

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-227679

(P2009-227679A)

(43) 公開日 平成21年10月8日(2009.10.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B 0 6 5
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	4 C 0 7 6
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	4 C 0 8 4

審査請求 有 請求項の数 23 O L (全 104 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-115655 (P2009-115655)
 (22) 出願日 平成21年5月12日 (2009. 5. 12)
 (62) 分割の表示 特願平6-505485の分割
 原出願日 平成5年7月29日 (1993. 7. 29)
 (31) 優先権主張番号 922, 813
 (32) 優先日 平成4年7月31日 (1992. 7. 31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 029, 335
 (32) 優先日 平成5年3月4日 (1993. 3. 4)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 040, 510
 (32) 優先日 平成5年3月31日 (1993. 3. 31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507025881
 ストライカー・コーポレーション
 アメリカ合衆国ミシガン州49002, カ
 ラマズー, エアビュー・ブルヴァード・
 2825
 (74) 代理人 100090941
 弁理士 藤野 清也
 (74) 代理人 110000774
 特許業務法人 もえぎ特許事務所
 (72) 発明者 ルーガー, ディビッド シー
 アメリカ合衆国 01748 マサチュー
 セッツ, ホブキントン, ダウネイ ストリ
 ート 19

最終頁に続く

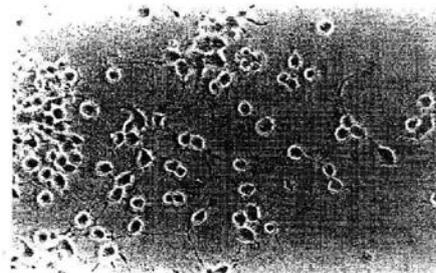
(54) 【発明の名称】 組織形成因子誘導による神経の再生と修復

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】哺乳動物細胞の神経経路を維持するための治療的処置方法、組成物を提供する。

【解決手段】瀕死の神経細胞の生存性を増強するための方法であって、神経細胞の生存性増強のために十分な時間と濃度で神経細胞にモルフォゲンを含有する組成物を供給することからなる方法であり、該モルフォゲンが、OP-1、OP-2、CBMP2、Vgl(fx)、Vgr(fx)、DPP(fx)、GDF(fx)、60A(fx)からなる群から選択された配列の一つと少なくとも70%のアミノ酸配列ホモロジーを有しているものからなる。

【選択図】 図 1 B



- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】
瀕死の神経細胞の生存性を増強するための薬剤の生産へのモルフォゲンの使用。
- 【請求項 2】
瀕死の神経細胞の生存性を増強するための方法であって、上記1胞の生存性増強のために十分な時間と濃度で上記細胞にモルフォゲンを供給することからなる方法。
- 【請求項 3】
上記細胞が、上記細胞からなる神経組織に対する化学的または機械的損傷のため瀕死の状態にあるところの請求項1または2の発明。
- 【請求項 4】 10
上記損傷が神経切断からなる請求項3の発明。
- 【請求項 5】
上記モルフォゲンが上記損傷に対して先に上記細胞に供給されている請求項3の発明。
- 【請求項 6】
上記損傷が上記細胞の脱ミエリン化によるものである請求項3の発明。
- 【請求項 7】
上記損傷が細胞性毒物に対して上記細胞が露出したことによるものである請求項3の発明。
- 【請求項 8】 20
上記毒物がエタノールからなる請求項7の発明。
- 【請求項 9】
上記細胞がニューロパシーのため瀕死の状態にあるところの請求項1または2の発明。
- 【請求項 10】
上記ニューロパシーの病因が代謝、感染、毒物、自己免疫、栄養、虚血性である請求項9の発明。
- 【請求項 11】
上記ニューロパシーが、パーキンソン病、ハンチントン舞蹈病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、アルツハイマー病である請求項10の発明。
- 【請求項 12】 30
上記細胞が上記細胞からなる神経組織に関連した腫瘍性病変のため死のリスクにあるところの請求項1または2の発明。
- 【請求項 13】
上記病変が神経由来の細胞からなる腫瘍によりもたらされたものである請求項12の発明。
- 【請求項 14】
上記腫瘍が神経芽細胞腫または網膜芽細胞腫ある請求項13の発明。
- 【請求項 15】
上記病変がグリア細胞からなる腫瘍からもたらされたものである請求項12の方法。
- 【請求項 16】 40
上記瀕死の細胞が中枢神経系の部分からなるところの請求項1または2の発明。
- 【請求項 17】
上記細胞が線条体基底神経節ニューロンからなる請求項16の発明。
- 【請求項 18】
上記細胞が黒質ニューロンからなる請求項16の発明。
- 【請求項 19】
瀕死の細胞が末梢神経系の部分である請求項1または2の発明。
- 【請求項 20】
上記モルフォゲンが上記細胞において細胞接着分子の生産を促進させるところの請求項1または2の発明。
- 【請求項 21】 50

上記細胞接着分子が神経細胞接着分子である請求項20の発明。

【請求項22】

神経細胞接着分子が、N-CAM-120、N-CAM-140、N-CAM 180からなる群から選択されたものである請求項21の発明。

【請求項23】

上記モルフォゲンが、OP-1、OP-2、CBMP2、Vgl(fx)、Vgr(fx)、DPP(fx)、GDF(fx)、60A(fx)からなる群から選択された配列の一つと少なくとも70%のアミノ酸配列ホモロジーを有しているものからなる請求項1または2の発明。

【請求項24】

上記モルフォゲンが、OP-1、OP-2、CBMP2、Vgl(fx)、Vgr(fx)、DPP(fx)、GDF(fx)、60A(fx)からなる群から選択された配列の一つと少なくとも80%のアミノ酸配列ホモロジーを有しているものからなる請求項23の発明。 10

【請求項25】

上記モルフォゲンが、配列表配列番号5(hOP-1)の残基43-139で定義された配列と60%以上のアミノ酸配列の同一性を持つアミノ酸配列からなるものである請求項24の発明。

【請求項26】

上記モルフォゲンが配列表配列番号5(hOP-1)の残基43-139で定義された配列と65%以上のアミノ酸配列の同一性を持つアミノ酸配列からなるものである請求項25の発明。

【請求項27】

上記モルフォゲンが配列表配列番号5(hOP-1)の残基43-139で定義された配列であって対立形質遺伝子および種変異体を含むものからなるものである請求項22の発明。 20

【請求項28】

哺乳動物の瀕死の状態にある神経細胞の生存性を増強するための方法であって、内因性モルフォゲンの生産を刺激することのできる物質の有効量を上記哺乳動物に投与するステップからなる方法。

【請求項29】

上記物質が上記神経細胞からなる組織の内因性モルフォゲンの生産を刺激するところの請求項28の方法。

【請求項30】

哺乳動物の神経回路を維持するために十分な時間と濃度で上記経路を特定するニューロンにモルフォゲンを供給することからなる神経回路維持のための方法。 30

【請求項31】

上記モルフォゲンがあらかじめ上記回路に傷害に対して供給されている請求項30の方法。

【請求項32】

上記モルフォゲンが損傷した神経回路の修復促進のために充分に供給されている請求項30の方法。

【請求項33】

上記損傷した神経回路が上記回路に対して物理的・化学的損傷により起こったものである請求項32の方法。 40

【請求項34】

上記損傷が神経切断である請求項33の方法。

【請求項35】

上記損傷が上記回路で特定されるニューロンの脱ミエリン化である請求項33の方法。

【請求項36】

上記損傷が細胞性毒物に対して、上記回路で特定する細胞の露出からおこるものである請求項33の方法。

【請求項37】

上記毒物がエタノールである請求項36の方法。

【請求項38】

上記で損傷した神経回路が上記回路で特定される細胞のニューロパシーからもたらされたものである請求項30の方法。

【請求項39】

上記ニューロパシーの病因が代謝、感染、毒物、自己免疫、栄養、虚血性である請求項38の方法。

【請求項40】

上記ニューロパシーが、パーキンソン病、ハンチントン舞蹈病、筋萎縮性遅発性硬化症、多発性硬化症、アルツハイマー病である請求項39の方法。

【請求項41】

上記ニューロパシーが軸索の変性である請求項38の方法。

10

【請求項42】

上記ニューロパシーが脱ミエリン化ニューロパシーである請求項38の方法。

【請求項43】

上記損傷した神経回路が腫瘍性病変によるものである請求項30の方法。

【請求項44】

上記腫瘍性病変が神経芽腫またはグリオマーによって起こるものである請求項43の方法。

【請求項45】

上記モルフォゲンが上記回路で特定される細胞において細胞接着分子の生産を促進させるところの請求項30の方法。

20

【請求項46】

上記細胞接着分子が神経細胞接着分子であるところの請求項45の方法。

【請求項47】

神経細胞接着分子がN-CAM-120、N-CAM-140、N-CAM 180からなる群から選択されたものである請求項46の方法。

【請求項48】

上記モルフォゲンがOP-1、OP-2、CBMP2、Vgl(fx)、Vgr(fx)、DPP(fx)、GDF(fx)、60A(fx)からなる群から選択された配列の一つと少なくとも70%のアミノ酸配列ホモロジーを有しているものからなる請求項30または45の方法。

【請求項49】

上記モルフォゲンがOP-1、OP-2、CBMP2、Vgl(fx)、Vgr(fx)、DPP(fx)、GDF(fx)、60A(fx)からなる群から選択された配列の一つと少なくとも80%のアミノ酸配列ホモロジーを有しているものからなる請求項48の方法。

30

【請求項50】

上記モルフォゲンが配列表配列番号5(hOP-1)の残基43-139で定義された配列と60%以上のアミノ酸配列の同一性を持つアミノ酸配列からなるものである請求項49の方法。

【請求項51】

上記モルフォゲンが配列表配列番号5(hOP-1)の残基43-139で定義された配列と65%以上のアミノ酸配列の同一性を持つアミノ酸配列からなるものである請求項50の方法。

【請求項52】

上記モルフォゲンが配列表配列番号5(hOP-1)の残基43-139で定義されたアミノ酸配列であって、その対立形質および種変異体を含むものからなるものである請求項51の方法。

40

【請求項53】

上記モルフォゲンが配列表配列番号16のヌクレオチド1036-1341または配列表配列番号20のヌクレオチド1390-1695まで定義されたDNA配列と厳密な条件でハイブリダイズする核酸によってコードされたポリペプチド鎖からなるものである請求項1、2、30または46の発明。

【請求項54】

上記モルフォゲンが、モルフォゲンファミリーまたは対立型、種特異型またはその他配列の変異体のプロドメインからなるペプチドとコンプレックスを形成した二量体蛋白質種

50

からなるものである請求項1、2、26、30、45または51の発明。

【請求項55】

上記二量体モルフォゲンが、上記ペプチドと非共有的に結合したものである請求項54の発明。

【請求項56】

上記二量体モルフォゲンが、上記の2ペプチドと結合したものである請求項54または55の発明。

【請求項57】

上記ペプチドが少なくとも、上記プロドメインを特定する配列の少なくとも最初の18アミノ酸からなる請求項54または55の発明。

【請求項58】

上記ペプチドが上記プロドメインの全長型である請求項57の発明。

【請求項59】

上記ペプチドが配列表配列番号16のヌクレオチド136-192または配列表配列番号20のヌクレオチド157-211で定義されたDNA配列と厳密な条件でハイブリダイズする核酸によってコードされたポリペプチド鎖からなるものである請求項54または55の発明。

【請求項60】

上記コンプレックスが塩基性アミノ酸、界面活性剤、キャリアー蛋白質で安定化されているものである請求項54または55の発明。

【請求項61】

神経回路を特定する細胞に内因性モルフォゲンの生産を促進させることができる物質の有効量を哺乳動物に投与することからなる哺乳動物で神経回路を維持する方法。

【請求項62】

以下のことからなる哺乳動物の損傷部位に神経回路の再生を促進させるための組成物；
インビボでその部位に蛋白質を保持させるために、適切な生体内適合性、生体内吸収性キャリアーおよび、

上記キャリアーに散布し上記損傷部位に供給した時上記のモルフォゲンのようなモルフォゲンが上記部位に神経回路の再生促進させる。

【請求項63】

上記キャリアーが軸索の成長の方向性を助けるために構造的に充分であるところの請求項62の組成物。

【請求項64】

上記キャリアーが高分子材料である請求項63の組成物。

【請求項65】

上記キャリアーがラミニンまたはコラーゲンである請求項63の組成物。

【請求項66】

神経回路の切断部を修復するための器具であって下記の内容からなる器具：

生体内適合性のあるチューブ状ケーシングが内部表面と外部表面にあり神経突起が再生する回路を特定し、上記器具はなめらかで神経経路の切断を覆うために十分な容積を持ち、切断神経の末端をその開口部に受入れ、そして

上記チューブ状管によって特定できる回路にモルフォゲンを散布し、神経経路の切断を特定する切断された神経を補助し、モルフォゲンが神経経路の再生を促進するように、上記回路に配置した場合に上記神経末端を補助することができる。

【請求項67】

上記モルフォゲンが、インビボでの部位に蛋白質を保持するために適した生体内適合性、生体内吸収性キャリアーと共に上記導管に散布されるところの請求項66の器具。

【請求項68】

上記キャリアーが、上記導管内で軸索成長の方向性を補助するための十分な構造をとるところの請求項67の器具。

【請求項69】

10

20

30

40

50

上記ケーシングの外部表面が基本的に不浸透性である請求項67の器具。

【請求項70】

上記キャリアーがポリマーである請求項66の器具。

【請求項71】

上記キャリアーがラミニンまたはコラーゲンである請求項67の器具。

【請求項72】

神経由来の形質転換細胞の細分化を誘導するための方法であって、下記のステップからなる方法：

非形質転換神経細胞に特徴的な形態へ上記細胞の再分化を誘導するために十分な濃度と時間モルフォゲン組成物を上記形質転換細胞に接触させる。

【請求項73】

上記非形質転換神経細胞に特徴的な形態が神経突起の外成長の形成を含む請求項72の方法。

【請求項74】

上記非形質転換神経細胞に特徴的な形態が細胞凝集と細胞接着を含む請求項72の方法。

【請求項75】

上記モルフォゲン組成物が上記細胞において神経細胞接着分子の生産誘導である請求項72の方法。

【請求項76】

上記誘導神経細胞接着分子がN-CAM-180、N-CAM-140、N-CAM-120請求項72の方法。

【請求項77】

上記形質転換細胞がニューロblastomaである請求項72の方法。

【請求項78】

哺乳動物のニューロパシーの検出のためと哺乳動物のニューロパシーを処置するための治療の有効性の評価とのキットであって、以下からなるキット：

- a) 哺乳動物から得られた細胞または体液サンプルを採取するための手段；
- b) 結合蛋白質-モルフォゲンコンプレックスの形成のために上記サンプルにモルフォゲン特異的に結合する結合蛋白質；
- c) 上記コンプレックス検出手段

【請求項79】

上記結合蛋白質がモルフォゲンのプロドメインの一部または全部によって特定されたエピトープに特異性を有している請求項78のキット。

【請求項80】

哺乳動物のニューロパシーを検出するための方法であって、以下のステップからなる方法：

上記哺乳動物血清または脳脊髄液中のモルフォゲンの生理学的濃度の変動を検出し、上記変動を神経細胞死の増加の指標とする。

【請求項81】

哺乳動物のニューロパシーを検出するための方法であって、以下のステップからなる方法：

上記哺乳動物血清または脳脊髄液中のモルフォゲン抗体のタイターの出現濃度の変動を検出し、上記変動を神経細胞死の増加の指標とする。

【請求項82】

上記ニューロパシーが神経変性疾患、神経脱ミエリン化、ミエリン機能不全、神経性腫瘍、神経損傷等によるものである請求項78、80または81の発明。

【請求項83】

以下のステップからなる組織中の細胞接着分子の生産促進の方法

上記組織の細胞の細胞接着性分子の生産を誘導するために十分な濃度と時間上記組織にモルフォゲンを供給する。

【請求項84】

10

20

30

40

50

上記細胞接着性分子が神経細胞接着分子である請求項83の方法。

【請求項 8 5】

上記細胞がニューロンである請求項84の方法。

【請求項 8 6】

上記モルフォゲンがOP-1、OP-2、CBMP2、Vgl(fx)、Vgr(fx)、DPP(fx)、GDF(fx)、60A(fx)からなる群から選択された配列の一つと少なくとも70%のアミノ酸配列ホモロジーを有しているものからなる請求項78、80または81の方法。

【請求項 8 7】

上記モルフォゲンがOP-1、OP-2、CBMP2、Vgl(fx)、Vgr(fx)、DPP(fx)、GDF(fx)、60A(fx)からなる群から選択された配列の一つと少なくとも80%のアミノ酸配列ホモロジーを有しているものからなる請求項86の方法。

10

【請求項 8 8】

上記モルフォゲンが配列表配列番号5(hOP-1)の残基43-139で定義された配列と60%以上のアミノ酸配列の同一性を持つアミノ酸配列からなるものである請求項87の方法。

【請求項 8 9】

上記モルフォゲンが配列表配列番号5(hOP-1)の残基43-139で定義された配列と65%以上のアミノ酸配列の同一性を持つアミノ酸配列からなるものである請求項88の方法。

【請求項 9 0】

上記モルフォゲンが配列表配列番号5(hOP-1)の残基43-139で定義されたアミノ酸配列であって、その対立形質および種変異体を含むものからなるものである請求項89の方法。

20

【請求項 9 1】

上記モルフォゲンが配列表配列番号16のヌクレオチド1036-1341または配列表配列番号20のヌクレオチド1390-1695まで定義されたDNA配列と厳密な条件でハイブリダイズする核酸によってコードされたポリペプチド鎖からなるものである請求項78、80または81の方法。

【請求項 9 2】

脳血液関門を通過する上記モルフォゲンの移送を促進することのできる分子に結合したモルフォゲンからなる、瀕死の神経細胞の生存性を増強するための組成物。

【請求項 9 3】

上記キャリアーが脳組織由来細胞外マトリックスである請求項62または67の発明。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、インビボで神経細胞の生存性を増強する方法、およびインビボで神経回路を維持するための方法、組成物と器具に関する。

【0002】

本発明は、瀕死の細胞の生存性を促進させる方法であって、神経の母細胞を形質転換させて再分化させるための方法を包含する方法、および分化した神経細胞に形質発現を維持させるための方法を提供する。さらにまた、本発明は、傷害を受けた神経回路を修復するための手段を提供する。この手段には長い距離にわたる軸索の成長を促進するための方法を含んでおり、さらに免疫学的に関連している神経組織傷害を軽減するための方法を提供するものである。本発明の代表的な実施態様としては、細胞中の細胞接着性分子の発現であって、特に神経細胞中の神経細胞接着性分子の発現を促進する方法を提供するものである。最終的には、本発明は神経組織の鬱血状態を評価し、哺乳動物における神経系の機能不全を評価するための手段を提供するものである。

40

【背景技術】

【0003】

哺乳動物の神経系は、末梢神経系(PNS)および中枢神経系(CNS、脳および脊髄からなる)からなっており、二種類の代表的な細胞から構成されている。これはニューロンとグリア細胞である。グリア細胞はニューロンの間を満たしており、それを保護し、その機能

50

を調節している。PNS中のシュワン細胞とCNS中の寡突起神経膠細胞のような、ある種のグリア細胞は、神経軸索を取り巻き、保護している保護性ミエリン鞘を形成する。神経軸索は、ニューロン細胞本体から延びて、ニューロンの電気的なインパルスを伝達してゆく突起である。末梢神経系では、複数のニューロンの長軸索が束になって、神経または神経繊維を形成している。次にこれらが何本か組みあわせて、神経束になる。ここにおいて神経繊維は、神経内の血管補充と一緒に、保護性の複層式鞘を結合させたゆるやかなコラーゲンマトリックス中に埋め込まれた状態の神経束を形成している。中枢神経系では、ニューロン細胞本体は、これらのミエリン鞘化された突起とは視覚的に見分けがつく。そして夫々灰色と白の物質として言及されている。

【0004】

成長中には、中枢神経系と末梢神経系からの分化したニューロンは、軸索を発生させる。この軸索は成長し、目的の標的細胞に接続する。ある場合には、成長した軸索は、相当な距離までとどく必要がある。あるものは、末梢にまで成長してゆくものに対して他のものは中枢神経系中にとどまる。哺乳動物において、神経発生の段階は、胎芽期間に完成し、神経細胞は、一旦十分に分化すると増殖することはない。

【0005】

従って、例えばニューロンが機械的あるいは化学的損傷を受けた場合、さらにはまた回路を形成するニューロンを死の危険にさらすに十分な神経病変が起こった場合は、哺乳動物の神経系は、特別に危険な状態になる。ある亜集団または末梢或いは中枢神経系において神経の系統のみに影響を与えるような多くの神経病変（ニューロパシー）が、今日までに認識されている。神経細胞それ自身またはそれに付随するグリア細胞が影響を受けているニューロパシーは、細胞代謝機能不全、感染、毒性物質に対する露出、自己免疫性機能不全、栄養不全あるいは虚血などの原因によって起こる。それ以外にも、細胞の機能不全が直接的な細胞死を誘発することがあると考えられている。その他の場合として、ニューロパシーは、生体の免疫/炎症系を促進することで完全な組織壊死を引き起こすと考えられている。さらに最初の神経性障害に対する免疫応答メカニズムが、ニューロンおよびこれらのニューロンによって特定されている神経伝達系を破壊する。

【0006】

現在、これらのニューロパシーによって引き起こされた下記の損傷を修復するための、満足すべき方法は存在していない。この損傷としては多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、ハンチントン舞蹈病、アルツハイマー病、パーキンソン病（パーキンソン症）および肝性脳症のような代謝由来疾患などがある。近年、激しい外傷性病変あるいは脳および/または脊髄の神経変性病変を阻止することを目的とする、欠失したり、欠損のあるニューロンを機能的に他のものと換えるか、またはそのようなニューロンを補償するような試みにおいて、胎児ニューロンの移植が今日迄では第一義的なものとなっている。しかし、ヒト胎児細胞の移植研究は厳しく制限されている。さらにまた神経成長因子およびインシュリンライクグロースファクターのような神経栄養因子を投与することによってCNS内の神経成長を促進させることが提案されている（例えば、特許文献1および非特許文献1参照）。CNSに神経栄養因子を投与するには、血液脳関門（blood-brain barrier）を通過させる必要がある。バリアーは、直接注入によって、または化学的な変性や抱合のような、バリアー通過を促進するために分子を変性することによって、または分子トランケーションによって通過させることができる。さらにシュワン細胞が、損傷を受けた神経突起の成長を促進し、維持することを目的にCNS病変部位に移植されている。（例えば、非特許文献2参照）。

【0007】

神経経路障害は、CNSの軸索の障害によりおこるものの場合、自己末梢神経の移植が、中枢神経系の病巣をつなぎ合わせ、その正常なターゲット領域に軸索を戻させている。CNSニューロンとは対照的に、末梢神経系ニューロンは、軸索性の障害に反応して新しい末梢突起を伸長させることができる。末梢神経系軸索のこの再生機能があることは、CNS軸索に対する脊髄分節の移植を可能にするものと予想される。しかしながら、好ましい移植

10

20

30

40

50

は、細胞本体に近接して得られる満足すべき移植に関係した複数の因子によって制限されている。この制限因子としては、バイパスを形成させるべきCNSの軸索障害の長さ、CNS神経性細胞本体から移植部位への距離がある。

【0008】

末梢神経系においては、ニューロンの細胞再生機能は、ダメージを受けた神経回路に対して機能修復する能力に限定されている。特に、新しい軸索は、ランダムに伸長し、しばしば方向を誤まり、そして異常な機能を引き起こすような不適切なターゲットに接続することがある。たとえば、自律神経が障害を受けた場合、再生した軸索は、麻痺をもたらす誤った筋肉に接続する場合がある。さらに切断された神経突起が、数ミリメートル以上、例えば10mm以上の長さのギャップを形成する場合、好ましい神経再生とはならず、神経突起が必要な長さに伸長しないか、方向違いの軸索の伸長となる場合がある。外科的な手法によって末梢神経の障害を修復する試みは、特に障害が広い範囲にわたる場合には色々な結果が生じる。場合によっては、切断された神経末端の適切な配列を得るために行われる縫合操作は、軸索の再生を阻害すると考えられる傷痕組織の形成を促進する。たとえ傷痕の組織形成が元に戻ったとしても、神経案内通路あるいはそれ以外の管状プロテーゼを用いる場合、再生がうまくゆくのは一般的に、10mm以下の長さの神経損傷に限られている。さらに、末梢ニューロンの修復能力は、障害やニューロパシーが細胞本体自身に影響を与えるか、あるいはまた末端軸索の拡大性変性をもたらす場合には極端に抑制されてしまう。

10

【0009】

さらにまた、哺乳動物の神経回路は腫瘍性の病巣によって引き起こされる障害によってもリスクにさらされる。ニューロンとグリア細胞両方の異常増殖が確認されている。一般的には、神経由来の形質転換細胞は、正常な分化した細胞のしめす機能を喪失しており、そしてその機能喪失によって神経回路を破壊する。さらに腫瘍の増殖は、正常な神経組織を破壊し、神経を圧迫して経路の阻害を行い、脳脊髄液や血液の通過を阻害し、および/または生体の免疫反応を促進することによって、病巣を発生させる。さらにまた、脳および脊髄内の腫瘍性病巣の重要な原因である転移性の腫瘍は、神経回路に障害を与え、神経細胞の死を引き起こす。

20

【0010】

神経細胞の成長、分化および発達に関連のある形態形成正常化分子の一つのタイプは細胞接着性分子(CAM)であり、特に特徴的なものとして神経細胞接着性分子(N-CAM)である。CAMは免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、特異的な結合即ち並んでいる細胞同士の間でCAM-CAM結合を通じて、発達中のそして成熟した組織内での細胞と細胞のインターアクションを媒介している。現在までに多くの異なるCAMが特定された。これらの内で、もっとも徹底して研究されたものはN-CAMとL-CAM(肝臓細胞接着分子)であり、いずれも様々な成熟した組織におけると同様に、発達の初期段階における全ての細胞から同定された。神経組織の発達において、N-CAMの発現は、組織形成、神経の遊走、神経・筋肉組織接着、網膜形成、シナプス形成そして神経変性等において重要であると考えられている。さらにまた、N-CAMの発現の低下は神経機能不全と係わっていることが予想されている。例えば、少なくとも1つのN-CAM、N-CAM-180型の発現は、ミエリン形成不全マウスで低下している(例えば、非特許文献3参照)。またN-CAMのレベルの低下は正常な圧力の水頭症と関連付けられており(例えば、非特許文献4参照)、タイプII精神分裂病についても同様である(例えば、非特許文献5参照)。さらに、N-CAMに対する抗体は、障害を受けた神経の機能回復を妨げることが確認された(例えば、非特許文献6参照)。

30

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】米国特許第5,093,317号

【非特許文献】

【0012】

50

- 【非特許文献 1】Lundborg,1987,Acta Orthop. Scand. 58:145-169
 【非特許文献 2】Paino et al.,1991,Exp.Neurology,114(2):254-257
 【非特許文献 3】Bhat,1988,Brain Res.,452:373-377
 【非特許文献 4】erdelin,1989,ActaNeurol. Scand.,79:177-181
 【非特許文献 5】Lyons et al.,1988,Biol. Psychiatry,23:769-775
 【非特許文献 6】Remsen,1990,Exp.Neurobiol.110:268-273

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明の目的の一つは、哺乳動物において死のリスクを持つニューロンの生存性を増強するための方法を提供することである。さらに別の目的は、物理的・化学的外傷、ニューロパシーまたは腫瘍性病巣等による神経組織の損傷またはそれに続くダメージの危険にさらされている神経回路をインビボで維持するための方法を提供することにある。さらに別の目的は、末梢神経系の神経回路のギャップを修復するための組成物または器具を提供することにある。さらにその他の目的としては、神経回路を特徴付けている形質転換細胞であって特に神経由来の形質転換細胞を再分化させるための手段を提供することである。別の目的は細胞におけるCAMの発現であって、特にN-CAMの発現を促進するための方法を提供することにある。さらにまた別の目的は神経組織、血清および/または脳脊髄液中に存在する蛋白質のレベルの変動をモニターすることによって神経組織の状態をモニタリングする方法を提供することである。本発明のこれらの目的と方法は以下に示す説明、図およびクレームから明白となるはずである。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は、神経細胞の生存性を増強するための方法を含み、インビボで哺乳動物の神経回路を維持するための方法と組成物を提供する。

【0015】

一つの態様では、本発明は、神経回路の障害あるいはこのような障害が予見される場合に対して、障害を受けた経路の修復あるいはそれらが層のダメージを抑制することを含む神経回路を維持するために十分な濃度と回数で、ここに定義する形態形成蛋白質（モルフォゲン）の治療上有効な量を哺乳類に投与するためのステップからなる治療方法および組成物を特徴としている。

【0016】

別の態様において、本発明は組成物および治療方法を特徴としており、この治療法と組成物とは、神経回路に障害を有しているかまたはこのような障害をうけることが予見されている。哺乳類に対して特定の化合物を投与することを含むような、ダメージを受けた神経回路を修復したり、ダメージの進行を抑制することを含むインビボで哺乳類の神経回路を維持するためのものである。上記の化合物は、哺乳類の生体において神経回路を保持するために十分な内因性のモルフォゲンの治療上有効な濃度を誘発するようなものである。これらの化合物は、ここではモルフォゲン促進剤と呼び、哺乳動物に投与した場合に、モルフォゲンを生産するかまたはモルフォゲンの生産が可能でありおよび/またはモルフォゲンを分泌する組織や臓器に作用する物質を包含するものであり、または、モルフォゲンの生体内濃度を変化させるものであると理解される。

【0017】

例えばこの薬剤は内因性モルフォゲンの発現および/または分泌を刺激することにより作用する。

【0018】

特に、本発明は瀕死のニューロンの生存を増強するための方法を提供するものであり、神経の傷害に対する生体の免疫/炎症反応に関連した組織破壊性の作用からニューロンを保護する方法を含んでいる。さらにまた、本発明は分化した表現型を維持するようにニューロンを刺激するための方法を提供するものであり、神経由来形質転換細胞を再分化させて非

形質転換ニューロンの形態学的特性を示すように誘導する方法を含んでいる。一つの実施態様において、本発明は細胞内の細胞接着分子、特にニューロンの神経細胞付着分子(N-CAM)の生産を促進するための手段を提供する。さらにまた、本発明は障害を受けたニューロンと神経回路の細胞修復を促進する方法、組成物、器具を提供する。この修復促進は、末梢および中枢神経系の障害を受けた軸索を再生させることをふくんでいる。さらにまた、本発明は哺乳動物の血清または脳脊髄液に存在するモルフォゲンや内因性モルフォゲン抗体の濃度の変動をモニターすることによって、哺乳類の神経組織の状態を評価したり、ニューロパシーを検出してモニターするための手段を提供するものである。

【0019】

ここに使用する"神経回路"とは、刺激側から標的細胞側へ電気的信号を通過させるための神経回路を意味している。回路とは、電気的インパルスが伝達されるニューロンを含み、相互接続しているニューロンの群、さらに束ねられた状態の神経軸索によって形成されている神経繊維およびニューロンを取り巻き、ニューロンに関係したグリア細胞を含むものである。

【0020】

本発明の実施態様において、ここに説明するモルフォゲンは末梢神経系の障害を受けた神経回路の修復に有用である。特に、モルフォゲンは障害を受けた回路を修復するために有用である。この回路としては、神経それ自身または神経とシナプス後細胞のギャップを長い距離にわたって橋渡しして、神経突起とくに軸索の再生をさせることが必要な切断や障害を受けた神経繊維(神経)をも含む。特にここで述べられているモルフォゲンは、保護性ミエリン鞘の脈管形成と再構成を含む完全な軸索性神経再生を促進できるものである。モルフォゲンは、好ましくは投与部位においてモルフォゲンを保持できる生体内適合性であって生体吸収性のキャリアー物質中に分散させて、障害の部位に供給される。そして必要な場合には、切断されたニューロンまたは神経の近位側から遠位末端側に、軸索の成長が向かうような方法で供給される。例えば軸索の成長を方向づける方法は、10mm以上の長い距離にわたって神経再生を誘導させる場合に必要であるかもしれない。これらの機能を備えた多数のキャリアーが想定されている。例えば有用なキャリアーとしては、以下に示すような基本的に不溶解性の物質または以下に開示されているように調製された粘性溶液を含む。これらは、ラミニン、ヒアルロン酸、コラーゲン、あるいはポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ酪酸および/またはこれらの共重合体のような適当な合成された生体内適合性のあるポリマー物質である。最近供給されているキャリアーとしては、現在好まれている実例を上げると、例えばマウスザルコマー細胞由来の細胞外マトリックス組成物がある。また特に有用性が予想されるものとしては、脳組織由来細胞外マトリックスがある。

【0021】

特に好ましい実施態様としては、モルフォゲンは障害を受けた回路の距離にまたがっている神経案内導管中にモルフォゲンが分配する器具の部品として局所投与される。回路は、軸索のような神経突起の成長を誘導するために、保護的なカバーとして、そして物理学的手段としても作用する。有用な回路は、生体内適合性膜またはケーシングからなっており、チューブ状構造をとり、修復される神経のギャップまたは切断箇所を結びつけるのに十分な大きさを有しており、分断された神経末端を受け入れるために開口されている。ケーシングまたは膜はシリコンのような生体内適合性で、非刺激性の素材またはポリエチレンやポリエチレンビニール酢酸のような生体内適合性ポリマーで作られる。さらにまた、ケーシングは、例えばコラーゲン、ヒアルロン酸、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ酪酸を含む生体内適合性、生体吸収性ポリマーから構成される。

【0022】

特に好ましい実施態様としては、回路の外部表面は基本的には不浸透性である。

【0023】

モルフォゲンは生体内適合性のキャリアー物質を使用して導管中に分配される。この場合モルフォゲンが、分断された神経の末端に接触できるように、米国特許5,011,486号に

10

20

30

40

50

記載されたように、ケーシングの内部表面に吸着させるかまたはその他の方法で結合させておく必要がある。さらに、ここに述べた神経案内導管は、一般的には形状としてはチューブ状であれば、種々の異なった形状を採用できることは当業者には明白である。案内導管の内腔が、例えば断面では長円形または方形であっても良い。さらに案内導管が、神経切断端を結び付けるように2またはそれ以上のパーツをつなぎあわせて構築されていても良い。神経の末端は、フィブリングルーのような生体内適合性のある接着物質による縫合手段か、あるいはまた医学的な技術として公知の手段によって、神経案内導管を確実に結合させておく。

【0024】

またここに述べたモルフォゲンは、障害を受けたりまたは分離した網膜、視神経に対するその他の障害の修復のように、中枢神経系内に障害を受けた神経回路のバイパスを形成させるために、自己の末梢神経分節を移植する際に有用であると推測される。ここでモルフォゲンは移植部位で軸索の成長を促進させるために接続部位に投与される。特に、バイパスを形成させるべきダメージを受けた軸索の分節が、神経細胞本体から離れて発生する場合に投与される。

【0025】

さらにまた、ここで述べたモルフォゲンは、瀕死の神経細胞の生存性を増大させ、それによって神経回路に対するダメージを予防し、限定しあるいは抑制するのに有用である。非有糸分裂性のニューロンは、死のリスクをもっており、この死はニューロバシの結果、または細胞死を誘発するニューロンあるいはグリア細胞の機能不全によって起こるか、細胞またはその細胞を取り巻く組織に対する化学的または物理的傷害に引き続いておこる。化学的な傷害は公知の毒性物質に由来しており、この毒性物質はタバコの煙と阿片中の毒性物質と同様に鉛、エタノール、アンモニア、ホルムアルドヒドおよび複数の有機溶媒を含むものである。さらにまたグルタミン酸塩のような興奮性アミノ酸もまた、神経細胞死の原因として作用している (Freese et al., 1990, Brain Res., 521:254-264)。神経細胞死もまた、多くの神経変性疾患において明らかな寄与因子になると考えられている。神経変性疾患にはアルツハイマー病、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、筋萎縮性遅延型硬化症、多発性硬化症等がふくまれる。これらのニューロバシの病因は、肝性脳症性、感染性、毒物性、自己免疫性、栄養あるいはまた虚血性などを原因とする代謝性のものと考えられる。さらにエタノールといくつかの毒物は、神経変質性疾患においては明らかな寄与性因子であるとして確認されている。ここで述べているモルフォゲンは、瀕死の細胞に対して、それらの細胞の生存性を増大させて、神経回路の完全性を保護するために投与することができる。モルフォゲンはその部位に直接投与するか、または全身的に投与することもできる。さらにまた、上記に示したように、好ましくは目的とする神経組織に關与している細胞内において、内因性のモルフォゲンの発現および/または分泌を促進する物質を哺乳動物に投与することができる。

【0026】

本発明の別の実施態様において、開示されている方法は、モルフォゲン処置細胞が非形質転換細胞の形態学的特性を示すように、形質転換細胞、特に神経またはグリア細胞由来の形質転換細胞を再分化させるために有用である。形質転換細胞が神経由来の細胞である場合、モルフォゲン処理は好ましくは細胞を丸くし、細胞を凝集させ(クラumpingさせ)細胞-細胞の接着をおこさせ、神経突起の外成長と伸長を引き起こし、N-CAMを生産させる。ここで述べた方法で、基本的に神経組織中で神経細胞腫瘍の発生および/または増殖を阻害または減少させることが期待されている。本発明の方法は、網膜芽腫、神経芽腫、神経膠腫、神経膠腫等の神経組織由来の種々の腫瘍の作用を基本的に抑制する目的に有用であろうことが予測される。さらに本方法は、転移性組織によっておこる腫瘍性の病変を抑制する目的にも有効であると考えられる。転移性腫瘍はCNSの最も普通の腫瘍の一つであって、血流を介して頭蓋内室へ到達する。転移性腫瘍は、例えば正常神経組織の構造を破壊し、神経を圧迫し、脳組織に栄養供給している脳脊髄液や血液の流れをブロックし、および/または生体の免疫反応を促進することによって、神経回路に障害を与える。

10

20

30

40

50

【0027】

本発明の別の実施態様において、ここに述べたモルフォゲンは、神経組織に最初におこる損傷に対する生体の免疫/炎症反応に由来した神経回路の傷害を緩和するための、神経保護効果を提供する目的に有用である。このような反応は、神経組織の損傷にひきつづいて起きる。神経組織の損傷はたとえば自己免疫性機能不全、腫瘍性病巣、感染、化学的または物理的外傷、ニューロンまたはグリア細胞への血流の停止による疾患（例えば虚血性または低酸素性によるもの）さらには神経あるいは神経周囲の器官に対する傷害などによって起きる。例えば、閉塞性卒中のように神経への血液供給が閉塞したことによっておこる低酸素または虚血-再灌流によっておこる一次的な傷害は、免疫的に発生すると考えられている。さらに多くの初期的な脳腫瘍に伴う傷害の少なくとも一部分は、免疫学的に

10

【0028】

本発明のさらに別の態様では、ここに説明した発明は、ニューロンにその発現型を発現させ続けることを含む、分化型ニューロンの成長と維持を支援するための方法をも提供する。この活性は、神経組織の疾病の治療に特に有用であると考えられる。神経組織の疾病とは、細胞加齢によって発生し、アルツハイマー病で明らかにされていると考えられているような、細胞の代謝機能を減少または喪失、さらに細胞が老化し静止した状態になることによって発生する機能喪失をさす。治療されるべきに細胞に直接モルフォゲンを投与したり、非経口的にまたは経口的に投与することによって行う全身的供給は、あきらかに細胞代謝機能不全の作用を抑制および/または逆転させ、それによってリスクを持った神経回路を維持することによって、これらの細胞にその発現型を発現させ続けるように促進する。さらにまた、インビボで内因性モルフォゲンの発現および/または分泌を促進できる物質の投与も行っても良い。

20

【0029】

本発明のさらに別の態様では、本発明は細胞内のCAMの発現レベル、特にニューロン中のN-CAM発現を促進するための方法を提供する。CAMは組織形成のために必須の細胞-細胞間のインターアクションを行わせる分子として特定される。CAMは組織境界形成、胚誘導および遊走を含む組織発達と組織の安定化と再生において、基本的な制御作用を担っていると考えられている。CAMのレベル変化は先天性疾患、腫瘍および変性疾患を含む組織変性の多くに関連している。

30

【0030】

特に、N-CAMの発現は、網膜形成、シナプス形成および神経-筋肉組織接着を含む正常な神経細胞の発達と分化に関係している。N-CAMの異性体の1またはそれ以上の抑制は、正常な組織の発達を抑制することが知られている。N-CAM発現レベルの変化は、正常な内圧の水頭症とタイプIIの分裂病を含む複数のニューロパシーと同様に、神経芽腫を含む腫瘍と関係している。治療するべきに細胞に直接モルフォゲンを投与したり、非経口的にまたは経口的に投与することによって行う全身的供給は、1またはそれ以上のCAM、特にN-CAMの細胞性発現を誘導する目的で使用することができる。さらにまた、インビボでのモルフォゲンの発現および/または分泌を刺激するような物質を、好ましく傷害の部位に投与して、CAMの生産を誘導することができる。

40

【0031】

CAMはまた、形質形成制御経路の一部であると仮定されている。この経路の活性は、まだ特定されていない分子によって誘導される（Edelman, G.M., 1986, Ann. Rev. Cell Biol.,

50

2:81-116を参照のこと)。どの特定のセオリーに制限されることなく、ここで説明したモルフォゲンはこの経路の物質として作用する。

【0032】

最終的に、内因性モルフォゲンレベルの変化は神経組織の機能不全を検出する方法の一部としてモニターすることができる。特に内因性モルフォゲンレベルの変化は、神経組織の変化を反映しているものと予想される。モルフォゲンの発現はバイオプシーした細胞、脳脊髄液、血清から直接測定できる。さらにまた、モルフォゲンレベルはモルフォゲンに対する内因性抗体のレベル変化を検出することで評価できる。例えば、哺乳動物から血清サンプルを採取し、先行技術として公知の標準的な蛋白質検出手段によって溶液中のモルフォゲンまたは抗体の含有量を検出できる。一例としては、抗モルフォゲン抗体のような目的のモルフォゲンに特異的に作用する結合蛋白質は、標準的なイムノアッセイにおいてモルフォゲン検出の目的に使用可能である。検出されたモルフォゲンレベルは、検出レベルの変化をもちいて組織の状態を示すために、あらかじめ決定された標準または参照レベルと比較することができる。

10

【0033】

本発明の好ましい実施態様において、モルフォゲンまたはモルフォゲン促進剤は、経口または非経口的に全身的に投与される。本発明のその他の実施態様では、モルフォゲンは脳脊髄液または神経組織内に注入することによって神経組織に直接投与できる。

【0034】

本発明のどの治療方法においても、「モルフォゲンの投与」とはモルフォゲン単独またはそれ以外の分子と組み合わせて投与することを示している。例えば、モルフォゲンの成熟型は、プレカーサである「プロ」ドメインを含む形で供給されるが、これは蛋白質の溶解性を促進することが知られている。蛋白質の溶解性を促進することが知られているその他の有用な分子としては、種々の血清蛋白質と同様にカゼインおよび乳成分が含まれる。モルフォゲンまたはモルフォゲン促進剤に関連したその他の有用な分子としては、神経組織に対してモルフォゲンまたはモルフォゲン促進剤を直接送り込むことのできる組織ターゲティング分子が含まれる。本発明の治療プロトコールにおいて有用であると考えられる組織ターゲティング性分子としては、抗体、抗体フラグメントあるいは神経組織細胞の表面分子と特異的に作用する結合性蛋白質が含まれる。

20

【0035】

また別の有用な組織ターゲティング分子はモルフォゲンのプレカーサ、「プロ」ドメイン、特にOP-1またはGDF-1の「プロ」ドメインの一部または全部である。これらの蛋白質は天然には神経組織に関連して見出されるが、その他の組織で合成されて、そして合成された組織から分泌後に神経組織に移送される。例えば、この蛋白質は骨組織中で活性であることが見出されており、OP-1合成の一次ソースは泌尿器系の組織（腎臓および膀胱組織）であるらしい。第二の発現レベル箇所は脳、心臓、肺（下記）にあることがわかっている。さらにこの蛋白質は血清、唾液、種々の乳中から分離されている。さらにこの蛋白質の分泌型は、完全型のモルフォゲン配列のプロドメインと共に成熟型二量体からなっている。従って関連したモルフォゲンのプロドメインはインビボでは異なった組織に特異的なモルフォゲンを輸送するために作用している。

30

40

【0036】

さらにまた関連した組織ターゲティングあるいは溶解性-増強分子は、酸-不安定性結合をもっていて、一般的な化学的手段でモルフォゲンに共有的に結合している。この結合は、骨の再構成部位の酸性条件下において選択的に切断される。

【0037】

最後に、ここで提供されるモルフォゲンまたはモルフォゲン促進剤は神経成長因子および抗炎症剤などを含む神経回路を維持するに有用であることが知られているその他の分子と組み合わせて投与することができる。

【0038】

モルフォゲンをCNSの障害を治療する目的で用いようとする場合には、付随的な問題を

50

考慮しなければならない。いわゆる血液脳関門と呼ばれている脳の毛細血管壁の構造を通過しなければならない。この構造は、血液中に存在する分子の種類を選別して、脳内への通過を予防する。血液脳関門は、脳内へのモルフォゲンまたはモルフォゲン促進剤の直接注入によって、効果的にバイパスさせることができる。さらにまたモルフォゲンまたはモルフォゲン促進剤は、血液脳関門を超えて移送されやすくするために修飾することもできる。例えば、モルフォゲンまたはモルフォゲン促進剤の切断型は最も有望と考えられる。

【0039】

さらにモルフォゲンまたはモルフォゲン促進剤は、より親油性に変更するために修飾することができ、また自然にバリアーを通過することのできるその他の分子と当業者には公知の標準的手段を用いて共有結合させることができる。このような技術としてはPardridge, *Endocrine Review* 7:314-330 (1980) や米国特許4,801,575に記載された技術を例示することができる。

【0040】

従って、モルフォゲンの機能的な「アナログ」の用語は、蛋白質が形態形成性の生物活性を有しているが、ここに定義したモルフォゲンと比較して付加的な構造的な違いを有するものをさす。例えばモルフォゲンの一部分が一般的でない付加的な化学成分を有しているものである。このような成分（例えば例を上げて示すと、アシル化、アルキル化、陽イオン化、グリコシル化反応あるいはその他モルフォゲンにこの成分を共有結合させるための手段）は分子の溶解性、吸収性、生物学半減期あるいは脳-血液バリアーを超えた移送などを改善すると考えられる。

【0041】

本発明における有用なモルフォゲン本来は骨形成蛋白質として特定される蛋白質である。OP-1、OP-2、およびCBMP蛋白質、同様なアミノ酸配列を持つ蛋白質として、DPP（ショウジョウバエ由来）、Vgl（ツメガエル由来）、Vgr-1（マウス由来、米国特許5,011,691、Opperman 他）、GDF-1（マウス由来、Lee (1991) *PNAS* 88: 4250-4254）、これらの蛋白質の配列は配列表配列番号5-14と表IIに示した）。そして最近60Aの蛋白質が特定された（ショウジョウバエ由来、配列表配列番号24、Wharton 他、1991、*PNAS* 88:9214-9218）。蛋白質のTGFスーパーファミリーのメンバーを含むこのファミリーのメンバーは、C末端領域のアミノ酸配列に高いホモロジーを有する。この蛋白質は、典型的には30残基より少ないN末端シグナルペプチド配列を持つ前駆体として翻訳され、次いで「プロ」ドメインとなり、それが切断されて成熟配列となる。シグナルペプチドは、翻訳後速やかに切断され、Von Heijneの方法（1986, *Nucleic Acids Research* 14:4683-4691）を用いて特定のアミノ酸配列を予想することができる。以下の表Iは、今日特定されている種々のモルフォゲンを示す。そのこゝで使用されている学名と配列番号、配列表に含まれない全長蛋白質のアミノ酸配列を記載した出典を示しているが、これらの文献の開示内容は、引用によって本発明と一体化されている。

（表1）

OP-1

OP-1蛋白質をコードするDNA配列の全てまたは一部から発現された形態形成活性蛋白質のグループを総称的にさす。対立形態型および種の変異型を含む。例えばヒトOP-1（hOP-1、配列表配列番号5、成熟蛋白質アミノ酸配列）マウスOP-1（mOP-1、配列表配列番号6、成熟蛋白質アミノ酸配列）保存された7個のシステイン骨格が配列表配列番号5、6の38から139番目の残基によって特定されている。蛋白質の全長をコードするcDNA配列と全アミノ酸が配列表配列番号16と17（hOP-1）および配列表配列番号18と19（mOP-1）に示されている。成熟蛋白質は残基293-431（hOP-1）と292-430（mOP-1）によって特定されている。そこが切断されることにより成熟蛋白質が得られる。蛋白質のプロ領域は開裂して、成熟で、形態形成活性を有する蛋白質を生じるが、本質的に残基30-292（hOP-1）と残基30-291（mOP-1）によって本質的に特定される。

OP-2

OP-2蛋白質をコードするDNA配列の全てまたは一部から発現された活性蛋白質のグループを総称的にさす。対立形質型および種変異型を含む。例えばヒトOP-2 (hOP-2, 配列表配列番号7、成熟蛋白質アミノ酸配列) マウスOP-2 (mOP-2, 配列表配列番号8、成熟蛋白質アミノ酸配列)。保存された7個のシステイン骨格が配列表配列番号7、8の38から139番目の残基によって特定されている。蛋白質の全長をコードするcDNA配列と全アミノ酸が配列表配列番号20と21 (hOP-2) および配列表配列番号22と23 (mOP-2) に示されている。成熟蛋白質は残基264-402 (hOP-2) と261-399 (mOP-2) によって特定されている。蛋白質のプロ領域は開裂して、成熟で形態形成活性を有する蛋白質が生じるが、本質的に残基18-263 (hOP-2) と残基18-260 (mOP-1) によって本質的に特定される。(両方のOP-2蛋白質とも上流21残基に別の開裂部位を有する。)

10

CBMP2

CBMP2蛋白質をコードするDNA配列から発現された形態形成活性蛋白質を総称的にさす。対立形質型および種変異型を含む。ヒトCBMP2A (CBMP2A (fx)) 配列表配列番号9、ヒトCBMP2B-DNA (CBMP2B (fx)) 配列表配列番号10。全長の蛋白質のアミノ酸配列はBMP2AおよびBMP2BあるいはBMP2およびBMP4として文献、Wozney, et al. (1988) Science 242:1528-1534に示されている。BMP2 (BMP2A) のプロドメインは残基25-248または残基25-282を含む。成熟蛋白質は残基249-396または残基283-396を含む。BMP4 (BMP2B) のプロドメインは残基25-256または残基25-292を含み成熟蛋白質は残基257-408または残基293-408を含む。

20

DPP (fx)

ショウジョウバエDPP 遺伝子によってコードされている蛋白質配列をさし、保存された7個のシステイン骨格 (配列表配列番号11) で特定される。全長の蛋白質のアミノ酸配列はPadgett, et al. (1987) Nature 325:81-84に示されている。プロドメインはシグナルペプチドの開裂箇所から残基456までである。成熟蛋白質の領域は残基457-588で特定されている。

Vgl (fx)

ツメガエルVgl 遺伝子によってコードされている蛋白質配列をさし、保存された7個のシステイン骨格 (配列表配列番号12) で特定される。全長の蛋白質のアミノ酸配列はWeeks (1987) Cell 51:861-867に示されている。プロドメインはシグナルペプチド開裂部位から残基246までである。成熟蛋白質は残基247-360で特定されている。

30

Vgr-1 (fx)

マウスVgr-1遺伝子によってコードされている蛋白質配列をさし、保存された7個のシステイン骨格 (配列表配列番号13) で特定される。全長の蛋白質のアミノ酸配列はLyons, et al. (1989) PNAS 86: 4554-4558に示されている。プロドメインはシグナルペプチド開裂部位から残基299までである。成熟蛋白質は残基303-438で特定されている。

40

GDF-1 (fx)

ヒトGDF-1遺伝子によってコードされている蛋白質配列をさし、保存された7個のシステイン骨格 (配列表配列番号14) で特定される。全長蛋白質に対するcDNAとコードされるアミノ酸配列が配列表配列番号32に示される。プロドメインはシグナルペプチド切断部位から残基2-14内までである。成熟蛋白質残基215-372で特定されている。

60A

60A蛋白質 (全長蛋白質に対するcDNAとコードされるアミノ酸配列が配列表配列番号24に示されている) をコードしているDNA配列 (ショウジョウバエ60A遺伝子) の一部または全部より発現された形態形成性活性蛋白質をさす。60A

50

(fx) は保存された7個のシステイン骨格(配列表配列番号24の残基354から455)で特定される蛋白配列をさす。プロドメインは、シグナルペプチド開裂部位から残基324までである。成熟蛋白質は残基325-455で特定される。

BMP3 (fx)

ヒトBMP3遺伝子によってコードされている蛋白質配列をさし、保存されている7個のシステイン骨格で特定される(配列表配列番号26)。全長の蛋白質のアミノ酸配列はWozeny et al. (1988) *Science*242: 1528-1534に示されている。プロドメインはシグナルペプチド開裂部位から残基290までである。成熟蛋白質は残基291-472で特定されている。

BMP5 (fx)

ヒトBMP5遺伝子によってコードされている蛋白質配列をさし、保存されている7個のシステイン骨格で特定される(配列表配列番号27)。全長の蛋白質のアミノ酸配列はCeleste, et al. (1991) *PNAS* 87: 9843-9847に示されている。プロドメインはシグナルペプチド開裂部位から残基316までである。成熟蛋白質は残基317-454で特定されている。

BMP6 (fx)

ヒトBMP6遺伝子によってコードされている蛋白質配列をさし、保存されている7個のシステイン骨格で特定された(配列表配列番号28)。全長の蛋白質のアミノ酸配列はCeleste, et al. (1990) *PNAS* 87: 9843-9847に示されている。プロドメインはシグナルペプチド開裂部位から残基374までである。成熟蛋白質は残基375-513で特定されている。

【0042】

OP-2蛋白質はこのファミリーのその他の蛋白質とおなじ保存されたシステイン骨格に加えて、この領域(配列表配列番号7および8の残基4)に付加的なシステイン残基を持つ。GDF-1蛋白質は保存された骨格(配列表配列番号14の残基44-47)に4個のアミノ酸が挿入されている。しかしこの挿入は、折りたたみ構造においてはシステインの相互関係を阻害しないようだ。さらにCBMP2蛋白質はシステイン骨格からアミノ酸残基1個が失われている。

【0043】

モルフォゲンは還元すると失活する。しかし、酸化してできるホモダイマーは活性だし、本発明の他のモルフォゲンと組み合わせて酸化すると活性化される。ここに示したように、モルフォゲンは一対のポリペプチド鎖からなる2量体蛋白質であり、それぞれのポリペプチド鎖は、配列表配列番号5の残基43-139によって特定されるC末端側の少なくとも6個のシステイン骨格からなるが、これらのシステインと機能的には等しいアレンジメントを含む(即ち、配列中のシステインの直線的な配置を変えるようなアミノ酸の挿入や欠失を行っても折りたたみ構造におけるシステイン相互間の関係は変わらない)。すなわち、ポリペプチド鎖が折りたたまれる時、ポリペプチド鎖の1対からなっている2量体蛋白質種は、適当な3次元構造をとる。この場合、ここに定義するようにモルフォゲンとして蛋白質が活性であるように、鎖間または鎖内で適当なジスルヒド結合を含んでいる。特徴的なことには、モルフォゲンは、通常、形態形成的に許容される環境では、次の生物学的機能をの全てをそなえている。未分化細胞の増殖促進。未分化細胞の分化促進。分化細胞の増殖促進。分化細胞の成長と維持の補助。さらに、これらのモルフォゲンは、好ましい環境条件に拘束された細胞の再分化を誘導できることが期待される。

【0044】

好ましい一つの実例において、本発明のモルフォゲンは一般的なアミノ酸配列の2種の内の1つを含む。一般配列1(配列表配列番号1)または一般配列2(配列表配列番号2)である。Xaaは20の天然型L-型アミノ酸またはその誘導体の一つを示している。一般配列1は保存された6つのシステイン骨格からなり、そして一般配列2はOP-2で確認される付加的なシステインを付けた保存された6つのシステイン骨格からなる(配列表配列番号2、残基36)。別の好ましい実例では、この配列はN末端に次の付加配列を結合させたものから

なる。

【 0 0 4 5 】

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa (配列表配列番号15)

1

5

上記の一般配列中の好ましいアミノ酸配列は次のものを含む。一般配列3(配列表配列番号3)、一般配列4(配列表配列番号4)、一般配列5(配列表配列番号30)、一般配列6(配列表配列番号31)、列リストは以下に示す。これらの一般配列は、表IIに示したこのモルフォゲンファミリーの種々の好ましいメンバーの中で共有されるホモロジーを、それらのアミノ酸配列に変化を加えたものと同様に含んでいる。特に一般配列3と4は表IIに表され配列表配列番号5-14で特定される次の蛋白質の複合アミノ酸配列である。ヒトOP-1(hOP-1,配列表配列番号5および16-17)、マウスOP-1(mOP-1,配列表配列番号6および18-19)、ヒトおよびマウスOP-2(配列表配列番号7、8および20-22)、CBMP2A(配列表配列番号9)、CBMP2B(配列表配列番号10)、DPP(ショウジョウバエ由来、配列表配列番号11)、Vgl(ツメガエル由来、配列表配列番号12)、Vgr-1(マウス由来、配列表配列番号13) GDF-1(マウス由来、配列表配列番号14)。一般配列は、配列中の可変位置の可変性残基と同様に、表IIの配列によって明示されたアミノ酸配列を含んでいる。これらの一般配列は、一般配列3または4の41または46位に分子間または分子内ジスルヒド結合を形成することができる適当なシステイン骨格を提供するような付加的システインを加えることができるし、蛋白質の三次元構造に影響を及ぼすある種の臨界的なアミノ酸を含む。

10

20

一般配列 3

Leu Tyr Val Xaa Phe

1

5

Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa

10

Xaa Ala Pro Xaa Gly Xaa Xaa Ala

15

20

Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa

25

30

Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

35

Xaa Xaa Xaa Asn His Ala Xaa Xaa

40

45

Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

50

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys

55

60

Cys Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

65

Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa

70

75

Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Leu Xaa

80

Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Val Xaa

85

90

Xaa Cys Gly Cys Xaa

95

ここでXaaは以下に示す1 またはそれ以上のアミノ酸の群から他とは無関係に、選択されたものである。Res.は残基residueを意味している。res.4でのXaa=(Ser,AspまたはGlu)。res.6でのXaa=(Arg,Gln,SerまたはLys)。res.7でのXaa=(AspまたはGlu)。res.8

30

40

50

でのXaa=(LeuまたはVal)。res.11でのXaa=(Gln,Leu, Asp,His,またはAsn)。res.12でのXaa=(Asp,Arg, またはAsn)。res.14でのXaa=(IleまたはVal)。res.15でのXaa=(IleまたはVal)。res.18でのXaa=(Glu,Gln,Leu,Lys,ProまたはArg)。res.20でのXaa=(TyrまたはPhe)。res.21でのXaa=(Ala,Ser,Asp,Met,His,LeuまたはGln)。res.23でのXaa=(Tyr,AsnまたはPhe)。res.26でのXaa=(Glu,His,Tyr,AspまたはGln)。res.28でのXaa=(Glu, Lys,Asp またはGln)。res.30でのXaa=(Ala,Ser,ProまたはGln)。res.31でのXaa=(Phe,LeuまたはTyr)。res.33でのXaa=(LeuまたはVal)。res.34でのXaa=(Asn,Asp, AlaまたはThr)。res.35でのXaa=(Ser,Asp,Glu,LeuまたはAla)。res.36でのXaa=(Tyr, Cys,His,SerまたはIle)。res.37でのXaa=(Met,Phe,GlyまたはLeu)。res.38でのXaa=(AsnまたはSer)。res.39でのXaa=(Ala,SerまたはGly)。res.40でのXaa=(The,LeuまたはSer)。res.44でのXaa=(IleまたはVal)。res.45でのXaa=(ValまたはLeu)。res.46でのXaa=(GlnまたはArg)。res.47でのXaa=(Thr,AlaまたはSer)。res.49でのXaa=(ValまたはMet)。res.50でのXaa=(HisまたはAsn)。res.51でのXaa=(Phe,Leu,Asn,Ser,AlaまたはVal)。res.52でのXaa=(Ile,Met,Asn,AlaまたはVal)。res.53でのXaa=(Asn,Lys,AlaまたはGlu)。res.54でのXaa=(ProまたはSer)。res.55でのXaa=(Glu,Asp,Asn, またはGly)。res.56でのXaa=(Thr,Ala,Val,Lys,Asp,Tyr,SerまたはAla)。res.57でのXaa=(Val,Ala, またはLys)。res.58でのXaa=(ProまたはAsp)。res.59でのXaa=(LysまたはLeu)。res.60でのXaa=(ProまたはAla)。res.63でのXaa=(AlaまたはVal)。res.65でのXaa=(ThrまたはAla)。res.66でのXaa=(Gln,Lys,ArgまたはGlu)。res.67でのXaa=(Leu,Met, またはVal)。res.68でのXaa=(Asn,SerまたはAsp)。res.69でのXaa=(Ala,ProまたはSer)。res.70でのXaa=(Ile,ThrまたはVal)。res.71でのXaa=(SerまたはAla)。res.72でのXaa=(ValまたはMet)。res.74でのXaa=(TyrまたはPhe)。res.75でのXaa=(Phe,TyrまたはLeu)。res.76でのXaa=(AspまたはAsn)。res.77でのXaa=(Asp, Glu,Asn またはSer)。res.78でのXaa=(Ser,Gln,AsnまたはTyr)。res.79でのXaa=(Ser,Asn,AspまたはGlu)。res.80でのXaa=(Asn, Thr またはLys)。res.82でのXaa=(IleまたはVal)。res.84でのXaa=(LysまたはArg)。res.85でのXaa=(Lys,Asn,GlnまたはHis)。res.86でのXaa=(TyrまたはHis)。res.87でのXaa=(Arg,GlnまたはGlu)。res.88でのXaa=(Asn,GluまたはAsp)。res.90でのXaa=(Val,ThrまたはAla)。res.92でのXaa=(Arg,Lys,Val,AspまたはGlu)。res.93でのXaa=(Ala,GlyまたはGlu)。res.97でのXaa=(HisまたはArg)。

10

20

30

一般配列 4

```

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

```

40

50

ス由来、配列表配列番号14)、ヒトBMP3(配列表配列番号26)、ヒトBMP5(配列表配列番号27)、ヒトBMP6(配列表配列番号28)、60(A)(ショウジョウバエ由来、配列表配列番号24-25)。一般配列は、配列中の可変位置の可変性残基と同様に、6および7個のシステイン骨格(一般配列5と6に対応する)によって特定され、そしてC末端ドメイン中のこれらの配列と同一のアミノ酸配列を含んでいる。一般配列3と4、一般配列5と6において、41位(一般配列5)あるいは46位(一般配列6)にシステインを更に付加することができ、適当なシステイン骨格を提供すると、分子間にまたは分子内にジスルヒド結合を形成させることができる。システインは付加物はその蛋白質の3次構造に影響を与えるある種の臨界的なアミノ酸を含んでいる。

10

一般配列 5

```

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

```

20

30

ここでXaaは以下に示すアミノ酸の1またはそれ以上の群から独立的に、選択されたものである。Res.は残基residueを意味している。res.2でのXaa=(TyrまたはLys)。res.3でのXaa=(ValまたはIle)。res.4でのXaa=(Ser,AspまたはGlu)。res.6でのXaa=(Arg,Gln,SerまたはLys)。res.7でのXaa=(Asp,LysまたはGlu)。res.8でのXaa=(Leu,IleまたはVal)。res.11でのXaa=(Gln,Leu,Asp,His,SerまたはAsn)。res.12でのXaa=(Asp,Arg,GluまたはAsn)。res.14でのXaa=(IleまたはVal)。res.15でのXaa=(IleまたはVal)。res.16でのXaa=(AlaまたはSer)。res.18でのXaa=(Glu,Gln,Leu,Lys,ProまたはArg)。res.19でのXaa=(GlyまたはSer)。res.20でのXaa=(TyrまたはPhe)。res.21でのXaa=(Ala,Ser,Asp,Met,His,LeuまたはGly)。res.23でのXaa=(Tyr,AsnまたはPhe)。res.26でのXaa=(Glu,His,Tyr,Asp,SerまたはGln)。res.28でのXaa=(Glu,Lys,Asp,AlaまたはGln)。res.30でのXaa=(Ala,Ser,Pro,AsnまたはGln)。res.31でのXaa=(Phe,LeuまたはTyr)。res.33でのXaa=(Leu,MetまたはVal)。res.34でのXaa=(Asn,Asp,Ala,ProまたはThr)。res.35でのXaa=(Ser,Asp,Glu,Leu,LysまたはAla)。res.36でのXaa=(

40

50

Tyr,Cys,His,SerまたはIle)。res.37でのXaa=(Met,Phe,GlyまたはLeu)。res.38でのXaa=(Asn,LysまたはSer)。res.39でのXaa=(Ala,Ser,ProまたはGly)。res.40でのXaa=(Thr,LeuまたはSer)。res.44でのXaa=(Ile,ValまたはThr)。res.45でのXaa=(Val,IleまたはLeu)。res.46でのXaa=(GlnまたはArg)。res.47でのXaa=(Thr,AlaまたはSer)。res.48でのXaa=(LeuまたはIle)。res.49でのXaa=(ValまたはMet)。res.50でのXaa=(His,ArgまたはAsn)。res.51でのXaa=(Phe,Leu,Asn,Ser,AlaまたはVal)。res.52でのXaa=(Ile,Met,Asn,Ala,LeuまたはVal)。res.53でのXaa=(Asn,Lys,Ala,Gly,PheまたはGlu)。res.54でのXaa=(Pro,ValまたはSer)。res.55でのXaa=(Glu,Asp,Asn,Val,LysまたはGly)。res.56でのXaa=(Thr,Ala,Val,Lys,Asp,Tyr,Ser,Pro,HisまたはAla)。res.57でのXaa=(Val,Ala,またはIle)。res.58でのXaa=(ProまたはAsp)。res.59でのXaa=(Lys,GluまたはLeu)。res.60でのXaa=(ProまたはAla)。res.63でのXaa=(AlaまたはVal)。res.65でのXaa=(Thr,GluまたはAla)。res.66でのXaa=(Gln,Lys,ArgまたはGlu)。res.67でのXaa=(Leu,Met,またはVal)。res.68でのXaa=(Asn,Ser,GlyまたはAsp)。res.69でのXaa=(Ala,ProまたはSer)。res.70でのXaa=(Ile,Thr,LeuまたはVal)。res.71でのXaa=(Ser,ProまたはAla)。res.72でのXaa=(Val,IleまたはMet)。res.74でのXaa=(TyrまたはPhe)。res.75でのXaa=(Phe,Tyr,HisまたはLeu)。res.76でのXaa=(Asp,LeuまたはAsn)。res.77でのXaa=(Asp,Glu,AsnまたはSer)。res.78でのXaa=(Ser,Gln,Asn,AspまたはTyr)res.79でのXaa=(Ser,Asn,Asp,LysまたはGlu)。res.80でのXaa=(Asn,ThrまたはLys)。res.82でのXaa=(IleAsnまたはVal)。res.84でのXaa=(LysまたはArg)。res.85でのXaa=(Lys,Asn,Gln,ValまたはHis)。res.86でのXaa=(TyrまたはHis)。res.87でのXaa=(Arg,Gln,ProまたはGlu)。res.88でのXaa=(Asn,GluまたはAsp)。res.90でのXaa=(Val,Thr,IleまたはAla)。res.92でのXaa=(Arg,Lys,Val,AspまたはGlu)。res.93でのXaa=(Ala,Gly,GluまたはSer)。res.95でのXaa=(GlyまたはAla)。res.97でのXaa=(HisまたはArg)。

10

20

一般配列 6

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

30

40

50

Xaa Cys Xaa Cys Xaa

100

ここでXaaは以下に示すアミノ酸の1またはそれ以上の群から他とは無関係に、選択されたものである。Res.は残基residueを意味している。res.2でのXaa=(Lys,Arg,AlaまたはPro)。res.3でのXaa=(Lys,ArgまたはMet)。res.4でのXaa=(His,ArgまたはGln)。res.5でのXaa=(Glu,Ser,His,Gly,Arg,Pro,Thr,Tyr)。res.7でのXaa=(TyrまたはLys)。res.8でのXaa=(LeuまたはVal)。res.9でのXaa=(Ser,AspまたはGlu)。res.11でのXaa=(Arg,Glu,Ser,AlaまたはLys)。res.12でのXaa=(Asp,GluまたはLys)。res.13でのXaa=(Leu,IleまたはVal)。res.16でのXaa=(Gln,Leu,Asp,His,AsnまたはSer)。res.17でのXaa=(Asp,Arg,AsnまたはGlu)。res.19でのXaa=(IleまたはVal)。res.20でのXaa=(IleまたはVal)。res.21でのXaa=(AlaまたはSer)。res.23でのXaa=(Glu,Gln,Leu,Lys,ProまたはArg)。res.24でのXaa=(GlyまたはSer)。res.25でのXaa=(TyrまたはPhe)。res.26でのXaa=(Ala,Ser,Asp,Met,His,Gln,LeuまたはGly)。res.28でのXaa=(Tyr,AsnまたはPhe)。res.31でのXaa=(Glu,His,Tyr,Asp,GlnまたはSer)。res.33でのXaa=(Glu,Lys,Asp,GlnまたはSer)。res.35でのXaa=(Ala,Ser,Pro,GlnまたはAsn)。res.36でのXaa=(Phe,LeuまたはTyr)。res.38でのXaa=(Leu,ValまたはMet)。res.39でのXaa=(Asn,Asp,Ala,ThrまたはPro)。res.40でのXaa=(Ser,Asp,Glu,Leu,AlaまたはLys)。res.41でのXaa=(Tyr,Cys,His,SerまたはIle)。res.42でのXaa=(Met,Phe,GlyまたはLeu)。res.43でのXaa=(Asn,SerまたはLys)。res.44でのXaa=(Ala,Ser,GlyまたはPro)。res.45でのXaa=(Thr,LeuまたはSer)。res.49でのXaa=(Ile,ValまたはThr)。res.50でのXaa=(Val,LeuまたはIle)。res.51でのXaa=(GlnまたはArg)。res.52でのXaa=(Thr,AlaまたはSer)。res.53でのXaa=(LeuまたはIle)。res.54でのXaa=(ValまたはMet)。res.55でのXaa=(His,AsnまたはArg)。res.56でのXaa=(Phe,Leu,Asn,Ser,AlaまたはVal)。res.57でのXaa=(Ile,Met,Asn,Ala,ValまたはLeu)。res.58でのXaa=(Asn,Lys,Ala,Glu,GlyまたはPhe)。res.59でのXaa=(Pro,SerまたはVal)。res.60でのXaa=(Glu,Asp,Gly,ValまたはLys)。res.61でのXaa=(Thr,Ala,Val,Lys,Asp,Tyr,Ser,Ala,ProまたはHis)。res.62でのXaa=(Ala,ValまたはIle)。res.63でのXaa=(ProまたはAsp)。res.64でのXaa=(Lys,LeuまたはGlu)。res.65でのXaa=(ProまたはAla)。res.68でのXaa=(AlaまたはVal)。res.70でのXaa=(Ala,ThrまたはGlu)。res.71でのXaa=(Gln,Lys,ArgまたはGlu)。res.72でのXaa=(Leu,ValまたはMet)。res.73でのXaa=(Asn,Ser,AspまたはGly)。res.74でのXaa=(Ala,ProまたはSer)。res.75でのXaa=(Ile,Thr,ValまたはLeu)。res.76でのXaa=(Ser,AlaまたはPro)。res.77でのXaa=(Val,MetまたはIle)。res.79でのXaa=(TyrまたはPhe)。res.80でのXaa=(Phe,Tyr,LeuまたはHis)。res.81でのXaa=(Asp,AsnまたはLeu)。res.82でのXaa=(Asp,Glu,AsnまたはSer)。res.83でのXaa=(Ser,Gln,Asn,TyrまたはAsp)。res.84でのXaa=(Ser,Asp,Asn,GluまたはLys)。res.85でのXaa=(Asn,ThrまたはLys)。res.87でのXaa=(Ile,ValまたはAsn)。res.89でのXaa=(LysまたはArg)。res.90でのXaa=(Lys,Asn,Gln,HisまたはVal)。res.91でのXaa=(TyrまたはHis)。res.92でのXaa=(Arg,Gln,GluまたはPro)。res.93でのXaa=(Asn,GluまたはAsp)。res.95でのXaa=(Val,Thr,AlaまたはIle)。res.97でのXaa=(Arg,Lys,Val,AspまたはGlu)。res.98でのXaa=(Ala,Gly,GluまたはSer)。res.100でのXaa=(GlyまたはAla)。res.102でのXaa=(HisまたはArg)。

【0047】

本発明においてモルフォゲンとして使用するために特に有用な配列は、C末端ドメインを含むものである。この配列は次のものをさす。少なくとも保存された6または7個のシステイン骨格を含むもの全てで、60A,BMP3,BMP5 およびBMP6(配列表配列番号24-28)のC末端ドメインからなる蛋白質と同様のVgl, Vgr-1,DPP,OP-1,OP-2,CBMP-2A,CBMP-2B,GDF-1(配列表配列番号5-14および表II)のC末端96-102アミノ酸残基を持つものである。さらに、米国特許5,011,691号に開示されているCOP-1,3-5,7,16のように一般配列からデザインされた生物的合成物は有用性がある。その他の配列としては、インヒビリン/アクチビン蛋白質(米国特許4,968,590、5,011,691号を参照)が含まれる。さらにまた、その

他の有用性のある蛋白質は上記の配列のいずれかと少なくとも70%のアミノ酸配列ホモロジー「相似性」を好ましくは80%ホモロジーか相似性を持ち、形態形成活性を示す。これらの物質は、このモルフォゲン蛋白質ファミリーの新規メンバーと同様に、自然発生的であろうと生合成的に製造されたものでであろうと対立形変異、種特異型およびその他の配列変異型（「ミューテイン」または「ミュータント」蛋白質）をもつことが予想される。

【0048】

ここにおいて用いている「アミノ酸配列のホモロジー」はアミノ酸配列の相似性を意味していると理解される。ホモローガスの配列は同一または相似のアミノ酸を有し、相似性のアミノ酸はDayoffらによって、Atlas of Protein Sequence and Structure: vol.5, Supplement 3, pp.345-362 (M.O.Dyoff, ed., Natl BioMed. Research Fdn., Washington, D.C. 1978) に定義されたような保存性アミノ酸である。このように参照配列と70%のアミノ酸配列のホモロジーを持つ候補配列は、参照アミノ酸配列に続いて候補アミノ酸配列を並べてみた場合、候補配列中のアミノ酸の70%は、参照配列のアミノ酸配列に一致しているか、あるいは保存性アミノ酸変化を構成していることが必要とされる。「アミノ酸配列同一性」は、二つの一連をなす配列の間でアミノ酸の同一性が必要であることと理解される。このように参照配列に対して候補配列が60%の同一性を有するという事は、参照アミノ酸配列と候補アミノ酸配列を並べたとき、候補アミノ酸配列中のアミノ酸の60%が参照アミノ酸の配列に一致することが必要である。

【0049】

ここで使用したホモロジーと同一性の計算には参照配列としてOP-1を用いた。またここで使用した配列は、ホモロジーと同一性の計算のためにNeedlemanらの方法(1970, J. Mol. Biol. 48:443-453)を使用して配列が並べられ、アラインプログラム(DNAstar, Inc)で同一性を計算した。全例において、並べられた時の候補配列中の内部欠落とアミノ酸の挿入は、ホモロジー/同一性計算を行っている時には無視した。

【0050】

現在、本発明のモルフォゲンとして有用な最も好ましい蛋白質の配列は、hOP1の6個の保存されたシステイン骨格(例えば配列表配列番号5の残基43-139)で特定されているアミノ酸配列と60%以上の同一性好ましくは65%以上の同一性を持つもつものである。これらの最も好ましい配列は、ショウジョウバエ60A蛋白質を含むOP-1とOP-2蛋白質の対立形質型と種変異型の両方を含む。さらにまた、本発明の別の好ましい観点において、有用なモルフォゲンは、「OPX」としてここに示した一般アミノ酸配列を有するポリペプチド鎖の種類から構成される、活性な蛋白質を含んでいる。このOPXは、OP1およびOP2(配列表配列番号29)の色々な同定された種とホモロジーを持つ。

【0051】

本発明の別の好ましい観点において、有用なモルフォゲンは、以下のDNAまたはRNA配列に厳密なハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする核酸によってコードされるポリペプチド鎖から成る活性蛋白質を含む。このDNAまたはRNA配列は、OP1またはOP2の保存されるシステインドメインを特定するC末端配列をコードするもので、夫々配列表配列番号16と20のヌクレオチド1036~1341、ヌクレオチド1390~1695である。

【0052】

本発明の装置、方法、組成物に有用なモルフォゲンは、上記のポリペプチド鎖のいずれかから構成される蛋白質であり、天然の原料から単離されるか、あるいは遺伝子組換えDNAまたはその他の合成方法で調製される。更にこれらの蛋白質の対立形質型と種変異型、それらの自然発生的なまたは生合成的な突然変異株、種々の切断または融合形成物を含む欠失または付加変異体も活性を有すると予想され、これらは保存性C末端システイン骨格を変更していても、折りたたみ構造においてこれらのシステインの相互関係を機能的に妨げないような骨格変更であればそれらも含まれる。さらにまた、このような活性型は、ここに開示し特徴的に述べられている構成物と等質であると考えられる。蛋白質は、次のような変異形態を含む。異なるグリコシレーションパターン、異なるN末端、アミノ酸配列

ホモロジーの領域を有する関連蛋白質のファミリー、天然あるいは宿主細胞で遺伝子組換えDNAの発現によって調製した生物合成蛋白質の活性化切断型または変異型などである。

【0053】

形態形成性蛋白質は、原核細胞または真核宿主細胞中で、完全または切断cDNAあるいは合成DNAから発現させることができる。そして精製、切断、リフォールディング、形態形成的活性組成物を構成するために二重化される。現在好ましい宿主細胞としては、大腸菌、CHO、COS、BSC細胞のような哺乳動物細胞がある。本発明の方法、組成物および装置に有用なモルフォゲンの詳細な説明は、1991年3月11日出願667,274および1991年8月30日出願752,764の米国特許出願に開示されており、ここに引用することによって一体化して開示される。

10

【0054】

本開示を考慮すると、熟練した遺伝子技術者は、種々の異なる種のcDNAまたはゲノムライブラリーから適切なアミノ酸配列をコードしている遺伝子を単離することができる。またオリゴヌクレオチドからDNAを構築し、原核細胞と真核細胞の両方を含む種々のタイプの宿主で発現させ、哺乳動物の神経回路を維持することのできる活性な蛋白質を大量に生産することができる。この神経回路保護には、瀕死のニューロンの生存性を増強するヒトを含む色々な哺乳動物における神経の再生と修復を促進することを包含するものである。

【発明の効果】

【0055】

本発明は、瀕死の細胞の生存性を促進させる方法であって、神経の母細胞を形質転換させて再分化させるための方法を包含する方法、および分化した神経細胞に形質発現を維持させるための方法を提供する。さらにまた、本発明は、傷害を受けた神経回路を修復するための手段を提供する。この手段には長い距離にわたる軸索の成長を促進するための方法を含んでおり、さらに免疫学的に関連している神経組織傷害を軽減するための方法を提供するものである。本発明の代表的な実施態様としては、細胞中の細胞接着性分子の発現であって、特に神経細胞中の神経細胞接着性分子の発現を促進する方法を提供するものである。最終的には、本発明は神経組織の鬱血状態を評価し、哺乳動物における神経系の機能不全を評価するための手段を提供するものである。

20

【0056】

本発明の先に示した目的、特性、利点はその他の目的と特性および利点と共に、以下に示す詳細な説明からより一層明白なものとなるであろう。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0057】

ここに説明した蛋白質はニューロンの生存性を増強するための有効物質であり、特に瀕死のニューロンに有効である。そして哺乳類の神経回路を維持するために有効である。ここに開示したように、これら蛋白質(「モルフォゲン」)は非分裂性ニューロンの生存性を増強ことができ、神経細胞性CAMの発現を刺激し、分化したニューロンの表現型発現を維持し、神経由来の形質転換細胞の再分化を誘導し、そして神経突起の破壊部分、特に遠位軸索の大きなギャップを超えて軸索成長を促進する。さらにまた、この蛋白質は、免疫学的に関係した神経組織の損傷に伴う組織破壊作用を緩和するために神経保護作用を与えることができる。最後に蛋白質は哺乳動物の神経組織の生存性をモニターするための方法の一部として使用できる。

40

【0058】

投与および使用方法、複数の限定されない実施例と同様に本発明の方法、組成物と装置において有用な適切なモルフォゲンの詳細な説明が以下に開示される。1) 死のリスクを持った神経細胞の生存性を増強し、哺乳動物の神経回路を維持するための治療剤としてここに説明するモルフォゲンおよびモルフォゲン促進剤の適合性を説明し、2) モルフォゲンとモルフォゲン促進剤としての候補物質の有効性を評価する分析方法を提供する。

【0059】

1. 有用なモルフォゲン

50

hOP-1	Cys	Lys	Lys	His	Glu	Leu	Tyr	Val		
mOP-1		
hOP-2	...	Arg	Arg		
mOP-2	...	Arg	Arg		
DPP	...	Arg	Arg	...	Ser		
Vgl	Lys	Arg	His		
Vgr-1	Gly		
CBMP-2A	Arg	...	Pro		
CBMP-2B	...	Arg	Arg	...	Ser		
BMP3	...	Ala	Arg	Arg	Tyr	...	Lys	...		10
GDF-1	...	Arg	Ala	Arg	Arg		
60A	...	Gln	Met	Glu	Thr		
BMP5		
BMP6	...	Arg		
	1				5					
hOP-1	Ser	Phe	Arg	Asp	Leu	Gly	Trp	Gln	Asp	
mOP-1	
hOP-2	Gln	Leu	...	
mOP-2	Ser	Leu	...	
DPP	Asp	...	Ser	...	Val	Asp	...	20
Vgl	Glu	...	Lys	...	Val	Asn	
Vgr-1	Gln	...	Val	
CBMP-2A	Asp	...	Ser	...	Val	Asn	...	
CBMP-2B	Asp	...	Ser	...	Val	Asn	...	
BMP3	Asp	...	Ala	...	Ile	Ser	Glu	
GDF-1	Glu	Val	His	Arg	
60A	Asp	...	Lys	His	...	
BMP5	
BMP6	Gln	
		10					15			
hOP-1	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ala	
mOP-1	
hOP-2	...	Val	Gln	Ser	
mOP-2	...	Val	Gln	Ser	
DPP	Val	Leu	Asp	
Vgl	...	Val	Gln	Met	
Vgr-1	Lys	
CBMP-2A	Val	Pro	His	
CBMP-2B	Val	Pro	Gln	
BMP3	Ser	...	Lys	Ser	Phe	Asp	
GDF-1	...	Val	Arg	...	Phe	Leu	40
60A	Gly	
BMP5	
BMP6	Lys	
			20				25			

hOP-1	Ala	Tyr	Tyr	Cys	Glu	Gly	Glu	Cys	Ala	
mOP-1	
hOP-2	Ser	
mOP-2	
DPP	His	...	Lys	...	Pro	
Vgl	...	Asn	Tyr	Pro	
Vgr-1	...	Asn	Asp	Ser	
CBMP-2A	...	Phe	His	...	Glu	...	Pro	
CBMP-2B	...	Phe	His	...	Asp	...	Pro	10
BMP3	Ser	...	Ala	...	Gln	
GDF-1	...	Asn	Gln	...	Gln	
60A	...	Phe	Ser	Asn	
BMP5	...	Phe	Asp	Ser	
BMP6	...	Asn	Asp	Ser	
				30					35	
hOP-1	Phe	Pro	Leu	Asn	Ser	Tyr	Met	Asn	Ala	
mOP-1	
hOP-2	Asp	...	Cys	
mOP-2	Asp	...	Cys	20
DPP	Ala	Asp	His	Phe	...	Ser	
Vgl	Tyr	Thr	Glu	Ile	Leu	...	Gly	
Vgr-1	Ala	His	
CBMP-2A	Ala	Asp	His	Leu	...	Ser	
CBMP-2B	Ala	Asp	His	Leu	...	Ser	
GDF-1	Leu	...	Val	Ala	Leu	Ser	Gly	Ser**	...	
BMP3	Met	Pro	Lys	Ser	Leu	Lys	Pro	
60A	Ala	His	
BMP5	Ala	His	Met	
BMP6	Ala	His	Met	
				40						30
hOP-1	Thr	Asn	His	Ala	Ile	Val	Gln	Thr	Leu	
mOP-1	
hOP-2	Leu	...	Ser	...	
mOP-2	Leu	...	Ser	...	
DPP	Val	
Vgl	Ser	Leu	
Vgr-1	
CBMP-2A	
CBMP-2B	
BMP3	Ser	Thr	Ile	...	Ser	Ile	
GDF-1	Leu	Val	Leu	Arg	Ala	...	40
60A	
BMP5	
BMP6	
	45					50				

hOP-1	Val	His	Phe	Ile	Asn	Pro	Glu	Thr	Val	
mOP-1	Asp	
hOP-2	...	His	Leu	Met	Lys	...	Asn	Ala	...	
mOP-2	...	His	Leu	Met	Lys	...	Asp	Val	...	
DPP	...	Asn	Asn	Asn	Gly	Lys	...	
Vgl	Ser	...	Glu	Asp	Ile	
Vgr-1	Val	Met	Tyr	...	
CBMP-2A	...	Asn	Ser	Val	...	Ser	---	Lys	Ile	
CBMP-2B	...	Asn	Ser	Val	...	Ser	---	Ser	Ile	
BMP3	...	Arg	Ala**	Gly	Val	Val	Pro	Gly	Ile	10
GDF-1	Met	...	Ala	Ala	Ala	...	Gly	Ala	Ala	
60A	Leu	Leu	Glu	...	Lys	Lys	...	
BMP5	Leu	Met	Phe	...	Asp	His	...	
BMP6	Leu	Met	Tyr	...	
		55					60			
hOP-1	Pro	Lys	Pro	Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Gln	
mOP-1	
hOP-2	Ala	Lys	
mOP-2	Ala	Lys	20
DPP	Ala	Val	
Vgl	...	Leu	Val	Lys	
Vgr-1	Lys	
CBMP-2A	Ala	Val	Glu	
CBMP-2B	Ala	Val	Glu	
BMP3	...	Glu	Val	...	Glu	Lys	
GDF-1	Asp	Leu	Val	...	Ala	Arg	
60A	Arg	
BMP5	Lys	
BMP6	Lys	
			65					70		30
hOP-1	Leu	Asn	Ala	Ile	Ser	Val	Leu	Tyr	Phe	
mOP-1	
hOP-2	...	Ser	...	Thr	Tyr	
mOP-2	...	Ser	...	Thr	Tyr	
Vgl	Met	Ser	Pro	Met	...	Phe	Tyr	
Vgr-1	Val	
DPP	...	Asp	Ser	Val	Ala	Met	Leu	
CBMP-2A	...	Ser	Met	Leu	
CBMP-2B	...	Ser	Met	Leu	
BMP3	Met	Ser	Ser	Leu	...	Ile	...	Phe	Tyr	40
GDF-1	...	Ser	Pro	Phe	...	
60A	...	Gly	...	Leu	Pro	His	
BMP5	
BMP6	
				75					80	

hOP-1	Asp	Asp	Ser	Ser	Asn	Val	Ile	Leu	Lys
mOP-1
hOP-2	...	Ser	...	Asn	Arg
mOP-2	...	Ser	...	Asn	Arg
DPP	Asn	...	Gln	...	Thr	...	Val
Vg1	...	Asn	Asn	Asp	Val	...	Arg
Vgr-1	Asn
CBMP-2A	...	Glu	Asn	Glu	Lys	...	Val
CBMP-2B	...	Glu	Tyr	Asp	Lys	...	Val
BMP3	...	Glu	Asn	Lys	Val
GDF-1	...	Asn	...	Asp	Val	...	Arg
60A	Leu	Asn	Asp	Glu	Asn
BMP5
BMP6	Asn

85

10

hOP-1	Lys	Tyr	Arg	Asn	Met	Val	Val	Arg
mOP-1
hOP-2	...	His	Lys
mOP-2	...	His	Lys
DPP	Asn	...	Gln	Glu	...	Thr	...	Val
Vg1	His	...	Glu	Ala	...	Asp
Vgr-1
CBMP-2A	Asn	...	Gln	Asp	Glu
CBMP-2B	Asn	...	Gln	Glu	Glu
BMP3	Val	...	Pro	Thr	...	Glu
GDF-1	Gln	...	Glu	Asp	Asp
60A	Ile	...	Lys
BMP5
BMP6	Trp

90

95

20

30

hOP-1	Ala	Cys	Gly	Cys	His
mOP-1
hOP-2
mOP-2
DPP	Gly	Arg
Vg1	Glu	Arg
Vgr-1
CBMP-2A	Gly	Arg
CBMP-2B	Gly	Arg
BMP3	Ser	...	Ala	...	Arg
GDF-1	Glu	Arg
60A	Ser
BMP5	Ser
BMP6

100

40

**BMP3の残基56と57の間はVal 残基である。

GDF-1 の残基43と44の間には、アミノ酸配列 Gly-Gly-Pro-Proがある

50

【0063】

先のアミノ酸配列の比較から明白になったように、意味のあるアミノ酸の変更を、モルフォゲン活性を保持しつつ一般配列の範囲で行なうことが可能である。例えば、表IIに示したGDF-1蛋白質の配列は、ここに説明したhOP1と50%位しかアミノ酸の同一性を持たないにもかかわらず、GDF-1配列は、hOP-1配列と70%以上のアミノ酸配列のホモロジー（或いは相似性）を持つ。ここで言う「ホモロジー」、「相似性」は、Dayoffらにより、Atlas of Protein Sequence and Structure : vol.5, Suppl.3, pp.345-362 (M.O.Dyoff, ed., Natl BioMed. Research Fdn., Washington, D.C. 1979) に示されている方法によって特定される、配列中の許容された保存性アミノ酸の変化を含む。

【0064】

本発明のモルフォゲンとして有用な特に好ましい配列は、hOP1（配列表配列番号5の残基43-139）の保存された6個のシステイン骨格で特定されるアミノ酸配列と60%以上、さらに好ましくは65%以上の同一性をもつ。これらの最も好ましい配列は、ショウジョウバエ60A蛋白質、OP-1、OP-2の対立形質および種変異体の双方を含む。さらに、他の好ましい観点において、本発明は、7個のシステイン骨格を持ち、種々の特定されたマウスおよびヒトのOP1、OP20蛋白質に共通する、「OPX」としてここに示した一般アミノ酸配列を有するポリペプチドの種からなるモルフォゲンを含む。OPXは配列表配列番号29に示している。そこに記載するように、夫々のXaaはその位置で、マウスまたはヒトOP1またはOP2のC末端配列（配列表配列番号5-8および/または配列表配列番号16-23）の相当する位置で得られる残基から他とは無関係に選択される。

【0065】

2. 治療剤を投与するための製剤と方法

モルフォゲンは好ましい方法で個体に投与される。投与は好ましくは直接的（神経組織への注射のように局部的に）または全身的（非経口または経口投与）である。モルフォゲンは非経口的に投与できる。静脈内、皮下、筋肉、眼窩、目、頭蓋、関節囊、心室、脳槽、腹膜、頬、直腸、膺、鼻腔内またはエアロゾル投与をあげることができる。モルフォゲンは好ましくは水溶液にすることもできる。溶液は患者に対して所望のモルフォゲンを与えるのに加え、患者の電解質と容易バランスに負の影響を与えないので生理的に受容可能である。モルフォゲンの水性媒体は通常の生理食塩水（9.85%食塩、0.15M）pH7-7.4である。モルフォゲンを含有する水性溶液は、一例を上げると、0.1%トリフロロ酢酸（TFA）または0.1%塩酸含有アセトニトリルの50%エタノール溶液、あるいは同等の溶媒に蛋白質を溶解させて調製することができる。得られた溶液1容量に10容量のリン酸緩衝食塩水（PBS）を加え、さらに0.1-0.2%ヒト血清アルブミン（HSA）を加えてもよい。得られた溶液は、好ましくは持続的に攪拌する。必要であれば、与えられたモルフォゲンはその他の適切な分子とを結合させて溶解度をあげることができる。例えばモルフォゲンのプロドメインを成熟2量体と結合させると、蛋白質の溶解性を相当あげることができる。（下記セクションII.1を参照）。実際、内因性蛋白質はこの形態で移送されると考えられる。溶解性を促進するものとして、特に経口投与に有用なその他の分子は、カゼインをあげることができる。例えば、0.2%カゼインの添加はOP-1の成熟活性型の溶解度を80%増加させる。牛乳および/または種々の血清蛋白質に見出されるその他の成分も有用である。

【0066】

非経口的投与に有用な溶液は、製薬技術として公知の方法で、例えばRemington's Pharmaceutical Science (Gennaro, A, ed.) Mack Pul., 1990に記載されている方法で調製できる。製剤化材料としては、ポリエチレングリコールのようなポリアルキレングリコール、植物油、水素添加したフタレンおよび類似物があげられる。特に、直接投与製剤は、グリセロールと高い粘度をもつ他の組成物を含む。例えばヒアルロン酸、コラーゲン、トリカルシウムリン酸塩、ポリブチレート、ラクチド、ラクチド/グリコリド共重合ポリマーなどを含む生体内適合性、好ましくは生体吸収性ポリマーがモルフォゲンのインビボ放出を制御する賦型剤として有用である。このモルフォゲンを非経口的に投与するシステムとして特に有用なものは、エチレンビニル酢酸共重合体粒子、浸透圧ポンプ、埋め込み式注入シ

10

20

30

40

50

ステム、リポゾームなどを含む。ラクトースを賦型剤として含有する吸入式投与のための処方、例えば、ポリオキシエチレン-9-ラウリルエーテル、グリココレート、デオキシコレート含有する水性溶液あるいは油性溶液であって鼻腔内にゲルとして投与するかあるいは、鼻腔に滴下する形態のものである。非経口的処方はパッカル投与のためにグリココレートを含有するか、直腸内投与のためメトキシサリチレートを含有するか、腔内投与のためカトリック酸を含有するものである。

【0067】

さらにまた、ここに説明したモルフォゲンは経口的に投与できる。一般的に、治療薬として蛋白質を経口投与することは、殆ど行われていない。大部分の蛋白質は、哺乳動物の消化器系で消化酵素と酸によってすぐに分解されて、血液中に吸収されない。しかし、ここに述べたモルフォゲンは、典型的に酸に安定でプロテアーゼ抵抗性がある（たとえば米国特許4,968,590を参照のこと）。さらに、少なくとも一つのモルフォゲン、OP-1は乳腺分泌物で、初乳および57日めの乳から同定されている。さらに乳腺分泌物から精製したOP-1はモルフォゲンの活性を有している。特に、米国特許4,968,590に開示されている、標準的に採用されているインビボ骨アッセイ法を使用して、適切なマトリックス素材と共に皮下に移植した場合、この蛋白質は哺乳動物の軟骨形成を誘導する。さらに、モルフォゲンは血流から検出される（下記実施例9を参照）。最終的に、溶解型モルフォゲン、例えばプロドメインと結合させた成熟モルフォゲンは哺乳類の神経経路を維持する作用を有している（下記実施例4および6を参照のこと）。これら知見は、経口および非経口投与物は、個体に対して投与した場合、モルフォゲンが生物活性を示すことを意味している。さらに、ここに示したモルフォゲンの成熟型は、典型的には非常に低い溶解性を示すが、乳（および乳腺分泌物と初乳）に見出されるモルフォゲンの形態は、非常にとけやすい。恐らく成熟型のモルフォゲン活性形が、完全な配列のプロドメインの一部または全部と結合するか、1つまたはそれ以上の乳成分と結合しているかによるのであろう。したがって、ここで提供される化合物はインビトロ、インビボでその溶解性を促進できる分子と結合させてもよい。

10

20

【0068】

ここで提供される化合物は、神経組織に対してモルフォゲンまたはモルフォゲン促進物質をターゲティングすることができる分子と結合させることもできる。例えば、神経またはグリア細胞を含む神経組織細胞上の表面分子に特異的に作用する抗体、抗体フラグメント、他の結合蛋白質は使用可能である。有用なターゲティング分子は、米国特許5,091,513に開示された一本鎖結合部位技術を用いて、デザインすることができる。

30

【0069】

上記したように、ここで提供されるモルフォゲンはC末端活性ドメインの配列にホモロジーが高い。比較すると、プロドメインとして定義される配列では配列はかなり異なっている。したがって、プロドメインはモルフォゲン特異的といえる。今日迄に同定されているモルフォゲンは、異なる組織で特異的に発現されることが公知である。さらに、どのような既存の理論に制限されることなく、体内での自然条件下では、一定の組織には、特に選択されたモルフォゲンが典型的に作用しているらしい。さらに、溶液中のモルフォゲンの活性型と結合していることが確認されたプロドメインの一部または全部が、ここに記載したモルフォゲンに対するターゲット化合物として使用できる。例えば、プロドメインは、ターゲット組織の1またはそれ以上の分子と特異的に反応するのでプロドメインと結合したモルフォゲンをその組織に方向づけることができる。さらにまた、神経組織に対してモルフォゲンをターゲティングさせるための別な有用な分子は、モルフォゲンプロドメインの1部または全部であり、特に、自然に神経組織に結合することが確認されているOP-1またはGDF-1のプロドメインの一部または全部はである。

40

【0070】

最後に、ここで提供されるモルフォゲンまたはモルフォゲン促進剤は単独で投与するか、または神経経路の維持に有効であることが知られている神経成長因子と抗炎症剤を含むその他の分子と組み合わせて投与できる。

50

【0071】

ここで提供される化合物は、薬剤学的に受容されうる無毒性の賦型剤およびキャリアーと混合して製剤化できる。上記のように、このような組成物は以下のような投与のために調製できる。非経口的投与、特に溶液あるいは懸濁液の形態；経口投与、特に錠剤あるいはカプセル剤の形態；鼻腔内投与、特に粉末、鼻腔内滴下剤またはエアロゾール。

【0072】

組成物は、治療上有効な量をヒトまたはその他の哺乳動物に非経口的または経口的に投与するための形態に調製できる。治療上有効な量は、患者の病理学的な状態を除去するか低減するために十分な時間にわたって適切な濃度で提供できる量であり、上記に述べた神経学的な病気や障害を治療するのに十分な量である。さらにまたこの量は、神経組織に対する傷害が予測される時に神経細胞の生存性を増強し、そして/またニューロンと神経経路を保護することができる量である。

10

【0073】

当業者には理解できるように、治療用組成物中に説明した化合物の濃度は多くの因子によって変動する。この因子は投与する薬剤の投与量、使用する化合物の化学的特性（疎水性など）、投与経路などである。投与する薬剤の好ましい投与量もまた、以下のような変動因子に依存している。これらの変動因子としては神経学的な疾患のタイプとその進行の程度、個々の患者の全体的な健康状態、選定した化合物の相対的な生物学的な有効性、化合物賦型剤の配合そしてその投与経路などである。一般的に言えば、本発明の化合物は、非経口的投与のためには、約0.1-10% W/Vの化合物を含有する水溶性の生理学的緩衝液として製造される。代表的な投与範囲は一日体重1kg当たり10ngから1gである。好ましい投与範囲は一日体重1kg当たり0.1 μ から100mgである。最適には、全ての場合において投与されるモルフォゲンの量は、一日患者の体重1g当たり2-20 μ の間である。21日間連続して正常な成長期のラットに毎日成熟型モルフォゲン（OP-1, 20 μ g）を投与した時、OP-1による生理学的問題はなにも認められない。さらに、正常な新生マウスに10日間毎日モルフォゲン（OP-1）を10 μ g全身的に注射したところ、どのような異常も発生しなかった。

20

【0074】

脳血液関門を通過するための蛋白質および蛋白質フラグメントが脳-血液バリアを通過する能力は、そのサイズ、親油性またはその実際のイオンチャージに関係しているため、標準的な公知の方法を用いて、バリアを通過する機能を増強させるためにモルフォゲンの適切な変換をすることができる（フェニルアラニンペンタフルロフェニルアラニンに置換するかまたはアルブミンのような陽イオン化された蛋白質と共役結合させる）。例えば以下のものを参照のこと。Kastin et al., *Pharmac. Biochem. Behav.*, 1979, 11:713-716; Rapoport et al., *Science*, 1980, 207:84-86; Pardridge et al., 1987, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 146:307-313; Riekkine et al., 1987, *Peptides*, 8, 261-265。これらの機能的アナログの有効性は、たとえばこれらの化合物が、ここに示した実施例に記載されているように、形質転換細胞の再分化を誘導したり、瀕死のニューロンの生存性を増強したりする能力を測定することによって評価できる。

30

【0075】

本発明の方法において全身的にモルフォゲンを投与する場合に、好ましくは大容量の負荷投与量が治療の初めに採用される。次いで治療は維持量で持続される。それに続く投与は血液中のモルフォゲンレベルを一定間隔でモニターして決定することができる。

40

【0076】

神経経路のニューロンに対する傷害が、例えば外科的な方法の一部として慎重に引き起こされる場合、好ましくはモルフォゲンは傷害の誘発のほんの少し前に投与しておくか、傷害の誘発と同時に投与される。好ましくは、モルフォゲンは手術の準備中に予防的に投与しておく。最適な条件では、全ての場合に投与されるモルフォゲンの量は患者の体重キログラム当たり2-20 μ gである。

【0077】

さらにまた、内因性モルフォゲンレベルを促進できる物質の有効量は上記に説明したど

50

の様な投与経路であっても投与可能である。例えば、神経組織細胞からのモルフォゲンの生産および/または分泌を促進する物質を、哺乳動物に対して与えることができるが、これは治療されるべき神経組織に結合しているグリア細胞に対してモルフォゲンを直接投与して行なう。一定の組織中の内因性モルフォゲンのレベルを変更させることのできる物質の特定と試験を行うための方法は、ここでは実施例13に一般的に説明してあるが、国際出願US92/07359 (WO93/015172) に詳細に説明してあり、引用によってここに一体化して開示される。要約すれば、候補化合物は、試験組織の細胞によって生産されるモルフォゲンの生産、即ち発現および/または分泌にその化合物が影響を与えるのに十分な時間、試験組織またはその細胞と共にインビトロで試験化合物をインキュベートすることによって、同定し試験することができる。ここで適切な組織または培養された組織細胞は、このましくはニューロンおよび/またはグリア細胞からなっている。例えば、試験のための適切な組織は黒質、下垂体グリア細胞および類似組織から単離された培養細胞を含んでいる。

10

【0078】

候補化合物に対してさらされたとき、生成するモルフォゲンのレベルを測定するための特に好ましい検出方法としては、モルフォゲンに対して特異的に反応し、さらにモルフォゲンとのコンプレックスの一部として検出される抗体あるいは結合性蛋白質を用いたイムノアッセイがあげられる。イムノアッセイは、公知の一般的な技術とモルフォゲンに対して培養され、そのモルフォゲンに特異的である抗体を使用して行われる。ここに述べたように、モルフォゲンは天然の原料物質から単離するか、遺伝子操作によって調製できる。内因性モルフォゲンを促進できる物質はここで説明するように製剤学的方法によって製剤化され、投与される。

20

【0079】

モルフォゲンを軸索の再生を促進するためある部位に投与する場合には、好ましくはモルフォゲンは、インビボでその部位に蛋白質を保持できる適切な生体内適合性で好ましくは生体吸収性のある、それを通じて神経突起が再生するところのキャリアーと共に投与する。現在、好ましいキャリアーは、軸索の成長を方向づけるのを助けるのに十分な構造をもったものからなっている。現在好ましいキャリアーとしては、コラーゲン、ヒアルロン酸、ラミニンおよび/またはポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ酪酸のような合成ポリマーまたは合成共重合体のような構造的分子である。現在もっとも好ましいキャリアーは、組織細胞外マトリックスからなるものである。これらは、市販されている。さらにまた、脳組織由来細胞外マトリックスは、引用によって本発明と一体化している国際出願US92/01968 (WO92/15323) に記載の手段、および/またはその他の公知手段によって調製できる。

30

【0080】

神経経路特に末梢神経系の経路の切断を修復するための現在の好ましい手段としては、切断を覆うために十分な大きさを持ち、切断神経末端を受け入れることができる開口部を有する生体内適合性の隔膜またはケーシングを含む器具の一部としてその部位にモルフォゲンを供給することを含んでいる。モルフォゲンはケーシングに配置され、好ましくは適切なキャリアー全体に分散され、そして切断された神経の末端に接触可能である。さらにまた、モルフォゲンはケーシングの内部表面に吸着されるか、そこに結合する。さらに現在の好ましいケーシングは不透過性の外表面を有している。ケーシングは神経の案内回路として作用し、さらに軸索成長の方向付けを補助する。さらにまた、ケーシングは傷痕組織の形成を助ける免疫関連物質から損傷を受けた神経を保護する。適切な回路とケーシングの素材は、シリコンあるいはコラーゲン、ヒアルロン酸、ラミニン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ酪酸および類似物質等の生体吸収性物質を含む。さらに、ここに一般的に説明した神経案内回路は、形状がチューブ状であるが、種々のその他の形状が使用され得ることが当業者には明らかである。案内回路の内腔は、例えば横断面が長円または方形であっても良い。さらにまた案内回路は、神経の切断端を守るようにしっかりと結びつけられた2またはそれ以上のパーツで構築しても良い。神経末端はフィブリングルーのような生体内適合性の接着物質で縫合するかあるいはその他公知の医学的手段で神経案内回

40

50

路に結び付けられる。

【0081】

2.1 可溶性モルフォゲンコンプレックス

水溶液の溶解性が改善され、本質的にアミノ酸で構成されている、治療用の製剤として有用なモルフォゲンの好ましい形態は、少なくとも100のアミノ酸ペプチド配列からなる二量体モルフォゲン蛋白質またはその対立形質体、種変異体または他の配列変異体である。このアミノ酸ペプチド配列は、モルフォゲンファミリーのメンバーのプロ領域の一部または全部からなるペプチドと複合したモルフォゲンファミリーに特徴的な、7またはそれ以上のシステイン残基のパターンを持つ。また対立形質、種特異的あるいはそれらの変異体からなるものである。好ましくは、二量体モルフォゲン蛋白質は2つのペプチドと複合している。さらにまた、二量体モルフォゲン蛋白質は、好ましくは非共有的にプロ領域ペプチドまたはペプチドと複合している。また、プロ領域ペプチドは、好ましくはもとのモルフォゲンプロ領域を特定するN末端側18アミノ酸を少なくとも持っている。もっとも好ましい実施態様では、実質的にプロ領域の全長を特定するペプチドが使用される。

10

【0082】

その他のモルフォゲンの溶解型は、これらの蛋白質の切断されていないプロ型の二量体、二量体の一つのサブユニットは蛋白質の切断されないプロ型であり、そしてもう一方のサブユニットは蛋白質の成熟型である「半二量体」、さらにそれらの切断型を含んでおり、好ましくは切断されたプロドメインペプチドに非共有的に結合している。

20

【0083】

上記に示したように、有用なプロドメインは、プロ領域の全長または種々のこれらの切断型を含んでいる。特にこの切断型はArg-Xaa-Xaa-Argのプロテアーゼ開裂部位で切断されるようになっている。例えば、OP-1においては可能性のあるプロ配列は残基30-292（全長型）、48-292および158-292によって特定される配列を含む。溶解性OP-1コンプレックスの安定性は、プロ領域が48-292切断型のような切断型であるよりも、むしろ全長型である時に増強される。なぜなら残基30-47は他のモルフォゲンのN末端部分と配列のホモロジーを示している、全てのモルフォゲン対してコンプレックスの安定性を増強するので有用性が高いと考えられている。したがって、一般的に好ましいプロ配列は、与えられたモルフォゲンのプロ領域の全長をコードしたものである。有用性のあることが期待されているその他のプロ配列は生物合成プロ配列であって、特に1またはそれ以上のモルフォゲンプロ配列のN末端部に由来した配列を組み込んだものである。

30

【0084】

当業者には容易に理解されるように、プロ領域をコードする有用な配列は、公知のモルフォゲンをコードする遺伝子配列から得ることができる。さらにまた、キメラのプロ領域は1またはそれ以上の公知のモルフォゲンの配列から構築することができる。更にまた、別の可能性としては、1またはそれ以上の公知のプロ領域の合成配列の変異体をつくり出すことである。

【0085】

別の好ましい実施態様においては、有用なプロ領域ペプチドは核酸配列によってコードされるアミノ酸配列からなるポリペプチド鎖をふくんでいる。この核酸は、配列表配列番号16および20のヌクレオチド136-192と152-211に夫々対応するOP1またはOP2のプロ領域配列の少なくともN末端の18アミノ酸をコードするDNAまたはRNA配列と厳密な限定条件下でハイブリダイズするものである。

40

【0086】

A. 培養液または体液からの可溶性モルフォゲンコンプレックスの単離

モルフォゲンは可溶性コンプレックスとして哺乳動物細胞に発現される。しかし、通常コンプレックスは、精製溶液中にしばしば添加される界面活性剤、アルコール、有機溶媒、カオトロピック剤および溶液のpH低下のために添加される化合物等の変質剤にさらされることによって、精製中に触離する。以下に示すものは、非変質条件下で調製された培地（または場合により、血清、脳脊髄液あるいは腹膜液のような体液）から可溶性蛋白質を

50

精製するための一般的に好ましいプロトコールである。本方法は、素早く、再現可能であり、そして実質的に純粋な状態で単離された可溶性モルフォゲンコンプレックスを産出する。

【0087】

可溶性モルフォゲンコンプレックスは、変性剤の存在下で行なわれる簡単な3ステップのクロマトグラフィプロトコールを使用して調製培地から単離することができる。プロトコールには培地（あるいは体液）をアフィニティーカラムに流し、続いてイオン交換とゲル濾過クロマトグラフィーを通過させることになっている。ここに述べたアフィニティーカラムはZn-IMACカラムである。本プロトコールはモルフォゲンの変異体の精製にも一般的には適用可能である。なお、変異体全てが以下に説明するプロトコールのマイナーな変更を行うだけで単離できると予想される。さらにまた他のプロトコールは与えられたモルフォゲンのプロドメイン（例えばプロテインA結合セファロースカラムに対して結合した）に対して特異的に結合する抗体を用いるなどの標準的な手法で作られたイムノアフィニティーカラムにおいて有用性を持つことが想定している。イムノアフィニティーカラムを調製するためのプロトコールは先行技術に開示されている（例えばGiede to Protein Purification, M.Deutscher, ed., Academic Press, San Diego, 1990, のセクションVIIとXIを特に参照のこと）。

【0088】

本実験において、OP-1は先行技術（例えば国際出願US90/05903（WO91/5802））に開示されたように哺乳動物細胞であるCHO（chinese hamster ovary）細胞で発現させた。0.5% FBSを含むCHO細胞調整培地は最初にImmobilized Metal-Ion Affinity Chromatography（IMAC）を使用して精製した。調製培地からの可溶性OP-1は非常に選択的にZn-IMAC樹脂に結合し、高濃度のイミダゾール（50mM イミダゾールpH8.0）で結合したコンプレックスを効率的に溶出した。Zn-IMACのステップでは、フロースルーと35mMイミダゾールで洗浄したフラクションに溶け出す汚染性の血清蛋白質のブルクと可溶性OP-1とを分離する。Zn-IMACで精製した可溶性OP-1は、次いで50mM NaClを含む20mM NaPO₄（pH7.0）で平衡化したS-セファロース陽イオン交換樹脂カラムにかける。このS-セファロースステップはさらに精製を行い、そして次のゲル濾過ステップのための前処理として可溶性OP-1コンプレックスを濃縮する。蛋白質はTBSで平衡化したセファクリル S-200HRカラムにかける。基本的には同一のプロトコールを用いて、可溶性のモルフォゲンを血清、脳脊髄液、腹腔内液などの1またはそれ以上の体液から単離することができる。IMACは、カラムの3倍容量の0.2M ZnSO₄でチャージしたキレート化セファロース（Pharmacia製）を使用して行う。調製培地はpH7.0に調整し、500mM NaCl含有20mM HEPES（pH7.0）で平衡化したZn-IMAC樹脂に直接負荷した。Zn-IMAC樹脂は、樹脂1mlあたり調製培地80mlを負荷させる。負荷後カラムを平衡化緩衝液で洗浄し、混入している他の蛋白質の大部分を35mMイミダゾールを含む平衡化緩衝液（pH7.0）で溶出した。次いで可溶性OP-1コンプレックスを50mMイミダゾール（pH8.0）を含む20mM HEPES-500mM食塩溶液で溶出した。

【0089】

可溶性OP-1コンプレックスを含む50mMイミダゾール溶出液は20mM NaPO₄（pH7.0）9倍容量で希釈し、50mM NaClを含む20mM NaPO₄（pH7.0）で平衡化したS-セファロース（Pharmacia製）カラムにかけた。S-セファロース樹脂は、樹脂1mlあたり調製培地800mlを負荷した。負荷後、S-セファロースカラムを平衡化緩衝液で洗浄し、100mM NaClで溶出し、続いて300mM、および500mM NaClを含む20mM NaPO₄（pH7.0）で溶出した。300mM NaClのプールはさらにゲル濾過クロマトグラフィーで精製した。300mM NaCl溶出液50mlを、トリス緩衝食塩水（TBS）・50mM Tris・150mM NaCl（pH 7.4）で平衡化した5.0×90cmセファクリルS-200HR（Pharmacia製）に適用した。カラムは5ml/分の流下速度で溶出し、10mlずつ分画した。見たところでは溶性OP-1の分子は蛋白質分子量標準と比較して決定した。分子量標準はアルコールデヒドロゲナーゼ（ADH 150kDa）、ウシ血清アルブミン（BSA 68kDa）、カルボニックアンヒドラーゼ（CA 30kDa）およびチトクロームC（cyt C 12.5kDa）である。S-200カラムのフラクションの精製度は標準的な15% SDS ポリアクリルアミドゲルのク

10

20

30

40

50

ーマシーブルー染色による分離によって決定した。成熟OP-1とプロドメインの特定は、標準的な逆相C18HPLCを用いてプロドメインから成熟OP-1を分離してN末端アミノ酸配列を分析して決定した。

【0090】

可溶性OP-1コンプレックスはおよそ110kDaの分子量で溶出される。これは、2つのプロドメイン（各39kDa）に1つの成熟OP-1二量体（35-36kDa）が結合したという可溶性OP-1コンプレックスの組成の予想値に一致した。最終的なコンプレックスの純度は還元型15%ポリアクリルアミドゲルに適切なフラクションを流下させて証明することができる。

【0091】

コンプレックスのコンポーネントは、S-200またはS-200HRカラムからのコンプレックスを含むフラクションを、標準的な手法によるアセトニトリルのグラジエント（0.1%TFA中）で逆相C18HPLCカラムにかけ、溶出して決定できる。コンプレックスはこのステップで解離し、プロドメインと成熟種は分離した種として溶出する。ついでこれらの分離した種は標準的な手法（例えばGuide to Protein Purification, M. Deutscher, ed., Academic Press, San Diego, 1990, 特に602-613ページを参照）を用いてN末端配列を決定する。そして分離した36kDaと39kDaの蛋白質は夫々成熟モルフォゲンおよび単離され、切断されたプロドメインであることが確認された。哺乳動物細胞の生産したOP-1からの単離したプロドメインのN末端配列は、プロ領域の2つの型を示していた。これは完全型（配列表配列番号16の残基30からはじまる）と切断型（配列表配列番号16の残基48からはじまる）である。単離した成熟種のポリペプチドサブユニットのN末端配列は成熟配列のN末端が配列表配列番号16の残基293、300、313、315、316および318からはじまっていることを明らかにした。さらにこれらのすべてが標準的な骨誘導分析法で活性を示していた。

【0092】

B. インビトロの可溶性モルフォゲンコンプレックス形成

培養培地または体液から可溶性コンプレックスを精製するかわりに、可溶性コンプレックスを精製したプロドメインと成熟型二量体種から構築することもできる。明らかに、上手なコンプレックス形成は、SS結合に影響しないように、これらの分子の折り畳み構造を緩めるのに十分な変性条件の下で成分を結合させることが必要となる。好ましくは、変性条件は、切断されたプロドメインが、緩められた折り畳み条件下で成熟型二量体種と結合する機会を持つように細胞内小囊の条件に十分に似せておく。そのときの溶液中の変質剤の濃度は、二量体とプロドメインの結合を維持する一方で、二量体とプロ領域とが適切なりフォールディングを行えるように、好ましくは段階的にコントロールして減らしていく。有用な変質剤は、pH4-10、好ましくはpH6-8の緩衝溶液中に4-6M尿素またはグアニジン塩酸塩（GuHCl）を含むものである。そのとき可溶性コンプレックスは、透析で制御するか、または尿素あるいはGuHClの0.1-2M以下、好ましくは1-2M以下の最終変質剤濃度に溶液を希釈することで形成される。尿素あるいはGuHCl濃度は、好ましくは生理的な緩衝液で希釈する。蛋白質の精製/再生手段と要件は先行技術に開示されており、適切な再生プロトコルを開発するための詳細は、当業者によって容易に決定することができる。この問題に対する一つの有用なテキストは、Guide to Protein Purification, M. Deutscher, ed., Academic Press, San Diego, 1990, とくにセクションVをあげることができる。コンプレックス形成はまた、1またはそれ以上のシャペロン蛋白質を加えることで補助される。

【0093】

C. 可溶性モルフォゲンコンプレックスの安定性

生理学的緩衝液、例えばトリス緩衝食塩水（TBS）およびリン酸緩衝食塩水（PBS）中の高純度可溶性モルフォゲンコンプレックスの安定性は、多くの手段のうちどれでもで増強できる。一般的に好ましい方法は、少なくともプロ配列の最初の18アミノ酸配列表配列番号16のOP-1の残基30-47）からなるプロ領域を使用することであり、プロ領域の全長を使うことは特に好ましい。残基30-47はその他のモルフォゲンのN末端部分と配列にホモロジーがあり、そして全てのモルフォゲンにとってコンプレックス安定性を増強するために特に有用であると考えられている。可溶性モルフォゲンコンプレックスの安定性を増強す

10

20

30

40

50

るためのその他の有用な手段は、3種類の添加物を含む。これらの添加物は塩基性アミノ酸（L-アルギニン、リジンおよびベタイン等）、非イオン性界面活性剤（Tween-80またはNonidet p-120）およびキャリアー蛋白質（血清アルブミンおよびカゼイン等）を含む。これらの添加物の有効濃度は塩基性アミノ酸の場合1-100mM、好ましくは50mMを含む10-70mMであり、非イオン性界面活性剤の場合0.01-1.0%、好ましくは0.1%（v/v）を含む0.05-0.2%、キャリアー蛋白質の場合0.01-1.0%、好ましくは0.1%（w/v）を含む0.05-0.2%である。

【0094】

このアミノ酸ペプチド配列は、モルフォゲンファミリーのメンバーのプロ領域の一部または全部からなるペプチドと複合したモルフォゲンファミリーに特徴的な、7またはそれ以上のシステイン残基のパターンを持つ。

10

【実施例1】

【0095】

モルフォゲン発現組織の同定

モルフォゲンの組織分布を測定することは、得られた組織で発現した異なるモルフォゲンを、関連するモルフォゲンと同様に、同定するために使用される。組織分布は、候補モルフォゲン誘導物質のスクリーニングと同定の為に有用なモルフォゲン生産組織を同定するのに使用される。組織分布はさらに候補モルフォゲン誘導物質をスクリーニングし同定する為に有用なモルフォゲン生産組織を同定するのに使用されるモルフォゲン（あるいはmRNAの転写）は、発現が低い組織でも、標準的な手法と一部変法を用いて異なった組織で容易に同定される。例えば、蛋白質の分布は標準的なウエスタンブロットや免疫蛍光操作とモルフォゲンあるいは目的のモルフォゲン群に特異的な抗体で同定できる。同様にモルフォゲンmRNAの分布は、標準的なノーザンハイブリダイゼーション法とmRNA特異的プローブを用いて特定される。

20

【0096】

mRNAに特異的にハイブリダイズし、mRNAに関連したその他の者から目的のmRNAを区別するプローブを使用できる。なぜならば、ここでいうモルフォゲンはその活性C末端ドメインと高いホモロジーを以ているため、特異的なモルフォゲンmRNAの組織識別が未成熟蛋白質のプロドメイン、および/または成熟蛋白質のN末端領域をプローブを用いて識別できる。その他の有用な初列は3'非コード領域のフランキングとそれに続く明らかなストップコドンである。配列のこの部分は、本発明のモルフォゲンの間でも、実質的に異なっている。そしてそれゆえに蛋白質特異的である。例えば特に有用なVgr-1特異的プローブ配列は、PvuII-SacI断片であり、非翻訳プロドメインと成熟N末端領域の両方をコードする265bpのフラグメントからなる（Lyons et al. (1989) PNAS 86:4554-4558にcDNA配列が記載されている。同様に、特に有用なmOP-1特異的プローブ配列がBstXI-BglII断片であり、mOP-1のプロ領域の殆ど2-3番目をカバーしている0.68kbの配列である。StuI-StuI断片、7システインドメインの直前の上流配列0.2kb。EarI-PstIフラグメント、3'非翻訳配列の部分を含む0.3kbフラグメント（配列表配列番号18、プロ領域は残基30-291で必須として特定されている）。同様のアプローチが使用され、例えばhOP-1（配列表配列番号16）、ヒトまたはマウスOP-2（配列表配列番号20および22）に使用。

30

40

【0097】

合成操作あるいはクローン化した配列から得たこのモルフォゲン特異的プローブを使い、従来技術として良く知られている手法により、モルフォゲン転写を哺乳動物組織から同定した。要約すると、全RNAは種々の成熟マウス組織（肝臓、腎臓、睾丸、心臓、脳、胸腺、胃）から、Chomezyskiらの方法（1987、Anal. Biochem 162:156-159）および以下に示した方法のような標準的な方法で調製した。ポリ（A）+RNAはオリゴ（dt）-セルロースクロマトグラフィー（ファルマシアLKB バイオテクノロジーInc.）を用いて調製した。各組織からのポリ（A）+RNA（通常15μg）を1%アガロース/ホルムアルデヒドゲルで分離し、Nytran膜（Schleicher & Schuell）に移した。転移に続いて、メンブランは80℃に加熱し、RNAはUV光で架橋させた（通常1mw/cm²で30秒間）。ハイブリダイゼーションに先立

50

ち、加熱により適当なプローブを変性させた。

【0098】

ハイブリダイゼーションはローラーボトル中で回転しているルーサイト製シリンダー中
で行った。1rev/分、37 15時間、40%フォルムアミド、5×Denhardts、5×SSPE、0.1%
SDSの条件とした。ハイブリダイゼーションに引き続いて、50 で0.1%SDS,0.1×SSPEで
フィルターの非特異的カウントを洗浄した。

【0099】

種々のモルフォゲンの組織分布を実施例に示している。Vgr-1,OP-1,MP2,MP3,MP4,B
MP5,GDF-1,OP-2について行い、成人組織について米国出願USSN 752,7264 に開示し、ま
たOzkaynak et al. 1991, Biochem. Biophys. Res. Commn. 179:116-123,およびOzkaynak
et al. 1992,JBC (印刷中) に開示しており、引用により本発明と一体化する。ここに記
載した通常のプローブ技術を用いて、脳、脾臓、肺、心臓、肝臓および腎臓組織に対する
これらのモルフォゲンに特異的なプローブを使ったノーザンプロットハイブリダイゼー
ションは、腎臓関連組織がOP-1の最大の発現ソースであることを示しており、脳、心臓、肺
組織が第二のソースであることを示している。OP-1 mRNAもまた、このプローブ法によっ
て唾液腺、特にラット耳下腺中に特定されている。肺組織は、Vgr-1, BMP5, BMP4およびB
MP3の最大の組織発現ソースであるとおもわれる。Vgr-1の低レベルは腎臓と心臓組織に認
められ、一方、肝臓はBMP5の第二の発現ソースであり、脾臓はBMP4の第二の発現ソースで
あることが示された。GDF-1は脳中で一番多く発現されている。今日ではOP2は、初期の栓
塞組織において一番多く発現していることが確認されている。特異的にマウス胚と出生後
6日めの動物のノーザンプロットでは、8日めの胚にOP2の発現が認められた。発現は17日
目の胚で顕著に減少し、出生後の動物では検出されなかった。

10

20

【実施例2】

【0100】

神経系のモルフォゲンの分布

モルフォゲンは成長中および成熟ラットの脳および脊髄組織に特定されており、成長期
および成熟ラットの神経組織(上記実施例1)から抽出したmRNAにたいしてモルフォゲン
特異的プローブのノーザンプロット法と免疫組織学的研究法によって特定されている。例
えば、成長期ラット組織のノーザンプロット分析ではCNS中で明らかにOP-1 mRNAの転写発
現を確認されている(国際出願US92/01968(WO92/15323)、Ozkaynak et al.,1991,Bioch
em.Biophys. Res. Comm.,179:11623、Ozkaynak,et al., 1992,J.Biol.Chem.,267:25220-2
5227)。GDF-1 mRNAは成長期および成熟ラットの神経組織で最も多く発現することが確認
されている。特に小脳および脳幹を含む脳、脊髄および末梢神経で確認されている(Lee,
S.,1991,PNAS 88:4250-4254)。BMP2B(BMP4として先行技術を参照)およびVgr-1の転写
は神経組織で発現することが報告されている(Jones et al.,1991,Development,111:531-
542)。しかし神経組織ではこれらの遺伝子の初期発現組織は知られていない(Ozkaynak,
et al.,1992,J.Biol.Chem.,267:25220-25227)。特にCBMP2の転写は、下垂体の発達に伴
って間脳の領域で発現することが知られており、Vgr-1のmRNAは、発達中の神経管の底板
にきわめて隣接した細胞中と同様に、発達中の神経管の上衣板を含む、CNSの腹背軸で報
告されている。老齢ラットでは、Vgr-1のmRNAが、発達した海馬組織で報告されている。
さらにOP-1とBMP-2を本来的にコードする遺伝子は、ヒト海馬cDNAライブラリーをプロ
ーブして特定された。

30

40

【0101】

公知技術の一般的な方法とここに一体化されている国際出願US92/01968(WO92/15323)
の開示内容を用いて免疫組織学的研究は、成長期と成熟ラットの脳および脊髄組織の特定
の領域にOP-1NO発現が極在化していることを確認した。公知の先行技術による標準的な抗
体のプロトコルを用いて作成し、好ましくはOP-1アフィニティーカラムで精製した標準
的なモルフォゲン特異的抗血清を用いて、特にウサギ抗-OP1抗血清を用いて、特異的にOP
-1蛋白質の発現が、成熟(2-3カ月齢)マウスおよび5-6日齢胎児性神経組織で評価されて
いる。抗体それ自身は標準的な蛍光ラベル化技術を用いてラベルし、あるいはラベル化抗

50

ウサギIgG分子が結合OP-1抗体を視覚化するために用いられている。

【0102】

免疫染色によって成熟ラット中枢神経系（CNS）にOP-1の存在を示すことができる。同一のそして広い範囲に染色が、脳（1A）と脊髄（1B）に認められた。

【0103】

図1Aと図1Bに示すように、免疫蛍光染色によって成熟ラット中枢神経系（CNS）にOP-1の存在を示すことができる。同一のそして広い範囲に染色が、脳（1A）と脊髄（1B）に認められた。OP-1は、灰白質（神経細胞体）の細胞外マトリックスに一番多く分布していることが確認されており、細胞体それ自身を除いて全体に明らかに存在している。ミエリン鞘化した神経繊維で主に形成された白質には、染色は神経膠星状細胞（グリア細胞）限定されていることが確認された。さらにまた同様の染色パターンが新生ラット（10日齢）の脳部分に観察された。

【0104】

さらにまた、OP-1は特異的に黒質に分布しており、黒質は線条体基底節、大脳皮質に結合している副運動ニューロン系および皮質脊髄を構成している。これらのサブポピュレーションあるいはニューロンの系の機能不全はハンチントン舞踏病とパーキンソン病を含む多くのニューロパシーと関係している。OP-1はまたアデンデマグリア細胞に分布している。これは脳脊髄液中に各種の因子を分泌することが知られており、成長期および成熟ラットの心室弁、コロイド溝、脳の中心溝の周辺でみられる。

【0105】

最終的に、成長期の胚のモルフォゲンの抑制が神経組織の発達を抑制している。特に、標準的な条件でインビトロで培養している9-日目のマウス胚細胞を、遺伝子操作で調製し、精製し、免疫源として用いて調製したOP-1特異的モノクローナル抗体の存在下および非存在下でインキュベーションを行った。抗体は先行技術と実施例13に一般的に開示した標準的な抗体生産手段で生産した。2日後に成長期の胚への抗体の作用を組織学的に観察して評価した。組織学的試験によって測定したところ、OP-1特異的抗体は、特異的に、成長期の胚において眼葉の形成を阻害した。特に間脳の外成長が発達しなかった。さらに心臓は奇形化した。さらにまた、ラベル化したOP-1特異的抗体を用いて胚の断面の免疫組織学的研究方法で分離したところ、OP-1特異的抗体は神経上皮に分布した。

【0106】

神経細胞に作用する内因性モルフォゲンは、神経組織細胞例えばニューロンおよび/またはニューロンに結合するグリア細胞によって発現し分泌され、脳脊髄液および/または血流によってニューロンへ移送される。最近、OP-1はヒト血液中に確認された（下記実施例9）。さらに、最近になって移送されたシュワン細胞が、少なくとも、いくつかの新しい神経突起の周辺に管腔形成とミエリン鞘形成誘導することを含む、ラット脊髄の神経繊維形成を促進することが発見された（Bung, 1991, Exp. Neurology, 114:254-257）。これらの細胞の再生能力はシュワン細胞によるモルフォゲンの分泌によって媒介させることができる。

【実施例3】

【0107】

モルフォゲンによる神経細胞生存性の増強

ここに述べたモルフォゲンは細胞の生存性を増強するが、特に瀕死の神経細胞の生存性を増強する。例えば、十分に分化したニューロンは非分裂性であり、公知の合成培地あるいは低血清培地を用いて、標準的な哺乳動物細胞培養条件下で培養した時、インビトロでは死滅する（Charness, 1986, J. Biol. Chem., 26:3164-3169、Freese et al., 1990, Brain Res., 521:254-264を参照のこと）。しかし、もし非分裂性神経細胞の初代培養がモルフォゲンで処理された場合、これらの細胞の生存性は大幅に増強される。例えば、成熟ラット脳の黒質から単離された線条体基底節の初代培養は、標準的な方法を使用して行われた。即ち黒質組織をパスツールピペットを使って均質化して分離し、標準的な組織培養プロトコルを使用し、低血清培地、例えば50%DMEM（Dulbecco's modified Eagle's medium）

10

20

30

40

50

、50%F-12培地、ペニシリン/ストレプトマイシン添加不活化馬血清、4g/lのグルコースを用いて増殖させた。標準的な培養条件の下では、これらの細胞は無血清培地で培養した時3週間で明らかに死滅していった。細胞死は、細胞接着性の不活性化とその超微細構造的な特徴の変化例えばクロマチン凝集とオルガネラ崩壊などにより、形態学的に明らか事実であった。

【0108】

この例においては、培養基底節は、0.1-100ng/mlのOP-1を配合した合成培地で処理した。新鮮なモルフォゲン - 調製培地は、3-4日ごとに細胞に供給した。細胞の生存性は明らかに増強され、添加したOP-1のレベルに依存していた。OP-1の濃度が細胞培養中で増加したとき、明らかに細胞死が減少した。特異的に、細胞は接着性を残し、生存分化ニューロンの形態学的特性の保持が持続した。モルフォゲン処理がない場合には、培養細胞の殆どが解離し、細胞壊死をきたした。

10

【0109】

黒質の基底節の機能不全は、インビボではハンチントン舞蹈病とパーキンソン病に関係している。ここで説明するニューロンの生存性を増強できるモルフォゲンの機能は、このモルフォゲンがニューロパシまたは化学的、物理的傷害のため、インビボで、瀕死の神経性細胞の生存性を増強する治療の一部として有用であることを明示している。臨床応用のためには、モルフォゲンを投与するか、あるいはまたモルフォゲン産生刺激剤を投与することができる。

20

【実施例4】

【0110】

形質転換細胞のモルフォゲン誘導性再分化

ここに述べたモルフォゲンは形質転換細胞を、非形質転換細胞に特徴的な形態学的特性への再分化を誘導する。特にモルフォゲンは神経由来の形質転換細胞を非形質転換ニューロンの形態学的特性への再分化を誘導することができる。神経由来の形質転換ヒトNG108-15株の再分化を誘導したモルフォゲンについて、以下に示す実施例で詳細を説明する。また形質転換細胞のモルフォゲン誘導再分化はマウス神経芽腫細胞(N1E-115)およびヒト胎児カルシノーマ細胞についてである(国際出願US92/01968(WO92/15323)を参照)。

【0111】

NG108-15は神経芽腫とグリオマー細胞を融合させて作製した形質転換融合細胞株であり(America Type Tissue Culture, Rockville, MD から入手)、形質転換胎児ニューロンの形態学的特徴を有している。即ち繊維芽細胞の形態学性を有している。特に細胞はポリゴナルな細胞体を有し、短い、スパイク様の突起を有し、近接細胞にまれに接触する(図1A)。NG108-15細胞を無血清の合成培地中で0.1から300ng/mlのOP-1をいれて4時間インキュベーションすると、確実に濃度依存性の細胞形態学的変化が誘導される。

30

【0112】

実験中NG108-15細胞は、ポリL-リジンコート6穴プレートで予備培養した。各ウエルには2.5mlの合成培地中に細胞を40-50,000個を含有させた。3日めに0.025%のトリフルオロ酢酸を含む60%エタノールにOP-1 2.5µlを各ウエルに添加した。OP-1の濃度は0-300ng/mlで試験を行った。通常、培地は新しいOP-1のアリコートで毎日交換し、さらにモルフォゲンは、OP-1での4時間のインキュベーションによって誘導できた。さらにOP-1の濃度を10ng/mlにすることで再分化を十分誘導した。1日後に、hOP-1処理細胞は明らかにその細胞の超微細構造が変化した。その変化は細胞体の周囲を含んでおり、相の鮮やかさが増加しそして短い神経突起が長くなった。2日後、OP-1で処理した細胞は上皮性シートを形成し始めた。このシートは処理後3日目にはじまる多層凝集成長の基を供給している。4日目までにOP-1処理細胞の殆どが密着した多層凝集状態に結合した(図1B)。図2は、モルフォゲン濃度の作用として、6つの独立した実験群からランダムに選択した20の視野中の多層凝集あるいは細胞凝集の平均数をプロットしたものである。40ng/mlのOP-1は細胞凝集の最大値の半分を誘導した。

40

【0113】

50

モルフォゲン誘導の再分化が、DNA合成、細胞分裂、または細胞の生存性などの、どのような変化ももたらさずに起こり、これは、形態学的変化が細胞の分化あるいはhOP-1の毒性作用にとって2次的なものではないということを示している。さらにOP-1誘導性形態形成は、形質転換細胞の分化を増強することがわかっている酪酸塩、DMSO、レチノイン酸、フォルスコリンのようなその他の分子とは異なり、トリチウムチミジンの取り込みによって測定したように、細胞分裂を阻害しなかった。データは、OP-1が細胞の安定性と生存性を再分化誘導後も維持できることを示している。さらに効果はモルフォゲンに特異的であって、NG108-15細胞を0.1-40ng/mlのTGF- β でインキュベートした時には再分化は誘導されなかった。

【0114】

また、実験は高純度可溶性モルフォゲン（成熟型OP-1とそのプロドメインを結合させたもの等）を用いて行い、これはまた特異的にNG108-15細胞の再分化を誘導した。

【0115】

従って、ここに述べたモルフォゲンは神経系の腫瘍或いは腫瘍性病変の処置の、特に網膜芽腫瘍および神経膠腫を含む神経芽腫の処置において、有用な治療剤を提供する。モルフォゲンそれ自身を投与することもできるし、さらにモルフォゲン産生刺激剤を投与することもできる。

【実施例5】

【0116】

化学的損害からの神経組織の保護

正常細胞の生存性を増強し、再分化細胞の細胞凝集および細胞-細胞接着を誘導することに説明するモルフォゲンの機能は、モルフォゲンが化学的に引き起こされた損傷から回路を保護している細胞を保護していることによって、神経回路を維持するための治療剤として有用であることを示している。特にモルフォゲンはニューロンを保護することができる。これは、ニューロンの増殖と遊走を阻害し、細胞と細胞の接着を邪魔することが知られている毒物の作用からニューロンを保護して発達させることを含んでいる。このような毒物の例としてはエタノールが含まれ、タバコの煙中に含まれる1またはそれ以上の毒物および種々の阿片化合物がある。ニューロンの発達におよぼすエタノールの毒性作用は、胎児性アルコール症候群であきらかにされた神経学的損傷を誘発させる。モルフォゲンはまた、グルタミン酸塩のような興奮性アミノ酸に関連した細胞毒性からニューロンを保護

【0117】

例えば、エタノールは、モルフォゲン処理したNG108-15細胞の細胞-細胞接着作用に対して、これらの細胞に20-50mM濃度で与えた時、これを阻害する。最大阻害の半量値は5-10mMエタノール濃度であることが試験されている。この濃度は一本のアルコール飲料を飲んだ後の成人の血液中のアルコール濃度である。モルフォゲン誘導N-CAMレベルがエタノールによって影響されないの、むしろエタノールはCAMの誘導より細胞とCAMの特異的な結合を恐らく障害している。さらに、抑制的な作用はモルフォゲン濃度に逆比例している。従って、エタノールのような毒物に露出することからの損害のリスクにあるニューロンであって、特に発達中のニューロンに対してモルフォゲンまたはモルフォゲン促進剤を投与することは、毒物の阻害作用を回復することによって神経組織の損害からこれらの細胞を保護することになると予想される。ここに述べたモルフォゲンは、これらの毒物に露出して誘導されたニューロパシーからもたされる損傷した神経経路を処置するための治療に有用である。

【実施例6】

【0118】

モルフォゲン誘導CAM発現

ここに説明したモルフォゲンは、形態形成誘導の一部としてCAMの発現を誘導し、特にN-CAM発現を誘導する。CAMは組織発達の必須段階として、全ての組織から同志された形態形成制御分子である。N-CAMは少なくとも3種の異性体からなっており（N-CAM-180、N-CA

10

20

30

40

50

M-140、N-CAM-120、ここで180、140、120はポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定したおよその分子量である)少なくとも、一時的に発達中の組織で発現されており、そして神経組織では永続的である。N-CAM-180、N-CAM-140どちらの異性体も発達中の組織と成熟組織両方で発現している。N-CAM-120は、成熟組織のみで見出される。他に中間型CAMであるL1がある。

【0119】

N-CAMは適切な神経の発達に組み込まれている。この発達は適切な神経胚形成、神経細胞凝集、束化、シナプス形成等を含む。N-CAM特異的抗体を用いて分子を複合化することによるN-CAM生産の障害は網膜の形成を障害する。網膜の形成障害には網膜の軸索の凝集、標的の筋細胞への軸索の接合のような末梢神経系での軸索形成がある。さらに、物理学的あるいは化学的ニューロンの損傷、癌性形質転換およびなんらかの遺伝性神経疾患が、細胞の接着性と凝集性を変更する、CAMの発現における変化によって組み合わせられていることが明白な事実として示されている。特にN-CAMレベル増加はハンチントン舞蹈病の線条体(線条体基底節など)で増加し、接着性減少はアルツハイマー疾患で記録されている。

10

【0120】

ここで説明したモルフォゲンはCAMの生産、特にN-CAM分子の全ての異性体を含むN-CAMとL1の生産を刺激することが可能である。例えば、N-CAMの発現はモルフォゲン処理NG108-15細胞では顕著に促進されている。未処理NG108-15細胞は繊維芽細胞性の、あるいはほんの少しだけ分化した形態学的特性を示し通常は分化細胞に見られるN-CAMの180と140のみを発現する。モルフォゲン処理に引き続いて、これらの細胞は成熟ニューロンの形態学的特性を示し、N-CAMの3種の異性体すべての発現レベルが増強された。下記の実施例に示したと同様なプロトコルを用いると、さらにまたモルフォゲン処理NG108-15細胞のL1発現が誘導された。

20

【0121】

本実施例においてNG108-15細胞をOP-1を添加して濃度が増加した状態で4日間培養し、そして標準的なウエスタンブロットを全細胞抽出物について行った。N-CAM異性体が、3種の異性体全てに交差反応する抗体mAb H28.123を用いたところ検出された。抗体はSigma Chemical Co.St.Louisから入手できる。異なった異性体はゲル電気泳動の異なった移動度によって区別することができる。対照のNG108-15細胞(未処理)は、100 μ gの蛋白質を用いてウエスタンブロットを行って確認した所、140kDaと180kDaの異性体が発現しているが、120kDaは発現していない。OP-1処理NG108-15細胞は、120kDa異性体を誘導すると同時に、濃度に依存して180kDaと140kDaの異性体の発現が増加する。図2A、図2BではmAb H28.123をプローブとして行ったOP-1処理NG108-15細胞抽出物のウエスタンブロットを示しており、3つの異性体全ての誘導が認められる。図2Aはモルフォゲン濃度の作用としてN-CAM-180とN-CAM-140の容量反応曲線である。N-CAM-120はグラフ中に認められず、対照細胞中では定量できなかった。しかし図2Aのウエスタンブロットであきらかなように、N-CAM-120はモルフォゲン処理に反応して誘導されている。N-CAM-180とN-CAM-140の異性体に認められる誘導の違いは、140異性体の構成的発現が最大値に近く、ことによるものと考えられる。

30

40

【0122】

N-CAM発現の増加は、多細胞凝集のモルフォゲン誘導に反応していた。図2Aと図3Bを比較した。図3は6つの独立した実験でランダムに選択した20のフィールド当たりのモルフォゲン濃度に対する、多層性凝集(凝集)の平均数をグラフ化したものである。120異性体の誘導はモルフォゲン誘導された形質転換細胞の再分化は形質転換された発現型細胞からの細胞の再分化を促進するだけでなく、成熟細胞へ作用して発現型への分化も促進したことを示している。モルフォゲン処理細胞にmAb H28.123を用いて行った免疫組織学的研究では、末梢と処理細胞の神経突起を結びつけるN-CAMクラスター形成が認められ、未処理細胞では反応していなかった。さらにまた、モルフォゲン処理は、細胞数の計数またはトリチュウムチミジンの取り込みによって測定したところ、細胞分裂は抑制しなかった。

50

最後に、フォルスコリンとジメチルスルフォキシドのような公知の化学的分化剤はN-CAM生産を誘導しなかった。

【0123】

さらに、NG108-15細胞に対するOP-1の細胞凝集作用は抗N-CAM抗体またはアンチセンスN-CAMオリゴヌクレオチドで抑制できる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは公知技術の一般的な手段でヌクレオチドシンセサイザーを使用して合成できる。好ましくはホスホロチオレートオリゴヌクレオチド(S-オリゴ)を調製して、細胞膜のヌクレオチドの透過を促進させる。N-CAM誘導を阻害するために十分なN-CAM抗体とN-CAMアンチセンスオリゴヌクレオチドの両者の濃度は、多層化細胞凝集の形成をも阻害する。特に0.3-3 μ MのN-CAMアンチセンスS-オリゴ、5-500 μ M非修飾N-CAMアンチセンスオリゴあるいはまた10 μ g/ml mAb H28.123とモルフォゲン処理細胞をインキュベーションすると、明らかに細胞の凝集が抑制される。阻害が完全でない場合には、モルフォゲンがその他のCAMを増強させるらしい。

10

【0124】

可溶性モルフォゲン(プロドメインを結合させた成熟OP-1)を用いて行った実験でも特異的にCAM発現が誘導された。

【0125】

ここに述べたモルフォゲンは、CAMレベル、特にN-CAMレベルを変えて、神経学的障害、例えばハンチントン舞蹈病およびアルツハイマー病それらの類似疾患を治療するための治療剤として有用である。臨床的な応用ではモルフォゲンそれ自身を投与するか、あるいはまたモルフォゲン産生刺激剤を投与する。

20

【0126】

ここに記載したN-CAM発現に影響するモルフォゲンの有効性は、適切な細胞とここに示した方法を用いて、インビトロで評価できる。さらに形質転換細胞株に対するN-CAMの発現は、ここに記載した方法に従って、神経性細胞またはグリア細胞の初代培養で評価できる。インビボでのN-CAM発現におけるモルフォゲン処置の有効性は、以下の実施例9で述べたような組織バイオプシーと、実施例11で述べた動物モデルを用いるかmAb H28.123のようなN-CAM特異的抗体でN-CAM分子を検出することで評価できる。

【0127】

さらに、脳脊髄液または血清のN-CAM蛋白質レベルまたは蛋白フラグメントの存在レベルは、モルフォゲン処置の効果を評価して検出できる。N-CAM分子は細胞表面から脱落することが知られており、血清および脳脊髄液の両方から検出できる。さらに、可溶性N-CAMのレベルの変化は、正常圧の水頭症とタイプIIの分裂病に関係している。N-CAMの体液レベルは実施例9に述べた方法とmAb H28.123nのようなN-CAM特異抗体を用いることで検出できる。

30

【実施例7】

【0128】

モルフォゲン誘導神経ギャップ修復(PNS)

ここに述べたモルフォゲンはまた、損傷神経回路の修復と再生を行って、引き離された距離を超えて末梢神経系の軸索の成長を促進させる。末梢神経系のニューロンは誘導なしに、損傷の後に新しい神経突起を発生させることができる一方で、この発生が適切に結合しないと死滅する。切断の長さは5または10mmの場合には、再生は困難であるか、まったく不可能である。

40

【0129】

本実施例ではモルフォゲンによる神経再生はラット座骨神経モデルを用いて評価する。ラット座骨神経は、5mmのギャップ、特別な場合には10mmのギャップを越えて自発的に再生する。この特別な場合とは、生理食塩を満たした神経誘導集管に切断末端を挿入しギャップ中におく。この実験では神経の再生は12mmのギャップを越えて試験された。

【0130】

体重230-250gの成熟雌性のスプラグ-ドーリユラット(Charles River Laboratories

50

, Inc.) をペントバルビタールナトリウム (35mg/kg体重) の腹腔内投与によって麻酔させた。皮膚の切開は、太腿骨に対して平行させ、そして、ちょうど後方側で行った。外側広筋と膝腱筋肉との間の無血管筋肉内平面が、座骨神経を取り巻く疎性線維輪紋状組織に対してくみこまれ、そして続いている。疎性組織が縦に分割されており、どの部分においても血流遮断なしに、座骨神経を十分に引き離してフリーにすることができる。外科手術顕微鏡下で座骨神経を微小鉗を用いてmid-thighで切断し、12mmに神経切断端を分離して、OP-1ゲル片を移植した。移植部分は、モルフォゲン溶液を満たした内部直径1.5mm、長さ20mmのシリコンチューブで包み込んだ。特に、チューブの中心12mmは、MATRIGEL (Collaborative Research, Inc., Bedford, MA) の約100 μ l でCHOで遺伝子組換え生産した精製OP-1を1-5 μ gを混合して調製したOP-1ゲルからなっている。なおMATRIGELはマウス肉腫組織から抽出した細胞外マトリックスで、可溶化した組織基底膜を含有している。可溶化組織基底膜はリン酸緩衝生理食塩水中にラミニン、タイプIVコラーゲン、ヘパリン硫酸塩、プロテオグリカン、エンタクチン等を含んでいる。OP-1を満たしたチューブは、損傷部分に直接移植し、神経の切断端を、チューブそれぞれの末端に4mmを入れる。両切断端はOP-1ゲルに接しており、そして束保護鞘を神経上膜を通して市販の外科用10-0ナイロンで3針縫って、シリコンチューブ中にしっかりと固定しておく。

10

【0131】

さらにOP-1ゲル移植に対して、空のシリコンチューブ、ゲルのみを満たしたチューブ、および「反転」自己移植、これは動物の座骨神経の12mm切断断片を縫合の前に180度回転させたものであり、対照として移植した。全ての実験は4回繰り返した。すべての傷はきずクリップでとめて塞ぎ、10日後に除去した。全ラットとも両脚に移植を行った。3週間目に動物を屠殺し、移植域を取り外し、すぐにドライアイスで凍結させた。次に凍結片の移植箇所を細かく切断し、フルロセイン (Sigma Chemical Co. から入手) でラベルした抗神経フィラメント抗体を用いて免疫蛍光染色によって軸索の再生を試験した。

20

【0132】

ギャップがOP-1ゲルで満たされている移植箇所の全長12mmにわたり、坐骨神経の再生が起こっていた。これとは対照的に、空のシリコンチューブおよび反転自己移植は神経再生が起こらず、ゲル含有の1移植箇所のみが軸索再生を示した。

【実施例8】

【0133】

モルフォゲン誘導神経ギャップの修復 (CNS)

インビボでの軸索の損傷に引き続き、CNSニューロンは再生ができない。さらにCNS神経組織の損傷、脊髄、視神経と網膜を含む損傷はこれらの細胞によって特定される神経回路の激しい障害と破壊を引き起こす。末梢神経の移植はCNS軸索の損傷をバイパスするためにも有効に使われる。成功した自己移植修復は一般的には、移植部位がCNSニューロン細胞体の近傍にあることが必要であり、そしてCNS軸索切除の最初の結果は神経細胞死である。ここでCNS神経修復において説明したモルフォゲンの有効性は、Bignamiらによって説明され、引用によってここに一体化した開示内容 (Bignami et al., 1979, Exp. Eye. Res. 28:63-69) のように、ラットの碎けた視神経モデルを用いて評価できる。最近それらに述べられているように、実験ラット (Charse River Laboratories, Willmington, MA) を標準的な実験手法で麻酔し、眼窩から眼を丁寧に摘出して引っ張ることで視神経を押しつぶした。即ち眼球の後ろに時計用鉗子を挿入し、15秒間鉗子で視覚神経を絞り、30秒間間隔において15秒間さらに鉗子を絞った。ラットは時間をおいた後屠殺した。その間隔は手術後48時間、3、4、11、15、18日である。視覚神経の修復手術に対するモルフォゲンの効果は、2回の繰り返し実験で評価した。その実験はモルフォゲンまたはPBS (25 μ l の溶液と25 μ gのモルフォゲン) を操作前、操作中および操作後一定の間隔で視覚神経に与えて評価した。

40

【0134】

治療なしで、神経を押しつぶすことで外科的にグリアに傷をつけ、グリアの傷のマーカー蛋白質であるグリア線維化酸性蛋白質 (GFA) を免疫蛍光染色して、組織学的に判断し

50

た。Bignam et al., 1974, J.Comp.Neur. 153:27-38に記載されたように、市販の入手可能なGFAに対する抗体 (Sigma Chemical Co., St. Louis) を使用して、空気乾燥によってクリオスタット切片の間接的蛍光染色を行った。GFAレベルの減少がモルフォゲン処理動物で認められた。これはモルフォゲンの作用はグリアの傷形成阻害と視覚神経の再生を促進していることを表している。

【実施例 9】

【0135】

神経組織の診断

神経組織のモルフォゲンの分布は神経の破壊またはニューロパシーを診断する方法の一部として利用可能である。この方法は脳組織のニューロパシーを診断するのに特に有利である。特にバイオプシーによる脳組織は、公知技術を使用して患者のリスクを見ることに使う。バイオプシーした組織のモルフォゲンの発現は、モルフォゲン特異的抗血清またはモノクローナル抗体を使った標準的な免疫蛍光技術を使用した一般的な方法で評価できる。特に、バイオプシー組織は公知技術によって薄く切片を作り、蛍光ラベル化した（あるいは別の検出方法）抗体と組織を特異的な抗原-抗体コンプレックス形成させることのできるような条件でインキュベートする。形成したコンプレックスの存在と量を測定し、あらかじめ得た標準または参照値と比較する。組織のモルフォゲン変化レベルの検出は組織機能の指標として使用できる。さらにまた、モルフォゲンレベルの変動はモルフォゲンRNAに対して特異的にハイブリダイズするラベル化プローブを用い、先行技術に記載された標準的なハイブリダイゼーションプロトコールで、標準ノーザンプロット分析またはインサイチュ-ハイブリダイゼーションによって、モルフォゲンの転写レベルをモニターすることで評価できる。

10

20

【0136】

脳脊髄液または血液中のモルフォゲンレベルの変動は組織の生物活性を評価するために使用できる。例えばモルフォゲンは下垂体細胞に関連して検出され、これは脳脊髄液中に各種の因子を分泌することが知られている。そして一般的にはグリア細胞細胞に結合しており、細胞外マトリックスにはあるが神経細胞体には結合していない。したがって脳脊髄液はモルフォゲン移送の自然の手段である。さらにモルフォゲンは脳脊髄液中の死細胞から放出される。さらにOP-1は最近ではヒト血液中に検出されており、血液もまた移送の手段でありそして/また死細胞の内容物の環納所でもある。

30

【0137】

脊髄液は、公知の医学的な方法を用いて標準的な腰椎穿刺によって得ることができる。同様に血清サンプルは静脈穿刺によって血液を得て、3000RPM 10分間遠心分離して血清を調製する。血清または脳脊髄液のモルフォゲンの存在は一般的なウエスタンプロット（イムノプロット）、ELISAまたはRIA法によって評価できる。簡単には例えばELISAの場合サンプルは適切な緩衝液で希釈して、この緩衝液はリン酸緩衝生理食塩水など、そして50 μ lアリコートをもルフォゲン特異的抗体を用いてプロコートしたマイクロタイタープレートのウェルの底に吸着させ、そして4で18時間インキュベートする。次いでプレートは標準緩衝液で洗浄し、適切な緩衝液中のビオチンのような検出剤をコンジュゲートさせた第二のモルフォゲン特異抗体の液を50 μ l加えて室温で90分間インキュベートする。モルフォゲン-抗体コンプレックスは一般的な方法で検出する。

40

【0138】

さらにモルフォゲン特異的アフィニティカラムは、カラムマトリックスに吸着させたモルフォゲン特異的抗体を用いて作製することができる。そして目的のモルフォゲンを選択的に抽出するためにマトリックスに液体サンプルを通過させる。適切な溶出緩衝液は、最初にコントロール（例えば精製した遺伝子組換え生産モルフォゲン）と結合および溶出条件を予測して測定することによって、経験的に定めることができる。次いでフラクションは標準的なイムノプロットによってモルフォゲンの存在を試験し、N末端配列により確認する。血清あるいはその他の体液中のモルフォゲン濃度は、吸光度法、ELISAあるいはRIAによる抗体分析法を含む、標準的な蛋白質定量方法を使用して測定する。この方法によ

50

りOP-1が血液中から特定された。

【0139】

ヒト血液中から以下の分析方法によってOP-1が検出された。実施例13に記載され、公知技術である免疫学的手法を用いて、遺伝子操作によって生産された哺乳動物細胞のモルフォゲンに対して結合するモノクローナル抗体を、活性化アガロースゲル (Afi-Gel Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA メーカーの使用説明に従って調製) を通過させて固定化し、精製OP-1を血清から得るのに使用した。ヒト血清を次いでカラムに通過させ、3MK-チオシアン酸塩で溶出した。K-チオシアン酸塩のフラクションは6M尿素、20mM PO₄、pH7.0 中で透析し、C8HPLCカラムにかけ、20分で25-50%アセトニトリル/0.1% TFAのグラジュエントで溶出した。遺伝子組み換え生産成熟型OP-1のホモダイマーは20 - 22分で溶出された。次いでフラクションを回収し、OP-1の存在をイムノプロットで試験した。図4は還元条件と酸化条件のヒト血清中のOP-1のイムノプロットを示した。図においてレーン1とレーン4はOP-1の標準であり、酸化条件 (レーン1)、還元条件 (レーン4) で流した。レーン5は、17、27、39kDaの分子量標準である。レーン2とレーン3はヒト血清OP-1であり、酸化条件下 (レーン2)、還元条件下 (レーン3) である。

10

【0140】

モルフォゲンは、体液のモルフォゲンレベルの変動を神経組織の状態の変化として示す。体液サンプル中のモルフォゲンの量を予め得た対照値と比較して診断応用に使用することができる。さらにまた内因性モルフォゲン抗体レベルの変動はこの方法で測定でき、特に好ましくは血清中であり、内因性モルフォゲン抗体に特異的に結合するその他の蛋白質や抗体を使用する。内因性抗体レベルの変動の検出は組織状態の変化の指標とすることができる。

20

【実施例10】

【0141】

免疫反応介在性神経組織損傷の軽減

ここに示したモルフォゲンは神経組織の免疫学的に関連した損傷を軽減するために使用できる。この損傷の詳細と損傷を軽減するためのモルフォゲンの使用は国際出願US92/07358 (WO93/04692) に開示されている。神経組織に対するこのような損傷の最も重要な原因は、神経回路に対する低酸素症と血液供給の虚血 - 再灌流である。これは血栓または手術操作によっておこる。国際出願US92/07358 (WO93/04692) に開示されているように、モルフォゲンは組織に対する血液供給の虚血 - 再灌流につづく心筋組織に対する障害を軽減できることをしめしている。神経組織に対する免疫学的に関連した損傷を軽減することに関してモルフォゲンの効果は先行技術と公知技術による方法とモデルを用いて評価できる。

30

【0142】

例えばウサギ栓塞モデルは、脳虚血と再灌流に続く組織損傷に対するモルフォゲンの作用を評価するための有用な方法である。以下に開示したプロトコールは、本質的にPhillips (Phillips et al., 1989, *Annals of Neurology*, 25, 281-285) らの方法であり、引用と公知の先行技術によってここに一体化している。要約すると、白色ニューイングランドウサギ (2-3kg) 麻酔し、人工呼吸器を取りつけた。次いで頭蓋内循環を選択的にセリンジャーの方法でカテーテル化した。ベースラインの脳血管造影をデジタル基本ユニットによって行った。遠位内部頸動脈あるいはその枝血管を、18時間経過した自己血栓の0.035mlを使用して選択的に閉塞させた。動脈性の閉塞は、栓塞後にただちに繰り返し血管造影をおこなって記録した。脳梗塞を発生させるために十分な時間経過後 (15分または90分)、TPAアナログFB-FB-CF (0.8mg/kg以上2分間) のような再灌流剤を投与して、血流を再開させた。

40

【0143】

脳梗塞に対するモルフォゲンの効果は、OP-1のようなモルフォゲンを種々の濃度で、血栓の形成および/または再灌流に続いて異なった時間で投与して評価できる。ウサギは栓塞後3-14日めに屠殺し、その脳を神経病理学的試験の目的で10%の中性緩衝液へ少なくとも

50

も2週間の液浸によって固定化して調製した。脳は冠状平面で2-3mm間隔で切片を作り番号をつけ、標準的な病理組織学的手段でパラフィンで処理し、神経組織の壊死の程度を肉眼的に測定した。モルフォゲン処理動物は、非処理動物との病理学的比較により、試験動物の脳虚血 - 再灌流のあとに起こる神経組織の壊死を減少させるか、あるいは明らかに抑制させると考えられた。

【実施例 1 1】

【0 1 4 4】

インビボでのモルフォゲンの有効性を評価するための動物モデル

ここに述べたモルフォゲンのインビボ活性は、ここに述べた動物モデルで速やかに評価できる。好ましくは、適切な動物モデルは神経組織の損傷を示しており、例えば遺伝的あるいは環境的に誘発される。このモデルにpH7のリン酸緩衝食塩水のような適切な治療用製剤中の有効量のモルフォゲンを脳室内に直接注射する。好ましくは、モルフォゲンは損傷ニューロンの領域に注入する。損傷組織は次の時点で切除し、そして組織は形態学的に評価し、そして/または適切な生化学マーカーの評価を行う(例えばモルフォゲンまたはN-CAMの分布、CNS神経栄養活性またはCNS組織損傷の生化学的マーカーによる投与量依存性効果の測定、なお、例えばマーカーとしてはグリア線維性酸性蛋白質等を使用する)。投与量とインキュベーション時間は試験する動物で変化する。異なる種への適切な投与範囲は、樹立した動物モデルを比較して決定できる。以下に示したものはラットの脳穿刺モデルのための見本的なプロトコールである。

【0 1 4 5】

要約すると、雄性ロングエバンス系ラット、これは市場で一般的に購入でき、これを麻酔し、頭の部分を手術用に準備する。頭蓋冠は標準的な外科手法で露出させ、そして穴を両耳の中心部にドリルであけ、0.035kのワイヤーを頭蓋冠に通す。モルフォゲン(OP-1 25 μ g)またはPBSのいずれかを含む25 μ lの溶液をハミルトンシリンジで穴に注入する。溶液は表面から3mmの深さまで入れ、下にある皮質、脳梁および海馬に注入する。皮膚は縫合し、動物を回復させる。

【0 1 4 6】

手術の3日後に、ラットは断頭で屠殺し、脳の病理切片を作成した。傷痕組織の形成を定性的に、グリア傷痕のマーカー蛋白質であるグリア線維化酸性蛋白質を免疫蛍光染色して評価した。グリア線維化酸性蛋白質抗体は市販されている(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)。切片はまたOP-1の存在を確認するため抗OP-1抗体でプローブされる。グリア線維化酸性蛋白質のレベルの減少は、モルフォゲン処理動物の組織切片においてモルフォゲンの作用がグリアの傷痕形成を抑制し、神経再生を促進した証拠と考えられた。

【実施例 1 2】

【0 1 4 7】

モルフォゲン種の脳血液バリア通過を評価するためのインビトロモデル

脳血液バリアを容易に通過するモルフォゲン種を選別する能力を評価するためのインビトロの方法を以下に説明する。モデルとプロトコールの詳細な説明はAudusらによって示されており(Audus et al., 1987, Ann. N.Y. Acad. Sci., 507:9-18)、引用によってここに一体化されている。

【0 1 4 8】

要約すると、微小血管内皮細胞を新鮮なウシの脳の大脳灰白色質から単離する。脳は地方の屠殺場から入手し、そして抗生物質を含む氷で冷却した最小必須培地(MEM)に入れて実験室まで輸送する。無菌条件でおおきな表面の血管と髄膜を標準的な手法で除去する。皮質の灰白質を吸引によって除き、1mmの大きさの立方体状に切断した。刻んだ灰白質は、振盪ウオータバス中で37 3時間、0.5%のディスパーゼ(BMB Indianapolis IN)とインキュベートした。3時間消化した後、混合液を遠心分離(1000 \times g 10分)して濃縮し、13%デキストランに再度懸濁し、5800 \times gで10分間遠心分離した。上清の脂肪、細胞破片、ミエリンは捨て、クルードな微小血管ペレットを1mg/mlのコラゲナーゼ/ディスパーゼに再懸濁させ、振盪ウオータバス中で37 5時間、インキュベートした。5時間消化した後

10

20

30

40

50

、微小血管懸濁液は、予備調整した50%パーコルグラジエントにいれ、1000×gで10分間遠心分離した。精製した内皮細胞（グラジエントの上から2番目の層）を含むバンドを回収して、培養液（50%MEM/50%F-12培地の混合）で2回洗浄した。細胞は後で使用するため、10%ウマ血清と20%DMSOを含む培地で凍結させた（-80）。分離した後、およそ 5×10^5 cells/cm²で、培養皿または、コラーゲンとフィブロネクチンでコートした5-12m μ のポアサイズのポリカーボネートフィルターに播種した。細胞を播種後10-12日目に、セルの単層膜が顕微鏡でコンフルエントになったことを検査する。

【0149】

これらの細胞の形態学的、組織学的、生化学的性質は、これらの細胞が脳血液バリアを通過するという顕著な特性を有していることを示していた。これらの特徴は以下の通りである。強固な細胞間結合、膜の開口部がなく、低レベルの細胞飲作用活性、ガンマ-グルタミルトランスペプチダーゼ、アルカリホスファターゼ活性の存在、ファクターVIII抗原活性。

10

【0150】

極性結合または移送のモデルが必要な場合に、培養細胞は多方面の実験に使用できる。マルチウエルプレート中の細胞をプレート化することによって、大分子と小分子のレセプター結合と非レセプター結合を誘導することができる。移送内皮細胞のフラックス測定を行うために、細胞はポラスなポリカーボネート（Nucleopore, Pleasanton, CA）膜フィルターで成長する。大きなポアサイズのフィルター（5-12m μ ）が、分子フラックスに対する律連障害にならないよう使用された。大きなポアフィルターの使用はフィルターの下で細胞が成育することを受け入れないし、細胞単層の視覚検査ができる。

20

【0151】

一度細胞がコンフルエントに達すると、それは平行放散細胞装置（Crown Glass, Somerville, NJ）に置き換える。フラックス測定のため、拡散細胞の供給チャンバーは、試験物質でパルス化して、次いで種々の時間にパルスを流し、アリコートは分析のためチャンバーから回収する。放射能活性または蛍光ラベル化した物質は、分子のフラックスの信頼できる定量ができる。単層のインテグリティは、しょ糖やイヌリンのような非移送性試験物質の添加によって同時に測定され、そして少なくとも4回の繰り返し測定は統計的有意差を保証するために行われる。

30

【実施例13】

【0152】

内因性モルフォゲンレベルを変化させる候補化合物のスクリーニング法

本来のモルフォゲンレベルに影響させるために投与することのできる候補物質は以下のスクリーニング方法を用いて見いだすことができる。測定可能なレベルのモルフォゲンを生産する細胞によって生産されるモルフォゲンのレベルは、細胞への化合物の作用を評価するために、培養細胞を化合物をインキュベートし、そして化合物を除去してインキュベートすることで測定される。これは蛋白質またはRNAレベルのいずれかによってモルフォゲンを検出することによってもできる。また詳細な説明は国際出願US92/07358（W092/0512）に開示されている。

40

13.1 培養中の細胞増殖

腎臓、副腎、膀胱、脳、あるいはその他臓器の細胞培養は文献に開示されたようにして行うことができる。例えば、腎臓は出産直後、新生、若い、成熟齧歯類（マウスまたはラット）から移植でき、そして腎臓全体または切片（14mm）として器官培養に使用できる。

【0153】

腎臓、副腎、膀胱、脳、乳房、あるいはその他の組織由来の初代培養組織または樹立細胞株は、マルチウエルプレート（6または24ウエル）中で、従来 of 細胞培養技術を使って樹立し、そして一定時間（1-7日間）血清添加または無添加で培養を行う。例えば、細胞はDulbecco's Modified Essential培地（Gibco, Long Island, NY）あるいは無血清培地、必要によっては合成培地（インシュリン、トランスフェリン、グルコース、アルブミン、あるいはその他の成長因子を含む）中で培養する。

50

【0154】

モルフォゲンの生産レベルを試験するサンプルは培養上清または細胞溶解液を含み、定期的に回収を行い、OP-1の生産をイムノブロット分析 (Sambrock et al., eds., 1989, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY) によって評価した。あるいはまた細胞培養それ自身の一部を定期的に回収してRNA分析のためにpoly A+RNAを調製して使用した。新しいOP-1合成をモニターするために、培養物は35Sメチオニン / 35Sシステイン混合物を用いて従来技術によって6-24時間ラベル化し、次いで従来の免疫沈降法によってOP-1の合成を評価した。

【0155】

13. 2 形態形成蛋白質レベルの測定

細胞型による形態形成蛋白質の生産を定量するために、イムノアッセイをモルフォゲンの検出に使用し、抗体は蛋白質に対する特異的ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を用いた。例えば以下のようなELISAでOP-1特異的抗体を用いてOP-1の検出を行った。OP-1特異的アフィニティ精製ポリクローナルウサギIgGの1 μ g/100 μ lを96ウエルプレートの各ウエルに加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。ウエルは、0.1% Tween20を含むpH8.2の0.15M NaCl-0.167Mホウ酸ナトリウム緩衝液 (BSB) で4回洗浄した。非特異的吸着を最小化するため、ウエルは0.1% ウシ血清アルブミン (BSA) を含むBSBで洗浄し、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。次いでウエルは0.1% Tween20を含むBSBで4回洗浄した。試験サンプルの細胞培養上清を適当に希釈した溶液100 μ lをトリプレットで各ウエルに加え、37 $^{\circ}$ Cで30分インキュベートした。インキュベーション後100 μ lのビオチン化ウサギ抗-OP-1血清 (保存溶液は約1g/ml、使用直前に1% BSAをBSBで1:400に希釈) を各ウエルに加え、37 $^{\circ}$ Cで30分インキュベートした。次いでウエルは0.1% Tween20を含むBSBで4回洗浄した。100 μ lアルカリ性ストレパビジン (Southern Biotechnology Associates, Inc. Birmingham, Alabama使用直前に0.1% Tween20を含むBSBで1:400に希釈) を各ウエルに加え、37 $^{\circ}$ Cで30分インキュベートした。プレートは0.5M Tris 緩衝生理食塩水 (TBS) pH7.2で4回洗浄した。50 μ lの基質 (ELISA Amplification System Kit, Life Technologies, Inc., Bethesda, MD) を各ウエルに加え、室温で15分インキュベートした。50 μ lのアンプリファイアー (同じアンプリフィケーションキットから) を各ウエルに加え、室温で15分インキュベートした。反応は50 μ lの0.3M硫酸を添加して停止させた。各ウエルの溶液を490nmのODを測定した。培養液中のOP-1を定量するために、OP-1の検量線を試験サンプルと平行して作製した。

【0156】

ポリクローナル抗体は以下のようにして調製した。各ウサギに、フロインドの完全アジュバント500 μ lを含む0.1% SDS液に入ったOP-1モノマー (配列表配列番号5の328-431のアミノ酸配列) を生産する大腸菌100 μ g/500 μ lで一次免疫した。抗原は動物の背と脇腹の複数箇所に皮下投与した。ウサギはフロインドの不完全アジュバントを用いて同じ方法で一ヶ月後にブースター処理した。試験のため耳静脈から7日後に採血を行った。OP-1に対する抗体がELISA分析で血清中に検出されるまで、2回の追加ブースター投与と試験採血が一ヶ月の間隔をおいて行われた。次いでウサギは100 μ gの抗原でブースター処理し、ブースター処理後7日目と10日目に採血した (1回15ml) 。モルフォゲンに特異的な抗体は以下のように調製できる。マウスにOP-1生産大腸菌を2回注射した。最初の注射ではフロインドの完全アジュバント中に100 μ gのOP-1を含む液を皮下に注射した。2回目には、フロインドの不完全アジュバント中に50 μ gのOP-1を含む液を腹腔内に注射した。マウスには次いで8カ月間に4回腹腔内投与し全量で230 μ gのOP-1 (配列表配列番号5の307-431のアミノ酸配列) を投与した。融合に一週間先んじて、マウスの腹腔内に100 μ gのOP-1 (307-431) とシステインにウシ血清アルブミンをSMCC交差結合剤を用いて結合させた300 μ gのN末端ペプチド (Ser 293-Asn-309Cys) をブースター投与した。ブースター投与は融合の前5日 (IP) 、4日 (IP) 、3日 (IP) 、1日 (IV) に行った。マウス脾臓はミエローマ (例えば653) 細胞と1:1の比率でPEG1500 (Boehringer Mannheim) を用いて融合させ、融合細胞はプレート化し、抗原としてOP-1 (307-431) を用いてOP-1特異的抗体を選択した。

10

20

30

40

50

融合細胞と抗体のスクリーニングは先行技術で広く利用可能な標準的な方法によって行った。

【0157】

本発明は、その精神と必要な特性から外れることなくその特徴的な形態で実施可能である。本発明の実施は、全てに関連して説明のように理解され、発明の範囲は上記説明によってよりむしろ添付されたクレームによって示され、そして限定はされない。さらにクレームに均等な手法と範囲から来る全ての変更は、これらの実施を改良することである。

【産業上の利用可能性】

【0158】

本発明は、瀕死の細胞の生存性を促進させる方法であって、神経の母細胞を形質転換させて再分化させるための方法を包含する方法、および分化した神経細胞に形質発現を維持させるための方法を提供する方法を提供する。さらにまた、本発明は、傷害を受けた神経回路を修復するための手段を提供する。この手段には長い距離にわたる軸索の成長を促進するための方法を含んでおり、さらに免疫学的に関連している神経組織傷害を軽減するための方法を提供するものである。本発明の代表的な実施態様としては、細胞中の細胞接着性分子の発現であって、特に神経細胞中の神経細胞接着性分子の発現を促進する方法を提供するものである。最終的には、本発明は神経組織の鬱血状態を評価し、哺乳動物における神経系の機能不全を評価するための手段を提供するものである。

10

【図面の簡単な説明】

【0159】

本発明それ自身と同じく、本発明の前述のおよび他の目的と特性および利点は、添付されている図とともに読むことによって、以下の説明からより一層理解できるであろう。

20

【図1A】形質転換された神経芽腫Xグリオマー細胞(1A)を示した微小写真である。

【図1B】1Aを再分化させて、非形質転換ニューロンの形態形成特性をひきだすモルフォゲン(OP-1)の作用を示した微小写真である。

【図2A】Aは、モルフォゲン処理されたNG108-15細胞の180kDaと140kDaのN-CAM異性体の誘導に対する容量反応曲線である。

【図2B】Bは、モルフォゲン処理されたNG108-15細胞からの全細胞抽出物のN-CAM特異的抗体によるウエスタンブロット写真である。

【図3】モルフォゲン濃度の函数として、ランダムに選択した20の領域中の細胞凝集の平均数をプロットしたものである。

30

【図4】ヒト血清中のOP-1の存在をイムノブロットで確認した写真である。

【配列表フリーテキスト】

【0160】

(1) 一般情報

(i) 出願人:

- (A) 名称: キュリス, インコーポレイテッド
- (B) 通り: ムールトン ストリート 61
- (C) 市: ケンブリッジ
- (D) 州: マサチューセッツ
- (E) 国: アメリカ合衆国
- (F) 郵便番号: 02138-1118

(ii) 発明の名称: 組織形成因子誘導による神経再生と修復

10

(iii) 配列の数:33

(iv) 連絡先:

- (A) 受信人: キュリス, インコーポレイテッド
- (B) 通り: ムールトン ストリート 61
- (C) 市: ケンブリッジ
- (D) 州: マサチューセッツ
- (E) 国: アメリカ合衆国
- (F) 郵便番号: 02138-1118

(v) コンピュータ読み取り形式:

- (A) 媒体: フロッピーディスク
- (B) コンピュータ: IBM PC コンパチブル
- (C) オペレーティングシステム: PC-DOS/MS-DOS
- (D) ソフトウェア: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

20

(viii) 代理人情報

- (A) 氏名: ケリー ロビン D
- (B) 登録番号: 34,637
- (C) レファレンス/ドケット番号: CRP070

(ix) 電話連絡先

- (A) 電話: 617/248-7000
- (B) ファクシミリ: 617/248-7100

(2) 配列番号1に関する情報

30

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 97 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 1本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii)分子種：蛋白質

(ix)特徴：

5

(A) 名称：蛋白質

(B) 存在位置：1...97

(D) その他情報：ラベル=一般配列1

/ノート=それぞれのXAAは独立して20の天然に得られるL-異性体、A-アミノ酸、または誘導体の一つを示す。

10

(xi) 配列：配列番号 1

15

Xaa
1 5 10 15

10

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

20

Xaa
35 40 45

25

Xaa Cys Cys Xaa Xaa
50 55 60

Xaa
65 70 75 80

30

Xaa Cys Xaa Cys
85 90 95

20

Xaa

35

(2) 配列番号 2に関する情報

(i) 配列の特徴

40

(A) 長さ：97 アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：1本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

45

(ii)分子種：蛋白質

30

(xi)配列: 配列番号 3

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

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

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

Xaa Cys Cys Xaa Pro
 50 55 60

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

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

Xaa

10

25 (2) 配列番号 4に関する情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ:102アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

30

20

(ii)分子種: 蛋白質

35

(ix)特徴:

- (A) 名称/ キイ: 蛋白質
- (B) 存在位置:1...102
- (D) その他情報: ラベル=一般配列4
 / ノート= それぞれのXAA は明細書に
 特定した1 またはそれ以上のアミノ酸か
 らなる群から独立的に選択される。

40

(xi)配列: 配列番号 4

45

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

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

50

30

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

5 Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa
 50 55 60

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

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

Xaa Xaa Cys Gly Cys Xaa
 100

10

15 (2) 配列番号 5に関する情報

- (i) 配列の特徴
 - (A) 長さ:139アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (C) 鎖の数:1本鎖
 - (D) トポロジー: 直鎖状

20 (ii)分子種: 蛋白質

- (vi)由来
 - (A)生物種: ヒト
 - (F)組織の種類: 海馬

- (ix)特徴:
 - (A) 名称/ キイ: 蛋白質
 - (B) 存在位置:1...139
 - (D) その他情報: hOP-1(成熟型)

20

35 (xi) 配列: 配列番号 5

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

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

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

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

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

30

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

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

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

10 (2) 配列番号 7に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ:139アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

15 (C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子種: 蛋白質

20 (vi) 由来

(A) 生物種: ヒト

(F) 組織の種類: 海馬

(ix) 特徴:

25 (A) 名称/ キー: 蛋白質

(B) 存在位置:1...139

(D) その他情報: ラベル= HOP-2(成熟型)

(xi) 配列: 配列番号 7

30

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

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

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

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

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

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

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

10

20

30

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

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

(2) 配列番号 8に関する情報

(i) 配列の特徴

- 10 (A) 長さ:139アミノ酸
- (B) 型:アミノ酸
- (C) 鎖の数:一本鎖
- (D) トポロジー:直鎖状

15 (ii)分子種:蛋白質

(vi)由来

- (A)生物種:ゲッ菌類
- (F)組織の種類:胚

(ix)特徴:

- (A) 名称/ キー: 蛋白質
- (B) 存在位置:1...139
- (D) その他情報: ラベル=MOP-2 (成熟型)

(xi) 配列: 配列番号 8

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

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

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

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

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

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

10

20

30

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

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

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

10 (2) 配列番号 9に関する情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ:101アミノ酸
 - (B) 型:アミノ酸
 - (C) 鎖の数:一本鎖
 - (D) トポロジー:直鎖状
- 15

(ii)分子種:蛋白質

20 (vi)由来

(A)生物種:ウシ

(ix)特徴:

- (A) 名称/ キー: 蛋白質
 - (B) 存在位置:1...101
 - (D) その他情報: ラベル=CBMP-2A FX
- 25

(xi) 配列: 配列番号 9

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

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

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

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

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

30

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

5 Gly Cys Gly Cys Arg
100

(2) 配列番号10に関する情報

- 10 (i) 配列の特徴
 - (A) 長さ:101アミノ酸
 - (B) 型:アミノ酸
 - (C) 鎖の数:一本鎖
 - (D) トポロジー:直鎖状

10

15 (ii)分子種:蛋白質

- (vi)由来
 - (A)生物種:ヒト
 - (F)組織の種類:海馬

20

- (ix)特徴:
 - (A) 名称/キイ:蛋白質
 - (B) 存在位置:1...101
 - (D) その他情報:ラベル=CBMP-2B FX

25

(xi) 配列: 配列番号10

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

20

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

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

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

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

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

30

Gly Cys Gly Cys Arg
100

(2) 配列番号11に関する情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ:102アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子種: 蛋白質

(vi) 由来

- (A) 生物種: ショウジョウバエ

(ix) 特徴:

- (A) 名称/ キー: 蛋白質
- (B) 存在位置: 1...101
- (D) その他情報: ラベル=DPP-FX

(xi) 配列: 配列番号11

Cys Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asp
 1 5 10 15
 Asp Trp Ile Val Ala Pro Leu Gly Tyr Asp Ala Tyr Tyr Cys His Gly
 20 25 30
 Lys Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Phe Asn Ser Thr Asn His Ala
 35 40 45
 Val Val Gln Thr Leu Val Asn Asn Asn Asn Pro Gly Lys Val Pro Lys
 50 55 60
 Ala Cys Cys Val Pro Thr Gln Leu Asp Ser Val Ala Met Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Asn Asp Gln Ser Thr Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Glu Met Thr Val
 85 90 95
 Val Gly Cys Gly Cys Arg
 100

(2) 配列番号12に関する情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ:102アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii)分子種: 蛋白質

(vi)由来

5 (A) 生物種: ツメガエル

(ix)特徴:

- (A) 名称/ キイ: 蛋白質
 - (B) 存在位置:1...102
 - (D) その他情報: ラベル=VGR-1-FX
- 10

(xi) 配列: 配列番号12

15 Cys Lys Lys Arg His Leu Tyr Val Glu Phe Lys Asp Val Gly Trp Gln 10
 1 5 10 15
 Asn Trp Val Ile Ala Pro Gln Gly Tyr Met Ala Asn Tyr Cys Tyr Gly
 20 20 25 30
 20 Glu Cys Pro Tyr Pro Leu Thr Glu Ile Leu Asn Gly Ser Asn His Ala
 35 40 45
 25 Ile Leu Gln Thr Leu Val His Ser Ile Glu Pro Glu Asp Ile Pro Leu
 50 55 60
 Pro Cys Cys Val Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Ser Met Leu Phe Tyr
 65 70 75 80
 30 Asp Asn Asn Asp Asn Val Val Leu Arg His Tyr Glu Asn Met Ala Val 20
 85 90 95
 Asp Glu Cys Gly Cys Arg
 100

35 (2) 配列番号13に関する情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ:102アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (C) 鎖の数: 一本鎖
 - (D) トポロジー: 直鎖状
- 40

(ii)分子種: 蛋白質

45 (vi)由来

(A)生物種: ゲツ菌類 30

(ix)特徴:

- (A) 名称/ キイ: 蛋白質
 - (B) 存在位置:1...102
 - (D) その他情報: ラベル=VGR-1-FX
- 50

(xi) 配列: 配列番号13

5 Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln Asp Val Gly Trp Gln
 1 5 10 15
 Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Gly Tyr Ala Ala Asn Tyr Cys Asp Gly
 20 25 30
 10 Glu Cys Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala Thr Asn His Ala
 35 40 45
 Ile Val Gln Thr Leu Val His Val Met Asn Pro Glu Tyr Val Pro Lys
 50 55 60
 15 Pro Cys Cys Ala Pro Thr Lys Val Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe
 65 70 75 80
 Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val
 85 90 95
 20 Arg Ala Cys Gly Cys His
 100

10

(2) 配列番号14に関する情報

25

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ:106アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

30

20

(ii)分子種: 蛋白質

(iii) ハイポセティカル:NO

35

(iv)アンチセンス:NO

(vi)由来源

- (A) 生物: ヒト
- (F) 組織タイプ: 脳

40

(ix)特徴:

- (A) 名称/ キイ: 蛋白質
- (B) 存在位置:1...106
- (D) その他情報: ノート=GDF-1(fx)

45

30

(xi) 配列: 配列番号14

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

Arg Trp Val Ile Ala Pro Arg Gly Phe Leu Ala Asn Tyr Cys Gln Gly
 20 25 30
 5 Gln Cys Ala Leu Pro Val Ala Leu Ser Gly Ser Gly Gly Pro Pro Ala
 35 40 45
 Leu Asn His Ala Val Leu Arg Ala Leu Met His Ala Ala Ala Pro Gly
 50 55 60
 10 Ala Ala Asp Leu Pro Cys Cys Val Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ile Ser
 65 70 75 80
 Val Leu Phe Phe Asp Asn Ser Asp Asn Val Val Leu Arg Gln Tyr Glu
 85 90 95 10
 15 Asp Met Val Val Asp Glu Cys Gly Cys Arg
 100 105

20 (2) 配列番号15に関する情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ:5アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- 25 (C) 鎖: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii)分子種: ペプチド

30 (xi)配列: 配列番号15 20

Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5

35 (2) 配列番号16に関する情報

(i) 配列の特徴

- 40 (A) 長さ:1822 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

45 (ii)分子種: cDNA 30

(iii) ハイボセティカル:NO

50 (iv)アンチセンス:NO

(vi)由来源

- (A) 生物: ヒト
- (F) 組織タイプ: 海馬

(ix)特徴

- (A) 名称/ キー : CDS
- (B) 位置:49.....1441
- (C) 確認法: 実験
- 5 (D) その他情報:/機能= 骨形成蛋白質
/生産物=OP1
/確認= 実験
/標準的名称= OP-1

10 (xi) 配列: 配列番号16

15	GGTGGGGGCC CGGAGCCCGG AGCCCGGGTA GCGCGTAGAG CCGGGCGG ATG CAC GTG Met His Val 1	57	10
20	CGC TCA CTG CGA GCT GCG GCG CCG CAC AGC TTC GTG GCG CTC TGG GCA Arg Ser Leu Arg Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala Leu Trp Ala 5 10 15	105	
25	CCC CTG TTC CTG CTG CGC TCC GCC CTG GCC GAC TTC AGC CTG GAC AAC Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser Leu Asp Asn 20 25 30 35	153	
30	GAG GTG CAC TCG AGC TTC ATC CAC CGG CGC CTC CGC AGC CAG GAG CGG Glu Val His Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser Gln Glu Arg 40 45 50	201	
35	CGG GAG ATG CAG CGC GAG ATC CTC TCC ATT TTG GGC TTG CCC CAC CGC Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu Pro His Arg 55 60 65	249	20
40	CCG CGC CCG CAC CTC CAG GGC AAG CAC AAC TCG GCA CCC ATG TTC ATG Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro Met Phe Met 70 75 80	297	
45	CTG GAC CTG TAC AAC GCC ATG GCG GTG GAG GAG GGC GGC GGG CCC GGC Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly Gly Gly Pro Gly 85 90 95	345	
50	GGC CAG GGC TTC TCC TAC CCC TAC AAG GCC GTC TTC AGT ACC CAG GGC Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser Thr Gln Gly 100 105 110 115	393	
55	CCC CCT CTG GCC AGC CTG EAA GAT AGC CAT TTC CTC ACC GAC GCC GAC Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr Asp Ala Asp 120 125 130	441	30
60	ATG GTC ATG AGC TTC GTC AAC CTC GTG GAA CAT GAC AAG GAA TTC TTC Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys Glu Phe Phe 135 140 145	489	

	CAC CCA CGC TAC CAC CAT CGA GAG TTC CGG TTT GAT CTT TCC AAG ATC	537	
	His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu Ser Lys Ile		
	150 155 160		
5	CCA GAA GGG GAA GCT GTC ACG GCA GCC GAA TTC CGG ATC TAC AAG GAC	585	
	Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Asp		
	165 170 175		
10	TAC ATC CGG GAA CGC TTC GAC AAT GAG ACG TTC CGG ATC AGC GTT TAT	633	
	Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile Ser Val Tyr		
	180 185 190 195		
15	CAG GTG CTC CAG GAG CAC TTG GGC AGG GAA TCG GAT CTC TTC CTG CTC	681	10
	Gln Val Leu Gln Glu His Leu Gly Arg Glu Ser Asp Leu Phe Leu Leu		
	200 205 210		
20	GAC AGC CGT ACC CTC TGG GCC TCG GAG GAG GGC TGG CTG GTG TTT GAC	729	
	Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu Val Phe Asp		
	215 220 225		
25	ATC ACA GCC ACC AGC AAC CAC TGG GTG GTC AAT CCG CGG CAC AAC CTG	777	
	Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg His Asn Leu		
	230 235 240		
30	GGC CTG CAG CTC TCG GTG GAG ACG CTG GAT GGG CAG AGC ATC AAC CCC	825	
	Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser Ile Asn Pro		
	245 250 255		
35	AAG TTG GCG GGC CTG ATT GGG CGG CAC GGG CCC CAG AAC AAG CAG CCC	873	20
	Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn Lys Gln Pro		
	260 265 270 275		
40	TTC ATG GTG GCT TTC AAG GCC ACG GAG GTC CAC TTC CGC AGC ATC	921	
	Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe Arg Ser Ile		
	280 285 290		
45	CGG TCC ACG GGG AGC AAA CAG CGC AGC CAG AAC CGC TCC AAG ACG CCC	969	
	Arg Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro		
	295 300 305		
50	AAG AAC CAG GAA GCC CTG CGG ATG GCC AAC GTG GCA GAG AAC AGC AGC	1017	
	Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser		
	310 315 320		
55	AGC GAC CAG AGG CAG GCC TGT AAG AAG CAC GAG CTG TAT GTC AGC TTC	1065	30
	Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe		
	325 330 335		
60	CGA GAC CTG GGC TGG CAG GAC TGG ATC ATC GCG CCT GAA GGC TAC GCC	1113	
	Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala		
	340 345 350 355		

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

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

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

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

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

20 GAGAATTCAG ACCCTTTGGG GCCAAGTTTT TCTGGATCCT CCATTGCTCG COTGGGCCAG 1411
GAACCAGCAG ACCAACTGCC TTTTGTGAGA CCTTCCCCTC CCTATCCCCA ACTTTAAAGG 1471

25 TGTGAGAGTA TTAGGAAACA TGAGCAGCAT ATGGCTTTTG ATCAGTTTTT CAGTGGCAGC 1531
ATCCAATGAA CAAGATCCTA CAAGCTGTGC AGGCCAAAACC TAGCAGGAAA AAAAAACAAC 1591

30 GCATAAAGAA AAATGGCCCG GCCAGGTCAT TGGCTGGGAA GTCTCAGCCA TGCACGGACT 1651
CGTTTCCAGA GGTAATTATG AGCGCCTACC AGCCAGGCCA CCCAGCCGTG GGAGGAAGGG 1711
GGCGTGGCAA GGGGTGGGCA CATTGGTGTG TGTGCGAAAG GAAAATTGAC CCGGAAGTTC 1771

35 CTGTAATAAA TGTCACAATA AAACGAATGA ATGAAAAAAA AAAAAAAAAA A 1822

(2) 配列番号17に関する情報

- 40 (i) 配列の特徴
 - (A) 長さ:431アミノ酸
 - (B) 型:アミノ酸
 - (D) トポロジー:直鎖状

45 (ii)分子種:蛋白質

(xi)配列:配列番号17

Met His Val Arg Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser rne Val Ala
50 1 5 10 15

10

20

30

Leu Trp Ala Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser
 20 25 30
 5 Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser
 35 40 45
 Gln Glu Arg Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu
 50 55 60
 10 Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro
 65 70 75 80
 Met Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly Gly
 85 90 95
 15 Gly Pro Gly Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser
 100 105 110
 Thr Gln Gly Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr
 115 120 125
 20 Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys
 130 135 140
 25 Glu Phe Phe His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu
 145 150 155 160
 Ser Lys Ile Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile
 165 170 175
 30 Tyr Lys Asp Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile
 180 185 190
 35 Ser Val Tyr Gln Val Leu Gln Glu His Leu Gly Arg Glu Ser Asp Leu
 195 200 205
 Phe Leu Leu Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu
 210 215 220
 40 Val Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg
 225 230 235 240
 His Asn Leu Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser
 245 250 255
 45 Ile Asn Pro Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn
 260 265 270
 50 Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe
 275 280 285

10

20

30

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

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

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

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

Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn
 355 360 365 10

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

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

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

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

(2) 配列番号18に関する情報

- 30 (i) 配列の特徴
 (A) 長さ:1873 塩基対
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖: 一本鎖
 35 (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子種: cDNA

(iii) ハイボセティカル:NO

40 (iv) アンチセンス:NO

(vi) 由来源

- 45 (A) 生物: ゲッ歯類
 (F) 組織タイプ: 胚

(ix) 特徴

- 50 (A) 名称/ キイ : GDS
 (B) 位置:104...1393
 (D) その他情報: / 機能= 骨形成蛋白質
 /生産物=MOP1
 /ノート=MOP-1(cDNA)

10

20

30

(xi) 配列: 配列番号18

	CTGCAGCAAG TGACCTCGGG TCGTGGACCG CTGCCCTGCC CCCTCCGCTG CCACCTGGGG	60	
5	CGGCGCGGGC CCGGTGCCCC GGATCGCGCG TAGAGCCGGC GCG ATG CAC GTG CGC Met His Val Arg 1	115	
10	TCG CTG CGC GCT GCG GCG CCA CAC AGC TTC GTG GCG CTC TGG GCG CCT Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala Leu Trp Ala Pro 5 10 15 20	163	
15	CTG TTC TTG CTG CGC TCC GCC CTG GCC GAT TTC AGC CTG GAC AAC GAG Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser Leu Asp Asn Glu 25 30 35	211	10
20	GTG CAC TCC AGC TTC ATC CAC CGG CGC CTC CGC AGC CAG GAG CGG CGG Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser Gln Glu Arg Arg 40 45 50	259	
25	GAG ATG CAG CGG GAG ATC CTG TCC ATC TTA GGG TTG CCC CAT CGC CCG Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu Pro His Arg Pro 55 60 65	307	
30	CGC CCG CAC CTC CAG GGA AAG CAT AAT TCG GCG CCC ATG TTC ATG TTG Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro Met Phe Met Leu 70 75 80	355	
35	GAC CTG TAC AAC GCC ATG GCG GTG GAG GAG AGC GGG CCG GAC GGA CAG Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Ser Gly Pro Asp Gly Gln 85 90 95 100	403	20
40	GGC TTC TCC TAC CCC TAC AAG GCC GTC TTC AGT ACC CAG GGC CCC CCT Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser Thr Gln Gly Pro Pro 105 110 115	451	
45	TTA GCC AGC CTG CAG GAC AGC CAT TTC CTC ACT GAC GCC GAC ATG GTC Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr Asp Ala Asp Met Val 120 125 130	499	
50	ATG AGC TTC GTC AAC CTA GTG GAA CAT GAC AAA GAA TTC TTC CAC CCT Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys Glu Phe Phe His Pro 135 140 145	547	
55	CGA TAC CAC CAT CGG GAG TTC CGG TTT GAT CTT TCC AAG ATC CCC GAG Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu Ser Lys Ile Pro Glu 150 155 160	595	30
60	GGC GAA CGG GTG ACC GCA GCC GAA TTC AGG ATC TAT AAG GAC TAC ATC Gly Glu Arg Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Asp Tyr Ile 165 170 175 180	643	

	CGG GAG CGA TTT GAC AAC GAG ACC TTC CAG ATC ACA GTC TAT CAG GTG	691	
	Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Gln Ile Thr Val Tyr Gln Val		
	185 190 195		
5	CTC CAG GAG CAC TCA GGC AGG GAG TCG GAC CTC TTC TTG CTG GAC AGC	739	
	Leu Gln Glu His Ser Gly Arg Glu Ser Asp Leu Phe Leu Leu Asp Ser		
	200 205 210		
10	CGC ACC ATC TGG GCT TCT GAG GAG GGC TCG TTG GTG TTT GAT ATC ACA	787	
	Arg Thr Ile Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu Val Phe Asp Ile Thr		
	215 220 225		
15	GCC ACC AGC AAC CAC TGG GTG GTC AAC CCT CGG CAC AAC CTG GGC TTA	835	10
	Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg His Asn Leu Gly Leu		
	230 235 240		
20	CAG CTC TCT GTG GAG ACC CTG GAT GGG CAG AGC ATC AAC CCC AAG TTG	883	
	Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser Ile Asn Pro Lys Leu		
	245 250 255 260		
25	GCA GGC CTG ATT GGA CGG CAT GGA CCC CAG AAC AAG CAA CCC TTC ATG	931	
	Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn Lys Gln Pro Phe Met		
	265 270 275		
30	GTG GCC TTC TTC AAG GCC ACG GAA GTC CAT CTC CGT AGT ATC CCG TCC	979	
	Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Leu Arg Ser Ile Arg Ser		
	280 285 290		
35	ACG GGG GGC AAG CAG CGC AGC CAG AAT CGC TCC AAG ACG CCA AAG AAC	1027	20
	Thr Gly Gly Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys Asn		
	295 300 305		
40	CAA GAG GCC CTG AGG ATG GCC AGT GTG GCA GAA AAC AGC AGC AGT GAC	1075	
	Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Ser Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser Asp		
	310 315 320		
45	CAG AGG CAG GCC TGC AAG AAA CAT GAG CTG TAC GTC AGC TTC CGA GAC	1123	
	Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp		
	325 330 335 340		
50	CTT GGC TGG CAG GAC TGG ATC ATT GCA CCT GAA GGC TAT GCT GCC TAC	1171	
	Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr		
	345 350 355		
55	TAC TGT GAG GGA GAG TGC GCC TTC CCT CTG AAC TCC TAC ATG AAC GCC	1219	30
	Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala		
	360 365 370		
60	ACC AAC CAC GCC ATC GTC CAG ACA CTG GTT CAC TTC ATC AAC CCA GAC	1267	
	Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro Asp		
	375 380 385		

	ACA GTA CCC AAG CCC TGC TGT GCG CCC ACC CAG CTC AAC GCC ATC TCT	1315	
	Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile Ser		
	390 395 400		
5	GTC CTC TAC TTC GAC GAC AGC TCT AAT GTC GAC CTG AAG AAG TAC AGA	1363	
	Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Asp Leu Lys Lys Tyr Arg		
	405 410 415 420		
10	AAC ATG GTG GTC CGG GCC TGT GGC TGC CAC TAGCTCTTCC TGAGACCCCTG	1413	
	Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His		
	425 430		
	ACCTTTGCGG GGCCACACCT TTCCAAATCT TCGATGTC ACCATCTAAG TCTCTCACTG	1473	10
15	CCCACCTTGG CGAGGAGAAC AGACCAACCT CTCCTGAGCC TTCCTCACC TCCCAACCGG	1533	
	AAGCATGTAA GGGTTCCAGA AACCTGAGCG TGCAGCAGCT GATGAGCGCC CTTTCTTCT	1593	
20	GGCACGTGAC GGACAAGATC CTACCAGCTA CCACAGCAAA CGCCTAAGAG CAGGAAAAAT	1653	
	GTCTGCCAGG AAAGTGTTCA GTGTCCACAT GGCCCTGGC GCTCTGAGTC TTTGAGGAGT	1713	
	AATCGCAAGC CTCGTTTCCG TGCAGCAGAA GGAAGGGCTT AGCCAGGGTG GCGCTGGCG	1773	
25	TCTGTGTTGA AGGGAACCA AGCAGAAGCC ACTGTAATGA TATGTCACAA TAAAACCCAT	1833	
	GAATGAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAGAATTC	1873	
30	(2) 配列番号19に関する情報		20
	(i) 配列の特徴		
	(A) 長さ:430 アミノ酸		
35	(B) 型: アミノ酸		
	(D) トポロジー: 直鎖状		
	(ii) 分子種: 蛋白質		
40	(xi) 配列: 配列番号19		
	Met His Val Arg Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala		
	1 5 10 15		
45	Leu Trp Ala Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser		30
	20 25 30		
	Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser		
	35 40 45		
50	Gln Glu Arg Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu		
	50 55 60		

	Pro	His	Arg	Pro	Arg	Pro	His	Leu	Gln	Gly	Lys	His	Asn	Ser	Ala	Pro	
	65					70					75					80	
5	Met	Phe	Met	Leu	Asp	Leu	Tyr	Asn	Ala	Met	Ala	Val	Glu	Glu	Ser	Gly	
				85						90					95		
	Pro	Asp	Gly	Gln	Gly	Phe	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Lys	Ala	Val	Phe	Ser	Thr	
			100						105					110			
10	Gln	Gly	Pro	Pro	Leu	Ala	Ser	Leu	Gln	Asp	Ser	His	Phe	Leu	Thr	Asp	
			115					120						125			
	Ala	Asp	Met	Val	Met	Ser	Phe	Val	Asn	Leu	Val	Glu	His	Asp	Lys	Glu	
15		130				135						140					10
	Phe	Phe	His	Pro	Arg	Tyr	His	His	Arg	Glu	Phe	Arg	Phe	Asp	Leu	Ser	
	145				150					155					160		
20	Lys	Ile	Pro	Glu	Gly	Glu	Arg	Val	Thr	Ala	Ala	Glu	Phe	Arg	Ile	Tyr	
				165					170						175		
	Lys	Asp	Tyr	Ile	Arg	Glu	Arg	Phe	Asp	Asn	Glu	Thr	Phe	Gln	Ile	Thr	
			180						185					190			
25	Val	Tyr	Gln	Val	Leu	Gln	Glu	His	Ser	Gly	Arg	Glu	Ser	Asp	Leu	Phe	
		195					200						205				
	Leu	Leu	Asp	Ser	Arg	Thr	Ile	Trp	Ala	Ser	Glu	Glu	Gly	Trp	Leu	Val	
30		210				215						220					20
	Phe	Asp	Ile	Thr	Ala	Thr	Ser	Asn	His	Trp	Val	Val	Asn	Pro	Arg	His	
	225				230					235					240		
35	Asn	Leu	Gly	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Glu	Thr	Leu	Asp	Gly	Gln	Ser	Ile	
			245						250					255			
	Asn	Pro	Lys	Leu	Ala	Gly	Leu	Ile	Gly	Arg	His	Gly	Pro	Gln	Asn	Lys	
			260					265					270				
40	Gln	Pro	Phe	Met	Val	Ala	Phe	Phe	Lys	Ala	Thr	Glu	Val	His	Leu	Arg	
			275					280					285				
	Ser	Ile	Arg	Ser	Thr	Gly	Gly	Lys	Gln	Arg	Ser	Gln	Asn	Arg	Ser	Lys	
45		290				295						300					30
	Thr	Pro	Lys	Asn	Gln	Glu	Ala	Leu	Arg	Met	Ala	Ser	Val	Ala	Glu	Asn	
	305				310					315					320		
50	Ser	Ser	Ser	Asp	Gln	Arg	Gln	Ala	Cys	Lys	Lys	His	Glu	Leu	Tyr	Val	
				325					330						335		

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

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

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

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

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

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

10

(2) 配列番号20に関する情報

20

- (i) 配列の特徴
 - (A) 長さ:1723 塩基対
 - (B) 型: 核酸
 - (C) 鎖: 一本鎖
 - (D) トポロジー: 直鎖状

25

(ii) 分子種: cDNA

30

- (vi) 由来源
 - (A) 生物: ヒト
 - (F) 組織タイプ: 海馬

20

35

- (ix) 特徴
 - (A) 名称/ キイ : CDS
 - (B) 位置:490...1696
 - (D) その他情報 /機能= 骨形成蛋白質
 /生産物=hOP2-PP
 /ノート=hOP-2(cDNA)

40

(xi) 配列: 配列番号20

GGGCCCGCA GAGCAGGAGT GGCTGGAGGA GCTGTGGTTG GAGCAGGAGG TGGCACGGCA 60

45 GGGCTGGAGG GCTCCCTATG AGTGGCGGAG ACGGCCAGG AGGCGCTGGA GCAACAGCTC 120

CCACACCGCA CCAAGCGGTG GCTGCAGGAG CTCGCCATC GCCCCTGCGC TGCTCGGACC 180

GCGGCCACAG CCGGACTGGC GGGTACGGCG GCGACAGAGG CATTGGCCGA GAGTCCCAGT 240

50

30

	AAC AGG GAG TCT GAC TTG TTC TTT TTG GAT CTT CAG ACG CTC CGA GCT	1056	
	Asn Arg Glu Ser Asp Leu Phe Phe Leu Asp Leu Gln Thr Leu Arg Ala		
	175 180 185		
5	GGA GAC GAG GGC TGG CTG GTG CTG GAT GTC ACA GCA GCC AGT GAC TGC	1104	
	Gly Asp Glu Gly Trp Leu Val Leu Asp Val Thr Ala Ala Ser Asp Cys		
	190 195 200 205		
10	TGG TTG CTG AAG CGT CAC AAG GAC CTG GGA CTC CGC CTC TAT GTG GAG	1152	
	Trp Leu Leu Lys Arg His Lys Asp Leu Gly Leu Arg Leu Tyr Val Glu		
	210 215 220		
15	ACT GAG GAC GGG CAC AGC GTG GAT CCT GGC CTG GCC GGC CTG CTG GGT	1200	10
	Thr Glu Asp Gly His Ser Val Asp Pro Gly Leu Ala Gly Leu Gly		
	225 230 235		
20	CAA CGG GCC CCA CGC TCC CAA CAG CCT TTC GTG GTC ACT TTC TTC AGG	1248	
	Gln Arg Ala Pro Arg Ser Gln Gln Pro Phe Val Val Thr Phe Phe Arg		
	240 245 250		
25	GCC AGT CCG AGT CCC ATC CGC ACC CCT CGG GCA GTG AGG CCA CTG AGG	1296	
	Ala Ser Pro Ser Pro Ile Arg Thr Pro Arg Ala Val Arg Pro Leu Arg		
	255 260 265		
30	AGG AGG CAG CCG AAG AAA AGC AAC GAG CTG CCG CAG GCC AAC CGA CTC	1344	
	Arg Arg Gln Pro Lys Lys Ser Asn Glu Leu Pro Gln Ala Asn Arg Leu		
	270 275 280 285		
35	CCA GGG ATC TTT GAT GAC GTC CAC GGC TCC CAC GGC CGG CAG GTC TGC	1392	20
	Pro Gly Ile Phe Asp Asp Val His Gly Ser His Gly Arg Gln Val Cys		
	290 295 300		
40	CGT CGG CAC GAG CTC TAC GTC AGC TTC CAG GAC CTC GGC TGG CTG GAC	1440	
	Arg Arg His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln Asp Leu Gly Trp Leu Asp		
	305 310 315		
45	TGG GTC ATC GCT CCC CAA GGC TAC TCG GCC TAT TAC TGT GAG GGG GAG	1488	
	Trp Val Ile Ala Pro Gln Gly Tyr Ser Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu		
	320 325 330		
50	TGC TCC TTC CCA CTG GAC TCC TGC ATG AAT GCC ACC AAC CAC GCC ATC	1536	
	Cys Ser Phe Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile		
	335 340 345		
55	CTG CAG TCC CTG GTG CAC CTG ATG AAG CCA AAC GCA GTC CCC AAG GCG	1584	30
	Leu Gln Ser Leu Val His Leu Met Lys Pro Asn Ala Val Pro Lys Ala		
	350 355 360 365		

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

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

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

(2) 配列番号21に関する情報

10

- 15 (i) 配列の特徴
 - (A) 長さ:402 アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (D) トポロジー: 直鎖状

- 20 (ii) 分子種: 蛋白質

(xi) 配列: 配列番号21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

20

30

Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Val Pro Ser Ile His Leu Leu Asn Arg Thr
 145 150 155 160
 5 Leu His Val Ser Met Phe Gln Val Val Gln Glu Gln Ser Asn Arg Glu
 165 170 175
 Ser Asp Leu Phe Phe Leu Asp Leu Gln Thr Leu Arg Ala Gly Asp Glu
 180 185 190
 10 Gly Trp Leu Val Leu Asp Val Thr Ala Ala Ser Asp Cys Trp Leu Leu
 195 200 205
 Lys Arg His Lys Asp Leu Gly Leu Arg Leu Tyr Val Glu Thr Glu Asp
 210 215 220 10
 15 Gly His Ser Val Asp Pro Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly Gln Arg Ala
 225 230 235 240
 Pro Arg Ser Gln Gln Pro Phe Val Val Thr Phe Phe Arg Ala Ser Pro
 245 250 255
 20 Ser Pro Ile Arg Thr Pro Arg Ala Val Arg Pro Leu Arg Arg Arg Gln
 260 265 270
 25 Pro Lys Lys Ser Asn Glu Leu Pro Gln Ala Asn Arg Leu Pro Gly Ile
 275 280 285
 Phe Asp Asp Val His Gly Ser His Gly Arg Gln Val Cys Arg Arg His
 290 295 300 20
 30 Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln Asp Leu Gly Trp Leu Asp Trp Val Ile
 305 310 315 320
 Ala Pro Gln Gly Tyr Ser Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ser Phe
 325 330 335
 35 Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Leu Gln Ser
 340 345 350
 40 Leu Val His Leu Met Lys Pro Asn Ala Val Pro Lys Ala Cys Cys Ala
 355 360 365
 Pro Thr Lys Leu Ser Ala Thr Ser Val Leu Tyr Tyr Asp Ser Ser Asn
 370 375 380
 45 Asn Val Ile Leu Arg Lys Ala Arg Asn Met Val Val Lys Ala Cys Gly
 385 390 395 400 30
 50 Cys His

(2) 配列番号22に関する情報

- (i) 配列の特徴
 - (A) 長さ:1926 塩基対
 - (B) 型: 核酸
 - (C) 鎖: 一本鎖
 - (D) トポロジー: 直鎖状
- (vi) 由来源
 - (A) 生物: ゲッ歯類
 - (F) 組織タイプ: 胚
- (ix) 特徴
 - (A) 名称/ キー : CDS
 - (B) 位置: 93...1289
 - (D) その他情報: / 機能= 骨形成蛋白質
/ 生産物=mOP2-PP
/ ノート=mOP-2(cDNA)
- (xi) 配列: 配列番号22

	GCCAGGCACA GGTGCGCCGT CTGGTCTCTCC CCGTCTGGCG TCAGCCGAGC CCGACCAGCT	60	
25	ACCAGTGGAT GCGCGCCGGC TGAAAGTCCG AG ATG GCT ATG CGT CCC GGG CCA	113	
	Met Ala Met Arg Pro Gly Pro		
	1 5		
30	CTC TGG CTA TTG GGC CTT GCT CTG TGC GCG CTG GGA GGC GGC CAC GGT	161	
	Leu Trp Leu Leu Gly Leu Ala Leu Cys Ala Leu Gly Gly Gly His Gly		20
	10 15 20		
35	CCG CGT CCC CCG CAC ACC TGT CCC CAG CGT CGC CTG GGA GCG CGC GAG	209	
	Pro Arg Pro Pro His Thr Cys Pro Gln Arg Arg Leu Gly Ala Arg Glu		
	25 30 35		
40	CGC CGC GAC ATG CAG CGT GAA ATC CTG GCG GTG CTC GGG CTA CCG GGA	257	
	Arg Arg Asp Met Gln Arg Glu Ile Leu Ala Val Leu Gly Leu Pro Gly		
	40 45 50 55		
45	CGG CCC CGA CCC CGT GCA CAA CCC GCC GCT GCC CGG CAG CCA GCG TCC	305	
	Arg Pro Arg Pro Arg Ala Gln Pro Ala Ala Ala Arg Gln Pro Ala Ser		
	60 65 70		
50	GCG CCC CTC TTC ATG TTG GAC CTA TAC CAC GCC ATG ACC GAT GAC GAC	353	
	Ala Pro Leu Phe Met Leu Asp Leu Tyr His Ala Met Thr Asp Asp Asp		30
	75 80 85		
50	GAC GGC GGG CCA CCA CAG GCT CAC TTA GGC CGT GCC GAC CTG GTC ATG	401	
	Asp Gly Gly Pro Pro Gln Ala His Leu Gly Arg Ala Asp Leu Val Me		
	90 95 100		

	AGC TTC GTC AAC ATG GTG GAA CGC GAC CGT ACC CTG GGC TAC CAG GAG Ser Phe Val Asn Met Val Glu Arg Asp Arg Thr Leu Gly Tyr Gln Glu 105 110 115	449	
5	CCA CAC TGG AAG GAA TTC CAC TTT GAC CTA ACC CAG ATC CCT GCT GGG Pro His Trp Lys Glu Phe His Phe Asp Leu Thr Gln Ile Pro Ala Gly 120 125 130 135	497	
10	GAG GCT GTC ACA GCT GCT GAG TTC CGG ATC TAC AAA GAA CCC AGC ACC Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Glu Pro Ser Thr 140 145 150	545	
15	CAC CCG CTC AAC ACA ACC CTC CAC ATC AGC ATG TTC GAA GTG GTC CAA His Pro Leu Asn Thr Thr Leu His Ile Ser Met Phe Glu Val Val Gln 155 160 165	593	10
20	GAG CAC TCC AAC AGG GAG TCT GAC TTG TTC TTT TTG GAT CTT CAG ACG Glu His Ser Asn Arg Glu Ser Asp Leu Phe Phe Leu Asp Leu Gln Thr 170 175 180	641	
20	CTC CGA TCT GGG GAC GAG GGC TGG CTG GTG CTG GAC ATC ACA GCA GCC Leu Arg Ser Gly Asp Glu Gly Trp Leu Val Leu Asp Ile Thr Ala Ala 185 190 195	689	
25	AGT GAC CGA TGG CTG CTG AAC CAT CAC AAG GAC CTG GGA CTC CGC CTC Ser Asp Arg Trp Leu Leu Asn His His Lys Asp Leu Gly Leu Arg Leu 200 205 210 215	737	
30	TAT GTG GAA ACC GCG GAT GGG CAC AGC ATG GAT CCT GGC CTG GCT GGT Tyr Val Glu Thr Ala Asp Gly His Ser Met Asp Pro Gly Leu Ala Gly 220 225 230	785	20
35	CTG CTT GGA CGA CAA GCA CCA CGC TCC AGA CAG CCT TTC ATG GTA ACC Leu Leu Gly Arg Gln Ala Pro Arg Ser Arg Gln Pro Phe Met Val Thr 235 240 245	833	
40	TTC TTC AGG GCC AGC CAG AGT CCT GTG CGG GCC CCT CGG GCA GCG AGA Phe Phe Arg Ala Ser Gln Ser Pro Val Arg Ala Pro Arg Ala Ala Arg 250 255 260	881	
40	CCA CTG AAG AGG AGG CAG CCA AAG AAA ACG AAC GAG CTT CCG CAC CCC Pro Leu Lys Arg Arg Gln Pro Lys Lys Thr Asn Glu Leu Pro His Pro 265 270 275	929	
45	AAC AAA CTC CCA GGG ATC TTT GAT GAT GGC CAC GGT TCC CGC GGC AGA Asn Lys Leu Pro Gly Ile Phe Asp Asp Gly His Gly Ser Arg Gly Arg 280 285 290 295	977	30
50	GAG GTT TGC CGC AGG CAT GAG CTC TAC GTC AGC TTC CGT GAC CTT GGC Glu Val Cys Arg Arg His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly 300 305 310	1025	

	TGG CTG GAC TGG GTC ATC GCC CCC CAG GGC TAC TCT GCC TAT TAC TGT	1073	
	Trp Leu Asp Trp Val Ile Ala Pro Gln Gly Tyr Ser Ala Tyr Tyr Cys		
	315 320 325		
5	GAG GGG GAG TGT GCT TTC CCA CTG GAC TCC TGT ATG AAC GCC ACC AAC	1121	
	Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn Ala Thr Asn		
	330 335 340		
10	CAT GCC ATC TTG CAG TCT CTG GTG CAC CTG ATG AAG CCA GAT GTT GTC	1169	
	His Ala Ile Leu Gln Ser Leu Val His Leu Met Lys Pro Asp Val Val		
	345 350 355		
15	CCC AAG GCA TGC TGT GCA CCC ACC AAA CTG AGT GCC ACC TCT GTG CTG	1217	10
	Pro Lys Ala Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Ser Ala Thr Ser Val Leu		
	360 365 370 375		
20	TAC TAT GAC AGC AGC AAC AAT GTC ATC CTG CGT AAA CAC CGT AAC ATG	1265	
	Tyr Tyr Asp Ser Ser Asn Asn Val Ile Leu Arg Lys His Arg Asn Met		
	380 385 390		
25	GTG GTC AAG GCC TGT GGC TGC CAC TGAGGCCCG CCCAGCATCC TGCTTCTACT	1319	
	Val Val Lys Ala Cys Gly Cys His		
	395		
30	ACCTTACCAT CTGGCCGGCC CCCTCTCCAG AGGCAGAAAC CCTTCTATGT TATCATAGCT	1379	
	CAGACAGGGG CAATGGGAGG CCCTTCACTT CCCCTGGCCA CTTCCTGCTA AAATTCTGGT	1439	
	CTTTCCAGT TCCTCTGTCC TTCATGGGGT TTCGGGGCTA TCACCCCGCC CTCTCCATCC	1499	20
	TCCTACCCCA AGCATAGACT GAATGCACAC AGCATCCAG AGCTATGCTA ACTGAGAGGT	1559	
	CTGGGGTCAG CACTGAAGGC CCACATGAGG AAGACTGATC CTTGGCCATC CTCAGCCAC	1619	
35	AATGGCAAAT TCTGGATGGT CTAAGAAGGC CCTGGAATC TAAACTAGAT GATCTGGGCT	1679	
	CTCTGCACCA TTCATTGTGG CAGTTGGGAC ATTTTITAGGT ATAACAGACA CATACTTA	1739	
	GATCAAATGCA TCGTGTACT CCTTGAAATC AGAGCTAGCT TGTTAGAAAA AGAATCAGAG	1799	
40	CCAGGTATAG CCGTGCATGT CATTAATCCC AGCGCTAAAG AGACAGAGAC AGGAGAATCT	1859	
	CTGTGAGTTC AAGGCCACAT AGAAACAGCC TGCTCGGGA GCAGGAAAAA AAAAAAAAAAC	1919	
45	GGAATTC	1926	30

(2) 配列番号23に関する情報

(i) 配列の特徴

- 5 (A) 長さ:399 アミノ酸
 (B) 型: アミノ酸
 (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子種: 蛋白質

10 (xi) 配列: 配列番号23

	Met	Ala	Met	Arg	Pro	Gly	Pro	Leu	Trp	Leu	Leu	Gly	Leu	Ala	Leu	Cys	
	1				5					10					15		10
15	Ala	Leu	Gly	Gly	Gly	His	Gly	Pro	Arg	Pro	Pro	His	Thr	Cys	Pro	Gln	
			20						25					30			
	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Arg	Glu	Arg	Arg	Asp	Met	Gln	Arg	Glu	Ile	Leu	
			35					40					45				
20	Ala	Val	Leu	Gly	Leu	Pro	Gly	Arg	Pro	Arg	Pro	Arg	Ala	Gln	Pro	Ala	
		50					55					60					
	Ala	Ala	Arg	Gln	Pro	Ala	Ser	Ala	Pro	Leu	Phe	Met	Leu	Asp	Leu	Tyr	
25	65					70					75					80	
	His	Ala	Met	Thr	Asp	Asp	Asp	Asp	Gly	Gly	Pro	Pro	Gln	Ala	His	Leu	
					85				90						95		
30	Gly	Arg	Ala	Asp	Leu	Val	Met	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Val	Glu	Arg	Asp	
				100					105					110			20
	Arg	Thr	Leu	Gly	Tyr	Gln	Glu	Pro	His	Trp	Lys	Glu	Phe	His	Phe	Asp	
			115					120					125				
35	Leu	Thr	Gln	Ile	Pro	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Glu	Phe	Arg	
			130				135						140				
	Ile	Tyr	Lys	Glu	Pro	Ser	Thr	His	Pro	Leu	Asn	Thr	Thr	Leu	His	Ile	
40	145					150					155					160	
	Ser	Met	Phe	Glu	Val	Val	Gln	Glu	His	Ser	Asn	Arg	Glu	Ser	Asp	Leu	
					165					170					175		
45	Phe	Phe	Leu	Asp	Leu	Gln	Thr	Leu	Arg	Ser	Gly	Asp	Glu	Gly	Trp	Leu	
				180					185					190			30
	Val	Leu	Asp	Ile	Thr	Ala	Ala	Ser	Asp	Arg	Trp	Leu	Leu	Asn	His	His	
			195					200					205				
50	Lys	Asp	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu	Tyr	Val	Glu	Thr	Ala	Asp	Gly	His	Ser	
		210					215					220					

Met Asp Pro Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly Arg Gln Ala Pro Arg Ser
 225 230 235 240
 5 Arg Gln Pro Phe Met Val Thr Phe Phe Arg Ala Ser Gln Ser Pro Val
 245 250 255
 Arg Ala Pro Arg Ala Ala Arg Pro Leu Lys Arg Arg Gln Pro Lys Lys
 260 265 270
 10 Thr Asn Glu Leu Pro His Pro Asn Lys Leu Pro Gly Ile Phe Asp Asp
 275 280 285
 Gly His Gly Ser Arg Gly Arg Glu Val Cys Arg Arg His Glu Leu Tyr
 290 295 300
 15 Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Leu Asp Trp Val Ile Ala Pro Gln
 305 310 315 320
 20 Gly Tyr Ser Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asp
 325 330 335
 Ser Cys Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Leu Gln Ser Leu Val His
 340 345 350
 25 Leu Met Lys Pro Asp Val Val Pro Lys Ala Cys Cys Ala Pro Thr Lys
 355 360 365
 Leu Ser Ala Thr Ser Val Leu Tyr Tyr Asp Ser Ser Asn Asn Val Ile
 370 375 380
 30 Leu Arg Lys His Arg Asn Met Val Val Lys Ala Cys Gly Cys His
 385 390 395

10

20

35 (2) 配列番号24に関する情報

- (i) 配列の特徴
- (A) 長さ:1368 塩基対
 - (B) 型: 核酸
 - (C) 鎖: 一本鎖
 - (D) トポロジー: 直鎖状

40 (ii) 分子種: cDNA

- 45 (ix) 特徴
- (A) 名称/ キー: CDS
 - (B) 位置: 1...1368

(xi) 配列: 配列番号24

50

30

	ATG TCG GGA CTG CGA AAC ACC TCG GAG GCC GTT GCA GTG CTC GCC TCC	48	
	Met Ser Gly Leu Arg Asn Thr Ser Glu Ala Val Ala Val Leu Ala Ser		
	1 5 10 15		
5	CTG GGA CTC GGA ATG GTT CTG CTC ATG TTC GTG GCG ACC ACG CCG CCG	96	
	Leu Gly Leu Gly Met Val Leu Leu Met Phe Val Ala Thr Thr Pro Pro		
	20 25 30		
10	GCC GTT GAG GCC ACC CAG TCG GGG ATT TAC ATA GAC AAC GGC AAG GAC	144	
	Ala Val Glu Ala Thr Gln Ser Gly Ile Tyr Ile Asp Asn Gly Lys Asp		
	35 40 45		
15	CAG ACG ATC ATG CAC AGA GTG CTG AGC GAG GAC GAC AAG CTG GAC GTC	192	10
	Gln Thr Ile Met His Arg Val Leu Ser Glu Asp Asp Lys Leu Asp Val		
	50 55 60		
20	TCG TAC GAG ATC CTC GAG TTC CTG GGC ATC GCC GAA CGG CCG ACG CAC	240	
	Ser Tyr Glu Ile Leu Glu Phe Leu Gly Ile Ala Glu Arg Pro Thr His		
	65 70 75 80		
25	CTG AGC AGC CAC CAG TTG TCG CTG AGG AAG TCG GCT CCC AAG TTC CTG	288	
	Leu Ser Ser His Gln Leu Ser Leu Arg Lys Ser Ala Pro Lys Phe Leu		
	85 90 95		
30	CTG GAC GTC TAC CAC CGC ATC ACG GCG GAG GAG GGT CTC AGC GAT CAG	336	
	Leu Asp Val Tyr His Arg Ile Thr Ala Glu Glu Gly Leu Ser Asp Gln		
	100 105 110		
35	GAT GAG GAC GAC GAC TAC GAA CGC GGC CAT CGG TCC AGG AGG AGC GCC	384	20
	Asp Glu Asp Asp Asp Tyr Glu Arg Gly His Arg Ser Arg Arg Ser Ala		
	115 120 125		
40	GAC CTC GAG GAG GAT GAG GGC GAG CAG CAG AAG AAC TTC ATC ACC GAC	432	
	Asp Leu Glu Glu Asp Glu Gly Glu Gln Gln Lys Asn Phe Ile Thr Asp		
	130 135 140		
45	CTG GAC AAG CGG GCC ATC GAC GAG AGC GAC ATC ATC ATG ACC TTC CTG	480	
	Leu Asp Lys Arg Ala Ile Asp Glu Ser Asp Ile Ile Met Thr Phe Leu		
	145 150 155 160		
50	AAC AAG CGC CAC CAC AAT GTG GAC GAA CTG CGT CAC GAG CAC GGC CGT	528	
	Asn Lys Arg His His Asn Val Asp Glu Leu Arg His Glu His Gly Arg		
	165 170 175		
55	CGC CTG TGG TTC GAC GTC TCC AAC GTG CCC AAC GAC AAC TAC CTG GTG	576	30
	Arg Leu Trp Phe Asp Val Ser Asn Val Pro Asn Asp Asn Tyr Leu Val		
	180 185 190		
60	ATG GCC GAG CTG CGC ATC TAT CAG AAC GCC AAC GAG GGC AAG TGG CTG	624	
	Met Ala Glu Leu Arg Ile Tyr Gln Asn Ala Asn Glu Gly Lys Trp Leu		
	195 200 205		

	ACC GCC AAC AGG GAG TTC ACC ATC ACG GTA TAC GCC ATT GGC ACC GGC	672	
	Thr Ala Asn Arg Glu Phe Thr Ile Thr Val Tyr Ala Ile Gly Thr Gly		
	210 215 220		
5	ACG CTG GGC CAG CAC ACC ATG GAG CCG CTG TCC TCG GTG AAC ACC ACC	720	
	Thr Leu Gly Gln His Thr Met Glu Pro Leu Ser Ser Val Asn Thr Thr		
	225 230 235 240		
10	GGG GAC TAC GTG GGC TGG TTG GAG CTC AAC GTG ACC GAG GGC CTG CAC	768	
	Gly Asp Tyr Val Gly Trp Leu Glu Leu Asn Val Thr Glu Gly Leu His		
	245 250 255		
15	GAG TGG CTG GTC AAG TCG AAG GAC AAT CAT GGC ATC TAC ATT GGA GCA	816	10
	Glu Trp Leu Val Lys Ser Lys Asp Asn His Gly Ile Tyr Ile Gly Ala		
	260 265 270		
20	CAC GCT GTC AAC CGA CCC GAC CGC GAG GTG AAG CTG GAC GAC ATT GGA	864	
	His Ala Val Asn Arg Pro Asp Arg Glu Val Lys Leu Asp Asp Ile Gly		
	275 280 285		
25	CTG ATC CAC CGC AAG GTG GAC GAC GAG TTC CAG CCC TTC ATG ATC GGC	912	
	Leu Ile His Arg Lys Val Asp Asp Glu Phe Gln Pro Phe Met Ile Gly		
	290 295 300		
30	TTC TTC CGC GGA CCG GAG CTG ATC AAG GCG ACG GCC CAC AGC AGC CAC	960	
	Phe Phe Arg Gly Pro Glu Leu Ile Lys Ala Thr Ala His Ser Ser His		
	305 310 315 320		
35	CAC AGG AGC AAG CGA AGC GCC AGC CAT CCA CGC AAG CGC AAG AAG TCG	1008	20
	His Arg Ser Lys Arg Ser Ala Ser His Pro Arg Lys Arg Lys Lys Ser		
	325 330 335		
40	GTG TCG CCC AAC AAC GTG CCG CTG CTG GAA CCG ATG GAG AGC ACG CGC	1056	
	Val Ser Pro Asn Asn Val Pro Leu Leu Glu Pro Met Glu Ser Thr Arg		
	340 345 350		
45	AGC TGC CAG ATG CAG ACC CTG TAC ATA GAC TTC AAG GAT CTG GGC TGG	1104	
	Ser Cys Gln Met Gln Thr Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Asp Leu Gly Trp		
	355 360 365		
50	CAT GAC TGG ATC ATC GCA CCA GAG GGC TAT GGC GCC TTC TAC TGC AGC	1152	
	His Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Gly Ala Phe Tyr Cys Ser		
	370 375 380		
55	GGC GAG TGC AAT TTC CCG CTC AAT GCG CAC ATG AAC GCC ACG AAC CAT	1200	30
	Gly Glu Cys Asn Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala Thr Asn His		
	385 390 395 400		
60	GCG ATC GTC CAG ACC CTG GTC CAC CTG CTG GAG CCC AAG AAG GTG CCC	1248	
	Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Leu Glu Pro Lys Lys Val Pro		
	405 410 415		

Leu Asp Lys Arg Ala Ile Asp Glu Ser Asp Ile Ile Met Thr Phe Leu
 145 150 155 160
 5 Asn Lys Arg His His Asn Val Asp Glu Leu Arg His Glu His Gly Arg
 165 170 175
 Arg Leu Trp Phe Asp Val Ser Asn Val Pro Asn Asp Asn Tyr Leu Val
 180 185 190
 10 Met Ala Glu Leu Arg Ile Tyr Gln Asn Ala Asn Glu Gly Lys Trp Leu
 195 200 205
 Thr Ala Asn Arg Glu Phe Thr Ile Thr Val Tyr Ala Ile Gly Thr Gly
 210 215 220 10
 15 Thr Leu Gly Gln His Thr Met Glu Pro Leu Ser Ser Val Asn Thr Thr
 225 230 235 240
 20 Gly Asp Tyr Val Gly Trp Leu Glu Leu Asn Val Thr Glu Gly Leu His
 245 250 255
 Glu Trp Leu Val Lys Ser Lys Asp Asn His Gly Ile Tyr Ile Gly Ala
 260 265 270
 25 His Ala Val Asn Arg Pro Asp Arg Glu Val Lys Leu Asp Asp Ile Gly
 275 280 285
 Leu Ile His Arg Lys Val Asp Asp Glu Phe Gln Pro Phe Met Ile Gly
 290 295 300 20
 30 Phe Phe Arg Gly Pro Glu Leu Ile Lys Ala Thr Ala His Ser Ser His
 305 310 315 320
 35 His Arg Ser Lys Arg Ser Ala Ser His Pro Arg Lys Arg Lys Lys Ser
 325 330 335
 Val Ser Pro Asn Asn Val Pro Leu Leu Glu Pro Met Glu Ser Thr Arg
 340 345 350
 40 Ser Cys Gln Met Gln Thr Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Asp Leu Gly Trp
 355 360 365
 His Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Gly Ala Phe Tyr Cys Ser
 370 375 380
 45 Gly Glu Cys Asn Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala Thr Asn His
 385 390 395 400
 50 Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Leu Glu Pro Lys Lys Val Pro
 405 410 415

Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Arg Leu Gly Ala Leu Pro Val Leu Tyr
 420 425 430
 His Leu Asn Asp Glu Asn Val Asn Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Ile
 5 435 440 445
 Val Lys Ser Cys Gly Cys His
 450 455

10

(2) 配列番号26に関する情報

10

(i) 配列の特徴

15

- (A) 長さ: 104 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

20

(ii) 分子種: 蛋白質

(ix) 特徴

25

- (A) 名称/ キー: 蛋白質
- (B) 位置: 1...104
- (D) その他情報: ノート=BMP3

(xi) 配列: 配列番号26

20

30

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

35

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

40

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

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

45

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

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

30

50

Thr Val Glu Ser Cys Ala Cys Arg
 100

(2) 配列番号27に関する情報

- (i) 配列の特徴
 - (A) 長さ: 102 アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (C) 鎖の数: 一本鎖
 - (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子種: 蛋白質

- (vi) 由来源
 - (A) 生物: ヒト

- (ix) 特徴
 - (A) 名称/ キイ: 蛋白質
 - (B) 位置: 1...102
 - (D) その他情報: ノート=BMP5

(xi) 配列: 配列番号27

Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln
 1 5 10 15
 Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Phe Tyr Cys Asp Gly
 20 25 30
 Glu Cys Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala Thr Asn His Ala
 35 40 45
 Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Met Phe Pro Asp His Val Pro Lys
 50 55 60
 Pro Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe
 65 70 75 80
 Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val
 85 90 95
 Arg Ser Cys Gly Cys His
 100

(2) 配列番号28に関する情報

- (i) 配列の特徴
 - (A) 長さ: 102 アミノ酸
 - (B) 型: アミノ酸
 - (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子種: 蛋白質

10

20

30

(vi) 由来源
(A) 生物: ヒト

5 (ix) 特徴
(A) 名称/ キイ: 蛋白質
(B) 位置: 1...102
(D) その他情報: 記録=BMP6

10 (xi) 配列: 配列番号28

1	Cys	Arg	Lys	His	Glu	Leu	Tyr	Val	Ser	Phe	Gln	Asp	Leu	Gly	Trp	Gln	
				5						10					15		
15	Asp	Trp	Ile	Ile	Ala	Pro	Lys	Gly	Tyr	Ala	Ala	Asn	Tyr	Cys	Asp	Gly	
			20					25						30			
20	Glu	Cys	Ser	Phe	Pro	Leu	Asn	Ala	His	Met	Asn	Ala	Thr	Asn	His	Ala	
			35					40					45				
25	Ile	Val	Gln	Thr	Leu	Val	His	Leu	Met	Asn	Pro	Glu	Tyr	Val	Pro	Lys	
			50				55					60					
30	Pro	Cys	Cys	Ala	Pro	Thr	Lys	Leu	Asn	Ala	Ile	Ser	Val	Leu	Tyr	Phe	
	65				70						75					80	
35	Asp	Asp	Asn	Ser	Asn	Val	Ile	Leu	Lys	Lys	Tyr	Arg	Trp	Met	Val	Val	
					85					90					95		
40	Arg	Ala	Cys	Gly	Cys	His											
				100													

10

20

(2) 配列番号29に関する情報

35 (i) 配列の特徴
(A) 長さ: 102 アミノ酸
(B) 型: アミノ酸
(D) トポロジー: 直鎖状

40 (ii) 分子種: 蛋白質

(ix) 特徴
(A) 名称/ キイ: 蛋白質
(B) 位置: 1...102
(D) その他情報: ラベル=OPX
ここでXAA は、明細書において特定した1またはそれ以上のアミノ酸から独立して選択される(II.B.2)

30

50

(xi) 配列: 配列番号29

5 Cys Xaa Xaa His Glu Leu Tyr Val Xaa Phe Xaa Asp Leu Gly Trp Xaa
 1 5 10 15
 Asp Trp Xaa Ile Ala Pro Xaa Gly Tyr Xaa Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly
 20 25 30
 10 Glu Cys Xaa Phe Pro Leu Xaa Ser Xaa Met Asn Ala Thr Asn His Ala
 35 40 45
 Ile Xaa Gln Xaa Leu Val His Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Val Pro Lys
 50 55 60
 15 Xaa Cys Cys Ala Pro Thr Xaa Leu Xaa Ala Xaa Ser Val Leu Tyr Xaa
 65 70 75 80
 Asp Xaa Ser Xaa Asn Val Xaa Leu Xaa Lys Xaa Arg Asn Met Val Val
 85 90 95
 20 Xaa Ala Cys Gly Cys His
 100

10

(2) 配列番号30に関する情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 97 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) トポロジー: 直鎖状

20

(ii) 分子種: 蛋白質

(ix) 特徴

- (A) 名称 / キー: 蛋白質
- (B) 存在位置: 1...97
- (D) その他情報: /ラベル=一般配列 5
 ノート= ここで各XAA は、明細書に示したような1
 またはそれ以上の特定されたアミノ酸の群から独立
 して選択される。

(xi) 配列: 配列番号30

30

45 Leu Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Gly Trp Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 50 Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Tyr Cys Xaa Gly Xaa Cys Xaa Xaa Pro
 20 25 30

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

Xaa Cys Cys Xaa Pro
 5 50 55 60

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

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

Xaa

10

15

(2) 配列番号31に関する情報

(i) 配列の特徴

20

- (A) 長さ: 102 アミノ酸
- (B) 型: アミノ酸
- (C) 鎖: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子種: 蛋白質

25

(ix) 特徴

30

- (A) 名称 / キー: 蛋白質
- (B) 存在位置: 1...102
- (D) その他情報: ラベル= 一般配列6
 ノート= ここで各XAA は、明細書に示したような1
 またはそれ以上の特定されたアミノ酸の群から独立
 して選択される。

20

35

(xi) 配列: 配列番号31

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

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

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

Xaa
 50 55 60

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

30

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

5 Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa
 100

(2) 配列番号32に関する情報

- 10 (i) 配列の特徴
 (A) 長さ: 1247塩基対
 (B) 型: 核酸
 (C) 鎖: 一本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状

10

15 (ii) 分子種: cDNA

- (vi) 由来源
 (A) 生物: ヒト
 (F) 組織型: 脳

- 20 (ix) 特徴
 (A) 名称/ キー: CDS
 (B) 位置: 84...1199
 25 (D) その他情報: 物質-GDF-1
 ノート= GDF-1 cDNA

(xi) 配列: 配列番号32

20

30 GGGGACACCG GCCCCGCCCT CAGCCCACTG GTCCCGGGCC GCCGCGGACC CTGCGCACTC 60
 TCTGGTCATC GCCTGGGAGG AAG ATG CCA CCG CCG CAG CAA GGT CCC TGC 110
 Met Pro Pro Pro Gln Gln Gly Pro Cys
 1 5
 35 GGC CAC CAC CTC CTC CTC CTC CTG GCC CTG CTG CTG CCC TCG CTG CCC 158
 Gly His His Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Leu Pro Ser Leu Pro
 10 15 20 25
 40 CTG ACC CGC GCC CCC GTG CCC CCA GGC CCA GCC GCC GCC CTG CTC CAG 206
 Leu Thr Arg Ala Pro Val Pro Pro Gly Pro Ala Ala Ala Leu Leu Gln
 30 35 40
 45 GCT CTA GGA CTG CGC GAT GAG CCC CAG GGT GCC CCC AGG CTC CGG C 254
 Ala Leu Gly Leu Arg Asp Glu Pro Gln Gly Ala Pro Arg Leu Arg P... 30
 45 50 55
 50 GTT CCC CCG GTC ATG TGG CGC CTG TTT CGA CGC CGG GAC CCC CAG GAG 302
 Val Pro Pro Val Met Trp Arg Leu Phe Arg Arg Arg Asp Pro Gln Glu
 60 65 70

	ACC AGG TCT GGC TCG CGG CGG ACG TCC CCA GGG GTC ACC CTG CAA CCG	350	
	Thr Arg Ser Gly Ser Arg Arg Thr Ser Pro Gly Val Thr Leu Gln Pro		
	75 80 85		
5	TGC CAC GTG GAG GAG CTG GGG GTC GCC GGA AAC ATC GTG CGC CAC ATC	398	
	Cys His Val Glu Glu Leu Gly Val Ala Gly Asn Ile Val Arg His Ile		
	90 95 100 105		
10	CCG GAC CGC GGT GCG CCC ACC CGG GCC TCG GAG CCT GTC TCG GCC GCG	446	
	Pro Asp Arg Gly Ala Pro Thr Arg Ala Ser Glu Pro Val Ser Ala Ala		
	110 115 120		
15	GGG CAT TGC CCT GAG TGG ACA GTC GTC TTC GAC CTG TCG GCT GTG GAA	494	10
	Gly His Cys Pro Glu Trp Thr Val Phe Asp Leu Ser Ala Val Glu		
	125 130 135		
20	CCC GCT GAG CGC CCG AGC CGG GCC CGC CTG GAG CTG CGT TTC GCG GCG	542	
	Pro Ala Glu Arg Pro Ser Arg Ala Arg Leu Glu Leu Arg Phe Ala Ala		
	140 145 150		
25	GCG GCG GCG GCA GCC CCG GAG GGC GGC TGG GAG CTG AGC GTG GCG CAA	590	
	Ala Ala Ala Ala Pro Glu Gly Gly Trp Glu Leu Ser Val Ala Gln		
	155 160 165		
30	GCG GGC CAG GGC GCG GGC GCG GAC CCC GGG CCG GTG CTG CTC CGC CAG	638	
	Ala Gly Gln Gly Ala Gly Ala Asp Pro Gly Pro Val Leu Leu Arg Gln		
	170 175 180 185		
35	TTC GTG CCC GCC CTG GGG CCG CCA GTG CGC GCG GAG CTG CTG GGC GCC	686	20
	Leu Val Pro Ala Leu Gly Pro Pro Val Arg Ala Glu Leu Leu Gly Ala		
	190 195 200		
40	GCT TGG GCT CGC AAC GCC TCA TGG CCG CGC AGC CTC CGC CTG GCG CTG	734	
	Ala Trp Ala Arg Asn Ala Ser Trp Pro Arg Ser Leu Arg Leu Ala Leu		
	205 210 215		
45	GCG CTA CGC CCC CGG GCC CCT GCC GCC TGC GCG CGC CTG GCC GAG GCC	782	
	Ala Leu Arg Pro Arg Ala Pro Ala Ala Cys Ala Arg Leu Ala Glu Ala		
	220 225 230		
50	TCG CTG CTG CTG GTG ACC CTC GAC CCG CGC CTG TGC CAC CCC CTG GCC	830	
	Ser Leu Leu Leu Val Thr Leu Asp Pro Arg Leu Cys His Pro Leu Ala		
	235 240 245		
55	CGG CCG CGG CGC GAC GCC GAA CCC GTG TTG GGC GGC GGC CCC GGG GGC	878	30
	Arg Pro Arg Arg Asp Ala Glu Pro Val Leu Gly Gly Gly Pro Gly Gly		
	250 255 260 265		
60	GCT TGT CGC GCG CGG CGG CTG TAC GTG AGC TTC CGC GAG GTG GGC TGG	926	
	Ala Cys Arg Ala Arg Arg Leu Tyr Val Ser Phe Arg Glu Val Gly Trp		
	270 275 280		

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

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

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

15 GGA GCC GCC GAC CTG CCC TGC TGC GTG CCC GCG CGC CTG TCG CCC ATC 1118
 Gly Ala Ala Asp Leu Pro Cys Cys Val Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ile 10
 330 335 340 345

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

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

25 CCGGGCCCA ACAATAAATG CCGCGTGG 1247

(2) 配列番号33に関する情報

30 (i) 配列の特徴 20
 (A) 長さ: 372 アミノ酸
 (B) 型: アミノ酸
 (D) トポロジー: 直鎖状

35 (ii) 分子種: 蛋白質

(xi) 配列: 配列番号33

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

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

45 Pro Gly Pro Ala Ala Ala Leu Leu Gln Ala Leu Gly Leu Arg Asp Glu 30
 35 40 45

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

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

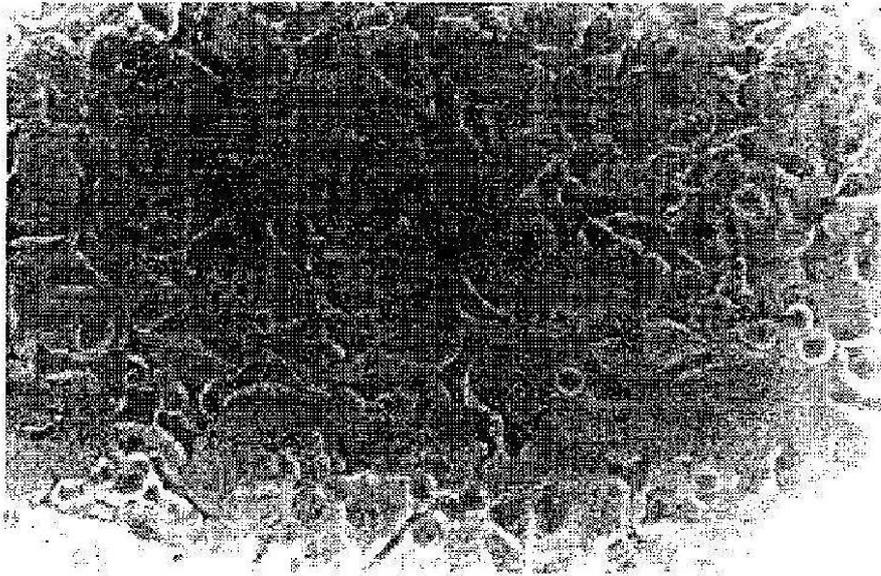
Thr Ser Pro Gly Val Thr Leu Gln Pro Cys His Val Glu Glu Leu Gly
 85 90 95
 5 Val Ala Gly Asn Ile Val Arg His Ile Pro Asp Arg Gly Ala Pro Thr
 100 105 110
 Arg Ala Ser Glu Pro Val Ser Ala Ala Gly His Cys Pro Glu Trp Thr
 115 120 125
 10 Val Val Phe Asp Leu Ser Ala Val Glu Pro Ala Glu Arg Pro Ser Arg
 130 135 140
 Ala Arg Leu Glu Leu Arg Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ala Pro Glu
 145 150 155 160
 15 Gly Gly Trp Glu Leu Ser Val Ala Gln Ala Gly Gln Gly Ala Gly Ala
 165 170 175
 20 Asp Pro Gly Pro Val Leu Leu Arg Gln Leu Val Pro Ala Leu Gly Pro
 180 185 190
 Pro Val Arg Ala Glu Leu Leu Gly Ala Ala Trp Ala Arg Asn Ala Ser
 195 200 205
 25 Trp Pro Arg Ser Leu Arg Leu Ala Leu Ala Leu Arg Pro Arg Ala Pro
 210 215 220
 Ala Ala Cys Ala Arg Leu Ala Glu Ala Ser Leu Leu Leu Val Thr Leu
 225 230 235 240
 30 Asp Pro Arg Leu Cys His Pro Leu Ala Arg Pro Arg Arg Asp Ala Glu
 245 250 255
 35 Pro Val Leu Gly Gly Gly Pro Gly Gly Ala Cys Arg Ala Arg Arg Leu
 260 265 270
 Tyr Val Ser Phe Arg Glu Val Gly Trp His Arg Trp Val Ile Ala Pro
 275 280 285
 40 Arg Gly Phe Leu Ala Asn Tyr Cys Gln Gly Gln Cys Ala Leu Pro Val
 290 295 300
 Ala Leu Ser Gly Ser Gly Gly Pro Pro Ala Leu Asn His Ala Val Leu
 305 310 315 320
 45

10

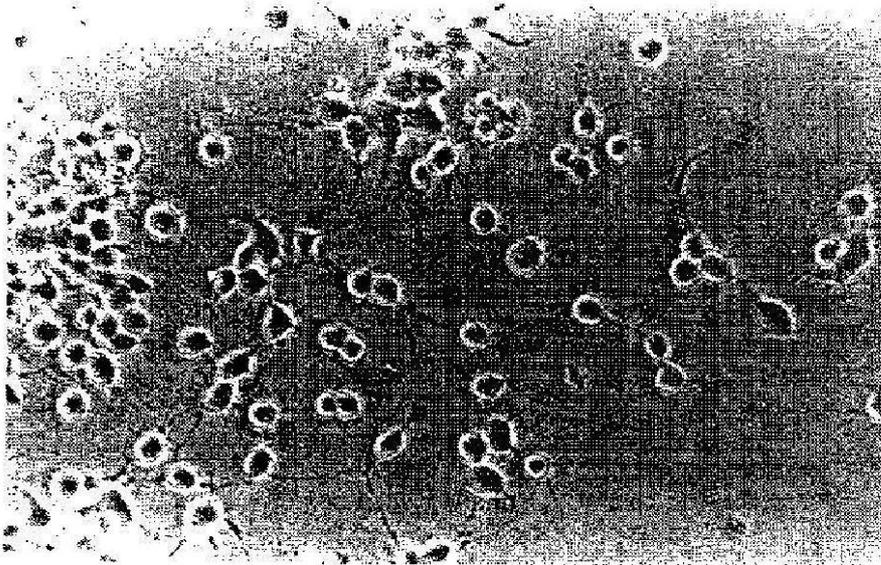
20

30

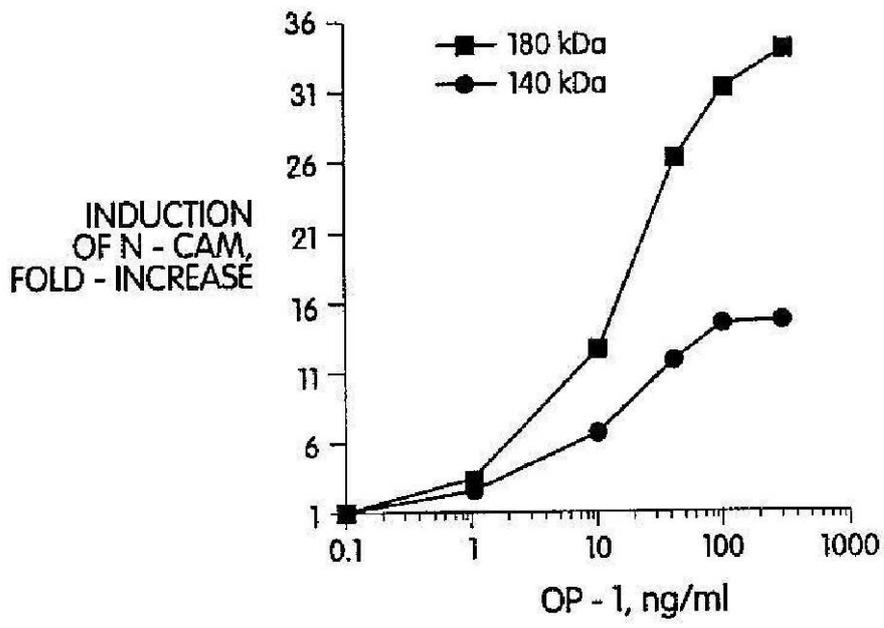
【 図 1 A 】



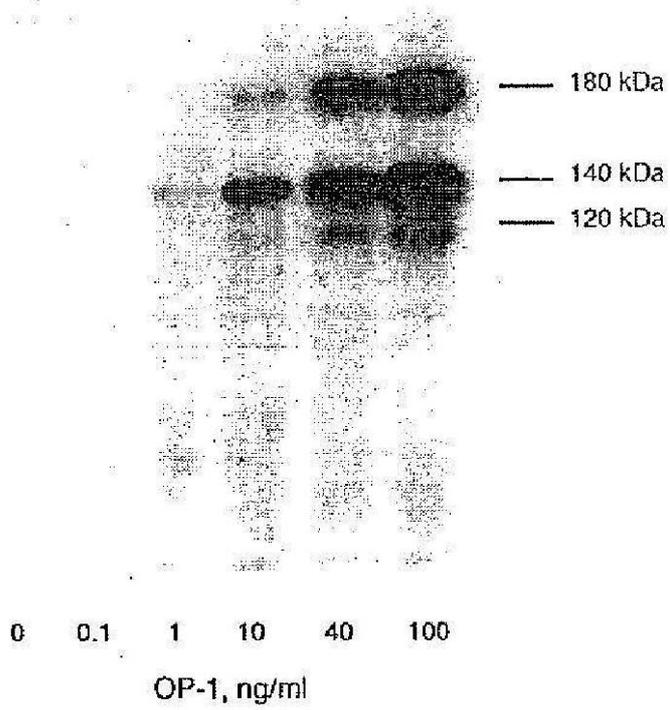
【 図 1 B 】



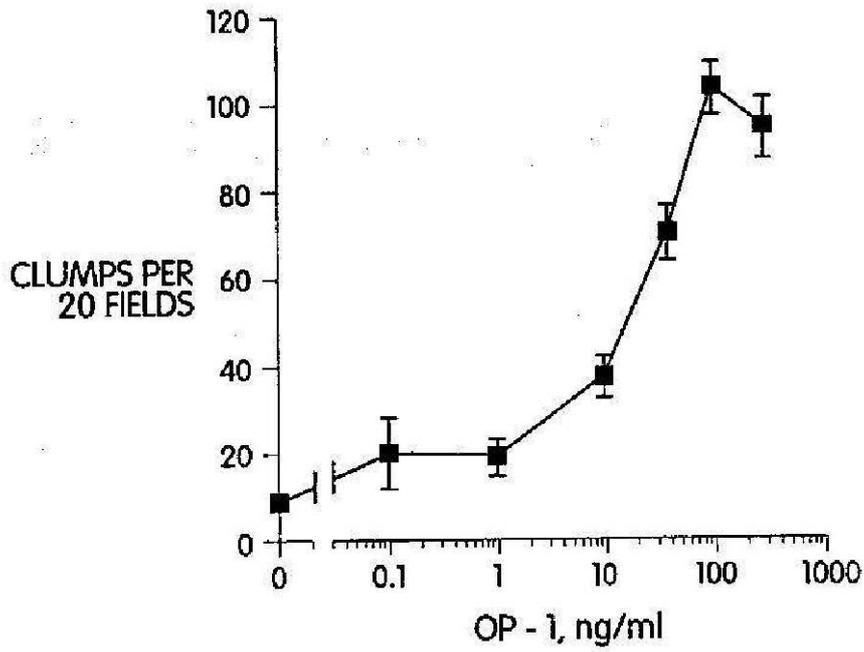
【 図 2 A 】



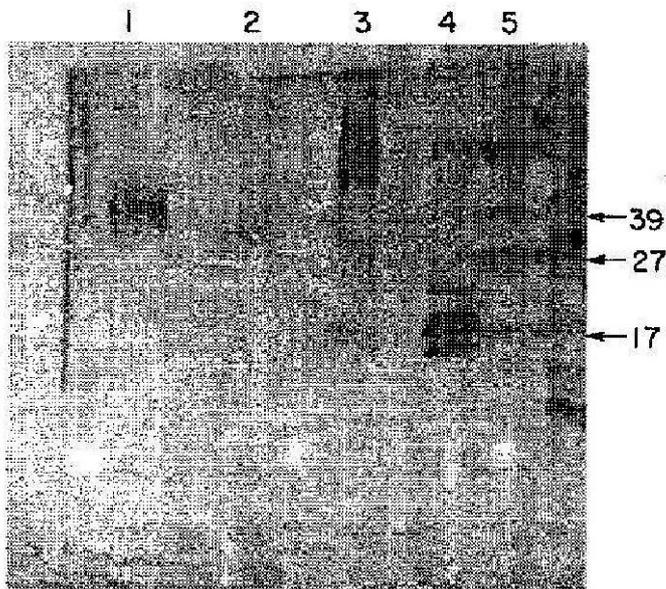
【 図 2 B 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 配列表 】

2009227679000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成21年5月22日 (2009.5.22)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

瀕死の神経細胞の生存性を増強するための薬剤の生産へのモルフォゲンの使用。

【請求項2】

瀕死の神経細胞の生存性を増強するための方法であって、上記1胞の生存性増強のために十分な時間と濃度で上記細胞にモルフォゲンを供給することからなる方法。

【請求項3】

上記細胞が、上記細胞からなる神経組織に対する化学的または機械的損傷のため瀕死の状態にあるところの請求項1または2の発明。

【請求項4】

上記損傷が神経切断からなる請求項3の発明。

【請求項5】

上記モルフォゲンが上記損傷に対して先に上記細胞に供給されている請求項3の発明。

【請求項6】

上記損傷が上記細胞の脱ミエリン化によるものである請求項3の発明。

【請求項7】

上記損傷が細胞性毒物に対して上記細胞が露出したことによるものである請求項3の発明。

【請求項8】

上記毒物がエタノールからなる請求項7の発明。

【請求項9】

上記細胞がニューロパシーのため瀕死の状態にあるところの請求項1または2の発明。

【請求項10】

上記ニューロパシーの病因が代謝、感染、毒物、自己免疫、栄養、虚血性である請求項9の発明。

【請求項11】

上記ニューロパシーが、パーキンソン病、ハンチントン舞蹈病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、アルツハイマー病である請求項10の発明。

【請求項12】

上記細胞が上記細胞からなる神経組織に関連した腫瘍性病変のため死のリスクにあるところの請求項1または2の発明。

【請求項13】

上記病変が神経由来の細胞からなる腫瘍によりもたらされたものである請求項12の発明。

【請求項14】

上記腫瘍が神経芽細胞腫または網膜芽細胞腫ある請求項13の発明。

【請求項15】

上記病変がグリア細胞からなる腫瘍からもたらされたものである請求項12の方法。

【請求項16】

上記瀕死の細胞が中枢神経系の部分からなるところの請求項1または2の発明。

【請求項17】

以下のことからなる哺乳動物の損傷部位に神経回路の再生を促進させるための組成物；インビボでその部位に蛋白質を保持させるために、適切な生体内適合性、生体内吸収性キャリアーおよび、

上記キャリアーに散布し上記損傷部位に供給した時上記のモルフォゲンのようなモルフォゲンが上記部位に神経回路の再生促進させる。

ここで、上記モルフォゲンは、

OP-1、OP-2、CBMP2、Vgl(fx)、Vgr(fx)、DPP(fx)、GDF(fx)、60A(fx)からなる群から選択された配列の一つと少なくとも70%のアミノ酸配列ホモロジーを有しているもの、

OP-1、OP-2、CBMP2、Vgl(fx)、Vgr(fx)、DPP(fx)、GDF(fx)、60A(fx)からなる群から選択された配列の一つと少なくとも80%のアミノ酸配列ホモロジーを有しているもの、又は

配列表配列番号5(hOP-1)の残基43-139で定義された配列と60%以上のアミノ酸配列の同一性を持つアミノ酸配列を含む

【請求項18】

モルフォゲンを含む、組織中の細胞接着分子の生産促進のための薬物。

ここで、上記モルフォゲンは、

OP-1、OP-2、CBMP2、Vgl(fx)、Vgr(fx)、DPP(fx)、GDF(fx)、60A(fx)からなる群から選択された配列の一つと少なくとも70%のアミノ酸配列ホモロジーを有しているもの、

OP-1、OP-2、CBMP2、Vgl(fx)、Vgr(fx)、DPP(fx)、GDF(fx)、60A(fx)からなる群から選択された配列の一つと少なくとも80%のアミノ酸配列ホモロジーを有しているもの、又は

配列表配列番号5(hOP-1)の残基43-139で定義された配列と60%以上のアミノ酸配列の同一性を持つアミノ酸配列を含む

【請求項19】

哺乳動物のニューロパシーを検出するための方法であって、以下のステップからなる方法：上記哺乳動物血清または脳脊髄液中のモルフォゲンの生理学的濃度の変動を検出し、上記変動を神経細胞死の増加の指標とする。

【請求項20】

哺乳動物のニューロパシーを検出するための方法であって、以下のステップからなる方法：

上記哺乳動物血清または脳脊髄液中のモルフォゲン抗体のタイターの出現濃度の変動を検出し、上記変動を神経細胞死の増加の指標とする。

【請求項21】

上記モルフォゲンがOP-1、OP-2、CBMP2、Vgl(fx)、Vgr(fx)、DPP(fx)、GDF(fx)、60A(fx)からなる群から選択された配列の一つと少なくとも70%のアミノ酸配列ホモロジーを有しているものからなる請求項19または20の方法。

【請求項22】

上記モルフォゲンが配列表配列番号5(hOP-1)の残基43-139で定義された配列と60%以上のアミノ酸配列の同一性を持つアミノ酸配列からなるものである請求項21の方法。

【請求項23】

上記モルフォゲンが配列表配列番号16のヌクレオチド1036-1341または配列表配列番号20のヌクレオチド1390-1695まで定義されたDNA配列と厳密な条件でハイブリダイズする核酸によってコードされたポリペプチド鎖からなるものである請求項19または20の方法。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P	39/02 (2006.01)	A 6 1 P 39/02	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P	25/14 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

- (72)発明者 クベラサムパス, サンゲーベル
 アメリカ合衆国 0 2 0 5 3 マサチューセッツ, メドウェイ, スプリング ストリート シックス
- (72)発明者 オパーマン, ハーマン
 アメリカ合衆国 0 2 0 5 3 マサチューセッツ, メドウェイ, サマー ヒル ロード 2 5
- (72)発明者 オズカイナック, エンジン
 アメリカ合衆国 0 1 7 4 8 マサチューセッツ, ミルフォード, パーデュー ドライブ 4 4
- (72)発明者 パング, ロイ エッチ.エル.
 アメリカ合衆国 0 3 7 5 0 ニューハンプシャー, エトナ, パートリッジ ロード 1 5
- (72)発明者 コーエン, チャールズ エム.
 アメリカ合衆国 0 2 0 5 3 マサチューセッツ, メドウェイ, ウィンスロブ ストリート 9 8

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA04
 4B063 QA08 QA19 QQ08 QQ79 QR48 QR77 QX01
 4B065 AA91X BB19 CA44
 4C076 AA99 CC01 CC03 CC11 EE41 EE43 FF02
 4C084 AA02 BA22 BA23 DC50 ZA01 ZA15 ZA16 ZA22 ZA36 ZB08
 ZB26 ZB35 ZC37

【外国語明細書】

2009227679000001.pdf

专利名称(译)	通过诱导组织因子神经再生和修复		
公开(公告)号	JP2009227679A	公开(公告)日	2009-10-08
申请号	JP2009115655	申请日	2009-05-12
[标]申请(专利权)人(译)	史赛克公司		
申请(专利权)人(译)	史赛克公司		
[标]发明人	ルーガーデイビッドシー クベラサムパスサンゲーベル オパーマンハーマン オズカイナックエンジン パングロイエッチエル コーエンチャールズエム		
发明人	ルーガー,デイビッド シー クベラサムパス,サンゲーベル オパーマン,ハーマン オズカイナック,エンジン パング,ロイ エッチ.エル. コーエン,チャールズ エム.		
IPC分类号	A61K38/00 C12Q1/02 C12N5/10 A61K47/42 A61P31/04 A61P39/02 A61P37/06 A61P9/10 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/00 A61P25/28 A61P35/00 G01N33/53 C12N15/09 G01N33/50 A61F2/00 A61K6 /00 A61K38/18 A61K48/00 A61L27/22 A61L27/24 A61P25/02 A61P25/32 A61P43/00 C07K14/435 C07K14/47 C07K14/495 C07K14/51 C07K16/22 C12Q1/06 G01N33/68		
CPC分类号	A61F2310/00365 A61K38/1875 A61K48/00 A61L27/227 A61L27/24 A61L2430/32 A61P9/10 A61P25 /00 A61P25/02 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P25/32 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/06 A61P39/02 A61P43/00 C07K14/51 C07K16/22		
FI分类号	A61K37/02.ZNA C12Q1/02 C12N5/00.B A61K47/42 A61P31/04 A61P39/02 A61P37/06 A61P9/10 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/00 A61P25/28 A61P35/00 G01N33/53.D C12N15/00.A A61K38/00 A61K38/16 C12N5/00.102 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA80 4B024/CA04 4B063/QA08 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063 /QR48 4B063/QR77 4B063/QX01 4B065/AA91X 4B065/BB19 4B065/CA44 4C076/AA99 4C076/CC01 4C076/CC03 4C076/CC11 4C076/EE41 4C076/EE43 4C076/FF02 4C084/AA02 4C084/BA22 4C084 /BA23 4C084/DC50 4C084/ZA01 4C084/ZA15 4C084/ZA16 4C084/ZA22 4C084/ZA36 4C084/ZB08 4C084/ZB26 4C084/ZB35 4C084/ZC37		
优先权	07/922813 1992-07-31 US 08/029335 1993-03-04 US 08/040510 1993-03-31 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供用于维持哺乳动物细胞神经通路的治疗方法和组合物。一种增强垂死的神经元存活的方法，该方法包括一次向神经元提供含有吗啡原的组合物，且其浓度足以增强神经元的存活。其中所述形态发生原选自OP-1，OP-2，CBMP2，Vgl (fx)，Vgr (fx)，DPP (fx)，GDF (fx)，60A (fx)。它由具有至少70%氨基酸序列同源性的序列之一组成。[选择图]图1B

