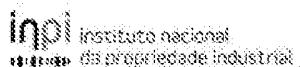

(11) Número de Publicação: **PT 784093 E**



(51) Classificação Internacional:

C12N 15/12 (2007.10) **C07K 14/715** (2007.10)
C12N 5/10 (2007.10) **A01K 67/27** (2007.10)
C07K 19/00 (2007.10) **C12N 15/62** (2007.10)
C07K 16/28 (2007.10) **C07K 1/107** (2007.10)
C12Q 1/68 (2007.10) **G01N 33/50** (2007.10)
G01N 33/566 (2007.10) **A61K 38/17** (2007.10)
A61K 48/00 (2007.10) **C12N 1/21** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **1996.12.20**

(30) Prioridade(s): **1995.12.22 US 577788**
1996.09.03 US 706945

(43) Data de publicação do pedido: **1997.07.16**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.10.01**
245/2008

(73) Titular(es):

AMGEN INC.
ONE AMGEN CENTER DRIVE, THOUSAND OAKS
CALIFORNIA 91320-1799 US

(72) Inventor(es):

MING-SHI CHANG US
DAVID L. LACEY US
WILLIAM J. BOYLE US
FRANK J. CALZONE US

(74) Mandatário:

JOSÉ EDUARDO LOPEZ VIEIRA DE SAMPAIO
R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **OSTEOPROTEGERINA**

(57) Resumo:

RESUMO

OSTEOPROTEGERINA

A presente invenção tem por objecto um polipéptido segregado, designado por osteoprotegerina, que é um elemento da super-família dos receptores dos factores de necrose do tumor e está envolvido na regulação do metabolismo dos ossos. Também tem por objecto ácidos nucleicos que codificam a osteoprotegerina, polipéptidos, vectores recombinantes e células hospedeiras para expressão, anticorpos que se ligam à OPG, e composições farmacêuticas. Os polipéptidos são utilizados para tratar doenças ósseas caracterizadas por um aumento da reabsorção tal como a osteoporose.

DESCRIÇÃO

OSTEOPROTEGERINA

Domínio da invenção

A presente invenção tem por objecto um novo polipéptido, designado por osteoprotegerina, que é um elemento da super-família dos receptores dos factores de necrose do tumor como se mostra nas figuras 9C-9D. O polipéptido utiliza-se para tratar doenças ósseas caracterizadas por um aumento da perda óssea tal como a osteoporose

Antecedentes da invenção

Os factores de crescimento de polipéptidos e as citocinas são factores segregados que assinalam uma ampla variedade de alterações no crescimento, na diferenciação e no metabolismo das células, por se ligarem especificamente a receptores de ligação discretos da superfície. Tal como uma classe de proteínas, os receptores variam na sua estrutura e no seu modo de transdução do sinal. São caracterizados por terem um domínio extracelular que está envolvida na ligação do ligando e um domínio citoplasmico que transmite um sinal intracelular apropriado. Os modelos de expressão dos receptores, em última análise, determinam quais as células que respondem a um dado ligando, enquanto a estrutura de um dado receptor dita a resposta celular induzida pela ligação do ligando. Os receptores têm mostrado que transmitem sinais intracelulares por via dos seus domínios citoplasmicos por meio da activação da fosforilação da tirosina da proteína ou da fosforilação da serina/treonina da proteína (por exemplo, receptor do factor de crescimento derivado de plaquetas

(RFCDP) ou o receptor I do factor β de transformação do crescimento (R-IF β TC, TGF β R-I na terminologia inglesa), por estimulação da activação da proteína G (por exemplo o receptor β -adrenérgico) e por associações de modulação com proteínas de transdução do sinal citoplasmico (por exemplo, R1-FNT [TNFR-I na terminologia inglesa] e Fas/APO) (Heldin, Cell 80, 213-223 (1995)).

A super-família dos receptores dos factores de necrose do tumor (RFNT) é um grupo das proteínas da transmembrana do tipo I que partilham um elemento conservado rico em cisteína que se repete três a seis vezes no domínio extracelular (Smith, et al. Cell 76, 953-962 (1994)). Colectivamente, estas unidades repetidas formam os domínios de ligação do ligando destes receptores (Chen et al., Chemistry 270, 2874-2878 (1995)). Os ligandos para estes receptores são um grupo relacionado sob o ponto de vista estrutural com as proteínas homólogas de um FNT α . (Goeddel et al., Cold Spring Harbor Symp. Quart. Biol. 51, 597-609 (1986); Nagata et al. Science 267, 1449-1456; (1995)). O FNT α liga-se a receptores distintos, mas fortemente relacionados R1-FNT e R2-FNT. O FNT α produz uma variedade de respostas biológicas nas células que comportam o receptor, incluindo, proliferação, diferenciação e citotoxicidade e apoptose (Beutler et al. Ann. Rev. Biochem. 57, 505-518 (1988)).

Crê-se que o FNT α medeia respostas inflamatórias agudas e crónicas (Beutler et al. Ann. Rev. Biochem. 57, 505-508 (1988)). A libertação sistémica de FNT α induz um choque tóxico e propaga a necrose dos tecidos. Por causa disto, o FNT α pode ser responsável por morbidez e mortalidade severas, associadas com uma variedade de doenças infecciosas, incluindo sepsia. As mutações em FasL, o ligando para o

receptor relacionado com o RFNT Fas/APO (Suda et al. Cell 75, 1169-1178 (1993)), está associado com a auto-imunidade (Fisher et al. Cell 81, 935-946 (1995)), enquanto a sobreprodução de FasL pode estar implicada na hepatite induzida por fármacos. Assim, os ligandos às várias proteínas relacionadas com os RFNT muitas vezes medeiam os efeitos severos de muitos estados de doença, o que sugere que os agentes que neutralizam a actividade destes ligandos terão um valor terapêutico. Os receptores solúveis R1-FNT e os anticorpos que se ligam a FNT α foram analisados quanto à sua capacidade para neutralizar o FNT α sistémico (Loetscher et al. Cancer Cells 3 (6), 221-226 (1991)). Recentemente, clonou-se uma forma de ocorrência natural de um ARNm de R1-FNT e o seu produto foi analisado quanto à sua capacidade para neutralizar a actividade de FNT α in vitro e in vivo (Kohno et al. PNAS EUA 87, 8331-8335; (1990)). A capacidades desta proteína para neutralizar o FNT α , sugere que os receptores solúveis do FNT funcionam para se ligar e eliminar os FNT, bloqueando assim os efeitos citotóxicos nas células que comportam o RFNT.

Um dos objectos da presente invenção consiste em identificar um novo elemento da super-família dos R-FNT. Antecipa-se que os novos membros da super-família dos R-FNT possam ser as proteínas da transmembrana ou as suas formas solúveis que compreendem os domínios extracelulares e os domínios sem transmembrana e citoplásmicos. Os requerentes identificaram um novo elemento da super-família dos R-FNT que codifica uma proteína segregada que está fortemente relacionada com o R2-FNT. Por analogia com o R1-FNT solúvel, a proteína relacionada com o R2-FNT pode regular negativamente a actividade do seu ligando e assim pode ser útil no tratamento de certas doenças dos seres humanos.

Sumário da invenção

Já se identificou um novo elemento da superfamília dos receptores dos factores de necrose do tumor (R-FNT) numa biblioteca de ADNc de intestino fetal de rato. Obteve-se um clone do ADNc de comprimento completo e sequenciou-se. A expressão do ADNc de rato num rato transgénico revelou um significativo aumento da densidade dos ossos, particularmente nos ossos longos, nos ossos pélvicos e nas vértebras. O polipéptido codificado pelo ADNc é designado por osteoprotegerina (OPG) e desempenha um papel na promoção da acumulação óssea. De acordo com a presente invenção, determinou-se o clone de ADNc da OPG humana.

A memória descritiva indica ácidos nucleicos que codificam um polipéptido com pelo menos uma das actividades biológicas da OPG. Os ácidos nucleicos que hibridam com os ácidos nucleicos que codificam a OPG humana, como se mostra nas figuras 9C-9D (SEQ ID NO: 124), são também providenciados, de acordo com a presente invenção. A OPG é uma OPG de mamífero e preferencialmente uma OPG humana. Os vectores recombinantes e as células hospedeiras que expressam a OPG estão também englobados assim como os processos para a produção de OPG recombinante. Os seus anticorpos ou fragmentos que se ligam especificamente ao polipéptido estão também englobados.

Os processos de tratamento das doenças ósseas estão também descritos no presente pedido de patente. Os polipéptidos são úteis para a prevenção da reabsorção óssea e podem ser utilizados para tratar qualquer estado clínico que resulte em perda óssea tal como osteoporose, hipercalcémia, doença óssea da Paget e perda óssea devida a artrite

reumatóide ou a osteomielite e similares. As doenças ósseas podem também ser tratadas com uma terapia anti-paralela ou uma terapia de genes utilizando os ácidos nucleicos da presente invenção. As composições farmacêuticas que contêm ácidos nucleicos e polipeptídos da OPG estão também englobadas.

Descrição das figuras

Figura 1. A. Análise FASTA dos novos EST LORF. Mostra-se a sequência de aminoácidos de FRI-1 alinhada com a sequência de R-2 FNT humano. B. Análise do perfil do novo EST LORF ilustrada é a deduzida sequência de aminoácidos de FRI-1 alinhada com o perfil de R FNT. C. Vista estrutural da super-família dos R FNT indicando a região que é homóloga do novo FRI-1.

Figura 2. Estrutura e sequência do gene de OPG de rato de comprimento completo, um novo elemento da superfamília de R-FNT. Insere-se um mapa de pMOB-B1. A caixa indica a posição de LORF dentro da sequência de ADNc (linha a negro). A caixa preta indica o péptido de sinal e as elipses cinzentas indicam a posição das sequências de repetição ricas em cisteína. B, C. Sequências de ácidos nucleicos e proteínas do ADNc da OPG de rato. O péptido de sinal previsto está sublinhado e os sítios potenciais de glicosilação ligados a N estão indicados a negro, letras sublinhadas. D, E. Comparação da sequência de Pileup (Wisconsin GCG Package, Versão 8.1) da OPG com outros elementos da super-família dos R-FNT TNFR. fas (SEQ ID NO 128), ntrlr (SEQ ID NO. 129); sfu-F2 (SEQ ID: 130); r2-tnf (SEQ ID NO. 131); id40 (SEQ ID NO. 132);

osteо (SEQ ID NO. 133); ngfr (SEQ ID NO: 134); Ox40 (SEQ ID NO. 135); 41bb (SEQ ID NO. 136).

Figura 3. Análise PepPlot (gráfico dos péptidos) (Wisconsin GCG Package, Versão 8.1) da sequência prevista de proteínas de OPG de rato.

A. Representação esquemática de OPG de rato mostrando os aminoácidos hidrofóbicos (em cima) e hidrofílicos (em baixo). Também se mostram os aminoácidos básicos (em cima) e ácidos (em baixo).

B. Visualização dos resíduos de aminoácidos que formam folhas beta (em cima) e os que partem as folhas beta (em baixo), conforme definido também de acordo com Chou ed Fasman (Adv. Enz. 47, 45-147 (1948)). C. Visualização das medições com propensão para hélices alfa e folhas beta (Chou e Fasman, ibid). As curvas acima de 1,00 mostram a propensão para uma estrutura de hélices alfa e folhas beta. A estrutura pode terminar em regiões de proteínas em que as curvas se situam abaixo de 1,00. D. Visualização dos resíduos que formam alfa (em cima) ou que partem alfa (em baixo). E. Visualização de porções da sequência de proteínas que se parecem com as sequências que se encontram normalmente na extremidade amino das estruturas alfa e beta (Chou e Fasman, ibid). F. Visualização de porções da sequência de proteínas que se parecem com as sequências que se encontram normalmente na extremidade carboxilo das estruturas alfa e beta (Chou e Fasman, ibid). G. Visualização de porções da sequência de proteínas que se encontram normalmente nas dobras (Chou e Fasman, ibid). H. Visualização do

momento hidrofóbico helicoidal (Eisenberg et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 81, 140-144 (1984)) em cada posição na sequência. I. Visualização da hidropatia média com base em Kyle e Doolittle (J. Mol. Biol. 157, 105-132 (1982)) e Goldman et al. (revisto tm Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 15, 321-353 (1986)).

Figura 4. Modelos de expressão de ARNm para o ADNc de OPG em tecidos humanos. Utilizaram-se sondas nas análises de "Northern blot" com uma inserção de ADNc de rato marcado com ^{32}P (A, dois painéis da esquerda), ou com a inserção de ADNc humano (B, painel da direita).

Figura 5. Criação de ratos transgénicos que expressam o ADNc de OPG em hepatócitos. Expressão de "Northern blot" de transgenes de HEOPG em fígado de rato.

Figure 6. Aumento da densidade óssea em OPG de ratos transgénicos. Painéis A-F. Ratos de controlo. G-J, Ratos que expressam OPG. Na necrópsia, todos os animais foram radiografados e prepararam-se fotografias. Em A-F, mostram-se as radiografias dos animais de controlo animais e a do transgénico onde não se verificou expressão (#28). Note-se que os ossos têm um córtex claramente definido e uma cavidade central da medula lucente. Pelo contrário, os animais da OPG (G-J) têm um córtex mal definido e um aumento da densidade na zona da medula.

Figura 7. Aumento da densidade trabecular em OPG de ratos transgénicos. A-D. Fotomicrografias representativas dos ossos de animais de controlo. Em A e B, mostram-se

imagens com baixa definição (4X, 10X) dos fémures (coloração tricrómica de Masson). As colorações com a fosfatase ácida resistente e tartrato (FART) demonstram osteoclastos (ver setas) tanto na cartilagem de reabsorção (C) como no osso trabécular (D). Note-se que a aparência lisa dos osteoclastos no osso trabecular. E-H. Fotomicrografias representativas dos ossos de animais que expressam OPG. Em E e F, mostram-se imagens com baixa definição (4X, 10X) dos fémures (coloração tricrómica de Masson). A região clara é a cartilagem lisa em crescimento, a área corada de azul e a área vermelha são medula. Note-se que ao contrário dos controlos, o osso trabecular não foi reabsorvido o que resulta na ausência da usual cavidade medular. Do mesmo modo, as trabéculas resultantes têm uma aparência muito variada com áreas azuis e claras. As áreas claras são partes remanescentes da cartilagem na placa de crescimento que nunca foi remodelada. Com base nas colorações de FART, estes animais têm osteoclastos (ver setas) na placa de crescimento (G), que pode ser reduzida em número. Contudo, as superfícies das trabéculas fora da placa de crescimento estão virtualmente isentas de osteoclastos (H), uma verificação que está em contraste directo com os animais de controlo (ver D).

Figura 8. Os animais que expressam HE-OPG não têm defeitos no desenvolvimento dos monócitos-macrófagos. Uma das causas da osteoporose em ratos é uma produção defeituosa de M-CSF devido a uma mutação pontual no gene de M-CSF. Isto resulta num marcado défice na circulação e de macrófagos a base de tecidos. O sangue periférico dos monócitos que contam elementos que expressam OPG, tal como se avaliou por análise de H1 E. Para afirmar a

presença de macrófagos nos tecidos realizou-se uma imuno-histoquímica utilizando anticorpos F480, que reconhecem um抗原 da superfície das células em macrófagos de murinos. A e C mostram fotomicrofotografias (4X) com uma baixa ampliação de baços de elementos normais e que sobre-expressam CR1. Note-se que ambos os animais têm numerosas células positivas F480. Os monócitos-macrófagos estavam também presentes na medula de animais normais (B) e daqueles que sobre-expressam HE-OPG (D) (40X).

Figura 9. Estrutura e sequência de clones de ADNc de OPG de ratos e de seres humanos. A, B. Sequências de proteínas e de ADNc de rato. C, D. Sequências de proteínas e de ADNc de seres humanos. Os péptidos de sinal previstos estão sublinhados e os sítios potenciais de glicosilação ligados a N estão indicados a negro. E, F Alinhamento da sequência e comparação das sequências de aminoácidos de OPG de ratos, murganhos e de seres humanos.

Figura 10. Comparação de sequência conservadas no domínio extracelular de R-1 de FNT e de seres humanos. PrettyPlot (Wisconsin GCG Package, Versão 8.1) de R-1 de FNT e o alinhamento de OPG descrito no exemplo. Linha do topo, sequências de R-1 de FNT humano codificando os domínios 1-4. Linha do fundo, sequências de OPG humano codificando os domínios 1-4. Os resíduos conservados estão evidenciados por caixas rectangulares.

Figura 11. Representação tridimensional de OPG humana. Vista lateral da visualização de Molescript da estrutura tri-dimensional prevista dos resíduos de OPG humana 25 a 163, (linha larga), co-cristalizada com FNT β (linha

fina). Como referência para orientação, as setas a negro ao longo da estrutura do polipéptido de OPG estão a apontar na direcção do terminal N para o terminal C. A localização das cadeias laterais dos resíduos individuais de cisteína estão inseridas ao longo da estrutura do polipéptido para ajudar a demonstrar os domínios separados ricos em cisteína. A molécula de FNT β está alinhada, tal como descrito por Banner et al. (1993).

Figura 12. Estrutura dos domínios de OPG ricos em cisteína. Alinhamento das sequências de aminoácidos de OPG humana (linha de topo SEQ ID NO: 136 e de rato (linha de fundo) evidenciando a prevista estrutura do domínio de OPG. O polipéptido está dividido em duas metades; a terminação N (A), e a terminação C (B). Prevê-se que a metade do terminal N contenha quatro domínios ricos em cisteína (marcada 1-4). As previstas ligações de sulfureto entre as cadeias estão indicadas por linhas cheias, marcadas por "SST", "SS2" ou "SS3". Prevê-se que a tirosina 28 e a histidina 75 (sublinhadas) formem uma interacção iónica. Os aminoácidos que se prevê que interajam com um ligando de OPG estão indicados por tracejado grosso acima do resíduo apropriado. Os resíduos de cisteína localizados na metade do terminal C da OPG estão indicados por caixas rectangulares.

Figura 13. Expressão e secreção das proteínas de fusão de OPG-Fc de comprimento completo e truncadas de rato. A. Mapa indicando os pontos de fusão com o domínio humano de Fc de IgG1 por meio das pontas das setas. B. Coloração prateada e gel de SDS-poliacrilamida de meio condicionado obtido de um FI.Fc (OPG de comprimento completo fundida com Fc na leucina 401) e vectores de expressão da

proteína de fusão de CT.Fc (OPG fundida com Fc na treonina 180 truncada no terminal de carboxi). Coluna 1, linha de células do vector de expressão parental de pCEP4; coluna 2, linha de células do vector FI.Fc; Coluna 3, linha de células do vector CT.Fc. C. "Western blot" de meio condicionado obtido a partir vectores de expressão das proteínas de fusão FI.Fc e CT.Fc sondados com o domínio Fc anti-humano de IgG1 (Pierce). Coluna 1, linha de células do vector de expressão parental de pCEP4; coluna 2, linha de células do vector FI.Fc; Coluna 3, linha de células do vector CT.Fc.

Figura 14. Expressão de OPG humana em *E. coli*. A. Construção de um vector de expressão bacteriano. O LORF do gene de OPG humana foi amplificado por RCP, depois juntou-se a um fragmento de ligante de oligonucleótido cujo filamento de topo é a SEQ ID NO: 137; o filamento do fundo é a SEQ ID NO: 127, e está ligado no ADN do vector do pAMG21. O vector resultante é capaz de expressar os resíduos de OPG 32-401 ligados a um resíduo de metionina de terminal N. B Análise por EGPA-SDS de bactérias induzidas e não induzidas comportadas as plasmídios pAMG21- OPG humana - 32-401. Coluna 1, padrões de PM; coluna 2, bactérias não induzidas; coluna 3, indução a 30 °C; coluna 4, indução a 37 °C; coluna 5, produto da lise de células completas a partir da indução a 37 °C; coluna 6, fracção solúvel do produto da lise de células completas; coluna 7, fracção insolúvel do produto da lise de células completas; coluna 8, corpos de inclusão purificados a partir do produto da lise de células completas.

Figura 15. Análise de OPG recombinante de murino produzida em células de OHC (ovário de hamster chinês) por meio de EGPA-SDS e de "western blotting". Aplicou-se uma quantidade igual de meio condicionado de OHC a cada coluna ilustrada e preparou-se por meio de tratamento quer com tampão de redução de amostras (coluna da esquerda), ou com tampão de não redução de amostras (coluna da direita). Depois da electroforese, transferiram-se as proteínas resolvidas para uma membrana de nylón, depois fez-se uma sondagem com anticorpos anti-OPG. As posições relativas das formas monoméricas de 55 kd e das formas diméricas de 100 kd estão indicadas pelas pontas das setas.

Figura 16. Análise por gravação de impulsos de OPG recombinante de murino produzida em células de OHC. As células de OHC foram marcadas por pulsação com ³⁵S-metionina/cisteína e depois foram gravados durante o tempo indicado. Prepararam-se as culturas marcadas por via metabólica tanto no meio condicionado como nas células e preparou-se para cada uma delas extractos em detergentes purificaram-se e depois faz-se a imunoprecipitação com anticorpos anti-OPG. Os produtos da imunoprecipitação foram resolvidos por EGPA-SDS, e expostos a um filme. Painéis de topo da esquerda e da direita; amostras analisadas em condições de não redução. Painéis do fundo da esquerda e da direita; Amostras analisadas em condições de redução. Painéis do topo e do fundo do lado esquerdo; Extractos de células. Painéis do topo e do fundo do lado direito; Extractos do meio condicionado. A mobilidade relativa das formas monoméricas de 55 kd e das formas diméricas de 100 kd de OPG estão indicadas pelas pontas das setas.

Figura 17. Expressão de OPG na linha de células CTLL-2. Preparou-se o meio condicionado isento de soro das células CTLL-2 e das células transfectadas de OPG [1-401] de OHC de murino, concentrou-se, depois analisou-se por EGPA-SDS não redutora e "western blotting". Coluna da esquerda; meio condicionado de CTLL-2. Coluna da direita; meio condicionado de OPG de OHC de murino. A mobilidade relativa das formas monoméricas de 55 kd e das formas diméricas de 100 kd de OPG estão indicadas pelas pontas das setas.

Figura 18. Detecção da expressão de OPG em amostras de soro e em extractos de fígado obtidos de ratos de controlo e de OPG de ratos transgénicos. Prepararam-se os ratos transgénicos tal como se descreveu no exemplo 4. Visualizou-se a expressão de OPG após a EGPA-SDS seguida de "Western blotting" utilizando anticorpos anti-OPG.

Figura 19. Efeitos da proteína de fusão de FC - OPG [22-401] humana na formação dos osteoclastos *in vitro*. Realizou-se o ensaio de formação dos osteoclastos tal como descrito no exemplo 11A na ausência (controlo) ou na presença das quantidades indicadas da fusão de OPG humana [22-401]-Fc. A formação de osteoclastos foi visualizada por coloração histoquímica para a fosfatase ácida resistente a tartaratos (FART). A. Adicionou-se OPG a 100 ng/ml. D. Adicionou-se OPG a 0,1 ng/ml. E. Adicionou-se OPG a 0,1 ng/ml. F. Adicionou-se OPG a 0,001 ng/ml. G. Controlo. Não se adicionou OPG.

Figura 20. Diminuição da actividade de FART na cultura de osteoclastos por meio do aumento das quantidades de OPG. Adicionou-se aos ensaios de formação de osteoclastos as

concentrações indicadas da proteína de fusão de OPG humana [22-401]-Fc e quantificou-se a actividade da FART tal como se descreveu no Exemplo 11A.

Figura 21. Efeito da OPG no estádio terminal da diferenciação dos osteoclastos. Adicionou-se a proteína de fusão de OPG humana [22-401]-Fc ao ensaio de formação de osteoclastos durante o estádio intermédio da maturação dos osteoclastos (dias 5-6; OPG-CTL) ou durante o estádio terminal da maturação dos osteoclastos (dias 7-15; CTL-OPG). Quantificou-se a actividade da e comparou-se com a actividade observada na ausência de OPG (CTL-CTL) na presença de toda a OPG (OPG-OPG).

Figura 22. Efeitos de IL-1 β , IL-1 α e OPG no cálcio ionizado no sangue de ratos. Monitorizaram-se os níveis de cálcio ionizado no sangue depois da injecção de IL-1 β isoladamente, IL-1 α isoladamente, IL-1 β mais OPG de murino [22-401]-Fc, IL-1 α mais OPG de murino [22-401]-Fc, e apenas OPG de murino [22-401]-Fc. Os ratos de controlo receberam apenas injecções de solução tamponada com fosfato. A experiência com IL-1 β está ilustrada em A; A experiência com IL-1 α está ilustrada em B.

Figura 23. Efeitos de OPG nos osteoclastos da calvaria em ratos de controlo e ratos tratados com IL1. Processos histológicos para analisar amostras de ossos da calvária estão descritos no exemplo 11B. As setas indicam os osteoclastos presentes nos ratos tratados no dia 2. Amostras da calvária de ratos que receberam diariamente quatro injecções de STF (A), uma injecção de IL-1 e três injecções de STF diariamente (B), uma injecção de STF e

três injecções de OPG diariamente (C), uma injecção de IL-1 e três injecções de OPG diariamente.

Figura 24. Análise radiográfica da acumulação óssea da cavidade medular de ratos normais. Injectaram-se os ratos subcutaneamente com solução salina (A) ou fusão de OPG de murino [22-401]-Fc (5mg/kg/d) durante 14 dias (B) e densidade óssea determinada como se descreveu no exemplo 11C.

Figura 25. Análise histomorfométrica da acumulação óssea na cavidade medular de ratos normais. As experiências de injecção e a histologia dos ossos realizaram-se conforme descrito no Exemplo 11 C.

Figura 26. Análise histomorfométrica da acumulação óssea na cavidade medular de ratos normais. Experiências de injecção e histologia dos ossos realizada como descrito no exemplo 11C. A. Injecção de solução salina B. Injecção da fusão de OPG de murino [22-401]-Fc.

Figura 27. Actividade da OPG administrada a ratos a que tinham sido retirados os ovários. Nesta experiência de duas semanas a tendência para uma reabsorção da densidade óssea parece ter sido bloqueada pela OPG ou outras terapias anti-reabsorção. As medições de DEXA foram feitas na mesma ocasião da ovariectomia e nas semanas 1 e 2 do tratamento. Os resultados estão expressos como a alteração da % em relação à densidade óssea inicial (média +/- DPM (desvio padrão da média)).

Figura 28. A densidade óssea na metáfise femoral, medida por processos histomorfométricos, tende a ser menor nos

ratos ovariectomizados (OVX) do que os animais operados de uma forma simulada (SHAM) 17 dias depois da ovarioectomia. Este efeito foi bloqueado pela OPG-Fc, com ratos a que se retirou o ovário e foram tratados com OPG-Fc (OVX+OPG) que tinham uma densidade óssea significativamente mais elevada dos que os ratos a que se retirou o ovário (OVX). (Média +/- DPM).

Descrição detalhada da invenção

Identificou-se um novo elemento da superfamília dos receptores dos factores de necrose do tumor R-FNT como um marcador de uma sequência expressa (EST) isolada de uma biblioteca de ADNc de intestino fetal de rato. As estruturas dos clones de ADNc de rato de comprimento completo e os clones correspondentes de murganho e humanos foram determinadas como descrito nos exemplos 1 e 6. De acordo com a presente invenção, o gene humano está ilustrado nas figuras 9C-9D (SEQ ID NO: 124). Para comparação, os genes de ratos e de murganhos estão ilustrados nas figuras 2B-2C e 9A-9B respectivamente. As três sequências exibiram uma forte semelhança com os domínios extra-celulares dos elementos da família dos R-FNT. Nenhum dos clones de ADNc de comprimento completo, isolado, codificou os domínios da transmembrana e citoplásmico como seria de esperar para os receptores ligados à membrana, sugerindo que estes ADNcs codificam proteínas segregadas solúveis em vez dos receptores da superfície das células. Uma porção do gene humano abarcando os nucleótidos 1200-1353, ilustrada na figura 9D foi depositada na base de dados do Genebank em 22 de Novembro de 1995 com o no. de acesso 17188769.

Determinou-se a distribuição do tecido do ARNm de rato e humano tal como se descreveu no exemplo 2. No rato, detectou-se na expressão do ARNm no rim, fígado, placenta e coração com a mais elevada expressão no rim. Também se detectou expressão no músculo do esqueleto e no pâncreas. Nos seres humanos, detectou-se a expressão nos mesmos tecidos em simultâneo com os nódulos linfáticos, timo, baço e apêndice.

O ADNc de rato foi expresso em ratos transgénicos (exemplo 3) utilizando o sistema de expressão do promotor ApoE específico do fígado. A análise de expressores mostrou um aumento marcado na densidade óssea, particularmente em ossos longos (fémures), vértebras e ossos planos (pélviz). A análise histológica das secções coradas dos ossos exibe uma osteoporose severa (ver exemplo 4) indicando um desequilíbrio marcado entre a formação e a reabsorção óssea que levou a uma acumulação marcada dos ossos e da cartilagem. Uma diminuição do número de osteoclastos trabeculares nos ossos dos animais que expressam OPG indica que uma porção significativa da actividade da proteína relacionada com o R-FNT pode ser prevenir a reabsorção óssea, um processo mediado pelos osteoclastos. Tendo em vista a actividade nos animais transgénicos que as expressam, as proteínas relacionadas com o R-FNT aqui descritas são designadas por OPGs.

Utilizando a sequência do ADNc de rato, isolaram-se os clones de ADNc de murganhos e de seres humanos (Exemplo 5). A expressão de OPG de murganho em 293 células e OPG Humana em *E. coli* está descrita nos exemplos 7 e 8. A OPG de murganho foi produzida como uma fusão de Fc que se purificou por cromatografia por afinidade da proteína A. Também se descreve no exemplo 7 a expressão de polipeptídos de OPG de comprimento completo e truncados de seres humanos e de

murganhos em OHC e 293 células quer como polipéptidos de fusão para a região Fc de IgG1 ou como polipéptidos não fundidos. A expressão de OPGs de comprimento completo e truncadas de seres humanos e de murganhos em E. coli quer como polipéptidos de fusão de Fc ou como polipéptidos não fundidos, está descrita no exemplo 8. A purificação de OPG bacteriana e de mamífero, produzida de forma recombinante está descrita no exemplo 10.

A actividade biológica da OPG foi determinada utilizando um ensaio de maturação de osteoclastos *in vitro*, um modelo *in vivo* de hipercalcémia induzida por interleucina-1 (IL-1), e estudos de injecção da densidade óssea em ratos normais (ver exemplo 11). As proteínas recombinantes de OPG que se seguiram, produzidas em OHC ou nas 293 células demonstraram actividade no ensaio de maturação de osteoclastos em E. coli. OPG de murino [22-185]-Fc, OPG de murino 122-194]-Fc, OPG de murino [22-401]Fc, OPG de murino [22-401], OPG humana [22-201]-Fc, OPG humana [22-401j-Fc. OPG de murino [22-180]-Fc produzida em células de OHC e OPG humana met[32-401] produzidas em E. coli não demonstraram actividade no ensaio *in vitro*.

A OPG de várias fontes foi produzida como um dímero e de alguma forma como um multímero. A OPG [22-401] de rato produzida em ratos transgénicos, a OPG de murino [22-401] e a OPG humana [22-401] produzida como um polipéptido recombinante em células de OHC, e a OPG expressa como um produto de ocorrência natural a partir de uma linha de células T citotóxicas eram predominantemente dímeros e trímeros quando analisadas em géis de SDS não redutores (ver exemplo 9). Os polipéptidos de OPG truncados com eliminações na região dos aminoácidos 186-401 (por exemplo, OPG [1-185] e OPG [1-194]) eram predominantemente monoméricas sugerindo que a região

186-401 pode estar envolvida na auto-associação dos polipéptidos de OPG. Contudo, a OPG humana met[32-401] produzida em E. coli era amplamente monomérica.

A OPG pode ser importante na regulação da reabsorção óssea. A proteína pode actuar como um receptor solúvel da família dos FNT e pode evitar a interacção receptor-ligando envolvida na via osteolítica. Um dos aspectos da regulação parece ser uma redução no número de osteoclastos.

Ácidos nucleicos

A memória descritiva indica ácidos nucleicos isolados que codificam um polipéptido com pelo menos uma das actividades biológicas de OPG. Tal como se descreve aqui, as actividades biológicas de OPG incluem, mas não se limitam a qualquer actividade que envolva o metabolismo dos ossos e, em particular, inclui o aumento da densidade óssea. Os ácidos nucleicos da presente memória descritiva seleccionam-se entre os seguintes:

- a) sequências de ácidos nucleicos como se mostra nas figuras 9C-9D (SEQ ID NO: 124) ou os seus filamentos complementares;
- b) os ácidos nucleicos que hibridam em condições severas com a região que codifica os polipéptidos nas figuras 2B-2C, 9A-9E e 9C-9D (SEQ ID NO: 124); e
- c) os ácidos nucleicos que hibridam em condições severas com os nucleótidos 148 a 337 inclusive como se mostra na figura 1A.
- d) as sequências de ácidos nucleicos que degeneraram das sequências em (a) e (b).

A memória descritiva indica ácidos nucleicos que codificam OPG de rato, de murganho e de seres humanos assim como sequências de ácidos nucleicos que hibridam com ela e que codificam um polipéptido que tenha pelo menos uma das actividades biológicas de OPG. Também tem por objecto ácidos nulceicos que hibridam com uma OPG EST de rato, englobando os nucleótidos 148-337 como se mostra na figura IA. As condições para a hibridação são geralmente de alta severidade tal como 5xSSC, formamida a 50 % formamida e 42°C descritas no exemplo 1 da memória descritiva. A severidade equivalente a estas condições pode ser facilmente obtida por ajustamento das concentrações do sal e do dissolvente orgânico e também da temperatura. Os ácidos nulceicos em (b) englobam sequências que codificam polipéptidos relacionados com OPG que não sofrem nenhuma hibridação detectável com outros elementos conhecidos da super-família dos receptores de FNT. Num enquadramento preferido, os ácidos nucleicos são como se mostra nas figuras 9C-9D (SEQ ID NO: 124).

A extensão da hibridação dos ácidos nucleicos da presente invenção pode ser variável dado que a hibridação pode ocorrer em parte ou em todas as regiões que codificam os polipéptidos tal como se mostra nas figuras 9C-9D (SEQ ID NO: 124), e pode também ocorrer em regiões adjacentes que não codificam. Por isso, os ácidos nucleicos de hibridação podem ser partes truncadas ou aumentadas das sequências mostradas nas figuras 9C-9D (SEQ ID NO: 124). Os ácidos nucleicos truncados ou aumentados estão englobados pela presente invenção desde que retenham uma ou mais das propriedades biológicas da OPG. Os ácidos nucleicos de hibridação podem também incluir regiões de não codificação adjacentes que 5' e/ou 3' em relação à região de codificação da OPG. As regiões de não codificação incluem regiões reguladoras envolvidas na

expressão da OPG, tal como sítios promotores, melhoradores, de iniciação translacional, sítios de terminação da transcrição e similares.

As condições de hibridação para ácidos nucleicos estão descritas em Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (1989).

O ADN que codifica a OPG de rato foi providenciado pelo plasmido pMO-B1.1 depositado na American Type Culture Collection, Rockville, MD em 27 de Dezembro de 1995 com o nº de acesso da ATCC 69970. O ADN que codifica a OPG de rato foi providenciado pela OPG de murino do plasmido pRcCMV depositado na American Type Culture Collection, Rockville, MD em 27 de Dezembro de 1995 com o nº de acesso da ATCC 69971. O ADN que codifica a OPG humana foi providenciado pela OPG humana do plasmido pRcCMV depositado na American Type Culture Collection, Rockville, MD em 27 de Dezembro de 1995 com o nº de acesso da ATCC 69969. Os ácidos nucleicos da descrição irão hibridar em condições severas com as inserções de ADN com os nos. De acesso da ATCC 69969, 69970, e 69971 e têm pelo menos uma das actividades biológicas da OPG.

A presente memória descriptiva também descreve derivados das sequências de ácidos nucleicos como se mostra nas figuras 2B, 9A e 9B. Tal como se utiliza aqui, os derivados incluem sequências de ácidos nucleicos que têm adições, substituições, inserções ou eliminações de um ou mais resíduos de tal modo que as sequências resultantes codificam polipéptidos que têm um ou mais resíduos de aminoácidos que tinham sido adicionados, eliminados, inseridos ou substituídos e os polipéptidos resultantes têm a actividade

da OPG. Os derivados de ácidos nucleicos podem ser de ocorrência natural, tal como por variação de combinações ou por polimorfismos ou podem ser construídos utilizando técnicas de mutagénese dirigidas ao sítio disponíveis para os especialistas na matéria. Um exemplo de uma variante de OPG de ocorrência natural é um ácido nucleico que codifica uma alteração de lis para asn no resíduo 3 dentro da sequência líder (ver exemplo 5). Antecipa-se que os derivados de ácidos nucleicos vão codificar alterações de aminoácidos nas regiões da molécula onde é menos provável que se perturbe a actividade biológica. Outros derivados incluem um ácido nucleico que codifica uma forma de OPG ligada à membrana com um domínio extracelular como se mostra nas figuras 9C-9D (SEQ ID NO: 124) em conjunto com domínios da transmembrana e citoplásmico.

Num enquadramento, os derivados de OPG incluem ácidos nucleicos que codificam formas truncadas de OPG com um ou mais aminoácidos eliminados do terminal carboxi. Os ácidos nucleicos que codificam OPG podem ter de 1 a 216 aminoácidos eliminados do terminal carboxi. Eventualmente, uma região Fc do anticorpo pode estender-se do novo terminal de carboxi para se obter um polipéptido activo sob o ponto de vista biológico da fusão de OPG-Fc. (ver exemplo 11). Em enquadramentos preferidos, os ácidos nucleicos codificam OPG com a sequência de aminoácidos dos resíduos 22-185, 22-189, 22-194 ou 22-201 (utilizando a numeração das figuras 9E-F) e eventualmente, codificando uma região Fc de IgG humana.

Também estão incluídos os ácidos nucleicos que codificam formas truncadas de OPG com um ou mais aminoácidos eliminados do terminal amino. As formas truncadas incluem aquelas a que faltam os 21 aminoácidos que constituem a sequência.

Adicionalmente, a presente invenção tem por objecto ácidos nucleicos que codificam OPG com 1 a 10 aminoácidos eliminados do terminal amino maduro (no resíduo 22) e, eventualmente, tendo de 1 a 216 aminoácidos eliminados do terminal carboxi (no resíduo 401). Eventualmente, os ácidos nucleicos podem codificar um resíduo de metionina no terminal amino. Exemplos desses polipéptidos truncados de OPG estão descritos no exemplo 8.

Exemplos dos ácidos nucleicos da presente invenção incluem ADNc, ADN genómico, ADN sintético e ARN. O ADNc obtém-se de bibliotecas preparadas a partir de ARNm isolado de vários tecidos que expressam OPG. Nos seres humanos, as fontes de tecido para a OPG incluem rim, fígado, placenta e coração. O ADN genómico que codifica a OPG obtém-se de bibliotecas genómicas que estão comercialmente disponíveis a partir de uma variedade de espécies. O ADN sintético obtém-se por síntese química de fragmentos sobrepostos de oligonucleótidos seguida da junção dos fragmentos para reconstituir parte ou toda a região de codificação e com as sequências (ver patente U.S. No. 4.695.623 que descreve as sínteses químicas dos genes do interferão). Obtém-se ARN mais facilmente por meio de vectores de expressão procarióticos que dirigem um elevado nível de síntese de ARNm, tal como vectores que utilizam promotores de T7 e polimerase de ARN.

As sequências de ácidos nucleicos da presente invenção são utilizadas para a detecção de sequências de OPG em amostras biológicas de modo a determinar quais as células e tecidos que expressam ARNm de OPG. As sequências podem também ser utilizadas para rastrear ADNc e bibliotecas genómicas para as sequências relacionadas com a OPG. Esse rastreio está dentro das capacidades de um especialista na matéria

utilizando condições de hibridação apropriadas para detectar sequências homólogas. Os ácidos nucleicos são também úteis para a indução da expressão de níveis de expressão OPG por terapia anti-paralela ou por terapia de genes. Os ácidos nucleicos são também úteis para o desenvolvimento de animais transgénicos que podem ser utilizados para a produção do polipéptido e para o estudo da actividade biológica (ver exemplo 3).

Vectores e células hospedeiras

Também têm por objecto os vectores de expressão que contêm as sequências de ácidos nucleicos que codificam OPG, as células hospedeiras transformadas com os referidos vectores e os processos para a produção de OPG. Pode-se encontrar uma revisão da expressão das proteínas recombinantes em Methods of Enzymology v. 185, Goeddel, D.V. ed. Academic Press (1990).

As células hospedeiras para a produção de OPG incluem células hospedeiras procarióticas, tal como células hospedeiras de E. coli, levedura, plantas, insectos e mamíferos. As estirpes de E. coli tais como HB101 ou JM101 são apropriadas para a expressão. As células hospedeiras preferidas de mamíferos incluem COS, OHCD-, 293, CV-1, 3T3, células de rim de hamster bebé (RHB) e outras. As células hospedeiras de mamíferos são preferidas quando após as modificações translacionais, no caso de glicosilação e tratamento de polipéptido, são importantes para a actividade da OPG. A expressão em mamíferos permite a produção de polipéptidos segregados que podem ser recuperados do meio de crescimento.

Os vectores para a expressão de OPG contêm no mínimo as sequências necessárias para a propagação do vector e para a expressão da inserção clonada. Estas sequências incluem uma origem de replicação, um marcador de selecção, um promotor, um sítio de ligação do ribossoma, sequências de melhoramento, sítios de combinação de ARN e sítios de terminação da transcrição. Os vectores apropriados para a expressão nas células hospedeiras mencionadas antes estão facilmente disponíveis e os ácidos nucleicos da presente invenção são inseridos nos vectores utilizando técnicas normalizadas de ADN recombinante. Os vectores para a expressão específica de tecidos de OPG estão também incluídos. Esses vectores incluem promotores que funcionam especificamente no fígado, no rim ou outros órgãos para a produção em ratos e vectores virais para a expressão de OPG em células humanas atingidas.

Utilizando um sistema apropriado de vector hospedeiro, a OPG é produzida de forma recombinante fazendo uma cultura de uma célula hospedeira transformada com um vector de expressão contendo sequências de ácidos nucleicos que codificam OPG em condições tais como as que a OPG é produzida e isolando o produto da expressão. A OPG é produzida no sobrenadante de células de mamíferos transfetadas ou em corpos de inclusão de células hospedeiras bacterianas transformadas. A OPG assim produzida pode ser purificada por processos conhecidos pelos especialistas na matéria como se descreve a seguir. A expressão de OPG em sistemas de hospedeiros bacterianos ou de mamíferos está descrita nos exemplos 7 e 8. Os vectores de expressão para os hospedeiros mamíferos são exemplificados por plasmídios tais como pDSR α descrito no pedido de patente PCT No. 90/14363. Os vectores de expressão para as células hospedeiras bacterianas são exemplificados pelos plasmídios pAMG2t e pAMG22-His descritos no Exemplo 8. O plasmido pAMG21

foi depositado na American Type Culture Collection, Rockville, MD em 24 de Julho de 1996 com o no. de acesso 98113. O plasmido pAMG22-His foi depositado na American Type Culture Collection, Rockville, MD em 2 de Julho de 1996 com o no. de acesso 98112. Antecipa-se que os plasmidos específicos e as células hospedeiras descritas têm fins ilustrativos e que outros plasmidos e células hospedeiras disponíveis também podem ser utilizados para expressar os polipéptidos.

A presente invenção também tem por objecto a expressão de OPG a partir de ácidos nucleicos endógenos por meio de eventos de recombinação in vivo ou ex vivo para permitir a indução de OPG a partir do cromossoma do hospedeiro. A expressão de OPG por meio da introdução de sequências reguladoras exógenas (por exemplo, promotoras ou melhoradoras) capazes de dirigir a produção de OPG a partir de regiões endógenas que codificam OPG está também englobada. A estimulação de sequências reguladoras endógenas capazes de dirigir a produção de OPG por exemplo por exposição a factores de melhoramento transcripcional) também está dentro do âmbito da presente invenção.

Polipéptidos

A presente invenção tem por objecto OPG, um novo elemento da super-família dos receptores de FNT, com uma actividade associada ao metabolismo dos ossos e em particular com actividades de inibição da reabsorção óssea, aumentando assim a densidade óssea. OPG refere-se a um polipéptido com uma sequência de aminoácidos de OPG humana ou um seu derivado com pelo menos uma das actividades biológicas da OPG. A sequência de aminoácidos de OPG humana está ilustrada nas figuras 9C-9D (SEQ ID NO: 125). Um derivado de OPG refere-se

a um polipéptido que têm uma adição, uma eliminação, uma inserção ou uma substituição de um ou mais aminoácidos tal como um polipéptido resultante que tenha pelo menos uma das actividades biológicas de OPG. As actividades biológicas de OPG incluem, mas não se limitam a actividades que envolvem o metabolismo dos ossos. Preferencialmente, os polipéptidos terão a sequência líder de terminal amino com 21 aminoácidos eliminados.

Os polipéptidos de OPG englobados pela presente descrição incluem fusão de Fc - [1-401] humano, [22-180] de rato, [22-401] humano, [22-180] humano, [1-180], [22-180] humano e met-32-401 humano. A numeração dos aminoácidos está ilustrada na SEQ ID NO: 125 (humana). Também estão englobados os derivados de polipéptidos com eliminações ou truncagens do terminal carboxi de parte ou de todos os resíduos de aminoácidos 180-401 de OPG; uma ou mais alterações dos aminoácidos nos resíduos 180-401; eliminação de parte ou de todo o domínio de OPG rico em cisteína, em particular eliminação do domínio distal (terminal carboxi) rico em cisteína; e uma ou mais alterações dos aminoácidos num domínio rico em cisteína, em particular no (domínio distal (terminal carboxi) rico em cisteína. Num enquadramento, a OPG tem de 1 até cerca de 216 aminoácidos eliminados do terminal carboxi. Noutro enquadramento, a OPG tem de 1 até cerca de 10 aminoácidos eliminados do terminal amino maduro (em que o terminal amino maduro está no resíduo 22) e, eventualmente, tem de 1 até cerca de 216 aminoácidos eliminados do terminal carboxi.

Ainda outros polipéptidos de OPG englobados pela presente descrição incluem os seguintes: fusão de [22-180] humano - Fc, fusão de [22-201] humano - Fc, fusão de [22-401]

humano -Fc, fusão de [22-185] de rato - Fc, fusão de [22-194] de rato -Fc. Estes polipéptidos são produzidos em células hospedeiras de mamíferos, tais como células de OHC ou células 293. Outros polipéptidos de OPG englobados pela presente invenção que são expressos em células procarióticas de hospedeiros incluem os seguintes: met [22-401] humano, fusão de Fc - met [22-401] humano (Fc região está fundida no terminal amino da sequência de codificação de OPG de comprimento completo tal como descrito no exemplo 8), fusão de met [22-401] humano -Fc (Fc região fundida com a sequência de OPG de comprimento completo), fusão de Fc - met [22-401] de rato, fusão de met [22-401] de rato - Fc, met [27-401] humano, met [22-185] humano, met [22-189] humano, met [22-194] humano, met [22-194] humano (P2SA), met [22-194] humano (P26A), met [27-185] humano, met [27-189] humano, met [27-194] humano, met-arg-gli-ser-(his)₆ [22-401] humano, met-lis [22-401] humano, met-(lis)₃- [22-401] humano, met [22-401] humano -Fc (P25A), met [22-401] humano (P25A), met [22-401] humano (P26A), met[22-401] humano (P26D), met [22-401] de rato, met[27-401] de rato, met[32-401] de rato, met[27-180] de rato, met[22-189] de rato, met[22-194] de rato, met[27-189] de rato, met[27-194] de rato, met-lis[22-401] de rato, HEK[22-401] de rato (A45T), met-lis-(his)₇ [22-401] de rato, met-lis [22-401]-(his)₇ de rato e met[27-401] de rato (P33E, G36S, A45P). Deve entender-se que os polipéptidos de OPG anteriores produzidos em células hospedeiras procarióticas têm um resíduo de metionina de terminal amino, se esse resíduo não estiver indicado. Em exemplos específicos, a fusão de OPG-Fc foi produzida utilizando uma região de 227 aminoácidos de IgG1- γ1 humana com a sequência ilustrada em Ellison et al. (Nuc. Acids Res. 10, 4071-4079 (1982)). Contudo, também se podem utilizar variantes da região Fc da IgG humana.

A análise da actividade biológica das truncagens de OPG de terminal carboxi fundidas com a região humana de Fc de IgG1 indica uma porção de OPG de cerca de 164 aminoácidos que é necessária para a actividade. Esta região engloba os aminoácidos 22-185, preferencialmente os da figura 9C-9D (SEQ ID NO: 125) e compreende quatro domínios ricos em cisteína característicos dos domínios ricos em cisteína dos domínios extracelulares dos R-FNT.

Utilizando a homologia entre OPG e os domínios extracelulares de ligação do ligando dos elementos da família dos receptores de FNT, gerou-se um modelo tri-dimensional de OPG com base na estrutura cristalina conhecida do domínio extracelular de R-1 de FNT (ver exemplo 6). Este modelo foi utilizado para identificar os resíduos dentro da OPG que podem ser importantes para a actividade biológica. Os resíduos de cisteína que estão envolvidos na manutenção da estrutura dos quatro domínios ricos em cisteína foram identificados. Identificaram-se no modelo as ligações de disulfureto que se seguem: Domínio 1: cis41 a cis54, cis44 a cis62, tir23 e his66 podem actuar para estabilizar a estrutura deste domínio; Domínio 2: cis65 a cis80, cis83 a cis98, cis87 a cis105; Domínio 3: cis107 a cis118, cis124 a cis142; Domínio 4: cis145 a cis160, cis166 a cis185. Também se identificaram resíduos que estavam muito próximos do FNT β como se mostra nas figuras 11 e 12A-12B. Neste modelo, assume-se que OPG se liga a um ligando correspondente; utilizou-se FNT β como um ligando modelo para estimular a interacção de OPG com o seu ligando. Com base neste modelo, os resíduos que se seguem na OPG podem ser importantes para a ligação do ligando: glu34, lis43, pro66 a gln91 (em particular, pro66, his68, tir69, tir70, tre71, asp72, ser73,

his76, ser77, asp78, glu79, leu81, tir82, pro85, val86, lis88, glu90 e gln91), glu153 e ser155.

Alterações nestes resíduos de aminoácidos quer simplesmente ou em combinação podem alterar a actividade biológica da OPG. Por exemplo, alterações em resíduos específicos de cisteína podem alterar a estrutura dos domínios individuais ricos em cisteína, em que as alterações nos resíduos importantes para a ligação do ligando podem afectar as interacções físicas da OPG com o ligando. Os modelos estruturais podem ajudar a identificar análogos que tenham as propriedades mais desejáveis, tal como uma actividade biológica aumentada, maior estabilidade, ou uma grande facilidade de formulação.

A presente invenção também tem por objecto dímeros de OPG compreendendo monómeros de OPG. O OPG parece ser activo como um multímero (por exemplo, dímero, trímero de um número maior de monómeros). Os multímeros de OPG podem compreender monómeros com a sequência de aminoácidos de OPG suficiente para promover a formação de multímeros ou podem compreender monómeros com sequências heterólogas tal como uma região Fc de anticorpo. A análise das eliminações do terminal carboxi de OPG sugere que pelo menos uma porção da região 186-401 está envolvida na associação dos polipéptidos de OPG. Também se descreve a substituição de parte ou de toda a região dos aminoácidos 186-401 da OPG por uma sequência de aminoácidos capaz de se auto-associar. Alternativamente, os polipéptidos de OPG ou os seus derivados podem ser modificados para formar dímeros ou multímeros por meio de mutagénese dirigida ao sítio para criar resíduos de cisteína desemparelhados para a formação de ligações de di-sulfureto inter-cadeias, por meio de reticulação fotoquímica, tal como exposição a luz

ultravioleta, ou por reticulação química por meio de moléculas ligantes bifuncionais tal como polietileno-glicol bifuncional e similares.

As modificações dos polipéptidos de OPG incluem modificações post-translacionais (por exemplo, cadeias de hidratos de carbono ligadas a N ou ligadas a O, tratando as extremidades do terminal N ou do terminal C), ligação das partes químicas à estrutura dos aminoácidos, modificações químicas de cadeias de hidratos de carbono ligadas a N ou ligadas a O e adição de um resíduo de metionina de terminal N como resultado da expressão das células hospedeiras procarióticas. Os polipéptidos podem também ser modificados com um marcador detectável, tal como um marcador enzimático, fluorescente, isotópico ou de afinidade para permitir a detecção e o isolamento da proteína.

Outras modificações de OPG incluem proteínas quiméricas em que a OPG se funde com uma sequência heteróloga de aminoácidos. A sequência heteróloga pode ser qualquer sequência que permita que a proteína de fusão resultante retenha a actividade da OPG. As sequências heterólogas incluem, por exemplo, fusões de imunoglobulina, tal como fusões de Fc, que podem ajudar na purificação da proteína. Uma sequência heteróloga que promove a associação de monómeros de OPG para formar dímeros, trímeros e outras formas multiméricas superiores é preferível.

Os polipéptidos da presente invenção são isolados e purificados a partir de outros polipéptidos presentes nos tecidos, linhas de células e células hospedeiras transformadas que expressam OPG, ou purificadas a partir de componentes em culturas de células contendo a proteína

segregada. Num enquadramento, o polipéptido está isento de qualquer associação com outras proteínas de mamíferos, tal como o produto de expressão de uma célula hospedeira bacteriana.

A presente invenção também tem por objecto derivados quimicamente modificados derivados de OPG que podem proporcionar vantagens adicionais tal como o aumento da estabilidade e o tempo de circulação do polipéptido ou uma diminuição da imunogeneicidade (ver patente U.S. No. 4.179.337). As partes químicas para a derivação seleccionam-se entre polímeros solúveis em água tal como copolímeros de poli-etileno-glicol, etileno-glicol/propileno-glicol, carboximetilcelulose, dextrano, álcool de polivinilo e similares. Os polipéptidos podem ser modificados em posições aleatórias dentro da molécula ou em posições pré-determinadas dentro da molécula e pode incluir uma, duas, três ou mais partes químicas ligadas.

O polímero pode ter qualquer peso molecular, e pode ser ramificada ou não ramificada. Para o polietileno-glicol, o peso molecular preferido está entre cerca de 1kDa e cerca de 100kDa (o termo "cerca de" indicando que nas preparações de polietileno-glicol, algumas moléculas pesarão mais, outras menos, do que o peso molecular estabelecido) para facilidade de manuseamento e produção. Podem utilizar-se outras dimensões, consoante o perfil terapêutico desejado (por exemplo, a duração da libertação sustentada desejada, os efeitos, se houver, na actividade biológica, a facilidade de manuseamento, o grau ou a falta de antigenicidade e outros efeitos conhecidos do polietileno-glicol na proteína terapêutica ou nos seus análogos).

As moléculas de polietileno-glicol (ou outros polímeros solúveis em água) devem estar ligadas à proteína tendo em conta os efeitos nos domínios funcional e antigénico da proteína. Há um certo número de processos de ligação disponíveis para os especialistas na matéria, por exemplo, EP 0 401 384 aqui incorporada como referência (acoplamento de PEG a G-CSF), ver também Malik et al., Exp. Hematol. 20: 1028-1035 (1992) (relatando o tratamento com polietileno-glicol de GM-CSF utilizando cloreto de tresilo). Por exemplo, o polietileno-glicol pode estar ligado covalentemente através de resíduos de aminoácidos por via de um grupo reactivo, tal como, um grupo amino ou carboxilo livre. Grupos reactivos são aqueles a que pode estar ligada uma molécula de polietileno-glicol. Os resíduos de aminoácidos com um grupo amino livre podem incluir resíduos de lisina e os resíduos de aminoácidos de terminal N; os que têm um grupo carboxilo livre podem incluir resíduos de ácido aspártico, resíduos de ácido glutâmico e o resíduo de aminoácido de terminal C. Os grupos sulfidrilo podem também ser utilizados como um grupo reactivo para a ligação das moléculas de polietileno-glicol. Preferido para fins terapêuticos é um grupo amino, tal como a ligação na terminação N do grupo lisina.

Pode-se desejar especificamente proteínas modificadas quimicamente no terminal N. Utilizando polietileno-glicol como uma ilustração das composições da presente invenção, pode-se seleccionar uma variedade de moléculas polietileno-glicol (pelo peso molecular, ramificação, etc.), a proporção entre as moléculas de polietileno-glicol e as moléculas de proteína (ou de péptido) na mistura reacional, o tipo de reacção com o polietileno-glicol a ser realizada, e o processo de obtenção da proteína seleccionada tratada com polietileno-glicol no terminal N. O processo de obtenção da

preparação tratada com polietileno-glicol na terminação N (isto é, separando esta parte das outras partes mono-tratadas com polietileno-glicol, se necessário) pode ser por purificação do material tratado com polietileno-glicol na terminação N a partir de uma população de moléculas de proteína tratadas com polietileno-glicol. A modificação química selectiva, no terminal N pode ser conseguida por alquilação redutora que explora a reactividade diferencial de diferentes tipos de grupos de aminas primárias (lisina versus o terminal N) disponíveis para a derivação de uma proteína em particular. Nas condições de reacção apropriadas, consegue-se uma derivação selectiva substancial da proteína na terminação N com um polímero contendo um grupo carbonilo.

Os dímeros sintéticos de OPG podem também ser preparados por vários processos de reticulação. Os monómeros de OPG podem estar e ligados quimicamente de uma maneira qualquer desde que retenha ou aumente a actividade biológica de OPG. Pode-se utilizar uma variedade de reticuladores químicos consoante as propriedades do dímero de proteína que se pretende, por exemplo, os reticuladores podem ser curtos e relativamente rígidos ou mais longos e mais flexíveis, podem ser biologicamente reversíveis e podem providenciar uma imunogeneicidade reduzida ou um semi-período de vida farmacocinética mais longo.

Num exemplo, as moléculas de OPG estão ligadas através da terminação amino por meio de uma síntese em duas etapas (ver exemplo 12). Numa primeira etapa, a OPG é modificada quimicamente na terminação amino para introduzir um tiol protegido que, depois da purificação, é desprotegido e utilizado como um ponto de ligação para a conjugação específica do sítio através de uma variedade de reticuladores

com uma segunda molécula de OPG. As reticulações do terminal amino incluem, mas não se limitam uma ligação de disulfureto, ligações de tioéter utilizando reticuladores alifáticos bifuncionais de cadeia curta, e ligações de tioéter com reticuladores polietileno-glicol bifuncionais, de comprimento variável ("halteres" de PEG). Também englobada pela síntese do haltere de PEG dos dímeros de OPG está um sub-produto dessa síntese, designado por um "mono-haltere". Um mono-haltere de OPG consiste num monómero acoplado a um PEG bifuncional linear com um terminal de polímero livre. Alternativamente, a OPG pode estar reticulada directamente através de uma variedade de técnicas de reticulação homobifuncionais específicas da amina que incluem reagentes tais como: dianidrido de dietilenotriaminapenta-acético (DTPA), p-benzoquinona (pBQ) ou suberato de bis(sulfo-succinimidilo) (BS³) assim como outros conhecidos na técnica. É também possível tiolar directamente a OPG com reagentes tais como iminotiolano na presença de uma variedade de reticuladores bifuncionais, específicos de tiol, tal como bismaleimida de PEG e consegue-se a dimerização e/ou os halteres num processo de uma só etapa. Também se inclui um processo para a purificação de OPG a partir de fontes naturais e de células hospedeiras transformadas. O processo de purificação pode utilizar uma ou mais etapas normalizadas de purificação de proteínas numa ordem apropriada para se obter a proteína purificada. As etapas de cromatografia podem incluir permuta iônica, filtração em gel, interacção hidrofóbica, fase inversa, "focagem isoeléctrica", cromatografia de afinidade utilizando um anticorpo anti-OPG ou um complexo de afinidade de biotina-estreptavidina e similares.

Anticorpos

Também estão englobados na presente descrição os anticorpos que se ligam especificamente à OPG. Os antigénios para a geração de anticorpos podem ser polipéptidos ou péptidos de comprimento completo abarcando uma porção da sequência de OPG. Os procedimentos imunológicos para a geração de anticorpos policlonais ou monoclonais reactivos com OPG são conhecidos dos especialistas na matéria (ver, por exemplo, Harlow e Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, "Cold Spring Harbor Laboratory (1989), Cold Spring Harbor, Massachusetts). Os anticorpos assim produzidos são caracterizados pela especificidade da ligação e pelo reconhecimento do epítopo utilizando ensaios normalizados com imuno-absorventes ligados a enzimas. Os anticorpos também incluem anticorpos quiméricos com regiões de domínios variáveis e constantes derivadas de diferentes espécies. Num enquadramento, os anticorpos quiméricos são anticorpos humanizados com domínios variáveis de murino e domínios constantes de seres humanos. Também estão englobadas as regiões de determinação complementaridade enxertadas numa estrutura humana (os chamados anticorpos enxertados em RDC). Os anticorpos quiméricos e enxertados nas RDC são produzidos por processos de recombinação conhecidos dos especialistas na matéria. Também estão englobados os anticorpos humanos produzidos em ratos.

Os anticorpos anti-OPG da presente descrição podem ser utilizados como um reagente de afinidade para purificar a OPG a partir de amostras biológicas (ver Exemplo 10). Num processo, o anticorpo é imobilizado em Sepharose activada com CnBr e utiliza-se uma coluna de um conjugado de anticorpo-Sepharose para eliminar a OPG das amostras líquidas. Também

se utilizam os anticorpos como reagentes de diagnóstico para detectar e quantificar a OPG em amostras biológicas, pelos processos descritos a seguir.

Composições farmacêuticas

A presente invenção também tem por objecto composições farmacêuticas compreendendo uma quantidade efectiva sob o ponto de vista terapêutico do polipéptido da presente invenção em conjunto com um diluente, veículo, solubilizante e/ou adjuvante aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico. A frase "quantidade efectiva sob o ponto de vista terapêutico" significa uma quantidade que providencia um efeito terapêutico para uma condição especificada e para uma via de administração. A composição pode estar numa forma líquida ou liofilizada e compreende um diluente (Tris, tampões de acetato ou de fosfato) com vários valores de pH e de força iônica, solubilizantes tais como Tween ou Polisorbato, veículos tais como albumina de soro humano ou gelatina, conservantes tais como timerosal ou álcool de benzilo e antioxidantes tais como ácido ascórbico ou metabisulfureto de sódio. Também engloba as composições que compreendem OPG modificada com polímeros solúveis em água para aumentar a solubilidade ou a estabilidade. As composições também podem compreender a incorporação de OPG em lipossomas, microemulsões, micelas ou vesículas para a libertação controlada ao longo de um prolongado período de tempo. Especificamente, as composições de OPG podem compreender a incorporação em matrizes de polímeros tais como hidrogéis, silicones, polietilenos, copolímeros de etileno - acetato de vinilo ou polímeros biodegradáveis. Exemplos de hidrogéis incluem poli-hidroxialquilmetacrilatos (p-HEMA), poliacrilamida, polimetacrilamida, polivinilpirrolidona,

álcool de polivinilo e vários complexos de polielectrólitos. Exemplos de polímeros biodegradáveis incluem ácido poliláctico (APL), ácido poliglicólico (APG), copolímeros de APL e APG, poliamidas e copolímeros e poliamidas e poliésteres. Outros controlos que levam à libertação das formulações incluem microcápsulas, microesferas, complexos macromoleculares e pérolas poliméricas que podem ser administradas por injecção.

A selecção de uma composição particular dependerá de um certo número de factores, incluindo o estado clínico que está a ser tratado, a via de administração e os parâmetros farmacocinéticos desejados. Uma análise mais aprofundada do componente apropriado para as composições farmacêuticas encontra-se em Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed. A.R. Gennaro, ed. Mack, Easton, PA (1980).

As composições da presente invenção podem ser administradas por injecção quer subcutânea, intravenosa ou intramuscular, ou por administração oral, nasal, pulmonar ou rectal. A via de administração eventualmente escolhida dependerá de um certo número de factores e pode ser acertada por um especialista na matéria.

A presente invenção também tem por objecto composições farmacêuticas compreendendo uma quantidade efectiva sob o ponto de vista terapêutico dos ácidos nucleicos da presente invenção em conjunto com um adjuvante aceitável sob o ponto de vista farmacêutico. As composições de ácidos nucleicos serão apropriadas para a libertação de parte ou toda a região que codifica OPG para as células e tecidos como parte de um regime terapêutico anti-paralelo ou de genes.

Processos de tratamento

O tecido ósseo dá suporte ao corpo e consiste em uma matriz mineral (em grande parte de cálcio e fosforosa), de proteínas de colagénio e de não colagénio e células. Três tipos de células encontradas nos ossos, osteócitos, osteoblastos e osteoclastos, estão envolvidos no processo dinâmico por meio do qual o osso se forma e é reabsorvido continuamente. Os osteoblastos promovem a formação óssea enquanto os osteoclastos estão associados à reabsorção. A reabsorção ou a dissolução da matriz óssea e mineral é um processo rápido e eficiente comparado com a formação óssea e pode libertar grande quantidade de mineral dos ossos. Os osteoclastos estão envolvidos na regulação da remodelação normal do tecido do esqueleto e da reabsorção induzida por hormonas. Por exemplo, a reabsorção é estimulada pela secreção da hormona da paratiróide em resposta às concentrações decrescentes de iões de cálcio em extracelulares. Pelo contrário, a inibição da reabsorção é a principal função da calcitonina. Além disso, os metabolitos de vitamina D alteram a capacidade de resposta do osso à hormona da paratiróide e calcitonina.

Depois da maturidade do esqueleto, a quantidade de osso no esqueleto reflecte o equilíbrio (ou desequilíbrio) da formação óssea e da reabsorção óssea. O pico da massa óssea ocorre depois da maturidade do esqueleto e antes da quarta década. Entre a quarta e a quintas décadas o equilíbrio desloca-se e a reabsorção do osso predomina. A diminuição inevitável da massa óssea com o avançar dos anos começa mais cedo nas mulheres do que nos homens e acelera claramente após a menopausa nalgumas mulheres (principalmente nas caucasianas e nas descendentes de asiáticos).

A osteopénia é um estado clínico relacionado geralmente com qualquer diminuição da massa óssea para níveis abaixo dos normais. Esse estado clínico pode aparecer a partir de uma diminuição da taxa de síntese óssea ou de um aumento da taxa de destruição óssea ou de ambos. A forma mais comum de osteopénia é uma osteoporose primária, também referida como osteoporose post-menopausa e senil. Esta forma de osteoporose é uma consequência da perda óssea universal com a idade e normalmente é o resultado de um aumento da reabsorção óssea com uma taxa normal de formação dos ossos. Cerca de 25 a 30 por cento de todas as mulheres brancas nos Estados Unidos desenvolvem osteoporose sintomática. Existe uma relação directa entre a osteoporose e a incidência de fracturas da bacia, do fémur, cervical e inter-trocântica em mulheres de 45 anos ou mais velhas. Os homens mais velhos desenvolvem osteoporose sintomática entre as idades de 50 e 70, mas a doença afecta principalmente as mulheres.

A causa da osteoporose post-menopausa e da osteoporose senil é desconhecida. Já se identificaram vários factores que podem contribuir para este estado clínico. Incluem a alteração dos níveis de hormonas que acompanham o envelhecimento e o consumo inadequado de cálcio atribuído a uma diminuição da administração de cálcio e outros minerais no intestino. Os tratamentos têm incluído normalmente uma terapia hormonal ou suplementos dietéticos numa tentativa para retardar o processo. Contudo, até à data, não existe um tratamento eficaz para a perda óssea.

A presente invenção tem por objecto a utilização de polipéptidos da presente invenção no fabrico de um medicamento para o tratamento de um distúrbio dos ossos utilizando uma quantidade de OPG efectiva sob o ponto de

vista terapêutico. O distúrbio dos ossos pode ser qualquer distúrbio caracterizado por uma perda líquida de massa óssea (osteopénia ou osteólise). Em geral, o tratamento com OPG é antecipado quando necessário para suprimir a taxa de reabsorção óssea. Assim, o tratamento pode ser feito para reduzir a taxa de reabsorção óssea quando a taxa de reabsorção está acima do normal ou para reduzir a reabsorção óssea para níveis normais de modo a compensar os níveis normais baixos de formação óssea.

Os estados clínicos que são tratados com OPG incluem os seguintes:

Osteoporose, tal como osteoporose primária, osteoporose endócrina (hipertiroidismo, hiperparatiroidismo, síndrome de Cushing, e acromegália), formas hereditárias e congénitas de osteoporose (osteogénesis imperfeita, homocistinúria, síndrome de Menkes, e síndrome de Riley-Day) e osteoporose devida à imobilização das extremidades.

Doença de Paget dos ossos (osteite deformante) em adultos e jovens.

Osteomielite ou uma lesão infecciosa dos ossos, que levam à perda óssea.

Hipercalemia que resulta de tumores sólidos (mama, pulmão e rim) e malignidades hematológicas (mieloma múltiplo, linfoma e leucemia), hipercalemia idiopática e hipercalemia associada com hipertiroidismo e distúrbios da função renal.

Osteopénia no seguimento de uma cirurgia, induzida pela administração de esteróides, e associada com distúrbios do

intestino delgado ou do intestino grosso e com doenças hepáticas e renais crónicas.

Osteonecrose ou morte das células dos ossos, associada a feridas traumáticas ou necrose não traumática associada com a doença de Gaucher, anemia das células falciformes, lúpus eritematoso sistémico e outros estados clínicos.

Perda óssea devida a artrite reumatóide.

Perda óssea periodontal.

Metástases osteolítica

Entenda-se que a OPG pode ser utilizada isoladamente ou em conjunto com outros factores para o tratamento de distúrbios ósseos. Num enquadramento, a osteoprotegerina é utilizada em conjunto com uma quantidade efectiva sob o ponto de vista terapêutico de um factor que estimula a formação óssea. Esses factores incluem mas não se limitam a factores morfogénicos dos ossos designados desde BMP-1 até BMP-12, factor β de transformação do crescimento (FTC- β) e elementos da família dos FTC- β , inibidores de interleucina-1, inibidores de FNT α , hormona da para-tiróide e os seus análogos, proteínas relacionadas com a para-tiróide e os seus análogos, prostaglandinas da série E, bisfosfonatos (tais como alendronato e outros) e minerais que melhoram os ossos tais como flúor e cálcio. Os exemplos que se seguem são dados para ilustrar melhor a presente invenção, mas não foram construídos como limitativos do seu âmbito. Quaisquer exemplos que não caiam dentro do âmbito das reivindicações são dados apenas com fins comparativos.

EXEMPLO 1:

Identificação e isolamento do ADNc de OPG de rato

Os materiais e processos para a clonagem do ADNc e as análises estão descritos em Maniatis et al, ibid. As reacções em cadeia de polimerase (RCP) foram realizadas utilizando um amplificador de ADN 9600 da Perkin-Elmer utilizando uma mistura de reacção de RCP (Boehringer-Mannheim) e as concentrações dos iniciadores especificadas pelo fabricante. No geral, fez-se a desnaturação de 25-50 µl da mistura reacional a 94 °C, seguido de 20-40 ciclos de 94 °C durante 5 segundos, 50-60 °C durante 5 Segundos e a 72 °C durante 3-5 minutos. Depois trataram-se as misturas reacionais a 72 °C durante 3-5 minutos. Depois analisaram-se as misturas reacções por electroforese em gel conforme descrito em Maniatis et al., ibid.

Construiu-se uma biblioteca de ADNc utilizando ARNm isolado a partir de intestino embrionário d20 para a análise EST (Adams et al. Science 252, 1651-1656; (1991). Dissecaram-se embriões de rato e todo o intestino delgado e o intestino grosso desenvolvidos foram retirados e lavaram-se com STF. Purificou-se o ARN total da célula por extracção ácida com tiocianato de guanidínio - fenol- clorofórmio (Chomczynski e Sacchi Anal. Biochem. 162, 156-159, (1987)). Obteve-se a fracção de ARNm de poli (A+) a partir da preparação de ARN total por adsorção a Dynabeads Oligo (dT)25 (Dynal Corp) e eluição a partir delas utilizando os procedimentos recomendados pelo fabricante. Preparou-se uma biblioteca aleatória de AND iniciado utilizando o sistema de plasmidos Superscript (Gibco BRL, Gaithersburg, Md). O iniciador aleatório de ADNc contendo um sítio interno de restrição Not

I foi utilizado para iniciar a síntese do primeiro filamento e tinha a seguinte sequência:

5'-AAAGGAAGGAAAAAGCGGCCGCTACANNNNNNNT-3' (SEQ ID NO: 1)

Not I

Para a síntese do primeiro filamento juntaram-se três misturas reaccionais separadas que continham 2,5 µg de ARN de poli(A) e 120 ng, 360 ng ou 1.080 ng de um iniciador aleatório. Depois da síntese do segundo filamento, extraíram-se os produtos da reacção separadamente com uma mistura de fenol:corofórmio:álcool de isoamilo (relação de 25:24:1), e depois precipitou no seio de etanol. Combinaram-se os produtos de ADNc de filamento duplo (fd) das três reacções e ligaram-se ao adaptador do oligonucleótido que se segue:

5'-TCGACCCACCGCGTCCG-3' (SEQ ID NO: 2)

3'-GGGTGCGCAGGCp-5' (SEQ ID NO: 3)

Depois da ligação o ADNc foi digerido até a digestão estar completa, com Not I, extraiu-se com fenol:cloro-fórmio:álcool de isoamilo (a 25 : 24 :1) e precipitou em etanol. O ADNc novamente suspenso foi então fraccionado por dimensão por meio de filtração em gel utilizando colunas pré-fabricadas providas de um sistema de plasmidos Superscript (Gibco BRL, Gaithersburg, Md) de acordo com as recomendações do fabricante. Juntaram-se as duas fracções contendo os produtos de ADNc maiores, precipitaram em etanol e depois ligou-se direccionalmente ao ADN do vector pMOB digerido em Not I e Sal I (Strathmann et al, 1991). Introduziu-se o ADNc ligado na *E. coli* de ElectroMAX DH10B apropriada (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) por electroporação. Para a análise automatizada das sequências colocaram-se em placas de agar com 20cm x 20cm aproximadamente 10.000 transformantes contendo ampicilina complementado com meio nutritivo de LB.

As colónias que apareceram foram recolhidas e colocadas em placas microtituladoras de 96 cavidades contendo 200 ml de caldo L, glicerol a 7,5 % e 50 µg/ml de ampicilina. As culturas cresceram durante a noite a 37 °C, fez-se um conjunto duplicado de placas microtituladoras utilizando um instrumento de replicação de 96 alfinetes esterilizados, depois armazenaram-se os dois conjuntos a -80 °C para uma posterior análise. Para a clonagem do ADNc de comprimento completo colocou-se em placa aproximadamente um milhão de transformantes em placas de ampicilina bacteriana de 96 cavidades contendo cerca de 10.000 clones cada. O ADN do plasmido de cada conjunto foi isolado separadamente utilizando o kit Qiagen Plasmid Maxi (Qiagen Corp., Alemanha) e foram dispostos em placas microtituladoras de 96 cavidades para as análises por RCP.

Para sequenciar clones aleatórios de ADNc de intestino de rato fetal, descongelaram-se concentrados de glicerol e diluíram-se pequenas alíquotas diluídas 1:25 em água destilada. Adicionou-se aproximadamente 3,0 ul de culturas bacterianas diluídas à mistura reaccional da RCP (Boehringer-Mannheim) contendo os seguintes oligonucleótidos:

5) TGTAAAACGACGGCCAGT-3' (SEQ ID NO: 4)
5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3' (SEQ ID NO: 5)

As misturas reaccionais foram incubadas num amplificador de ADN (Perkin-Elmer 9600) com as seguintes condições do ciclo: 94 °C durante 2 minutos; 30 ciclos de 94 °C durante 5 segundos, 50 °C durante 5 segundos, e 72 °C durante 3 minutos; 72 °C durante 4 minutos. Depois da incubação no amplificador de ADN, diluíram-se as misturas reaccionais com 2,0 mL de água. Os fragmentos de ADN amplificados foram

depois purificados utilizando colunas Centricon (Princeton Separations) utilizando os processos recomendados pelo fabricante. Os produtos da reacção de RCP foram sequenciados num sequenciador automático de ADN 373A da Applied Biosystems utilizando reacções do terminador corante Taq dos iniciadores de T3 (oligonucleótido 353-23; 5'-CAATTAACCCTCACTAAAGG-3') (SEQ ID NO: 6) (Applied Biosystems) utilizando os processos recomendados pelo fabricante.

A sequência do nucleótidos 5' resultante, obtida de clones de ADNc seleccionados aleatoriamente, foi traduzida e depois comparada com a base de dados existente de sequências conhecidas de proteínas utilizando uma versão modificada do programa FASTA (Pearson et al. Meth. Enzymol. 183, (1990As sequências traduzidas foram também analisadas quanto à presença de um elemento específico, rico em cisteína encontrado em todos os elementos conhecidos da super-família dos receptores do factor de necrose do tumor (R-FNT) (Smith et al. Cell 76, 959-962 (1994)), utilizando o processo do perfil de sequências de Gribskov et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4355-4359 (1987)), tal como foi modificado por Luethy et al. (Protein Science 3, 139-146; (1994).

Utilizando o FASTA e os dados pesquisados do Profile identificou-se um EST, IRF-1 (Intestino de Rato Fetal-1), como um possível novo elemento da superfamília dos R-FNT. IRF-1 continha uma inserção de aproximadamente 600 pb com um LORF de cerca de 150 aminoácidos. O emparelhamento mais parecido na base de dados foi o do R FNT do tipo II (R2-FNT). A região comparada mostrou uma homologia de ~43 % entre R2-FNT e IRF-1 ao longo deste LORF de 150 aa. A análise do perfil utilizando a primeira e a segunda repetições, ricas em cisteína. da super-família dos R-FNT originou uma pontuação

de Z de -8, indicando que o gene de IRF-1 possivelmente codifica um novo elemento da família. Para deduzir a estrutura do produto IRF-1, rastreou-se a biblioteca de ADNc de intestino de rato fetal quanto a clones de comprimento completo. Os oligonucleótidos que se seguem derivaram da sequência original de IRT-1:

5'-GCATTATGACCCAGAAACCGGAC-3' (SEQ ID NO: 7)

5'-AGGTAGGCCCTTCACATTC-3' (SEQ ID NO: 8)

Utilizaram-se estes iniciadores nas reacções RCP para rastrear 96 conjuntos de ADN de plasmídos, contendo cada conjunto ADN de plasmído de 10.000 clones de ADNc independentes. Aproximadamente 1 ug do ADN do conjunto de plasmídos foram amplificados numa mistura reacional de RCP (Boehringer-Mannheim) utilizando um amplificador de ADN de 96 cavidades da Perkin-Elmer com as seguintes condições em cada ciclo: 2 min a 94 °C, 1 ciclo; 15 sec a 94 °C, depois 45 sec a 65 °C, 30 ciclos; 7 min a 65 °C, 1 ciclo. Os produtos da reacção RCP foram analisados por electroforese em gel. 13 dos 96 conjuntos de ADN de plasmídos deram origem a produtos de ADN amplificados com a massa molecular relativa esperada.

Utilizou-se o ADN de um conjunto positivo para transformar a *E. coli* DH10B de ElectroMAX apropriada (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) como se descreveu antes. Colocou-se em placa aproximadamente 40.000 transformantes em filtros esterilizados de nitrocelulose (BA-85, Schleicher and Schuell), e depois rastrearam-se por hibridação das colónias utilizando uma versão marcada de ^{32}P -dCTP do produto de RCP obtido antes. Os filtros foram pré-hibridados em 5X SSC, formamida desionizada a 50 %, 5X solução de Denhardt, SDS a 0,5 %, e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADN de esperma de salmão desnaturado

durante 2-4 horas a 42 °C. Os filtros foram então hibridados em 5X SSC, formamida desionizada a 50 %, 2X solução de Denhardt, SDS a 0,1 %, e 100 µg/ml de ADN de esperma de salmão desnaturado e -5 ng/ml de uma sonda marcada durante 18 horas a 42°C. Lavaram-se então os filtros em 2X SSC durante 10 min à TA, 1X SSC durante 10 min a 55 °C, e finalmente em 0,5X SSC durante 10-15 min a 55 °C. Os clones de hibridação foram detectados no seguimento da autoradiografia, e depois voltaram para as placas em filtros de nitrocelulose para um rastreio secundário. Após rastreio secundário, isolou-se um clone de plasmido (pB1.1), depois amplificou-se em meio de caldo L contendo 100 ug/ml de ampicilina e obteve-se o ADN do plasmido. Sequenciaram-se ambos os filamentos da inserção pB1.1 de 2,4 kb.

Utilizou-se a sequência da inserção pB1.1 para uma pesquisa com o FASTA da base de dados pública para detectar quaisquer correspondências ou semelhanças entre as sequências. Não se encontraram quaisquer emparelhamentos com qualquer gene conhecido ou EST, embora houvesse uma semelhança de aproximadamente 45 % com os genes de R2-FNT de ratos e de seres humanos. Encontra-se um codão de iniciação aos 124 pb da sequência de nucleótidos, seguido de um LORF codificando 401 resíduos de aa que termina no pb 1327. Prevê-se que o 401 como um produto de resíduo tenha um péptido de sinal hidrofóbico de aproximadamente 31 resíduos na sua terminação N, e 4 sítios potenciais da glicosilação ligada a N. Não se identificou nenhuma membrana hidrofóbica abarcando a sequência utilizando o programa PepPlot (pacote GCG da Wisconsin, versão 8.1). Utilizou-se então 401 deduzida como sequência para pesquisar a base de dados de proteínas. Novamente não existiam emparelhamentos, embora parecesse haver uma forte semelhança com muitos elementos da super-

família dos R-FNT, sendo o mais notável o R2-FNT humano e de rato. Preparou-se um alinhamento da sequência desta nova proteína com elementos conhecidos da super-família dos R-FNT, utilizando o programa Pileup que foi depois modificado pelo PrettyPlot (Wisconsin (pacote GCG da Wisconsin, versão 8.1)). Este alinhamento mostra uma clara homologia entre o produto do gene de IRF-1 e todos os outros elementos da família dos R-FNT. Os mapas das regiões homólogas do domínio extracelular dos elementos da família de R-FNT e que corresponde às três ou quatro repetições ricas em cisteína encontradas no domínio de ligação do ligando destas proteínas. Isto sugere que o gene de IRF-1 codificou um elemento da família de R-FNT. Dado que não se detectou nenhuma transmembrana englobando a região os requerentes previram que isto pode ser um receptor segregado, semelhantes aos receptores solúveis derivados de R-FNT (Kohno et al. Proc. Natl. Acad. Sol. EUA 87, 8331-8335; (1990). Devido à actividade biológica aparente do gene de IRF-1 (*vide infra*), o produto foi designado por osteoprotegerina (OPG).

EXEMPLO 2

Modelos de expressão do ARNm de OPG em tecidos

Sondaram-se por "northern blots" (Clonetech) múltiplos tecidos humanos com o produto de RCP IRF-1 marcado com ^{32}P -dCTP para detectar a dimensão do transcripto humano e para determinar modelos de expressão. As análises por "Northern blots" foram pré-hibridadas em 5X SSPE, formamida a 50 %, 5X solução de Denhardt, SDS a 0,5 %, e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADN de esperma de salmão desnaturado durante 2-4 hr a 42 °C. As manchas foram então hibridadas em 5X SSPE, formamida a 50 %, 2X solução de Denhardt, SDS a 0,1 %, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADN de

esperma de salmão desnaturado, e 5 ng/ml de uma sonda marcada durante 18-24 hr a 42 °C. Lavaram-se então as análises de manchas em 2X SSC durante 10 min à TA, 1X SSC durante 10 min a 50 °C, depois em 0,5X SSC durante 10-15 min.

Utilizando uma sonda derivada de gene de rato, detecta-se uma espécie predominante de ARNm com uma massa molecular relativa de cerca de 2,4 kb em vários tecidos, incluindo o rim, o fígado, a placenta e o coração. Detectaram-se os níveis mais altos no rim. Detectaram-se espécies grandes de ARNm de Mr 4,5 de 7,5 kb nos músculos do esqueleto e no pâncreas. No tecido fetal humano, verificou-se que o rim expressa níveis relativamente elevados do ARNm de 2,4 kb. Utilizando uma sonda humana (*vide infra*), detecta-se apenas transcritos de 2,4 kb nos mesmos tecidos. Além disso, detectaram-se níveis relativamente elevados do transcrito de 2,4 kb nos nódulos linfáticos, timo, baço e apêndice. A dimensão do transcrito detectado no gene de osteoprotegerina tanto do rato como de seres é quase idêntica em comprimento à inserção de IRF-1 de pB1.1 de rato, sugerindo que se trata de um clone de ADNc de comprimento completo.

EXEMPLO 3:

Libertação sistémica de OPG em ratos transgénicos

Utilizou-se pB1.1 do clone de OPG de rato como matriz para a amplificação por RCP da região de codificação por sub-clonagem num vector de expressão específico do fígado ApoE (Simonet et al. J. Clin. Invest. 94, 1310-1319 (1994), e pedido de patente norte-americana PCT No. US 94/11675 e a série norte-americana de co-propriedade No. 08/221.767. Utilizaram-se os iniciadores de oligonucleótidos 5' e 3' que se seguem para a amplificação por RCP, respectivamente:

5'-GACTAGTCCCACAATGAACAAGTGGCTGTG-3' (SEQ ID NO: 9)

5'-ATAAGAATGCCGCCGCTAAACTATGAAACAGCCCAGTGACCATTC-3' (SEQ ID NO: 10)

A mistura reaccional da RCP (Boehringer-Mannheim) foi tratada como se segue: 94 °C durante 1 minuto; 1 ciclo; 94 °C durante 20 segundos, 62°C durante 30 segundos, e 74°C durante 1 minuto; 25 ciclos. No seguimento da amplificação, purificaram-se as amostras em colunas de RCP da Qiagen RCP que foram diferidas durante a noite com as enzimas de restrição SpeI e NotI. Extraíram-se os produtos digeridos e precipitaram e foram sub-clonados no vector de expressão do promotor ApoE. Antes da microinjecção do clone resultante, sequenciou-se HE-OPG, para assegurar que não tinha mutações. Purificou-se o plasmido de HE-OPG através de dois ciclos de centrifugação com um gradiente de densidade de CsCl. O ADN do plasmido purificado foi digerido com XhoI e Ase I e a inserção do transgene de 3,6 kb foi purificado por electroforese em gel. O fragmento purificado foi diluído para stock de uma solução de injecção de 1 µg/ml em Tris 5 mM, a pH 7,4, EDTA 0.2 mM. Injectaram-se embriões de células únicas a partir de ratos recém-nascidos BDF1 x BDF1 tal como descrito (Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4338 (1985)), excepto no facto de as agulhas da injecção terem sido biseladas e siliconizadas antes de terem sido utilizadas. Fez-se uma cultura dos embriões durante a noite num incubador com CO₂ e transferiram-se 15 a 20 embriões de 2 células para os ovidutos de fêmeas de ratos CD1 pseudo-grávidas.

No seguimento da gravidez de termo obtiveram-se 49 crias a partir da implantação dos embriões micro-injectados.

Rastreou-se a descendência por amplificação por RCP do transgene integrado em amostras de ADN genómico. A região-alvo para a amplificação foi uma região de 369 pb do intrão humano Apo E que estava incluído no vector de expressão. Os oligonucleótidos utilizados para a amplificação por RCP foram:

5'- GCC TCT AGA AAG AGC TGG GAG-3' (SEQ ID NO: 11)

5'-CGC CGT GTT CCA TTT ATG AGC-3' (SEQ ID NO: 12)

As condições para a RCP foram: 94 °C durante 2 minuto; 1 ciclo; 94 °C durante 1 min, 63°C durante 20 segundos, e 72°C durante 30 seg, Dos 49 descendentes originais, 9 foram identificados como fundadores transgénicos positivos para RCP.

Às 8-10 semanas de idade, cinco fundadores transgénicos (2, 11, 16, 17, e 28) e cinco controlos (1, 12, 15, 18, e 30) foram sacrificados para necrópsia e análise patológica. Isolou-se o fígado dos 4 fundadores remanescentes por hepatectomia parcial. Para a hepatectomia parcial, os ratos foram anestesiados e retirou-se cirurgicamente um lobo do fígado. Isolou-se o ARN celular total a partir dos fígados de todos os fundadores transgénicos e 5 controlos negativos da ninhada conforme descrito (McDonald et al. Meth. Enzymol. 152, 219 (1987)). A análise de "Northern blot" foi realizada nestas amostras para avaliar o nível de expressão transgénica. Aproximadamente 10ug de ARN total do fígado de cada animal foram resolvidos por géis de desnaturação por electroforese (Ogden et al. Meth. Enzymol 152, 61 (1987)), e depois transferiram-se para uma membrana de nylon HYBOND-N (Amersham), e sondaram-se com ADN da inserção de pB1.1 marcada com ³²P dCTP. Realizou-se a hibridação durante a

noite a 42 °C em formamida a 50 %, 5 x SSPE, SDS a 0,5 %, 5 x solução de Denhardt, 100 pg/ml de AND de esperma se salmão desnaturado e 2-4x 10⁶ cpm de sonda marcada/ml de tampão de hibridação. No seguimento da hibridação, as amostras foram lavadas duas vezes em 2 x SSC, SDS a 0,1 % à temperatura ambiente durante 5 min cada, e depois duas vezes em 0,1 x SSC, SDS a 0,1 % a 55 °C durante 5-10 min cada. A expressão dos transgenes nos fundadores e na ninhada de controlo foi determinada no seguimento da autoradiografia.

Os dados da análise "northern blot" indicam que 7 dos fundadores transgénicos expressam níveis detectáveis do ARNm do transgene (animal #'s 2, 11, 16, 17, 22, 33 e 45). Os ratos de controlo negativos e um dos fundadores (#28) não expressaram ARNm relacionado com o transgene. Dado que é previsível que OPG seja uma proteína segregada, a sobre-expressão do ARNm deve ser um substituto para o nível do produto do gene libertado sistemicamente. Dos ratos de RCP e dos ratos positivos para "northern blot", os animais 2, 17 e 22 expressaram os níveis mais elevados do ARNm de transgene, e podem mostrar efeitos biológicos mais extensos nas células e tecidos hospedeiros.

EXEMPLO 4

Actividade biológica de OPG

Cinco dos ratos transgénicos (os animais 2, 11, 16, 17 e 28) e 5 ratos da ninhada de controlo (os animais 1, 12, 15, 18, e 30) foram sacrificados para a necrópsia e as análises patológicas utilizando os seguintes procedimentos: Antes da eutanásia, todos os animais tinham os seus números de identificação verificados, depois foram pesados, anestesiados

e sangrados. O sangue foi guardado tanto sob a forma de soro como de sangue completo para a realização de um painel completo da química do soro e da hematologia. Realizou-se a radiografia imediatamente após a anestesia terminal por inalação letal de CO₂, e antes da dissecação total. No seguimento disto, os tecidos foram removidos e fixaram-se em Zn-formalina tamponada a 10 % para se fazer o exame histológico. Os tecidos recolhidos incluíram o fígado, o baço, o pâncreas, o estômago, o duodeno, o ílio, o cólon, o rim, os órgãos reprodutores, a pele e as glândulas mamárias, os ossos, o cérebro, o coração, os pulmões, o timo, a traqueia, o esófago, a tiróide, o jejuno, o cego, o recto, as glândulas supra-renais, a bexiga, e o músculo do esqueleto. Antes da fixação determinaram-se os pesos totais dos órgãos para o fígado, o estômago, o rim, as supra-renais, o baço, e o timo. Depois da fixação trataram-se os tecidos com blocos de parafina e obtiveram-se secções de 3 µm. Descalcificou-se o tecido dos ossos utilizando uma solução de ácido fórmico, e coraram-se todas as secções com hematoxilina e eosina. Além disso, a coloração com reticulina de Gomori e tricromo de Masson realizaram-se em certos tecidos. Realizou-se a histoquímica das enzimas para determinar a expressão da fosfatase ácida resistente a tartrato (FART), uma enzima altamente expressa pelos osteoclastos, as células de reabsorção óssea multinucleadas da linha dos monócitos-macrófagos. Realizou-se também a imuno-histoquímica para os抗ígenios da superfície dos monócitos-macrófagos BrdU e F480 para detectar as células de replicação e as células da linha dos monócitos-macrófagos, respectivamente. Para detectar a expressão do抗ígenio de superfície F480, desparafinaram-se secções de 4 µm embebidas em parafina, fixadas em formalina e hidrataram-se em água desionizada. Trataram-se as secções com peróxido de hidrogénio a 3 %, bloquearam-se com blocos de

proteína (Lipshaw, Pittsburgh, PA), e incubou-se em F480\ anti-murganho, monoclonal de rato (Harlan, Indianapolis, IN). Este anticorpo foi detectado por imunoglobulinas anti-rato de coelho, biotinilada estreptavidina conjugada com peroxidase (BioGenex San Ramon, CA) com DAB como cromagénio (BioTek, Santa Barbara, CA). As secções foram contra-coradas com hematoxilina.

Depois da grande dissecção e da observação dos tecidos viscerais, não se encontraram anomalias nos animais que expressam transgenes ou as ninhadas de controlo. A análise do peso dos órgãos indica que a dimensão do baço aumentou aproximadamente 38 % em ratos transgénicos relativamente aos animais de controlo. Houve um ligeiro alargamento da dimensão das plaquetas e um aumento das células não coradas em circulação nos animais que expressam transgenes. Houve uma diminuição marginal nos níveis de plaquetas nos animais que expressam transgenes. Além disso, o ácido úrico sérico, o azoto da ureia e os níveis de alcalinofosfatase tendem todos a baixar nos animais que expressam transgenes. Verificou-se que os animais que expressam transgenes têm uma radio-densidade aumentada do esqueleto, incluindo os ossos longos (fémures), vértebras, e ossos planos (pélviz). A dimensão relativa dos fémures nos animais que expressam transgenes não era diferente da dos ratos de controlo.

A análise histológica das secções coradas do osso dos animais que expressam OPG mostram uma osteoporose severa com a presença de remanescentes de cartilagem da substância esponjosa primária vista dentro da trabécula óssea na diáfise do fémur. Não se identificou um córtex claramente definido nas secções do fémur. Em animais normais, a diáfise central está cheia com medula óssea. As secções das vértebras também

mostram alterações osteopetróticas que implicam que as alterações esqueléticas induzidas pela OPG sejam sistémicas. A medula óssea residual mostrou predominantemente elementos mielóides. Os megacariócitos estavam presentes. As colorações de reticulina não mostraram evidências da deposição de reticulina. A imuno-histoquímica para F480, o antigénio da superfície da célula expresso pelas células de derivação de monócitos-macrófagos em murganhos, (SEQ ID NO: 4) mostraram a presença de células positivas de F480 nos espaços da medula. Focalmente podiam ver-se células positivas de F480 achatadas, directamente adjacentes das superfícies dos ossos trabeculares.

As células do mesênquima que revestem internamente as trabéculas ósseas estavam achatadas e pareciam inactivas. Com base nas colorações de H&E e de FART, só raramente se encontraram osteoclastos nas superfícies das trabéculas ósseas nos animais que expressam OPG. Pelo contrário, encontraram-se osteoclastos e/ou condroclastos na região da cartilagem de reabsorção da placa de crescimento, mas o seu número pode ser reduzido quando comparado com os controlos. Também estavam presentes osteoclastos na superfície cortical da metáfise onde a modelação da actividade é normalmente robusta. A diferença predominante entre os expressores e os controlos foi a diminuição profunda dos osteoclastos trabeculares, tanto nas vértebras como nos fémures. A extensão da acumulação óssea está directamente correlacionada com o nível de ARNn do transgene da OPG detectado por "northern blotting" do ARN total do fígado.

Os baços dos que expressam OPG têm uma quantidade acrescida de polpa vermelha com a expansão devida ao aumento da hematopoiese. Todas as estirpes hematopoiéticas estão

representadas. As células positivas de F480 estavam presentes tanto no caldo de controlo como nos que expressam OPG na polpa vermelha. Dois elementos que expressam (2 e 17) tinham focos de hematopoiese extramedular dentro do fígado e isto é provavelmente devido à medula osteopetrótica.

Não houve anomalias observáveis no timo, nódulos linfáticos, tracto gastrointestinal, tracto pancreato-hepatobiliar, tracto respiratório, sistema reprodutor, sistema genito-urinário, pele, sistema nervoso, coração e aorta, mama, músculo do esqueleto e gordura.

EXEMPLO 5

Isolamento do ADNc de OPG de murganho e de seres humanos

Isolou-se um clone de ADNc correspondente à extremidade 5' do ARNm de OPG de murganho a partir de uma biblioteca de ADNc de rim de murganho (Clontech) por amplificação por RCP. Os oligonucleótidos derivaram da sequência de ADNc de OPG de rato e estão ilustrados a seguir:

5'-ATCAAAGGCAGGGCATACTTCCTG-3' (SEQ ID NO: 13)

5'-GTTGCACTCCTGTTCACGGTCTG-3' (SEQ ID NO: 14)

5'-GAAGACACCTTGAAGGGCCTGATG-3' (SEQ ID NO: 15)

5'-TAACTTTACAGAAGAGCATCAGC-3' (SEQ ID NO: 16)

5'-AGCGCGGCCGCATGAACAAAGTGGCTGTGCTGCG-3' (SEQ ID NO: 17)

5'-AGCTCTAGAGAACAGCCCAGTGACCATTCC-3' (SEQ ID NO: 18)

Os produtos de ADNc de comprimento parcial ou completo, obtidos neste processo, foram sequenciados. O produto de

comprimento completo foi digerido com Not I e Xba I, depois foi clonado direcionalmente no vector do plasmídeo pRcCMV (Invitrogen). O plasmídeo resultante foi designado por pRcCMV-Mu-OPG. A sequência de nucleótidos do produto clonado foi comparada com a sequência de ADNc de OPG de rato. Na região de 1300 pb englobando o LORF de OPG, as sequências de ADN de rato e de murganho são aproximadamente 88 % idênticas. A sequência de ADNc de murganho continha um LORF de 401 aa, que foi comparada com a sequência da proteína OPG de rato e verificou-se que era ~94 % idêntica sem intervalos. Isto indica que a sequência de ADNc de murganho isolada codifica a proteína OPG de murino e que a sequência e a estrutura tinham sido altamente conservadas ao longo da evolução. A sequência da proteína OPG de murganho contém um péptido de sinal putativamente idêntico no seu terminal N e os 4 sítios potenciais de glicosilação ligada a N estão conservados.

O ADNc parcial de OPG humana foi clonado a partir de uma biblioteca de ADNc de rim humano utilizando os seguintes oligonucleótidos específicos de rato:

5'-GTG AAG CTG TGC AAG AAC CTG ATG-3' (SEQ ID NO: 19)

5'-ATC AAA GGC AGG GCA TAC TTC CTG-3' (SEQ ID NO: 20)

Este produto de RCP foi sequenciado e utilizado para produzir iniciadores para amplificar a extremidade 3' do ADNc humano utilizando um clone gnómico de OPG em lambda como matriz:

5'-TCCGTAAGAACAGCCCCAGTGACC-3' (SEQ ID NO: 29)

5'-CAGATCCTGAAGCTGCTCAGTTG-3' (SEQ ID NO: 21)

O produto de RCP amplificado foi sequenciado em conjunto com a sequência de extremidade 5', foi utilizado para produzir iniciadores específicos de 5' e 3' humanas úteis para amplificar as sequências completas de codificação de ADNc de OPG humana:

5'-AGCGCGGCCGCGGGGACCACAATGAACAAAGTTG-3' (SEQ ID NO: 22)

5'-AGCTCTAGAATTGTGAGGAAACAGCTGAATGGC-3' (SEQ ID NO: 23)

O produto de RCP humano de comprimento completo foi sequenciado, depois clonado direccional mente no vector de plasmido pRcCMV (Invitrogen) utilizando Not I e Xba I. O plasmido resultante foi designado por OPG humana de pRcCMV. A sequência de nucleótidos do produto clonado foi compara com as sequências de ADNc de OPG de rato e de murganho. Na região de 1300 pb que englobam a LORF de OPG, as sequências de ADNc de rato e de murganho são aproximadamente 78-88 % idênticas ao ADNc de OPG humana. As sequências de ADNc de OPG humana também continham um LORF de 401 aa, e foi comparada com as sequências de proteína de rato e de murganho. A proteína de OPG humana prevista é, aproximadamente, 85 % idêntica e ~90 % às proteínas de rato e de murganho, respectivamente. O alinhamento das sequências das proteínas de rato, murganho e humanas mostram que elas foram altamente conservadas durante a evolução. É previsível que a proteína humana tenha um péptido de sinal de terminal N, e 5 sítios potenciais de glicosilação ligada a N, 4 dos quais estão conservados entre as proteínas OPG de rato e murganho.

O ADN e a prevista sequência de aminoácidos da OPG de murganho estão ilustrados na figura 9A e na 9B (SEQ ID NO: 122). O ADN e a prevista sequência de aminoácidos da OPG humana estão ilustrados na figura 9C e na 9D (SEQ ID NO: 124)

Uma comparação das sequências de aminoácidos de OPG de rato, murganho e de seres humanos está ilustrada na figura 9E e na 9F.

O isolamento de mais clones de ADNc de OPG humana revelou a presença de uma alteração das bases G a C na posição 103 da sequência de ADN ilustrada na figura 9C. Esta alteração do nucleótido resulta na substituição de uma asparagina por uma lisina na posição 3 da sequência de aminoácidos ilustrada na figura 9C. A parte remanescente da sequência nos clones que tiveram esta alteração era idêntica à das figuras 9C e 9D.

EXEMPLO 6

Construção de modelos da estrutura tridimensional de OPG

A porção do terminal amino da OPG tem homologia com a porção extracelular de todos os elementos conhecidos da super-família dos R-FNT (figura 1C). O elemento mais notável nesta região de genes relacionados com R-FNT é uma sequência de repetições ricas em cisteína de ~40 aminoácidos, que se dobra em estruturas distintas (Banner et al. Cell 73, 431-445; (1993)). Este elemento normalmente aparece em quatro repetições em tandem (intervalo 3-6) (ver figura 1 C), e é conhecido por estar envolvido na ligação do ligando (Beutler e van Huffel Science 264, 667-663 (1994)). Cada repetição normalmente contém seis resíduos de cisteína espaçados, que estão envolvidos na formação de três ligações de di-sulfureto intradomínio, designadas por SS1, SS2, e SS3 (Banner et al., ibid). Nalguns receptores, tais como R2-FNT, CD30 e CD40, alguns dos domínios que se repetem contêm apenas duas ligações di-sulfureto inter-cadeias (SS1 e SS3).

A sequência da proteína humana OPG foi alinhada com um perfil do domínio extracelular de R2-FNT utilizando processos descritos por Luethy, et al., ibid, e os resultados foram visualizados graficamente utilizando o programa PrettyPlot do pacote Wisconsin, versão 8.1 (Genetics Computer Group, Madison, WI) (figura 10). O alinhamento indica uma conservação clara dos resíduos de cisteína envolvidos na formação dos domínios 1-4. Este alinhamento foi então utilizado para construir um modelo tri-dimensional (3-D) do domínio de terminal N de OPG humana utilizando a estrutura 3-D conhecida do domínio extracelular do R1-FNT p55 (Banner et al., ibid) como matriz. Para fazer isto, copiaram-se as coordenadas atómicas e a estrutura do péptido e as cadeias laterais de resíduos idênticos a partir das coordenadas da estrutura cristalina de R1-FNT. No seguimento disto, geraram-se as coordenadas remanescentes para as inserções e as diferentes cadeias laterais utilizando o programa LOOK (Molecular Applications Group, Palo Alto, CA). O modelo 3-D foi então refinado minimizando a energia da sua conformação utilizando o LOOK.

Por analogia com outros elementos da família dos R-FNT, assume-se que OPG se liga a um ligando. Com a finalidade de criar um modelo da interacção de OPG com o seu ligando, utilizou-se a estrutura cristalina de FNT- β para simular uma representação 3-D de um "ligando de OPG". Estes dados foram visualizados (ver figura 11) utilizando Molscript (Kraulis, J. Appl. Cryst. 24, 946-950, 1991). Construiu-se um modelo para o complexo de OPG/ligando com 3 moléculas de FNT β e 3 de OPG em que as posições de OPG são idênticas a R1-FNT na estrutura cristalina. Utilizou-se então este modelo para encontrar os resíduos de OPG que podiam interagir com o seu

ligando utilizando a sequente abordagem: calculou-se a área de solventes acessíveis de todos os resíduos no complexo e um único modelo de OPG. Os resíduos que têm acessibilidades diferentes no complexo relativamente ao monómero provavelmente irão interagir com o ligando.

As sequências de aminoácidos de OPG humana e de murganho foram re-alinhadas utilizando esta informação para evidenciar as sequências que compreendem cada um dos domínios ricos em cisteína 1-4 (figura 12A e 12B). Cada domínio tem características estruturais individuais que se podem prever:

Domínio 1

Contém 4 cisteínas envolvidas nas ligações de di-sulfureto SS2 (C41 a C54) e SS3 (C44 a C62). Embora nenhuma ligação SS1 seja evidente com base nas pontes de di-sulfureto, a tirosina conservada na posição 28 é homóloga do R1-FNT Y20, que está envolvido na interacção com H66 para ajudar na formação do domínio. A OPG tem uma histidina homóloga na posição 75, sugerindo que a OPG Y28 e H75 estão empilhados em conjunto na proteína natural, como acontece nos resíduos homólogos de R1-FNT. Por isso, ambos os resíduos podem na verdade ser importantes para a actividade biológica, e a OPG truncada de terminal N até e para lá de Y28 podem ter a actividade alterada. Além disso, é previsível que os resíduos E34 e K43 interajam com um ligando da ligação com base no nosso modelo 3-dimensional.

Domínio 2

Contém seis cisteínas e é previsível que contenha as ligações de di-sulfureto SS1 (C65 a C80), SS2 (C83 a C98) e

SS3 (C87 a C105). Esta região de OPG também contém uma região de estiramento de P66-Q91 que se alinha com a porção do domínio 2 de R1-FNT que forma contacto de proximidades com FNT β (ver antes), e pode interagir com um ligando de OPG. É previsível que os resíduos particulares P66, H68, Y69, Y70, 171, D72, S73, H75, T76, S77, D78, E79, L81, Y82, P85, V86, K88, E89, L90, e Q91 interajam com um ligando de ligação à base dos dados de estrutura dos requerentes.

Domínio 3

Contém 4 cisteínas envolvidas nas ligações de disulfureto de SS1 (C107 a C 118) e SS3 (C124 a C142), mas não na ligação SS2. Com base nos dados de estrutura dos requerentes, é previsível que os resíduos E115, L118 e K119 interajam com um ligando de OPG.

Domínio 4

Contém 4 cisteínas envolvidas nas ligações de disulfureto de SS1 (C145 a C 118) e SS3 (C166 a C185), mas não na ligação SS2, semelhante ao domínio 3. Os dados de estrutura dos requerentes prevêem que E153 e S155 interajam com um ligando de OPG.

Assim, o modelo estrutural previsto para OPG identifica um certo número de resíduos altamente conservados que provavelmente são importantes para a sua actividade biológica.

EXEMPLO 7

Produção de proteína recombinante segregada OPG em células de mamífero

Para determinar se a OPG é actualmente uma proteína segregada, fundiu-se ADNc de OPG de murganho com o domínio Fc de IgG1 humana como um marcador (Capon et al. Nature 337, 525-531 (1989)), e provocou-se a expressão em fibroblastos 293 humanos. Realizaram-se as fusões de Fc utilizando o vector pFc-A3. pFc-A3 contém a região que codifica a porção de Fc da cadeia pesada da imunoglobulina humana IgG-γI (Ellison et al. ibid) a partir do primeiro aminoácido do domínio charneira (Glu-99) até ao terminal carboxilo e é flanqueado por um sítio de fusão de 5'-NotI e os sítios de 3'-SaiI e XbaI. O plasmido foi construído por amplificação por RCP da biblioteca de ADNc de baço humano (Clontech), as reacções de RCP tinham um volume final de 100 µl e utilizaram-se 2 unidades de ADN polimerase Vent (New England Biolabs) em Tris-HCl 20 mM (a pH 8,8), KCl 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 µM, MgSO₄ 2 mM, Triton X-100 a 0,1 % com 400 µM a cada de dNTP e 1 ng da biblioteca de ADNc a ser amplificada em conjunto com 1µM de cada um dos iniciadores. As reacções foram iniciadas por desnaturação a 95 °C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s, e 73 °C durante 2 min. O iniciador de 5'

5'-ATAGCGGCCGCTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACTCAC-3' (SEQ ID NO: 24)

incorporou um sítio de NotI imediatamente a seguir de 5' do primeiro resíduo (Glu-99) do domínio charneira de IgG-γI. O iniciador de 3'

5'-TCTAGAGTCGACTTATCATTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTCTT-3' (SEQ ID NO: 25)

incorporou os sítios SalI e XbaI. O produto de RCP de 717-pb foi digerido com NotI e SalI, isolado por electroforese através de agarose a 1 % (FMC Corp.), purificado pelo processo de Geneclean (BIO 101, Inc.) e clonado em NotI, o vector de pBluescript II KS digerido por SalI (Stratagene). A inserção no plasmídeo resultante, pFc-A3, foi sequenciada para confirmar a fidelidade da reacção RCP.

O ADNc de murganho no plasmídeo pRcCMV-MuOPG foi amplificado utilizando os seguintes dois conjuntos de pares de iniciadores:

Par 1

5'-CCTCTGAGCTCAAGCTTCCGAGGACCACAATGAACAAG-3' (SEQ ID NO: 26)

5'-CCTCTGCGGCCGCTAACGAGCTTATTTCACGGATTGAACCTG-3' (SEQ ID NO: 27)

Par 2

5'-CCTCTGAGCTCAAGCTTCCGAGGACCACAATGAACAAG-3' (SEQ ID NO: 28)

5'-CCTCTGCGGCCGCTGTGCATTCTCTTG-3' (SEQ ID NO: 30)

O primeiro par amplifica todo o LORF de OPG e cria um sítio de restrição de NotI que é compatível com o sítio Not I do quadro no vector de fusão de Fc pFcA3. Preparou-se pFcA3 por engenharia genética de um sítio 5' de restrição de NotI com o resíduo 216 de ácido aspártico do ADNc de Fc da IgG1 humana. Esta estrutura introduz um ligante que codifica dois aminoácidos irrelevantes que englobam a junção entre a

proteína OPG e a região Fc de IgG. Este produto, quando ligado à porção de Fc, vai codificar directamente os 401 resíduos de OPG seguido dos 227 dos resíduos de aminoácidos da região Fc de IgG1 humana (FLFc). O segundo par de iniciadores amplifica as sequências de ADN que codificam os primeiros 180 resíduos de aminoácidos de OPG, que englobam o seu putativo domínio de ligação do ligando. Tal como antes, o iniciador de 3' cria um sítio de restrição artificial de NotI que funde LORF de OPG truncado de terminal C, na posição 180 de treonina, directamente com o domínio Fc de IgG1 (CT.fc).

A junção da sequência de aminoácidos que liga o resíduo 401 de OPG e o resíduo 221 de ácido acético da região Fc humana, pode-se modificar como se segue: Os resíduos 216-220 que codificam o ADN da região Fc humana podem ser eliminados como se descreve a seguir, ou o resíduo de cisteína que corresponde a C220 da região Fc humana pode ser mutado quer com serina ou com alanina. A proteína de fusão de OPF-Fc codificada por estes vectores modificados pode ser transfetada em 293 células humanas, ou células de OHC, e proteína de fusão recombinante OPG-Fc purificada como se descreve a seguir.

Ambos os produtos foram direccionalmente clonados no vector de plasmido pCEP4 (Invitrogen). pCEP4 contém a origem de replicação do vírus de Epstein-Barr e é capaz de replicação episomal nas 293 células de EBNA-1. Os vectores parentais de pCEP4, e pCEP4-FI.Fc e pCEP4-CT.Fc foram lipofectados em 293 células EBNA-1 utilizando os processos recomendados pelo fabricante. As células transfetadas foram então seleccionadas em 100 µg/ml de higromicina para seleccionar a expressão do vector, e as culturas de massa resistentes a fármacos resultantes cresceram até à

confluência. As células foram então postas em cultura em meio isento de soro durante 72 hr, e o meio condicionado foi retirado e analisado por EGPA-SDS. Uma coloração prateada do gel de poliacrilamida detecta as principais proteínas do meio condicionado produzidas pelas 293 culturas resistentes a fármacos. No meio condicionado de pCEP4-FI.Fc e de pCEP4-CT.Fc, foram abundantemente segregadas bandas únicas com as dimensões previstas (ver figuras 13B e 13C). A proteína de fusão Fc de comprimento completo acumulou-se até a uma concentração elevada, indicando que pode ser estável. Detectaram-se ambas as proteínas de fusão Fc por meio de anticorpos de Fc de IgG1 anti-humana (Pierce) em análises de "western blots", indicando que os produtos de OPG são recombinantes.

A proteína da fusão de OPG-Fc de comprimento completo foi purificada por meio de cromatografia em coluna de proteína-A (Pierce) utilizando os processos recomendados pelo fabricante. Submeteu-se então a proteína a uma análise da sequência de terminal N por degradação de Edman automatizada, praticamente como foi descrito por Matsudaira et al. (J. Biol. Chem. 262, 10-35 (1987)). A sequência de aminoácidos que se segue foi lida após 19 ciclos:

NH₂-ETLPPKYLHYDPETGHQLL-CO₂H (SEQ ID NO: 31)

Esta sequência era idêntica à prevista sequência de aminoácidos de OPG de murganho começando no resíduo de aminoácidos 22, sugerindo que o sítio de clivagem da sequência líder natural de mamíferos está entre os resíduos de aminoácidos Q21-E22, mas não entre Y31-D32 como originalmente previsto. As experiências realizadas nas 293 células de EBNA com pCEP4-FI.Fc e pCEP4-CT.Fc demonstram que

OPG é uma proteína segregada, e pode actuar sistemicamente para ligar o seu ligando.

Utilizaram-se processos similares aos utilizados para construir e expressar as fusões de muOPG[22-180]-Fc e muOPG[22-401]-Fc para outras proteínas de fusão humanas de OPG-Fc.

Construiu-se como se segue os aminoácidos 1-185 fundidos com a região Fc de IgG1 humana [muOPG Ct(185).Fc]. Amplificou-se o ADNc de OPG de murino a partir da osteoprotegerina do plasmido pRcCMV Mu (descrito no exemplo 5) utilizando o par de iniciadores que se segue numa reacção em cadeia de polimerase tal como se descreveu antes:

1333-82:

5'-TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT-3' (SEQ ID NO: 32)

1333-80:

5'-CCT CTG CGG CCG CAC ACA CGT TGT CAT GTG TTG C-3'
(SEQ ID NO: 33)

Este par de iniciadores amplifica a região do ADNc de OPG de murino que codifica os resíduos de aminoácidos amino 63-185 (correspondendo a 278-645 pb) do quadro de leitura de OPG como se mostra na figura 9A. O iniciador de 3' contém um sítio de restrição de Not I que é compatível com o sítio Not I no quadro do vector de fusão de Fc pFcA3. O produto também engloba um sítio de restrição único de EcoRI localizado no pb 436. O produto de RCP amplificado foi purificado, clivado com NotI e EcoRI e purificou-se o fragmento de restrição

resultante EcoRI-NotI. O vector pCEP4 com a inserção da fusão 1-401 de OPG-Fc de murino foi clivado com EcoRI e NotI, purificado, e ligado ao produto de RCP gerado antes. O vector de expressão à base de pCEP4 codifica os resíduos 1-185 de OPG seguido directamente pelos 227 resíduos de aminoácidos da região Fc de IgG1 humana. O vector de fusão de Fc 1-185 de OPG de murino foi transfetado em células 293, seleccionou-se o fármaco, e produziu-se o meio condicionado tal como se descreveu antes. Purificou-se o produto de fusão de OPG de murino 1-185 Fc por meio de cromatografia em coluna de proteína-A (Pierce) utilizando os processos recomendados pelo fabricante.

Construíram-se como se segue os resíduos de aminoácidos 1-194 que codificam ADN de OPG de murino fundidos com a região Fc de IgG1 humana (OPGmu Ct(194).Fc). O ADNc de OPG de murganho a partir da osteoprotegerina de murino do plasmido pRCCMV foi amplificado utilizando os pares de iniciadores que se seguem:

1333-82:

5'-TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT-3' (SEQ ID NO: 34)

1333-81:

5'-CCT CTG CGG CCG CCT TTT GCG TGG CTT CTC TGT T-3'
(SEQ ID NO: 35)

Este par de iniciadores amplifica a região do ADNc de OPG de murino que codifica os resíduos de aminoácidos 70-194 (correspondendo a 298-672 pb) do quadro de leitura de OPG. O iniciador de 3' contém um sítio de restrição Not I que é

compatível com o sítio Not I do quadro do vector de fusão de Fc pFcA3. O produto também engloba um sítio de restrição único de EcoRI localizado no pb 436. O produto de RCP amplificado foi clonado no vector de fusão de OPG [1-401] de murino e Fc, tal como descrito antes. O vector de expressão à base de pCEP4 codifica os resíduos 1-194 de OPG seguido directamente pelos 227 resíduos de aminoácidos da região Fc de IgG1 humana. O vector de fusão de Fc com 1-194 de OPG de murino foi transfetado em células 293, seleccionou-se o fármaco, e produziu-se o meio condicionado. Purificou-se o produto de fusão segregado resultante por meio de cromatografia em coluna de proteína-A (Pierce) utilizando os processos recomendados pelo fabricante.

Construiu-se como se segue os aminoácidos 1-401 que codificam o ADN de OPG fundidos com a região Fc de IgG1 humana. O ADN de OPG humana na osteoprotegerina do plasmido pRcCMV (descrito no Exemplo 5) foi amplificado utilizando os pares de iniciadores de oligonucleótidos que se seguem:

1254-90:

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTG GTT TCC GGG GAC CAC AAT
G-3' (SEQ ID NO: 36)

1254-95:

5'-CCT CTG CGG CCG CTA AGC AGC TTA TTT TTA CTG AAT
GG-3' (SEQ ID NO: 37)

O produto da RCP resultante codifica a proteína de OPG humana de comprimento completo e cria um sítio de restrição Not I que é compatível com o sítio Not I do quadro do vector de fusão de Fc pFcA3. O produto de RCP foi clonado

direcionalmente no vector do plasmido pCEP4 tal como se descreveu antes. O vector de expressão resultante codifica os resíduos 1-401 de OPG humana, seguido directamente pelos 227 resíduos de aminoácidos da região Fc de IgG1 humana. Produziu-se o meio condicionado a partir das células transfetadas e do fármaco seleccionado e purificou-se o produto de fusão de OPGhu FI.Fc por meio de cromatografia em coluna de proteína-A (Pierce) utilizando os processos recomendados pelo fabricante.

Os resíduos dos aminoácidos 1-201 codificam o ADN de OPG humana fundido com a região Fc de IgG1 humana [OPGhu Ct(201).Fc]. O ADNc de OPG humano clonado a partir da osteoprotegerina humana do plasmido pRccMV foi amplificado por RCP utilizando os pares de iniciadores de oligonucleotídos que se seguem:

1254-90:

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTG GTT TCC GGG GAC CAC AAT
G-3' (SEQ ID NO: 38)

1254-92:

5'-CCT CTG CGG CCG CCA GGG TAA CAT CTA TTC CAC-3'
(SEQ ID NO: 39)

Este par de iniciadores amplifica a região de ADNc de OPG que codifica os resíduos de aminoácidos 1-201 do quadro de leitura de OPG, e cria um sítio de restrição de Not I na extremidade que é compatível com o vector de fusão de Fc do sítio Not I no quadro, FcA3. Este produto, quando ligado à porção de Fc, vai codificar os 1-201 de OPG seguido directamente pelos 221 resíduos de aminoácidos da região Fc

de IgG1 humana. O produto de RCP foi clonado direcionalmente no vector do plasmido pCEP4 tal como se descreveu antes. Produziu-se o meio condicionado a partir das células transfectadas e do fármaco seleccionado e purificou-se o produto de fusão de OPG Ct (201) Fc por meio de uma cromatografia em coluna de proteína-A (Pierce) utilizando os processos recomendados pelo fabricante.

Os processos que se seguem foram utilizados para construir e expressar OPG de murganho e humano, não fundida.

Gerou-se um plasmido para a expressão em mamíferos de OPG de murino de comprimento completo (resíduos 1-401) por amplificação por RCP da inserção de ADNc de OPG de murino a partir de pRcCMV de Osteoprotegerina de murino e sub-clonou-se no vector de expressão pDSRa (DeClerck et. al J. Biol. Chem. 266, 3893 (1991)). Utilizaram-se os iniciadores de oligonucleótidos que se seguem:

1295-26:

5'-CCG AAG CTT CCA CCA TGA ACA AGT GGC TGT GCT GC-
3' (SEQ ID NO: 40)

1295-27:

5'-CCT CTG TCG ACT ATT ATA AGC AGC TTA TTT TCA CGG
ATT G-3' (SEQ ID NO: 41)

Amplificou-se o quadro de leitura de OPG de murino de comprimento completo por RCP tal como se descreveu antes. O produto de RCP foi purificado e digerido com as endonucleases de restrição Hind III e Xba I (Boehringer Mannheim,

Indianapolis, IN) nas condições recomendadas pelo fabricante, e depois ligou-se a Hind III e Xba I que digeriram pDSRa. Detectaram-se clones recombinantes por digestão da endonuclease de restrição, depois sequenciaram-se para assegurar que não se produziam mutações durante as etapas de amplificação por RCP.

Introduziu-se o plasmido resultante pDSRa-muOPG em células de ovário de hamster chinês (OHC) por meio de uma transfecção mediada por cálcio (Wigler et al. Cell. 11: 233 (1977)). Seleccionaram-se colónias individuais com base na expressão do gene de di-hidrofolato redutase (DHFR) no vector de plasmido e isolaram-se vários clones. A expressão da proteína recombinante de OPG de murino foi monitorizada por análise de "western blot" do meio condicionado de células de OHC. Seleccionaram-se células de elevada expressão e a expressão de OPG foi ainda amplificada por tratamento com metotrexato como descrito (DeClerck et al., *ibid*). Produziu-se o meio condicionado a partir de linhas de células de OHC para uma nova purificação da proteína OPG de murino segregada de forma recombinante.

Gerou-se um plasmido para a expressão em mamíferos de OPG humano de comprimento completo (aminoácidos 1-401) por sub-clonagem da inserção de ADNc em osteoprotegerina de pRcCMV humano directamente no vector pDSRa (DeClerck et. al. *ibid*). O plasmido pRcCMVOPG foi digerido completamente com Not I, foi tornado cego com Klenow, depois foi digerido até ao fim com o AND do vector Xba I, depois foi digerido com Hind III, foi tornado cego com Klenow, depois foi digerida com Xba I, depois ligou-se à inserção de OPG. Os plasmídios recombinantes foram então sequenciados para confirmar a orientação correcta do ADNc de OPG humana.

Introduziu-se o plasmido resultante pDSRa-OPG humano em células de ovário de hamster chinês (OHC) como se descreveu antes. Seleccionaram-se colónias individuais com base na expressão do gene de di-hidrofolato redutase (DHFR) no vector de plasmido e isolaram-se vários clones. A expressão da proteína recombinante de OPG humana foi monitorizada por análise de "western blot" do meio condicionado de células de OHC. Seleccionaram-se clones de elevada expressão e a expressão de OPG foi ainda amplificada por tratamento com metotrexato. O meio condicionado das linhas de células de OHC que expressam OPG humana foi produzido para a purificação da proteína.

Os vectores de expressão para OPG de murino que codifica os 1-185 foram produzidos como se segue. O ADNC de OPG de murino a partir da osteoprotegerina de murino do pRcCMV foi amplificado utilizando os iniciadores de nucleótidos que se seguem:

1333-82:

5'-TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT-3' (SEQ ID NO: 42)

1356-12:

5'-CCT CTG TCG ACT TAA CAC ACG TTG TCA TGT GTT GC-
3' (SEQ ID NO. 43)

Este par de iniciadores amplifica a região do ADNC de OPG de murino que codifica os aminoácidos 63-185 do quadro de leitura de OPG (pb 278-645) e contém um codão de paragem artificial directamente após o codão de cisteína (C185), a

que se segue um sítio de restrição de endonuclease artificial Sal I. O produto previsto contém um sítio de restrição de Eco RI interno útil para a sub-clonagem num vector pré-existente. Após a amplificação por RCP, o produto purificado resultante foi clivado com as endonucleases de restrição Eco RI e Sal I, e o fragmento grande foi purificado. O produto purificado foi então sub-clonado no fragmento de restrição grande de um produto digerido de Eco RI e Sal I de pBluescript-OPGmu FI.Fc descrito antes. O plasmido resultante foi digerido com Hind III e Xho I e o fragmento pequeno foi purificado em gel. Este fragmento, que contém um quadro de leitura aberta que codifica os resíduos 1-185 foi então sub-clonado num produto digerido de Hind III e Xho I do vector de expressão pCEP4. O vector resultante, pmuOPG [1-185], codifica um polipeptído de OPG truncado que termina num resíduo de cisteína localizado na posição 185. O meio condicionado das células transfetadas e do fármaco seleccionado foi produzido como se descreveu antes.

1333-82:

5'-TCC CTT GCC CTG ACC ACT CTT-3' (SEQ ID NO: 44)

1356-13:

5'-CCT CTG TCG ACT TAC TTT TGC GTG GCT TCT CTG
TT-3' (SEQ ID NO. 45)

Este par de iniciadores amplifica a região do ADNc de OPG de murino codificando os aminoácidos 70-194 do quadro de leitura de OPG (pb 298-672) e contém um codão de paragem artificial directamente após o codão de lisina (K194), a que se segue um sítio de restrição de endonuclease artificial Sal

I. O produto previsto contém um sítio de restrição de Eco RI interno útil para sub-clonagem num vector pré-existente. Após a amplificação por RCP, o produto purificado resultante foi clivado com as endonucleases de restrição Eco RI e Sal I, e o fragmento grande foi purificado. O produto purificado foi então sub-clonado no fragmento de restrição grande de um produto digerido de Eco RI e Sal I de pBluescript-OPGmu FI.Fc descrito antes. O plasmido resultante foi digerido com Hind III e Xho I e o fragmento pequeno foi purificado em gel. Este fragmento, que contém um quadro de leitura aberta que codifica os resíduos 1-185 foi então sub-clonado num produto digerido de Hind III e Xho I do vector de expressão pCEP4. O vector resultante, pmuOPG [1-185], codifica um polipeptídeo de OPG truncado que termina numa lisina na posição 194. O meio condicionado das células transfetadas e do fármaco seleccionado foi produzido como se descreveu antes.

Geraram-se várias mutações na extremidade 5' do gene OPGhu [22-401]-Fc gene que introduz quer substituições de aminoácidos ou eliminações da OPG entre os resíduos 22 a 32. Todas as mutações foram com o "Quick-Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit" (Stratagene, San Diego, CA) utilizando as condições recomendadas pelo fabricante. Em resumo, a mistura reacional contendo a matriz do ADN do plasmido OPGhu [22-401]-Fc e trataram-se iniciadores mutagénicos com Pfu polimerase na presença de desoxinucleótidos, depois amplificaram-se num amplificador de ADN tal como se descreveu antes. Transfectou-se então uma aliquota da mistura reacional na apropriada XL1-azul de *E. coli* por meio de choque térmico e depois colocou-se em placa. Sequenciou-se então o ADN do plasmido a partir de transformantes para verificar mutações.

Utilizaram-se os pares de iniciadores que se seguem para eliminar os resíduos 22-26 do gene de OPG humana, resultando na produção de uma proteína de fusão OPGhu[27-401]-Fc:

1436-11:

5'-TGG ACC ACC CAG AAG TAC CTT CAT TAT GAC-3' (SEQ ID NO: 140)

1436-12:

5'-GTC ATA ATG AAG GTA OTT CTG GGT GGT CCA-3' (SEQ ID NO: 141)

Utilizaram-se os pares de iniciadores que se seguem para eliminar os resíduos 22-28 do gene de OPG humana, resultando na produção de uma proteína de fusão OPGhu [29-401]-Fc:

1436-17:

5'-GGA CCA CCC AGC TTC ATT ATG ACG AAG AAA C-3'
(SEQ ID NO: 142)

1436-18:

5'-GTT TCT TCG TCA TAA TGA AGC TGG GTG GTC C-3'
(SEQ ID NO: 143)

Utilizaram-se os pares de iniciadores que se seguem para eliminar os resíduos 22-31 do gene de OPG humana, resultando na produção de uma proteína de fusão OPGhu [32-401]-Fc:

1436-27:

5'-GTG GAC CAC CCA GGA CGA AGA AAC CTC TC-3' (SEQ
ID NO: 144)

1436-28:

5'-GAG AGG TTT CTT CGT CCT GGG TGG TCC AC-3' (SEQ
ID NO: 145)

Utilizaram-se os pares de iniciadores que se seguem para alterar o codão para o resíduo 28 de tirosina até fenilalanina do gene de OPG humana, resultando na produção de uma proteína de fusão OPGhu [22-401]-Fc Y28F:

1436-29:

5'-CGT TTC CTC CAA AGT TCC TTC ATT ATG AC-3' (SEQ
ID NO: 146)

1436-30:

5'-GTC ATA ATG AAG GAA CTT TGG AGG AAA CG-3' (SEQ
ID NO: 147)

Utilizaram-se os pares de iniciadores que se seguem para alterar o codão para o resíduo 26 de prolina até alanina do gene de OPG humana, resultando na produção de uma proteína de fusão OPGhu [22-401]-Fc P26A:

1429-83:

5'-GGA AAC GTT TCC TGC AAA GTA CCT TCA TTA TG-3'
(SEQ ID NO: 148)

1429-84:

5'-CAT AAT GAA GGT ACT TTG CAG GAA ACG TTT CC-3'

(SEQ ID NO: 149)

Cada plasmido de OPGmu [22-401]-Fc resultante, contendo a mutação apropriada, foi então transfectado em células 293 humanas, o mutante da proteína de fusão OPG-Fc foi purificado a partir do meio condicionado tal como se descreveu antes. Avaliou-se *in vitro* a actividade biológica de cada proteína por meio do ensaio de formação de osteoclastos descrito no exemplo 11.

EXEMPLO 8

Expressão de OPG em *E. coli*

A. Vectores de Expressão bacteriana

pAMG21

O plasmido de expressão pAMG21 pode derivar do vector de expressão pCFM1656 (ATCC # 69576) da Amgen que, por sua vez, deriva do sistema de vectores de expressão da Amgen descrito na patente US No. 4.710.473. O plasmido pCFM1656 pode derivar do plasmido pCFM836 (Patente No. 4.710.473) por meio de: (a) destruição de dois sítios endógenos de restrição NdeI por preenchimento da extremidade com a enzima polimerase T4 seguida da ligação da extremidade cega; (b) substituição da sequência de ADN entre os sítios de restrição únicos AatII e ClaI contendo o promotor de síntese PL com um fragmento

similar obtido de pCFM636 (patente No. 4.710.473) contendo o promotor PL

AatII

5' CTAATTCCGCTCTCACCTACCAAACAATGCCCTGCACAAATAATTCAATAT-
3' TGCAGATTAAGGCGAGAGTGGATGGTTACGGGGGGACGTTTTATTTAAGTATA-
-AAAACATACAGATAACCCTGCGGTGATAAATTATCTCTGGCGGTGTTGACATAAA-
-TTTTTGATGTCTATTGGTAGACGCCACTATTAATAGAGACGCCACAACTGTATTT-

-TACCACTGGCGGTGATACTGAGCACAT 3' (SEQ ID NO: 53)

-ATGGTGACCGCCACTATGACTCGTGTAGCS' (SEQ ID NO: 54)

ClaI

e depois (c) a substituição da sequência de ADN pequena entre os sítios de restrição únicos ClaI e KpnI com o seguinte oligonucleótido

5' CGATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGGTTAACCGCGTTGAAATCGGTA C3' (SEQ ID NO: 48)

TAAACTAAGATCTTCCTCCTTATTGTATACCAARTGCGCAACCTTAAGC 5' (SEQ ID NO: 49)

ClaI

KpnI

O plasmido de expressão pAMG21 pode então ser derivado de pCFM1656 fazendo uma série de alterações das bases dirigidas ao sítio por meio de mutagénese de oligonucleótidos sobrepostos por RCP e substituição de sequências de ADN. Começando com o sítio BgIII (plasmido pb # 180) imediatamente 5' até ao promotor de replicação do plasmido PcopB e prosseguindo em direção aos genes de replicação do plasmido, as alterações nos pares de bases são as seguintes:

pAMG21 bp #	pb em pCFM1656 pb alterados para em pAMG21	
# 204	T/A	C/G
# 428	A/T	G/G

# 509	G/C	A/T
# 617	--	insere dois pb G/C
# 679	G/C	T/A
# 980	T/A	C/G
# 994	G/C	A/T
# 1004	A/T	C/G
# 1007	C/G	T/A
# 1028	A/T	T/A
# 1047	C/G	T/A
# 1178	G/C	T/A
# 1466	G/C	T/A
# 2028	G/C	eliminação de bp
# 2187	C/G	T/A
# 2480	A/T	T/A

# 2499-2502	AGTG	GTCA
	TCAC	CAGT
#2642	TCCGAGC	Eliminação de 7 pb
	AGGCTCG	

#3435	G/C	A/T
#3446	G/C	A/T
#3643	A/T	T/A

A sequência de ADN entre os sítios de restrição únicos *Ast*II (posição #4364 no pCFM1656) e *Sac*II (posição #4585 no pCFM1656) está substituída pela seguinte sequência de ADN:

(extremidade pegajosa de *Aat*II) 5' GCGTAACGTATGCATGGTCTCC
 (posição #4358 em pAMG21) 3' TGCACGCATTGCATACTGTACCGAGAGG

```

-CCATGCCAGAGTAGGGAACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACT-
-GGTACGCTCTCATCCCTGACGGTCCG'TAGTTTATTTGCTTCCGAGTCAGCTTCTGA-
-
-GGGCCTTCGTTTATCTGTTGTCGGTGAACGCTCTCTGAGTAGGACAATCCGC-
-CCCGGAAAGCAAATAGACAACAAACAGCCACTTGCAGAGGGACTCATCCTGTTAGGCG-
-
-CGGGAGCGGATTGAAACGTTGCGAAGCAACGGCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCGC-
-GCCCTCGCCTAAACTTGCAACGCTTCGTTGCCGGCCTCCCACCGCCGTCCTGCGGGCG-
-
-CATAAAACTGCCAGGCATCAAATTAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCTTTTGCCT-
-GTATTTGACGGTCCGTAGTTAATTGCTTCCGGTAGGACTGCCTACCGAAAACGCA-
-
AatII
-TTCTACAAACTCTTTGTTTATTTCTAAATACATTCAAATATGGACGTCGTACTTAAC-
-AAGATGTTGAGAAAACAAATAAAAGATTATGTAAGTTATACCTGCAGCATGAATTG-
-
-TTTTAAAGTATGGCAATCAATTGCTCTGTTAAATTGCTTTAGAAAATACTTTGGCAGC-
-AAAATTCTACCCGTTAGTTAACGAGGGACAATTAAACGAAATCTTATGAAACCGTCG-
-
-GGTTTGTGTATTGAGTTCATTTGCGCATTGGTTAAATGGAAGTGACCGTGCCTTAC-

```

-GATAATTATCAACTAGAGAAGAACATTAAATGGTATGTTACACGCATGTAAAAATA-
-CTATTAATAGTTGATCTCTCCTGTTAATTACCATACAGTATGTGCGTACATTTAT-

-AACTATCTATATAGTTGCTTCCTCTGAATGTGCAAACACTAACGATTCCGAAGCCATTAT-
-TTGATAGATATATCACAGAAAGAGACTACACGTTTGATTGTAAGGCTTCGGTAATA-

-TAGCAGTATGAATAGGGAAACCTAAACCCAGTGATAAGACCTGATGATTTCGCTTCTTAA-
-ATCGTCATACTTATCCCTTGATTGGGTCACTATTCTGGACTACTAAAGCGAAGAAATT-

-TTCACATTTGGAGATTTTATTTACAGCATTGTTCAAATATATTCCAATTAATCGGTG-
-AATGTAACCTCTAAAATAATGTCGTAAACAAAGTTATATAAGGTTAATTAGCCAC-

-AATGATTGGAGTTAGAATAATCTACTTAGGATCATTTTATTAAATTAGCGTCATCAT-
-TTACTAACCTCAATCTTATTAGATGATCCTAGTATAAAATAATTAAATCGCAGTAGTA-

-AATATTGCCTCCATTTTATGGTAATTATCCAGAATTGAAATATCAGATTAAACCATAG-
-TTATAACGGAGGTAAAAATCCCATTAAATAGGTCTAACATTAGTCTAAATTGGTATC-

-AATGAGGATAATGATCGCGAGTAATAATATTACACAATGTACCATTAGTCATATCAG-
-TTACTCCTATTTACTAGCGCTCATTTATATAAGTGTACATGGTAAATCAGTATAGTC-

-ATAAGCATGATTAAATATCATTATTGCTTCTACAGGCTTAATTTATTAATTATTCTGT-
-TATTGTAACTAATTATAGTAATAACGAAGATGTCCGAAATTAAATAATTAAAGACA-

-AAAGTGTGTCGGCATTATGTCTTCATACCCATCTCTTATCCTTACCTATTGTTGTC-
-TTCACAGCAGCCGTAAATACAGAAAGTATGGGTAGAGAAATTAGGAATGGATAACAAACAG-

-GCAAGTTTGGGTGTTATATATCATTAAACGGTAATAGATTGACATTGATTCTAATAA-
-CGTTCAAAACGCACAAATATATAGTAATTGCCATTCTAACGTAAACTAAGATTATT-

-ATTGGATTTTGTCACACTATTATATCGCTTGAAATACAATTGTTAACATAAGTACCTG-
-TAACCTAAAAACAGTGTGATAATATAGCGAACATTATGTTAACAAATTGTATTGAC-

-TAGGATCGTACAGGTTACGCAAGAAATGGTTGTTAGTCGATTAATCGATTGATT-
-ATCCTAGCATGTCCAAATGCGTTCTTACCAACAAATATCAGCTAATTAGCTAAACTAA-

-CTAGATTGTTAACTAATTAAAGGAGGAATAACATATGGTAAACGCGTGGAAATTGCA-
-GATCTAAACAAAATTGATTATTCCCTCTTATTGTTACCAATTGCGAACCTTAAGCT-

-AACCGCTCTTCACGCTCTTCACGC 3' [extremidades pegajosas de SacII (SEQ ID NO: 46)]
-TTGGCCAGAAGTGCAGAGTG 5' (posição # 5904 em pAMG21) (SEQ ID NO: 50)

Durante a ligação das extremidades pegajosas desta

sequência de ADN de substituição, os sítios exteriores de AatII e SacII foram destruídos. Há sítios únicos de AatII e SacII no ADN substituído.

pAMG22-His

O plasmido de expressão pAMG22-His pode derivar do vetor de expressão da Amgen pAMG22 por substituição da sequência pequena de ADN entre os sítios de restrição únicos NdeI (#4795) e EcoRI (#4818) de pAMG22 com o seguinte duplex de oligonucleótido:

NdeI	<u>NheI</u>	EcoRI
5' TATGAAACATCATCACsvATCACCATCATGCTAGCGTTAACGCGTTGG 3'	(SEQ ID NO: 51)	

3'-ACTTGTAGTAGTGGTAGTGGTAGTACGATCGCAATTGCGAACCTAA 5' (SEQ ID NO: 52)
MetLisHisHisHisHisHisAlaSerValAsnAlaLeuGlu (SEQ ID NO: 108)

pAMG22

O plasmido de expressão pAMG22 pode derivar do vector de expressão da Amgen pCFM1 656 (ATCC #69576) que, por sua vez, derivou do sistema de expressão do vector da Amgen descrito na patente US No. 4.710.473 concedida em 1 de Dezembro de 1987. O plasmido pCFM1656 pode derivar do plasmido pCFM836 descrito (Patente No. 4.710.473) por meio de: (a) destruição dos dois sítios de destruição endógenos NdeI por preenchimento das extremidades com a enzima polimerase de T4 seguida da ligação à extremidade cega; (b) substituição da sequência de ADN entre os sítios de restrição únicos AatII e ClaI contendo o promotor de síntese PL com um fragmento similar obtido a partir de pCFM636 (patente No. 4.710.473) contendo o promotor PL.

AstIII

5' CTAATTCCGCTCTCACCTACCAAACAATGCCCTGCAAAAATAAATTATAT-
3' TGCAGATTAAGGCAGAGTGGATGGTTACGGGGGACGTTTTATTAAAGTATA-

-AAAAAACATACAGATAACCCTCGGGTGATAAATTATCTCTGGCGGTGTTGACATAAA-
-TTTTTGATGTCTATTGGTAGACGCCACTATTAATAGAGACCGCCACAACTGTATTT-

-TACCACTGGCGGTGATACTGAGCACAT 3' (SEQ ID NO: 53)

-ATGGTGACCGCCACTATGACTCGTGTAGC5' (SEQ ID NO: 54)

ClaI

e depois (c) substituindo a sequência pequena de ADN entre os sítios de restrição únicos *ClaI* e *KpnI* com o seguinte oligonucleotídeo:

5' CGATTGATTCTAGAAGGAGCAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTGGTAC 3' (SEQ ID NO: 55)
3' TAAACTAAGATCTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGAACCTTAAGC 5' (SEQ ID NO: 56)

O plasmido de expressão pAMG22 pode então derivar depar meio da produção de uma série de alterações das bases dirigidas ao sítio por mutagénese de sobreposição dos oligo por RCP e substituições das sequências de ADN. Começando com o sítio BgIII (plasmido pb # 180) imediatamente 5' com o promotor de replicação do plasmido PcopB e prosseguindo em direcção aos genes de replicação do plasmido, sendo as alterações dos pares de base como se segue:

pAMG21 pb # pb em pCFM1656 pb alterados para em pAMG21

# 204	T/A	C/G
# 428	A/T	G/G
# 509	G/C	NT
# 617	-	Inseridos dois pb G/C
# 679	G/C	T/A
# 980	T/A	C/G
# 994	G/C	NT
# 1004	A/T	C/G
# 1007	C/G	T/A
# 1028	NT	T/A
# 1047	C/G	T/A
# 1178	G/C	T/A
# 1466	G/C	T/A
# 2028	G/C	eliminação de pb
# 2187	C/G	T/A
# 2480	NT	T/A

2499-2502 AGTG GTCA

TCAC CAGT

2642 TCCGAGC eliminação de 7 pb
AGGCTGG

# 3435	G/C	A/T
# 3446	G/C	A/T
# 3643	A/T	T/A

A sequência de ADN entre os sítios de restrição única *AatII* (posição #4364 no pCFM1656) e *SacII* (posição #4585 no pCFM1656) está substituída pela seguinte sequência de ADN:

[Extremidade pegajosa de *AatII*] (posição #4358 no pAMG22)

```

5' -GCGTAACGTATGCATGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGCCAACTGCCAGGCATCAA-
3' GCACGCATTGCATACTACGTACCAGAGGGGTACGCTCTCATCCCTGACGGTCCGTAGTT-
-TAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTCGTTTATCTGTTGTTGTCGGTG-
-ATTTGCTTCCGAGTCAGCTTCTGACCCGGAAAGCAAAATAGACAACAAACAGCCAC-
-ACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGAGCGGATTGAACGTTGCGAACGAAACGG-
-TGCGAGAGGACTCATCCTGTTAGGCAGCCCTC6CCTAAACTT6CAACGCTTCGTTGCC-
-CCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCGCATAAAACTCCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAG-
-GGCCTCCCACCGCCCGTCCTGCGGGCGGTATTTGACGGTCCGTAGTTAATTGCTTC-
-CCATCCTGACGGATGCCCTTTGCGTTCTACAAACTCTTGTATTCTAAAT-
-
CGGTAGGACTGCCTACCGGAAAAACGCAAAGATGTTGAGAAAACAAATAAAAGATTAA-

```

AatII

```

-CATTCAAATATGGACGTCTCATAATTTAAAAAATTCAATTGACAAATGCTAAAATT-
-GTAAGTTTATACCTGCAGAGTATTAAAAATTGTTAAGTAAACTGTTACGATTAAAG-
-TGATTAATATTCTCAATTGTGAGCGCTCACAAATTATCGATTGATTCTAGATTGTT-
-ACTAATTATAAGAGTTAACACTCGCGAGTGTAAATAGCTAAACTAAGATCTAAACTCA-

```

-AACTAATTAAAGGAGGAATRACATATGGTTAACCGCCTTGGAAATTCGAGCTCACTAGTGT-
-TTGATTAATTCCCTCCTTATTGTATAACCAATTGCGAACCTTAAGCTCGAGTGATCACA-

SacII

-GACCTGCAGGGTACCATGGAAGCTTACTCGAGGATCCGCCAAAGAAGAAGAAGAAGAA-
-CTGGACGTCCCAGGTACCTTCGAATGAGCTCCTAGGCGCCTTCTTCTTCTTCTT-

-AAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACC-
-TTTCGGGCTTCCTTCGACTCAACCGACGACGGTGGCGACTCGTTATTGATCGTATTGG-

-CCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTGCTGAAAGGAGGAACCGCTTTCA
-GAACCCCGGAGATTCGCCAGAACTCCCCAAAAACGACTTCCTGGCGAGAAGT-

-CGCTCTTCACGG-3' (SEQ ID NO: 58)

-GCGAGAAGTG5' (SEQ ID NO: 57)

[Extremidade pegajosa de SacII] (posição #5024 no pAMG22)

Durante a ligação das extremidades pegajosas desta sequência de substituição de ADN, os sítios exteriores AatII e SacII foram destruídos. Há sítios únicos AatII e SacII no ADN substituído.

B. OPG humana Met [32-4011]

No exemplo, o vector de expressão utilizado foi pAMG21, um derivado de pCFM1656 (ATCC no. de acesso 69576) que contém os sítios de restrição apropriados para a inserção de genes a jusante do lux PR. (Ver a patente U.S. No. 5.169.318 para a descrição do sistema de expressão de lux). A célula hospedeira utilizada foi GM120 (ATCC no. de acesso 55764). Este hospedeiro tem o promotor lacIQ e o gene lacI integrado num segundo sítio no cromossoma hospedeiro de um hospedeiro prototrófico K12 de *E. coli*. Outros vectores de expressão de

E. coli e as células hospedeiras vulgarmente utilizados são também apropriados para a expressão.

A sequência de ADN que codifica para uma metionina de terminal N e os aminoácidos 32-401 do polipeptído de OPG humana são colocados sob o controlo do promotor de luxPR no vector de expressão do plasmido pAMG21 como se segue. Para se conseguir isto, realizou-se uma RCP utilizando os oligonucleótidos #1257-20 e #1257-19 como iniciadores utilizando como matriz o ADN do plasmido pRc-CMV-OPGhu contendo o ADNc de OPG humana OPG-ADNc e fez-se a amplificação do ADN durante 30 ciclos sendo cada ciclo a: 94 °C durante 20 segundos, seguido de 37 °C durante 30 segundos, seguido de 72 °C durante 30 segundos. A amostra de RCP resultante foi resolvida em gel de agarose, excisou-se o produto da RCP, purificou-se e restringiu-se com as endonucleases de restrição KpnI e BamHI e purificou-se. Os oligonucleótidos de síntese #1257-21 e #1257-22 foram fosforilados individualmente utilizando polinucleótido cinase de T4 e ATP, e misturaram-se, aqueceram-se a 94 °C e deixaram-se arrefecer lentamente até à temperatura ambiente a partir de um duplex de ligante de oligonucleótido contendo as extremidades pegajosas NdeI e KpnI. O duplex de ligante fosforilado formado entre os oligonucleótidos #1257-21 e #1257-22 contendo as extremidades coesas NdeI e KpnI (ver Figura 14A) e KpnI e BamHI foram digeridos e purificados e o produto de RCP gerado utilizando iniciadores de oligo #1257-20 e #1257-19 (ver antes) foi inserido direccionalmente entre dois sítios do vector do plasmido pAMG21, nomeadamente o sítio NdeI e BamHI, utilizando uma metodologia normalizada de ADN recombinante (ver figura 14A e as sequências que se seguem). O ligante sintético utilizou codões de *E. coli* e originou uma metionina de terminal N.

Selecionaram-se dois clones e isolou-se o AND do plasmido e a inserção da OPG humana foi em seguida confirmada pela sequência de ADN. O plasmido pAMG21 resultante contendo os aminoácidos 32-401 do polipeptídeo de OPG humana precedido imediatamente no quadro por uma metionina é referido como pAMG21-OPGhu met[32-401] ou pAMG21-OPGhu met [32-401].

Oligo#1257-19

5'-TACGCAGTGGATCCTTATAAGCAGCTTA-3' (SEQ ID NO: 59)

oligo #1257-20

5'-GTCCTCCTGGTACCTACCTAAAACAAC-3' (SEQ ID NO: 60)

oligo#1257-21

5' -TATGGATGAAGAAACTTCTCATCAGCTGCTGTGATAAATGTCC
GCCGGGTAC-3' (SEQ ID NO: 61)

Oligo#1257-22

5'-CGCGGGACATTATCACACAGCAGCTGATGAGAAGTTCTTCATCCA-3'
(SEQ ID NO: 47)

Culturas de pAMG21-OPGhu met[32-401] em GM120 de *E. coli* em meio 2XYT contendo 20 µg/ml de canamicina foram incubadas a 30 °C antes da indução. A indução da expressão do produto do gene OPGhu met[32-401] a partir do promotor luxPR consegue-se no seguimento da adição do autoindutor sintético lactona de N-(3-oxo-hexanoil)-DL-homoserina com o meio de cultura com uma concentração final de 30 ng/ml e incubaram-se as culturas quer a 30 °C quer a 37 °C durante mais 6 horas. Passadas 6 horas, as culturas bacterianas foram examinadas por microscópio para detectar a presença de corpos de inclusão e foram peletizadas por centrifugação. Observaram-se

corpos de inclusão retrácteis nas culturas induzidas indicando que alguns dos produtos dos genes recombinantes de OPGhu met[32-401] foram produzidos de forma insolúvel em E. coli. Fez-se uma nova suspensão dos peletes bacterianos em Tris-HCl 10mM /pH 8, EDTA 1mM e fez-se directamente a lise por adição de 2X tampão de amostra Laemlli até 1X final, e 8-mercaptopetanol até a uma concentração final de 5 %, e analisaram-se por EGPA-SDS. Observou-se uma banda substancialmente mais intensa de coomassie de aproximadamente 42kDa num gel de EGPA-SDS contendo o total de culturas induzidas dos produtos da lise das células de 30 °C e 37 °C versus coluna 2 que representa um produto da lise total das células de uma cultura não induzida a 30 °C (figura 14B). O produto esperado do gene teria 370 aminoácidos de comprimento e tem um peso molecular esperado de cerca de 42,2 kDa. No seguimento da indução a 37 °C durante 6 horas, peletizou-se mais uma cultura e ou se fez um tratamento para isolar os corpos de inclusão (ver a seguir) ou se tratou por microfluidização. Os peletes tratados por microfluidização foram novamente suspensos em tampão de Tris 25mM- HCl/pH 8, NaCl 0,5M e passaram-se 20 vezes através de um microfluidizador do modelo 1108 (Microfluidics Corp.) e recolheram-se. Retirou-se uma aliquote da amostra recolhida (produto total da lise microfluidizado), e o restante foi peletizado a 20.000 x g durante 20 minutos. No seguimento da centrifugação removeu-se o sobrenadante (fracção solúvel microfluidizada) e fez-se uma nova suspensão dos peletes numa solução de Tris-HCl 25mM /pH8, NaCl 0,5M, ureia 6M (fracção solúvel microfluidizada). A uma aliquote quer da solução solúvel total, quer da fracção insolúvel, adicionou-se um volume igual de 2X tampão de amostra de Laemlli e β-mercaptopetanol até a uma concentração final de 5 %. Analisaram-se então as amostras por EGPA-SDS Encontrou-se uma

quantidade significativa do produto do gene recombinante de OPGhu met[32-401] na fracção insolúvel. Para purificar os corpos de inclusão da proteína recombinante procedeu-se como se segue: Separaram-se as células bacterianas do meio por meio de centrifugação usando um gradiente de densidade numa centrifugadora J-6B da Beckman equipado com um rotor JS-4,2 a 4.900 x g durante 15 minutos a 4°C. Fez-se uma nova suspensão dos peletes bacterianos em 5 ml de água e depois acertou-se com água até a um volume final de 10 ml. Transferiu-se esta solução para uma taça de aço inoxidável arrefecida com gelo e submeteu-se a um rompimento ultra-sónico utilizando um Sonificador Branson equipado com uma ponta normalizada (energia fixada =5, ciclo de serviço =95 %, 80 disparos). A suspensão das células tratadas por ultra-sons foi centrifugada numa ultracentrifugadora de CCF Optima da Beckman equipado com um rotor TLA 100.3 a 195.000 x g durante 5 a 10 minutos a 23 °C. Eliminou-se o sobrenadante e levaram-se os peletes com uma corrente de água de uma garrafa com esguicho. Recolheram-se os peletes raspando com uma micro-espátula e transferiram-se para um homogeneizador em vidro (15 ml de capacidade). Adicionou-se cinco ml de solução de Percoll (a 75 %, líquido, Percoll, cloreto de sódio 0,15 M) ao homogeneizador e o seu conteúdo foi homogeneizado até se obter uma suspensão uniforme. Aumentou-se o volume para 19,5 ml adicionando solução de Percoll, misturada e distribuída em 3 tubos selados Quick da Beckman (13 x32 mm). Selaram-se os tubos de acordo com as instruções do fabricante. Os tubos foram centrifugados num rotor TLA 100.3 da Beckman a 23 °C, a 20.000 rpm (21,600 x g), 30 minutos. Examinaram-se os tubos para ver o apropriado modelos de bandas. Para recuperar os corpos retrácteis, recuperaram-se fracções do gradiente e juntaram-se, depois diluíram-se com água. Os corpos de

inclusão foram peletizados por centrifugação e estimou-se a concentração em proteína por meio de EGPA-SDS.

Dissolveu-se uma alíquota dos corpos de inclusão isolados, tal como se descreve a seguir, em 1 X tampão de amostra de Laemlli com 5 % de β -mercaptoetanol e resolveu-se num gel de EGPA-SDS e os corpos de inclusão isolados originaram um produto de gene recombinante OPGhu[32-401] altamente purificado. Excisou-se a banda principal de ~42 kDa depois da resolução dos corpos de inclusão num gel de SDS-poliacrilamida a partir de um gel separado e determinou-se a sequência de aminoácidos de terminal N praticamente como descrito (Matsudaira et al. J Mol Biol 262, 10-35 (1987)). A sequência que se segue determinou-se após 19 ciclos:

NH₂ -MDEETSHQLLCDKCPPGTY-COOH (SEQ ID NO: 62)

Verificou-se que esta sequência era idêntica aos primeiros 19 aminoácidos codificados pelo vector de expressão de pAMG21 OPG-Hu met[32-401], produzido por um resíduo de metionina providenciado pelo vector de expressão.

C. OPG humana Met [22-401]

A sequência de ADN que codifica para uma metionina de terminal N e os aminoácidos 22 a 401 da OPG humana são colocados sob o controlo do promotor de luxPR no vector de expressão do plasmídeo procariótico pAMG21 como se segue. O ADN do plasmídeo isolado de pAMG21-OPGhu met[32-401] (ver secção B) foi clivado com as endonucleases de restrição KpnI e BamHI e os fragmentos resultantes foram resolvidos num gel de agarose. O fragmento B (fragmento de 1064 pb) foi isolado do gel utilizando uma metodologia padrão. Os oligonucleó-

tidos sintéticos (oligos) #1267-06 e #1267-07 foram fosforilados individualmente e deixou-se que formassem um duplex de ligante de oligo, que comportava as extremidades coesas NdeI e KpnI, utilizando processos descritos na secção B. O duplex de ligante sintético utilizou codões de E. coli e providenciou um terminal N para metionina. O ligante de oligo fosforilado contendo extremidades coesas de NdeI e KpnI e o fragmento de ~1064 isolado de pAMG21-OPGhu met[32-401] digerido com as endonucleases de restrição KpnI e BamHI foram inseridas direcionalmente entre os sítios de NdeI e BamHI de pAMG21 utilizando uma metodologia padrão de ADN recombinante. A mistura de ligação foi transformada no hospedeiro 393 de E. coli por electroporação utilizando o protocolo do fabricante. Seleccionaram-se clones, isolou-se o ADN do plasmídeo e sequenciou-se o ADN para verificar a sequência de ADN do gene de OPGhu-met [22-401].

Oligo #1267-06

5'-TAT GGA .AAC TTT TCC TCC AAA ATA TCT TCA TTA TGA TGA AGA AAC TTC TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TCC GCC GGG TAC-3'
(SEQ ID NO: 63)

Oligo #1267-07

5'-CCG GCG GAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAG AAG TTT CTT CAT CAT AAT GAA GAT ATT TTG GAG GAA AAG TTT CCA-3'
(SEQ ID NO: 64)

As culturas de pAMG21-OPGhu-met [22-401] na 393 hospedeira de E. coli foram colocadas em meio 2XYT contendo 20 µg/ml de canamicina e foram incubadas a 30 °C antes da indução. Conseguiu-se a indução da expressão recombinante do produto do gene a partir do promotor luxPR do vector pAMG21

no seguimento da adição do autoindutor sintético de lactona de N-(3-oxo-hexanoil)-DL-homo-serina ao meio de cultura até a uma concentração final de 30 ng/ml e da incubação quer a 30 °C ou a 37 °C durante mais 6 horas. Passadas 6 horas, peletizaram-se as culturas bacterianas por centrifugação (=30 °C I+6 ou 37 °C I+6). Também se peletizaram as culturas bacterianas imediatamente antes da indução (= 30 °C PreI) ou alternativamente não se adicionou nenhum indutor a uma cultura separada que se deixou em incubação a 30 °C durante mais 6 horas para se obter uma cultura (30 °C NI) não induzida (NI). Os peletes bacterianos quer de culturas de PreI a 30°C, BI a 30e°C, I +6 a 30 °C, ou de I+6 a 37°C foram novamente suspensos, fez-se a sua lise, e analisou-se por meio de electroforese em gel de SDS-poliacrilamida (EGPA) como descrito Na secção B. Os géis de poliacrilamida ou foram corados com azul de coomassie e/ou transferência de Western para nitrocelulose e foram imuno-sondados com anticorpo policlonal de OPG anti-mu-Fc de coelho, tal como descrito no exemplo 10. O nível do produto do gene no seguimento da indução, comparado com quer uma amostra não induzida (30°C NI) ou uma amostra de pré-indução (30 °C PreI).

D. OPG de murino Met [22-401]

A sequência de ADN que codifica para uma metionina de terminal N e os aminoácidos 22 a 401 do polipéptido de OPG (OPG) de murino (mu) foi colocado sob o controlo do promotor luxPR num vector procariótico de expressão do plasmido pAMG21 como se segue. Realizou-se a RCP utilizando o oligonucleótidos #1257-16 e #1257-15 como iniciadores, o AND da OPG do plasmido pRCCMVMu como matriz e as condições de amplificação de AND como descrito na secção B. O produto da RCP foi purificado e clivado com as endonucleases de

restrição KpnI e BamHI como descrito na secção B. Os oligos sintéticos #1260-61 e #1260-82 foram fosforilados individualmente e deixou-se que formassem um duplex de ligante de oligo com extremidades coesas de NdeI e KpnI utilizando os processos descritos na secção B. O duplex de ligante sintético utilizou codões de E. coli e providenciou uma metionina de terminal N. O duplex de ligante fosforilado formado entre os oligos #1260-61 e #1260-82 contendo extremidades coesas de NdeI e KpnI e as KpnI e BamHI digeriram e purificaram o produto de RCP gerado utilizando os iniciadores de oligo #1257-16 e #1257-15 que foram inseridas direccionalmente entre os sítios de NdeI e BamHI de pAMG21 utilizando uma metodologia padrão. A mistura de ligação foi transformada no hospedeiro 393 de E. coli por electroporação utilizando o protocolo do fabricante. Seleccionaram-se clones, isolou-se o ADN do plasmido e sequenciou-se o ADN para verificar a sequência de ADN do gene de OPGmu-met [22-401].

A expressão do polipéptido recombinante OPGmu met[22-401] a partir de culturas de células 393 comportando o plasmido pAMG21-OPGmu met[22-401] no seguimento da indução foi determinada utilizando processos descritos na secção C.

Oligo #1257-15

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAT AAG CAG CTT ATT TTC ACG GAT TGA AC-3' (SEQ ID NO: 65)

Oligo #1257-16

5'-GTG CTC CTG GTA CCT ACC TAA AAC AGC ACT GCA CAG TG-3' (SEQ ID NO: 66)

Oligo #1260-61

5'-TAT GGA AAC TCT GCC TCC AAA ATA CCT GCA TTA CGA TCC GGA
AAC TGG TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TGC TCC GGG TAC-3'
(SEQ ID NO: 67))

Oligo #1260-82

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG TTT CCG
GAT CGT AAT GCA GGT ATT TTG GAG GCA GAG TTT
CCA-3' (SEQ ID NO: 68)

E. OPG de murino Met [32-401]

A sequência de ADN que codifica para uma metionina de terminal N e os aminoácidos 32 a 401 da OPG de murino são colocados sob o controlo do promotor de luxPR no vector procariótico de expressão do plasmido pAMG21 como se segue. Para se conseguir isto, os oligonucleótidos sintéticos #1267-08 e #1267-09 foram fosforilados individualmente e deixou-se que formassem um duplex de ligante de oligo, utilizando os processos descritos na secção B. O duplex de ligante sintético utilizou codões de E. coli e providenciou uma metionina de terminal N. O duplex de ligante fosforilado formado entre os oligos #1267-08 e #1267-09 contendo extremidades coesas de NdeI e KpnI e as KpnI e BamHI digeriu e purificou o produto de RCP descrito anteriormente (ver secção D), que foi inserido direccionalmente entre os sítios de NdeI e BamHI de pAMG21 utilizando uma metodologia padrão. A mistura de ligação foi transformada no hospedeiro 393 de E. coli por electroporação utilizando o protocolo do fabricante. Seleccionaram-se clones, isolou-se o ADN do plasmido e

sequenciou-se o ADN para verificar a sequência de ADN do gene de OPGmu-met [32-401].

A expressão do polipéptido recombinante de OPGmu met[32-401] a partir de culturas de células 393 comportando o plasmido recombinante pAMG21 no seguimento da indução foi determinada utilizando processos descritos na secção C.

Oligo #1267-08

5'-TAT GGA CCC AGA AAC TGG TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG
TGC TCC GGG TAC-3' (SEQ ID NO: 69)

Oligo #1267-09

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG
TTT CTG GGT CCA-3' (SEQ ID NO: 70)

F. OPG de murino met-lis [22-401]

A sequência de ADN que codifica para uma metionina de terminal N seguida de um resíduo de lisina e os aminoácidos 22 a 401 da OPG de murino são colocados sob o controlo do promotor de luxPR no vector procariótico de expressão do plasmido pAMG21 como se segue. Fosforilaram-se os oligonucleótidos sintéticos #1282-95 e #1282-96 e deixou-se que formassem um duplex de ligante de oligo, utilizando os processos descritos na secção B. O duplex de ligante sintético utilizou codões de E. coli e providenciou uma metionina de terminal N. O duplex de ligante fosforilado formado entre os oligos #1282-95 e #1282-96 contendo extremidades coesas de NdeI e KpnI e as KpnI e BamHI digeriram e purificaram o produto de RCP descrito na secção

D) foi inserido direccionalmente entre os sitios de NdeI e BamHI de pAMG21 utilizando uma metodologia padrão. A mistura de ligação foi transformada no hospedeiro 393 de E. coli por electroporação utilizando o protocolo do fabricante. Seleccionaram-se clones, isolou-se o ADN do plasmido e sequenciou-se o ADN para verificar a sequência de ADN do gene de OPGmu-Lis [22-401].

A expressão do polipéptido recombinante de OPGmu met-lis[22-401] a partir de células 393 transformadas comportando o plasmido recombinante pAMG21 no seguimento da indução foi determinada utilizando processos descritos na secção C.

Oligo #1282-95

5'-TAT GAA AGA. AAC TCT GCC TCC AAA ATA CCT GCA TTA CGA TCC
GGA AAC TGG TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TGC TCC GGG TAC-
3' (SEQ ID NO: 71)

Oligo #1282-96

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG TTT CCG
GAT CGT AAT GCA GGT ATT TTG GAG GCA GAG TTT CTT TCA-3' (SEQ
ID NO: 72)

G. OPG de murino met-lis (his)₇[22-401]

A sequência de ADN que codifica para os resíduos de terminal N Met-Lis-His-His-His-His-His-His (=MKH) seguido dos aminoácidos 22 a 401 de OPG de murino foi colocada sob o controlo do promotor lux PR num vector procariótico de expressão do plasmido pAMG21 como se segue. Realizou-se a RCP utilizando os oligonucleótidos #1300-50 e #1257-15 como iniciadores e o ADN do plasmido pAMG2I -OPGmu-met[22-401]

como matriz. As condições de amplificação do ADN, tal como descrito na secção B. A amostra de RCP resultante foi resolvida em gel de agarose, excisou-se o produto da RCP, purificou-se e clivou-se com as endonucleases de restrição NdeI e BamHI e purificou-se. As NdeI e BamHI digeriram e purificaram o produto de RCP gerado utilizando os iniciadores de oligo #1300-50 e #1257-15 foram direccionalmente inseridos entre os sítios de NdeI e BamHI de pAMG21 utilizando uma metodologia padrão de ADN. A mistura de ligação foi transformada no hospedeiro 393 de E. coli por electroporação utilizando o protocolo do fabricante. Seleccionaram-se clones, isolou-se o ADN do plasmido e sequenciou-se o ADN para verificar a sequência de ADN do gene de OPGmu-MKH [22-401].

A expressão do polipéptido recombinante de OPGmu MKH [22-401] a partir de culturas de células 393 transformadas comportando o plasmido recombinante pAMG21 no seguimento da indução, foi determinada utilizando processos descritos na secção C.

Oligo #1300-50

5'-GTT CTC CTC ATA TGA AAC ATC ATC ACC ATC ACC ATC ATG AAA
CTC TGC CTC CAA AAT ACC TGC ATT ACG AT-3'
(SEQ ID NO: 73).

Oligo #1257-15

(ver secção D)

H. OPG de murino met-lis [22-401] (his)₇

A sequência de ADN que codifica para um resíduo de metilis de terminal N os aminoácidos 22 a 401 da OPG de murino e sete resíduos de histidina no seguimento do aminoácido 401 (=OPGmu MK [22-401]-H₇) são colocados sob o controlo do promotor de lux PR no vector procariótico de expressão do plasmido pAMG21 como se segue. Realizou-se a RCP utilizando os oligonucleótidos #1300-49 e #1300-51 como iniciadores e o ADN de pAMG21-OPGmu met[22-401] como matriz. As condições de amplificação do ADN, tal são as descritas na secção B. A amostra de RCP resultante foi resolvida num gel de agarose, excisou-se o produto da RCP, purificou-se, restringiu-se com as endonucleases de restrição NdeI e BamHI e purificou-se. As endonucleases NdeI e BamHI digeriram e purificaram o produto de RCP foram inseridas direcionalmente entre os sítios de NdeI e BamHI em pAMG21 utilizando uma metodologia normalizada. A ligação foi transformada no hospedeiro 393 de E. coli por electroporação utilizando o protocolo do fabricante. Seleccionaram-se clones, isolou-se o ADN do plasmido e sequenciou-se o ADN para verificar a sequência de ADN do gene de OPGmu-MK [22-401]-H₇.

A expressão do polipéptido recombinante de OPGmu MK-[22-401]-H₇ a partir de células 393 transformadas comportando o plasmido recombinante pAMG21 no seguimento da indução foi determinada utilizando processos descritos na secção C.

Oligo #1300-49

5'-GTT CTC CTC ATA TGA AAG AAA CTC TGC CTC CAA AAT
ACC TGC A-3' (SEQ ID NO: 74)

Oligo #1300-51

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAA TGA TGG TGA TGG TGA TGT AAG
CAG CTT ATT TTC ACG GAT TGA ACC TGA TTC CCT A-3' (SEQ ID NO:
75)

I. OPG de murino met [27-401]

A sequência de ADN que codifica para uma metionina de terminal N e os aminoácidos 22 a 401 da OPG de murino são colocados sob o controlo do promotor de lux PR no vector de expressão do plasmido procariótico pAMG21 como se segue. Realizou-se a RCP utilizando os oligonucleótidos #1309-74 e #1257-15 como iniciadores e o ADN do plasmido pAMG21 -OPGmu-met[22-401] como matriz. As condições de amplificação do ADN foram as descritas na secção B. A amostra do produto de RCP resultante foi resolvida em gel de agarose, excisou-se o produto da RCP, purificou-se e clivou-se com as endonucleases de restrição NdeI e BamHI e purificou-se. As endonucleases NdeI e BamHI digeriram e purificaram o produto de RCP que foi inserido direcionalmente entre os sítios de NdeI e BamHI em pAMG21 utilizando uma metodologia normalizada. A mistura de ligação foi transformada no hospedeiro 393 de E. coli por electroporação utilizando o protocolo do fabricante. Seleccionaram-se clones, isolou-se o ADN do plasmido e sequenciou-se o ADN para verificar a sequência de ADN do gene de OPGmu-met [27-401].

A expressão do polipéptido recombinante de OPGmu met [27-401] a partir de culturas de células 393 transfetadas comportando o plasmido recombinante pAMG21 no seguimento da indução, foi determinada utilizando processos descritos na secção C.

Oligo#1309-74

5'-GTT CTC CTC ATA TGA AAT ACC TGC ATT ACG ATC CGG
AAA CTG GTC AT-3' (SEQ ID NO: 76)

Oligo #1257-15

(ver secção D)

J. OPG humana met [27-401]

A sequência de ADN que codifica para uma metionina de terminal N e os aminoácidos 27 a 401 da OPG humana foi colocada sob o controlo do promotor de lux PR do vector de expressão do plasmido pAMG21 como se segue. Realizou-se a RCP utilizando os oligonucleótidos #1309-75 e #1309-76 como iniciadores e o ADN do plasmido pAMG2I -OPGhu-met[22-401] como matriz. As condições de amplificação do ADN são as descritas na secção B. A amostra de RCP resultante foi resolvida num gel de agarose, excisou-se o produto da RCP, purificou-se, restringiu-se com as endonucleases de restrição AseI e BamHI e purificou-se. As endonucleases AseI e BamHI digeriram e purificaram o produto de RCP anterior que foi inserido direcionalmente entre os sitios de NdeI e BamHI do pAMG21 utilizando uma metodologia normalizada. A mistura de ligação foi transformada no hospedeiro 393 de E. coli por electroporação utilizando o protocolo do fabricante. Seleccionaram-se clones, isolou-se o ADN do plasmido e sequenciou-se o ADN para verificar a sequência de ADN do gene de OPGhu-met [27-401].

A expressão do polipéptido recombinante de OPGhu met[27-401] no seguimento da indução a partir de células 393 transfectadas comportando o plasmido recombinante pAMG21 foi determinada utilizando os processos descritos na secção C.

Oligo #1309-75

5'-GTT CTC CTA TTA ATG AAA TAT CTT CAT TAT GAT
GAA GAA ACT T-3' (SEQ ID NO: 77)

Oligo #1309-76

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAT AAG CAG CTT ATT TTT ACT
GAT T-3' (SEQ ID NO: 78)

K. OPG de murino met [22-180]

A sequência de ADN que codifica para uma metionina de terminal N e os aminoácidos 22 a 180 da OPG de murino são colocados sob o controlo do promotor de lux PR no vector procariótico de expressão do plasmido pAMG2I como se segue. Realizou-se a RCP utilizando os oligonucleótidos #1309-72 e #1309-73 como iniciadores e o ADN do plasmido pAMG2I -OPGmu-met[22-401] como matriz. As condições de amplificação do ADN, tal são as descritas na secção B. A amostra de RCP resultante foi resolvida num gel de agarose, excisou-se o produto da RCP, purificou-se, restringiu-se com as endonucleases de restrição NdeI e BamHI e purificou-se. As endonucleases NdeI e BamHI digeriram e purificaram o produto de RCP que foi inserido direcionalmente entre os sítios de NdeI e BamHI de pAMG2I utilizando uma metodologia normalizada. A ligação foi transformada no hospedeiro 393 de E. coli por electroporação utilizando o protocolo do fabricante. Seleccionaram-se clones, isolou-se o ADN do plasmido e sequenciou-se o ADN para verificar a sequência de ADN do gene de OPGmu-met [22-180].

A expressão do polipéptido recombinante de OPGmu met [22-180] a partir de culturas de células 393 transformadas comportando o plasmido recombinante pAMG21 no seguimento da indução, foi determinada utilizando processos descritos na secção C.

Oligo #1309-72

5'-GTT CTC CTC ATA TGG AAA CTC TGC CTC CAA AAT ACC
TGC A-3' (SEQ ID NO: 79)

Oligo #1309-73

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAT GTT GCA TTT CCT TTC TGA
ATT AGC A-3' (SEQ ID NO: 80)

L. OPG de murino met [27-180]

A sequência de ADN que codifica para uma metionina de terminal N e os aminoácidos 27 a 180 da OPG de murino são colocados sob o controlo do promotor de lux PR no vector procariótico de expressão do plasmido pAMG21 como se segue. Realizou-se a RCP utilizando os oligonucleótidos #1309-74 (ver secção I) e #1309-73 (ver secção K) como iniciadores e o ADN do plasmido pAMG21 -OPGmu-met[22-401] como matriz. As condições de amplificação do ADN, foram as descritas na secção B. A amostra de RCP resultante foi resolvida num gel de agarose, excisou-se o produto da RCP, purificou-se, restringiu-se com as endonucleases de restrição NdeI e BamHI e purificou-se. As endonucleases NdeI e BamHI digeriram e purificaram o produto de RCP anterior que foi inserido direccionalmente entre os sítios de NdeI e BamHI em pAMG21 utilizando uma metodologia normalizada. A mistura de ligação

foi transformada no hospedeiro 393 de E. coli por electroporação utilizando o protocolo do fabricante. Seleccionaram-se clones, isolou-se o ADN do plasmido e sequenciou-se o ADN para verificar a sequência de ADN do gene de OPGmu-met [27-180].

A expressão do polipéptido recombinante de OPGmu met[27-180] a partir de culturas de células 393 transformadas comportando o plasmido recombinante pAMG21 no seguimento da indução foi determinada utilizando os processos descritos na secção C.

M. OPG de murino met[22-189] e met[22-194]

A sequência de ADN que codifica para uma metionina de terminal N e os aminoácidos 22 a 189 ou 22 a 194 de OPG de murino foram colocados sob o controlo do promotor lux PR de um vector procariótico de expressão do plasmido pAMG21 como se segue. O par de oligonucleótidos de síntese #1337-92 e #1337-93 (= ligante de OPGmu-189) ou #1333-57 e #1333-58 (= ligante de OPGmu-194) foi fosforilado individualmente e deixou-se que formasse um par de duplexes de ligante de oligo utilizando os processos descritos na secção B. O ADN do plasmido purificado de pAMG21-OPGmu-met[22-401] foi clivado com as endonucleases de restrição KpnI e BspEI e os fragmentos de ADN resultantes foram resolvidos num gel de agarose. O fragmento B de ~413 pb foi isolado utilizando uma metodologia normalizada de ADN de recombinante. Os duplexes dos ligantes de oligo fosforilados formados entre quer os oligos #1337-92 e #1337-93 (ligante de OPGmu-189) ou os oligos #1333-57 e #1333-58 (ligante de OPGmu-194) contendo as extremidades coesas de BspEI e BamHI, e o fragmento B de ~413 pb do plasmido pAMG21-OPGmu-met[22-401] digerido com as

endonucleases de restrição anteriores KpnI e BspEI, foi inserido direccionalmente entre os sítios KpnI e BamHI de pAMG21-OPGmu met[22-401] utilizando uma metodologia normalizada. Cada mistura de ligação foi transformada nos hospedeiros 393 de E. coli por electroporação utilizando o protocolo do fabricante. Seleccionaram-se clones, isolou-se o ADN do plasmido e sequenciou-se o ADN para verificar a sequência de ADN quer do gene de OPGmu-met [22-189], quer do gene de OPGmu-met[22-194].

A expressão dos polipéptidos recombinantes de OPGmu-met[22-189] e OPGmu-met[22-194] a partir dos plasmidos recombinantes pAMG21 transformados em células 393 foi determinada utilizando processos descritos na secção C.

Oligo #1337-92

5'-CCG GAA ACA GAT AAT GAG-3' (SEQ ID NO:81)

Oligo #1337-93

5'-GAT CCT CAT TAT CTG TTT-3' (SEQ ID NO:82)

Oligo #1333-57

5'-CCG GAA ACA GAG AAG CCA CGC AAA AGT AAG-3' (SEQ ID NO: 83)

Oligo #1333-58

5'-GAT CCT TAC TTT TGC GTG GCT TCT CTG TTT-3' (SEQ ID NO: 84)

N. OPG de murino met[21-189] e met[27-194]

A sequência de ADN que codifica para uma metionina de terminal N e os aminoácidos 27 a 189 ou 27 a 194 da OPG de

murino foram colocados sob o controlo do promotor de lux PR no vector procariótico de expressão de pAMG21 como se segue. Os ligantes de oligo fosforilados quer "o ligante OPGmu-189" ou "o ligante OPGmu-194" (ver secção M) contendo as extremidades coesas de BspEI e BamHI e o fragmento B isolado de ~413 pb do plasmido pAMG21-OPGmu-met[22-401] digeridos com as endonucleases de restrição KpnI e BspEI foram inseridos direccionalmente entre os sítios KpnI e BamHI do plasmido pAMG21-OPGmu-met[27-401] utilizando uma metodologia padrão. Cada ligação foi transformada no hospedeiro 393 de E. coli por electroporação utilizando o protocolo do fabricante. Seleccionaram-se clones, isolou-se o ADN do plasmido e sequenciou-se o ADN para verificar a sequência de ADN quer do gene de OPGmu-met [27-189], quer do gene de OPGmu-met[27-194].

A expressão dos polipéptidos recombinantes de OPGmu met[27-189] e OPGmu-met[27-194] no seguimento da indução de células 393, comportando o plasmido recombinante pAMG21 foi determinada utilizando os processos descritos na secção C.

O. OPG humano met[22-185], met [22-189], e met[22-194]

A sequência de ADN que codifica para uma metionina de terminal N e quer os aminoácidos 22 a 185, 22 a 189 ou 22 a 194 do polipéptido da OPG humana foram colocados sob o controlo do promotor de lux PR no vector procariótico de expressão de pAMG21 como se segue. O par de oligonucleótidos de síntese #1331-87 e #1331-88 (= ligante de OPGhu-185) ou #1331-89 e #1331-90 (= ligante de OPGhu-189) ou #1331-91 & #1331-92 (= ligante de OPGhu-194) foram fosforilados individualmente e deixou-se que cada um formasse um par de duplexes de ligante de oligo utilizando os processos

descritos na secção B. O ADN do plasmido purificado de pAMG21-OPGhu-met[27-401] foi restringido com as endonucleases de restrição KpnI e NdeI e os fragmentos de ADN resultantes foram resolvidos num gel de agarose. O fragmento B de ~407 pb foi isolado utilizando uma metodologia normalizada de ADN recombinante. Os duplexes dos ligantes de oligo fosforilados formados entre quer os oligos #1331-87 e #1331-88 (ligante de OPGhu-185) ou os oligos #1331-89 e #1331-90 (ligante de OPGhu-189) ou os oligos #1331-91 e #1331-92 (ligante de OPGhu-194) [cada ligante contém as extremidades coesas NdeI e BamHI] e o fragmento B de ~407 pb do plasmido pAMG21-OPGhu-met[27-401] digerido com as endonucleases de restrição anteriores KpnI e NdeI anteriores, foi inserido direccionalmente entre os sítios KpnI e BamHI do plasmido pAMG21-OPGhu met[22-401] utilizando uma metodologia normalizada. Cada ligação foi transformada no hospedeiro 393 de E. coli por electroporação utilizando o protocolo do fabricante. Seleccionaram-se clones, isolou-se o ADN do plasmido e sequenciou-se o ADN para verificar a sequência de ADN quer do gene de OPGhu-met [22-185], quer do gene de OPGhu-met[22-189].quer do gene de OPGhu-met[22-194].

A expressão de OPGhu-met[22-185], OPGhu-met[22-189] ou OPGhu-met[22-194] recombinantes em células 393 transformadas, comportando o plasmido recombinante pAMG21 no seguimento da indução, foi determinada utilizando os processos descritos na secção C.

Oligo #1331-87

5'-TAT GTT AAT GAG-3' (SEQ ID NO: 85)

Oligo #1331-88

5'-GAT CCT CAT TAA CA-3' (SEQ ID NO: 86)

Oligo #1331-89

5'-TAT GTT CCG GAA ACA GTT AAG-3' (SEQ ID NO: 87)

Oligo #1331-90

5'-GAT CCT TAA CTG TTT CCG GAA CA-3' (SEQ ID NO: 88)

Oligo #1331-91

5'-TAT GTT CCG GAA A C A GTG A A T CAA CTC AAA AAT AAG-
3' (SEQ ID N° 89)

Oligo #1331-92

5'-GAT CCT TAC TTT TGC GTG GCT TCT CTG TTT-3' (SEQ ID
NO: 90)

P. OPG humana met[27-185], met [27-189] e met[27-194]

A sequência de ADN que codifica para uma metionina de terminal N e qualquer um dos aminoácidos 27 a 185, 27 a 189, ou 27 a 194 do polipéptido de OPG humana foram colocados sob o controlo do promotor lux PR de um vector procariótico de expressão do plasmido pAMG21 como se segue. Os ligantes de oligo fosforilados "ligante de OPGhu-185", "ligante de OPGhu-189", ou "ligante deOPGhu-194" (Ver Secção O) contendo cada um as extremidades coesas de NdeI e BamHI, e o fragmento B de ~407 pb isolado do plasmido pAMG21-OPGhu-met[27-401] digerido com as endonucleases de restrição KpnI e NdeI, foram inseridos direccionalmente entre os sítios KpnI e BamHI do plasmido pAMG21-OPGhu met[27-401] (ver secção J) utilizando uma metodologia normalizada. Cada ligação foi transformada no hospedeiro 393 de E. coli por electroporação utilizando o protocolo do fabricante. Seleccionaram-se clones, isolou-se o ADN do plasmido e sequenciou-se o ADN para verificar a

sequência de ADN quer do gene de OPGhu-met [27-185], quer do gene de OPGhu-met [27-189]. quer do gene de OPGhu-met [27-194].

A expressão de OPGhu-met [27-185], OPGhu-met [27-189], e OPGhu-met [27-194] recombinantes a partir dos plasmídios recombinantes pAMG21 transformados em células 393 foi determinada utilizando os processos descritos na secção C.

O. OPG de murino met [27-401] (P33E, G36S, A45P)

A sequência de ADN que codifica para uma metionina de terminal N e os aminoácidos 27 a 48 da OPG humana seguida dos resíduos de aminoácidos 49 a 401 de OPG de murino foi colocada sob o controlo do promotor de lux PR do vector de expressão do plasmídeo pAMG21 como se segue. O ADN do plasmídeo purificado de pAMG21-OPGhu met[27-401] (ver secção J) foi clivado com as endonucleases de restrição AallI e KpnI e um fragmento B de ~1075 pb isolados de um gel de agarose utilizando uma metodologia normalizada de ADN recombinante. Adicionalmente, o ADN do plasmídeo pAMG21-OPGmu-met [22-401] (Ver Secção D) foi digerido com as endonucleases de restrição KpnI e BamHI e o fragmento B isolado de ~1064 pb B tal como se descreveu antes. O fragmento de restrição isolado pAMG21-OPGhu-met[27-401] de ~1075 pb das extremidades coesas de AatII & KpnI (ver antes), o fragmento de restrição pAMG21-OPGmu-met[22-401] de ~1064 pb e as extremidades pegajosas de KpnI e BamHI e um fragmento de restrição de ~5043 pb contendo as extremidades coesas AatII e BamHI correspondendo à sequência de ácidos nucleicos de pAMG21 entre AatII & BamHI foram ligados utilizando uma metodologia normalizada de ADN recombinante. A ligação foi transformada no hospedeiro 393 de E. coli por electroporação utilizando o protocolo do fabricante. Seleccionaram-se os clones e verificou-se a

presença da inserção recombinante no plasmido utilizando uma metodologia normalizada de ADN recombinante. As alterações nos aminoácidos dos genes de OPGmu-27-401 (P33E, G36S, A45P) em OPGmu desde prolina-33 até ao ácido glutâmico-33, glicina-36 até serina-36, e alanina-45 até prolina-45, resultaram da substituição dos resíduos de OPGmu 27 a 48 pelos resíduos de OPGhu 27 a 48.

A expressão de OPGmu-met[27-401] recombinante (P33E, G36S, A45P) a partir de células 393 comportando o plasmido recombinante pAMG21 foi determinada utilizando os processos descritos na secção C.

R. OPG de murino met-lis (his)₇-ala-ser-(asp) 4 lis [22-401] (A45T)

A sequência de ADN que codifica para uma sequência de reconhecimento de enterocinase de terminal N é marcada com His que é (de terminal NH₂ para COOH) Met-Lis-His-His-His-His-His-Ala-Ser-Asp-Asp-Asp-Asp-Lis (=HEK), seguida dos aminoácidos 22 a 401 do polipeptído de OPG de murino foi colocada sob o controlo do promotor Ps4 regulado pelo promotor lac como se segue: pAMG22-His (Ver Secção A) foi digerido com as endonucleases de restrição de NheI e BamHI e o fragmento grande (o fragmento A) foi isolado a partir de gel de agarose gel utilizando uma metodologia normalizada de ADN recombinante. Os oligonucleótidos #1282-91 e #1282-92 foram fosforilados individualmente e deixou-se que formassem um duplex de ligante de oligo, utilizando os processos previamente descritos (Ver Secção B). O duplex de ligante fosforilado formado entre os oligos #1282-91 e #1282-09 contendo extremidades coesas de NdeI e KpnI e as KpnI e BamHI digeriram e purificaram o produto de RCP descrito (ver secção

D), e o fragmento A do vector pAMG22-His digerido com NdeI e BamHI foram ligados utilizando uma metodologia normalizada de ADN recombinante. A ligação foi transformada no hospedeiro GM120 de E. coli por electroporação utilizando o protocolo do fabricante. Seleccionaram-se clones, isolou-se o ADN do plasmido e sequenciou-se o ADN para verificar a sequência de ADN do gene de OPGmu-HEK [22-401]. A sequenciação do ADN revelou uma mutação espúria na sequência natural de OPGmu que resultou numa única alteração do aminoácido da alanina-45 do polipeptído de OPGmu até a uma treonina.

A expressão da OPGmu-HEK[22-401] (A45T) recombinante a partir das células comportando o plasmido recombinante pAMG21 foi determinada utilizando processos similares aos descritos na secção C, excepto no facto de, em vez da adição do autoindutor sintético, adicionou-se IPTG até se conseguir uma indução final de 0,4 mM.

Oligo #1282-91

5'-CTA GCG ACG ACG ACG ACA. AAG AAA CTC TGC CTC CAA
AAT ACC TGC ATT ACG ATC CGG AAA CTG GTC ATC AGC TGC TGT
GTG ATA AAT GTG CTC CGG GTA C-3' (SEQ ID NO: 91)

Oligo #1282-92

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG
TTT CCG GAT CGT AAT GCA GGT ATT TTG GAG GCA GAG TTT CTT
TGT CGT CGT CGT CG-3' (SEQ ID NO: 92)

S. OPG humana met-arg-gli-ser-(his)₆ [22-401]

Prepararam-se oito oligonucleótidos (1338-09 a 1338-16 que se mostram a seguir) para produzir um fragmento de 175 bases como sobreposição, de um ADN de filamento duplo. Os oligos foram anelados, ligados, e os oligos 5' e 3' foram utilizados como iniciadores de RCP para produzir grandes quantidades do fragmento com 175 bases. Os produtos finais do gene de RCP foram digeridos com as endonucleases de restrição ClaI e KpnI para se obter um fragmento que substitui os 28 codões de terminal N de OPG humana. O produto de RCP digerido por ClaI e KpnI foi inserido no pAMG21-OPGhu [27-401] que tinha sido clivado com ClaI e KpnI. O ADN ligado foi transformado nas células hospedeiras competentes da estirpe 393 de E. coli. Rastrearam-se os clones quanto à capacidade para produzir o produto da proteína recombinante e a possuir a fusão do gene com a sequência correcta de nucleótidos. Determinaram-se os níveis de expressão das proteínas a partir de estudos feitos em frascos de agitação de 50 ml. Analisaram-se os produtos completos da lise das células e os peletes tratados por ultra-sons quanto à expressão da estrutura por meio de géis de EGPA corados com Coomassie e fez-se a análise de Western com anticorpo anti-OPG de murino. A expressão de OPGhu Met-Arg-Gli-Ser-(His)₆ [22-401] resultou na formação de corpos de inclusão grandes e localizou-se a proteína com a fracção insolúvel (pélete).

1338-09

ACA AAC ACA ATC GAT TTG ATA CTA GA (SEQ ID NO: 93)

1338-10

TTT GTT TTA ACT AAT TAA AGG AGG AAT AAA ATA TGA GAG GAT
CGC ATC AC (SEQ ID NO: 94)

1338-11

CAT CAC CAT CAC GAA ACC TTC CCG CCG AAA TAC CTG CAC TAC
GAC GAA GA (SEQ ID NO: 95)

1338-12

AAC CTC CCA CCA GCT GCT GTG CGA CAA ATG CCC GCC GGG TAC
CCA AAC A (SEQ ID NO: 96)

1338-13

TGT TTG GGT ACC CGG CGG GCA TTT GT (SEQ ID NO: 97)

1338-14

CGC ACA GCA GCT GGT GGG AGG TTT CTT CGT COT AGT GCA GGT
ATT TCG GC (SEQ ID NO: 98)

1338-15

GGG AAG GTT TCG TGA TGG TGA TGG TGA TGC GAT CCT CTC ATA
TTT TAT T (SEQ ID NO: 99)

1338-16

CCT CCT TTA ATT AGT TAA AAC AAA TCT AGT ATC AAA TCG ATT
GTG TTT G (SEQ ID NO: 100)

T. OPG humana met-lis [22-401] e met-(lis)₃ [22-401]

Para preparar as estruturas de met-lis e met-(lis)₃ de OPG[22-401] humana, os oligonucleótidos sobrepostos foram desenhados para adicionar o número apropriado de resíduos de lisina. Os dois oligos para cada estrutura foram projectados para se sobrepor, permitindo dois ciclos de RCP para produzir o produto final. A matriz para a primeira reacção de RCP foi a preparação do ADN de um plasmido contendo o gene de OPG humana 22-401. A primeira RCP adicionou o(s) resíduo(s) de lisina. A segunda RCP utilizou o produto do primeiro ciclo e adicionou a sequência novamente ao primeiro sítio de restrição, ClaI.

Os produtos do gene da RCP final digeridos com as endonucleases de restrição ClaI e KpnI, que substituem os 28 codões de terminal N de OPG humana, foram então ligados no plasmido pAMG21- OPGhu [27-401] que tinha sido digerido com as duas endonucleases de restrição. O ADN ligado foi

transformado nas células hospedeiras competentes da estirpe 393 de E. coli. Rastrearam-se os clones quanto à capacidade para produzir o produto da proteína recombinante e a possuir a fusão do gene com a sequência correcta de nucleótidos. Determinaram-se os níveis de expressão das proteínas a partir de estudos feitos em frascos de agitação de 50 ml. Analisaram-se os produtos completos da lise das células e os peletes tratados por ultra-sons quanto à expressão da estrutura por meio de géis de EGPA corados com Coomassie e fez-se a análise de Western com anticorpo anti-OPG de murino. Nenhuma estrutura tinha um nível detectável de expressão de proteína e os corpos de inclusão não estavam visíveis. As sequências de ADN foram confirmadas pela sequenciação do ADN.

Iniciadores de oligonucleótidos para preparar Met-Lis OPGhu[22-401]:

1338-17

ACA. AAC ACA ATC GAT TTG ATA CTA GAT TTG TTT TAA CTA ATT
AAA GGA GGA ATA AAA TG (SEQ ID NO: 101)

1338-18

CTA ATT AAA GGA GGA ATA AAA. TGA AAG AAA CTT TTC. CTC
CAA.AAT ATC (SEQ ID NO: 102)

1338-20

TGT TTG GGT ACC COG CGG AGA TTT ATC ACA C (SEQ ID NO:
103)

Iniciadores de oligonucleótilo para preparar Met-(Lis)₃-OPGhu[22-401]:

1338-17

ACA AAC ACA ATC GAT TTG ATA CTA GAT TTG TTT TAA CTA ATT
AAA GGA GGA ATA AAA TG (SEQ ID NO: 104)

1338-19

CTA ATT AAA GGA GGA ATA AAA TGA AAA AAA AAG AAA CTT TTC
CTC CAA AAT ATC (SEQ ID NO: 105)

1338-20

TGT TTG GGT ACC CGG CGG ACA TTT ATC ACA C (SEQ ID NO:
106)

U. Fusões de OPG humana e de murino [22-401]/Fc

Construiram-se quatro fusões de OPG-Fc em que a região Fc da IgG1 foi fundida no terminal N de cada um dos aminoácidos 22 a 401 da osteoprotegerina humana ou de murino (referida como Fc/OPG [22-401]) ou no terminal C (referida como OPG[22-401]/Fc). As fusões de Fc foram construídas utilizando o vector de fusão pFc-A3 descrito no Exemplo 7.

Todos os genes de fusão foram construídos utilizando tecnologia normalizada de RCP. A matriz para as reacções de RCP foram preparações de plasmido contendo os genes-alvo. Os oligos de sobreposição foram desenhados para combinar a porção do terminal C de um dos genes com a porção do terminal N de outro gene. Este processo permite a fusão de dois genes em conjunto no quadro de leitura correcto depois de terem sido realizadas as reacções de RCP apropriadas. Inicialmente colocou-se um oligo de "fusão" para cada gene numa reacção de RCP com um iniciador universal para o vector que comporta o

gene-alvo. Utilizou-se o oligo de "fusão" complementar com um iniciador universal para a RCP de outro gene. No final desta reacção de RCP, obtiveram-se dois produtos separados, com cada gene individual tendo presente um sítio de fusão, criando uma sobreposição suficiente para levar ao segundo ciclo de RCP e criar a fusão desejada. No segundo ciclo de RCP, combinaram-se os dois primeiros produtos de RCP em conjunto com os iniciadores universais e, por via das regiões de sobreposição, produziu-se a sequência de ADN de fusão de comprimento completo.

Os produtos finais dos genes de RCP foram digeridos com as endonucleases de restrição XbaI e BamHI, e depois foram ligados ao pAMG21 do vector que tinha sido digerido com as duas endonucleases de restrição. O ADN ligado foi transformado nas células hospedeiras competentes da estirpe 393 de E. coli. Rastrearam-se os clones quanto à capacidade para produzir o produto da proteína recombinante e a possuir a fusão do gene com a sequência correcta de nucleótidos. Determinaram-se os níveis de expressão das proteínas a partir de estudos feitos em frascos de agitação de 50 ml. Analisaram-se os produtos completos da lise das células, os peletes tratados por ultra-sons e o sobrenadante quanto à expressão da fusão por meio de géis de EGPA corados com Coomassie e fez-se a análise de Western com anticorpo anti-OPG de murino.

Fc/OPGhu [22-401]

A expressão do péptido de fusão Fc/OPGhu [22-401] foi detectada num gel de EGPA corado com Coomassie e numa análise de "Western blot". As células têm corpos de inclusão muito grandes e a maioria do produto está numa fracção insolúvel

(pélete). Os iniciadores que se seguem foram utilizados para construir esta fusão de OPG-Fc:

1318-48

CAG CCC GGG TAA AAT GGA AAC GTT TCC TCC AAA ATA TCT
TCA TT (SEQ ID NO: 107)

1318-49

CGT TTC CAT TTT ACC CGG GCT GAG CGA GAG GCT CTT CTG
CGT GT (SEQ ID NO: 108)

Fc/OPGmu [22-401]

A expressão do péptido de fusão foi detectada num gel corado com Coomassie e numa análise de "Western blot". As células têm corpos de inclusão muito grandes e a maioria do produto está numa fração insolúvel (pélete). Os iniciadores que se seguem foram utilizados para construir esta fusão de OPG-Fc:

1318-50

CGC TCA GCC CGG GTA AAA TGG AAA CGT TGC CTC CAA AAT
ACC TGC (SEQ ID NO: 109)

1318-51

CCA TTT TAC CCG GGC TGA GCG AGA GGC TCT TCT GCG TGT
(SEQ ID NO: 110)

OPGmu [22-401]/Fc

A expressão do péptido de fusão foi detectada num gel corado com Coomassie e numa análise de "Western blot". A quantidade de produto recombinante foi inferior à das proteínas de fusão de OPG com a região Fc região na posição do terminal N. Não se observaram corpos de inclusão detectáveis. A maior parte do produto parecia estar na fracção insolúvel (pélete). Os iniciadores que se seguem foram utilizados para construir esta fusão de OPG-Fc:

1318-54

GAA AAT AAG CTG CTT AGC TGC AGG TGA ACC AAA ATC (SEQ ID NO: 111)

1318-55

CAG CTG CAG CTA AGC AGC TTA TTT TCA CGG ATT G (SEQ ID NO: 112)

OPGhu [22-401]/Fc

A expressão do péptido de fusão foi detectada num gel corado com Coomassie, embora estivesse presente um sinal positivo fraco numa análise de "Western". Não se detectaram corpos de inclusão óbvios. Os iniciadores que se seguem foram utilizados para construir esta fusão de OPG-Fc:

1318-52

AAA AAT AAG CTG CTT AGC TGC AGC TGA ACC AAA ATC (SEQ ID NO: 113).

1318-53

CAG CTG CAG CTA AGC AGC TTA TTT TTA CTG ATT GG (SEQ ID NO: 114)

V. Fusão de OPG humana met [22-401]-Fc (P25A)

Esta estrutura combina uma troca do aminoácido prolina por alanina na posição 25 (P25A) com a fusão de OPGhu met [22-401] -Fc. O plasmido foi digerido com as endonucleases de restrição ClaI e KpnI, que eliminam 28 codões de terminal N do gene, e o fragmento pequeno resultante (menos do que 200 pares de bases) foi purificado em gel. Este fragmento que contém troca do aminoácido prolina por alanina foi então ligado na fusão do plasmido pAMG21-huOPG [22-401]-Fc que tinha sido digerido com as duas endonucleases de restrição. O ADN ligado foi transformado nas células hospedeiras competentes da estirpe 393 de E. coli. Rastrearam-se os clones quanto à capacidade para produzir o produto da proteína recombinante e a possuir a fusão do gene com a sequência correcta de nucleótidos. Determinaram-se os níveis de expressão das proteínas a partir de estudos feitos em frascos de agitação de 50 ml. Analisaram-se os produtos completos da lise das células e os peletes tratados por ultra-sons quanto à expressão da estrutura por meio de géis de EGPA corados com Coomassie e fez-se a análise de Western com anticorpo anti-OPG de murino. O nível de expressão do péptido de fusão foi detectado por EGPA com um gel corado com Coomassie e numa análise de "Western blot". A proteína estava na fracção insolúvel (pélete). As células tinham grandes corpos de inclusão.

W. OPG humana met [22-401] (P25A)

Construiu-se como se segue uma sequência de ADN que codifica para uma metionina de terminal N e os aminoácidos 22 a 401 da OPG humana com a prolina na posição 25 substituída por alanina sob o controlo do promotor de lux P_R no vector procariótico de expressão do pAMG21. Os oligos sintéticos #

1289-84 e 1289-85 foram emparelhados para formar um duplex de ligante de oligo com as extremidades coesas de XbaI e KpnI. O duplex do ligante sintético utilizou codões optimizados de E. coli e codificou uma metionina de terminal N. O ligante também incluiu um sítio de restrição de SpeI que não estava presente na sequência original. O duplex do ligante foi inserido direcionalmente entre os sítios XbaI e KpnI em pAMG21-OPGhu-22-401 utilizando processos normalizados. Cada mistura de ligação foi transformada nos hospedeiros GM221 de E. coli por transformação. Os clones foram inicialmente rastreados quanto à produção da proteína recombinante. Isolou-se o ADN do plasmido a partir de clones positivos e sequenciou-se o ADN para verificar a sequência de ADN do gene de OPGhu-Met [22-401]. (P25A). Os oligonucleótidos que se seguem foram utilizados para gerar o ligante de XbaI-KpnI:

Oligo #1289-84

5'-CTA GAA GGA GGA ATA ACA TAT GGA AAC TTT TGC TCC AAA
ATA TCT TCA TTA TGA TGA AGA AAC TAG TCA TCA. GCT GCT GTG
TGA TAA ATG TCC GCC GGG TAC -3' (SEQ ID NO: 115)

Oligo #1289-85

5'-CCG GCG GAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAG AAG TTT
CTT CAT CAT AAT GAA GAT ATT TTG GAG GAA AAG TTT CCA
TAT GTT ATT CCT CCT T-3' (SEQ ID NO: 116)

X. OPG humana met [22-401] (P25A) e (P26D)

Construiu-se como se segue uma sequência de ADN que codifica para uma metionina de terminal N e os aminoácidos 22 a 401 da OPG humana com a prolina na posição 26 substituída

por alanina sob o controlo do promotor de lux P_R no vector procariótico de expressão do pAMG21 foi: os oligos sintéticos # 1289-86 e 1289-87 foram emparelhados para formar um duplex de ligante de oligo com as extremidades coesas de XbaI e KpnI. O duplex do ligante sintético utilizou codões optimizados de E. coli e codificou uma metionina de terminal N. O duplex do ligante foi inserido direccionalmente entre os sitios XbaI e KpnI em pAMG21-OPGhu[22-401] (P25A) utilizando processos normalizados. Cada mistura de ligação foi introduzida nos hospedeiros GM221 de E. coli por transformação. Os clones foram inicialmente rastreados quanto à produção da proteína recombinante. Isolou-se o ADN do plasmido a partir de clones positivos e sequenciou-se o ADN para verificar a sequência de ADN do gène de OPGhu-met [22-401]. (P26A). Verificou-se que um dos clones sequenciados tem a prolina na posição 26 substituída por ácido aspártico em vez de alanina e este clone foi designado por OPGhu-met[22-401] (P26D). Os oligonucleótidos que se seguem foram utilizados para gerar o ligante de XbaI-SpeI:

Oligo #1289-86

5' - CTA GAA GGA GGA ATA ACA TAT GGA AAC TTT TCC
TGC TAA ATA TCT TCA TTA TGA TGA AGA AA - 3' (SEQ ID NO:
117)

Oligo #1289-87

5' - CTA GTT TCT TCA TCA TAA TGA AGA TAT TTA GCA
GGA AAA GTT TCC ATA TGT TAT TCC TCC TT - 3' (SEQ ID NO:
118)

Y. OPG humana met [22-1941] (P25A)

Construiu-se como se segue uma sequência de ADN que codifica para uma metionina de terminal N e os aminoácidos 22 a 194 da OPG humana com a prolina na posição 25 substituída por alanina sob o controlo do promotor de lux P_R no vector procariótico de expressão do pAMG21: os plasmídios pAMG21-OPGhu[27-194] e pAMG21-OPGhu[22-401] (P25A) foram todos digeridos com as endonucleases KpnI e BamHI. Isolou-se o fragmento de 450 pb a partir de pAMG21-OPGhu [27-194] e o fragmento de 6,1 kpb a partir de pAMG21-huOPG[22-401] (P25A). Estes fragmentos foram ligados e introduzidos no hospedeiro GM221 de E. coli por transformação. Os clones foram inicialmente rastreados quanto à produção da proteína recombinante. Isolou-se o ADN do plasmídeo a partir de clones positivos e sequenciou-se o ADN para verificar a sequência de ADN do gene de OPGhu-Met [22-194]. (P25A).

EXEMPLO 9

Associação de monômeros de OPG

As células de OHC tratadas por engenharia genética para sobre-expressar OPGmu [22-401] foram utilizadas para gerar o meio condicionado para a análise do OPG recombinante segregado utilizando anticorpos policlonais anti-OPG de coelho. Concentrou-se 20 vezes uma aliquota de meio condicionado, depois analisou-se por EGPA-SDS redutora e não redutora (Figura 15). Em condições redutoras, a proteína migrou como um polipéptido M_r de 50-55 kd, como seria previsível se o produto maduro for glicosilado em um ou mais dos seus sítios de glicosilação de consenso ligados a N. Surpreendentemente, quando se analisaram as mesmas amostras por EGPA-SDS não redutora, a maior parte da proteína migrou

sob a forma de um polipéptido de aproximadamente 100 kd, com uma dimensão dupla da proteína reduzida. Além disso, havia uma quantidade menor do polipéptido Mr de 50-55 kd. Este modelo de migração em EGPA-SDS foi consistente com a noção de que o produto de OPG estava a formar dímeros durante a oxidação dos grupos sulfidrilo livres.

O polipéptido de OPG maduro previsto contém 23 resíduos de cisteína, 18 dos quais previsivelmente estariam envolvidos na formação de pontes de disulfureto entre as cadeias que compreende os quatro domínios ricos em cisteína (Figura 12A). Os cinco resíduos de cisteína de terminal C remanescentes não estão envolvidos na estrutura secundária que se pode prever com base na homologia com outros elementos da família dos R-FNT. Acima de tudo há um número ímpar de resíduos de cisteína e é formalmente possível que pelo menos um resíduo esteja livre para formar uma ligação de sulfureto intermolecular entre os dois monómeros de OPG.

Para ajudar a esclarecer os modelos da cinase de OPG e a associação dos monómeros, realizou-se um estudo de marcação por meio de "pulse-chase". Marcaram-se sob o ponto de vista metabólico células de OHC que expressam OPGmu [22-401] tal como se descreveu antes em meio isento de soro contendo ^{35}S metionina e cisteína durante 30 min. Passado este período, retirou-se o meio e substituiu-se com meio completo contendo metionina e cisteína não marcadas a níveis de aproximadamente 2.000 vezes em excesso em relação à concentração original dos aminoácidos radioactivos. Aos 30 min, 1 hr, 2 hr, 4 hr, 6 hr e 12 hr após a adição, colheram-se as culturas por eliminação do meio condicionado e prepararam-se os produtos da lise do meio condicionado e as monocamadas aderentes. O meio de cultura e os produtos da lise das células foram purificados

tal como se descreveu antes, e depois imunoprecipitou-se utilizando anticorpos anti-OPG tal como se descreveu antes. Depois de se lavarem os produtos imunoprecipitados, eles libertaram-se por ebuição num tampão de EGPA-SDS não redutor e depois dividiram-se em duas metades iguais. A uma das metades, adicionou-se o agente redutor β -mercaptoetanol até a uma concentração final de 5 % (v/v), enquanto se manteve a outra metade em condições não redutoras. Analisaram-se ambos os conjuntos de imunoprecipitados por EGPA-SDS tal como se descreveu antes, depois trataram-se por autoradiografia e expôs-se a um filme. Os resultados estão ilustrados na Figura 16. As amostras analisadas por EGPA-SDS estão descritas no fundo dos dois painéis. Depois da síntese, o polipeptído de OPG é rapidamente tratado até se obter um polipeptído ligeiramente maior, que provavelmente representa uma modificação por glicosilação ligada a N. Passadas aproximadamente 1-2 horas, o nível de OPG na célula diminui drasticamente e concomitantemente aparece no sobrenadante da cultura. Isto parece ser o resultado do transporte vectorial de OPG a partir da célula no meio ao longo do tempo, consistente com a noção de que OPG é uma proteína segregada naturalmente. A análise dos mesmos imunoprecipitados em condições não redutoras revela a relação entre a formação de dímeros de OPG e a secreção em meio condicionado (figura 16, painéis superiores). Nos primeiros 30-60 minutos, os monómeros de OPG são tratados na célula por glicosilação aparente, seguido da formação de dímeros. Ao longo do tempo, o volume dos monómeros de OPG são transformados em dímeros, que em seguida desaparecem da célula. Ao fim de cerca de 60 minutos após a síntese, os dímeros de OPG aparecem no meio condicionado e acumulam-se durante toda a experiência. Ao fim deste período, formam-se dímeros de OPG, que são então segregados no meio de cultura. Os monómeros de OPG persistem

a um nível baixo dentro da célula ao longo do tempo e apareceram quantidades pequenas no meio. Não parece ser o resultado da quebra de dímeros de OPG covalentes, mas antes a produção de quantidades sub-estequiométricas de monómeros na célula e na secreção subsequente.

A OPG produzida por via recombinante a partir das células de OHC transfectadas parece ser predominantemente um dímero. Para determinar se a dimerização é um processo natural na síntese de OPG, os requerentes analisaram o meio condicionado de uma linha de células que se verificou expressarem naturalmente OPG. Verificou-se que a linha de células CTLL-2, uma linha de células T linfocíticas citotóxicas de murino (ATCC nº de acesso TIB-214), expressa o ARNm de OPG no rastreio de um tecido e no ARN de uma linha de células. Verificou-se que o transcrito de OPG era o mesmo que o ARN clonado e sequenciado de 2,5-3,0 kb identificado no rim e que se verificou codificar uma molécula segregada. A análise de "Western blot" do meio condicionado obtida a partir das células CTLL-2 mostra que a maior parte, senão toda a proteína OPG segregada é um dímero (Figura 17). Isto sugere que a dimerização de OPG e a secreção não é um artefacto da sobre-expressão numa linha de células, mas é provável que seja a principal forma do produto à medida que ele vai sendo produzido por expressão das células.

Analisaram-se tecidos de ratos normais e de ratos transgénicos e soro para determinar a natureza da molécula de OPG expressa na OPG de ratos transgénicos. Dado que o ADNc da OPG de rato foi expresso sob o controlo de um elemento de controlo de um hepatócito, analisaram-se extractos preparados a partir do parênquima de ratos de controlo e transgénicos em condições não redutoras (Figura 18). No extracto do rato

transgénico, mas não no rato de controlo, os dímeros de OPG foram facilmente detectados, em conjunto com quantidades sub-estequiométricas de monómeros. Os dímeros e os monómeros de OPG parecem idênticos à proteína recombinante de murino expressa nas células de OHC tratadas por engenharia genética. Isto sugere fortemente que os dímeros de OPG são na verdade uma forma natural do produto do gene e são provavelmente componentes activos chave. Obtiveram-se amostras de soro obtidas a partir de ratos de controlo e transgénicos que foram do mesmo modo analisadas por análise de "western blot". Nos ratos de controlo, a maioria da proteína OPG migra sob a forma de dímero, enquanto se detectam também pequenas quantidades de monómero. Além disso, detectam-se quantidades significativas de uma proteína maior relacionada com a OPG, que migra com uma massa molecular relativa consistente com a prevista dimensão de um trímero ligado covalentemente. Assim, a OPG recombinante é expressa predominantemente como uma proteína dimérica na OPG de ratos transgénicos e a forma dimérica pode ser a base para o fenótipo osteopetrótico na OPG de ratos. A proteína recombinante OPG pode também existir em formas "triméricas" com peso molecular mais elevado.

Para determinar se os resíduos de cisteína de terminal C da OPG desempenham um papel na homodimerização, alteraram-se os codões de OPG de murino OPG para 195 resíduos de cisteína (C195), C202, C277, C319, e C400 foram alterados para serina utilizando o kit de mutagénese dirigida ao sítio QuickChange™ (Stratagene, San Diego, CA) como se descreveu antes. O gene de OPGmu foi sub-clonado entre os sítios NotI e XbaI do vector de ADNpc 3.1 (+) (Invitrogen, San Diego, CA). O plasmido resultante, ADNpc3.1-OPGmu, e os iniciadores mutagénicos foram tratados com a polimerase Pfu na presença de desoxinucleótidos, depois foi amplificado num amplificador

de ADN como se descreveu antes. Transfectou-se então uma alíquota na apropriada XL1-Blue de E. coli por meio de choque térmico, e depois colocou-se em placa. Sequenciou-se então o AND do plasmido a partir dos transformantes para verificar as mutações.

Os pares de iniciadores que se seguem foram utilizados para alterar o codão para o resíduo 195 de cisteína para serina do gene de OPG de murino, resultando na produção de uma proteína OPGmu [22-401] C195S:

1389-19:

5'-CAC GCA AAA GTC GGG AAT AGA TGT CAC-3' (SEQ ID NO: 150)

1406-38:

5'-GTG RCA TCT ATT CCC GAC TTT TGC GTG-3' (SEQ ID NO: 151)

Os pares de iniciadores que se seguem foram utilizados para alterar o codão para o resíduo 202 de cisteína para serina do gene de OPG, resultando na produção de uma proteína OPGmu [22-401] C202S:

1389-21:

5'-CAC CCT GTC GGA AGA GGC CTT CTT C-3' (SEQ ID NO: 152)

1389-22:

5' -GAA GAA GGC CTC TTC CGA CAG GGT G-3'
(SEQ ID NO: 153)

Os pares de iniciadores que se seguem foram utilizados para alterar o codão para o resíduo 277 de cisteína para serina do gene de OPG de murino, resultando na produção de uma proteína OPGmu [22-401] C277S:

1389-23:

5' -TGA CCT CTC GGA AAG CAG CGT GCA-3' (SEQ ID NO: 154)

1389-24:

5' -TGC ACG CTG CTT TCC GAG AGG TCA- 3' (SEQ ID NO: 155)

Os pares de iniciadores que se seguem foram utilizados para alterar o codão para o resíduo 319 de cisteína para serina do gene de OPG de murino, resultando na produção de uma proteína OPGmu [22-401] C319S:

1389-17:

5'-CCT CGA AAT CGA GCG AGC AGC TCC-3' (SEQ ID NO: 156)

1389-18:

5'-CGA TTT CGA GGT CTT TCT CGT TCT -3' (SEQ ID NO: 157)

Os pares de iniciadores que se seguem foram utilizados para alterar o codão para o resíduo 400 de cisteína para

serina do gene de OPG de murino, resultando na produção de uma proteína OPGmu [22-401] C400S:

1406-72:

5'-CCG TGA AAA TAA GCT CGT TAT AAC TAG GAR TGG-3'
(SEQ ID NO: 158)

1406-75:

5'-CCA TTC CTA GTT ATA ACG AGC TTA TTT TCA CGG (SEQ ID NO: 159)

Cada plasmido muOPG [22-401] resultante contendo a mutação apropriada foi então transfectado em células 293 humanas, a proteína de fusão mutante OPG-Fc foi purificada a partir do meio condicionado tal como se descreveu antes. A actividade biológica de cada proteína foi avaliada por meio do ensaio de formação de osteoclastos descrito no exemplo 11. Analisou-se cada transfectante do meio condicionado por meio de EGPA-SDS não redutora e "western blotting" com anticorpos anti-OPG.

A mutação de qualquer um dos cinco resíduos de cisteína de terminal C resulta na produção de moléculas de OPG de 55 kd predominantemente (> 90 %) monoméricas. Isto sugere fortemente que os resíduos de cisteína de terminal C em conjunto desempenham um papel na homodimerização de OPG.

Os mutantes de eliminação de OPG de terminal C foram produzidos para mapear as regiões do domínio de terminal C de OPG que são importantes para a homodimerização de OPG. Os mutantes de eliminação de OPG foram produzidos por

amplificação por RCP utilizando iniciadores o que introduz sinais prematuros de tradução de paragem na região de terminal C de OPG de murino. O oligo 5' foi produzido com o codão de iniciação de OPGmu (contendo um sítio de restrição de HindIII) e os oligonucleótidos de 3' (contendo um codão de paragem e o sítio XhoI) foram produzidos para truncar a região de terminal C da extremidade de OPGmu em cada um dos resíduos de treonina 200 (CT 200), prolina 212 (CT212), ácido glutâmico 293 (CT-293), ou serina 355 (CT-355).

Os iniciadores que se seguem foram utilizados para construir OPGmu -[22-200]:

1091-39:

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTC CGA GGA CCA CAA TGA ACA
AG-3' (SEQ ID NO: 160)

1391-91:

5' -CCT CTC TCG AGT CAG GTG ACA TCT ATT CCA CAC TTT
TGC GTG GC-3' (1391-91) (SEQ .ID NO: 161)

Os iniciadores que se seguem foram utilizados para construir OPGmu -[22-212]:

1091-39:

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTC CGA GGA CCA CAA TGA ACA
A-3' (SEQ ID NO: 162)

1391-90:

5'-CCT CTC TCG AGT CAA GGA ACA GCA AAC CTG AAG AAG
GC -3' (SEQ ID NO: 163)

Os iniciadores que se seguem foram utilizados para construir OPGmu -[22-293]:

1091-39:

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTC CGA GGA CCA CAA TGA ACA
AG-3'; (SEQ ID NO. 164)

1391-89:

5'-CCT CTC TCG AGT CAC TCT GTG GTG AGG TTC GAG TGG
CC-3' (SEQ ID NO: 165)

Os iniciadores que se seguem foram utilizados para construir OPGmu -[22-355]:

1091-39:

5'-CCT CTG AGC TCA AGC TTC CGA GGA CCA CAA TGA ACA
AG-3' (SEQ ID NO: 166)

1391-88:

5' CCT CTC TCG AGT CAG GAT GTT TTG AAG TGC TTG AGG
GC-3' (SEQ ID NO: 167)

Cada plasmídeo OPGMU-ct resultante contendo a truncagem apropriada foi então transfectado em células 293 humanas, a proteína de fusão mutante de OPG-Fc foi purificada a partir do meio condicionado tal como se descreveu antes. A

actividade biológica de cada proteína foi avaliada *in vitro* por meio do ensaio de formação de osteoclastos descrito no exemplo 11. Analisaram-se os meios condicionados por meio de EGPA-SDS não redutora e "western blotting" utilizando anticorpos anti-OPG.

A truncagem da região de terminal C de OPG afecta a capacidade da OPG para formar homodímeros. CT 355 é predominantemente monomérica, embora se formem alguns dímeros. CT 293 forma o que parece ser igual a quantidades molares de monómero e dímero e também agregados de peso molecular elevado. Contudo, CT 212 e CT 200 são monoméricos.

EXEMPLO 10

Purificação de OPG

A. Purificação de proteínas de fusão de mamíferos OPG-Fc

Preparou-se, como se segue, 5 L de meio condicionado a partir de células 293 que expressam uma proteína de fusão OPG-Fc. Descongelou-se uma amostra congelada em 10 ml de meio de 293S (DMEM-elevado teor de glicose, 1x L-glutamina, soro de bovino fetal (CBF) a 10 % inactivado pelo calor e 100 ug/ml de higromicina) e, passado um dia, alimentou-se com meio fresco. Passados três dias, dividiram-se as células em dois frascos de T175 em diluições de 1:10 e 1:20. Fizeram-se mais duas divisões de 1:10 para aumentar para 200 frascos T175. As células estiveram neste ponto 5 dias após a descongelação. As células cresceram até próximo da confluência (cerca de três dias) momento em que se aspirou o meio contendo soro, lavaram-se as células uma vez com 25 ml de SBF por frasco e adicionou-se a cada frasco 25 ml de meio

SF (DMEM-elevado teor de glicose, 1x L-glutamina). Mantiveram-se as células em CO₂ a 5 % durante três dias, momento em que se colheu o meio, centrifugou-se e filtrou-se através de filtros de nitrato de celulose 0,45m (Corning).

As proteínas de fusão OPG-Fc foram purificadas utilizando uma coluna de Sefarose com proteína G (Pharmacia) equilibrada em SBF. A dimensão da coluna variou consoante o volume de meio inicial. Carregou-se o meio condicionado, tal como se descreveu antes, numa coluna, lavou-se a coluna com SBF, e eluiu-se a proteína pura utilizando glicona 100 mM a pH 2,7. Recolheram-se as fracções em tubos contendo Tris 1M a pH 9,2 de modo a neutralizar tão rapidamente quanto possível. Juntaram-se as fracções contendo proteína, concentraram-se quer em Amicon Centricon 10 ou em Centriprep 10 e filtrou-se duas vezes e, SBF. A proteína pura é armazenada a - 80 °C.

[22-401]-Fc de murino, [22-180]-Fc de murino, [22-194]-Fc de murino, [22-401]-Fc humana e [22-201]Fc humana foram purificadas por este processo. [22-185]-Fc de murino foi purificada por este processo.

B. Preparação de anticorpos anti-OPG

Injectaram-se, subcutaneamente, três coelhos brancos da Nova Zelândia (peso inicial de 2,27-3,63 kg) com proteína de fusão OPGmu[22-401]-Fc. Imunizou-se cada coelho no dia 1 com 50 µg de antimónio emulsionado num volume igual de adjuvante de Freund completo. Realizaram-se mais reforços (dias 14 e 28) pelo mesmo processo com a substituição de adjuvante de Freund completo. Monitorizaram-se os títulos dos anticorpos por meio de IEE (imuno-ensaio ligado a enzimas). Depois do segundo reforço, os anti-soros revelaram elevados títulos de

anticorpos e obteve-se de cada animal 25 ml de produção hemorrágica. Os soros passaram primeiro por uma coluna de afinidade na qual a OPG-Fc de murino tinha sido imobilizada. Os anticorpos anti-OPG foram eluídos com tampão de eluição Pierce Gentle contendo ácido acético glacial a 1 %. A proteína eluída foi então dialisada em SBF e passou numa coluna de Fc para eliminar quaisquer anticorpos específicos para a porção de Fc da proteína de fusão OPG. A passagem através de fracções contendo os anticorpos específicos anti-OPG foi seguida de diálise em SBF.

C. Purificação de OPG de murino [22-401]

Cromatografia de afinidade do anticorpo

Os anticorpos anti-OPG purificados por afinidade foram diafiltrados em tampão de acoplamento (carbonato de sódio a 0,1 M, a pH 8,3, NaCl 0,5 M), e misturou-se com pérolas de sefarese activadas por CNBr (Pharmacia) durante duas horas, à temperatura ambiente. Lavou-se então a resina com tampão de acoplamento que bloqueou completamente os sítios não ocupados com etanolamina 1 M (pH 8,0) durante duas horas, à temperatura ambiente. Lavou-se então a resina a um pH baixo (acetato de sódio 0,1 M a pH 4,0, NaCl 0,5 M) seguido de uma lavagem a um pH alto (Tris-HCl 0,1 M a pH 8,0, NaCl 0,5 M). Repetiram-se as últimas lavagens três vezes. A resina foi finalmente equilibrada com SBF antes de se encher uma coluna. Uma vez a coluna cheia, lavou-se a resina com SBF. Realizou-se uma eluição em branco com glicina-HCl 0,1 M, a pH 2,5), seguida de um re-equilíbrio com SBF.

Concentrou-se o meio condicionado a partir de células de OHC que expressam OPGmu[22-410] e aplicou-se à coluna a uma

velocidade de fluxo baixa. A coluna foi lavada com SBF até a absorbância estar em 280nm em relação ao valor de base. Eluiu-se a proteína da coluna, primeiro com glicina-HCl 0,1 M (pH 2,5), re-equilibrou-se com SBF e eluiu-se com um segundo tampão (CAPS 0,1 M, a pH 10,5), NaCl 1 M). Os dois conjuntos resultantes da filtração foram diafiltrados separadamente em SBF e foram filtrados em meio esterilizado antes de se congelarem a -20°C.

Cromatografia convencional

Concentrou-se 23x o meio condicionado de células de OHC num cartucho enrolado em espiral da Amicon (Si OY10) e diafiltrou-se em Tris 20mM a pH 8,0. O meio dialfiltrado foi então aplicado a uma coluna Q-sefarose HP (Pharmacia) que tinha sido equilibrada com Tris 20mM a pH 8,0. Lavou-se então a coluna até se obter uma densidade óptica de 280nm em relação ao valor base. Eluiu-se a proteína com uma coluna 20 e um gradiente de NaCl 0-300 mM em Tris a pH 8,0. Detectou-se a proteína OPG utilizando uma "western blot" às fracções da coluna.

Juntaram-se as fracções que continham OPG e levaram-se a uma concentração final de NaCl de 300 mM, DTT 0,2 mM. Equilibrou-se uma coluna NINTA superose (Qiagen) com Tris 20mM a pH 8,0, NaCl 300 mM, DTT 0,2 mM depois do que se aplicaram as fracções reunidas. Lavou-se então a coluna com um tampão de equilíbrio até se obter a densidade óptica de base. Eluíram-se as proteínas da coluna com um gradiente de imidazole 0-30 mM em tampão de equilíbrio. Lavaram-se as proteínas remanescentes da coluna com imidazole 1M. Utilizou-se novamente uma "western blot" para detectar as fracções que continham OPG.

Fez-se a diálise das fracções reunidas a partir da coluna NiNTA em fosfato de potássio 10 mM a pH 7,0, DTT 0,2 mM. Aplicou-se então o conjunto dialisado a uma coluna cerâmica de hidroxiapatite (Bio-R) que tinha sido equilibrada com tampão de fosfato 10 mM. Depois da lavagem da coluna, eluiu-se a proteína com um gradiente de fosfato 10-100 mM em 20 volumes da coluna. Seguiu-se então um volume de 20 colunas com um gradiente de fosfato de 100-400 mM.

Detectou-se a OPG por coloração com azul de coomassie de géis de SDS-poliacrilamida e por "western blotting". Reuniram-se as fracções e diafiltraram-se em SBF e congelaram-se a -80 °C. As proteínas purificadas apresentaram-se como monómeros e assim permaneceram após a diafiltração em SBF. O monómero é estável quando armazenado congelado ou a pH 5 a 4 °C. Contudo se armazenado a 4 °C em SBF, irão formar-se dímeros e o que pode parecer trímeros e tetrâmeros, passada uma semana.

D. Purificação de OPGhumana met [22-401] a partir de *E. coli*

Fez-se uma suspensão da pasta de células bacterianas em EDTA 10 mM até a uma concentração de 15 % (p/v) utilizando um homogeneizador de pequeno corte a 5 °C. Quebraram-se as células por meio de duas homogeneizações a 15,000 psi cada a 5 °C. Centrifugou-se o homogeneizado resultante a 5.000 x g durante uma hora a 5 °C. Lavaram-se os péletes centrifugados por meio da homogeneização com pequenos cortes em água no volume original de homogeneização seguida de centrifugação tal como se tinha feito antes. Os péletes lavados foram então solubilizados até 15 % (p/v) por meio de uma solução de (concentração final) cloridrato de guanidina 6 M,

ditiotreitol 10 mM, TrisHCl 10 mM, a pH 8,5 à temperatura ambiente durante 30 minutos. Diluiu-se esta solução 30 vezes em ureia 2M contendo CAPS 50 mM, a pH 10,5, glutationa reduzida 1 mM e depois agitou-se durante 72 horas a 5 °C. Purificou-se a OPG a partir desta solução a 25 °C por meio de um primeiro ajustamento para pH 4,5 com ácido acético e depois fez-se uma cromatografia numa coluna de resina SP-HP Sefarose equilibrada com acetato de sódio 25 mM, a pH 4,5. A eluição da coluna foi realizada com um gradiente linear de cloreto de sódio de 50 mM até 550 mM no mesmo tampão utilizando 20 volumes de coluna a uma velocidade de fluxo de 0,1 volumes de coluna/ minuto. As fracções do pico continham apenas a OPG desejada a partir do conjunto e armazenou-se a 5 °C ou tampão permutado com uma solução tamponada com fosfato, concentrou-se por ultrafiltração e depois armazenou-se a 5 °C. Este material foi analisada por CLAR de fase inversa, EGPA-SDS, ensaio do produto lisado de límulo amebócito para detectar a presença de endotoxina, e sequenciação do terminal N. Além disso, também se podem utilizar técnicas tais como espectrometria de massa, estabilidade de pH/temperatura, fluorescência, dicroísmo circular, calorimetria de rastreio diferencial e ensaios de perfilagem da protease para examinar a natureza da dobragem da proteína.

EXEMPLO 11

Actividade biológica de OPG recombinante

Com base na histologia e na histomorfometria, verificou-se que a sobre-expressão hepática da OPG em ratos transgénicos os números de osteoclastos decresceram marcadamente levando a um marcado aumento no tecido dos ossos (ver exemplo 4). Para se conseguir mais informação do

mecanismo potencial subjacente a este efeito *in vivo*, ensaiaram-se várias formas de OPG recombinante num modelo de cultura *in vitro* da formação de osteoclastos (ensaio de formação de osteoclastos). Este sistema de cultura foi originalmente desenvolvido por Udagawa (Udagawa et al. Endocrinology 125, 1805-1813 (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7260-7264 (1990)) e utilizou-se uma combinação de células de medula óssea e células das linhas de células de estroma da medula óssea. Uma descrição da modificação deste sistema de cultura utilizada para estes estudos já tinha sido previamente publicada (Lacey et al. Endocrinology 136, 2367-2376 (1995)). Neste processo, as células de medula óssea, retirado dos fémures e tibias do rato e fez-se uma cultura durante a noite em meio de cultura (MEM alfa com soro bovino fetal a 10 % inactivado pelo calor) complementado com 500 U/ml de FEC-1 (factor 1 de estimulação de colónias, também chamado M-FEC), um factor de crescimento hematopoiético específico para as células da linha da família dos macrófagos monocíticos. No seguimento desta incubação, recolheram-se as células não aderentes, submeteram-se à purificação com um gradiente e depois fez-se uma co-cultura com células da linha de células de medula óssea ST2 (1×10^6 de células não aderentes: 1×10^5 de células ST2/ ml de meio). O meio é complementado com dexametasona (100 nM) e o metabolito activo sob o ponto de vista biológico de vitamina D3 conhecido como 1,25 di-hidroxivitamina D3 (1,25 (OH)₂ D₃, 10nM). Para melhorar o aparecimento dos osteoclastos, adicionou-se prostaglandina E2 (250 nM) a algumas das culturas. O período de co-cultura normalmente varia entre 8 -10 dias e o meio, com todos os suplementos foi adicionado em fresco e foi renovado de 3 em 3 a de 4 em 4 dias. A vários intervalos, avaliaram-se as culturas quanto à presença de tartrato de fosfatase ácida (TRFA) utilizando quer uma coloração

histoquímica (kit da Sigma # 387A, Sigma, St. Louis, MO) ou em ensaio da solução de TRFA. O processo histoquímico com TRFA permite a identificação dos osteoclastos sob o ponto de vista fenotípico que sejam células multinucleadas (\geq 3 núcleos) que são também TRFA+. O ensaio da solução envolve a lise das culturas que contêm osteoclastos num tampão de citrato (100 mM, pH 5,0) contendo Triton X-100 a 0,1%. Mede-se então a actividade da fosfatase ácida resistente a tartrato com base na conversão de p-nitrofenilfosfato (20 nM) em p-nitrofenol na presença de tartrato de sódio 80 mM que ocorre durante uma incubação de 3-5 minutos à TA. A reacção termina pela adição de NaOH até a uma concentração final de 0,5 M. Mede-se a densidade óptica a 405 nm e faz-se um gráfico com os resultados.

Estudos anteriores (Udagawa et al. *ibid*) utilizando o ensaio de formação de osteoclastos demonstraram que estas células expressam receptores para a ^{125}I -calcitonina (autoradiografia) e podem fazer cavidades nas superfícies dos ossos, que, quando combinadas com TRFA positiva confirmam que as células multinucleadas têm um fenótipo de osteoclasto. Outras evidências que suportam o fenótipo de osteoclastos das células multinucleadas que aparecem *in vitro* no ensaio de formação de osteoclastos são as células que expressam as integrinas αv e $\beta 3$ por meio de imunocitoquímica e receptor de calcitonina e ARNm de TRFA por hibridação *in situ* (HIS).

A fusão de OPGhu [22-401]-Fc foi purificada a partir de meio condicionado de células de OHC e em seguida utilizou-se no ensaio de formação de osteoclastos. Em 100 ng/ml de OPGhu [22-401]-Fc, a formação de osteoclastos foi virtualmente 100 % inibida (Figura 19A). Os níveis de TRFA medidos nas culturas da lise, em cavidades de placas microtituladoras,

foram também inibidos na presença de OPG com uma DI₅₀ de aproximadamente 3 ng/ml (Figura 20). O nível de actividade de TRFA nos produtos da lise parece estar correlacionados com o número relativo de osteoclastos vistos por citoquímica do TRFA (compare as figuras 19A-19G e 20). A IgG1 humana purificada e os pb de FNT foram também ensaiados neste modelo e verificou-se que não tinham efeitos inibidores nem estimuladores que sugerem que os efeitos inibidores de OPGhu [22-401]-Fc foram devidas à porção de OPG da proteína de fusão. Ensaiaram-se formas adicionais de moléculas humanas e de murino e os dados cumulativos estão resumidos no quadro 1.

Quadro 1

Efeitos de várias formas de OPG na formação de osteoclastos *in vitro*

Estrutura de OPG Bioactividade relativa *in vitro*

+++	PG [22-401]-Fc
+++	PG [22-194]-Fc
++	PG [22-185]-Fc
-	PG [22-180]-Fc
+++	PG [22-401]
+++	PG [22-401] C195
+	PG [22-401] C202
-	PG [22-401] C277
+	PG [22-401] C319
+	PG [22-401] C400
-	PG [22-185]
++	PG [22-194]
++	PG [22-200]
-	PG [22-212]
+++	PG [22-293]
+++	PG [22-355]

+++ PG [22-401]-Fc
 +++ PG [22-201]-Fc
 +++ PG [22-401]-Fc P26A
 +++ PG [22-401]-Fc Y28F
 +++ PG [22-401]
 ++ PG [27-401]-Fc
 ++ PG [29-401]-Fc

+/- OPG [32-401]-Fc |
 +++, ED₅₀ = 0.4-2 ng/ml
 ++, ED₅₀ = 2-10 ng/ml
 +, ED₅₀ = 10-100 ng/ml
 -, ED₅₀ > 100 ng/ml

Os dados cumulativos sugerem que as sequências dos aminoácidos 22-401 da OPG de murino e humana são completamente activas in vitro, quer quando estão fundidos com o domínio Fc ou quando não estão fundidas. Inibem de uma forma dependente da dose e possuem actividades semi-máximas no intervalo de 2-10 ng/ml. A truncagem da terminação C de murino no resíduo 180 de treonina inactiva a molécula, enquanto as truncagens na cisteína 185 e para lá desse resíduo têm uma actividade completa. É previsível que o resíduo de cisteína localizado na posição 185 forme uma ligação SS3 no domínio da região 4 da OPG. A eliminação deste resíduo noutras proteínas relacionadas com as proteínas do R-FNT já demonstrou antes que anulam a actividade biológica (Yan et al. J. Biol. Chem. 266, 12099-12104 (1994)). A verificação dos requerentes de que OPGmu[22-180]-Fc está inactivo enquanto OPGmu [22-185j-Fe está acitvo, é consistente com estas verificações. Isto sugere que os resíduos de aminoácidos 22-185 definem uma região para a actividade de OPG.

Estas verificações indicam que tal como a OPG expressa transgenicamente, a proteína OPG recombinante também suprimiu a formação de osteoclastos tal como foi ensaiado num ensaio de formação de osteoclastos. As experiências ao longo do

tempo e o exame do aparecimento das células de TRFA+, células β 3+, células F480+ em culturas continuamente expostas a OPG demonstram que nos blocos de OPG aparece TRFA+ e células de β 3+, mas não células F480+. Pelo contrário, TRFA+ e as células de β 3 começam a aparecer tão cedo como no 4º dia que se segue ao estabelecimento da cultura em culturas de controlo. Apenas as células F480+ podem ser encontradas em culturas tratadas com OPG e parecem estar presentes qualitativamente num número igual às das culturas de controlo. Assim, o mecanismo dos efeitos de OPG *in vitro* parece envolver um bloqueio na diferenciação de osteoclastos numa etapa para além do aparecimento de monócitos-macrófagos mas antes do aparecimento de células que expressam quer TRFA ou integrinas de β 3. Colectivamente, estas verificações indicam que OPG não interfere com o crescimento geral e a diferenciação de precursores de monócitos-macrófagos a partir de medula óssea, mas pelo contrário sugere que a OPG bloqueia especificamente a diferenciação selectiva de osteoclastos a partir de precursores de monócitos-macrófagos.

Para determinar mais especificamente quando é que a via de diferenciação dos osteoclastos foi inibidora, utilizou-se uma variante do processo da cultura *in vitro*. Esta variante, descrita em (Lacey et al. *supra*), utiliza macrófagos da medula óssea como precursores dos osteoclastos. Os precursores dos osteoclastos conseguem derivar-se a partir da recolha de células de medula óssea não aderentes depois de uma incubação durante a noite em FEC-1/M-FEC, e a cultura das células durante mais 4 dias com 1.000 - 2.000 U/ml de FEC-1. Após os 4 dias de cultura, designada por fase de crescimento, eliminaram-se as células não aderentes. As células aderentes, que são macrófagos de medula óssea, podem então ser expostas até 2 dias a vários tratamentos Na presença de 1.000 - 2.000

U/ml de FEC-. Este período de 2 dias é designado por período de diferenciação intermédia. Depois, as camadas de células são novamente lavadas e depois adicionam-se células ST-2 (1×10^5 célula/ml), dexametasona (100 nM) e $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}3$ (10 nM) durante os últimos 8 dias para o que se designa por período de diferenciação terminal. Podem adicionar-se também agentes de ensaio durante este período terminal. A aquisição de marcadores fenotípicos da diferenciação de osteoclastos é feita durante este período terminal (Lacey et al. *ibid*).

Analisou-se OPGhu [22-401]-Fc (100 ng/ml) quanto aos seus efeitos na formação de osteoclastos neste modelo adicionando-a durante quer o período intermédio, terminal ou, alternativamente em ambos os períodos de diferenciação. Realizaram-se tanto a citoquímica de TRFA como os ensaios de solução. Os resultados do ensaio de solução estão ilustrados na figura 21. OPGhu [22-401]-Fc inibiu o aparecimento da actividade de TRFA quando adicionadas tanto no período intermédio como no período terminal ou apenas nas fases de diferenciação terminal. Quando se adicionam na fase intermédia e depois se eliminam das culturas por lavagem, OPGhu [22-401]-Fc não bloqueiam o aparecimento da actividade de TRFA nos produtos da lise em culturas. Os resultados da citoquímica resultam em paralelo dos dados do ensaio da solução. Colectivamente, estas observações indicam que OPGhu [22-401]-Fc apenas necessita de estar presente durante o período de diferenciação terminal para exercer todos os seus efeitos supressores na formação de osteoclastos.

B. Experiências de estimulação de IL1- α e IL1- β in vivo

A IL1 aumenta a reabsorção óssea tanto sistemicamente como localmente quando injectada subcutaneamente sobre a

calvária do rato (Boyce et al., Endocrinology 125, 1142-1150 (1989)). Os efeitos sistémicos podem ser avaliados pelo grau de hipercalcémia e os efeitos locais histologicamente avaliando a dimensão relativa da resposta mediada por osteoclastos. O objectivo destas experiências foi determinar se OPGmu [22-401]-Fc recombinante podia modificar as acções locais e/ou sistémicas da IL1 quando injectada subcutaneamente na mesma região da calvária como IL1.

Experiência de IL-1 β

Dividiram-se ratos machos (ICR Swiss, brancos) com 4 semanas de idade, pelos seguintes grupos de tratamento (5 ratos por grupo): Grupo de controlo: Animais tratados com alfa IL1 (os ratos receberam uma injecção por dia de 5 ug de alfa-IL1); animais tratados com uma dose baixa de OPGmu [22-401]-Fc (os ratos receberam uma injecção por dia de 10 μ g de OPGmu [22-401]-Fc); animais tratados com uma dose baixa de OPGmu [22-401]-Fc e alfa-1L1 (dosagem igual à anterior); animais tratados com uma dose elevada de OPGmu [22-401]-Fc (os ratos receberam 3 injecções por dia de 10 μ g de OPGmu [22-401]-Fc); animais tratados com uma dose elevada de OPGmu [22-401]-Fc e alfa-IL1. Todos os ratos receberam o mesmo numero total de injecções de cada um dos factores activos ou de veículo (albumina de soro bovino a 0,1 % em solução salina tamponada com fosfato). Todos os grupos foram sacrificados no dia a seguir à última injecção. Mediu-se o peso e os níveis de cálcio ionizado no sangue antes da das primeiras injecções, quatro depois da segunda injecção e 24 horas depois da terceira injecção de IL1, imediatamente antes de os animais serem sacrificados. Depois do sacrifício retirou-se a calvária e tratou-se para se seccionar em parafina.

Experiência com IL1- α

Dividiram-se ratos machos (ICR Swiss, brancos) com 4 semanas de idade, pelos seguintes grupos de tratamento (5 ratos por grupo): Grupo de controlo; animais tratados com alfa-IL1 (os ratos receberam uma injecção por dia de 5 µg de alfa-IL1); animais tratados com uma dose baixa de OPGmu [22-401]-Fc (os ratos receberam uma injecção por dia de 10 µg de OPGmu [22-401]-Fc); animais tratados com uma dose baixa de OPGmu [22-401]-Fc e alfa-1L1 (dosagem igual à anterior); animais tratados com uma dose elevada de OPGmu [22-401]-Fc (os ratos receberam 3 injecções por dia de 10 µg de OPGmu [22-401]-Fc); animais tratados com uma dose elevada de OPGmu [22-401]-Fc e alfa-IL1. Todos os ratos receberam o mesmo número total de injecções/dia de cada um dos factores activos ou de veículo. Todos os grupos foram sacrificados no dia a seguir à última injecção. Mediu-se os níveis de cálcio ionizado no sangue antes da primeira injecção, quatro depois da segunda injecção e 24 horas depois da terceira injecção de IL1, imediatamente antes de os animais serem sacrificados. Mediu-se os pesos antes da primeira injecção, quatro horas depois da segunda injecção e 24 horas depois da terceira injecção de IL1, imediatamente antes de os animais serem sacrificados. Depois do sacrificio retirou-se a calvária e tratou-se para se seccionar em parafina.

Processos histológicos

Fixaram-se amostras de ossos de calvária em formalina zincada, descalcificou-se em ácido fórmico, desidratou-se por meio de etanol e montou-se em parafina. Cortaram-se secções (51.µm de espessura) ao longo da calvária adjacente à sutura lambdóide e corou-se quer com hematoxilina quer com eosina ou

fez-se reagir para avaliar a actividade da fosfatase ácida resistente a tartrato (Kit# 387A da Sigma) e contra-corou-se com hematoxilina. Avaliou-se a reabsorção óssea nos ratos tratados com IL1- α por processos histomorfométricos utilizando a osteo-medicação (Osteometrics, Atlanta, GA) por meio de características histológicas em traços num carretel de digitalização utilizando uma câmara de brilho montada num microscópio. Determinou-se o número de osteoclastos, as superfícies alinhadas dos osteoclastos e as superfícies erodidas nos espaços da medula do osso da calvária. Mediram-se os lados injectados e não injectados da calvária separadamente.

Reinicialização

IL1- α e IL1- β produziram hipercalcémia nas doses utilizadas, particularmente no segundo dia, presumivelmente por indução sistemática do aumento da reabsorção óssea. A resposta hipercalcémica foi bloqueada pela OPGmu [22-401]-Fc nos ratos tratados com IL1-beta e diminuíram significativamente nos ratos tratados com IL1-alfa, sendo o efeito mais aparente no 2º dia (Figura 22A-22B).

A análise histológica das calvárias dos ratos tratados com IL1-alfa e beta mostra que os tratamentos apenas com IL1 produziram um aumento marcado nos índices da reabsorção óssea incluindo: Número de osteoclastos, superfície alinhada com os osteoclastos, e superfície erodida (superfícies que mostram conchas profundas devido à acção dos osteoclastos (Figura 23B, quadro 2). Em resposta a IL1- α ou IL1- β , os aumentos na reabsorção óssea foram semelhantes nos lados injectados ou não injectados da calvária. As injecções de opgMu [22-401]-Fc reduziram a reabsorção óssea tanto nos ratos tratados com

IL1-alfa como nos que receberam apenas veículo mas esta redução foi vista apenas nos lados da calvária injectados com opgmu [22-401]-Fc.

A explicação mais provável para estas observações é que OPGmu [22-401]-Fc inibiu a reabsorção óssea; uma conclusão suportada pela redução tanto do número total de osteoclastos como pela percentagem de superfície óssea disponível que sofre a reabsorção óssea, na região da calvária adjacente aos sítios da injecção de OPGmu [22-401]-Fc. As acções de OPGmu [22-401]-Fc parecem ser a mais marcadas localmente pela histologia, mas o facto de OPGmu [22-401]-Fc também ter moderado a hipercalcémia induzida por IL1 sugere que OPGmu [22-401]-Fc tem efeitos mais subtis na reabsorção óssea sistémica.

Quadro 2. Efeitos de OPG nas variáveis da reabsorção óssea em ratos injectados com IL-1.

	% de superfície os osteoclastos \pm D, P,)		Superfície erodida (média \pm D, P,)		Número de osteoclastos /mm ² área de tecido (média \pm D, P,)	
	Lado não injectado	Lado injectado	Lado não injectado	Lado injectado	Lado não injectado	Lado injectado
Experiência 1						
Controle	12,36 \pm 3,44	9,54 \pm 2,46	8,07 \pm 3,90	9,75 \pm 3,16	32,51 \pm 11,09	23,50 \pm 10,83
IL1-B (2,5 µg/d)	17,18 \pm 1,30	16,40 \pm 2,16	40,66 \pm 4,28	37,53 \pm 10,28	71,80 \pm 18,76	60,89 at 5,16
OPG (40 µg/d)	10,12 \pm 3,71	5,04 \pm 1,66	9,73 \pm 4,33	4,19 \pm 3,61	32,73 \pm 11,09	15,24 \pm 7,54
OPG+IL1-B	18,61 \pm 2,46	#13,26 \pm 2,50	44,87 \pm 8,63	# 25,94 \pm 6,82	69,42 \pm 36,29	# 47,13 \pm 24,26
Experiência 2						
Control	11,56 \pm 4,22	11,95 \pm 2,97	12,67 \pm 5,04	10,03 \pm 5,13	51,72 at 23,93	56,03 \pm 30,70
IL1- α (5µg/d)	28,81 \pm 4,84	23,46 \pm 5,76	37,51 et 5,16	41,10 \pm 12,53	113,60 \pm 18,04	102,70±32,09
OPG (40µg/d)	14,40 \pm 1,00	#4,26 \pm 2,54	11,55- \pm 4,14	#4,29 \pm 3,16	72,281-14,11	#22,65 \pm 6,68
OPG+IL1- α	29,58 \pm 8,80	#17,83 \pm 3,34	33,66 \pm 9,21	#24,38 \pm 8,88	146,10 \pm 42,37	# 66,56 \pm 15,62
# Diferente do lado não injectado p < 0,05 (por meio do teste t dos pares)						

C. Efeitos sistémicos de OPGmu [22-4011-Fc no crescimento dos ratos

Dividiram-se ratos machos BDF1 com 3-4 semanas de idade, com o peso variando de 9,2 - 15,7g por grupos de 10 ratos por grupo. Injectaram-se estes ratos subcutaneamente com uma solução salina ou com OPGmu [22-401]-Fc na ordem de 2,5 mg/kg durante 14 dias (5mg/kg/dia). Radiografaram-se os ratos antes do tratamento, no dia 7 e no dia 14. Sacrificaram-se os ratos 24 horas depois da última injecção. Retirou-se o fémur direito, fixou-se em formalina zincada, descalcificou-se em ácido fórmico e embebeu-se em parafina. Cortaram-se secções na região média da metáfise femoral distal e no eixo femural. Determinou-se a densidade óssea, por histomorfometria, em seis regiões adjacentes que se estendiam do limite da metáfise da placa de crescimento, através da esponjosa primária e secundária e na diáfise femural (eixo). Cada região media 0,5 X 0,5 mm².

Alterações radiográficas

Passados sete dias de tratamento havia evidência de uma zona de aumento da densidade óssea na zona esponjosa associada às placas de crescimento nos ratos tratados com relativamente às que se viram nos controlos. Os efeitos foram particularmente impressionantes nas metáfases femorais distais e nas metáfases tibiais proximais (Figura 24A-24B). Contudo também foram evidentes bandas com uma densidade aumentada nos corpos vertebrais, na crista ilíaca e na tíbia distal. No 14º dia, as regiões de opacidade estenderam-se ao longo dos eixos femural e tibial embora a intensidade da opacidade ao rádio esteja diminuída. Adicionalmente, não

havia diferenças no comprimentos dos fémures no fim da experiência ou nem alterações do comprimento durante a duração da experiência o que implica que a OPG não altera o crescimento dos ossos.

Alterações histológicos

A metáfise femural distal mostrou um aumento da densidade óssea numas regiões que distavam 1,1 a 2,65 da placa de crescimento (Figuras 25 e 26A-26B). Trata-se de uma região que o osso é rapidamente eliminado pela reabsorção induzida por osteoclastos em ratos. Nestes ratos jovens em rápido crescimento, o aumento dos ossos nesta região observou-se com o tratamento com a OPG o que é consistente com uma inibição da reabsorção óssea.

D. Efeitos da Osteoprotegerina na perda óssea induzida por Ovariectomia em Ratos

Retiraram-se os ovários (OVX) a doze ratos fêmeas da espécie Fisher com doze semanas de idade ou fez-se-lhes uma operação simulada e fizeram-se medições por absorciometria por raios X (DEXA) da densidade óssea nas metáfises femorais distais. Passados 3 dias do período de recuperação, os animais receberam diariamente injecções durante 14 dias como se segue: Os animais operados de uma forma simulada receberam veículo (solução salina tamponada com fosfato); dez animais OVX receberam veículo (solução salina tamponada com fosfato); seis animais OVX receberam OPG-Fc a 5 mg/kg SC; seis animais OVX receberam pamidronato (PAM) 5mg/kg SC; seis animais OVX receberam estrogénio (ESTR) 40ug/kg SC. Passados 7 e 14 dias do tratamento tinham uma densidade óssea que foi medida por DEXA. Dois dias após a última injecção, os animais foram

mortos e retirou-se a tíbio e o fémur direitos para avaliação histológica.

As medições da densidade óssea feitas por DEXA mostraram uma tendência para a redução da densidade óssea no seguimento da operação dos ovários que tinha sido bloqueada pela OPG-Fc. Os seus efeitos foram semelhantes aos dos agentes anti-reabsorção conhecidos estrogénio e pamidronato. (Figure 27). A análise histomorfométrica confirmou estas observações com o tratamento com OPG-Fc a produzir uma densidade óssea que era significativamente mais elevada nos ratos OVX do que a verificada nos ratos não tratados por OVX (Figura 28). Estes resultados confirmam a actividade da OPG na perda óssea associada com a falta de estrogénio endógeno no seguimento de ovariectomia.

Resumo in vivo

As acções *in vivo* da OPG recombinante são paralelas das alterações observadas nos ratos transgénicos tratados com OPG. A redução do número de osteoclastos observada na OPG transgénica é reproduzida por injecção local de OPG recombinante na calvária tanto em ratos normais como em ratos tratados com IL1- α ou IL1- β . Os ratos transgénicos por OPG desenvolveram um fenótipo osteopetróticas com um preenchimento progressivo da cavidade da medula com ossos e cartilagem não remodelada que se estende das placas de crescimento desde o dia 1 progressivamente depois do nascimento. Em ratos normais com três semanas de idade (em crescimento), os tratamentos com OPG também levaram à retenção de osso e de cartilagem não remodelada em regiões da formação óssea endocôndrica, um efeito observado radiograficamente e confirmado histologicamente. Assim, a OPG

recombinante produz alterações fenotípicas em animais normais semelhantes às vistas em animais transgénicos e as alterações são consistentes com a inibição induzida por OPG na reabsorção óssea. Com base nos ensaios *in vitro* da formação dos osteoclastos, uma porção significativa desta inibição é devida à formação de osteoclastos defeituosos. Consistente com esta hipótese, a OPG bloqueia a osteoporose induzida por ovariectomia em ratos. A perda óssea neste modelo é conhecida por ser mediada por osteoclastos, activados, sugerindo um papel para a OPG no tratamento da osteoporose primária.

EXEMPLO 12

Derivados de OPG por tratamento com polietileno-glicol

Preparação de conjugados de PEG-OPG de terminal N por alquilação redutora

OPGhu met [22-194] P25A foi permutada com um tampão em NaOAc 25-50 mM, a pH 4,5-4,8 e concentrou-se para 2-5 mg/ml. Utilizou-se esta solução para realizar uma aquilação redutora de OPG com aldeídos comportando PEG, monofuncionais a 5-7 °C. Os aldeídos comportando PEG, monofuncionais, lineares ou ramificados, PM=1 a 57 kDa (disponível na Shearwater Polymers) foram adicionados à solução de OPG sob a forma de sólidos em quantidades que constituem 2-4 moles de aldeídos comportando PEG por mole de OPG. Depois da dissolução do polímero numa solução de proteína, adicionou-se cianoboro-hidreto de sódio até a uma concentração final de 15 a 20 mM na mistura reacional de solução de reserva 1-1,6 M preparada de fresco em água DI fria. O progresso da reacção e a extensão do tratamento de OPG com polietileno-glicol foi monitorizado com CLAR por exclusão de dimensão numa coluna

G3000SWxL (Toso Haas) eluindo-se com NaPO₄ 100 mM , NaCl 0,5 M , etanol a 10 %, a pH 6,9. Normalmente deixa-se a reacção prosseguir durante 16-18 horas, após o que se diluiu a mistura reaccional 6-8 vezes e baixa-se o pH para 3,5-4. A mistura reaccional é fraccionada por cromatografia de permuta iónica (HP SP HiLoad 16/10, Pharmacia) eluindo-se com NaOAc 20 mM a pH 4 com um gradiente linear até NaCl 0,75 M em 25 volumes de coluna a uma velocidade de fluxo de 30 cm/h. As fracções de OPG com mono-, di- ou poli-PEG foram reunidas e caracterizadas por CED (cromatografia por exclusão de dimensão, CLAR e EGPA-SDS. Por meio da sequenciação do terminal N, determinou-se que o conjugado de monoPEG-OPG, o principal produto da reacção na maior parte dos casos, foi 98 % de OPG modificada por PEG com terminal N.

Este processo foi utilizado geralmente para preparar os seguintes conjugados de PEG-OPG de terminal N (em que OPG representa OPGhu met [22-194] P25A: monoPEG de 5 kD, PEG mono-ramificado de 10 kD, monoPEG de 12 kD, monoPEG de 20 kD, PEG mono-ramificado de 20 kD, monoPEG de 25 kD, monoPEG de 31 kD, monoPEG de 57 kD, diPEG de 12 kD, diPEG de 25 kD, diPEG de 31 kD, diPEG de 25 kD, triPEG de 25 kD.

Preparação de conjugados de PEG-OPG por acilação

OPGhu met [22-194] P25A foi permutada com um tampão em tampão de BICINE 50 mM, a pH 8 e concentrou-se para 2-3 mg/ml. Utilizou-se esta solução para realizar a acilação de OPG com ésteres monofuncionais de PEG-N-hidroxisuccinimidilo à temperatura ambiente. Ésteres lineares ou ramificados de PEG-N-hidroxisuccinimidilo, PM=1 a 57 kDa (disponível na Shearwater Polymers) foram adicionados à solução de OPG sob a forma de sólidos em quantidades que constituem 4-8 moles de

ésteres de PEG-N-hidroxisuccinimidilo por mole de OPG. O progresso da reacção e a extensão do tratamento de OPG com polietileno-glicol foi monitorizado com CLAR por exclusão de dimensão numa coluna G3000SWxL (Toso Haas) eluindo-se com NaPO₄ 100 mM, NaCl 0,5 M, etanol a 10 %, a pH 6,9. Normalmente deixa-se a reacção prosseguir durante 1 hora, após o que se dilui a mistura reacional 6-8 vezes e baixa-se o pH para 3,5-4. A mistura reacional é fraccionada por cromatografia de permuta iónica (HP SP HiLoad 16/10, Pharmacia) eluindo-se com, NaOAc 20 mM a pH 4 com um gradiente linear até NaCl 0,75 M em 25 volumes de coluna a uma velocidade de fluxo de 30 cm/h. As fracções de OPG com mono-, di- ou poli-PEG foram reunidas e caracterizadas por CED, CLAR e EGPA-SDS.

Este processo foi normalmente utilizado para preparar os conjugados de PEG-OPG que se seguem: poliPEG de 5 kD, poliPEG de 20 kD, PRG poli ramificado de 40 kD, poli PEG de 50 kD.

Preparação de PEG-OPG dimérico

Prepara-se OPGhu met [22-194] P25A por tiolação a 1-3 mg/ml num tampão de fosfato a um pH quase neutro. Adiciona-se anidrido mecarpto-succínico de S-acetilo (AMSA) num excesso molar de 3-7 vezes ao mesmo tempo que se mantém o pH a 7,0 e agitou-se a 4 °C durante 2 hrs. Separa-se a OPG monotiolada da OPG não tiolada ou não modificada por cromatografia de permuta iónica e o tiol protegido é desprotegido por tratamento com hidroxilamina. Depois da desprotecção, elimina-se a hidroxilamina por filtração em gel e a OPG monotiolada resultante é submetida a uma variedade de reticulações químicas específicas do tiol. Para gerar um dímero ligado por disulfureto, deixa-se a OPG tiolada a > 1

mg/ml sofrer uma oxidação ao ar por diálise em tampão de fosfato ligeiramente básico. Preparou-se o dímero do tioéter de OPG covalente fazendo reagir o reticulador de bismaleimida, N,N-bis(3-maleimido propianil)-2-hidroxi 1,3 propano com a OPG tiolada a > 1 mg/ml numa relação molar de 0,6x de reticulador : OPG em tampão de fosfato a pH 6,5. Do mesmo modo, produzem-se os PEG bicirculares por reacção de quantidades sub-estequiométricas de reticuladores de bismaleimida e PEG com OPG tiolada a > 1 mg/ml em tampão de fosfato a pH 6,5. Qualquer um dos conjugados diméricos pode ainda ser purificado utilizando quer cromatografia de permata iónica, quer cromatografia de exclusão por dimensão.

Os conjugados diméricos de PEG-OPG (em que OPG representa OPG hu met [22-194] P25A preparada utilizando os procedimentos anteriores incluem dímeros de OPG ligados por disulfureto, dímeros de OPG e tioéter covalentes com um reticulador do tipo de amina alifática, mono-halteres e halteres de PEG de 3,4 kD e 8kD.

Fez-se a análise dos conjugados de PEG-OPG quanto à actividade *in vitro* utilizando o ensaio de maturação de osteoclastos descrito no exemplo 11 A e quanto à actividade *in vivo* medindo o aumento da densidade óssea depois da injeção em ratos tal como descrito no exemplo 11C. A actividade, *in vivo*, está ilustrada no quadro 3.

Quadro 3

Actividade biológica *in vivo* de OPG comportando PEG

Estrutura de OPG

Aumento da densidade óssea na tíbia

OPGmu met[22-194]	-
OPGmu met[22-194]PEG de 5 k	+
OPGmu met[22-194]PEG de 20 k	+
OPGhu met[22-194] P25A	-
OPGhu met[22-194] P25A PEG	+
OPGhu met[22-194] P25A PEG de 20k	+
OPGhu met[22-194] P25A PEG de 31k	+
OPGhu met[22-194] P25A PEG de 57k	+
OPGhu met[22-194] P25A PEG de 12k	+
OPGhu met[22-194] P25A PEG ramificado de 20k	+
OPGhu met[22-194] P25A dímero de PEG de 8k	+
OPGhu met[22-194]P25A reticulação de disulfureto	+

Embora a presente invenção tenha sido descrita pelo que se considera serem os seus enquadramentos preferidos, ela não se limita aos enquadramentos descritos.

Lisboa, 4 de Dezembro de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Polipéptido caracterizado pelo facto de compreender a sequência de aminoácidos das figuras 9C-9D (SEQ ID NO: 125) com os resíduos 22 a 401 inclusive ou um seu fragmento ou uma parte truncada dos resíduos, em que um ou mais polímeros solúveis em água que estão ligados ao polipéptido e em que o polipéptido inibe a formação de osteoclastos.
2. Polipéptido, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de compreender os resíduos de aminoácidos 22 a 401 das figuras 9C-9D (SEQ ID NO: 125).
3. Polipéptido, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de compreender um fragmento dos resíduos 22 a 401 das figuras 9C-9D (SEQ ID NO: 125).
4. Polipéptido, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de compreender uma parte truncada dos resíduos 22 a 401 das figuras 9C-9D (SEQ ID NO: 125).
5. Polipéptido, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de compreenderem uma eliminação ou uma parte truncada do terminal carboxi de parte ou de todos os resíduos de aminoácidos 180 a 401 das figuras 9C-9D (SEQ ID NO: 125).
6. Polipéptido, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o fragmento ou a parte truncada compreenderem os resíduos 22 a 185 das figuras 9C-9D (SEQ ID NO: 125).

7. Polipéptido de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o polímero solúvel em água se seleccionar entre um ou mais de polietileno-glicol, copolímero de etileno-glicol/propileno-glicol, carboximetilcelulose, dextrans, e álcool de polivinilo.
8. Polipéptido de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o polímero solúvel em água estar ligado numa posição pré-determinada no polipéptido.
9. Polipéptido de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de compreender, ligado a ele, dois ou mais polímeros solúveis em água.
10. Polipéptido de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de o polietileno-glicol estar ligado à terminação amino.
11. Polipéptido de acordo com as reivindicações 7 ou 10, caracterizado pelo facto de o polietileno-glicol ter um peso molecular seleccionado entre um ou mais de 5 kD, 10 kD, 12 kD, 20 kb, 25 kD, 31 kD, e 57 kD.
12. Dímero reticulado de osteoprotegerina (OPG) caracterizado pelo facto de ser formado por um ou mais polímeros solúveis em água ligados e ligando dois polipéptidos que compreendem a sequência de aminoácidos das figuras 9C-9D (SEQ ID NO: 125) dos resíduos 22 a 401 inclusive, ou um seu fragmento ou uma sua parte truncada, em que o dímero inibe a formação de osteoclastos.
13. Composição farmacêutica caracterizada pelo facto de compreender uma quantidade efectiva, sob o ponto de vista

terapêutico, do polipéptido de acordo com a reivindicação 1 num veículo, adjuvante, solubilizante, estabilizador e/ou antioxidante aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico.

14. Utilização do polipéptido de acordo com a reivindicação 1 caracterizada pelo facto de se destinar ao fabrico de um medicamento para o tratamento de um distúrbio dos ossos.
15. Utilização de acordo com a reivindicação 1 caracterizada pelo facto de o distúrbio dos ossos ser uma perda óssea excessiva.
16. Utilização de acordo com a reivindicação 14 caracterizada pelo facto de o distúrbio dos ossos se seleccionar entre um ou mais de osteoporose, doença de Paget, hiper-calcémia, hiperparatiroidismo, osteopénia induzida por esteróides, perda óssea devida a artrite reumatóide, perda óssea devida a osteomielite, metástases osteolíticas e perda óssea periodontal.
17. Utilização de acordo com a reivindicação 14 caracterizada pelo facto de o medicamento ainda compreender uma quantidade efectiva sob o ponto de vista terapêutico de uma substância seleccionada entre uma ou mais proteínas morfogénicas dos ossos PMO-1 a PMO-12, um elemento da família dos FCT-beta (factor de crescimento do tumor), um inibidor de IL-1, um inibidor de FNT-alfa (factor de necrose do tumor), uma hormona da paratiróide ou um seu análogo, uma hormona da paratiróide relacionada com uma proteína ou um seu análogo e uma prostaglandina da série E, um bisfosfonato e um mineral de fortalecimento dos ossos.