotein an einen TGF-beta-Familienvertreter zu inhibieren.

Zum Beispiel können innerhalb einer Ausführungsform der Offenbarung geeignete organische Moleküle ausgewählt werden aus entweder einer chemischen Bibliothek, wobei die Chemikalien individuell untersucht werden, oder aus kombinatorischen chemischen Bibliotheken, wo mehrere Verbindungen gleichzeitig untersucht werden, dann vereinzelt werden, um die aktivsten Verbindungen zu bestimmen und zu isolieren.

Repräsentative Beispiele solcher kombinatorischer chemischer Bibliotheken schließen die ein, die beschrieben wurden von Agrafiotis et al., "System and method of automatically generating chemical compounds with desired properties", U.S.-Patent Nr. 5 463 564; Armstrong, R.W., "Synthesis of combinatorial arrays of organic

compounds through the use of multiple combinatorial array syntheses", WO 95/02566; Baldwin, J.J., et al., "Sulfonamide derivatives and their use", WO 95/24186; Baldwin, J.J., et al., "Combinatorial dihydrobenzopyran library", WO 95/30642; Brenner, S., "New kit for preparing combinatorial libraries," WO 95/16918; Chenera, B., et al., "Preparation of library of resin-bound aromatic carbocyclic compounds," WO 95/16712; Ellman, J.A., "Solid phase and combinatorial synthesis of benzodiazepine compounds on a solid support", U.S.-Patent Nr. 5 288 514; Felder, E., et al., "Novel combinatorial compound libraries," WO 95/16209; Lerner, R., et al., "Encoded combinatorial chemical libraries", WO 93/20242; Pavia, M.R., et al., "A method for preparing and selecting pharmaceutically useful non-peptide compounds from a structurally diverse universal library", WO 95/04277; Summerton, J.E., und D.D. Weller, "Morpholino-subunit combinatorial library and method", U.S.-Patent Nr. 5 506 337; Holmes, C., "Methods for the Solid Phase Synthesis of Thiazolidinones, Metathiazanones, and Derivatives thereof", WO 96/00148; Phillips, G.B., und G.P. Wei, "Solid-phase Synthesis of Benzimidazoles," *Tet. Letters* 37:4887-90,1996; Ruhland, B., et al., "Solid-supported Combinatorial Synthesis of Structurally Diverse β -Lactams," *J. Amer. Chem. Soc.* 111:253-4, 1996; Look, G.C., et al., "The Identification of Cyclooxygenase-1 Inhibitors from 4-Thiazolidinone Combinatorial Libraries," *Bioorg. and Med. Chem. Letters* 6:707-12, 1996.

2. Proteine und Peptide

Ein breites Spektrum von Proteinen und Peptiden können ebenso als Kandidaten-Moleküle für Inhibitoren des Bindens von TGF-beta-Bindungsprotein an einen TGF-beta-Familienvertreter angewendet werden.

a. Kombinatorische Peptid-Bibliotheken

Peptidmoleküle, die mutmaßliche Inhibitoren des Bindens von TGF-beta-Bindungsprotein an einen TGF-beta-Familienvertreter sind, können durch das Screenen kombinatorischer Peptid-Bibliotheken erhalten werden. Solche Bibliotheken können entweder vom Fachmann hergestellt (*siehe z. B.* U.S.-Patente Nr. 4 528 266 und 4 359 535, und Patent-Kooperationvertrags-Publikation Nr. WO 92/15679, WO 92/15677, WO 90/07862, WO 90/02809), oder von kommerziell verfügbaren Quellen

(z. B. New England Biolabs Ph.D.TM Phage Display Peptide Library Kit) erstanden werden.

b. Antikörper

Antikörper, die das Binden von TGF-beta-Bindungsprotein an einen TGF-beta-Familienvertreter inhibieren, können angesichts der hierin beschriebenen Offenbarung leicht hergestellt werden. Innerhalb des Kontexts der vorliegenden Offenbarung verstehen sich Antikörper so, dass sie monoklonale Antikörper, polyklonale Antikörper, anti-idiotypische Antikörper, Antikörperfragmente (z. B. Fab und F(ab')₂, Fv-variable-Regionen oder Komplementaritäts-bestimmende Regionen) einschließen. Wie oben diskutiert, verstehen sich Antikörper so, dass sie spezifisch gegen das TGF-beta-Bindungsprotein oder gegen einen spezifischen TGF-beta-Familienvertreter sind, wenn sie mit einer K_a von mehr als oder gleich $10^7 M^{-1}$, vorzugsweise mehr als oder gleich $10^8 M^{-1}$ binden, und nicht an andere TGF-beta-Bindungsproteine binden, oder mit einer K_a von mehr als oder gleich $10^6 M^{-1}$ binden. Weiterhin sollten Antikörper der vorliegenden Offenbarung das Binden von TGF-beta-Bindungsprotein an einen TGF-beta-Familienvertreter blockieren oder inhibieren.

Die Affinität eines monoklonalen Antikörpers oder Bindungspartners, ebenso wie die Inhibition des Bindens, kann leicht durch einen Durchschnittsfachmann bestimmt werden (*siehe* Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660-672, 1949).

Kurz gesagt, polyklonale Antikörper können leicht durch einen Durchschnittsfachmann aus einer Vielfalt von warmblütigen Tieren erzeugt werden, wie Pferde, Kühe, verschiedenes Geflügel, Kaninchen, Mäuse oder Ratten. Typischerweise wird das TGF-beta-Bindungsprotein oder ein einzigartiges Peptid davon mit 13-20 Aminosäuren (vorzugsweise konjugiert an Schlüssellochsnecken-Hämocyanin durch Vernetzung mit Glutaraldehyd) angewendet, um das Tier durch intraperitoneale, intramuskuläre, intraokulare oder subkutane Injektionen zu immunisieren, zusammen mit einem Adjuvans, wie Freund'sches vollständiges oder unvollständiges Adjuvans. Im Anschluss an mehrere Wiederholungsimmunisierungen werden Serumproben gesammelt und auf Reaktivität gegen das Protein oder Peptid getestet.

Besonders bevorzugte polyklonale Antiseren werden auf einem dieser Assays ein Signal abgeben, das mindestens dreimal größer als der Hintergrund ist. Hat der Titer des Tieres einmal ein Plateau erreicht, was seine Reaktivität gegen das Protein betrifft, so können größere Mengen von Antiseren leicht erhalten werden, entweder durch wöchentliche Blutentnahmen, oder durch Ausbluten des Tieres.

Monoklonale Antikörper können unter Anwendung konventioneller Techniken (*siehe* U.S.-Patent Nr. RE 32 011, 4 902 614, 4 543 439 und 4 411 993; *siehe auch Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kennett, McKearn und Bechtol (Hrsg.), 1980, und *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow und Lane (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988) ebenfalls leicht erzeugt werden.

Kurz gesagt, wird innerhalb einer Ausführungsform ein gegebenes Tier, wie eine Ratte oder Maus, mit TGF-beta-Bindungsprotein oder einem Abschnitt davon wie oben beschrieben immunisiert. Das Protein kann mit einem Adjuvans, wie Freund'schem vollständigen oder unvollständigen Adjuvans, vermischt sein, um die resultierende Immunreaktion zu erhöhen. Zwischen einer und drei Wochen nach der anfänglichen Immunisierung kann das Tier mit einer weiteren Wiederholungsimmunisierung reimmunisiert werden und auf Reaktivität gegen das Protein getestet werden durch Verwendung der oben beschriebenen Assays. Hat das Tier einmal ein Plateau in seiner Reaktivität gegen das injizierte Protein erreicht, so wird es getötet, und Organe, die große Mengen an B-Zellen enthalten, wie die Milz und Lymphknoten, werden geerntet.

Zellen, die vom immunisierten Tier erhalten werden, können durch Infektion mit einem Virus, wie dem Epstein-Barr-Virus (EBV), immortalisiert werden (*siehe* Glasky und Reading, *Hybridoma* 8(4):377-389, 1989). Alternativ dazu werden innerhalb einer bevorzugten Ausführungsform die geernteten Milz- und/oder Lymphknoten-Zellsuspensionen mit einer geeigneten Myelomzelle fusioniert, um ein "Hybridom" zu erzeugen, das einen monoklonalen Antikörper sezerniert. Geeignete Myelomlinien schließen zum Beispiel NS-1 (ATCC Nr. TIB 18) und P3X63 – Ag 8.653 (ATCC Nr. CRL 1580) ein.

Im Anschluss an die Fusion können die Zellen in Kulturplatten eingesetzt werden, die ein geeignetes Medium beinhalten, wie RPMI 1640 oder DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas), ebenso wie zusätzliche Inhaltsstoffe, wie fötales Rinderserum (FBS, *d. h.* von Hyclone, Logan, Utah oder JRH Biosciences). Zusätzlich sollte das Medium ein Reagenz beinhalten, welches das Wachstum fusionierter Milz- und Myelomzellen selektiv ermöglicht, wie HAT (Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri). Nach ungefähr sieben Tagen können die resultierenden fusionierten Zellen oder Hybridome gescreent werden, um das Vorliegen von Antikörpern zu bestimmen, die reaktiv gegen das TGF-beta-Bindungsprotein sind (abhängig vom verwendeten Antigen), und die das Binden von TGF-beta-Bindungsprotein an den TGF-beta-Familienvertreter blockieren oder inhibieren.

Eine breite Vielfalt von Assays kann angewandt werden, um das Vorliegen von Antikörpern zu bestimmen, die reaktiv gegen die Proteine der vorliegenden Erfindung sind, einschließlich zum Beispiel Gegenstromimmunoelktrophorese, Radioimmunoassays, Radioimmunopräzipitationen, enzymgekoppeltes Immunosorptionsassay (ELISA), Dot-Blot-Assays, Western Blots, Immunopräzipitation, Inhibitions- oder Kompetitionsassays und Sandwichassays (*siehe* U.S.-Patent Nr. 4 376 110 und 4 486 530; *siehe auch* *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow und Lane (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Im Anschluss an mehrere klonale Verdünnungen und Nach-Assays kann ein Hybridom, das gegen das erwünschte Protein reaktive Antikörper produziert, isoliert werden.

Andere Techniken können ebenfalls angewendet werden, um monoklonale Antikörper zu konstruieren (*siehe* William D. Huse et al., "Generation of a Large Combinational Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda", *Science* 246:1275-1281, Dezember 1989; *siehe auch* L. Sastry et al., "Cloning of the Immunological Repertoire in *Escherichia coli* for Generation of Monoclonal Catalytic Antibodies: Construction of a Heavy Chain Variable Region-Specific cDNA Library", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5728-5732, August 1989; *siehe auch* Michelle Alting-Mees et al., "Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to

Hybridomas", *Strategies in Molecular Biology* 3:1-9, Januar 1990). Diese Bezugsstellen beschreiben ein kommerzielles System, erhältlich bei Stratagene (La Jolla, Kalifornien), das die Produktion von Antikörpern durch rekombinante Techniken ermöglicht. Kurz gesagt, wird mRNA aus einer B-Zellenpopulation isoliert und verwendet, um Schwer- und Leichtketten-Immunglobulin-cDNA-Expressionsbibliotheken in den λ ImmunoZap(H)- und λ ImmunoZap(L)-Vektoren zu erzeugen. Diese Vektoren können individuell gescreent oder ko-exprimiert werden, um Fab-Fragmente oder Antikörper zu bilden (*siehe* Huse et al., *supra*; *siehe auch* Sastry et al., *supra*). Positive Plaques können anschließend zu nicht-lytischen Plasmiden konvertiert werden, was eine Expression hohen Levels von monoklonalen Antikörperfragmenten aus *E. coli* erlaubt.

In ähnlicher Weise können Abschnitte oder Fragmente, wie Fab- und Fv-Fragmente von Antikörpern, unter Anwendung von herkömmlichem enzymatischem Verdau oder rekombinanter DNA-Techniken konstruiert werden, um die variablen Regionen eines Gens, das einen spezifisch bindenden Antikörper codiert, zu beinhalten. Innerhalb einer Ausführungsform werden die Gene, welche die variable Region aus einem Hybridoms codieren, das einen monoklonalen Antikörper von Interesse produziert, unter Verwendung von Nukleotidprimern für die variable Region amplifiziert. Diese Primer können durch einen Durchschnittsfachmann synthetisiert werden, oder können von kommerziell verfügbaren Quellen erstanden werden. Stratagene (La Jolla, Kalifornien) verkauft Primer für variable Regionen von Maus und Mensch, einschließlich, unter anderem, Primer für V_{Ha^-} , V_{Hb^-} , V_{Hc^-} , V_{Hd^-} , C_{H1^-} , V_L^- und C_L^- Regionen. Diese Primer können angewendet werden, um variable Regionen von Schwer- oder Leichtketten zu amplifizieren, die dann in Vektoren inseriert werden können, wie ImmunoZAPTM H bzw. ImmunoZAPTM L (Stratagene). Diese Vektoren können dann in *E. coli*-, Hefe- oder Säuger-basierende Systeme zur Expression eingeführt werden. Durch Anwendung dieser Techniken können große Mengen eines einzelkettigen Proteins produziert werden, das eine Fusion der V_H^- und V_L^- -Domänen enthält (*siehe* Bird et al., *Science* 242:423-426, 1988). Zusätzlich können solche Techniken angewendet werden, um einen "murinen" Antikörper in einen "humanen" Antikörper zu verwandeln, ohne die Bindungsspezifität des Antikörpers zu verändern.

Sind geeignete Antikörper einmal erhalten worden, so können sie durch viele Techniken isoliert oder gereinigt werden, die dem Durchschnittsfachmann allgemein bekannt sind (*siehe Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow und Lane (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Geeignete Techniken schließen Peptid- oder Proteinaffinitätsäulen, HPLC oder RP-HPLC, Reinigung auf Protein A- oder Protein G-Säulen, oder jede Kombination dieser Techniken ein.

c. Mutanten-TGF-beta-Bindungsproteine

Wie hierin und unten in den Beispielen (z. B. Beispiele 8 und 9) beschrieben, sollten veränderte TGF-beta-Bindungsprotein-Versionen, die mit der Fähigkeit nativer TGF-beta-Bindungsproteine, die Aktivität eines bestimmten TGF-beta-Familienvertreters zu blockieren, kompetitieren, zu einer erhöhten Knochendichte führen. Somit würden TGF-beta-Bindungsprotein-Mutanten, die an den TGF-beta-Familienvertreter binden, aber die Funktion des TGF-beta-Familienvertreters nicht inhibieren, die Kriterien erfüllen. Die Mutanten-Versionen müssen mit den endogenen inhibitorischen Funktionen von TGF-beta-Bindungsprotein effektiv kompetitieren.

d. Produktion von Proteinen

Obwohl verschiedene Gene (oder Abschnitte davon) hierin bereitgestellt worden sind, sollte sich verstehen, dass innerhalb des Kontexts der vorliegenden Offenbarung, die Bezugnahme auf eines oder mehrere dieser Gene, Derivate der Gene einschließt, die den Genen (und, gegebenenfalls den Proteinen (einschließlich Peptide und Polypeptide), die durch die Gene und deren Derivate codiert werden) im wesentlichen ähnlich sind. Wie hierin verwendet, gilt eine Nukleotidsequenz als "im wesentlichen ähnlich", wenn: (a) die Nukleotidsequenz von der codierenden Region der oben beschriebenen Gene stammt, und zum Beispiel Abschnitte der Sequenz oder Allelvariationen der oben diskutierten Sequenzen einschließt, oder alternativ, ein Molekül codiert, welches das Binden von TGF-beta-Bindungsprotein an einen Vertreter der TGF-beta-Familie inhibiert, (b) die Nukleotidsequenz zu Hybridisierung an Nukleotidsequenzen der vorliegenden Erfindung, unter mäßiger, hoher oder sehr hoher Stringenz, in der Lage ist (*siehe Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989); oder (c) die DNA-Sequenzen degeneriert sind, als ein Resultat des genetischen Codes, zu

den in (a) oder (b) definierten DNA-Sequenzen. Ferner schließt das hierin offenbarte Nukleinsäuremolekül beides, komplementäre und nicht-komplementäre Sequenzen, ein, vorausgesetzt die Sequenzen erfüllen die hierin dargelegten Kriterien anderweitig. Innerhalb des Kontexts der vorliegenden Offenbarung bedeutet hohe Stringenz standardmäßige Hybridisierungsbedingungen (z. B. 5xSSPE, 0,5% SDS bei 65°C, oder das Äquivalent dazu).

Die Struktur der Proteine, die durch die hierin beschriebenen Nukleinsäuremoleküle codiert werden, kann aus den primären Translationsprodukten vorhergesagt werden, unter Verwendung der Hydrophobie-Plot-Funktion von zum Beispiel P/C Gene oder Intelligenetics Suite (Intelligenetics, Mountain View, Kalifornien) oder gemäß der von Kyte und Doolittle (*J. Mol. Biol.* 157:105-132, 1982) beschriebenen Verfahren.

Proteine der vorliegenden Erfindung können in der Form saurer oder basischer Salze, oder in neutraler Form hergestellt werden. Zusätzlich können individuelle Aminosäurereste durch Oxidation oder Reduktion modifiziert werden. Ferner können verschiedene Substitutionen, Deletionen oder Additionen an den Aminosäure- oder Nukleinsäuresequenzen durchgeführt werden, und zwar mit dem Nettoeffekt die biologische Aktivität des Mutanten- oder Wildtyp-Proteins zu bewahren oder weiter zu steigern oder zu vermindern. Außerdem kann zum Beispiel, aufgrund der Degeneration im genetischen Code, beachtliche Variation in Nukleotidsequenzen vorhanden sein, die dieselbe Aminosäuresequenz codieren.

Andere Derivate der hierin offenbarten Proteine schließen Konjugate der Proteine, zusammen mit anderen Proteinen und Polypeptiden ein. Dies kann zum Beispiel durch die Synthese von N-terminalen oder C-terminalen Fusionsproteinen erreicht werden, die addiert werden können, um die Reinigung oder Identifizierung von Proteinen zu erleichtern (*siehe* U.S.-Patent Nr. 4 851 341, *siehe auch* Hopp et al., *Bio/Technology* 6:1204, 1988). Alternativ dazu werden Fusionsproteine, wie das Flag/TGF-beta-Bindungsprotein, konstruiert, um bei der Identifizierung, Expression und Analyse des Proteins zu helfen.

Proteine der vorliegenden Erfindung können unter Verwendung einer breiten Vielzahl von hierin beschriebenen Techniken konstruiert werden. Ferner können Mutationen in bestimmten Loci durch Synthese von Oligonukleotiden, die eine Mutantensequenz beinhalten, eingeführt werden, flankiert von Restriktionsstellen, welche die Ligation an Fragmente der nativen Sequenz erlauben. Im Anschluss an die Ligation codiert die resultierende rekonstruierte Sequenz ein Derivat, das die gewünschte Aminosäureinsertion, -substitution oder -deletion aufweist.

Alternativ dazu können Oligonukleotid-gerichtete, Stellen-spezifische (oder Segment-spezifische) Mutageneseverfahren eingesetzt werden, um ein verändertes Gen bereitzustellen, bei dem bestimmte Codons, gemäß der erforderlichen Substitution, Deletion oder Insertion, verändert sind. Exemplarische Verfahren zur Ausführung der oben dargelegten Veränderungen werden offenbart von Walder et al. (*Gene* 42:133, 1986); Bauer et al. (*Gene* 37:73, 1985); Craik (*BioTechniques*, Januar 1985, 12-19); Smith et al. (*Genetic Engineering: Principles and Methods*, Plenum Press, 1981); und Sambrook et al. (*supra*). Deletions- und Trunkierungsderivate von Proteinen (z. B. ein löslicher extrazellulärer Abschnitt) können auch konstruiert werden unter Verwendung geeigneter Restriktionsendonukleasestellen, angrenzend an die gewünschte Deletion. Nach der Restriktion können Überhänge aufgefüllt und die DNA erneut ligiert werden. Exemplarische Verfahren zur Ausführung der oben dargelegten Veränderungen werden von Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2te Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) offenbart.

Mutationen, die in den Nukleinsäuremolekülen der vorliegenden Erfindung gemacht werden, bewahren vorzugsweise den Leserahmen der codierenden Sequenzen. Ferner werden die Mutationen vorzugsweise keine komplementären Regionen herstellen, die hybridisieren könnten, um mRNA-Sekundärstrukturen zu produzieren, wie Schleifen oder Haarnadeln, welche die Translation der mRNA nachteilig beeinflussen würden. Obwohl eine Mutationsstelle vorbestimmt sein kann, ist es nicht notwendig, dass die Natur der Mutation *per se* vorbestimmt ist. Zum Beispiel, um optimale Charakteristika von Mutanten an einer gegebenen Stelle zu selektieren, kann an dem Zielcodon statistische Mutagenese durchgeführt, und die exprimierten Mutanten auf indikative biologische Aktivität gescreent werden. Alternativ dazu

können Mutationen in bestimmten Loci eingeführt werden, durch Synthetisieren von Oligonukleotiden, die eine Mutanten-Sequenz enthalten, flankiert von Restriktionsstellen, welche die Ligation an Fragmente der nativen Sequenz erlauben. Im Anschluss an die Ligation codiert die resultierende rekonstruierte Sequenz ein Derivat, das die erwünschte Aminosäureinsertion, -substitution oder -deletion aufweist.

Nukleinsäuremoleküle, die Proteine der vorliegenden Erfindung codieren, können auch unter Anwendung von Techniken der PCR-Mutagenese, der chemischen Mutagenese (Drinkwater und Klinedinst, *PNAS* 83:3402-3406, 1986), durch erzwungenen Nukleotid-Fehleinbau (z. B. Liao und Wise, *Gene* 88:107-111, 1990) oder unter Verwendung von statistisch mutagenisierten Oligonukleotiden (Horwitz et al., *Genome* 3:112-117, 1989) konstruiert werden.

Die vorliegende Erfindung sieht auch die Manipulation und Expression der oben beschriebenen Gene durch das Kultivieren von Wirtszellen vor, die einen Vektor enthalten, der zur Expression der oben beschriebenen Gene in der Lage ist. Solche Vektoren oder Vektorkonstrukte schließen entweder synthetische oder cDNA-abstammende Nukleinsäuremoleküle ein, die das gewünschte Protein codieren, welche funktionsfähig mit geeigneten transkriptionell oder translationell regulatorischen Elementen verknüpft sind. Geeignete regulatorische Elemente können von einer Vielfalt von Quellen stammen, einschließlich bakterieller, Pilz-, viraler, Säuger-, Insekten- oder pflanzlicher Gene. Die Auswahl geeigneter regulatorischer Elemente ist von der gewählten Wirtszelle abhängig, und kann leicht von einem gewöhnlichen Fachmann bewerkstelligt werden. Beispiele für regulatorische Elemente umfassen: einen transkriptionellen Promotor und Enhancer oder eine RNA-Polymerase-bindende Sequenz, einen transkriptionellen Terminator und eine Ribosomenbindungs-Sequenz, einschließlich eines Translationsinitiations-Signals.

Nukleinsäuremoleküle, die jedes der oben beschriebenen Proteine codieren, können leicht durch eine breite Vielfalt von prokaryotischen und eukaryotischen Wirtszellen exprimiert werden, einschließlich bakterieller, Säuger-, Hefe- oder anderer Pilz-, viraler, Insekten- oder pflanzlicher Zellen. Verfahren zur Transformation oder Transfektion solcher Zellen, um eine fremde DNA zu exprimieren, sind im

Fachbereich allgemein bekannt (siehe z. B. Itakura et al., U.S.-Patent Nr. 4 704 362; Hinnen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929-1933, 1978; Murray et al., U.S.-Patent Nr. 4 801 542; Upshall et al., U.S.-Patent Nr. 4 935 349; Hagen et al., U.S.-Patent Nr. 4 784 950; Axel et al., U.S.-Patent Nr. 4 399 216; Goeddel et al., U.S.-Patent Nr. 4 766 075; und Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2te Ausg., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; für pflanzliche Zellen siehe Czako und Marton, *Plant Physiol.* 104:1067-1071, 1994; und Paszkowski et al., *Biotech.* 24:387-392, 1992).

Bakterielle Wirtszellen, die zur Ausführung der vorliegenden Erfindung geeignet sind, schließen *E. coli*, *B. subtilis*, *Salmonella typhimurium*, und verschiedene Arten innerhalb der Gattungen *Pseudomonas*, *Streptomyces* und *Staphylococcus*, ebenso wie viele andere bakterielle Arten, die einem Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet allgemein bekannt sind, ein. Repräsentative Beispiele für bakterielle Wirtszellen schließen DH5 α (Stratagene, La Jolla, Kalifornien) ein.

Bakterielle Expressionsvektoren umfassen vorzugsweise einen Promotor, der in der Wirtszelle funktioniert, einen oder mehrere selektierbare phänotypische Marker und einen bakteriellen Replikationsursprung. Repräsentative Promotoren schließen das β -Lactamase- (Penicillinase-) und Lactose-Promotorsystem (siehe Chang et al., *Nature* 275:615, 1978), den T7 RNA-Polymerase-Promotor (Studier et al., *Meth. Enzymol.* 185:60-89, 1990), den Lambda-Promotor (Elvin et al., *Gene* 87:123-126, 1990), den *trp*-Promotor (Nichols und Yanofsky, *Meth. in Enzymology* 101:155, 1983) und den *tac*-Promotor (Russell et al., *Gene* 20:231, 1982) ein. Repräsentative selektierbare Marker schließen verschiedene Antibiotikum-Resistenzmarker ein, wie die Kanamycin- oder Ampicillin-Resistenzgene. Viele Plasmide, die zur Transformation von Wirtszellen geeignet sind, sind im Fachbereich allgemein bekannt, einschließlich unter anderem pBR322 (siehe Bolivar et al., *Gene* 2:95, 1977), der pUC-Plasmide pUC18, pUC19, pUC118, pUC119 (siehe Messing, *Meth. in Enzymology* 101:20-77, 1983, und Vieira und Messing, *Gene* 19:259-268, 1982), und pNH8A, pNH16a, pNH18a, und Bluescript M13 (Stratagene, La Jolla, Kalifornien).

Hefe- und Pilz-Wirtszellen, die zur Ausführung der vorliegenden Erfindung geeignet sind, schließen unter anderem *Saccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, die Gattungen *Pichia* oder *Kluyveromyces* und verschiedene Arten der Gattung *Aspergillus* ein (McKnight et al., U.S.-Patent Nr. 4 935 349). Geeignete Expressionsvektoren für Hefe oder Pilze schließen unter anderem YCp50 (ATCC Nr. 37419) für Hefe und den amdS-Kloniervektor pV3 (Turnbull, *Bio/Technology* 7:169, 1989), YRp7 (Struhl et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1035-1039, 1978), YEp13 (Broach et al., *Gene* 8:121-133, 1979), pJDB249 und pJDB219 (Beggs, *Nature* 275:104-108, 1978) und Derivate davon ein.

Bevorzugte Promotoren zur Verwendung in Hefe schließen Promotoren von glykolytischen Hefegenen (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* 255:12073-12080, 1980; Alber und Kawasaki, *J. Mol. Appl. Genet.* 1:419-434, 1982) oder Alkoholdehydrogenase-Gene (Young et al., in *Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals*, Hollaender et al. (Hrsg.), S. 355, Plenum, New York, 1982; Ammerer, *Meth. Enzymol.* 101:192-201, 1983) ein. Beispiele nützlicher Promotoren für Pilzvektoren schließen die ein, die von *Aspergillus nidulans*-Genen, stammen, wie der *adh3*-Promotor (McKnight et al., *EMBO J.* 4:2093-2099, 1985). Die Expressionseinheiten können auch einen transkriptionellen Terminator einschließen. Ein Beispiel für einen geeigneten Terminator ist der *adh3*-Terminator (McKnight et al., *ibid.*, 1985).

Wie mit bakteriellen Vektoren, werden die Hefevektoren allgemein einen selektierbaren Marker einschließen, der einer von jedweder Anzahl von Genen sein kann, die einen dominanten Phänotypen aufweisen, für den ein phänotypisches Assay existiert, um den Transformanten zu ermöglichen, selektiert zu werden. Bevorzugte selektierbare Marker sind die, die Wirtszell-Auxotrophie komplementieren, Antibiotikum-Resistenz bereitstellen oder einer Zelle die Nutzung spezifischer Kohlenstoffquellen ermöglichen, und schließen *leu2* (Broach et al., *ibid.*), *ura3* (Botstein et al., *Gene* 8:17, 1979) oder *his3* (Struhl et al., *ibid.*) ein. Ein anderer geeigneter selektierbarer Marker ist das *cat*-Gen, das Hefezellen Chloramphenicol-Resistenz verleiht.

Techniken zur Transformation von Pilzen sind in der Literatur allgemein bekannt und sind beschrieben worden beispielsweise von Beggs (*ibid.*), Hinnen et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929-1933, 1978), Yelton et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1740-1747, 1984) und Russell (*Nature* 301:167-169, 1983). Der Genotyp der Wirtszelle kann einen genetischen Defekt beinhalten, der vom selektierbaren Marker, der auf dem Expressionsvektor vorhanden ist, komplementiert wird. Die Auswahl eines bestimmten Wirtes und selektierbaren Markers liegt allgemein innerhalb des gewöhnlichen Kenntnisstandes im Fachbereich.

Protokolle zur Transformation von Hefe sind ebenfalls dem Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet allgemein bekannt. Zum Beispiel kann Transformation leicht durchgeführt werden, entweder durch Präparation von Hefe-Sphäroplasten mit DNA (*siehe* Hinnen et al., *PNAS USA* 75:1929, 1978), oder durch Behandlung mit alkalischen Salzen, wie LiCl (*siehe* Itoh et al., *J. Bacteriology* 153:163, 1983). Transformation von Pilzen kann auch unter Verwendung von Polyethyleneglykol durchgeführt werden, wie von Cullen et al. (*Bio/Technology* 5:369, 1987) beschrieben.

Virale Vektoren schließen diejenigen ein, die einen Promotor umfassen, der die Expression eines isolierten Nukleinsäuremoleküls leitet, das ein gewünschtes Protein codiert, wie oben beschrieben. Eine breite Vielfalt von Promotoren kann innerhalb des Kontexts der vorliegenden Erfindung verwendet werden, einschließlich zum Beispiel Promotoren, wie MoMLV-LTR, RSV-LTR, Friend MuLV-LTR, der adenovirale Promotor (Ohno et al., *Science* 265:781-784, 1994), der Neomycin-Phosphotransferase-Promotor/Enhancer, der late-Parvovirus-Promotor (Koering et al., *Hum. Gene Therap.* 5:457-463, 1994), der Herpes-TK-Promotor, der SV40-Promotor, der Metallothionein Ila-Gen-Enhancer/Promotor, der Cytomegalovirus-immediate-early-Promotor und der Cytomegalovirus-immediate-late-Promotor. Innerhalb besonders bevorzugter Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist der Promotor ein gewebespezifischer Promotor (*siehe z. B.* WO 91/02805; EP 0 415 731; und WO 90/07936). Repräsentative Beispiele für geeignete gewebespezifische Promotoren schließen den neural-spezifischen Enolase-Promotor, den 'Blutplättchen-abgeleiteten Wachstumsfaktor-beta'-Promotor, den Promotor von knochenmorphogenem Protein, den humanen alpha 1-Chimärin-Promotor, den Synapsin I-Promotor und den

Synapsin II-Promotor ein. Zusätzlich zu den oben angemerktten Promotoren können andere viral-spezifische Promotoren (z. B. retrovirale Promotoren (einschließlich der oben angemerktten, ebenso wie anderer, wie HIV-Promotoren)), Hepatitis, Herpes (z. B. EBV) und Bakterien-, Pilz- oder Parasiten- (z. B. Malaria-) spezifische Promotoren verwendet werden, um auf eine spezifische Zelle abzielen, die mit einem Virus, Bakterien, Pilz oder Parasiten infiziert ist.

Säugerzellen, die zur Ausführung der vorliegenden Erfindung geeignet sind, schließen unter anderem COS, CHO, SaOS, Osteosarkome, KS483, MG-63, primäre Osteoblasten und humanes oder Säuger-Knochenmarkstroma ein. Säuger-Expressionsvektoren zur Verwendung in der Ausführung der vorliegenden Erfindung werden einen Promotor einschließen, der zur Steuerung der Transkription eines klonierten Gens oder einer cDNA in der Lage ist. Bevorzugte Promotoren schließen virale Promotoren und zelluläre Promotoren ein. Knochen-spezifische Promotoren schließen den 'Bone-Sialo-Protein'- und den Promotor für Osteocalcin ein. Virale Promotoren schließen den Cytomegalovirus-immediate-early-Promotor (Boshart et al., *Cell* 41:521-530, 1985), Cytomegalovirus-immediate-late-Promotor, SV40-Promotor (Subramani et al., *Mol. Cell. Biol.* 1:854-864, 1981), MMTV-LTR, RSV-LTR, Metallothionein-1, Adenovirus E1a ein. Zelluläre Promotoren schließen den Maus-Metallothionein-1-Promotor (Palmiter et al., U.S.-Patent Nr. 4 579 821), einen Maus-V_K-Promotor (Bergman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7041-7045, 1983; Grant et al., *Nucl. Acids Res.* 15:5496, 1987) und einen Maus-V_H-Promotor (Loh et al., *Cell* 33:85-93, 1983) ein. Die Wahl des Promotors wird mindestens zum Teil vom erwünschten Expressionslevel oder von der Empfangszelllinie abhängen, die transfiziert werden soll.

Solche Expressionsvektoren können auch einen Satz von RNA-Spleissstellen enthalten, die stromabwärts vom Promotor und stromaufwärts von der DNA-Sequenz lokalisiert sind, die das Peptid oder Protein von Interesse codiert. Bevorzugte RNA-Spleissstellen können von Adenovirus- und/oder Immunoglobulin-Genen erhalten werden. Ebenfalls in den Expressionsvektoren enthalten ist ein Polyadenylierungssignal, das stromabwärts von der codierenden Sequenz von Interesse lokalisiert ist. Geeignete Polyadenylierungssignale schließen die early- oder late-Polyadenylier-

ungssignale von SV40 (Kaufman und Sharp, *ibid.*), das Polyadenylierungssignal aus der E1B-Region von Adenovirus-5 und den humanen Wachstumshormon-Gen-Terminator (DeNoto et al., *Nuc. Acids Res.* 9:3719-3730, 1981) ein. Die Expressionsvektoren können eine nicht-codierende virale Leader-Sequenz einschließen, wie den dreiteiligen Adenovirus 2-Leader, lokalisiert zwischen dem Promotor und den RNA-Spleissstellen. Bevorzugte Vektoren können auch Enhancer-Sequenzen einschließen, wie den SV40-Enhancer. Expressionsvektoren können auch Sequenzen einschließen, welche die Adenovirus-VA-RNAs codieren. Geeignete Expressionsvektoren können von kommerziellen Quellen erhalten werden (z. B. Stratagene, La Jolla, Kalifornien).

Vektorkonstrukte, die klonierte DNA-Sequenzen umfassen, können in kultivierte Säugerzellen eingeführt werden durch zum Beispiel Calciumphosphat-vermittelte Transfektion (Wigler et al., *Cell* 14:725, 1978; Corsaro und Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7:603, 1981; Graham und Van der Eb, *Virology* 52:456, 1973), Elektroporation (Neumann et al., *EMBO J.* 1:841-845, 1982) oder DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion (Ausubel et al. (Hrsg.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987). Um Zellen zu identifizieren, bei welchen die klonierte DNA stabil integriert ist, wird generell ein selektierbarer Marker in die Zellen eingeführt, zusammen mit dem Gen oder der cDNA von Interesse. Bevorzugte selektierbare Marker zur Verwendung in kultivierten Säugerzellen schließen Gene ein, die Arzneimittel-Resistenz, wie gegen Neomycin, Hygromycin und Methotrexat, verleihen. Der selektierbare Marker kann ein amplifizierbarer selektierbarer Marker sein. Bevorzugte amplifizierbare selektierbare Marker sind das DHFR-Gen und das Neomycin-Resistenz-Gen. Selektierbare Marker sind von Thilly (*Mammalian Cell Technology*, Butterworth Publishers, Stoneham, Massachusetts) in einem Überblickartikel beschrieben worden.

Säugerzellen, die einen geeigneten Vektor enthalten, wird es für einen Zeitraum, typischerweise 1-2 Tage, gestattet, zu wachsen, um das Expressieren der DNA-Sequenz(en) von Interesse zu beginnen. Eine Arzneimittel-Selektion wird dann angewandt, um ein Wachstum von Zellen zu selektieren, die den selektierbaren Marker in einer stabilen Weise exprimieren. Für Zellen, die mit einem amplifizier-

baren selektierbaren Marker transfiziert worden sind, kann die Arzneimittelkonzentration schrittweise erhöht werden, um hinsichtlich einer erhöhten Kopienanzahl der klonierten Sequenzen zu selektieren, wodurch die Expressionsspiegel erhöht werden. Zellen, welche die eingeführten Sequenzen exprimieren, werden hinsichtlich Herstellung des Proteins von Interesse in der gewünschten Form oder bei dem gewünschten Spiegel selektiert und gescreent. Zellen, die diese Kriterien erfüllen, können dann zur Produktion geklont und hochskaliert werden.

Protokolle zur Transfektion von Säugerzellen sind dem gewöhnlichen Fachmann allgemein bekannt. Repräsentative Verfahren schließen Calciumphosphat-vermittelte Transfektion, Elektroporation, Lipofektion, retrovirale, adenovirale und Protoplast-fusion-vermittelte Transfektion ein (*siehe* Sambrook et al., *supra*). Nackte Vektor-konstrukte können ebenfalls durch muskuläre Zellen oder andere geeignete Zellen im Anschluss an eine Injektion in den Muskel eines Säugers (oder anderer Tiere) aufgenommen werden.

Zahlreiche Insektenwirtszellen, die im Fachbereich bekannt sind, können ebenfalls innerhalb der vorliegenden Erfindung, angesichts der vorliegenden Patentbeschreibung, nützlich sein. Zum Beispiel ist die Verwendung von Baculoviren als Vektoren zur Expression heterologer DNA-Sequenzen in Insektenzellen von Atkinson et al. (*Pestic. Sci.* 28:215-224, 1990) in einem Überblickartikel beschrieben worden.

Zahlreiche pflanzliche Wirtszellen, die im Fachbereich bekannt sind, können ebenfalls innerhalb der vorliegenden Erfindung, angesichts der vorliegenden Patentbeschreibung, nützlich sein. Zum Beispiel ist die Verwendung von *Agrobacterium rhizogenes* als Vektoren zur Expression von Genen in pflanzlichen Zellen von Sinkar et al. (*J. Biosci. (Bangalore)* 11:47-58, 1987) in einem Überblickartikel beschrieben worden.

Innerhalb verwandter Aspekte der vorliegenden Erfindung können Proteine der vorliegenden Erfindung in einem transgenen Tier exprimiert werden, dessen Keimzellen und somatische Zellen ein Gen enthalten, welches das gewünschte Protein codiert, und welches funktionsfähig mit einem für die Expression des Gens

effektiven Promotor verknüpft ist. Alternativ dazu können in einer ähnlichen Weise transgene Tiere erzeugt werden, denen das gewünschte Gen fehlt (z. B. "Knock-out"-Mäuse). Solche Transgene können in einer Vielfalt von nicht-humanen Tieren erzeugt werden, einschließlich Mäusen, Ratten, Kaninchen, Schafen, Hunden, Ziegen und Schweinen (*siehe* Hammer et al., *Nature* 315:680-683, 1985, Palmiter et al., *Science* 222:809-814, 1983, Brinster et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4438-4442, 1985, Palmiter und Brinster, *Cell* 41:343-345, 1985, und U.S.-Patent Nr. 5 175 383, 5 087 571, 4 736 866, 5 387 742, 5 347 075, 5 221 778 und 5 175 384). Kurz gesagt, wird ein Expressionsvektor, der ein zu exprimierendes Nukleinsäuremolekül zusammen mit geeignet positionierten Expressions-Kontrolsequenzen einschließt, in Pronuklei befruchteter Eier eingeführt, zum Beispiel durch Mikroinjektion. Die Integrierung der injizierten DNA wird durch Blot-Analyse von DNA aus Gewebeproben detektiert. Es wird bevorzugt, dass die eingeführte DNA in der Keimbahn des Tieres inkorporiert wird, so dass sie an die Nachkommen des Tieres weitergegeben wird. Gewebespezifische Expression kann durch die Verwendung eines gewebespezifischen Promotors oder durch die Verwendung eines induzierbaren Promotors erreicht werden, wie dem Metallothionein-Gen-Promotor (Palmiter et al., 1983, *ibid.*), der eine regulierte Expression des Transgens erlaubt.

Proteine können, unter anderen Verfahren, durch Kultivierung geeigneter Wirt- und Vektor-Systeme isoliert werden, um die rekombinanten Translationsprodukte der vorliegenden Erfindung zu produzieren. Überstände solcher Zelllinien, oder Proteininklusiven oder ganze Zellen, wo das Protein nicht in den Überstand abgesondert wird, können dann mit einer Vielzahl von Reinigungsprozeduren behandelt werden, um die gewünschten Proteine zu isolieren. Zum Beispiel kann der Überstand unter Verwendung von kommerziell erhältlichen Protein-Konzentrationsfiltern, wie eine Amicon- oder Millipore-Pellicon-Ultrafiltrationseinheit, zunächst konzentriert werden. Im Anschluss an die Konzentrierung kann das Konzentrat auf eine geeignete Reinigungsmatrix aufgetragen werden, wie zum Beispiel einen Anti-Protein-Antikörper, gebunden an einen geeigneten Träger. Alternativ dazu können Anionen- oder Kationen-Austauschharze eingesetzt werden, um das Protein zu reinigen. Als eine weitere Alternative können ein oder mehrere Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie(RP-HPLC)-Schritte eingesetzt werden, um das Protein

weiter zu reinigen. Andere Verfahren der Isolation von Proteinen der vorliegenden Erfindung sind im Kenntnisstand des Fachbereichs allgemein bekannt.

Ein Protein gilt innerhalb des Kontexts der vorliegenden Erfindung als "isoliert", wenn kein anderes (unerwünschtes) Protein, der SDS-PAGE-Analyse zufolge, gefolgt von Coomassie-Blaufärbung, detektiert wird. Innerhalb anderer Ausführungsformen kann das gewünschte Protein so isoliert werden, dass kein anderes (unerwünschtes) Protein der SDS-PAGE-Analyse zufolge, gefolgt von Silberfärbung, detektiert wird.

3. Nukleinsäuremoleküle

Innerhalb anderer Aspekte der Offenbarung werden Nukleinsäuremoleküle bereitgestellt, die in der Lage sind, das Binden von TGF-beta-Bindungsprotein an einen Vertreter der TGF-beta-Familie zu inhibieren. Zum Beispiel werden innerhalb einer Ausführungsform der Offenbarung Antisinn-Oligonukleotid-Moleküle bereitgestellt, welche die Expression von TGF-beta-Bindungsprotein-Nukleinsäuresequenzen spezifisch inhibieren (*siehe allgemein* Hirashima et al. in *Molecular Biology of RNA: New Perspectives* (M. Inouye und B. S. Dudock, Hrsg., 1987, Academic Press, San Diego, S. 401); *Oligonucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression* (J.S. Cohen, Hrsg., 1989, MacMillan Press, London); Stein und Cheng, *Science* 261:1004-1012, 1993; WO 95/10607; U.S.-Patent Nr. 5 359 051; WO 92/06693; und EP-A2-612844). Kurz gesagt, solche Moleküle werden so konstruiert, dass sie komplementär sind zu, und in der Lage zur Bildung von Watson-Crick-Basenpaaren sind mit, einer Region transkribierter TGF-beta-Bindungsprotein-mRNA-Sequenz. Die resultierende doppelsträngige Nukleinsäure stört die anschließende Prozessierung der mRNA, und verhindert dadurch die Proteinsynthese (siehe Beispiel 10).

Innerhalb anderer Aspekte der Offenbarung werden Ribozyme bereitgestellt, die in der Lage sind, das Binden des TGF-beta-Bindungsproteins an einen Vertreter der TGF-beta-Familie zu inhibieren. Wie hierin verwendet, ist es beabsichtigt, dass "Ribozyme" RNA-Moleküle einschließen, die Antisinn-Sequenzen zur spezifischen Erkennung und eine RNA-spaltende enzymatische Aktivität enthalten. Der katalytische Strang spaltet eine spezifische Stelle in einer Ziel-RNA bei mehr als einer stöchiometrischen Konzentration. Eine breite Vielfalt von Ribozymen kann

innerhalb des Kontexts der vorliegenden Offenbarung verwendet werden, einschließlich zum Beispiel des Hammerkopf-Ribozyms (zum Beispiel, wie von Forster und Symons, *Cell* 48:211-220, 1987; Haseloff und Gerlach, *Nature* 328:596-600, 1988; Walbot und Bruening, *Nature* 334:196, 1988; Haseloff und Gerlach, *Nature* 334:585, 1988, beschrieben); des Haarnadel-Ribozyms (zum Beispiel, wie von Haseloff et al., U.S.-Patent Nr. 5 254 678, erteilt am 19. Oktober 1993, und Hempel et al., Europäische Patentveröffentlichung Nr. 0 360 257, veröffentlicht am 26. März 1990, beschrieben); und Ribozymen auf Basis von ribosomaler *Tetrahymena*-RNA (siehe Cech et al., U.S.-Patent Nr. 4 987 071). Ribozyme der vorliegenden Offenbarung bestehen typischerweise aus RNA, können aber auch aus DNA, Nukleinsäureanalogen (z. B. Phosphorothioate) oder Chimären davon (z. B. DNA/RNA/RNA) zusammengesetzt sein.

4. Marker

Das Genprodukt oder jedes der obenstehend und untenstehend beschriebenen Kandidatenmoleküle können mit einer Vielfalt von Verbindungen markiert werden, einschließlich zum Beispiel fluoreszierender Moleküle, Toxine und Radionuklide. Repräsentative Beispiele für fluoreszierende Moleküle schließen Fluorescein, *Phycobili*-Proteine, wie Phycoerythrin, Rhodamin, Texas-Rot und Luziferase ein. Repräsentative Beispiele für Toxine schließen Ricin, Abrin, Diphtherie-Toxin, Cholera-Toxin, Gelonin, antivirales Protein der Kermesbeere, Tritin, *Shigella*-Toxin und *Pseudomonas*-Exotoxin A ein. Repräsentative Beispiele für Radionuklide schließen Cu-64, Ga-67, Ga-68, Zr-89, Ru-97, Tc-99m, Rh-105, Pd-109, In-111, I-123, I-125, I-131, Re-186, Re-188, Au-198, Au-199, Pb-203, At-211, Pb-212 und Bi-212 ein. Zusätzlich können die oben beschriebenen Antikörper ebenfalls markiert oder an einen Partner eines Ligand-Bindungspaares konjugiert werden. Repräsentative Beispiele schließen Adivin-Biotin und Riboflavin-Riboflavinbindungsprotein ein.

Verfahren zur Konjugierung und Markierung der hierin beschriebenen Moleküle mit den oben dargelegten repräsentativen Markierungen können leicht von einem Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet ausgeführt werden (*siehe* Trichothece Antibody Conjugate, U.S.-Patent Nr. 4 744 981; Antibody Conjugate, U.S.-Patent Nr. 5 106 951; Fluorogenic Materials and Labeling Techniques, U.S.-Patent Nr.

4 018 884; Metal Radionuclide Labeled Proteins for Diagnosis and Therapy, U.S.-Patent Nr. 4 897 255; und Metal Radionuclide Chelating Compounds for Improved Chelation Kinetics, U.S.-Patent Nr. 4 988 496; *siehe auch* Inman, *Methods In Enzymology*, Band 34, *Affinity Techniques, Enzyme Purification: Part B*, Jakoby und Wilchek (Hrsg.), Academic Press, New York, S. 30, 1974; *siehe auch* Wilchek und Bayer, "The Avidin-Biotin Complex in Bioanalytical Applications", *Anal. Biochem.* 171:1-32, 1988).

PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNGEN

Wie oben angemerkt, stellt die vorliegende Offenbarung auch eine Vielfalt von pharmazeutischen Zusammensetzungen bereit, die eins der oben beschriebenen Moleküle umfassen, welches das Binden des TGF-beta-Bindungsproteins an einen Vertreter der TGF-beta-Familie inhibiert, zusammen mit einem pharmazeutisch oder physiologisch annehmbaren Träger, Hilfsstoffen oder Verdünnungsmitteln. Allgemein sollten solche Träger in den eingesetzten Dosierungen und Konzentrationen nicht-toxisch gegenüber Empfängern sein. Gewöhnlich bedingt die Zubereitung solcher Zusammensetzungen die Kombination des therapeutischen Wirkstoffes mit Puffern, Antioxidantien, wie Ascorbinsäure, Polypeptiden niedrigen Molekulargewichts (weniger als ungefähr 10 Resten), Proteinen, Aminosäuren, Kohlenhydraten, einschließlich Glukose, Saccharose oder Dextrinen, chelatisierenden Wirkstoffen, wie EDTA, Glutathion und anderen Stabilisatoren und Hilfsstoffen. Neutral gepufferte Kochsalzlösung oder Kochsalzlösung, gemischt mit nicht-spezifischem Serum-Albumin, sind beispielhafte geeignete Verdünnungsmittel.

Zusätzlich können die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Offenbarung zur Verabreichung zubereitet werden, durch eine Vielfalt von verschiedenen Routen. Zusätzlich können pharmazeutische Zusammensetzungen der vorliegenden Offenbarung in Behälter eingebracht werden, zusammen mit Verpackungsmaterial, das Instruktionen in Bezug auf die Verwendung solcher pharmazeutischer Zusammensetzungen zur Verfügung stellt. Allgemein werden solche Instruktionen eine konkrete Ausdrucksweise einschließen, welche die Reagenzkonzentration beschreibt, ebenso wie, innerhalb bestimmter Ausführungsformen, relative Mengen von Hilfsstoff-Inhaltsstoffen oder

Verdünnungsmitteln (z. B. Wasser, Kochsalzlösung oder PBS), die notwendig sein können, um die pharmazeutische Zusammensetzung zu rekonstituieren.

BEHANDLUNG

Die vorliegende Erfindung sieht auch die Herstellung von Medikamenten zur Erhöhung des Knochenmineralgehaltes und der Knochenmineraldichte vor. Kurz gesagt, führen zahlreiche Zustände zum Verlust von Knochenmineralgehalt, einschließlich zum Beispiel Krankheit, genetische Prädisposition, Unfälle, die zu mangelnder Knochenbenutzung führen (z. B. aufgrund einer Fraktur), Therapeutika, die Knochenresorption verursachen oder die knochenbildende Zellen zerstören, und normalem Altern. Durch Verwendung der hierin beschriebenen Moleküle, die das Binden von TGF-beta-Bindungsprotein an einen TGF-beta-Familienvertreter inhibieren, um Medikamente herzustellen, können solche Zustände behandelt oder verhindert werden. Wie hierin verwendet, sollte sich verstehen, dass der Knochenmineralgehalt erhöht worden ist, wenn der Knochenmineralgehalt in einer statistisch signifikanten Weise (z. B. um mehr als eine halbe Standardabweichung), an einer ausgewählten Stelle erhöht worden ist.

Die hierin beschriebenen Moleküle können bei der Herstellung von Medikamenten zur Behandlung einer breiten Vielfalt von Zuständen verwendet werden, die zum Verlust von Knochenmineralgehalt führen. Patienten mit solchen Zuständen können durch klinische Diagnose unter Verwendung von allgemein bekannten Techniken identifiziert werden (siehe z. B. Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, Inc.). Repräsentative Beispiele für Krankheiten, die behandelt werden können, schließen Dysplasien ein, worin abnormales Wachstum oder abnormale Knochenentwicklung vorhanden ist. Repräsentative Beispiele für solche Zustände schließen Achondroplasie, cleidocraniale Dysostose, Enchondromatose, fibröse Dysplasie, Gaucher-Syndrom, hypophosphatämische Rachitis, Marfan-Syndrom, multiple erbliche Exotosen, Neofibromatose, Osteogenesis imperfecta, Osteopetrose, Osteopoikilie, sklerotische Läsionen, Frakturen, periodontale Krankheit, Pseudoarthrose und pyogene Osteomyelitis ein.

Andere Zustände, die unter Verwendung der Medikamente der Erfindung behandelt oder verhindert werden können, schließen eine breite Vielfalt von Ursachen für Osteopenie (d. h. ein Zustand, der mehr als eine Standardabweichung hinsichtlich Knochenmineralgehalt oder Knochenmineraldichte unter den Spitzen-Skelett-mineralgehalt in der Jugend herbeiführt) ein. Repräsentative Beispiele für solche Zustände schließen anämische Zustände, durch Steroide verursachte Zustände, durch Heparin verursachte Zustände, Knochenmark-Störungen, Skorbut, Unterernährung, Calciummangel, idiopathische Osteoporose, kongenitale Osteopenie oder Osteoporose, Alkoholismus, chronische Lebererkrankung, Senilität, den postmenopausalen Zustand, Oligomenorrhoe, Amenorrhoe, Schwangerschaft, Diabetes mellitus, Hyperthyroidismus, Cushing'sche Erkrankung, Akromegalie, Hypogonadismus, Immobilisierung oder Nichtgebrauch, sympathisches Reflex-Dystrophie-Syndrom, transiente regionale Osteoporose und Osteomalazie ein.

Innerhalb eines Aspektes sieht die vorliegende Offenbarung die Verwendung eines Moleküls vor, welches das Binden des TGF-beta-Bindungsproteins an einen TGF-beta-Familienvertreter inhibiert, bei der Herstellung eines Medikaments zur Erhöhung des Knochenmineralgehaltes oder der Knochenmineraldichte in einem warmblütigen Tier, wobei das Medikament eine effektive Menge des Moleküls bereitstellt. Beispiele für warmblütige Tiere, die behandelt werden können, schließen sowohl Wirbeltiere als auch Säuger ein, einschließlich zum Beispiel Pferde, Kühe, Schweine, Schafe, Hunde, Katzen, Ratten und Mäuse. Repräsentative Beispiele für therapeutische Moleküle schließen Ribozyme, Ribozymgene, Antisinn-Oligonukleotide und Antikörper (z. B. humanisierte Antikörper) ein.

Innerhalb anderer Aspekte umfasst die vorliegende Offenbarung das Einführen eines Vektors, der die Expression eines Moleküls steuert, welches das Binden des TGF-beta-Bindungsproteins an einen Vertreter der TGF-beta-Familie inhibiert, in Zellen, die zum Knochen wandern. Solche Zellen können dann bei der Herstellung eines Medikaments zur Erhöhung der Knochendichte in einem warmblütigen Tier verwendet werden. Kurz gesagt, können zum Knochen wandernde Zellen direkt aus Knochen von Patienten (z. B. Zellen, erhalten aus dem Knochenmark, wie CD34+,

Osteoblasten, Osteozyten und dergleichen), aus dem peripheren Blut oder aus Kulturen erhalten werden.

Ein Vektor, der die Expression eines Moleküls lenkt, welches das Binden des TGF-beta-Bindungsproteins an einen Vertreter der TGF-beta-Familie inhibiert, wird in die Zellen eingeführt. Repräsentative Beispiele für geeignete Vektoren schließen virale Vektoren, wie virale Herpes-Vektoren (z. B. U.S.-Patent Nr. 5 288 641), adenovirale Vektoren (z. B. WO 94/26914, WO 93/9191; Kolls et al., *PNAS* 91(1):215-219, 1994; Kass-Eisler et al., *PNAS* 90(24):11498-502, 1993; Guzman et al., *Circulation* 88(6):2838-48, 1993; Guzman et al., *Cir. Res.* 73(6):1202-1207, 1993; Zabner et al., *Cell* 75(2):207-216, 1993; Li et al., *Hum Gene Ther.* 4(4):403-409, 1993; Caillaud et al., *Eur. J. Neurosci.* 5(10):1287-1291, 1993; Vincent et al., *Nat. Genet.* 5(2):130-134, 1993; Jaffe et al., *Nat. Genet.* 1(5):372-378, 1992; und Levrero et al., *Gene* 101(2):195-202, 1991), adeno-assoziierte virale Vektoren (WO 95/13365; Flotte et al., *PNAS* 90(22):10613-10617, 1993), Baculovirus-Vektoren, Parvovirus-Vektoren (Koering et al., *Hum. Gene Therap.* 5:457-463, 1994), Pockenvirus-Vektoren (Panicali und Paoletti, *PNAS* 79:4927-4931, 1982; und Ozaki et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 193(2):653-660, 1993), und Retroviren (z. B. EP 0 415 731; WO 90/07936; WO 91/0285; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; U.S.-Patent Nr. 5 219 740; WO 93/11230; WO 93/10218) ein. Virale Vektoren können gleichermaßen konstruiert werden, die eine Mischung von verschiedenen Elementen (z. B. Promotoren, Hüllen-Sequenzen und dergleichen) aus verschiedenen Viren oder nicht-viralen Quellen enthalten. Innerhalb verschiedener Ausführungsformen kann entweder der virale Vektor selbst, oder ein virales Partikel, das den viralen Vektor enthält, in den untenstehend beschriebenen Verfahren und Zusammensetzungen verwendet werden.

Innerhalb anderer Ausführungsformen der Offenbarung können Nukleinsäuremoleküle selbst, die ein Molekül codieren, welches das Binden des TGF-beta-Bindungsproteins an einen Vertreter der TGF-beta-Familie inhibiert, durch eine Vielfalt von Techniken verabreicht werden, einschließlich zum Beispiel Verabreichung von Asialosomucoid (ASOR), konjugiert mit Poly-L-Lysin-DNA-Komplexen (Cristano et al., *PNAS* 92:92122-92126, 1993), mit abgetötetem Adenovirus

verknüpfte DNA (Curiel et al., *Hum. Gene Ther.* 3(2):147-154, 1992), Cytofektin-vermittelten Einführens (DMRIE-DOPE, Vical, Kalifornien), direkter DNA-Injektion (Acsadi et al., *Nature* 352:815-818, 1991); DNA-Ligand (Wu et al., *J. of Biol. Chem.* 264:16985-16987, 1989); Lipofektion (Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417, 1989); Liposomen (Pickering et al., *Circ.* 89(1):13-21, 1994; und Wang et al., *PNAS* 84:7851-7855, 1987); Mikroprojektil-Beschuss (Williams et al., *PNAS* 88:2726-2730, 1991); und direkter Einführung von Nukleinsäuren, die das Protein selbst codieren, entweder allein (Vile und Hart, *Cancer Res.* 53: 3860-3864, 1993) oder unter Verwendung von PEG-Nukleinsäure-Komplexen.

Repräsentative Beispiele für Moleküle, die von Vektoren der vorliegenden Offenbarung exprimiert werden können, schließen Ribozyme und Antisinn-Moleküle ein, welche oben einzeln ausführlicher diskutiert werden.

Die Feststellung von erhöhtem Knochenmineralgehalt kann direkt durch die Anwendung von Röntgenstrahlen (z. B. Dualenergie-Röntgenabsorptiometrie oder "DEXA"), oder durch Inferenz mittels Knochenumsatz-Marker (Osteoblasten-spezifische alkalische Phosphatase, Osteocalcin, Typ 1-Prokollagen-C'-Propeptid (PICP) und Gesamt-Alkalische-Phosphatase; siehe Comier, C., *Curr. Opin. in Rheu.* 7:243, 1995) oder Knochenresorptionsmarker (Pyridolin, Desoxypryridinolin, N-Telopeptid, Harn-Hydroxyprolin, Tartrat-resistente saure Plasma-Phosphatasen und Galaktosylhydroxylysin; siehe Comier, *supra*) bestimmt werden. Die Menge an Knochenmasse kann auch aus Körpergewichten oder durch Anwendung anderer Verfahren (siehe Guinness-Hey, *Metab. Bone Dis. and Rel. Res.* 5:177-181, 1984) berechnet werden.

Wie es einem Fachmann offensichtlich sein wird, wird die Menge und Häufigkeit der Verabreichung natürlich von solchen Faktoren abhängen, wie der Natur und Schwere der Indikation, die behandelt wird, der gewünschte Antwort, dem Zustand des Patienten und so weiter. Typischerweise können die Zusammensetzungen durch eine Vielfalt von Techniken verabreicht werden, wie oben angemerkt.

Die folgenden Beispiele werden veranschaulichend und nicht zur Einschränkung angeboten.

BEISPIELE

BEISPIEL 1

SKLEROSTEOSE KARTIERT AUF DEM LANGEN ARM DES HUMANEN CHROMOSOMS 17

Die genetische Kartierung des für Sklerosteose bei Menschen verantwortlichen Defekts hat das für diese Störung verantwortliche Gen auf die Region des humanen Chromosoms 17 lokalisiert, welche einen neuen Vertreter der TGF-beta-Bindungsprotein-Familie codiert. Bei der Sklerosteose zeigt der Skelettknochen eine erhebliche Erhöhung der Mineraldichte im Verhältnis zu der von unbetroffenen Individuen. Der Knochen im Kopf zeigt ebenfalls übermäßiges Wachstum. Sklerosteose-Patienten sind allgemein gesund, obwohl sie bei der Geburt unterschiedliche Grade von Syndaktylie und unterschiedliche Grade von kranialer Kompression und Nervenkompression im Schädel aufweisen können.

Eine Kopplungsanalyse des mit Sklerosteose assoziierten Gendefekts wurde durch Anwenden der Homozygotie-Kartierungsmethode an DNA-Proben durchgeführt, die von 24 Südafrikanischen Afrikaaner-Familien gesammelt wurden, in denen die Erkrankung vorkam (Sheffield et al., 1994, *Human Molecular Genetics* 3:1331-1335. "Identification of a Bardet-Biedl syndrome locus on chromosome 3 and evaluation of an efficient approach to homozygosity mapping"). Die Afrikaaner-Population von Süd Afrika ist genetisch homogen; die Population stammt von einer kleinen Anzahl von Gründern, die das Gebiet vor mehreren Jahrhunderten kolonisierten, und sie ist durch geographische und soziale Barrieren seit der Gründung isoliert gewesen. Die Sklerosteose ist überall auf der Welt außerhalb der Afrikaaner-Gemeinde selten, was darauf hindeutet, dass eine Mutation im Gen in der Gründerpopulation vorhanden war und sich seitdem in der Anzahl erhöht hat, zusammen mit dem Anwachsen der Population. Die Anwendung der Homozygotie-Kartierung basiert auf der Annahme, dass DNA-Kartierungsmarker, die an eine rezessive Mutation angrenzen, wahrscheinlich in betroffenen Individuen aus blutsverwandten Familien und isolierten Populationen homozygot sind.

Ein Satz von 371 Mikrosatellitenmarkern (Research Genetics, Set 6) aus den autosomalen Chromosomen wurde ausgewählt, um DNA-Pools von Sklerosteose-Patientenproben zu typisieren. Die DNA-Proben für diese Analyse kamen von 29 Sklerosteose-Patienten in 24 Familien, 59 unbetroffenen Familienmitgliedern und einem Satz von unverwandten Kontroll-Individuen aus derselben Population. Die Pools bestanden aus 4-6 Individuen, entweder betroffenen Individuen, betroffenen Individuen aus blutsverwandten Familien, Eltern und unbetroffenen Geschwistern oder unverwandten Kontrollen. In den Pools von unverwandten Individuen und in den meisten Pools mit betroffenen Individuen oder Familienmitgliedern zeigte die Analyse der Marker mehrere Allelgrößen für jeden Marker. Ein Marker, D17S1299, zeigte eine Indikation von Homozygotie: eine Bande in mehreren der Pools von betroffenen Individuen.

Alle 24 Sklerosteose-Familien wurden mit insgesamt 19 Markern in der Region von D17S1299 (bei 17q12-q21) typisiert. Betroffene Individuen aus jeder Familie zeigten sich als homozygot in dieser Region, und 25 von 29 Individuen waren homozygot für einen Kern-Haplotypus; sie hatten jeweils die gleichen Allele zwischen D17S1787 und D17S930. Die anderen vier Individuen hatten ein Chromosom, das zu diesem Haplotypus passte und ein zweites, das nicht passte. In wenigen Worten, wiesen die Daten zwingend darauf hin, dass diese 3-Megabasen-Region die Sklerosteose-Mutation enthielt. Die Sequenzanalyse der meisten Exons in dieser 3-Megabasen-Region identifizierte eine Nonsense-Mutation in der neuen TGF-beta-Bindungsprotein-codierenden Sequenz (C>T-Mutation an der Position 117 der Sequenz ID Nr. 1 führt zu einem Stop-Codon). Diese Mutation zeigte sich als einzigartig in Sklerosteose-Patienten und Trägern von Afrikaaner-Abstammung. Die Identität des Gens wurde weiter bestätigt durch die Identifizierung einer Mutation in seinem Intron (A>T-Mutation an der Position +3 des Introns), was zu unkorrekter mRNA-Prozessierung in einem einzelnen unverwandten Patienten mit diagnostizierter Sklerosteose führt.

BEISPIEL 2

GEWEBESPEZIFITÄT DER TGF-BETA-BINDUNGSPROTEIN-GENEXPRESSION

A. Genexpression von humanem Beer durch RT-PCR:

Erststrang-cDNA wurde aus den folgenden Gesamt-RNA-Proben unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Kits ("Superscript Preamplification System for First-Strand cDNA Synthesis", Life Technologies, Rockville, MD) erstellt: humanes Gehirn, humane Leber, humane Milz, humaner Thymus, humane Plazenta, humaner Skelettmuskel, humane Schilddrüse, humane Hypophyse, humaner Osteoblast (NHOst von Clonetics Corp., San Diego, CA), humane Osteosarkom-Zelllinie (Saos-2, ATCC# HTB-85), humaner Knochen, humanes Knochenmark, humaner Knorpel, Knochen der grünen Meerkatze, *Saccharomyces cerevisiae* und humanen peripheren Blut-Monozyten. Alle RNA-Proben wurden von einer kommerziellen Quelle (Clontech, Palo Alto, CA) erstanden, außer den folgenden, die im Hause erstellt wurden: humaner Osteoblast, humane Osteosarkom-Zelllinie, humaner Knochen, humaner Knorpel und Knochen der grünen Meerkatze. Diese hauseigenen RNA-Proben wurden unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Kits ("TRI Reagent", Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH) hergestellt.

PCR wurde an diesen Proben durchgeführt und zusätzlich an einer humanen genomischen Probe als Kontrolle. Der Sinn-Beer-Oligonukleotid-Primer hatte die Sequenz 5'-CCGGAGCTGGAGAACAACAAG-3' (SEQ ID Nr: 19). Der Antisinn-Beer-Oligonukleotid-Primer hatte die Sequenz 5'-GCACTGGCCGGAGCACACC-3' (SEQ ID Nr: 20). Zusätzlich wurde PCR durchgeführt unter Verwendung von Primern für das humane Beta-Actin-Gen als Kontrolle. Der Sinn-beta-Actin-Oligonukleotid-Primer hatte die Sequenz 5'-AGGCCAACCGCGAGAAGATGA CC-3' (SEQ ID Nr: 21). Der Antisinn-beta-Actin-Oligonukleotid-Primer hatte die Sequenz 5'-GAAGTCCAGGGCGACGTAGCA-3' (SEQ ID Nr: 22). PCR wurde unter Verwendung von Standardbedingungen in 25 µl-Reaktionen mit einer Annealingtemperatur von 61 Grad Celsius durchgeführt. Zweiunddreißig Zyklen von PCR wurden mit den Beer-Primern durchgeführt und vierundzwanzig Zyklen wurden mit den Beta-Actin-Primern durchgeführt.

Im Anschluss an die Amplifikation wurden 12 µl von jeder Reaktion durch Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung analysiert. Siehe Figur 2A.

B. RNA-in-situ-Hybridisierung von Maus-Embryo-Schnitten:

Die Vollängen-Maus-*Beer*-cDNA (Sequenz ID Nr. 11) wurde in den pCR2.1-Vektor (Invitrogen, Carlsbad, CA), in der Antisinn- und Sinn-Richtung, durch Anwendung des Protokolls des Herstellers kloniert. ³⁵S-alpha-GTP-markierte cRNA-Sinn- und Antisinn-Transkripte wurden unter Verwendung von in-vitro-Transkriptionsreagentien synthetisiert, die von Ambion, Inc (Austin, TX) geliefert wurden. In-situ-Hybridisierung wurde gemäß der Protokolle von Lyons et al. (*J. Cell Biol.* 111:2427-2436, 1990) durchgeführt.

Die Maus-*Beer*-cRNA-Sonde detektierte eine spezifische Message, die im Neuralrohr, in den Gliedmaßenknospen, in den Blutgefäßen und den ossifizierenden Knorpeln von sich entwickelnden Mausembryos exprimiert war. Die Tafel A in der Figur 3 zeigt eine Expression im apikalen ektodermalen Kamm (aer) der Gliedmaßenknospe (l), in den Blutgefäßen (bv) und dem Neuralrohr (nt). Die Tafel B zeigt eine Expression im 4. Ventrikel des Gehirns (4). Die Tafel C zeigt eine Expression in der Mandibula (ma), den Halswirbeln (cv), dem Hinterhauptsbein (oc), dem Gaumen (pa) und einem Blutgefäß (bv). Die Tafel D zeigt eine Expression in den Rippen (r) und einer Herzklappe (va). Die Tafel A ist ein Querschnitt von einem 10,5 dpc-Embryo. Die Tafel B ist ein sagittaler Schnitt von einem 12,5 dpc-Embryo, und die Tafeln C und D sind sagittale Schnitte von 15,5 dpc-Embryos.

ba=Branchialbogen, h=Herz, te=Telencephalon (Vorderhirn), b=Gehirn, f=frontonasale Masse, g=Darm, h=Herz, j=Kiefer, li=Leber, lu=Lunge, ot=Ohrvesikel, ao=, sc=Rüchenmark, skm=Skelettmuskel, ns=nasaler Sinus, th=Thymus, to=Zunge, fl=Vorderglied, di=Zwerchfell

BEISPIEL 3

EXPRESSION UND REINIGUNG DES REKOMBINANTEN BEER-PROTEINS

A. Expression in COS-1-Zellen:

Die DNA-Sequenz, die das humane Vollängen-Beer-Protein codiert, wurde unter Verwendung der folgenden PCR-Oligonukleotid-Primer amplifiziert: der 5'-Oligonukleotid-Primer hatte die Sequenz 5'-**AAGCTTGGTACCATGCAGCTCCCAC**-3' (SEQ ID Nr: 23) und beinhaltete eine HindIII-Restriktions-Enzymstelle (fett gedruckt) gefolgt von 19 Nukleotiden des *Beer*-Gens, die 6 Basenpaare vor dem vermuteten aminoterminalen Start-Codon (ATG) anfangen. Der 3'-Oligonukleotid-Primer hatte die Sequenz 5'-**AAGCTTCTACTTGCATCGTCGTCCT**TGTAGTCGTAGGCGTTCTCCAGCT-3' (SEQ ID Nr: 24) und beinhaltete eine HindIII-Restriktions-Enzymstelle (fett gedruckt), gefolgt von einem reversen Komplement-Stop-Codon (CTA), gefolgt vom reversen Komplement des FLAG-Epitops (unterstrichen, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO), flankiert vom reversen Komplement von Nukleotiden, welche die carboxyterminalen 5 Aminosäuren des Beer codieren. Das PCR-Produkt wurde TA-kloniert ("Original TA Cloning Kit", Invitrogen, Carlsbad, CA), und individuelle Klone wurden mittels DNA-Sequenzierung gescreent. Ein Sequenz-verifizierter Klon wurde dann mit HindIII verdaut und auf einem 1,5%-Agarose-Gel gereinigt unter Verwendung von kommerziell erhältlichen Reagenzien ("QIAquick Gel Extraction Kit", Qiagen Inc., Valencia, CA). Dieses Fragment wurde dann an HindIII-verdautes, Phosphatase-behandeltes pcDNA3.1-Plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA) mit T4 DNA-Ligase ligiert. DH10B-*E. coli* wurden transformiert und auf LB plattiert, 100-µg/ml-Ampicillin-Platten. Kolonien, welche die gewünschte Rekombinante in der richtigen Orientierung trugen, wurden mittels eines PCR-basierten Screens identifiziert unter Verwendung eines 5'-Primers, welcher der T7-Promotor/Priming-Stelle in pcDNA3.1 entspricht, und eines 3'-Primers mit der Sequenz 5'-GCACTGGCCGGAGCACACC-3' (SEQ ID Nr: 25), der dem reversen Komplement der internen BEER-Sequenz entspricht. Die Sequenz des klonierten Fragments wurde mittels DNA-Sequenzierung bestätigt.

COS-1-Zellen (ATCC# CRL-1650) wurden für die Transfektion verwendet. 50 µg des Expressionsplasmids pcDNA-Beer-Flag wurden unter Verwendung eines

kommerziell erhältlichen Kits transfiziert, wobei Protokolle befolgt wurden, die vom Hersteller geliefert wurden ("DEAE-Dextran Transfection Kit", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Das endgültige Medium im Anschluss an die Transfektion war DMEM (Life Technologies, Rockville, MD), das 0,1% fötales Rinderserum enthielt. Nach 4 Tagen in Kultur wurde das Medium entfernt. Expression von rekombinantem BEER wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung des monoklonalen Anti-FLAG-M2-Antikörpers (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) analysiert. Die Reinigung von rekombinantem BEER-Protein wurde unter Verwendung einer Anti-FLAG M2-Affinitätssäule ("Mammalian Transient Expression System", Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) durchgeführt. Das Säulenprofil wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot unter Verwendung des monoklonalen Anti-FLAG-M2-Antikörpers analysiert.

B. Expression in SF9-Insektenzellen:

Die humane *Beer*-Gensequenz wurde durch Anwendung von PCR mit Standardbedingungen und den folgenden Primern amplifiziert:

Sinn-Primer: 5'-GTCGTCGGATCCATGGGGTGGCAGGCGTTCAAGAATGAT-3'
(SEQ ID Nr: 26)

Antisinn-Primer: 5'-GTCGTCAAGCTTCTACTTGTCATCGTCCTTGTAGTCGTA
GGCGTTCTCCAGCTCGGC-3' (SEQ ID Nr: 27)

Die resultierende cDNA enthielt die codierende Region von Beer mit zwei Modifikationen. Das N-terminale Sekretionssignal war entfernt und ein FLAG-Epitop-tag (Sigma) war im Leserahmen an das C-terminale Ende des Inserts fusioniert. BamHI- und HindIII-Klonierungsstellen wurden addiert, und das Gen wurde in den pMelBac-Vektor (Invitrogen) subkloniert, und zwar zum Transfer in einen baculoviralen Expressionsvektor, durch Anwendung von Standardverfahren.

Rekombinante Baculoviren, die das Beer-Protein exprimieren, wurden unter Verwendung des Bac-N-Blue-Transfektionskits (Invitrogen) hergestellt und gemäß der Instruktionen des Herstellers gereinigt.

SF9-Zellen (Invitrogen) wurden in TNM_FH-Medium (Invitrogen) aufbewahrt, das 10% fötales Kalbserum enthielt. Zur Proteinexpression wurden SF9-Kulturen in Spinner-Flaschen bei einer MOI von mehr als 10 infiziert. Proben des Mediums und der Zellen wurden täglich für fünf Tage genommen, und die Beer-Expression wurde mittels Western-Blot unter Verwendung eines monoklonalen Anti-FLAG M2-Antikörpers (Sigma) oder eines polyklonalen Anti-Beer-Kaninchen-Antiserums verfolgt.

Nach fünf Tagen wurden die Baculovirus-infizierten SF9-Zellen durch Zentrifugation geerntet und Zellen-assoziiertes Protein wurde vom Zell-Pellet unter Verwendung eines Hochsalz-Extraktionspuffers (1,5 M NaCl, 50 mM Tris pH 7,5) extrahiert. Der Extrakt (20 ml pro 300 ml Kultur) wurde durch Zentrifugation geklärt, drei Mal gegen vier Liter an Tris-gepufferter Kochsalzlösung dialysiert (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5), und durch Zentrifugation wieder geklärt. Diese Hochsalz-Fraktion wurde auf Hitrap-Heparin (Pharmacia; 5 ml Bettvolumen) aufgetragen, mit HEPES-gepufferter Kochsalzlösung (25 mM HEPES 7,5, 150 mM NaCl) gründlich gewaschen, und gebundene Proteine wurden mit einem Gradienten von 150 mM NaCl zu 1200 mM NaCl eluiert. Beer-Eluierung wurde bei ungefähr 800 mM NaCl beobachtet. Beer-enhaltende Fraktionen wurden zu 10% Glycerol und 1 mM DTT ergänzt und bei -80 Grad C gefroren.

BEISPIEL 4

HERSTELLEN UND TESTEN VON POLYKLONALEN ANTIKÖRPERN GEGEN BEER, GREMLIN UND DAN

A. Herstellen des Antigens:

Die DNA-Sequenzen von humanem *Beer*, humanem *Gremlin* und humanem *Dan* wurden durch Anwendung von Standard-PCR-Verfahren mit den folgenden Oligonukleotid-Primern amplifiziert:

H. Beer

Sinn: 5'-GACTTGGATCCCAGGGGTGGCAGGCGTTC-3' (SEQ ID Nr: 28)

Antisinn: 5'-AGCATAAGCTTCTAGTAGGCGTTCTCCAG-3' (SEQ ID Nr: 29)

H. Gremlin

Sinn: 5'-GACTTGGATCCGAAGGGAAAAAGAAAGGG-3' (SEQ ID Nr: 30)

Antisinn: 5'-AGCATAAGCTTTTAATCCAAATCGATGGA-3' (SEQ ID Nr: 31)

H. Dan

Sinn: 5'-ACTACGAGCTCGGCCCCACCACCCATCAACAAG-3' (SEQ ID Nr: 32)

Antisinn: 5'-ACTTAGAAGCTTTCAGTCCTCAGCCCCCTCTTCC-3' (SEQ ID Nr: 33)

In jedem Fall amplifizierten die aufgelisteten Primer die gesamte codierende Region minus der Sekretionssignal-Sequenz. Diese schließen Restriktionsstellen für das Subklonieren in den bakteriellen Expressionsvektor pQE-30 (Qiagen Inc., Valencia, CA) ein, an den Stellen BamHI/HindIII für Beer und Gremlin, und den Stellen SacI/HindIII für Dan. Der pQE30 enthält eine codierende Sequenz für ein 6xHis-tag am 5'-Ende der Klonierungs-Region. Die vervollständigten Konstrukte wurden in den *E. coli*-Stamm M-15/pRep (Qiagen Inc) transformiert und individuelle Klone durch Sequenzierung verifiziert. Proteinexpression in M-15/pRep und Reinigung (6xHis-Affinitätstag, das an Ni-NTA bindet, gekoppelt mit Sepharose) wurden wie vom Hersteller (Qiagen, The QIAexpressionist) beschrieben durchgeführt.

Das von *E. coli* abgeleitete Beer-Protein wurde in signifikanter Menge gewonnen unter Verwendung von Solubilisierung in 6 M Guanidin und zu 2-4 M dialysiert, um eine Ausfällung während der Lagerung zu verhindern. Das Gremlin- und Dan-Protein wurden in höherer Menge gewonnen mittels Solubilisierung in 6 M Guanidin und einer Nach-Reinigungs-Guanidinkonzentration von 0,5 M.

B. Herstellung und Testen von polyklonalen Antikörpern:

Polyklonale Antikörper gegen jedes der drei Antigene wurden in Kaninchen- und in Hühner-Wirten durch Anwendung von Standardprotokollen hergestellt (R & R Antibody, Stanwood, WA; standard protocol for rabbit immunization and antisera recovery; Short Protocols in Molecular Biology, 2. Ausgabe. 1992. 11.37-11.41. Beitragende Helen M. Cooper und Yvonne Paterson; Hühner-Antiseren wurden hergestellt mit Strategic Biosolutions, Ramona, CA).

Kaninchen-Antiseren und Hühner-IgY-Fraktion wurden mittels Western-Blot auf Aktivität gescreent. Jedes der drei Antigene wurde durch PAGE getrennt und auf 0,45 µm Nitrocellulose (Novex, San Diego, CA) transferiert. Die Membran wurde in Streifen geschnitten, wobei jeder Streifen ungefähr 75 ng des Antigens enthielt. Die

Streifen wurden in 3%-Blotting-Grade-Block (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) blockiert und 3 Mal in 1XTris-Puffer-Kochsalzlösung (TBS)/0,02%-TWEEN-Puffer gewaschen. Der primäre Antikörper (Präimmunsierungs-Blutungen, Kaninchen-Antiseren oder Hühnerei-IgY in Verdünnungen im Bereich von 1:100 bis 1:10.000 in Blockierungspuffer) wurde mit den Streifen eine Stunde lang bei sanftem Schaukeln inkubiert. Auf eine zweite Serie von drei Waschvorgängen 1XTBS/0,02%-TWEEN folgte eine Inkubation von einer Stunde mit dem sekundären Antikörper (Peroxidase-konjugiertes Esel-Anti-Kaninchen, Amersham Life Science, Piscataway, NJ; oder Peroxidase-konjugiertes Esel-Anti-Huhn, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Ein letzter Zyklus von 3X Waschen von 1XTBS/0,02%-TWEEN wurde durchgeführt, und die Streifen wurden mit 'Lumi-Light'-Western-Blotting-Substrat (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland) entwickelt.

C. Antikörper-Kreuzreaktivitätstest:

Unter Befolgung des Protokolls, das im vorherigen Abschnitt beschrieben wurde, wurden Nitrocellulose-Streifen von Beer, Gremlin oder Dan inkubiert mit Verdünnungen (1:5000 und 1:10.000) ihrer entsprechenden Kaninchen-Antiseren oder Hühnerei-IgY, sowie Antiseren oder Hühnerei-IgY (Verdünnungen 1:1000 und 1:5000), die gegen die übrigen zwei Antigene erzeugt worden waren. Die erhöhten Spiegel an nicht-passenden Antikörpern wurden durchgeführt, um Niedrigaffinitäts-Bindung von diesen Antikörpern zu detektieren, die nur bei erhöhter Konzentration beobachtet werden kann. Das Protokoll und die Dauer der Entwicklung ist gleich für alle drei Bindungsereignisse unter Verwendung des oben beschriebenen Protokolls. Es wurde keine Antigen-Kreuzreaktivität für irgendeines der getesteten Antigene beobachtet.

BEISPIEL 5

INTERAKTION VON BEER MIT TGF-BETA-SUPERFAMILIEN-PROTEINEN

Die Interaktion von Beer mit Proteinen aus verschiedenen phylogenetischen Armen der TGF- β -Superfamilie wurden durch Anwendung von Immunopräzipitations-Verfahren studiert. Gereinigtes TGF β -1, TGF β -2, TGF β -3, BMP-4, BMP-5, BMP-6 und GDNF wurden von kommerziellen Quellen (R&D systems; Minneapolis, MN) erhalten. Ein repräsentatives Protokoll ist wie folgt. Teilweise gereinigtes Beer wurde in HEPES-gepufferter Kochsalzlösung (25 mM HEPES 7,5, 150 mM NaCl) dialysiert.

Immunopräzipitationen wurden in 300 µl von IP-Puffer (150 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA, 1,4 mM β-Mercaptoethanol, 0,5% Triton X 100 und 10% Glycerol) durchgeführt. 30 ng rekombinantes humanes BMP-5-Protein (R&D systems) wurde auf 15 µl FLAG-Affinitätsmatrix (Sigma; St. Louis, MO) in Anwesenheit und Abwesenheit von 500 ng FLAG-Epitop-getagtem Beer aufgetragen. Die Proteine wurden 4 Stunden lang bei 4°C inkubiert, und die Affinitätsmatrix-assoziierten Proteine wurden dann fünfmal in IP-Puffer (1 ml pro Waschvorgang) gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden aus der Affinitätsmatrix in 60 Mikrolitern 1XSDS-PAGE-Probenpuffer eluiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgelöst, und Beer-assoziiertes BMP-5 wurde durch Western-Blot unter Verwendung von Anti-BMP-5-Antiserum (Research Diagnostics, Inc) detektiert (siehe Figur 5).

Beer-Ligand-Bindungs-Assay:

FLAG-Beer-Protein (20 ng) wurde in 100 µl PBS/0,2%-BSA zugesetzt und in jede Vertiefung einer 96-Vertiefungs-Mikrotiterplatte, die vorher mit monoklonalem Anti-FLAG-Antikörper (Sigma; St. Louis, MO) beschichtet wurde, adsorbiert, und mit 10%-BSA in PBS blockiert. Dies wurde in Raumtemperatur während 60 Minuten durchgeführt. Diese Proteinlösung wird entfernt und die Vertiefungen werden gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen. BMP-5 wurde zu jeder Vertiefung in Konzentrationen zwischen 10 pM und 500 nM in PBS/0,2%-BSA zugesetzt und während 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bindungslösung wurde entfernt und die Platte dreimal mit 200 µl-Volumen von PBS/0,2%-BSA gewaschen. Die BMP-5-Spiegel wurden dann unter Verwendung von BMP-5-Antiserum mittels ELISA detektiert (F.M. Ausubel et al. (1998) Current Protocols in Mol Biol. Band 2 11.2.1-11.2.22). Die spezifische Bindung wurde berechnet, indem nicht-spezifische Bindung von der Gesamt-Bindung subtrahiert wurde, und wurde mit dem LIGAND-Programm (Munson und Podbard, Anal. Biochem. 107, S. 220-239, (1980)) analysiert.

In einer Variation dieses Verfahrens wurde Beer als ein humanes Fc-Fusionsprotein konstruiert und exprimiert. Ebenso wurde der Ligand BMP als eine Maus-Fc-Fusion konstruiert und exprimiert. Diese Proteine wurden zusammen inkubiert und das Assay wurde, wie von Mellor et al. beschrieben, unter Verwendung homogener

zeitlich-aufgelöster Fluoreszenz-Detektierung durchgeführt (G.W. Mellor et al., *J of Biomol Screening*, 3(2) 91-99, 1998).

BEISPIEL 6

SCREENEN-ASSAY HINSICHTLICH INHIBITION DES BINDENS VON TGF-BETA-BINDUNGSPROTEIN AN TGF-BETA-FAMILIENVERTRETERN

Das oben beschriebene Assay wurde wiederholt mit zwei Ausnahmen. Erstens, die BMP-Konzentration wird auf der vorher bestimmten K_d fixiert gehalten. Zweitens, eine Kollektion von Antagonistkandidaten wird in einer fixierten Konzentration zugesetzt (20 μM im Fall der Kollektionen von kleinen organischen Molekülen und 1 μM in Antikörper-Studien). Diese Kandidatenmoleküle (Antagonisten) des TGF-beta-Bindungsprotein-Bindens schließen organische Verbindungen ein, welche aus kommerziellen oder internen Kollektionen stammen, die verschiedene chemische Strukturen repräsentieren. Diese Verbindungen werden als Stammlösungen in DMSO erstellt und werden zu Assay-Vertiefungen bei $\leq 1\%$ des Endvolumens unter den standardmäßigen Assay-Bedingungen zugesetzt. Diese wurden 2 Stunden lang bei Raumtemperatur mit dem BMP und Beer inkubiert, die Lösung wurde entfernt und das gebundene BMP wird wie beschrieben quantifiziert. Mittel, die 40% des BMP-Bindens inhibieren, welches in Abwesenheit der Verbindung oder des Antikörpers beobachtet wurde, wurden als Antagonisten dieser Interaktion angesehen. Diese wurden ferner als potentielle Inhibitoren evaluiert, basierend auf Titrationsuntersuchungen, um ihre Inhibitionskonstanten und ihren Einfluss auf die TGF-beta-Bindungsprotein-Bindungsaffinität zu bestimmen. Vergleichbare Spezifitäts-Kontrollassays können auch durchgeführt werden, um das Selektivitätsprofil für den identifizierten Antagonist durch Studien zu etablieren, die Assays verwenden, welche von der BMP-Ligand-Wirkung abhängen (z. B. BMP/BMP-Rezeptor-Kompetitions-Studie).

BEISPIEL 7

INHIBITION DER LOKALISIERUNG VON TGF-BETA-BINDUNGSPROTEIN ZU DER KNOCHENMATRIX

Die Evaluierung der Inhibition der Lokalisierung zur Knochenmatrix (Hydroxyapatit) wurde durch Anwendung von Modifikationen der Methode von Nicolas (Nicolas, V. *Calcif Tissue Int* 57:206, 1995) durchgeführt. Kurz gesagt, wurde ^{125}I -markiertes

TGF-beta-Bindungsprotein wie von Nicolas (*supra*) beschrieben hergestellt. Hydroxyapatit wurde in jede Vertiefung einer 96-Vertiefungs-Mikrotiterplatte zugesetzt, ausgestattet mit einer Polypropylen-Filtrationsmembran (Polyfiltroninc, Weymouth, MA). TGF-beta-Bindungsprotein wird zu 0,2%-Albumin in PBS-Puffer zugefügt. Die Vertiefungen, welche die Matrix enthielten, wurden dreimal mit diesem Puffer gewaschen. Adsorbiertes TGF-beta-Bindungsprotein wird unter Verwendung von 0,3 M NaOH eluiert und quantifiziert.

Die Inhibitor-Identifizierung wird mittels Inkubation von TGF-beta-Bindungsprotein mit Testmolekülen und Aufbringen der Mischung auf die Matrix durchgeführt, wie oben beschrieben. Die Matrix wird dreimal mit 0,2%-Albumin in PBS-Puffer gewaschen. Adsorbiertes TGF-beta-Bindungsprotein wird unter Verwendung von 0,3 M NaOH eluiert und quantifiziert. Mittel, die 40% des TGF-beta-Bindungsprotein-Bindens inhibieren, welches in Abwesenheit der Verbindung oder des Antikörpers beobachtet wurde, werden als Knochen-Lokalisierungsinhibitoren betrachtet. Diese Inhibitoren werden ferner durch Dosis-Antwort-Studien charakterisiert, um ihre Inhibitions-konstanten und ihren Einfluss auf TGF-beta-Bindungsprotein-Bindungsaffinität zu bestimmen.

BEISPIEL 8

KONSTRUIEREN DER TGF-BETA-BINDUNGSPROTEIN-MUTANTE

A. Mutagenese:

Eine Vollängen-TGF-beta-Bindungsprotein-cDNA in pBluescript SK diene als eine Vorlage bzw. Matrize für die Mutagenese. Kurz gesagt, werden geeignete Primer (siehe die oben angegebene Diskussion) verwendet, um das DNA-Fragment mittels Polymerasekettenreaktion unter Verwendung von Vent-DNA-Polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA) zu erstellen. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde für 23 Zyklen in Puffern durchgeführt, die vom Hersteller bereitgestellt wurden, unter Verwendung einer 57°C Annealing-Temperatur. Das Produkt wurde dann zwei Restriktionsenzymen ausgesetzt und, nach der Isolation unter Verwendung von Agarose-Gelelektrophorese, zurück in pRBP4-503 ligiert, aus welchem die passende Sequenz durch enzymatischen Verdau entfernt worden war. Die Integrität der Mutante wurde durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

B. Säuger-Zellexpression und Isolierung von Mutanten-TGF-beta-Bindungsprotein:

Die Mutanten-TGF-beta-Bindungsprotein-cDNAs wurden in den pcDNA3.1-Säuger-Expressionsvektor überführt, der in BEISPIEL 3 beschrieben wurde. Nachdem die Sequenz verifiziert wurde, wurden die resultierenden Konstrukte in COS-1-Zellen transfiziert, und sezerniertes Protein wurde gereinigt, wie in BEISPIEL 3 beschrieben.

BEISPIEL 9

TIERMODELLE-I

ERZEUGUNG VON TRANSGENEN MÄUSEN, DIE DAS *BEER*-GEN ÜBEREXPRIMIEREN

Der ~200 Kilobasen- (kb) BAC-Klon 15G5, der aus der CITB-Maus-Genom-DNA-Bibliothek (vertrieben von Research Genetics, Huntsville, AL) isoliert wurde, wurde verwendet, um die komplette Sequenz des Maus-*Beer*-Gens und dessen 5'- und 3'-flankierende Regionen zu bestimmen. Ein 41 kb-Sall-Fragment, das den gesamten Genkörper enthielt, plus ~17 kb der 5'-flankierenden und ~20 kb der 3'-flankierenden Sequenz wurden in die BamHI-Stelle des SuperCosI-Cosmid-Vektors (Stratagene, La Jolla, CA) subkloniert und in dem *E. coli*-Stamm DH10B vermehrt. Aus diesem Cosmid-Konstrukt wurde dann ein 35 kb großes MluI-AvIII-Restriktionsfragment (Sequenz Nr. 6), einschließlich des gesamten Maus-*Beer*-Gens, sowie 17 kb und 14 kb der 5'- bzw. 3'-flankierenden Sequenz, unter Anwendung herkömmlicher Mittel einer Gel-Reinigung unterzogen und zur Mikroinjektion von Mauszygoten verwendet (DNX-Transgenics; U.S.-Patent Nr. 4 873 191). Gründer-Tiere, in denen das klonierte DNA-Fragment statistisch ins Genom integriert wurde, wurden in einer Frequenz von 5-30% von lebendgeborenen Jungen erhalten. Die Anwesenheit des Transgens wurde festgestellt, indem Southern-Blot-Analyse von Genom-DNA durchgeführt wurde, die aus einer kleinen Menge an Maus-Gewebe extrahiert wurde, wie der Spitze des Schwanzes. DNA wurde unter Anwendung des folgenden Protokolls extrahiert: das Gewebe wurde über Nacht bei 55°C in einem Lysis-Puffer verdaut, der 200 mM NaCl, 100 mM Tris pH8,5, 5 mM EDTA, 0,2% SDS und 0,5 mg/ml Proteinase K enthielt. Am folgenden Tag wurde die DNA einmal mit Phenol/Chloroform (50:50), einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, und mit Ethanol gefällt. Nach der Resuspension in TE (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA) wurden 8-10

µg von jeder DNA-Probe mit einer Restriktionsendonuklease, wie EcoRI, verdaut, der Gelelektrophorese unterzogen und auf eine geladene Nylon-Membran, wie HyBondN+ (Amersham, Arlington Heights, IL), transferiert. Der resultierende Filter wurde dann mit einem radioaktiv markiertem Fragment von DNA hybridisiert, stammend vom Maus-*Beer*-Gen-Locus und in der Lage, beides, ein Fragment aus dem endogenen Gen-Locus und ein Fragment unterschiedlicher Größe, das vom Transgen stammt, zu erkennen. Gründer-Tiere wurden zu normalen nicht-transgenen Mäusen herangezüchtet, um ausreichende Anzahlen von transgenen und nicht-transgenen Nachkommen zu erzeugen, in welchen die Effekte von *Beer*-Gen-Überexpression bestimmt werden sollten. Für diese Untersuchungen wurden Tiere verschiedenen Alters (zum Beispiel 1 Tag, 3 Wochen, 6 Wochen, 4 Monate) einer Anzahl verschiedener Assays unterzogen, die entworfen waren, um die Brutto-Skelettbildung, die Knochenmineraldichte, den Knochenmineralgehalt, die Osteoklast- und Osteoblast-Aktivität, das Ausmaß endochondraler Ossifikation, die Knorpelbildung, etc. zu ermitteln. Die transkriptionelle Aktivität von dem Transgen kann bestimmt werden durch Extrahieren von RNA aus verschiedenen Geweben und Anwendung eines RT-PCR-Assays, das Einzel-Nukleotidpolymorphismen zwischen dem Mausstamm, von dem das Transgen stammt (129Sv/J), und dem Stamm von Mäusen, die für DNA-Mikroinjektion verwendet wurden [(C57BL5/J x SJL/J)F2] ausnutzt.

TIERMODELLE-II

ZERSTÖRUNG DES MAUS-BEER-GENS DURCH HOMOLOGE REKOMBINATION

Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES) kann angewandt werden, um das endogene Maus-*Beer*-Gen zu inaktivieren und danach Tiere zu erzeugen, welche die Funktionsverlust-Mutation tragen. Ein Reporter-gen, wie das *E.coli*-β-Galactosidase-Gen, wurde in den Targeting-Vektor eingebaut, so dass seine Expression vom endogenen Promotor und dem Translationsinitiationssignal des *Beer*-Gens gesteuert wird. In dieser Weise können die räumlichen und zeitlichen Muster der *Beer*-Genexpression in Tieren bestimmt werden, die ein angezieltes Allel tragen.

Der Targeting-Vektor wurde konstruiert zuerst durch Klonen der Arzneimittel-selektierbaren Phosphoglyceratkinase(PGK)-Promotor-gesteuerten *Neomycin-Resistenz-Gen(neo)*-Kassette von pGT-N29 (New England Biolabs, Beverly, MA) in den Klonierungsvektor pSP72 (Promega, Madison, WI). PCR wurde angewandt, um die PGK*neo*-Kassette mit Bakteriophage-P1-loxP-Stellen zu flankieren, welche Erkennungsstellen für die P1-Cre-Rekombinase sind (Hoess et al., PNAS USA, 79:3398, 1982). Dies erlaubt die nachfolgende Entfernung des Neo-Resistenzmarkers in angezielten ES-Zellen oder ES-Zell-abstammenden Tieren (U.S.-Patent 4 959 317). Die PCR-Primer bestanden aus der 34 Nukleotide (ntd) großen loxP-Sequenz, 15-25 ntd, komplementär zu den 5'- und 3'-Enden der PGK*neo*-Kassette, sowie Restriktionsenzym-Erkennungsstellen (BamHI im Sinn-Primer und EcoRI im Antisinn-Primer) zum Klonieren in pSP72. Die Sequenz des Sinn-Primers war
5'-AATCTGGATCCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCTGCAG
GATTCGAGGGCCCCT-3' (SEQ ID Nr: 34); die Sequenz des Antisinn-Primers war
5'-AATCTGAATTCCACCGGTGTTAATTAATAACTTCGT
ATAATGTATGCTATACGAAGTTATAGATCTAGAG TCAGCTTCTGA-3' (SEQ ID Nr: 35).

Der nächste Schritt bestand darin, ein 3,6 kb großes XhoI-HindIII-Fragment, welches das *E. coli*- β -Galactosidase-Gen und das SV40-Polyadenylierungssignal von pSV β (Clontech, Palo Alto, CA) enthielt, in das pSP72-PGK*neo*-Plasmid zu klonieren. Der "kurze Arm" der Homologie von dem Maus-*Beer*-Gen-Locus wurde durch Amplifizieren eines 2,4 kb-Fragments aus dem BAC-Klon 15G5 hergestellt. Das 3'-Ende des Fragments deckte sich mit der Translationsinitiationsstelle des *Beer*-Gens, und der Antisinn-Primer, der in der PCR verwendet wurde, schloss auch 30 ntd komplementär zum 5'-Ende des β -Galactosidase-Gens ein, so dass seine codierende Region mit der Beer-Initiationsstelle im Leserahmen fusioniert werden konnte. Die Herangehensweise, die vorgenommen wurde, um den "kurzen Arm" in das pSP72- β gal-PGK*neo*-Plasmid einzuführen, bestand darin, das Plasmid an einer Stelle stromaufwärts vom β -gal-Gen zu linearisieren, und dann dieses Fragment mit dem "kurz-Arm"-PCR-Produkt zu cotransformieren und Plasmide zu selektieren, in denen das PCR-Produkt durch homologe Rekombination integriert worden war. Der Sinn-Primer für die "kurz-Arm"-Amplifikation schloss 30 ntd, komplementär zum

pSP72-Vektor, um dieses Rekombinations-Ereignis zu erlauben, ein. Die Sequenz des Sinn-Primers war 5'-ATTAGGTGACACT ATAGAACTCGAGCAGCTGAAGC-TTAACCACATGGTGGCTCACAACCAT-3' (SEQ ID Nr: 36) und die Sequenz des Antisinn-Primers war 5'-AACGACGGCCAGTGAATCCGTA ATCATGGTCATGCTGCCAGGTGGAGGAGGGCA-3' (SEQ ID Nr: 37).

Der "lange Arm" aus dem *Beer*-Gen-Locus wurde durch Amplifikation eines 6,1 kb-Fragments aus dem BAC-Klon 15G5 mit Primern erstellt, die auch die selten-schneidenden Restriktionsenzymstellen SgrAI, FseI, AscI und PacI einführen. Im genaueren war die Sequenz des Sinn-Primers war 5'-ATTACCACCGGTGACACCC-GCTTCCTGACAG-3' (SEQ ID Nr: 38); die Sequenz des Antisinn-Primers war 5'-ATTACTTAATTAACATGGCGCGCCAT ATGGCCGGCCCCTAATTGCGGCGCATCGTTAATT-3' (SEQ ID Nr: 39). Das resultierende PCR-Produkt wurde als ein Zwischenschritt in den TA-Vektor (Invitrogen, Carlsbad, CA) kloniert.

Das Maus-*Beer*-Gen-Targeting-Konstrukt schloss auch einen zweiten selektierbaren Marker ein, das *Herpes-Simplex-Virus-1-Thymidinkinase-Gen* (HSVTK) unter der Steuerung des Rous-Sarkom-Virus-'Long-Terminal-Repeat'-Elements (RSV-LTR). Die Expression dieses Gens macht Säugerzellen empfindlich (und nicht-lebensfähig) gegenüber Gancyclovir; dies ist daher ein bequemer Weg gegen Neomycin-resistente Zellen zu selektieren, in welchen das Konstrukt durch ein nicht-homologes Ereignis integriert hat (U.S.-Patent 5 464 764). Die RSVLTR-HSVTK-Kassette wurde aus pPS1337 unter Verwendung von Primern amplifiziert, die anschließendes Klonieren in die FseI- und AscI-Stellen des "lang-Arm"-TA-Vektorplasmids erlauben. Für diese PCR war die Sequenz des Sinn-Primers 5'-ATTACGGCCGGCCGCAAAGGAATTCAAGA TCTGA-3' (SEQ ID Nr: 40); die Sequenz des Antisinn-Primers war 5'-ATTACGGCGCGCCCCTCACAGGCCGCACCCAGCT-3' (SEQ ID Nr: 41).

Der letzte Schritt im Konstruieren des Targeting-Vektors schloss das Klonieren des 8,8 kb großen SgrAI-AscI-Fragments, welches das "lang-Arm"- und das RSVLTR-HSVTK-Gen enthielt, in die SgrAI- und AscI-Stellen des pSP72-"kurz-Arm"-βgal-

PGKneo-Plasmids ein. Dieser Targeting-Vektor wurde durch Verdau mit entweder *Ascl* oder *Pacl* vor der Elektroporation in ES-Zellen linearisiert.

BEISPIEL 10

ANTISINN-VERMITTELTE BEER-INKTIVIERUNG

17-Nukleotid-Antisinn-Oligonukleotide werden in einem überlappenden Format hergestellt, und zwar in solcher Weise, dass das 5'-Ende des ersten Oligonukleotids das Translations-initiiierende AUG des Beer-Transkripts überlappt, und die 5'-Enden aufeinanderfolgender Oligonukleotide in 5-Nukleotid-Zuwächsen vorlagen, wobei man in der 5'-Richtung (bis zu 50 Nukleotide weit) in Bezug zum Beer-AUG vorgeht. Korrespondierende Kontroll-Oligonukleotide wurden unter Verwendung äquivalenter Basen-Zusammensetzung entworfen und erstellt, aber in der Sequenz umverteilt, um jedwede signifikante Hybridisierung an die codierende mRNA zu inhibieren. Die Zuführung von Reagentien in das zelluläre Testsystem wurde durch kationische Lipid-Zuführung vorgenommen (P.L. Felgner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413, 1987). 2 µg Antisinn-Oligonukleotid wurde zu 100 µl reduziertem Serum-Medium (Opti-MEM I reduziertes Serum-Medium; Life Technologies, Gaithersburg MD) zugesetzt, und dies wurde mit Lipofectin-Reagenz (6 µl) (Life Technologies, Gaithersburg MD) in den 100 µl reduziertem Serum-Medium gemischt. Diese werden gemischt, während 30 Minuten bei Raumtemperatur komplexieren gelassen, und die Mischung wurde zu vorher angesetzten MC3T3E21- oder KS483-Zellen zugegeben. Diese Zellen wurden kultiviert und die mRNA gewonnen. Die Beer-mRNA wurde unter Verwendung von RT-PCR in Verbindung mit Beer-spezifischen Primern verfolgt. Zusätzlich wurden separate experimentelle Vertiefungen erfasst und die Protein-spiegel durch Western-Blot-Verfahren charakterisiert, die in Beispiel 4 beschrieben wurden. Die Zellen wurden geerntet, in Lysis-Puffer (50 mM Tris pH 7,5, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS) resuspendiert und das lösliche Protein gesammelt. Dieses Material wurde auf eine denaturierende 10-20%-Gradienten-SDS-PAGE aufgetragen. Die getrennten Proteine wurden auf Nitrocellulose transferiert und der Western-Blot wurde wie oben durchgeführt, unter Verwendung der beschriebenen Antikörperreagentien. Parallel dazu wurden die Kontroll-Oligonukleotide in identische Kulturen zugesetzt, und die experimentellen Operationen wurden wiederholt. Abnahme in Beer-mRNA- oder Protein-Spiegeln werden als signifikant betrachtet,

wenn die Behandlung mit dem Antisinn-Oligonukleotid in beiden Fällen zu einer 50%-Veränderung führt, verglichen mit dem Kontroll-durchmischten (control scrambled) Oligonukleotid. Diese Methodik erlaubt eine selektive Geninaktivierung und anschließende Phänotyp-Charakterisierung der mineralisierten Knötchen im Gewebe-Kulturmodell.

SEQUENZEN

Sequenz ID Nr. 1: Human-BEER-cDNA (Region kompletter Codierung plus 5'- und 3'-UTRs)

```
AGAGCCTGTGCTACTGGPAGGTGGCGTGCCTCCTCTGGCTGTTACCATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTGTCTGC
CTGCTGTTACACACAGCCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCAGGGGTGGCAGGCGTTCCAGAPTSATGCCACGGAAATCATCCG
CGAGCTCGGAGATACCCCGAGCCTCCACCGAGCTCGAGAAACACACAGACCTGAAACCGGGGGAGAACGGGGGGCGGC
CTCCCCAGCCACCCCTTTGAGACCAAAAGAGTGTCCGAGTACAGCTGCCGGGAGCTGCACTTCAACCCGCTACGTAACCGAT
GGCCCTGTGGCGAGGCCAAGCCGTTCAACCGAGCTGCTGTCTCCGGCCAGTCCGGCCGGCGCCGCTGCTGCCCAACGC
CATCGGCGGGGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCCGACTTCCGCTGCATCCCGAGCCGCTACCGGCGCGCAAGCGGTGC
AGCTGCTGTGTCCGGTGGTGAAGCGCCGCGCGCGCGCAAGGTGCSCCTGCTGGCCCTGTCGAAGTGCABGCCTCACCC
CGCTTCCACAAACAGTCCGAGCTCAAGACTTCCGGACCGAGGCCCTCCGGCCGAGAAAGTCCGGPAGCCGGGGCCCGG
CGCCCGGAGGCGCAAGCCAAACAGGCCGAGCTGGAGAACCCCTACTAGAGCCCGCCCGCCGCTCCCAACGGCGGGC
GGCCCGGGCTGAAACCGGGGCCCACTTTCTGTCTCTGCGGCTGGTTTGATTGTTTATATTTTATTGTAATGGCCTGC
AAACCCAGGGCAAGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCGGCAAGGCCGCCCTCAGCCCGCCAGCTG
AGGGGTCCCAAGGGGCAAGGGAGGGAAATTGAGAGTCAACAGACTGAGCCAGGAGCCCGCCCTCTGGGGCCGCTACCT
TTGCTGCTCCCACTTCCAGAGGAGGCAAGAAATGGAAAGCAATTTTCAACCCGCTGGGGTTTTAAGGGAGCGGTGTGGAGTGG
GAAAGTCCAGGGACTGGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTCACCCCTTGCACCTCGCTGCCCATCAGAAAGCCTGAGGGCTGC
CCAGAGCAACAGACTGGGGGCAACTGTAGATGTGGTTTCTAGTCCCTGGCTCTGCCACTCACTTGTCTGTGTAACCTTGAAC
TACAGATTCTCCTTCCGGACCTCAATTTCCACTTTGTAAAATGAGGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT
TGSCATATGATTCCPAGGACTCCAGTGCCTTTTGAATGGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGAGAAATGAAATG
CAGTTGCATTGATTGAGTCCAGGCTCACTTCCAGAAATTCAGAGTGTGTGATGCTCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAAAAA
CAAACAGAAAAAAGTAAGAGTCTATTTATGGCTGACATATTTACGGCTGACAAACTCCTGGAAAGAGCTATGCTG
CTTCCAGGCTGGCTTCCCGGATGTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAGGAATACATCATCCATTGGGGTAGA
AAAGGAGAGGTCAGAGGTTGGTGGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCAACTTCCCAAGAGCAGCATCCCTCCCGG
ACCCATAGCCATGTTTTAAGTCACTTCCGAGAGAAAGTGAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGCAGGCCCGAGGGAGC
AGCCATCACAACTCACAGACCAGCACATCCCTTTGAGACACCGCCTTCTGCCACCCTCACGGACACATTTCTGCCT
AGAAAACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAABAGAATATTATTGGGGGAAPACTACAAGT
GCTGTACATATGCTGAGAACTGCAGAGCATAAAGCTGCCACCCAAABATCTTTTGAABATCATTTCCAGACAACTC
TACTTTCTGTAGTTTTTAAATTCCTAAAANAAAGTTTTAAACGAGGCGCATGACATATGAAAGCCCTGCAAGACT
GGTGTTTTTTTGGCAATCTTCCAGTGGGACTTGTCCACAGAAATGAAAGTGTGGTTTTTAAAGAGTTAAGTTACAT
ATTTATTTCTCACTAAGTTATTTATGCAAAAGTTTTCTTGTAGAGAATGACAAATGTAATATTGCTTTATGAATTA
CAGTCTGTTCTTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAAGCAATGAATCATGACCGAAAG
```

Sequenz ID Nr. 2: Human-BEER-cDNA (komplette Sequenz)

MQLELALCLVCLLVHTAFRVVEGQSQRFKNDAT E I I F E L J E Y F E E F E E L E N N K T H N R A E N G G R E F H H F F E T K D V S E Y S C
RELHFTRYVTDGEFCRSAPVTELVCSGQCGFARLLENAIGRGKMWRFSGDFRCIFDRYRAQRVQLLCPGGEAFERARIVR
LVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGTEAARPQKGRKPRPRARSAKANQAELENAY

Sequenz ID Nr. 3: Human-BEER-cDNA, enthaltend Sclerosteosis-Nicht-Sinn-Mutation

AAGCCCTGTGCTACTGGAGGTGGCGTGCCTCCTCTGECTGGTACCACTGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTCCTCTGC
CTGCTGCTACACACAGCCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCTAGGGGTGGCAGGCGTTCAAGAAATGATGCCACGGAAATCATCC:
CGAGCTGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAGAACACACAGACCATGAACCGGGGGGAGAACCGGAGGGGGG
CTCCCCACACCCCTTTGAGACCAAGAGCGTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACCTTCAACCCCTACCTGACCGAT
GGGCCGTGCCGACGGCCAGGCCGTACCCGAGCTGTGTGCTCCGGCCAGTGGCGCCCGGGCGGCTGCTGCCAACGC
CATCGGCCGGCCAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCCGACTCCGCTGCATCCCGACCGCTACCGCGCGCAGCGGTGC
AUCTGCTGTGTCCCGTSGTGGAGCGCCGGCGCGGCGPAGGTGGGCTGCTGGCTCCTGCAAGTGCAGCGCCTCC
CGCTTCCACAACCACTCGGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGGCCGCTCGGCCGAGAGGGCCGGAAGCCCGGGCCCG
CGCCCGGAGCGCCAGCCAGCCAGCTGGAGAACGCGCTACTAGAGCCCGCCCGCCCTCCCCACCGCGCGG
GCCCCGCCCCGAAACCGGGCCCCACATTTCTGTCTCTGCGGTGGTTTGATTGTTTATATTTTATTGTAATGCTGC
AACCCAGGGCAGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCCGGCPAGGCCCCCTCAGCCCGCCAGCTG
AGGGGTCCACCGGGCAGGGGAGGGAAATTGAGAGTCCACAGACTGAGCCACGAGCCCGGCTCTGGGGCCGCTACT
TTGCTGTGCCACTTCAGAGCGAGGCGAATGGAAGCATTTTACCCGCTGGGTTTTAAAGGAGCGCTGTGGAGTGG
GAAAGTCCAGGGACTGGTTAAGAPAGTTGGATAAGATTCCCCCTTGCACCTCGCTGCCCTCAGAAAGCCTGAGGCGTGC
CCAGAGCACAAAGACTGGGGCAACTGTAGATGTGGTTCTAGTCTGGCTCTGCCACTACTTGTGTGTAACTTGAAC
TACACAATTTCTCCTTCGGGACCTCPATTTCCACTTTGTAAAATGAGGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT
TGGCATATGATTCCAAGGACTCCAGTGCCTTTTGAATGGGCAGAGGTGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGAAATGAATG
CAGTTGCATTGATTCAGTGCCAAGGTCACTTCCAGAATTCAGAGTTGTGATGCTCTTCTGACAGCCAAAGATGAAAA
CAACACGAAAAAAGTAAAGAGTCTATTTATGGCTGACATATTTACGGCTGACAACTCCTGGAGGAGCTATGCTG
CTTCCAGCCTGGCTTCCCGGATGTTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAAGAAATAACATCATCCATTGGGGTAGA
AAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGGGATAGAAATCCATCCGCCCCACTTCCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCCG
ACCCATAGCCATGTTTTAAAGTCACTTCCGAGAGAGTGAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGCAGGCCGAGGGAGC
AGCCATCACAAACTCACAGACCAGCACATCCCTTTTGAACACCGGCTCTGCCCCAACCCTCACGGACACATTTCTGCCT
AGAAAACAGCTTCTTACTGCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAGAAATATTATTGGGGGAAAACTACAAGT
GCTGTACATATGCTGAGAACTGCAGAGCATAATAGCTGCCACCCCAAATCTTTTGAAGAAATCATTTCCAGACACCTC

TTACTTTCTGTGTAGTTTTTAAATTGTTAATAAATAAAGTTTTTAAACAGAAAGCACATAGCATATGAAAAGCCTGCAGZACT
GGTCTGTTTTTTTGGCAATTCCTTCCACGTGGGACTTGTCCACAAGAAATGAAAAGTAGTGGTTTTTAAAGAGTTAAGTTACAT
ATTTATTTTCTCACTTAAGTTATTTATGCAAAAGTTTTTCTTGTAGAGAATGACAATGTTAATATTCCTTTATGAAATTA
CRGTCTGTTCTTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAAGACAAATGAAATCATGACCGAAG

Sequenz ID Nr. 4: Trunkiertes Human-BEER-Protein von Sclerosteosis

HQLFLALCLVCLLVHTAERVVEG*

Sequenz ID Nr. 5: Human-BEER-cDNA, codierend Protein-Variante (V10I)

AGAGCCTGTGCTACTGGAGGTTGGCGTGGCCTCCTCTGGCTGCTACCATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTCATCTGC
CTGCTGGTACACACAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCAGGGGTGGCAGGGCTTCAAGAAATGRTGCCACGGAAATCATCCG
CGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAGAACACAAAGACCATGAACCGGGCCGAGAGACGGAGGGCGGC
CTCCCCACCAACCCCTTTGAGACCAAGACGTTGTCGAGTACAGCTGCCGGAGCTGCACCTTACCCGGTACGTGACCGAT
GGGCCGTGCCGCAGCGCCAAGCCGGTCAACGAGCTGGTGTGCTCCGSCCAGTGGGGCCCGGGCCGGCTGCTGCCAAGSC
CATCGGCCCGGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCGACTTCCGCTGCATCCCGACCGCTACCGGGCGCAGCGCTGC
AGCTGCTGTGTCCCGGTGGTGAGGGCCGGCGCCGGCAAGGTGGCCCTGTTGGCTGTGCAAGTGCAGCGCCTCAC
CGCTTCCACAAACAGTCCGAGCTCAGGACTTCCGGACCGAGGGCCGCTCGGCAGCAGAAGGGCCGGAAAGCGGGCCCGG
CGCCCGSAGCGCCAAGCCAACCCAGGCGAGCTGAGAAACCGCTACTAGAGCCCGCCCGGCCCTCCCCACCGGGCCSC
GCCCGGGCCCTGAACCGCGGCCCACTTTCTGTCTCTGCGCGTGGTTTTGATTGTTTTATTTTCATTGTAATGCCCTGC
AAGCCAGGGCAGGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAAATCCCGGGCCCGGCAAGGCCCCCTCAGCCCGCCAGCTG
AGGGGTCCCACGGGGCAGGGGAGGGAATTGAGAGTACACAGACACTGAGCCACGCAAGCCCGCCCTCTGGGGCCGCTACCT
TTGCTGCTCCCACTTCAAGAGGAGGCAAAATGGAAGCATTTTCACCGCCCTGGGGTTTTAAGGGAGCGGTGTGGGAGTGG
GAAAGTCCAGGGACTGGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTCCCCCTTGCACCTCGCTGCCCATCAGAAAGCCTGAGGCGTGC
CCAGAGCACAAAGACTGGGGGCAACTGTAGATGTGGTTTTCTAGTCCCTGGCTCTGCCACTAACTTGTGTAACTTGAAC
TACACAAATTCCTTCGGGACCTCAATTTCCACTTTGTAAATGAGGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT
TGGCATATGATTCCAGGACTCCAGTCCCTTTTCAAATGCCCGAGAGTGGAGAAAGAGAGAGAAAGAGAGAGAAATGAATG
CAGTTGCATTGATTCAAGTCCAAAGGTCACTTCCAGAAATTCAGAGTTGTGATGCTCTCTCTGACAGCCAAAGATGAAA
CAAAACAGAAABAAAAGTAAGAGTCTATTTATGGCTGACATATTTACGGCTGACAAACTCCTGGAAGAGCTATGCTG
CTTCCCAGCCTGGCTTCCCGGATGTTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAAGAAATAAATCATCCATTGGGGTAGA
AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCPACTTCCCAAAGAGCAGCATCCCTCCCGG
ACCCATAGCCATGTTTTAAAGTCACTTCCGAGAGAAAGTGAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGCAGGGCCGAGGGAGC

AGCCATCACAAGCTACAGACGAGCAGATCCCTTTTGAGACACCGCCTTCTGCCCAOCCACTCAGGGACACATTTCTGGCT
A5AABACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAABAGAATATTATTGGGGGAAAAGCTACAGT
GCTGTACATATGCTGAGAACTGCAGAGCATAATAGCTGCCACCCAAAATCTTTTTGAAAATCATTTCCAGACACCTC
TTACTTTCTGTGTAGTTTTTAATTGTTAABABAAAAAAGTTTTAABACAGAGCACATGACATATGAAAAGCCTGCGGGACT
GCTCGTTTTTTTGGCAATTCTTCCAGGTGGGACTTGTCCACAGAAATGAAAGTAGTGGTTTTTAAAGAGTTAAGTTACAT
ATTTATTTTCTCACTTAAGTTATTTATGCCAAAGTTTTTCTTGTAGAGAAATGACAAATGTTAATATTGCTTTATGAATTA
GARTCTGTCTTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAAGACATGAATCATGACCGAAG

Sequenz ID Nr. 6: Human-BEER-Protein-Variante (V10I)

IQLEPLALCLICLLVHTAFRVVEGGWQAFKNDATETIIRELGEYFEFFEELENNKTMNRPEMGGREFPHHFEETKDVSEYSC
RELHFTRYVTDGEFCSAKFVTELVCSGQCGEARLLFNATGRGKWRFSSEDFRCIFDRYRAQRVQLLCPGGEAFRARKVR
LVASCKKRLTRFHHQSELKDFGTEAARFQGRKREFRARSAMHQALEHRY

Sequenz ID Nr. 7: Human-BEER-cDNA, codierend Protein-Variante (P38R)

AGAGCCTGTGCTACTGSAAGGTGGCGTGCCCTCCTCTGGCTGGTACCATGCAGCTCCCCTGGCCCTGTGTCTCGTCTGC
CTGCTGGTACACACAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCAGGSGTGGCAGGCGTTCAGAAATGATGCCACGGAATCATCCG
CGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAGACACACAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGGGC
CTCCCCACCACCCCTTTGAGACCAAAGAGCTGTCCGAGTACAGCTGCCGGAGCTGCACCTTACCCGCTACGTGACCGAT
GGCCCGTGCUCUAGCGCCAGCCGGTCAACCGAGCTGGTGTCTCCGGCCAGTGGGGCCGGCGCCCTGCTGCCCAACGC
CATCGGCCGGCAAGTGGTGGCGACCTAGTGGGCCCGACTTCCGCTGCATCCCCGACCGCTACCGCGCGAGCGCGTGC
AGCTGCTGTGTCCCGTGGTGAAGCGCCGCGCGCGCPAGGTGCCCTGGTGGCTCGTGCAAGTGCAAGCGCCTCACC
CGCTTCCACAACCAAGTCCGAGCTCAAGGACTTCGGGACCGAGGCGCTCGGCCGAGAAAGGGCCGGAAGCCGCGGCCCG
CGCCCGGAGCGCAAGAGCCAACCAAGCCGAGCTGGAGAACCCCTACTAGAGCCCGCCGCGCCCTCCCCACCGCGGGC
GCCCGGGCCCTGAACCGCGCCCCACATTTCTGTCTCTGCGCGTGGTTTGAATGTTTATATTTCAATGTAAATGCCTGC
AACCAGGGCAGGGGGCTGAGACCTTCCAGGCCCTGAGGAATCCCGGGCGCCGGCPAGSCCCCCTCAGCCCGCCAGCTG
AGGGTCCCACGGGGCAGGGGAGGGAATTGAGAGTCAACAGACACTGAGCCACGCAGCCCGCCCTCTGGGGCCCGCTACCT
TTGCTGGTCCCACTTCAGAGGAGGCAGAAATGGAAGCATTTTCAACCGCCCTGGGTTTTAAGGGAGCGGTGTGGGAGTGG
GAAAGTCCAGGACTGGTTAAGAAAGTTGGATAAGATTCCCCCTGCACCTCGCTGCCCATCAGAAAGCCTGAGGGCTGC
CCAGAGCACAAGACTGGGGCAACTGTAGATGTGTTTTCTAGTCTGGCTCTGCCACTA ACTTGCTGTGTAACTTGAAC
TACACAACTTCTCTCCGGACCTCAATTTCCACTTTGTAATAAGAGGTGGAGGTGGGAATAGGATCTCGAGGAGACTAT
TGSCATATGATTCAPAGGACTCCAGTGCCTTTTGAATGGGAGAGGTSAGAGAGAGAGAGAGAAAGAGAGAGAATGAATG

CAGTTGCATTGATTTCAGTGCACAGCTCCTCCAGATTTCAGAGTTGTGATGCTCTCTTTCTGACAGCCAAAGATGAA
CAGCAGAAABAAAAAGTAAAGCTCTATTTTATGGCTGACATATTTACGGCTGACCAACTCTGGAGAAAGCTATGCTG
CTTCCCAGCCTGGCTTCCCCGGATCTTTGGCTACCTCCACCCCTCCATCTCAAGAAATAACATCATCCATTGGGGTAGA
AAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGTGGAGGGGATAGAAATCACATCGGCCCCACTTCCCAAGAGCAGCARTCCCTCCCCG
ACCCCTAGCCATGTTTTAAAGTCCCTTCCGAAGGAAAGTGAAGGTTCAAGGCACTGGCCTTGCAGGCCCGAGGGAGC
AGCCATCACAAATCACAGCCAGCAGCTCCCTTTTGAGACACCGCCTTCTGCCACCACCTCAGGGACACATTTCTGCT
AGAAACAGCTTCTTACTGCTCTTTCATGTGATGGCATATCTTACACTAAAGAAATATTATTGGGGGAAAACTACAGT
GCTGTACATATGCTGAGAACTGCAAGCATAATAGCTGCCACCCAAABAACTTTTTTGAAATCATTTCCAGACAACCTC
TTACTTTCTGTAGTTTTTAAATSTTAAAAAAGTTTAAACAGAGCAGCATGACATATGAAAGCCTGCAGGACT
GGTGGTTTTTTGGCAATTCTTCCAGCTGGGACTTGTCCACAGAAATGAAAGTASTGGTTTTTAAAGAGTTAAGTTACAT
ATTTATTTCTCACTTAAGTTATTTCATGCCAAAGTTTTCTGTAGAGAAATGACATGTTAATATTGCTTTATGAATTA
CAGTCTGTTCTTCCAGAGTCCAGAGACATTGTTAATAAAGACAATGAATCATGACCGAAAAG

Sequenz ID Nr. 8: Human-BEER-Protein-Variante (P38R)

MQLFLALCLVCLLVHTAFRVVGGQGHQAFKNDATETIRELGEYEEFEELENNKTMNRPEHGGRPEHHFFETKDYSEYEC
RELHFTRYVTDGFCRSAKEVTELVCSGQCGFARLLLEHAIGRGRKWNRFSGEDFRCIFDRYRAQRVQLLCEFGGEAERARKYR
LVASCKCKRLTRFHHQSELKDFGTEAFARFQKGRKERFRARSANANQAELENAY

Sequenz ID Nr. 9: Meerkatzen (Vervet)-BEER-cDNA (komplette codierende Region)

ATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTTGTCTGCTGCTGCTGCTACACCGCAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCAGGGGTGGCA
GGCCTTCAAGAAATGATGCCACGGAAATCATCCCCGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAGAAACACA
AGACCATGAAACCGGGCGGAGAAATGGAGGGCGGCCCTCCCCACCAACCCCTTTGAGACCAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGC
CGAGAGCTGCACCTTACCCCGCTACGTGACCGAAGGGCCGTGCCCGAGCGCCAAAGCCAGTCAACCGAGTTGGTGTGCTCCGG
CCAGTGCGGCCCGCAAGCCTGTGCTGCCAAGCGCATCGGCCCGGCCAAGTGGTGGCGCCCGAGTGGGCCCGAATTCCGCT
GCATCCCCGACCGCTACCGCGCGCAGCGTGTGCAGCTGCTGTGCTCCCGTGGTGGCGCGCCGCGCGCGCAAGTGCGC
CTAGTGGCTTGGTGCAGTGCAGCCCTCAGCCGCTCCACAGCCAGTGGAGCCTCAAGGACTTCCGTCCCGAGGCCGC
TCGGCCGCAGAAGGGCCGGAAGCGCGGCCCGCCCGCGGGGGCCAAAGCCATCAGGCCGAGCTGGAGAACGCCCTACT
AG

Sequenz ID Nr. 10: Meerkatzen-BEER-Protein (komplette Sequenz)

MQLELA.LCLVCLLVHAA.FRVVGGQGWQAFKNDATFIIIFELGEYFEEFEELENNKTHNRÆENGGREFEHHFFETKDVSEYSC
RELHETRYVTDGFCRSAPKVFTELVCSGGQGFARLLENFAIGRGMWRFEEDEFRCIEDRYRAQRVQLLCEGGAAFRARHVR
LVASCKCKRLTRFHHQSELKDFGFETARFQKGRKPRFGRSAPKANHQAELENAY

Sequenz ID Nr. 11: Maus-BEER-cDNA (nur codierende Region)

ATGCAGCCCTCACTAGCCCGCTGCCTCATCTGCCTACTTGTGCACCGCTTCTTCTCTGTGTGAGAGGGCCAGGGGTGACA
AGCCTTCAGGAATGATGCCACAGAGGTCATCCCAGGGCTTGGAGAGTACCCCGRSCCTCCTCCTGAGAAACAACAGACCA
TGAACCGGGCGGAGAAATGGAGGCGAGCCTCCCCACCATCCCTATGACGGCCAAAGGTGTGTCCGAGTACAGCTGCCGGGAG
CTGCCTACACCCCGCTTCTGTACAGAGCGCCCATGCCCGAGGSCCAAGCGGGTACCGAGTTGTTGTGTGTCCGGCCAGTE
CGGCCCGGGCGGGCTGCTGCCCAAGCCPTCCGGCGGCTGAAGTGGTGGCGCCCGACGGACCGGATTTCCGCTGCATCC
CGGATCGCTACCGCGGCGAGCGGGTGCAGCTGCTGTGCCCGGGGGCGGGCGCCGGCTCGCGCAAGGTGCTGTGGTG
GCCTCGTGGAAAGTGCAAGCGCCTCACCCGCTTCCACAACCAAGTCCGAGCTCAAGGACTTCGGGCGGGAGACCCGCGGGCC
GCAGAAAGGTCGCPAGCCCGGGCCCGGGCCCGGGAGCCAPAGCCAPCCAGGGGAGCTGGAGAACCGCTACTAGAG

Sequenz ID Nr. 12: Maus-BEER-Protein (komplette Sequenz)

MQESLAEFLICLLLVHAA.FCAVEGGQGWQAFRNDATFVIIFGLGEYFEEFEEENNQTHNRÆENGGREFEHHFYDAKDVSEYSCRE
LHYTRFLTDGFCRSAPKVFTELVCSGGQGFARLLENFAIGRVMWRFENGFDEFRCIEDRYRAQRVQLLCEGGAAFRSRKVLV
ASCKCKRLTRFHHQSELKDFGFETARFQKGRKPRFGRSAPKANHQAELENAY

Sequenz ID Nr. 13: Ratten-BEER-cDNA (vollständige codierende Region plus 5'-UTR)

GAGGACCGAGTGCCTTCTCCTCCTTCTGGCACCATGCAGCTCTCACTAGCCCCCTTGCCTTGCCTGCCTGCTTGTACATGCA
GCCTTCGTGTGCTGTGGAGAGCCAGGGGTGGCAAGCCTTCAAGAATGATGCCACAGAAATCATCCCGGACTCAGAGAGTA
CCCAGAGCCTCCTCAGGAAGCTAGAGAACCAACAGACCATGAAACCGGGCCGAGAACGGAGGCAGAACCCCCACCATCCTT
ATGACACCAAAGACGTGTCCGAGTACAGCTGCCGCGAGCTGCACTACACCCGCTTCTGTGACCGACCGCCCGTGCAGCAGT
GCCAAGCCGGTCAACCGATTGGTGTGCTCGGGCCAGTCCGGCCCCCGCGGGCTGCTGCCCAACGCCATCGGGCGCGTGAA
GTGGTGGCGCCCGAACCGACCCGACTTCCGCTGCATCCCGAATCGCTACCGCGCGCAGCGGGTGCAGCTGCTGTGCCCCG
GCGGCGCGGGCGCGCTCGCGCAAGGTGCGTCTGGTGGCCTCGTGCAGTGCAGCGCCTCACCCCTTCCACAACCAAG

TCGGAGCTCAAGGACTTCGGACCTGAGACCGCGCGCCGCCAGAAAGGCTGSCAAGCCGCGGCCCGCGCCCGGGGAATGCA
AGCCAAACCAGCGCGGAGCTGGAGAACCGCCTACTAG

Sequenz ID Nr. 14: Ratten-BEER-Protein (komplette Sequenz)

MDLSLAECLACLLVHRAAFVAVESQSMQAFKRDATLIEGLREYEEFQOLEMNIQTMIRAEHGGRFPHHFYDTKDUSEFAT
RELHYTRFVYTDSECRSAKEVTELVCSGGQGFARLLFNAIGRVKWREHGFDFRCIEDRYRAQRVQLLCEGGAAERSESRK
LVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGFEETARFQNGRKFREFRARGAKAHQAELENAY

Sequenz ID Nr. 15: Rinder-BEER-cDNA (partielle codierende Sequenz)

AGAAATGATGAGAGAAATATCATCCCCGAGCTGGGCGAGTACCCCGAGCCTCTGCCAGAGCTGAACAACAAGACCATGAAC
CGAATGAAATAAGGGAGGAGACCTCCCCACACCCCTTTGAGACCPAAGACCGCCTCCGASTACAGCTGCCGGGAGCTGCA
ATTCAAGCCCTACCTGACCGATGGGCCGTGCGCAGCACCAGCCGGTCACCGAGCTGGTGTGCTCGGGCCAGTGGGCCC
CGAATGAGCCCTGCTGCCCAACGCCATCGGCCCGGGCAASTGGTGGCGCCCAAGCGGGCCCGACTTCGCTGCATCCCGAG
CCTTACCGCGCCAGCGGGTGACGCTGTTGTGTCTCTGGCGGGCGGGCGCGCGCGCGGCAAGSTSCGCCTGGTGGCTC
GTAATGATGAGCGGCTCACTCGCTTCCACAACCGTCCGAGCTCAAGGACTTCGGGCCCGAGGGCCGCGGGCCGCAAA
CGGGCCGGAAGCTGCGGCCCGCGCCCGGGGCACCAAGCCAGCCGGGCGGA

Sequenz ID Nr. 16: Rinder-BEER-Protein (partielle Sequenz - - Signalsequenz und die letzten 6 Reste fehlen)

MDATLIEGLREYEEFLEELNKTMINRAENGGRFPHHFETKDAEYSCRELHETRYVTDGFCRSKAEVTELVCSGGQGF
ARLLFNAIAGGKWRFSGFDFRCIEDRYRAQRVQLLCEGGAAERARKVRLVASCKCKRLTRFHNQSELKDFGFEAAREFQT
GRNLRERARGTKASRA

Sequenz ID Nr. 17: MluI – AvIII-Restriktionsfragment, verwendet zur Herstellung vom Maus-BEER-Transgen

CGCSTTTTGGTGAGCAGCAATATTGCGCTTCGATGAGCCTTGGCGTTGAGATTGATACCTCTGCTGCACAAAAGGCATC

GACCGAGCTGGACCAGCGCATTGGTGACACCGTCTCCTTGGAACTTATTGCGCATGGAGTGTCAATTCATCAGGACNGCC
TGATCGCAATGGTGCATCCACGCAGCGGCAATCGAAAACCCCTCAGCCGCTGACCAATATCTACAACATCAGCCCTGGT
ATCCTGCGTGTATGAGCCAGCGCAGAACAGGTAACCGTCACTGCGGATAAATTCAAAAGTTAAACCTGGTGTGATACCAA
CATTGAAACGTTGATCGAAAACGGCGTGAAPACGGCTGCTGAATGTGCGGGCGCTGGATGTCACAAGCAATGGCAGCAG
ACAAGAAAGCGATGGATGAACTGGCTTCTATGTCCGCAAGGCCATCATGATGGAATGTTTCCCGGGTGGTGTATCTGG
CAGCAGTGGCGTGGATAGTATGCAATTGATAATTATTATCATTTGCGGCTCCTTTCCGGCGATCCCGCTTGTACGGGGC
GGCGACCTCGCGGGTTTTGCTATTTATGAAAATTTTCCGGTTTAAAGCGTTTTCCGTTCTTCTTGTGATAACTTAATGT
TTTTATTTAAAATACCCCTCTGAAAAGAAAAGGAAACGACAGGTGCTGAAGCGAGCTTTTTGCGCTCTGTGTTTTCTTTC
TCTGTTTTTGTCCGTGGATGAAACATGGAGGTCACAAAPAGCAGAGCTTATCGATGATAAGCGGTCAAAACATGAGAAAT
TCGGCGGCGCATAAACGACTCACTATAGGATCGAGGCTACTCCCGGCGCATGAAGCGGAGGAGCTGGCTCCGCGATG
CCAGAGACGCCCCCAACCCCAAGTGCCTGACCTCAGCCTCTACCAAGCTCTGGCTTGGGCTTGGCGGGGTCAAGGC
TACCAGTTCTCTTAAACAGGTGGCTGGGCTGTCTCTTGGCGCGCGTCACTGTGACAGCTGCCTAGTTCTGCAGTGAGGTC
ACCGTGGAAATGTCTGCTTCCGTTGCCATGGCAACGGGATGACGTTACAACTCTGGGTGTGGAGCTTTCTCTGCTGCTCA
GGAAATCCAAATACCCCTAAATACCCCTAGGAGAGGAGGTAGCTGAGCCAAAGCTTTCTGGCTTCTCCAGATAAGTTTG
ACTTAGATGGAAPAAAACAAATGATAAAGGCCGAGCCCTCTGAAAATTCCTCCTAATGCACCCTAGGAAATGTGTA
TATTATTGAGCTCGTATGTCTTATTTTAAAAGAAACTTTAGTCATGTTATTAAATAGAAATTTCTCAGCAGTGGGA
GAGAACCATATTAACACCAAGATAAAGTTGGCATGATCCACATTTGACGGAAGATCCAGCTTGGGTTTTCTGATGATGTG
AAGACCCCATTTATTAAGTCTTAAGCTCTGTTTTTGCACACTAGGAAGCGATGGCCGGATGGCTGAGGGGCTGTAGG
ATCTTTCAATGTCTTACATGTGTGTTTTCTGTCTGCACTAGGACCTGCTGCCTAGCCTGCAGCAGAGCCAGAGGGGTT
TCACATGATTAGTCTCAGACACTTGGGGGAGGTTGCATGTACTGCATCGCTTATTTCCATACGGAGCACCTACTATGTG
TCAAACACCATATGGTGTTCACCTCTCAGAACGGTGGTGGTCATCATGGTGCATTTGCTGACGGTTGGATTGGTGGTAGA
GAGCTGAGATATATGGACGCACTCTTCAGCATTCTGTCAACGTGGCTGTGCATTCTTGCTCCTGAGCAAGTGGCTAAACA
GACTCACAGGGTCAGCCTCCAGCTCAGTCGCTGCATAGTCTTAGGGAACCTCTCCAGTCTCCCTACCTCAACTATCCA
AGAAAGCCAGGGGGCTTGGCGGCTCAGGAGCCTGCTTGTGGGGGACAGGTTGTTGAGTTTTATCTGCAGTAGGTTGCCT
AGGCATAGTGTGAGGACTGATGGCTGCCTTGGAGAACACATCCTTTGCCCTCTATGCAATCTGACCTTGAATGGGGC
GCTGCTCAGCTGGGAGGATCAACTGCATACCTAAAGCCAAAGCCTAAAGCTTCTTCTCCACCTGAAACTCCTGGACCAAG
GGGCTTCCCGCACATCCTCTCAGGCCAGTGAGGGAGTCTGTGTGAGCTGCACCTTCCATCTCAGGGCGTGAGAGGCAGA
GGGAGGTGGGGGAGAGCCTTGCAGCTCTTCTCCATCTGGACAGCGCTCTGGCTCAGCAGCCATATGAGCACAGGC
ACATCCCCACCCACCCACCTTTCTGTCTGCGAGAATTTAGGCTCTGTTCAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
TATCCTCTCTTAGSTAGACAGGACTCTGCAGSAGACACTCCTTTGTAAGATACTGCACCTTAAATTTGGATGTTGTGAGG
GGAAAGCGAAGGGCCTCTTTGACCATTGAGTCAAGGTACCTTCTAACTCCCACTCGTATTGGGGGGCTACTCTAGTGCTAG
ACATGACAGAGCCCTCAGAACTGTAGTTAACAGTGTGGTAGGATGATCCTTCAGGGAGCCTGACATGTGACAGTTCCA
TTCTTACCCAGTCACCGAACATTTATTTCAGTACCTACCCCGTAACAGGCAACCGTAGCAGGTAAGTGGGGACGGACCACT
CAAPAGAACTGACAGACCGAAGCCTTGGAAATATAAACACCAAGCATCAGGCTCTGCCAACAGAACACTCTTTAACACTCA
GGCCCTTTAACACTCAGGACCCCAACCCCAACCCCAAGCAGTTGGCACTGCTATCCACATTTTACAGAGAGGAAAACCTA
GGCACAGGACGATATAAGTGGCTTGTAAAGCTTGTCTGCATGGTAATGGCAGGGCTGGATTGAGACCCAGACATTOCA

ACTCTAGGGTCTATTTTTCTTTTTCTCGTTGTTGGATCTGGGTCTTACTGGGTAACTCAGGCTAGCCTCAGACTCAT
ATCCTTCTCCCATGGCTTACGAGTGTAGGATTCCAGGTGTGTGCTACCATGTCTGACTCCCTGTAGCTTGTCTATACCA
TCCTCACAACATAGGAATTGTGATAGCAGCACACACACCGGAAGGAGCTGSGGAATCCACAGAGGGCTCCGAGGATG
ACAGGGGAATGCCTACACAGAGGTGGGAAGGAAGCAGAGGGGAACAGCATGGGCTGGGACACAGTCTATTTGGGG
AAGCTGCGGGTACCCTATATGCTGGGTGAGGGGAGAGGTCATGAGATGAGGCAGGAGAGGCCACAGCAGGAGCGGG
TAGGGCTCCTTATTGCCAGAGGGCTCGGATCTTCTCCTCTTCTCCTTCCGGGGCTGCTGTTCATTTCCACCACTG
CCTGCCATCCAGGTCTGTGGCTCAGGACATCACCCAGCTGCAGAACTGGGCATCACCCACGTCTGATGCTGCCAGG
GCAGTCTCCTTCATGCAGCTCAGACCCAGTGTAGCTTCTACGAGGATTTGTGGCATCACTACTTGGGCATCAAGGCCAT
GATAGGAGGAGTTCCACCTCAGTGTCTTACTTTGAAAGGGCCACAGATTTCAATTGACAGGGCTGGCCCATAAABATGG
TGAAGAGCTACATTCGGSCACCCATGGAGCTTAGCCCTCTGGAGCTGCTTCTCTCCAAAGAGGGCCCCACTTGAABAA
EFTTCCAGAAAGATCCCAABATATGCCACCAACTAGGGATTAAGTGTCTACTGTGAGGCCGATGGGGGCCACTGCATAT
AATCTGTGCATAGACATGACATGGAATAATAATTTTCAGACAGAGAGCAGGAGTTAAGTGTGCTGTCTCCTTTCCCTT
TAAATTGAGTGTGCCCATTTTTTTATTCATGTATGTGTATACATGTGTGTGCACACATGCCATAGGTTGTACTGAAACCC
ETCTTCAATGCTTCCCCACCCGCTTATTTTTTGAGGCAGGGTCTCTTCCCTGATCTCTGGGGCTCATTGGTTTTATCTAG
GCTGCTGGCCAGTGAAGCTCTGGAGTTCTGCTTTCTCTACCTCCCTAGCCCTGGGACTGCAGGGGCATGTGCTGGCCAG
GCTTTTATGTGCGCTTGGGGATCTGAACCTTAGGTCCTAGGCCTGAGCACCCTAAAGACTCTGCCACATGCCAGCCTGT
TTGAGCAAGTGAACCATTCGCCAGATTCGCCAGTGGGGCTTTCTTACCTTTTATTTGGCTAGGCATTCATGAGTGGTC
ACCTGGCCAGAGGAATGAGTGGCCAGGACTGGCTCAGGGTCAGCAGCCTAGAGATACTGGGTTAAGTCTTCTCTCCGCTC
GCTCCTCTCAGCCGACAGAGAAAGTAGGACTGAATGAGAGCTGGCTAATGTCAGACAGGACAGAGGCTGAGAGGGTC
ACAGGGCAGATGTACAGAGCAGACAGGTTCTCCCTCTGTGGGGAGGGGTGCCCCACTGCAGGTGTAAATTGCCTTCT
TTGTGCTCCATAGAGGCTTCTGGGTACACAGCAGCTTCCCTGTCTGCTGATTCCCAAGAGAACTCCCTACCCTGGA
CTTACAGAAAGTCTATTTGACTGGTGTAAAGGTTCAACAGCTTTGGCTCTTGGTGGACGGTGCATACTGCTGTATCAGCTC
AAGAGTCTATTCCAGGATGACACACACACACACACACACACACACACACAGCTAATTTTGATATGCCTTAACTA
GCTCAGTGAAGTGGCATTCTGACATCCCTGAAGTTAGCACACATTTCCCTCTGGTGTCTCTGGCTTAAACACCTTCTAA
ATCTATATTTTATCTTTGCTGCCCTGTACCTTCTGAGAAAGCCCTAGGGCCACTTCCCTTCGCACCTACATTGCTGGAT
GGTTTCTCTCCAGAGCTCTTAAATCTGATCCCTCTGCCCTCTGAGCCATGGGAACAGCCCAATAACTGAGTTAGACATAA
AAGCTCTCTAGCCAAACTTCAGCTAAATTTAGACAATAAATCTTACTGGTTGTGGAATCCTTAAGATTCTTCATGACC
TCCTTCACATGGCAGAGTATGAAGCTTTATTACAATGTTTATTGATCAACTAACTCATAAAAAGCCAGTGTCTTTTC
ACCTGCTCAAGAAAGGAACAAAATTCATCCTTAACTGATCTGTGCACCTTGCACATCCATACGAATATCTTAAGAGTAC
TAAGATTTTGGTTGTGAGAGTCAATGTTACAGAAATGTACAGCTTTGACAAGGTGCATCCTTGGGATGCCGAAGTGAACCT
GCTGTCCAGCCCTTACTTCTGAGGCTGTTTTGGAAGCAATCTCTGGAAAGCACTTTAGGAGGTAGGATGCTGGAAAC
AGCCGGTCACTTCAGCATCCCGATGACGAATCCCGTCAAAGCTGTACATTTCTGTAAACAGACTGGGAAGCTGCAGACTTT
AAGGCCAGGGCCCTATGGTCCCTCTTAAATCCCTGTACACCCAAACCCGAGCCCTTCTCCTCCAGCCGTTCTGTGCTTCTC
ACTCTGGATAGATGGAGAACACGGCCTTGCTAGTTAAAGGAGTGAAGGCTTACCCCTTCTCACATGGCAGTGGTTGGTCAT
CCTCATTCAGGGAACTCTGGGGCATTCTGCCTTTACTTCTCTTTTTGGACTACAGGGAATATATGCTGACTTGTTTTTGA
CCTTGTGTATGGGAGACTGGATCTTTGGTCTGGAATGTTTCTGCTAGTTTTTCCCATCCTTTGGCAACCCCTATCTA

TATCTTACCACTAGGCATAGTGGCCCTGCTTCTGGAGCCTGCCTTCAGGCTGGTTCTCGGGACCAATGTCCTGGTTTCT
CCCCAGCATATAGTGTTCACAGTGTTCACCTGCGGGTGGTTGCTGAACAAGCGGGGATTGCATCCCAGAGCTCCGGTGCC
TTGTGGGTACACTGCTAGATATAAATGGATACTGGCCTCTCTCTGACCACTTGACAGAGCTCTGGTGGCTTGTGGGTACAC
TGTAAAGATAAATAGATAGTGGCCTCTCTCTATCCACTTGCAGGACTCTAGGGACACAGGAATCCATTACTGAGAAAACC
AGGGCTAGGAGCAGGGAGGTAGCTGGGCAGCTGAAGTCTTGGGGACTAACCAATGAATACCAGAGTTTGGATCTCTAG
AATACTCTTAAATCTGGTGGGCAGAGTGGCCTGCCTGTAAATCCCAGAACTCGGGAGCGGGAGACAGGGAAATCATCAGA
GCAACTGGCTAACCAAGATAGCAAAACACTGAGCTCTGGCCTCTGTGAGAGATCCTGCCTTAAACATATAAGAGAGAGAA
TAAACATTGAAAGAGACAGTAAATGCCAATTTTAAAGCCCAACATGCACTGGACAAATGTGGCTTTGAAACACACATAT
GCCTCATGTGAACCAAGCATGCACTCGGGCTTATCACACACATAATTTGAAAGAGAGAGTGGAGAGAGAGAGTGCAC
ATTAGAGTTTACAGGAAAGTGTGAGTGGACACACCCATGCACACAGACATGTGTGCCAAGGGAGTAGGAAGGGAGCTGGG
TTTTGTATAGAGGGAGCCATCATGTGTCTTAAAGAAAGGGGTGTGAAGGGAGCCGTTGTGTGGCCTGGACTAGAGCAT
GGTTGTAACTGAGCATGCTCCCTGTGGAAACAGGAGGGTGGCCACCTGCAGAGGGTCCCACTGTCCAGCGGATCATGT
AAAAGCCCTGCTGAAGACTTTAGCTAATAGCCAGAGAGGAAAGTAAAGAAAGTGGGGGGACTCCCATCTCTGATGTAG
GAGGATCTGGGCAAGTAGAGGTGCTTTGAGGTAGAAAGAGGGTGCAGAGGAGATGCTCTTAAATCTGGSTCAACATTT
TCTTTCCAAATAATGCTGTGAGGAGGTGTAGGTGGTGGCCATTCACCTCACTCAGCAGAGGGGTGATGATGCCCGGTGA
TGTGGAAATGGCCAGCATCAACCTGGCTCTGGAAAGACTCCATCTTTACAGAGGAGAGTGGATCTGTGTATGGCCAG
CGGGGTACAGGTTGCTTGGGGCCCTGGGGACTCCTAGCACTGGGTGTGTTTATCGAGTGTCTTGTGTGCCAGGCAC
TGGCCTGGGGCTTTGTTTCTCTCTGTTTTGTTTTGTTTTTGGAGACAGACTCTTGTATGTATCCSTGTCAATCTTGG
AATCTCACTGCATAGCCAGGCTGGGGAGAGGGGGAGGGCAATAGGCCCTGTAAAGCAAGCCACTTCAGAGACTAGAC
TCCACCTTCCGAATGATGACAGGTCAAGAGCTGAGTTCGGGAGATTTTTTTTTCCAGCTGCCAGGTGGAGTGTGAGTGGC
AGCTAGCGGCAAGGATAGAGGGCGAGCTCCCTGTGCAGGAGAAATGCAAGCAAGAGATGGCAAGCCAGTGAATTAAGCT
TCTGTGTGGGAGCAAGTGGATGAAGAGAGAGGCTGGGCTTTCGCTCTGGGGGGGGGTGAGGGGTGGGATGAGGTGA
GAGGAGGGCAGCTCCCTGCAGTGTGATGAGATTTTTCTGACAGTGAACCTTTGGCCTCTCCCTCCCCACTTCCCTTCTT
TCCTTCTCCCAACATGCTTTCTTGTCTTGAAGAAATCTGAGTTTCCACTCACTGGTGTATGCAACGGAAACAGA
AGCCGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GTATGTGTGTCAAGTGGCAATGGCTCAATGCTCTCAGGAAAGTGGCAGGAAAGGAATTAAGCTGTAGGCTGAGGCAAGTGTGG
GATGCAGGAGAGAGGAGAGGAGGGATACCAGAGAAGGAAATTAAGGGAGCTACAAAGAGGGCATTCTTGGGTTGTGTGT
TGTGTGTGTGTGTATATTTATATTGTAATGGAAATACATTTCTTTTAAATAAATACTTAATCCATTTATTTATTTTATGTGCACGT
GTGTGTGCTGCATGAGTTCATGTGTGCCACGTGTGTGGGGAAACCTTGGAGGCCCAAGGGGGCATCTGATCCCTGG
AACTGGAGTTGGAGGAGGTTGTGAGTCCCTGACATGTTTGTCTGGGAACTGAAACCCCGGTCTATGCAGAGCAGGAAGT
GCAGTTATCTGCTGAGCCATCTCTCCAGTCTTGAATCCATTTCTTTAAATAACAGTGGCAGAGACATGATGGGATTTA
CGTATGGAATTAATGTGGCGGTCAATTAAGTCCGGCACAGGCAAGCACCTGTAAGCCATCACCAACCCGCAACAGTGA
ATGTGACCATCACCCCATGTTCTTCAATGTCCCTGTCCCTCCATCTCCATTTCTCAAGCACTCTTGTCTCTGCCCTCTG
TCGCTGGAGAACAGTGTGCATCTGCACACTCTTATGTCAAGTGAAGTCAACACAGCCTGCACCCCTCTCTGGTCTGAGTAT
TGGGTTCTGACTCTGCTATCACACACTACTGTACTGCATTTCTCTGGCTCTTTTTTTTAAACATATTTTTTATTGTTTGT
GTGTATGCACATGTGCCACATGTGTACAGATACTATGGAGGCCAGAGAGGCCATGGCCGTCCCTGGAGCTGGAGTTACA

GGCAGCGTGTGAGCTGCCTGCTGTGGGTGCTGGGACCAACTTGAATCTAAGCAAGCACTTTTAACTGCTGGGGCAGT
TCTCAGTACCCCTTCTTCATTTCTCCGCTGGGTTCCCTTGTATGGACACATGTAGCTAGCAATATCTTGCTTATCTAATTA
TGTACATTTGTTTTGTGCTAAGAGAGASTAATGCTCTATGGCTGAGCTGGCCTCAACCTTGCCATCCTCCTGCCTCAGGC
TCTCCTCCTGAGTGTCTAGGATGACAGGGGAGTGGTAACCTTACATGCTTTCATGTTTTGTTCAGACTGAGGATACAT
TCATACAGAGAGGTCTGGTCACTAAGTGTGCATTTCACTGAATGGTACCAACCTGATCAAGAACTAATCTCAGGGG
CTGGAGAGATGGCACTGACTGCTCTCCAGAGGTCCGGGTTCAATTCACAGCAACACATGTTGGCTCACAGCCATCTA
TACGCGATCTGACGCCCTCTCTGGTGTGTCTGAAGCAGCTACAGTSTACTCAGATAAATAAATAAATCTTTAAAGC
ACAGACACACACACATTTACACCCAGAAAGCCCACTCCATSTTCCCTCCCACTCTCTGCCTACAGTACTCCAGGTT
ACGACTTTCCAGGCTTCTAACAACCTGGTTTACTTGGGCTCTTTCTGCTCTGTGGAGCCACACATTTGTGTGCTCAT
ACAGCTTCTTTCTAGTAAGTTCATATTACTCTGCTTTTTACATGTATTTATTTATTGTAGTTGTGTGTGCTGTGGGC
CCATGCATGGCACGCTGTGTGGGATGTCAAGATATTGTGAACAGGGGACAGTTCTTTCTTCAATCATGTGGGTTCCAG
AGGTTGAAGTCTCAGTCTCATGTGTGGGACCAATGCTTTACCCACTGAGACTCTCCATATTTCTTTTTTTCCCTG
AGGTTGGGGCTTGTTCATAGCCCAACTGGCTTTGCACTTGCAGTTCCAAGTGAATCCCTGTCTCCACTCTTAGAGTA
TTGGATTACGATGTGACTACCAACCTGACTGGATCATTAATTTCTTTGATGGGGGGGGGAGGCGCATGCTGCAGG
TGAAAGGATGACTGACTGGACTGAGCGTGGAGGACAGGCAAGCTTCAAGTCTAATGCTCTCCCACTGAGCTATTTG
GGTTTGGCAGAGAACAACTTACAGAAAGTTCTCAGTGCATGTGGATTGGGGTTGGAGTTCAACTCATCAGCTTGACAT
TGGCTCCTCTACCCACTGAGCCTTCTCACTACTCTCTACCTAGATCATTAATCTTTTTTAAAGACTTATTAGGGGGC
TGGAGAGATGGCTCAGCCGTTAAGAGCACCGAATGCCCTTCCAGAGGTCCTGGGTTCPAATCCAGCATGCCATTGCTGG
GCAATAGGGGGGGCGGTTGTCCAGGTGAGTASCTGTGGCAGTTTTCCGGGTGGAGAACCTCTGACACCTGCTGTG
CCTGGTCACTCTGGTGGGTGCATGGTGAATGCTTGTGTATGGAGACTTTGACTGTTACAGTGAATTTGGCTTCCA
CAGTTACCAAGTCTCCCTGTTCTTGCAGGCCGGGTGCTTGTCCATTGCCGAGGGCTACAGCCGCTCCCAACGCTA
GTTATCGCTACCTCATGATGGGCAGAGATGGACGTCAGTCTGCTCTGAGTACTGTGAGGCAAGATCTGAGATCGG
CCCCAAGGATGGCTTCTGGCCCACTCTGCCAGCTCATGACAGACTAGCCAGGAGGGCAAGGTGAATCTTAGGGTG
CCCACAGCCTCTTTTCCAGAGGTTCTACTGGGAGGGCCCTGGCAGCCATGTTTAGGAAACACAGTATACCCACTCCCTGC
ACCACCAGACAGGTGCCACATCTGTCCACTCTGGTCTCGGGGGCCACTCCACCCTTAGGGAGCACATGAAGAGGCTC
CCTAAGAAAGTTCTGCTCCTTAGCCATCCTTTCTGTAAATTTATGTCTCTCCCTGAGGTGAGGTTACAGGTTTATGCTCCTG
TCTGTGGCATAGATACATCTCAGTGACCCAGGGTGGGAGGCTATCAGGGTGCATGSCCGGACACGGGCACTCTTCAT
GACCCCTCCCCCCTGGGTCTTCTGTGTGGTCCAGAACACAGGCTGGTAAAGGAATATGCAACACAGGGCCCTG
ACCTCCCATGTCTGTCTCTGGTCTCACAGCCGACACGCCCTGCTGAGGCAGACCAATGACATTAAGTTCTGAAGCAG
AGTGGAGATAGATTAGTACTAGATTTCCAAAGAGAGGAAAPAAAGGCTGCATTTTAAATTAATTTCTTAGAATTA
AGTACTACATAGGGGCCCTTGGGTAAACCAATCCATTTTTCCCAAGGCTATCTTGATTTCTTTGAAATTTTTAAAGTGT
GCCTTGCCAGAGGCTTACGATCTATATCTGCTGCTTCAGAGCCTTCCCTGAGGATGGCTCTGTTCTTTGCTTGTTAGA
AGAGCGATGCCTTGGCAGGGSTTCCCCCTTTTCAAGATACAGGGTGTAAAGTCCAGCCTATTACAAACAAACAAACAA
CAACAAACAAAGGACCTCCATTTGGAGAAATGCAAGGATTTTATCCTGAATTAATGTGTGGTGGTTCAGTCAATCAC
GCCAAGTGTCTGCCATCCTGCTTGTATTCTAAGAATAATTAGGAGGAGGAACTAGCCAATTGCAGCTCATGTCCGTGG
GTGTGTGCACGGGTGCATATGTTGGAAGGGGTGCTGTCCCTTGGGACAGAGGAAATGAAAGGCCCTCTGCTCAC

OCTGGCCATTTACGGGAGGCTCTGCTGGTTCACGGTGTCTGTGCAGGATCCTGAAPCTGACTCGCTGGACAGRAACGAG
ACTTGGGGGACCCATGAGAATGGAGAGAGAGAGCAAGAAGAAACAGCOCTTTAAAGGACTTTCTAGGGTGGTTTT
TGAACCTCGCTGAACTTGTATGTGTGCACATTTGCCAGAGATTGAACATAATCCTCTTGGGACTTCACGTTCTCATTAT
TTGTATGTCTCCGGGGTCAAGCAGAGCCGTCAGCCACCACCCGAGCACCAGGACATAGGGTCTCATAAABGCCCTTT
TATGAGAACCAAGGCTGTTTTGAGTACCCCGTGTATAGAGAGAGTTGTTGTGTGGGGACCCGGATCCACAGCAGCCTGGT
TGCCTGCCTGTAGGATGTCTTACAGGAGTTTGCAGAGAACTTCTTGGAGGGAAAGAAATATCAGGGATTTTTGTTGA
ATATTTCAAAATCAGCTTTAAGTGTAAAGACTCAGCACTGTTTATGTTAAAGTAAAGGACATGCTTTTTCCAGAGCTGCT
GCAGAGGACAGGAGAAAGCAGACCTGTCTTAGGATGTCACTCCAGGGTAAAGACCTCTGATCACAGCAGGAGCAGAGCTG
TGCAGCCTGGATGCTATTTGCTCCCTATTCTGTGTGACCAACAGCACTCCTGGTCCACATAGGGCTGGTCACTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCCAGAAATGAAGTGAACATAGCCAAATTTGTGTACCTCAGTCTTTAGTTTCCAGAGCGCT
CTCTGCTCATAATATGTGCATTTCAAAATAACCTGTAGAGTTGGCAGGACTGGTTCATGTGTTATGAGAGAGGAAABA
GAGAGGAAAGGACAAACCAAAACCAAAACCAAAACCAAAACCAAAACCAAAACCAAAACCAAAACCAAAACCAAAACCAAA
GCCCCAGTTCATGAGAGGACAGAGACAGGAAAGACCGCCCAAAAGTCAAGGATAGCATGCTCTACGTATCGAGACTCCAGGCA
GGGCTACGGTCCCAAGATCCTAGGTTTTGGATTTTTGGGCTTTGGTTTTTGAGACAGGTTTTCTCTGTGTAGCCCTGGCTG
TCTTGAAGCTCGCTCTGTAGACAGGCTGGCTCAAACTTAGAGATCTGCTGACTTGCCTTTGAGGGCTGGGACGAAT
GCCACCACTGCCCAACTAAGATTCATTAABAAAABAAAAGTTCAAAATAATTAAGAGTTGCCAGCTCGTTAAAGCTAA
GTAGAGGACTCTCAGGCTGCTGCTTGAGGCTGTTCTTGGCTTGACCTGAATCTGCCCCAGAGTGTCCAAGTGC
CATGACTTTGAGCCATCTCCAGAGAGGAAGTGAAATTTGGCTCCCAAGTGCATTGGGACACAGTCTCTCTTTGTCTA
GGTAACACATGGTACACATAGCATTGAACCTCTCCACTCTGAGGGTGGTTTTCCCTCCCCCTGCTCTTCTGGTTGGTC
ACCCCATAGGACAGCCACAGGACACTACTAGCACCTACTGGACCTCTTTTGGGGACATGAAGAAAGAGCCTTTGGG
AGATTCCTGGCTTTCCATTAGGGCTGAAGTACAACGGTCTTGGTTGGCTTTGGCTCGTGTATATAAAGCTAGCTACTA
TTCTCAGGTAATAATACCGATGTTGTGGAAAGGCCAACCCCGTGGCTGCCCGTGAATAGGGGTGGGTTGGGAATCCTG
GATAGTGTCTATCCATGGAAAGTGGTGGAAATAGGAAATTAAGGGTGTCCCCCCCCCCCAACTCTTCTCTCAGACCCAG
CCACTTTCTATGACTTATAAACATCCAGGTAAAAATTACAACATATAAAATGGTTTCTCTTCTCAATCTTCTAAGTCTG
CCTGCCCTTTCCAGGGGTAGGTCTGTTTCTTGTCTGTTCTATTGCTCTTGAGAGCACAGACTAACACTTACCAATGAGGG
AACTCTTGGCCACTACTAAGGCTCTTCTGGGCTCCAGCACTCTTAGTTATTTAAGAAATCTCACTTGGCCCTTAGCAC
ACCCGCCACCCCAAGTGGGTGTGGATAATGCCATGGCCAGCAGGGGCACTGTTGAGGGCGGTGCCCTTCCACCTTAG
TTGCTTATAGTATTTAAGATGCTAAATGTTTTAATCAAGAGAGCACTGATCTTATAATACGAGGATAAGAGATTTCTC
ACAGGAATTTGCTTTTTTCATAATCTTTTACAGGCTTTGTCTGATCGTACCATAGAGAGAATAGCTGGATATTTAAGT
TGTATTTCCATTTTCTCTGCCAGCGTTAGGTTAAGTCCGTAABAAGTCAATCAGTGGACCGAAGAGCCTCAGAGGGCAGG
GGATGGTGGGTGAGGCAGAGCACTGTCACTGCCAGGCATGGGAGGTCTGCCATCCGGGAGGAAAGGAAAGTTTAGC
CTCTAGTCTACCAACAGTGTAAACGCACTTAAAGTTGTAAACCAAAATAAATGTCTTACATTAACAAGACGTCTGTTTTG
TGTTTCCTTTTGTGTGTTTGGGCTTTTTATGTGTGCTTTATAACTGCTGTGGTGGTGTGTTGTTAGTTTTGAGGTAGGA
TCTCAGGCTGGCTTGAACCTTCTGATCGCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCCCTGCC
AAAGCACATGCCACCACACCAGTACAGCATTCTTCTAACATTTAAABATAATCACCTAGGGGCTGGAGAGAGGGTTCCA
GCTAAGAGTGCACACTGCTCTTGGGTAGGAACCTGAGTTTAACTCCAGAACCTATACTGGGTGGCTCCAGGTCCAGAGGA

TTTGGGGCAGTTCCTTTCTCAACCTGGACCTGTGATAATGAGGGGGTTGGACGGCGCGCCTTTGGTCGCTTTCAAGTCT
AATGAAATTCATTATCCCTACCACTTCCCTTCTACCCCGCTCCTCCACAGCAGCTGTCTGATTTATTAGCTTCAATTAAC
CTCCACTCCTTTCTCCATCTCCTGGGATACCGCCCTGTCCAGTGGCTGGTAAAGGAGCTTAGGAAAGGACCAGAGCGAG
GTGTGGCTAGAGGCTACCAAGCAGGGCTGGGGATGAGGAGCTAAACTGGAAAGTSTTTGGTTAGTAGSCACAAGCCTT
GGTGGGATCCCTACTACCGGAGAAAGTGGAGATGGGCGCTGAGAAGTTCAAGACCATCCATCCTTAACTACACAGCCAGT
TTGAGGGCAGCCTGGGCTACATFAAFAACCAATCTCAAAAGCTGCCAATTCGATTCGTGTGCCACGTAGTGGCCGATGTA
ACTAGTGGATGAAGTGGTGAATCCTGGGGCAACCTATTTACAGATGTGGGGAAAGCAACTTTAAGTACCCCTGGCCAG
GATACAAAGAAAGTAAAGTGAAGAGCTCCAGTGTTCATCCCTGGGTTCCAGGACAGGGAGAGAGAGAGCCAGGGTGG
ATCTCACTGCTCCCGGTTGCTCCTTCTATAATCCATACAGATTCGAAAGCGCAGGGCAGGTTTGGAAAGAGAGGAA
GGTGGAGAGGAGCAGCCAGTCTGGGCTAGGCTGAGGCGCTCAGCGCATCCCTCTCTCCGAGATGTGTGGAGTACAGCT
GGCCGAGCTGCACTACACCCGCTTCTGACAGAGCGGCCATGGCCAGGGCCAAAGCCGGTCACCGASTTGGTGTGCTCC
GACCAATGCGGCCCGCGGGCTGCTGCCAACGCGCATGGGGCGGTGAAGTGGTGGCGCCGACGGACCGGATTTCCG
CTGCATCCCGGATCGCTACCGCGGCGAGCGGTGCAGCTGCTGTGCCCGGGGGCGGGGGCCCGCTCGGCAAGGTGC
GTGTGGTGGCTCTGTGCAGTGCAGAGCCCTCACCCGCTTCCACACCCAGTGGAGCTCAAGGACTTCGAGCCGGAGAC
GGCGGGCCGAGAAAGGCTGCGAGGGCGGGCCCGGCGCCCGGGGAGGCAAPAGCCACAGGGCGGAGCTGGAGACCGCTA
CTAGAGGGAGCCCGCCCTATGCAGCCCGGGGGATCGGATTCGTTTTCAAGTSTAABGCTGCAGCCAGGCCAGGGT
GGCAACTTTCCAGACCGTGTGGATTCAGAGCCAGTGAAGACCGGAGGTCTTCTGCCCGCTGGGGAGGATGGGGGG
GGTGGGTTCCCGCGGCCAGGAGGAAAGCTTGAAGTCCAGACTCTGCTAGCCCGGGTGGGATGGGGTCTTTCTA
CCCTCGCCGGACCTATAAGAGACAGGCAAGTGTTCACCTTAAAGGGAAAGGGAGTGTGGAAAGGAAAGCCTGGGACTGG
TTATGGACGTACAGTAAAGATCTACTCCTTCCACCCAAATGTAAAGCCTGCGTGGGCTAGATAGGGTTTCTGACCTGACC
TGGCACTGAGTGTGATGTTGGGCTACGTGCTTCTTTGGTACGGTCTTCTTTGTAAATAGGGACCGGAACTCTGCT
GGGTTCCAGGATGGGGTACCCCTGTAGACTGGTGAAGAGAGAGGAGAACAGGGGAGGGGTAGGGGAGAGATTGTGG
TGGCAACCGCCTAGAAAGAGCTGTTGTTGGCTCCCAGCCTCGCCGCTCAGAGGTTTGGCTTCCCCACTCCTTCTC
TCAATCTGCCCTTCAATCCATATCTGGGATAGGGAAGGCCAGGTCGGAGAGTGGTGGAAAGGGCCAGAAATCACACTC
CTGGCCCCCGAAGAGCAGTGTCCCGCCCCACTGCTTGTCTATTGTAAAGGGATTTCTACACAAAGTTTAAAGT
GTTGGAGAAACTGGGCTGGCACTCACCTCCCATCCTTGTCCCTTGGCAGGACACCACCTCCTGCCTGCCACCCACGG
ACACATTTCTGTCTAGAAACAGAGCGTCGTGCTGTCTCTGAGACAGCATATCTTACATTAATAAGAAATATACGGG
GGGGGGGGGGAGGGGGCAAGTGTATACATATGCTGAGAGCTGTGAGGGCCACAGCACCCACAACTCTTTTGT
AAATCAATTCAGACACCTCTTACTTTCTGTGTAGATTTTAAATGTTAAAGGGGAGGAGAGAGCGTTTGTACAGAA
GCACATGGAGGGGGGGTAGGGGGTGGGGCTGGTGAATTTGGCGACTTTCCATGTGAGACTCATCCACAAAGACTGA
AAGCCGCTTTTTTTTTAAGAGTTCAGTGAATATTTATTTCTCATTTAAGTTATTTATGCCAACATTTTTTTCTTG
TAGAGAAAGGAGTGTAAATATCGCTTTGTGAAGCACAAGTGTGTGGTTTTTGTTTTTTGTTTTTTCCCCGACCAGA
GGCATTGTTAATAAAGACAATGATCTCGAGCAGGAGGCTGTGGTCTTGTTTTGTCAACCACACAAATGTCTCGCCACT
GTCACTCACTCCCTTCCCTTGGTCAAGACCCAAACCTTGACAAACCTCCGACTGCTCTCTGGTAGCCCTTGTGGCA
ATACGTGTTCCCTTGAAGTCAATTCATCCTTCCCTTTCGAAAGCTGGCTCTCATTCGCCAGCTGGGTATCGTCAT
ACCCTCACCCAGCCTCCCTTTAGCTGACCACTCTCCACACTGTCTTCCAAAGTGCAGTTTACCCGAGCCAGTCCCT

CACTTGCCTTGAATCCAGCATTAAAGAGGCAGAGACAGTCCGATCTCTGTGASTTCAAGCCAGCCCTGCTTACGGAGT
GAGTTCCAAAGACAGCCAGCCCTACACAGAGAAACCCTGTCTCGAATAAACAABAAACAAAGAAATAAAGAAAGAAAG
CAAAACCGAACAAACAGAAACACAGCCAGAGTGTTTGTCCCCGATATTTATTATTCATATTTTTGTCCCTTTGCCATTT
TAGACTAAAGACTCGGGABAGCAGGTCTCTCTCTGTTTCTCATCCGGACACACCAGAACAGATGTATGGAGATGAC
TAAATGTCTGCACTTGCACATCTGGGGCTGGGTGGATTGGTTAGATGGCA.TGGGCTGGGTGTGGTTAGCATGACTGACAG
AGCAAGAGATATGTGGTGCATAGCAACCGAGGAAGTTGCACAGAACAA.CACTGTGTACTGATGTGCAGGTATGGGCA
CATGCCAGCAGAGGCCAAGGGACAGCCCTTAGGGTAGTGTTCACAGAGCCCTCCCCCTTTTAAACATGGGCATCTCTCA
TTGGCTGTGAGCTTGCCTACTGGGCTGGGCTGGCTAGCTTGTAGSTCCAGGGATCTGCATATCTCTGCCCTCCCTAGTGC
TGGGATTACAGTCAATATATGAGCACACCTGGCTTTTTTATGTGGGTTCTGGGCTTTGACCCAGATCTGAGTCTTGCAG
GGCAATGGGTTGATGTGCTGCTCATCTCCCCAGCCCTGGGATTTCTACTTTCTATTAAGTATTTCTATTAAATCAATG
AGCCCTGCCCTGCACCTCAGCAGTTCTTAGCCCTGCTGAGAGTCAAGTGGGGAGTGAAGCCAGCCCTCGAGGCCCCATC
AGCGAAGCAGAGACAAAGAAATGAAAATTTGGGATTCGAGGCTCGGGATATGGGATACAGAAAGGCTCAGGGAGGAA
ATGAAACAGATGATAGAGGCAGGAAGGGTAGGGCCCTGCATACATGGAACTGGTSTACATSTTATCTGCATGGGGTTT
GCATTCGATGGCTCTCAGCAGGTTCAACCACACTGGAAACAGAAAGCCAAAGGAGAGSTAGGTTGTTGAGTCAAG
TACTGTCACTCATGCTGAGAAATGGAAAGCAATTAAGATGGCCGCAATTAAGATATTAGCTCCCTGAGGAAAGGCAA
GAGCTGGGCTGTGGGCACTGAAGGGAGCTTTGAATGATGTCACTTCTCTSTATGCTAGGAGGGCAGTATTGGAGACT
GAGACTTGACTGTGTGTCCATATGATTCTCTTTTCTACAGTCACTCTGGGCTGCTGAGCTTGTCTCTGTCCAGAA
AOCCTGGAGCTGGCAGTGGCCAGCTGCAGTATAGATSTCTGCAAGAAAGTCTGAAAGCAGGGAGGAGATGAGGACCC
AGAGGACCACCACCTCTGCTGCTGACAAAGCTGCAGGACCAGTCTCTCTACASATGAGAGACAGAGGCGAGATGA
ATGGTCAGGGGAGGAGTCAAGAGAAAGGAGAGGGTGAGGCAGAGACCAAGGGAGGGAAACACTTGTGCTCTACAGCTACTG
ACTGAGTACCAGCTGCGTGGCAGACAGCCAAATGCCAAGGCTGGGCTGATCATGGCACTCGTGGGACTCCTAGCCAGTG
CTGGCAGAGGGGASTGCTGAATGGTGCATGGTTTGGATATGATCTGAAATGTGGTCCAGCCCTAGTTTCTTCCAGTTGCT
GGGATAAAGCACCCCTGACCAAGCTACTTTTTTGTGTTGTTTGGTTTGGTTTTGTGTTTTTGGTTTTTGGGTTTGGGTT
TCTCTGTATCACCTAGCTGTCTGGAACCTCACTCTGTAGACCAGGCTGGCCTGAACTCAGAAATCCCCCTGCTCTGC
CTCCTAGTGTGGAATTAAGGCTTGGCCACCAGTCCCGCCCAAGCTACTTTAAGAGAGAGAGGAGATSTATAAG
TATTAATCCAGGTTATAGTTCATGCTGTAGAAATGGAGTCTTCATATCCAGGTATCTCCACAGACATGCCACA
AAACACCTGTCTACGAAATCTCTCATGGACTCCCTCCCCAGTATTCTAACTGTGTCPAATCTACAAGAAATAGTG
ACATCACAGTCTCTAACGTTTTGGGCTGAGTCTGAACTCTCATGCTAAGTACTGGGAAAGATGAAAACCTTTACCTAGT
GTCAAGCATTGGAGCAGAGCCCTTGGGATTTGAGATGCTTTTTGCAAGGCTCCTAATGGCTACATGGAGAGAGGGGGCC
TGGAGAGAGACCCATACACCTTTTGTGCTTATGTACCTGACCTGCTCCTTGGGAAGCTCTAGCAAGAGCCCTTCCCT
GGATCACCCACCCCTTGCACCTCCAGACTCAGAGCCAAATTAACCTTTCTTGTACTGTCTCAAGCCAGTCCGTC
TGGGTTGTATCACTGTCAATGGAAACAGACTTGCTGGATGGATACTTGTACATTCATAATGTCTAGAAATGAAAG
TCCTATAGAGAAAAGAAAATTAGCTGGCACACAGATAGAGGCCCTGGAGGAGGCTGGCTTTGTCTCCCGAGGAGGTG
GCGAGTAAAGGTGTAATGTTCAATGGATGTAATGGGCCATATATGAGGGTCTGGGTAACAAAGAGGCCCTGTGAATATA
AAGCACTGAAGGTATGTCTAGTCTGGAGAAGGTCACTACAGAGAGTTCCTCACTCAGTGCCATACACACACACACA
CACACACACACACACACACACACACACCACAAAGAAAABAAAGGAGAAABATCTGAGAGCAAGTACAGTACTTAAA

CTGTAGCA3CCCTCCGCTGAGGGGCTCCAGGTGGGGCGCCCAAGGTGCTGCAGTGGGAGCUPACATGAGAGGTGATGTCTTG
GAGTCACCTCGGGTACCATTGTTTAGGGAGGTGGGGATTGTGGTGTGGGACAGGCAGCCTCAAGGATGCTTTTCAACA
ATGGTTGATGASTTGGAACTAABAAGGGGCCATCACACTGGCTCCCATAGCTCTGGGCTTGCCAGCTTCCACATCTGCC
CCCCACCCCTGTCTGGCACCAGCTCAAGCTCTGTGATTCTACACATCCAAAAGAGGAAGAGTAGCCTACTGGGCATGCC
ACCTCTTCTGGACCATCAGGTGAGAGTGTGGCAAGCCCTAGGCTCCTGTCCAGGATGCAGGGCTGCCAGATAGGATGCTC
AGCTATCTCTGAGCTGGACTATTTTAGGAATAAGGATTATGCCGCCCGGGGTTGGCCAGCACCCAGCAGCCTGTGC
TTGCTAABAAGCAAGTGTCTTTGATTTATCTAABAACAGAGCCGTGGACCCACCCACAGGACAAGTATGTATGCATCTGT
TTGATGTATCTGAAAAGCGACACAACCATTTTTCACATCATGGCATCTTCTCTAAGCCCATTTCTTTTTGTTTTGTTTT
TTGAGACAGGGTTTCTCTGTGTAGTCTGGTGTCTCTGAACTCAGCTTTGTAGACCAGGCTGGCTCGAAGTCAAGAAATC
CTGGGATTAAGGTGTGTGCCACCACGCCCCGCCCTAAGCCCATTTCTTAATGGTGATCCAGTGGTTGAATTTGGGGCC
AGACACATGTGCATTAGGGATTAGCTGCTGTCTCTGAGCTACCTGGTACAATCTTTATCCCTGGGGCTGGGCTCCTG
ATCCCTGACTCGGGCCGATCAAGTCCAGTTCTGGGGCCGATCAAGTCCAGTTCTGGGGCCGAAACAAGTCCAGTCCCT
AGCTCGATTAGCTCATCTCTGGCTCCCTGGCTGTTCTTACTTACACTCTTCCCTTGTCTGTGGACTTGTGCTTTCTTTA
CTCAAGTTGTCTGCCACAGTCCCTAAGCCACCTCTGTAAAGACAAGTAAAGATAACTTCCCTCAAGCCGGAAAGTCCCTG
ASTCACCACACCCTCTGGAGGTGTGTGGACACATGTTTCATGCGTGTGGTTGGCCTTACCTACGTGTGC

Sequenz ID Nr. 18: Human-BEER-Genomsequenz (Dieses Gen besitzt zwei Exons
an den Positionen 161-427 and 3186-5219)

tagaggagaa gtctttgggg agggtttgct ctgagcacac ccctttccct cctccgggg 60

ctgagggaaa catgggacca gccctgcccc agcctgtcct cattggctgg catgaagcag 120

agaggggctt taaaaaggcg accgtgtctc ggctggagac cagagcctgt gctactggaa 180

ggtaggctgc cctcctctgg ctggtaccat gcagctccca ctggccctgt gtctctctctg 240

cctgctggta cacacagcct tccgtgtagt ggagggccag gggtaggcagg cgttcaagaa 300

tgatgccacg gaaatcatcc ccgagctcgg agagtacccc gagcctccac cggagctgga 360

gaacaacaag accatgaacc gggcggagaa cggagggcgg cctccccacc accccttga 420

gaccaaaggc atgggggtgga ggagagaatt cttagtaaaa gatcctgggg aggtttttaga 480

aacttctctt tgggaggctt ggaagactgg ggtagaccca gtgaagattg ctggcctctg 540
ccagcactgg tcgaggaaca gtcttgccctg gaggtggggg aagaatggct cgctggtgca 600
gccttcaaat tcaggtgcag aggcattgagg caacagacgc tggtgagagc ccagggcagg 660
gaggacgctg ggggtggtgag ggtatggcat cagggcatca gaacaggctc aggggctcag 720
aaaagaaaag gtttcaaaga atctcctcct gggaatatag gagccacgtc cagctgctgg 780
taccactggg aaggaacaa ggtaagggag cctcccatcc acagaacagc acctgtgggg 840
caccggacac tctatgctgg tgggtggctgt cccaccaca cagaccaca tcatggaatc 900
cccaggaggt gaacccccag ctccaagggg aagaaacagg tccaggcac tcagtaactt 960
ggtagtgaga agagctgagg tgtgaacctg gtttgatcca actgcaagat agccctgggtg 1020
tgtggggggg tgtgggggac agatctccac aaagcagtgg ggaggaaggc cagagaggca 1080
cccctgcagt gtgcattgcc catggcctgc ccagggagct ggcacttgaa ggaatgggag 1140
tttctggcac agtttttagcc cctgacatgg gtgcagctga gtccaggccc tggaggggag 1200
agcagcatcc tctgtgcagg agtagggaca tctgtcctca gcagccacc cagteccaac 1260
cttgcctcat tccaggggag ggagaaggaa gaggaacctt .gggttctctg tcaggcctgc 1320
acagagaagc ccaggtgaca gtgtgcatct ggctctataa ttggcaggaa tcctgaggcc 1380
atgggggggt ctgaaatgac acttcagact aagagcttcc ctgtcctctg gccattatcc 1440
aggtggcaga gaagtccact gccaggctc ctggaccca gccctccccg cctcacaacc 1500
tgttgggact atgggggtgt aaaaagggca actgcatggg aggccagcca ggacctccg 1560

tcttcaaaat ggaggacaag ggcgcctccc cccacagctc cccttctagg caaggtcagc 1620
tgggctccag cgactgctg aagggctgta aggaacccaa acacaaaatg tccaccttgc 1680
tggactccca cgagaggcca cagccccctga ggaagccaca tgctcaaaac aaagtcatga 1740
tctgcagagg aagtgcctgg cctaggggcg ctattctcga aaagccgcaa aatgccccct 1800
tccctgggca aatgcccccc tgaccacaca cacattccag cctgcagag gtgaggatgc 1860
aaaccagccc acagaccaga aagcagcccc agacgatggc agtggccaca tctcccctgc 1920
tgtgcttgct cttcagagtg ggggtggggg gtggccttct ctgtcccctc tctggtttgg 1980
tcttaagact atttttcatt cttctctgtc acattggaac tatccccatg aaacctttgg 2040
gggtggactg gtactcacac gacgaccage tatttaaaaa gctcccaccc atctaagtcc 2100
accataggag acatgggtcaa ggtgtgtgca ggggatcagg ccaggcctcg gagcccaatc 2160
tctgcctgcc cagggagtat caccatgagg cgccattca gataacacag aacaagaaat 2220
gtgcccagca gagagccagg tcaatgtttg tggcagctga acctgtaggt tttgggtcag 2280
agctcagggc ccctatggta ggaaagtaac gacagtaaaa agcagccctc agctccatcc 2340
cccagcccag cctcccatgg atgctegaac gcagagcctc cactcctgcc ggagccaaaa 2400
gggtgctggga ccccagggaa gtggagtccg gagatgcagc ccagcctttt gggcaagttc 2460
ttttctctgg ctgggcctca gtattctcat tgataatgag ggggttggaac aactgcctt 2520
tgattccttt caagtctaat gaattcctgt cctgatcacc tcccctcag tccctcgctt 2580
ccacagcagc tgcctgatt tattaccttc aattaacctc tactccttcc tccatccctt 2640

gtccacccct cccaagtggc tggaaaagga atttgggaga agccagagcc aggcagaagg 2700
tgrgctgagt acctaccctg cccaggccag ggaccctgcg gcacaagtgt ggcttaaatac 2760
ataagaagac cccagaagag aaatgataat aataatacat aacagccgac gctttcagct 2820
atatgtgcca aatggatatt tctgcattgc gtgtgtaatg gattaactcg caatgcttgg 2880
ggcggcccat ttgcagaca ggaagaagag agaggttaag gaacttgccc aagatgacac 2940
ctgcagtgag cgatggagcc ctggtgtttg aaccccagca gtcatttggc tccgagggga 3000
cagggtgccg aggagagctt tccaccagct ctgagcattc tgggacctc ctgcaataga 3060
tgrtcagggg caaaagcctc tggagacagg cttggcaaaa gcagggctgg ggtggagaga 3120
gacgggcccg tccagggcag gggtagccag gcgggcccgc acctcaccg gcgcctctct 3180
ccacagacgt gtccgagtac agctgcccgc agctgcactt caccgctac gtgaccgatg 3240
ggccgtgccg cagcgcgaag ccggtcaccg agctggtgtg ctccggccag tggggcccgg 3300
cgcgcctgct gcccaacgcc atcggccgcg gcaagtggtg gcgacctagt gggcccgact 3360
tccgctgcat ccccgaccgc taccgcgcgc agcgcgtgca gctgctgtgt cccggtggtg 3420
aggcgcgcgc cgcgcgcaag gtgcgcctgg tggcctcgtg caagtgcaag cgcctcacc 3480
gcttccacaa ccagtccgag ctcaaggact tcgggaccga ggccgctcgg ccgcagaagg 3540
gcccgaagcc ggggccccgc gcccggagcg ccaaagccaa ccaggccgag ctggagaacg 3600
cctactagag cccgcccgcg cccctcccc cggcgggcg ccccgccct gaaccgcgc 3660
cccacatttc tgcctctgc gcgtgggttg atgtttata ttccattgta aatgcctgca 3720

accagggca gggggctgag accttcagg ccctgaggaa tcccgggCGC cggcaaggcc 3780
ccctcagcc cgccagctga ggggtcccac ggggcagggg aggggaattga gagtcacaga 3840
cactgagcca cgcagccccg cctctggggc cgcctacctt tgctgggtccc acttcagagg 3900
aggcagaaat ggaagcattt tcaccgcctt ggggttttaa gggagcgggtg tgggagtggg 3960
aaagtccagg gactgggttaa gaaagtggg taagattccc ccttgcacct cgctgccccat 4020
cagaaagcct gaggcgtgcc cagagcacia gactggggggc aactgtagat gtggtttcta 4080
gtcctggctc tgccactaac ttgctgtgta accttgaact acacaattct ccttcgggac 4140
ctcaatttcc actttgtaaa atgaggggtgg aggtgggaat aggatctcga ggagactatt 4200
ggcatatgat tccaaggact ccagtgcctt ttgaatgggc agaggtgaga gagagagaga 4260
gaaagagaga gaatgaatgc agttgcattg attcagtgcc aaggtcactt ccagaattca 4320
gagttgtgat gctctcttct gacagccaaa gatgaaaaac aaacagaaaa aaaaaagtaa 4380
agagtctatt tatggctgac atatttacgg ctgacaaact cctggaagaa gctatgctgc 4440
ttcccagcct ggcttccccg gatgtttggc tacctccacc cctccatctc aaagaaataa 4500
catcatccat tggggtagaa aaggagaggg tccgaggggtg gtgggagggg tagaaatcac 4560
atccgccccca acttcccacia gaggcagcatc cctccccga cccatagcca tgttttaaag 4620
tcaccttccg aagagaagtg aaaggttcaa ggacactggc cttgcaggcc cgagggagca 4680
gccatcacia actcacagac cagcacatcc cttttgagac accgccttct gccaccact 4740
caggacaca tttctgccta gaaaacagct tcttactgct cttacatgtg atggcatatc 4800

ttacactaaa agaataattat tgggggaaaa actacaagtg ctgtacatat gctgagaaac 4860
tgcagagcat aatagctgcc acccaaaaat ctttttgaaa atcatttcca gacaacctct 4920
tactttctgt gtagttttta attgttaaaa aaaaaaagtt ttaaacagaa gcacatgaca 4980
tatgaaagcc tgcaggactg gtcgcttttt tggcaattct tccacgtggg acttgtccac 5040
aagaatgaaa gtagtggttt ttaaagagtt aagttacata tttattttct cacttaagtt 5100
atztatgcaa aagtttttct tgtagagaat gacaatgta atattgcttt atgaattaac 5160
agtctgtcct tccagagtcc agagacattg ttaataaaga caatgaatca tgaccgaaag 5220
gatgtggctt cattttgtca accacacatg acgtcatttc tgtcaaagtt gacacccttc 5280
tcttggtcac tagagctcca accttggaca cacctttgac tgcctctctgg tggccttctg 5340
ggcaattatg tcttctttg aaaagtcatg tttatcctt cctttccaaa cccagaccgc 5400
atttcttcac ccagggcatg gtaataacct cagccttgta tctttttagc agcctccctt 5460
ccatgctggc ttccaaaatg ctgttctcat tgtatcactc cctgctcaa aagccttcca 5520
tagctcccc ttgcccagga tcaagtgcag tttccctatc tgacatggga ggccttctct 5580
gcttgactcc cacctcccac tccaccaagc tctctactga ccccaaattg tcatgcagat 5640
cctgcttcc ttagtttgcc atccacactt agcaccocca ataactaatc ctctttcttt 5700
agyaatcaca ttacttgca tctcttccc taacctcca gagatgttcc aatctccat 5760
gatecctctc tctctgagg ttcagcccc tttgtctac accactactt tggttcctaa 5820
ttctgtttc catttgacag tcattcatgg aggaccagcc tggccaagtc ctgcttagta 5880

ctggcataga caacacaaaag ccaagtacaa ttcaggacca gctcacagga aacttcatct 5940
tcttcgaagt gtggatttga tgccctctgg gtagaaatgt aggatcttca aaagtgggcc 6000
agcctcctgc acttctctca aagtctcggc tccccaaagg gtcttaatag tgctggatgc 6060
tagctgagtt agcatcttca gatgaagagt aaccctaaag ttactcttca gttgccctaa 6120
gggaggatgg tcaactggaa agctttaa ataaatccagc ctaccttggg ggaaccacc 6180
cccacaaaga aagctgaggt cctcctgat gacttgtcag ttaactacc aataaccac 6240
ttgaattaat catcatcatc aagtcttga taggtgtgag tgggtatcag tggccggcc 6300
cttctgggg ctccagcccc cgaggaggcc tcagttagcc cctgcagaaa atccatgcat 6360
catgagtgtc tcagggccca gaatatgaga gcaggtagga aacagagaca tcttccatcc 6420
ctgagaggca gtgcggcca gtgggtggg acacgggctc tgggtcaggt ttgtgttgtt 6480
tgtttgttg ttttgagaca gagtctcgt ctattgcca ggctggagt cagtgtcaca 6540
atctcggctt actgcaactt ctgcctccc ggattcaagt gattctctg cctcagcctc 6600
cagagtagct gggattacag gtgcgtgcca ccacgcctgg ctaattttg ttttttgat 6660
agagacgggg tttcaaccatg ttggccaggc tagtctcga ctcttgacct caagtgatct 6720
gcctgcctcg gcctcccaaa gtgctgggat tacaggcgtg agccaccaca cccagccca 6780
ggttgggtgt tgaatctgag gagactgaag caccaagggg ttaaattgtt tgcccacagc 6840
catacttggg ctcagttcct tgccctacce ctcaactgag ctgcttagaa cctgggtgggc 6900
acatgggcaa taaccaggct acactgtttt gtaccaagtg ttatgggaat ccaagatagg 6960

agtaatttgc tctgtggagg ggatgagga tagtggtag ggaaagcttc acaaagtggg 7020
tgttgcttag agattttcca ggtggagaag ggggcttcta ggcagaaggc atagcccaag 7080
caaagactgc aagtgcattg ctgctcatgg gtagaagaga atccaccatt cctcaacatg 7140
taccgagtcc ttgccatgtg caaggcaaca tgggggtacc aggaattcca agcaatgtcc 7200
aaacctaggg tctgctttct gggacctgaa gatacaggat ggatcagccc aggctgcaat 7260
cccattacca cgagggggaa aaaaacctga aggctaaatt gtaggtcggg ttagaggtta 7320
tttatggaaa gttatattct acctacatgg ggtctataag cctggcgcca atcagaaaag 7380
gaacaaaca cagacctagc tgggaggggc agcattttgt ttaggggggc ggggcacatg 7440
ttctgggggt acagccagac tcagggtctg tattaatagt ctgagagtaa gacagacaga 7500
gggatagaag gaaataggtc cctttctctc tctctctctc tctctctctc actctctctc 7560
tctctcacac acacacacag acacacacac acgctctgta ggggtctact tatgctccaa 7620
gtacaaatca ggccacattt acacaaggag gtaaaggaaa agaacgttgaggaggccaca 7680
ggacccccaaa attccctggt ttccttgaat caggcaggac ttacgcagct gggaggggtgg 7740
agagcctgca gaagccacct gcgagtgaagc caagttcaga gtcacagaca ccaaaagctg 7800
gtgccatgtc ccacaccgc ccacctccca cctgctcctt gacacagccc tgtgctccac 7860
aacccggctc ccagatcatt gattatagct ctggggcctg caccgtcctt cctgccacat 7920
ccccaccca ttcttggaac ctgccctctg tcttctcctt tgtccaaggg caggcaaggg 7980
ctcagctatt gggcagcttt gaccaacagc tgaggctcct tttgtggctg gagatgcagg 8040

aggcagggga atattcctct tagtcaatgc gaccatgtgc ctggtttgcc cagggctggtc 8100
tcgtttacac ctgtaggcca agcgttaatta ttaacagctc ccacttctac tctaaaaaat 8160
gacccaatct gggcagtaaa ttatatggtg cccatgctat taagagctgc aacttgctgg 8220
gcgtgggtggc tcacacctgt aatcccagta ctttgggacg tcaaggcggg tggatcacct 8280
gaggtcacga gttagagact ggcctggcca gcatggcaaa accccatctt tactaaaaat 8340
acaaaaatta gcaaggcatg gtggcatgca cctgtaatcc caggtactcg ggaggctgag 8400
acaggagaat ggcttgaacc caggaggcag aggttgcagt gagccaagat tgtgccactg 8460
ccctccagcc ctggcaacag agcaagactt catctcaaaa gaaaaaggat actgtcaatc 8520
actgcaggaa gaaccacagt aatgaatgag gagaagagag gggctgagtc accatagctg 8580
cagcaccgac tcctgcagga aaggcgagac actgggtcat gggctactgaa gggtgccctg 8640
aatgacgttc tgctttagag accgaacctg agccctgaaa gtgcatgcct gttcatgggt 8700
gagagactaa attcatcatt ccttggcagg tactgaatcc tttcttacgg ctgccctcca 8760
atgcccatt tcctacaat tgtctggggg gcctaagctt ctgccacca agagggccag 8820
agctggcagc gagcagctgc aggtaggaga gataggtacc cataagggag gtgggaaaga 8880
gagatggaag gagaggggtg cagagcacac acctccctg cctgacaact tcctgagggc 8940
tggcatgcc agcagattta aggcggaggc aggggagatg gggcgggaga ggaagtgaaa 9000
aaggagaggg tggggatgga gaggaagaga gggatgatcat tcattcattc cattgctact 9060
gactggatgc cagctgtgag ccaggcacca ccctagctct gggcatgtgg ttgtaatctt 9120

ggagcctcat ggagctcaca gggagtgctg gcaaggagat ggataatgga cggataacaa 9180

ataaacattt agtacaatgt ccgggaatgg aaagtctctg aaagaaaaat aaagctggtg 9240

agcatataga cagccctgaa ggcggccagg ccaggcattt ctgaggaggt ggcatttgag 9300

c 9301

PATENTANSPRÜCHE

1. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, welches die Sequenz ID NR. 1, 5, 9, 11, 13 oder 15 oder eine komplementäre Sequenz davon umfasst.
2. Isoliertes Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, wobei das Nukleinsäuremolekül ein Protein codiert, welches das Protein der Sequenz ID NR. 2 umfasst.
3. Isoliertes Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, wobei das Nukleinsäuremolekül ein Protein codiert, welches das Protein der Sequenz ID NR. 6 umfasst.
4. Isoliertes Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, wobei das Nukleinsäuremolekül ein Protein codiert, welches das Protein der Sequenz ID NR. 10 umfasst.
5. Isoliertes Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, wobei das Nukleinsäuremolekül ein Protein codiert, welches das Protein der Sequenz ID NR. 12 umfasst.
6. Isoliertes Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, wobei das Nukleinsäuremolekül ein Protein codiert, welches das Protein der Sequenz ID NR. 14 umfasst.
7. Isoliertes Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, wobei das Nukleinsäuremolekül ein Protein codiert, welches das Protein der Sequenz ID NR. 16 umfasst.
8. Expressionsvektor, umfassend einen Promotor, welcher funktionsfähig an ein Nukleinsäuremolekül, das ein TGF-Beta-Bindungsprotein codiert, gebunden ist, wobei das Nukleinsäuremolekül ein Nukleinsäuremolekül ist, welches die Sequenz ID NR. 1, 5, 9, 11, 13 oder 15 umfasst.

9. Expressionsvektor gemäß Anspruch 8, wobei der Promotor aus der Gruppe gewählt wird, die aus dem CMV I-E-Promotor, SV40-Early-Promotor und MuLV LTR besteht.
10. Expressionsvektor gemäß Anspruch 8, wobei der Promotor ein gewebe-spezifischer Promotor ist.
11. Expressionsvektor gemäß mindestens einem der Ansprüche 8 bis 10, wobei das Nukleinsäuremolekül ein Protein codiert, welches das Protein der Sequenz ID NR. 2, 6, 10, 12, 14 oder 16 umfasst.
12. Verfahren zur Herstellung eines TGF-Beta-Bindungsproteins, umfassend das Kultivieren einer Zelle, welche einen Vektor gemäß mindestens einem der Ansprüche 8 bis 11 enthält, unter Bedingungen und für einen Zeitraum, die ausreichend sind zur Herstellung des Proteins.
13. Verfahren gemäß Anspruch 12, welches ferner den Schritt des Reinigens des Proteins umfasst.
14. Viraler Vektor, der in der Lage ist, die Expression eines Nukleinsäuremoleküls, welches ein TGF-Beta-Bindungsprotein codiert, zu steuern, wobei das Nukleinsäuremolekül ein Nukleinsäuremolekül ist, welches die Sequenz ID NR. 1, 5, 9, 11, 13 oder 15 umfasst.
15. Viraler Vektor gemäß Anspruch 14, wobei der Vektor aus der Gruppe gewählt wird, die aus Herpes simplex-Virus-Vektoren, adenoviralen Vektoren, Adenovirus-assoziierten viralen Vektoren und retroviralen Vektoren besteht.
16. Viraler Expressionsvektor gemäß Anspruch 14 oder 15, wobei das Nukleinsäuremolekül ein Protein codiert, welches das Protein der Sequenz ID NR. 2, 6, 10, 12, 14 oder 16 umfasst.

17. Wirtszelle, welche einen Vektor gemäß mindestens einem der Ansprüche 8 bis 11 und 14 bis 16 trägt.
18. Wirtszelle gemäß Anspruch 17, wobei die Zelle aus der Gruppe gewählt wird, die aus einer humanen Zelle, Hundezelle, Affenzelle, Rattenzelle und Mauszelle besteht.
19. Isoliertes Protein, welches ein TGF-Beta-Bindungsprotein der Sequenz ID NR. 2, 6, 10, 12, 14 oder 16 umfasst.
20. Monoklonaler Antikörper oder Fragment davon, der/das an einem TGF-Beta-Bindungsprotein bindet, welches durch ein Nukleinsäuremolekül der Sequenz ID NR. 1, 5, 9, 11, 13 oder 15 mit einem K_a größer oder gleich 10^8 M^{-1} codiert ist, und der/das nicht das Protein Dan oder das Protein Gremlin bindet.
21. Antikörper oder Fragment gemäß Anspruch 20, wobei der Antikörper oder das Fragment ein Protein der Sequenz ID NR. 2, 6, 10, 12 oder 14 bindet.
22. Antikörper oder Fragment gemäß Anspruch 20, wobei der Antikörper oder das Fragment ein Maus- oder Human-Antikörper oder -fragment ist.
23. Antikörperfragment gemäß mindestens einem der Ansprüche 20 bis 22, wobei das Fragment aus der Gruppe gewählt wird, die aus $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab', Fab und Fv besteht.
24. Antikörper oder Fragment gemäß mindestens einem der Ansprüche 20 bis 23, welches humanisiert ist.
25. Verwendung eines Antikörpers oder Antikörperfragments gemäß mindestens einem der Ansprüche 20 bis 24 bei der Herstellung eines Medikaments zur Steigerung der Knochenmineralisierung in einem warmblütigen Tier.
26. Verwendung gemäß Anspruch 25, wobei das warmblütige Tier Osteopenie hat.

27. Verwendung gemäß Anspruch 26, wobei die Osteopenie durch einen anämischen Zustand, Steroide, Heparin, eine Knochenmarksstörung, Skorbut, Fehlernährung, Calciummangel, idiopathische Osteoporose, kongenitale Osteopenie oder Osteoporose, Alkoholismus, chronische Lebererkrankung, Senilität, post-menopausalem Zustand, Oligomenorrhoe, Amenorrhoe, Schwangerschaft, Diabetes mellitus, Hyperthyroidismus, Cushing-Erkrankung, Akromegalie, Hypogonadismus, Immobilisierung oder Missbrauch, Sudeck-Dystrophie-Syndrom, transiente regionale Osteoporose oder Osteomalazie verursacht wird.
28. Verwendung gemäß Anspruch 25, wobei das Tier Osteoporose hat.
29. Verwendung gemäß Anspruch 25, wobei das Tier Achondroplasie Dysostosis cleidocranialis, Enchondromatose, fibröse Dysplasie, Gaucher, hypophosphatämische Rachitis, Marfan, multiple hereditäre Exostose, Neurofibromatose, Osteogenesis imperfecta, Osteopetrose, sklerotische Osteopoikilose-Läsionen, Frakturen, peridontale Erkrankungen, Pseudoarthrose oder pyrogene Osteomyelitis hat.
30. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend einen Antikörper oder ein Antikörperfragment gemäß mindestens einem der Ansprüche 20 bis 24 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Verdünnungsstoff.
31. Verfahren zum Nachweisen eines TGF-Beta-Bindungsproteins, umfassend das Inkubieren eines Antikörpers oder Antikörperfragments gemäß mindestens einem der Ansprüche 20 bis 24 unter Bedingungen und für einen Zeitraum, der ausreichend ist, um zu ermöglichen, dass der Antikörper oder das Fragment an ein TGF-Beta-Bindungsprotein bindet, und Nachweisen der Bindung.
32. Verfahren gemäß Anspruch 31, wobei der Antikörper an einen festen Träger gebunden ist.
33. Verfahren gemäß Anspruch 31 oder 32, wobei der Antikörper markiert ist.

34. Verfahren gemäß Anspruch 33, wobei der Antikörper mit einem Marker markiert ist, der aus der Gruppe gewählt wird, die aus Enzymen, fluoreszierenden Proteinen und Radioisotopen besteht.

35. Transgenes Tier, dessen Keimzellen und somatische Zellen ein Nukleinsäuremolekül, welches ein TGF-Beta-Bindungsprotein codiert, enthalten, wobei das Nukleinsäuremolekül ein Nukleinsäuremolekül ist, welches die Sequenz ID NR. 1, 5, 9, 11, 13 oder 15 umfasst;

wobei das Nukleinsäuremolekül in funktionsfähiger Weise an einen Promotor gebunden ist, der zur Expression des Gens wirksam ist, wobei das Gen in das Tier oder einen Vorfahren des Tieres in einem embryonischen Zustand eingeführt wird, mit der Maßgabe, dass das Tier nicht menschlich ist.

36. Transgenes Tier gemäß Anspruch 35, wobei das TGF-Beta-Bindungsprotein von einem Vektor gemäß mindestens einem der Ansprüche 8 bis 11 exprimiert wird.

37. Transgenes Tier gemäß Anspruch 35 oder 36, wobei das TGF-Beta-Bindungsprotein das Protein der Sequenz ID NR. 2, 6, 10, 12, 14 oder 16 umfasst.

38. Transgenes Knock-out-Tier, umfassend ein Tier, dessen Keimzellen und somatischen Zellen eine (Zer)Störung bei mindestens einem Allel eines endogenen Nukleinsäuremoleküls, das ein TGF-Beta-Bindungsprotein codiert, umfasst, wobei das endogene Nukleinsäuremolekül ein Nukleinsäuremolekül ist, welches die Sequenz ID NR. 1, 5, 9, 11, 13 oder 15 umfasst;

wobei die Störung die Transkription von Messenger-RNA von dem Allel im Vergleich zu einem Tier ohne die Störung verhindert, mit der Maßgabe, dass das Tier nicht menschlich ist.

39. Transgenes Tier gemäß Anspruch 38, wobei die Störung eine Nukleinsäuredeletion, -substitution oder -insertion ist.

40. Transgenes Tier gemäß mindestens einem der Ansprüche 36 bis 39, wobei das Tier aus der Gruppe gewählt ist, die aus einer Maus, einer Ratte und einem Hund besteht.

41. Kit zum Nachweisen vom TGF-Beta-Bindungsprotein, umfassend einen Behälter, welcher einen Antikörper gemäß mindestens einem der Ansprüche 20 bis 24 umfasst.

Gemeinsames Cystein-Gerüst

	1				50	
human_gremlin.pro	-----	-----	-----	-----	-----	-----
human_cerberus.pro	MHLLLFQLLV	LLPLGKTRH	QDGRONQSSL	SPVLLPRNQR	ELPTGNHEEA	
human_dan.pro	-----	-----	-----	-----	-----	
human_beer.pro	-----	-----	-----	-----	-----	
	51					100
human_gremlin.pro	-----	-----M	SRTAYTVGAL	LLLLGTLIPA	AEGKKKGSQG	
human_cerberus.pro	EKPDLFVAV	PHLVAT.SPA	GEGQRQREKM	LSRFGRFWKK	PEREMHPSRD	
human_dan.pro	-----	-----	-----	-----	-----	
human_beer.pro	-----	-----	-----	-----MQLPLA	LCLVCLLVHT	
	101					150
human_gremlin.pro	AI.PPPDKAQ	HNDSEQTQSP	QOPGSRNRGR	QQGRGTAMPG	EEVLESSQEA	
human_cerberus.pro	SDSEPPPPGT	QSLIQPID.G	MKMEKSPLE	EAKKFWHHFM	FRKTPASQGV	
human_dan.pro	-----	-----	-----	MLRVLVCAVL	PAMLLAAPPP	
human_beer.pro	AFRVVEGQGW	QAFKNDATSI	IPELGEYPEP	PPELENNKTM	NRAENGGRRP	
	151		↓	↓	↓	↓
human_gremlin.pro	LHVTERKYLK	RDWCKTQPLK	QTIHEEGCNS	RTIINRF.CY	GQCNSFYIPR	200
human_cerberus.pro	ILPIKSHEVH	WETCRTVPFS	QTIHEEGCEK	VVVQNNL.CF	GKCGSVHFP.	
human_dan.pro	INKLALPDK	SAWCEAKNIT	QIVGHSGCEA	KSIGNRA.CL	GQCFSYSVFN	
human_beer.pro	HHPFETKDVS	EYSCRELHFT	RYVTDGPCRS	AKPVTTELVC	GQCGPARLLP	
	201		↓	↓		250
human_gremlin.pro	HIRKEEGSFQ	SCSF...CKP	KKFTTMMVTL	NCPQLQPTK	K.KRVTRVKQ	
human_cerberus.pro	..GAAQHSHT	SCSH...CLP	AKFTTMHLPL	NCTELSSVIK	V...VMLVEE	
human_dan.pro	TFPQSTESLV	HCDS...CMP	AQSMWEIVTL	ECPGHEEVR	VDKLVKILH	
human_beer.pro	NAIGRGKWR	PSGPDFRCIP	DRYRAQRVQL	LCPGSEAPRA	RKVLVAS..	
	↓	↓				300
human_gremlin.pro	CRC.ISIDLD	-----	-----	-----	-----	
human_cerberus.pro	CQCKVTEHE	DGHILHAGSQ	DSFIPGUSA-	-----	-----	
human_dan.pro	CSCQACGKEP	SHEGLSVYVQ	GEDGPGSQPG	THPHPHPHPH	PGGQTPPEP	
human_beer.pro	CKCKRLTRFH	NQSELKDFGT	EAARPQGRK	PRPRARSAKA	NQAELENAY-	
	301	314				
human_gremlin.pro	-----	-----				
human_cerberus.pro	-----	-----				
human_dan.pro	PPGAPHTEEE	GAED				
human_beer.pro	-----	-----				

Figur 1

Humane Beer-Gen-Expression mittels RT-PCR

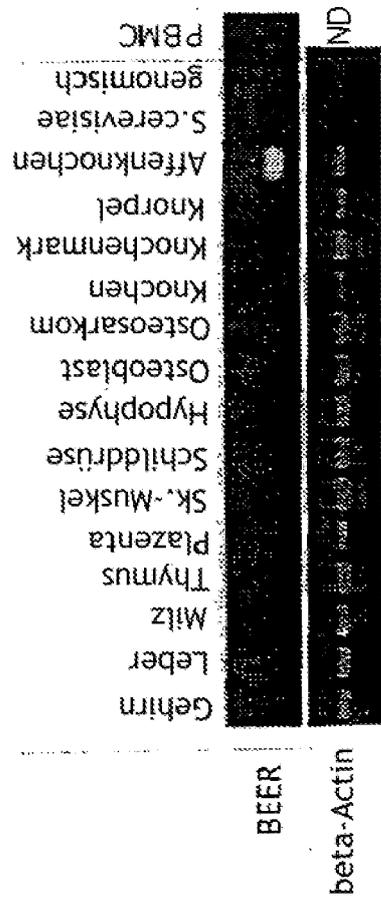


Fig. 2

RNA-in-situ-Hybridisierung von Mausembryo-Schnitten

3/6

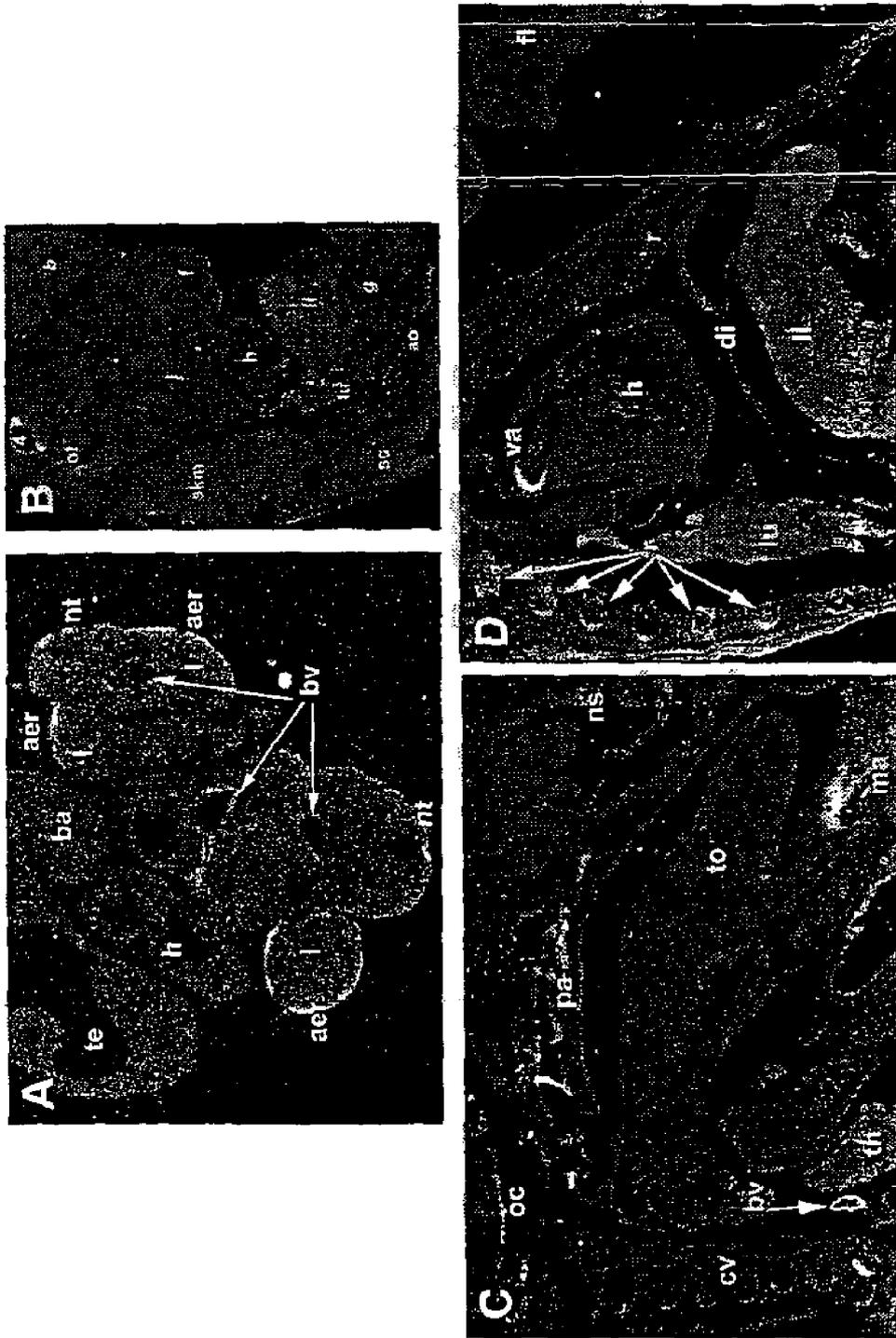


Fig. 3

Antikörper-Selektivität

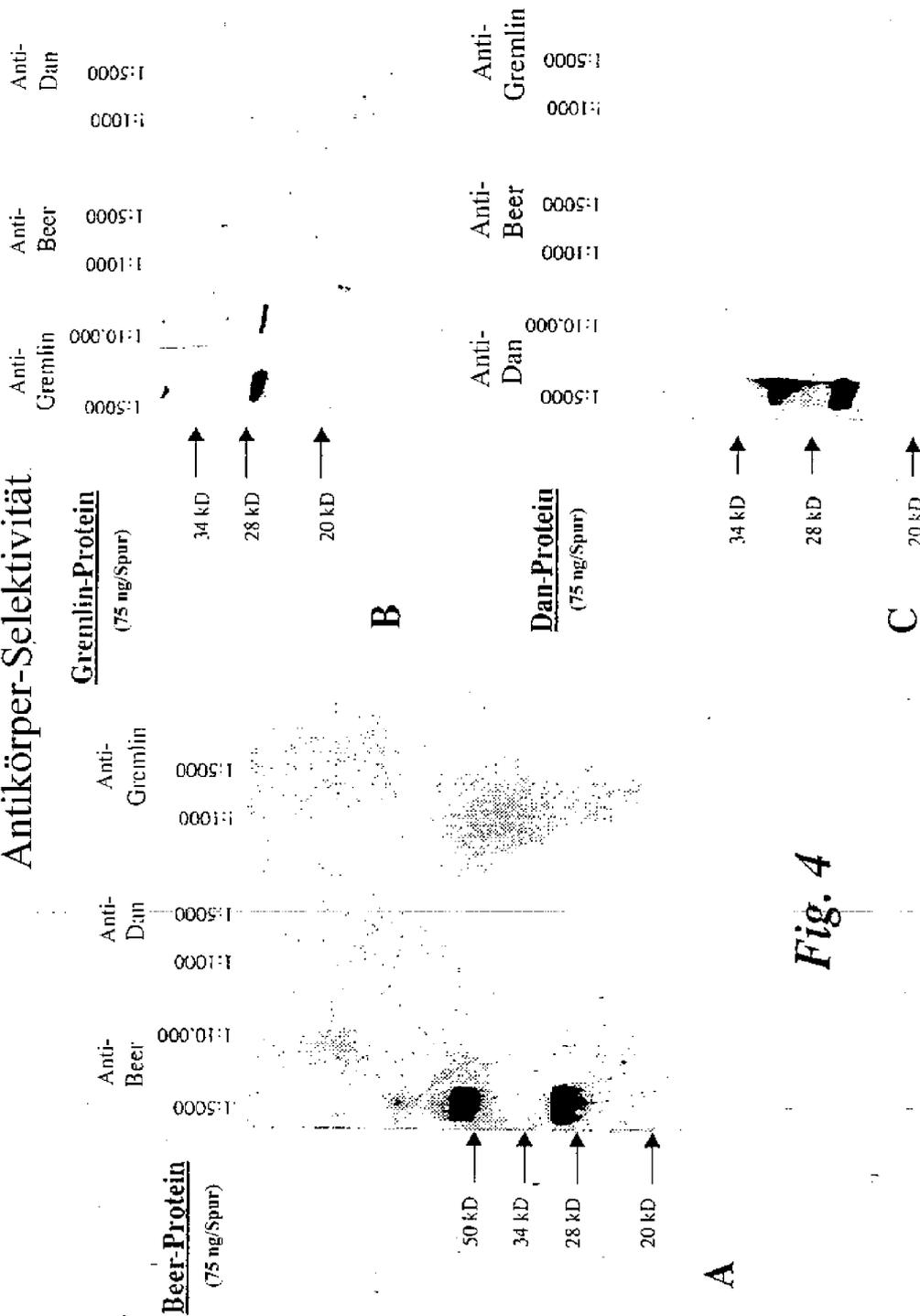
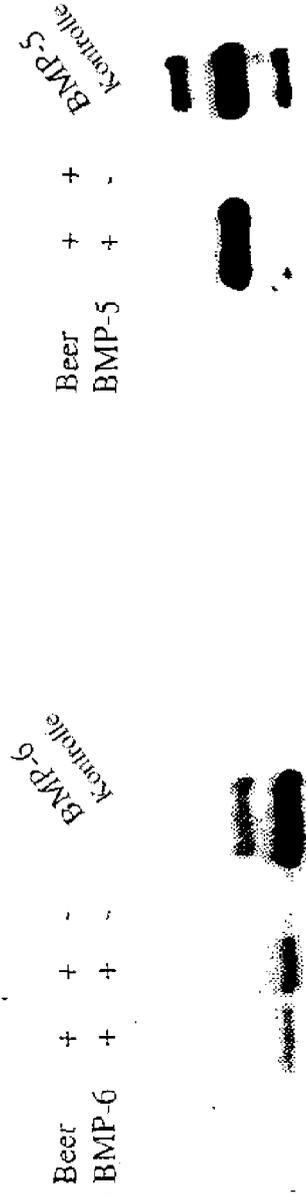


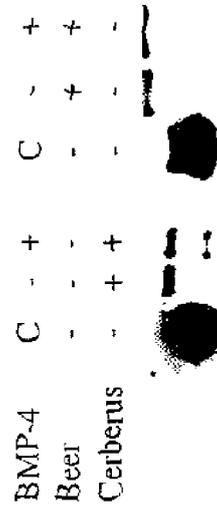
Fig. 4

Auswertung der Beer-Bindung an Vertreter der BMP-Familie Anti-FLAG-Immünpräzipitation



*Anti-BMP-6-Western-Blot

*Anti-BMP-5-Western-Blot



*Anti-BMP-4-Western-Blot

Fig. 5

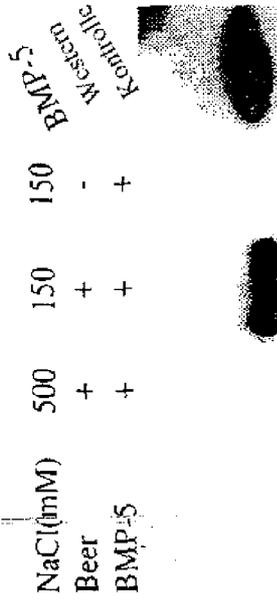
Charakterisierung der BMP-5/Beer-Dissoziationskonstante

0.75 1.5 7.5 15 30 60 120 nM BMP-5



*Anti-FLAG-Immünpräzipitation *Anti-BMP-5-Western-Blot

Ionische Zerstörung der BMP-5/Beer-Bindung



*Anti-FLAG-Immünpräzipitation *Anti-BMP-5-Western

Fig. 6