



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0707514-6 A2**



* B R P I 0 7 0 7 5 1 4 A 2 *

(22) Data de Depósito: 06/02/2007
(43) Data da Publicação: 10/05/2011
(RPI 2105)

(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/50
G01N 33/68

(54) Título: **MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE UM AGENTE QUE MODULE OSSOS OU UM LIPÍDIO; MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE UM AGENTE QUE MODULE A ATIVIDADE DE NORRIN-FRIZZLED4; KIT PARA IDENTIFICAR UM AGENTE QUE MODULE A ATIVIDADE DE LRP5-NORRIN-FRIZZLED4; CÉLULA OU LINHAGEM CELULAR DESPROVIDA DE NORRIN NATIVO E QUE EXPRESSE UMA LRP5 NÃO NATIVA E UMA FRIZZLED4 NÃO NATIVA**

(57) Resumo: MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE UM AGENTE QUE MODULE OSSOS OU UM LIPÍDIO; MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE UM AGENTE QUE MODULE A ATIVIDADE DE NORRIN-FRIZZLED4; KIT PARA IDENTIFICAR UM AGENTE QUE MODULE A ATIVIDADE DE LRP5-NORRIN-FRIZZLED4; CÉLULA OU LINHAGEM CELULAR DESPROVIDA DE NORRIN NATIVO E QUE EXPRESSE UMA LRP5 NÃO NATIVA E UMA FRIZZLED4 NÃO NATIVA. O relatório apresenta materiais e métodos para a triagem e identificação de reagentes que modulem a atividade de Norrin conforme se relacionada com a sinalização da via de Wnt. De preferência, os agentes assim identificados modulam a remodelagem óssea e/ou os níveis de lipídios e podem ser miméticos de Norrin e agonistas de Norrin, assim como outros agonistas e miméticos do complexo LRP5/Norrin/Frizzled4.

(30) Prioridade Unionista: 07/02/2006 US 60/765,760

(73) Titular(es): Wyeth

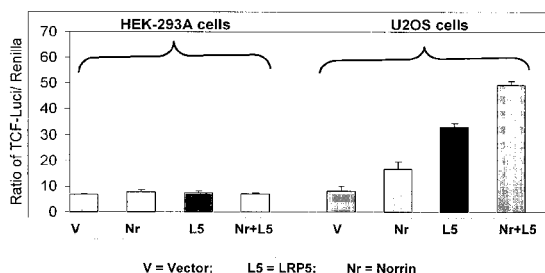
(72) Inventor(es): Frederick J. Bex III

(74) Procurador(es): Trench, Rossi e Watanabe

(86) Pedido Internacional: PCT US2007003236 de 06/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/092487 de 16/08/2007

Ratio of TCF-Luci/Renilla = Razão de TCF-Luci/Renilla
HEK-293A cells = células HEK-293A
U2OS cells = células U2OS
Vector = Vetor





PI0707514-6

“MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE UM AGENTE QUE
MODULE OSSOS OU UM LIPÍDIO; MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE UM
AGENTE QUE MODULE A ATIVIDADE DE NORRIN-FRIZZLED4; KIT
PARA IDENTIFICAR UM AGENTE QUE MODULE A ATIVIDADE DE
5 LRP5-NORRIN-FRIZZLED4; CÉLULA OU LINHAGEM CELULAR
DESPROVIDA DE NORRIN NATIVO E QUE EXPRESSE UMA LRP5 NÃO
NATIVA E UMA FRIZZLED4 NÃO NATIVA”

REFERÊNCIA A LISTAGENS DE SEQUÊNCIAS

As listagens de seqüência aqui apresentadas,
10 contendo SEQ ID NOS: 1-28, são aqui incorporadas por re-
ferência para todas as finalidades.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a materiais e
métodos para regular o gene de Norrin ou a proteína
15 Norrin, miméticos de Norrin, ou agentes que interajam com
Norrin e, dessa forma, modulem sua atividade no complexo
LRP5/Norrin/Frizzled4.

FUNDAMENTOS

Mutações na proteína Norrin ou da doença de
20 Norrie (NDP ou Ndph) levam à doença de Norrie (ND), uma
síndrome neurológica recessiva ligada a X (Berger et al.,
1992 *Nat. Genet.* 1: 199-203; e Chen et al., 1992 *Nat. Ge-
net.* 1: 204-208; por exemplo, N° de Acesso NCBI AAH29901,
BC029901 e CAA46639 para seqüências humanas, e CAA58725,
25 CAA63134 e X83794 para seqüências de *Mus musculus*). O ge-

ne que codifica NDP está localizado em Xp11.4 no genoma humano. As características da doença incluem displasia retiniana, cegueira e retardo mental. Camundongos com NDP desativado têm um fenótipo ocular que se assemelha à do-
5 ença de Norrie humana (Rhem et al., 2002 *J. Neuroscience* 22: 4286-4292) e mostram falha na angiogênese retiniana. O gene também está ligado à doença de Coats (telangiectasia retiniana), vítreo-retinopatia exsudativa ligada a X (EVRX) e retinopatia avançada de prematuridade (ROP).

10 Mutações em NDP também podem causar a forma ligada a X da Vítre-retinopatia Exsudativa Familiar (FEVR), que apresenta alguns dos sintomas de ND. FEVR também é causada por mutações no gene *Frizzled4* (*Fz4*), que codifica um dos dez receptores sete-transmembrana de serpentina
15 da sinalização Wnt (Robitaille et al., 2002 *Nat. Genet.* 32: 326-330).

A família Wnt consiste em 19 membros, e eles mostram interação de alta afinidade com 10 proteínas Frizzled (*Fz*). Diferentes Wnts têm diferentes afinidades
20 por várias proteínas Frizzled e podem se engajar em diferentes vias (Wu et al., 2002 *J. Biol. Chem.* 277: 41762 - 41769). A via canônica de Wnt envolve a estabilização de beta-catenina mediante interação com Frizzled e sua proteína receptora relacionada a lipoproteína co-receptora 5
25 ou 6 (LRP5/LRP6). Em pacientes e camundongos, as mutações

de perda de função em LRP5 também mostram defeitos oculares vasculares, além de osteoporose, e dão origem à síndrome de osteoporose-pseudoglioma (OPPG) (Gong et al., 2001 *Cell* 207: 513-523; e Kato et al., 2002 *J. Cell Biol.* 5 157: 303-314).

Norrin pode induzir a via Wnt-beta-catenina (Xu et al., 2004 *Cell* 116: 883-895). Norrin funciona muito como uma Wnt, porque ambas requerem um receptor Fz e um co-receptor LRP5/LRP6 para sinalização, e ambas se ligam predominantemente ao domínio rico em cisteína (CRD) de Fz com afinidade nanomolar (Hsieh et al., 1999 *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 96: 3546-3551; Wu et al., 2002 *J. Biol. Chem.* 277: 41762-41769; e Xu et al., 2004 *Cell* 116: 883-895). Norrin é uma pequena proteína rica em cisteína que é secreta-
15 cretada; forma oligômeros ligados por dissulfeto e permanece associada à superfície celular e matriz extracelular (Perez-Vilar et al., 1997 *J. Biol. Chem.* 272: 33410-33415). A partir de comparações de seqüências e estudos de modelagem, sugeriu-se que a Norrin tivesse uma similaridade de estrutura terciária à TGF-beta (Meitinger et al., 1993 *Nat. Genet.* 5: 376-380), fator de von Willebrand, e à mucina (Meindl et al., 1992 *Nat. Genet.* 2: 139-143). O gene de Norrin é expressado predominantemente no cérebro e na retina (Berger et al., 1992 *Nat. Genet.* 25 1: 199-203; e Chen et al., 1992 *Nat. Genet.* 1: 204-208).

Candidatos a fármacos para o tratamento de doenças relacionadas à remodelagem óssea estão sendo constantemente buscados. O esqueleto adulto humano está em um estado dinâmico, sendo continuamente degradado e reformado pelas ações coordenadas de osteoclastos e osteoblastos em superfícies ósseas trabeculares (também chamadas de cancelosas) e em sistemas haversianos. A ruptura da remodelagem óssea pode levar a doenças e condições como osteoporose (osteoporose pós-menopausa, osteoporose induzida por glicocorticóides, osteoporose induzida por transplantes e juvenil), raquitismo, osteomalacia, osteomálacia induzida por tumores, hipofosfatasia, doença de Paget e outras. Assim, é necessário elucidar mais detalhadamente as vias que controlam a remodelagem óssea e identificar alvos nessas cascatas que sejam úteis para o desenvolvimento de agentes que modulem os alvos.

SUMÁRIO

Os materiais e métodos aqui descritos proporcionam uma maior elucidação do envolvimento de Norrin na via de Wnt mediante sua interação com LRP5 e 6 e Frizzled4 para remodelagem óssea e modulação do metabolismo lipídico, e proporcionam genericamente ensaios que usam Norrin e compostos que interagem com Norrin (por exemplo, agonistas de Norrin) para a triagem de compostos que sejam úteis na modulação de transtornos ósseos e modulação de lipídios. Também são considerados métodos e materiais

para a identificação de miméticos de Norrin, assim como miméticos do complexo LRP5/Frizzled4/Norrin.

Portanto, um aspecto se refere a um método de identificação de um agente que module ossos ou um lipí-
5 dio, compreendendo: (a) a colocação de uma proteína Frizzled4 ou polipeptídeo Frizzled4 biologicamente ativo com uma proteína LRP5 ou proteína LRP5 biologicamente ativa na presença do agente; e (b) a determinação de se o dito agente é um agente que interaja com Frizzled4 e/ou LRP5
10 ou polipeptídeo ativo de Frizzled4 ou LRP5, e module pelo menos um parâmetro de ossos e/ou um lipídio na presença do agente. Em um aspecto, a proteína Frizzled4 ou fragmento polipeptídeo de Frizzled4 biologicamente ativo é ligado à proteína LRP5 ou fragmento polipeptídico biolo-
15 gicamente ativo de LRP5; isso pode ser na forma de uma proteína de fusão. O agente submetido à triagem por esse método pode ser um mimético de Norrin, assim como agonistas e antagonistas de Norrin.

Outro aspecto se refere a um método de identi-
20 ficação de um agente que module o metabolismo ósseo ou metabolismo lipídico, compreendendo: (a) a colocação de uma proteína Norrin ou um fragmento polipeptídico de Norrin biologicamente ativo e uma proteína ou fragmento polipeptídeo biologicamente ativo de Frizzled4 fusionado
25 proteínas LRP5 e/ou LRP6 ou seus fragmentos polipeptídicos biologicamente ativo na presença do agente; e (b) a

medição *in vitro* ou *in vivo* de pelo menos um parâmetro de modulação óssea e/ou modulação lipídica, para identificar o agente que module metabolismo ósseo ou metabolismo lipídico.

5 Os parâmetros de modulação óssea para qualquer um dos métodos discutidos pode ser qualquer um ou mais de densidade óssea, resistência óssea, número de trabéculas, tamanho do osso ou conectividade do tecido, ou quaisquer de suas combinações. Os parâmetros de modulação lipídica
10 discutidos em qualquer um desses métodos de triagem podem incluir uma alteração no nível de HDL, VLDL, colesterol, triglicerídeos, apoE ou LDL. Outro aspecto da triagem de agentes nesses métodos é observar se eles alteram padrões de expressão de genes associados ao metabolismo lipídico
15 ou metabolismo ósseo. Por exemplo, se eles alteram a expressão de um ou mais de COX-2, Jun, Fos, ciclina D1, Wnt10B, SFRP1, conexina 43, eNOS, Wnt10B, ciclina D1, Frizzled2, e se WISP2 é modulada.

Os métodos também podem incluir proteína Dkk ou
20 um fragmento polipeptídico de Dkk biologicamente ativo e/ou uma proteína Kremen, um fragmento polipeptídico de Kremen biologicamente ativo e/ou uma proteína Wnt ou um fragmento polipeptídico de Wnt biologicamente ativo.

Em ainda outro aspecto, considera-se o método
25 para a identificação de um agente que module uma atividade de de Norrin-Frizzled4, compreendendo: (a) a colocação do

agente, uma proteína Norrin ou um fragmento polipeptídico biologicamente ativo de Norrin e uma proteína Frizzled4 ou um fragmento polipeptídico biologicamente ativo de Frizzled4 fusionado a LRP5 e/ou LRP6 ou um fragmento polipeptídico biologicamente ativo de LRP5 e/ou LRP6, ou fusionado a um domínio de ligação a ligante (LBD) contendo o fragmento polipeptídico de LRP5 ou LRP6 e:

(i) uma proteína Kremen ou fragmento polipeptídico biologicamente ativo de Kremen; e/ou

10 (ii) uma proteína Dkk ou fragmento polipeptídico biologicamente ativo de Dkk; e

(b) a determinação de se o agente modula uma atividade de Norrin-Frizzled4. Os agentes podem ser um mimético de Norrin, agonista de Norrin, antagonista de Dkk ou a um antagonista de Kremen. Também pode ser para 15 avaliar agonistas de Frizzled4 e agonistas de LRP5.

Para alguns desses métodos, as proteínas ou fragmentos polipeptídicos biologicamente ativos das proteínas podem ser fixados a um substrato como PVDF ou nitrocelulose. 20

Um aspecto adicional considera um método de identificação de um agente que regule a modulação óssea ou modulação lipídica, compreendendo: (a) a administração do agente a uma célula que expresse Frizzled4 e LRP5, em que 25 Frizzled4 é uma proteína Frizzled4 ou fragmento polipeptídico biologicamente ativo de Frizzled4, e LRP5 é uma

proteína LRP5 ou um fragmento polipeptídico biologicamente ativo de LRP5; (b) a determinação de se a dita administração do agente de teste modula uma interação LRP5-Frizzled4; e (c) a determinação de se o agente modula um parâmetro ósseo e/ou um parâmetro lipídico. Um aspecto desse método considera que a célula não expressa Norrin, o que é útil na identificação de miméticos de Norrin. Outro aspecto tem a célula expressando uma Frizzled4, LRP5, LRP6 e/ou Norrin não endógena, e o uso da célula para, por exemplo, identificar agonistas de Norrin.

Outro aspecto considera um método de identificação de um agente que regule a modulação óssea ou modulação lipídica, compreendendo: (a) a administração de um agente de teste a uma célula que expresse LRP5, Norrin e Frizzled4, em que LRP5 é uma proteína LRP5 ou um fragmento polipeptídico biologicamente ativo de LRP5, Norrin é uma proteína Norrin ou um polipeptídeo de Norrin biologicamente ativo, e Frizzled4 é uma proteína Frizzled4 ou um fragmento polipeptídico biologicamente ativo de Frizzled4; (b) a determinação de se a dita administração do agente de teste modula a interação Norrin-Frizzled4; e (c) a determinação de se o agente de teste modula um parâmetro da modulação óssea ou modulação lipídica. Isso considera que a célula expressa de maneira ótima uma Norrin, LRP5 e/ou Frizzled4 não endógena. Alternativamente,

a célula pode não expressar uma *Norrin*, *LRP5*, *LRP6* e/ou *Frizzled4* endógena.

Qualquer um dos agentes testados pode ser um mimético de *Norrin*, antagonista de *Dkk* ou antagonista de *Kremen*, assim como agonista e mimético de *Frizzled4*, agonista de *Norrin* e agonista de *LRP5*.

Em qualquer um dos métodos ou células considerados, as células podem ser células de vertebrados. Células de vertebrados podem incluir, mas não se limitam a, células ósseas, células renais, células mesenquimais, adipócitos, pré-adipócitos ou células de *Xenopus*.

Em qualquer um dos métodos, kits, células/linhagens celulares discutidos, a *Dkk* pode ser *Dkk1*, *Dkk2*, *Dkk3* ou *Dkk4*, ou um polipeptídeo biologicamente ativo de *Dkk1*, *Dkk2*, *Dkk3* ou *Dkk4*. Da mesma forma, para *Kremen*, quando *Kremen* é citada em qualquer aspecto, pode ser *Kremen1* ou *Kremen2*, ou um polipeptídeo biologicamente ativo de *Kremen1* ou *Kremen2*. *Wnt* também pode ser qualquer uma de *Wnt1* a *Wnt19* (por exemplo, *Wnt1*, *Wnt3*, *Wnt3a* ou *Wnt10b*) ou um fragmento biologicamente ativo de qualquer uma dessas.

Linhagens celulares para uso com qualquer dos métodos e kits podem incluir, mas não se limitam a, células *KHOS/NP*, células *KHOS-240S*, células *KHOS-321H*, células *DSDh*, células *VA-ES-BJ*, células *7F2*, células *U2OS*, células *HOSTE85*, células *ROS*, células *MC3T3-E6*, células

UMR-106, células Saos2, células MG63, células HOB, células-tronco mesenquimais (por exemplo, células-tronco mesenquimais adultas humanas), células C3H10T1/2, células HEK293A ou células HEK293T.

5 Animais também são considerados para uso na triagem dos reagentes para modulação de metabolismo ósseo e metabolismo lipídico. Modelos animais incluem animais transgênicos. Por exemplo, o animais pode ser um animal transgênico que expresse LRP5 ou HBM. Alternativamente, o
10 animal pode ser um animal com desativação, em que uma ou mais de LRP5, LRP5, Norrin, uma Dkk, uma Kremen, uma Wnt e Frizzled4 estão desativadas. Alternativamente, os animais também consideram desativações e genes introduzidos combinados. Os animais podem ser qualquer vertebrado, co-
15 mo *Xenopus* ou camundongos.

Ainda outra modalidade considera um kit para a identificação de um agente que module a atividade de Norrin-Frizzled4, compreendendo: (a) uma série de células incapazes de expressar Norrin que sejam co-transfectadas
20 com ácidos nucléicos que codifiquem Frizzled4 ou um fragmento polipeptídico biologicamente ativo de Frizzled4 e LRP5 ou um fragmento polipeptídico biologicamente ativo de LRP5; (b) opcionalmente, um ácido nucléico de Dkk para co-expressão em uma série de células que co-expressem
25 Frizzled4 ou o fragmento polipeptídico biologicamente ativo de Frizzled4 e LRP5 ou o fragmento polipeptídico bi-

ologicamente ativo de LRP5; (c) opcionalmente, um ácido nucléico de Kremen para co-expressão em uma série de células que co-expressem Frizzled4 ou um fragmento polipeptídico biologicamente ativo de Frizzled4 e LRP5 ou um
5 fragmento polipeptídico biologicamente ativo de LRP5, e/ou para co-expressão em uma série de células que co-expressem Frizzled4 ou um fragmento polipeptídico biologicamente ativo de Frizzled4, LRP5 ou um fragmento polipeptídico biologicamente ativo de LRP5, e Dkk ou um frag-
10 mento biologicamente ativo de Dkk; (d) opcionalmente, um ácido nucléico de LRP6 para co-expressão em uma série de células que co-expressem Frizzled4 ou um fragmento polipeptídico biologicamente ativo de Frizzled4 e LRP5 ou um fragmento polipeptídico biologicamente ativo de LRP5; e
15 (e) opcionalmente, um ácido nucléico de Wnt para co-expressão em uma série de células que co-expressem Frizzled4 ou um fragmento polipeptídico biologicamente ativo de Frizzled4 e LRP5 ou um fragmento polipeptídico biologicamente ativo de LRP5.

20 Ainda outro aspecto considerado é uma célula ou linhagem celular desprovida de Norrin nativo e que expresse uma LRP5 não nativa e uma Frizzled4 não nativa, em que a LRP5 não nativa é uma proteína LRP5 não nativa, e a Frizzled4 não nativa é uma proteína Frizzled4 não nativa,
25 em que a LRP5 é a proteína completa ou um fragmento polipeptídico biologicamente ativo de LRP5, e Frizzled4 é a

proteína completa ou um fragmento polipeptídico biologicamente ativo de Frizzled4, e Norrin é a proteína completa ou um fragmento polipeptídico biologicamente ativo de Norrin. A expressão dessas proteínas pode ser uma expressão transitória ou estável. Outro aspecto considera a expressão não nativa (não endógena) de LRP5, LRP6, Frizzled4, uma Dkk e/ou uma Kremen, em que qualquer uma dessas pode ser a proteína inteira ou seus fragmentos polipeptídicos biologicamente ativos.

10 Outro aspecto considera os agentes identificados por qualquer um dos métodos acima isoladamente ou em uma composição farmacêutica com excipientes e/ou veículos farmacêuticamente aceitáveis adequados. O agente pode ser usado para tratar um transtorno lipídico e/ou um transtorno ósseo ou usado para formular um medicamento para uso no tratamento de um desses transtornos.

Deve-se entender que tanto a descrição genérica precedente, quanto a descrição detalhada a seguir são exemplificativas e explicativas e se destinam a explicar mais aprofundadamente a invenção conforme reivindicada.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Os desenhos anexos, que são incluídos para proporcionar uma melhor compreensão dos materiais e métodos apresentados e que são incorporados em e fazem parte deste relatório, ilustram as modalidades.

FIG. 1. Norrin ativa a sinalização TCF em células do tipo osteoblasto U2OS, mas não em células HEK-293A. Ensaaios de co-transfecção transitória foram conduzidos em células renais embrionária humanas (HEK) HEK-293A e células U2OS com repórteres TCF-luci e renila. O gráfico de barras representa a razão de sinais de luminescência de TCF-luci para sinais de renila que normalizam as respostas entre várias transfecções usando diferentes construtos de cDNA no vetor pcDNA.

FIG. 2. A co-transfecção de Frizzled4 (Fz4) induzir o sinal TCF mediado por Norrin em células HEK-293A e intensifica aquele em células U2OS. O gráfico de barras mostra os resultados de respostas de TCF-luci obtidas usando-se transfecções transitórias de células HEK-293A e U2OS com várias combinações de cDNAs.

FIG. 3. O sinal LRP5-Fz4-TCF induzido por Norrin pode ser inibido sinergicamente por Dkk1 e Kremen2 em células U2OS.

FIG. 4. O sinal TCF mediado por Norrin com mutante LRP5-G171V (fenótipo HBM) é menos inibido do que aquele com LRP5 na presença de Dkk1 e Kremen2.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Como era intrigante que três genes, NDP, Frizzled4 (Fz4) e proteína receptora relacionada a lipoproteína 5 (LRP5), se mostrassem envolvidos na vascularização da retina, investigações nessa linha

revelaram que interagem no nível molecular; e que a Norrin é um ligante do complexo LRP5-Fz4. É interessante notar que a ativação mediada por Norrin de LRP5/6 envolve Fz4 e não os outros cinco membros da família Fz (isto é, mFz3, hFz5, mFz6, mFz7 e mFz8). Entretanto, a Norrin tem especificidade por Fz4 e não mostra nenhuma homologia de seqüência significativa com Wnts.

Mutações de LRP5 em seres humanos e em camundongos revelaram o papel central que o sinal LRP5 e Wnt desempenha no metabolismo ósseo (Gong et al., 2001 *Cell* 10 207: 513-523; Kato et al., 2002 *J. Cell Biol.* 157: 303-314; Boyden et al., 2002 *N. Engl. J. Med.* 346: 1513-1521; e Little et al., 2002 *Am. J. Hum. Genet.* 70: 1-19). A mutação G171V (de alta massa óssea ou do tipo "HBM") e outras dessas mutações no primeiro domínio propulsor de 15 LRP5 resulta em uma afinidade diminuída das variantes HBM pela proteína Dkkopfl1 (*Dkk1*) em comparação com a LRP5 de tipo selvagem (Boyden et al., 2002 *N. Engl. J. Med.* 346; e Ai et al., 2005 *Mol. Cell. Biol.* 25: 4946-4955). A mutação HBM leva a uma inibição diminuída por *Dkk1* e à ativação de sinais Wnt-beta-catenina mediados por mutante HBM *in vitro*. Especula-se que esse fenômeno seja o mecanismo molecular subjacente importante para o fenótipo de alta massa óssea (HBM) em seres humanos e em camundongos 20 transgênicos com mutações do tipo HBM (Babij et al., 2003 25

J. Bone Mineral Res. 18: 960-974).

Dkk1 é um dos antagonistas secretados do sinal LRP5/6-Wnt (Glinka et al., 1998 *Nature* 391: 357-362; Kawano et al., 2003 *J. Cell. Sci.* 116: 2627-2634; e Bafico et al., 2001 *Nat. Cell Biol.* 3: 683-686). Além disso, Dkk1 na presença de Kremen1/2, outro tipo de receptor transmembrana de passagem única, intensifica a inibição do sinal LRP5/6-TCF mediado por Wnt (Mao et. al., 2002 *Nature* 417: 664-667) por internalização do complexo ternário LRP5-Dkk1-Kremen. Kremens forma o complexo ternário na superfície celular com LRP5/6 e Dkk1 para facilitar sua internalização ou endocitose. Kremens facilita a rápida endocitose de LRP5 e LRP6 a partir da membrana celular e, dessa forma, bloqueia a sinalização LRP5/6-Wnt. Os materiais e métodos aqui apresentados surgiram da especulação de que o padrão de expressão desses interatores em um dado tipo celular possa regular a sinalização Wnt ou trazer uma especificidade adicional à função de LRP5/6 em células como osteoblastos. Deve-se notar que, a menos que especificamente mencionado, em todos os casos em que se faz referência a Dkk1, pode-se substituir por qualquer uma das outras Dkks isoladamente ou em combinação.

A análise das quatro variantes de união de Kremen2 (Krm2) revelou uma variante desprovida de 44 aminoácidos na terminação carbóxi, que pode intensificar a ini-

bição mediada por Dkk1 de LRP5/6 (B. Mao et al., "Kremen proteins are Dickkopf Receptors that Regulate Wnt/beta-Catenin Signaling," 2002 *Nature* 417(6889): 664-667). Efeitos máximos da intensificação com Dkk1 são observados com um clone Krm2 de comprimento total. A atividade de Krm2 é mediada por sua interação com o segundo domínio rico em cisteína de Dkk1. Krm2 também pode converter o ativador de sinal LRP6-Wnt Dkk2 em um inibidor em células HEK-293A. Deve-se notar que, a menos que especificamente mencionado, em todos os casos em que se faz referência a Kremen2, pode-se substituir por Kremen1 isoladamente ou em combinação com Kremen2.

Os materiais e métodos aqui apresentados se referem às interações funcionais entre Norrin, Frizzled4, LRP5 ou variantes HBM de LRP5, por exemplo, G171V. Conforme aqui descrito, Norrin intensifica modestamente o sinal TCF do mutante G171V-LRP5 com relação ao sinal observado com LRP5 em células ósseas U2OS. Norrin também leva a uma inibição diminuída da via por Dkk1 e/ou Kremen2. Aqui são apresentados materiais e métodos para o uso de Norrin como um agente de triagem para encontrar reagentes que sejam miméticos de Norrin e agonistas de Norrin. Esses agentes de modulação de Norrin e miméticos de Norrin podem ser úteis para modulação óssea. Moduladores de Norrin e miméticos de Norrin incluem, mas não se limitam a, pequenas moléculas químicas, polipeptídios,

peptídios, siRNAs e imunoglobulinas.

1. Abreviações e Definições

1.1 Abreviações

As abreviações a seguir foram usadas no relatório. Embora esses acrônimos e abreviações possam ter diferentes significados em outras técnicas, são conforme indicados abaixo ou conforme separadamente distinguidos no relatório.

	ACP5	fosfatase ácida 5
10	Akt-3	proteína quinase B (PKB) ou RAC-PK
	ALPASE	fosfatase alcalina
	ALFA	ensaio homogêneo de proximidade luminescente amplificado
	APE	proteína relacionada a adaptador 1
15	AP1B1	complexo de proteína adaptadora AP-1, subunidade beta 1
	AXIN	axina
	b.i.d.	<i>bis in die</i> (duas vezes ao dia)
	BGN	biglicano específico para osso
20	BMC	teor mineral ósseo
	BMD	densidade mineral óssea
	BMP1	proteína morfogenética óssea 1
	BMP4	proteína morfogenética óssea 4
	BMU	unidade de remodelagem óssea
25	BSA	albumina sérica bovina

	BTG2	gene 2 de translocação de células B, anti-proliferativo
	CBFB	fator beta de ligação a núcleo
	CCND1	ciclina D1
5	CCND3	ciclina D3
	CCNI	ciclina I
	cDNA	DNA complementar
	CELSR2	receptor 2 do tipo G de sete passagens da caderina EGF LAG
10	CFP	proteína ciano fluorescente
	CHUK/IKK	quinase ubíqua de hélice-alça-hélice alfa conservada, I κ B quinase alfa
	CK1 alfa	caseína quinase 1, alfa 1
	CKB	creatina quinase, cérebro
15	CNK1	intensificador de conector do tipo KSR
	Coll1A1	colágeno, tipo 1, alfa 1
	Col3A1	colágeno, tipo 3, alfa 1
	Col6A3	colágeno, tipo VI, alfa 3
20	Connx43	Conexina 43
	COX-2	ciclooxigenase-2
	CRABP2	proteína de ligação a ácido retinóico celular II
	CRD	domínio rico em cisteína
25	CSF1R	receptor do fator estimulador de colônias 1

	CSPG2	condroitina sulfato proteoglicano
	CTGF	fator de crescimento de tecido con-
		juntivo
	CTSK	catepsina K
5	CX3CR1	receptor 1 de quimicina (C-X3-C)
	Ciclina D1	veja também CCND1
	DELTEX	homólogo deltex 2 (<i>Drosophila</i>), veja
	EphB2	
	Dkk	Dikkopf
10	Dkk1	Dikkopf1
	Dkk2	Dikkopf2
	Dkk3	Dikkopf3
	Dkk4	Dikkopf4
	DMSO	sulfóxido de dimetila
15	dsRNA	RNA de fita dupla
	DVL1	despenteadado, homólogo dsh (<i>Drosophi-</i>
		<i>la</i>)
	DXA	absorciometria de raios X dupla
	EDTA	ácido etilenodiaminatetraacético
20	EGTA	ácido etileno glicol- <i>O-O'</i> -bis(2-
		aminoetil)- <i>N,N,N'N'</i> -tetraacético
	eNOS	óxido nítrico sintetase excitável
	EPHB2	intensificador de conector do tipo
	KSR	(supressor quinase de ras de <i>Drosophila</i>)
25	EPHB6	receptor de Eph B6

	ERBB3	oncogene GR01
	ERK	também conhecida como proteína quina- se ativada por mitógeno p44/42 (MAPK)
5	EVRX	vítreo-retinopatia exsudativa ligada a X
	FAP	proteína de ativação de fibroblastos, alfa
	FBLN1	fibulina 1
	FBS	soro bovino fetal
10	FEVR	vítreo-retinopatia exsudativa famili- ar
	FGF-2	Fator de crescimento de fibroblastos 2 (básico)
15	FGF-7	Fator de crescimento de fibroblastos 7 (fator de crescimento de queratinócitos)
	FOS	homólogo do oncogene viral de osteos- sarcoma murídeo FBJ
	FOSL1	antígeno 1 do tipo Fos
20	FRET	transferência de energia por resso- nância fluorescente
	Frizzled2	Frizzled (<i>Drosophila</i>) homólogo 2, também chamada de FZD2
	Fz	Frizzled
	Fz4	Frizzled4
25	FZD2	Frizzled (<i>Drosophila</i>) homólogo 2
	FZD4	Frizzled homólogo 4

	G171V	mutação de glicina para valina na posição 171 de LRP5 humana
	GADD45A	induzível por parada do crescimento e dano ao DNA, alfa
5	GADD45B	induzível por parada do crescimento e dano ao DNA 45, beta
	GADD45G	induzível por parada do crescimento e dano ao DNA 45, gama
10	6	GAS6 específico para parada de crescimento
	GFP	proteína fluorescente verde
	GJA1	proteína alfa 1 de canal de membrana de junção de vão (também conhecida como Connexina 43)
15	GJB3	proteína beta 3 de canal de membrana de junção de vão
	GSK-3	glicogênio sintetase quinase-3
	GSK-3 α	glicogênio sintetase quinase-3, isoforma alfa
20	GSK-3 β	glicogênio sintetase quinase-3, isoforma beta
	HBM	fenótipo de alta massa óssea
	HDL	lipoproteína de alta densidade
	HEK	rim embrionário humano
25	HERPUD1	membro 1 do domínio do tipo ubiquitina induzível por estresse de retículo endoplasmático, induzível por homocisteína

	HRT	terapia de substituição hormonal
	i.m.	intramuscular
	i.v.	intravenoso
	IDB2	inibidor de ligação 2 a DNA
5	IDB3	fator de crescimento do tipo insulina
		2 (somatomedina A)
	IGF2R	receptor do fator de crescimento do
		tipo insulina 2
	IGFBP6	proteína de ligação 6 ao fator de
10		crescimento do tipo insulina
	iGSK	inibidor de GSK
	iGSK-3	inibidor de GSK-3
	IL-1	interleucina-1
	IL1R1	receptor de interleucina-1, tipo I
15	IL1RL1	do tipo receptor de interleucina-1 1
	IL4RA	receptor de interleucina 4, alfa
	IL-6	interleucina-6
	ITGA5	integrina alfa 5 (receptor alfa de
		fibronectina)
20	ITGB5	integrina, beta
	ITGBL1	integrina, do tipo beta 1
	JNK	via da c-jun amino quinase
	JUN	homólogo do oncogene de vírus de sar-
		coma aviário 17 v-jun
25	JUND1	gene d1 relacionado ao proto-oncogene
		Jun

	Kremen	gene que codifica Kringle que marca o olho e o nariz
	Krm1	Kremen1
	Krm2	Kremen2
5	LBD	domínio de ligação a ligante de LRP5, LRP6, HBM
	LDL	lipoproteína de baixa densidade
	LDLR	receptor de lipoproteína de baixa densidade
10	LOX	lisil oxidase
	LRP5	proteína 5 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade
	LRP6	proteína 6 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade
15	LSP1	proteína 1 específica para linfócitos
	LUM	lumicano
	mAb	anticorpo monoclonal
	MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno (p42,44) (ERK)
20	MAPKAPK2	proteína quinase 2 ativada por proteína quinase ativada por mitógeno, também chamada de MK2
	MCC	mutação para cânceres colo-retais
	MDSC	células tronco derivadas de mesênquima
25	MET	proto-oncogene <i>met</i> (receptor do fator de crescimento de hepatócitos)

	MMP-14	metaloproteinase de matriz 14
	MMP-9	metaloproteinase de matriz 9
	MSX1	homeo caixa, do tipo msh 1
	MYBL1	homólogo de oncogene viral de mielo-
5	blastose <i>v-myb</i> (aviário) do tipo 1	
	MYC	homólogo do oncogene viral de mielo-
	citomatose aviária <i>v-myc</i>	
	MYCS	oncogene do tipo <i>Myc</i> , proteína <i>s-myc</i>
	NCAM1	molécula de adesão de células neurais
10	1	
	ND	doença de Norrie
	NDP	proteína da doença de Norrie (também
		Ndph)
	NFATC1	fator nuclear de células T ativadas,
15	citoplasmático 1	
	NFKB1	fator nuclear do intensificador de
	gene de cadeia leve kapa em células B 1, p105	
	Non-TG	não transgênico
	NOS3	óxido nítrico sintetase 3, também
20	conhecida como eNOS	
	NR4A1	subfamília 4 de receptor nuclear,
	grupos A, membro 1	
	OGN	osteoglicina
	OPG	osteoprotegerina
25	OPPG	síndrome de osteoporosepseudoglioma
	OSMR	receptor de oncostatina M

	PCOLCE	proteína intensificadora da pró-colágeno c-proteinase
	PDGFA	Incl. Aglomerador M29464:fator de crescimento derivado de plaquetas alfa
5	PDGFRA	polipeptídeo do receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas alfa
	PKA	proteína quinase A
	PKC	proteína quinase C
10	PLAT	ativador de plasminogênio do tipo tissular, t-PA
	PNA	ácido nucléico peptídico
	PRDC-PENDING	proteína relacionada a DAC e Cerberus
	PTGIS	prostaglandina sintetase
15	PTGS	silenciamento de gene pós-transcrição
	PTGS1	prostaglandina endoperóxido sintetase 1, também chamada de COX-1
20	PTGS2	prostaglandina endoperóxido sintetase 2 (prostaglandina G/H sintetase ou ciclooxigenase 2) ou COX-2
	PTH	hormônio paratireoidiano
	RAMP3	proteína 3 modificadora de atividade de receptor (calcitonina)
	RANK	ativador de receptor de NF-kB
25	RANKL	ligante de ativador de receptor de NF-kB

	RLUs	unidades relativas de luciferase
	RNAi	interferência de RNA
	ROP	retinopatia de prematuridade
	RUNX1	fator de transcrição relacionado a
5	runt 1	
	RUNX2/CBFA1	fator de transcrição relacionado
	a runt 2	
	S100A10	proteína de ligação a cálcio similar
	a calpactina	
10	SDC1	sindecano 1
	SDF1	fator derivado de estroma 1
	SERM	modulador de receptor de estrogênio
	seletivo	
	SERPINE1	inibidor da serina (ou cisteína) pro-
15	teinase, clade E (nexina, inibidor do ativador de plasmi-	
	nogênio tipo 1), membro 1	
	SFRP1	proteína relacionada a frizzled se-
	cretada 1	
	SFRP4	proteína relacionada a frizzled se-
20	cretada 4	
	shRNA	RNA em forma de grampo curto
	siRNA	RNA de interferência curto
	SPARC	sparc/osteonectina
	SPARCL1	do tipo SPARC 1 (mast9, hevina)
25	SPP1	fosfoproteína secretada 1
	SPR	ressonância de plasmon de superfície

	STAT1	transdutor de sinal e ativador de transcrição 1
	STAT3	gene RIKEN cDNA 1110034C02
5	TANK	ativador de Nf-kappa B associado a membro da família TRAF
	TCF	fator de células T
	TG	transgênico
	TGFB1	fator de crescimento transformador, beta 1
10	TGFBR2	fator de crescimento transformador, beta receptor II
	TGF- β	fator de crescimento tumoral beta
	THBD	trombomodulina
	THBS1	trombospondina 1
15	TIEG	gene precoce induzível por TGFB
	TIMP1	inibidor tissular de metaloproteinase
	TIMP2	inibidor tissular de metaloproteinase
2		
	TIMP3	inibidor tissular de metaloproteinase
20	3	
	TNF	fator de necrose tumoral
	TNFRSF10B	superfamília de receptor de fator de necrose tumoral, membro 10b
	TNFRSF11B	superfamília de receptor de fator de
25		necrose tumoral, membro 11b (osteoprotegerina)

	TNFSF11	superfamília fator de necrose tumoral (ligante), membro 11 (veja RANKL)
	TOB1	transdutor de ErbB-2.1
	TRAF3	fator 3 associado a receptor de TNF
5	TUNEL	etiquetagem de extremidade de entalhe dUTP de desoxinucleotidil transferase terminal
	UNK_D83402	prostaglandina I2 (prostaciclina) sintetase
10	VCAM1	molécula de adesão de células vasculares 1
	VEH	veículo
	VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa
	WIF	fator inibitório de Wnt
	WISP1	proteína 1 da via induzível por WNT1
15	WISP2	proteína 2 da via de sinalização induzível por WNT1
	Wnt 3A	membro da família de sítios de integração MMTV do tipo sem aba
20	Wnt	família de sítios de integração MMTV do tipo sem aba (por exemplo, Wnt1 a Wnt 19)
	Wnt10B	membro da família de sítios de integração MMTV do tipo sem aba 10B
	Wnt6	membro da família de sítios de integração MMTV do tipo sem aba 6
25	YFP	proteína fluorescente amarela

1.2 Definições

De acordo com esta descrição detalhada, aplicam-se as seguintes abreviações e definições. Deve-se notar que, conforme aqui usado, as formas singulares "um", "uma", "o" e "a" incluem os respectivos plurais, a menos
5 que o contexto claramente indique de outra forma. Assim, por exemplo, referência a "um mimético" inclui uma pluralidade desses miméticos, e referência a "a dosagem" inclui referência a uma ou mais dosagens e seus equivalentes conhecidos por aqueles versados na técnica, e assim
10 por diante.

A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm os mesmos significados que os comumente entendidos por aqueles versados na técnica. Os seguintes termos são apresentados
15 abaixo. Os genes aqui citados pretendem incluir os números de acesso mencionados, assim como outras seqüências não especificadas.

"Animal" significa qualquer vertebrado. "Animal" inclui "mamíferos". Mamíferos preferidos incluem animais de criação (por exemplo, ungulados, como gado, búfalos, cavalos, ovelhas, porcos e cabras), assim como roedores (por exemplo, camundongos, hamsters, ratos e coibaias), caninos, felinos, primatas (por exemplo, chimpanzés, orangotangos, humanos), lupinos, camelídeos e cervídeos.
20
25 deos. Outros vertebrados incluem aves (por exemplo, gali-

nhas, patos, gansos, aves selvagens), anfíbios (por exemplo, *Xenopus*) e ictiíides (peixes).

“Norrin” pretende incluir todas as formas vertebradas de Norrin e todas as suas formas de polipeptí-
5 dios e ácidos nucleicos. “Norrin” também é chamada de ND, proteína da doença de Norrie, precursor de Norrin, NDP, Ndp e homologia da proteína de doença de Norrie (Ndph). Variantes de Norrin também são consideradas.

“Atividade de Norrin” seria uma atividade de
10 Norrin ao envolver a via de sinalização de Wnt e sua interação com Frizzled4 e LRP5/6. Isso incluiria a interação de Norrin com Frizzled4 (Fz4) e sua intensificação da atividade de LRP5. A única proteína Frizzled com a qual Norrin interage é a Frizzled4. Entretanto, as Wnts aqui
15 discutidas podem ser usadas nos sistemas de ensaio para comparar a especificidade de qualquer molécula que module a interação Norrin-Frizzled4 e LRP5 e LRP6 no sistema de sinalização de Wnt. Assim, “agente modulador de Norrin” é um agente que module uma atividade de Norrin, em que a
20 atividade de Norrin seja parte da sinalização de Wnt. Uma atividade de Norrin preferida é a regulação da remodelagem óssea e/ou modulação lipídica. Com relação à modulação lipídica, veja o pedido de patente norte-americana nº 09/578.900. O conteúdo do pedido de patente norte-
25 americana nº 09/578.900 é aqui incorporado por referência para todas as finalidades em sua inteireza. Agentes modu-

ladores de Norrin incluem agonistas e antagonistas da atividade óssea e/ou níveis lipídicos. Um agonista de Norrin, por exemplo, intensificaria o crescimento ósseo em um sujeito quando administrado.

5 "Dkk" pretende incluir todas as formas vertebradas de Dkk1, Dkk2, Dkk3 e Dkk4 e todas as formas de ácidos nucleicos e polipeptídios. "Dkk1" também se refere a Dickkopf-1, precursor de proteína-1 relacionada a Dickkopf, Dkk-1, DKK-1, hDkk-1 (para a forma humana de Dkk1),
10 AK e UNQ492/PRO1008. "Dkk2" também se refere a Dickkopf-2, precursor de proteína-2 relacionada a Dickkopf, Dkk-2, DKK-2, hDkk-2 (para a forma humana de Dkk2) e UNQ682/PRO1316. "Dkk3" também se refere a Dickkopf-3, precursor de proteína-3 relacionada a Dickkopf, Dkk-3,
15 hDkk-3 (forma humana de Dkk3), REIC e UNQ258/PRO295. "Dkk4" pretende incluir Dickkopf-4, precursor de proteína-4 relacionada a Dickkopf, Dkk-4, DKK-4 e hDkk-4 (para a forma humana de Dkk4). Variantes de Dkk também são consideradas. Agentes moduladores de Dkk incluiriam antagonistas e agonistas de Dkk.
20

"Kremen" pretende incluir todas as formas vertebradas de Kremen1 e Kremen2 e todas as formas de ácidos nucleicos e polipeptídios. "Kremen1" também é chamado de receptor de Dickkopf, FLJ31863, KREMEN, proteína contendo
25 Kringle que marca o olho e o nariz, proteína 1 transmembrana contendo Kringle e KRM1. "Kremen2" também é chamado

de receptor 2 de Dickkopf, precursor de proteína 2 Kremen, proteína contendo Kringle que marca o olho e o nariz, KRM2, MGC10791, MGC16709 e a forma Kremen2 associada à Equipe do Programa de Coleção de Genes de Mamíferos (MGC), 2002 "Generation and initial analysis of more than 5 15,000 full length human and mouse cDNA sequences," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 99(26): 16899-16903. Variantes de Kremen também são consideradas. Agentes moduladores de Kremen incluem antagonistas e agonistas de Kremen.

10 "LRP5" ou "proteína 5 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade" pretende incluir todas as formas de ácidos nucléicos e polipeptídios vertebradas de LRP5. Outros nomes para LRP5 e homólogos relacionados incluem BMND1, Zmax1, HGNC:8152, proteína 5 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade, 15 LR3, LRP7, OPPG, OPS e VBCH2. "LRP5" também é conhecida como "arr" em *Drosophila* e tem os seguintes sinônimos adicionais: BEST:CK00539, CK00539, l(2)k08131, LDLR-like, LRP, LRP5/6 e LRP6. Por exemplo, uma variante "HBM" ou 20 "alta massa óssea" de LRP5 tem uma única alteração de aminoácido na forma polipeptídica de uma glicina para uma valina na posição 171 na seqüência polipeptídica humana. há uma mutação similar na posição 170 da seqüência de camundongo. Homólogos adicionais em outros vertebrados podem ser determinadas em outras espécies dados os domínios 25 de hélice tridimensional. O uso de HBM considera a inclu-

são da variante G171V e seu homólogo de outras espécies de vertebrados. Uma variante de HBM é uma que produz um fenótipo de alta massa óssea, que resulta de uma mutação em LRP5 diferente da alteração G171V. Para as formas
5 Zmax1 e HBM, veja a patente norte-americana nº 6.770.461, que é aqui incorporada em sua inteireza para todas as finalidades. Assim, um exemplo de uma variante ou homólogo de tipo selvagem de LRP5 é a Zmax1. Quando se faz referência a LRP5, todas as formas de LRP5, incluindo uma va-
10 riante ou homólogo de tipo selvagem, também são consideradas. Variantes de LRP5 e HBM também são consideradas. Agentes moduladores de LRP5 incluiriam agonistas e antagonistas de LRP5. Também se consideram miméticos de LRP5.

"LRP6" ou "proteína 6 relacionada a receptor de
15 lipoproteína de baixa densidade" pretende incluir todas as formas de ácidos nucleicos e polipeptídios vertebrados de LRP6. LRP6 também é chamada de precursor da proteína 6 relacionada a lipoproteína de baixa densidade. Variantes de LRP6 também são consideradas. Quando se faz referência
20 a LRP6, todas as formas de LRP6, incluindo uma variante ou homólogo de tipo selvagem, também são consideradas. Quando se discute o complexo Frizzled4/LRP5, o complexo também se refere a Frizzled4/LRP6 e Frizzled4/LRP5/LRP6. Agentes moduladores de LRP6 incluem agonistas e antago-
25 nistas de LRP6. Miméticos de LRP6 mimetics também são considerados aqui para uso na modulação da via de Wnt de

modo a intensificar o crescimento ósseo.

“Wnt” pretende incluir qualquer proteína e ácido nucléico de Wnt (membro da família de sítios de integração MMTV do tipo sem aba), incluindo aqueles de Wnt1-
5 Wnt19. Formas exemplificativas de Wnt incluem Wnt1 (também conhecida como membro da família de sítios de integração MMTV do tipo sem aba 1, INT1 e precursor da proteína de proto-oncogene Wnt-1), Wnt3 (também conhecida como membro da família de sítios de integração MMTV do tipo
10 sem aba 3, INT4 e precursor da proteína de proto-oncogene Wnt-3), Wnt3a (também conhecida como membro da família de sítios de integração MMTV do tipo sem aba 3A e precursor da proteína Wnt-3a) e Wnt10b (também conhecida como membro da família de sítios de integração MMTV do tipo sem
15 aba 10B, precursor da proteína Wnt-10b, WNT-12, Wnt-12 e WNT-12). Variantes de qualquer uma das formas de Wnt também são consideradas. Agentes moduladores de Wnt incluem agonistas e antagonistas de Wnt.

“Variante” pretende incluir uma forma de um ácido nucléico que codifique uma proteína, em que a proteína tenha atividade biológica na cascata de Wnt e esteja envolvida na modulação do metabolismo ósseo e metabolismo lipídico. Isso pode incluir variantes aumentadas de LRP5, como a variante G171V que produz uma alta massa óssea no
25 ser humano que expressa essa proteína.

“Fragmento biologicamente ativo”, “fragmento

polipeptídico” e “polipeptídio biologicamente ativo” significam um fragmento biologicamente ativo de LRP5, LRP6, HBM, Kremen1, Kremen2, qualquer Dkk, qualquer Wnt e Norrin, em que essa atividade modula a via de Wnt e, de preferência, a via de Wnt com relação ao desenvolvimento ósseo, modulação óssea e/ou metabolismo de um lipídio. Esses são domínios das proteínas completas que estão envolvidas na sinalização de Wnt e, dessa forma, na modulação induzida pela via de Wnt de lipídios e/ou desenvolvimento ósseo. Por exemplo, polipeptídios biologicamente ativos de LRP5 e LRP6 podem ser a parte extracelular dessas proteínas (por exemplo, aminoácidos 1-1.376 da LRP5 humana (Nº de Acesso no GenBank NP_002326), Zmax1, ou HBM). Além disso, para LRP5 humana, que tem 1.615 aminoácidos de comprimento, outros domínios com atividade biológica podem incluir o domínio transmembrana (aminoácidos 1.385 a 1.407), o domínio citoplasmático (aminoácidos 1.408 a 1.615) e o domínio extracelular (aminoácidos 1-1.384 ou 20-1.384, se os primeiros 19 aminoácidos do peptídio de sinal forem removidos). Para LRP6 humana, que tem 1.613 aminoácidos de comprimento, haveria domínios análogos: domínio extracelular (aminoácidos 1-1.370 ou 20-1.370, se os primeiros 19 aminoácidos do peptídio de sinal forem removidos), domínio transmembrana (aminoácidos 1.371-1.393) e o domínio citoplasmático (aminoácidos 1.394-1.613). Demonstrou-se que o domínio extracelular rico em

cisteína (CRD) de Frizzled4 interage com Norrin, isto é, aminoácidos 36-165 (Nº de Acesso IPR000024; Nº de Acesso no GenBank NP_036325; Xu et al., 2004 *Cell* 116: 883-895); assim, um polipeptídio biologicamente ativo de Frizzled4
5 poderia conter o CRD. Um polipeptídio biologicamente ativo de Norrin poderia incluir o domínio CRD de Norrin, por exemplo, aminoácidos 15-150. Em outro exemplo, relatou-se que, para que uma proteína Dkk se ligue a Kremen1 ou Kremen2, é necessário o domínio extracelular inteiro, por
10 exemplo, aminoácidos 1-362 para Kremen2 humana (Nº de Acesso no GenBank BAC00872). Assim, partes biologicamente ativas de Kremen1 e Kremen2 conteriam pelo menos o domínio extracelular, assim como suas seqüências mais longas. Para Dkk1, por exemplo, um polipeptídio biologicamente
15 ativo conteria pelo menos o domínio rico em cisteína C-terminal (aminoácidos 183-266 para Dkk1 humana; Nº de Acesso no GenBank AAQ89364). Sabe-se que o domínio rico em cisteína C-terminal está envolvido na ligação de LRP5 e LRP6 a Kremen2. Assim, para qualquer polipeptídio biologicamente
20 gicamente ativo de uma proteína Dkk, o polipeptídio poderia conter pelo menos o domínio rico em cisteína de cada Dkk. Entretanto, outros exemplos incluem polipeptídios contendo o domínio rico em cisteína de uma proteína Dkk, assim como, por exemplo em Dkk1, seqüências das extremidades
25 N-terminais e/ou C-terminais do domínio rico em cisteína de Dkk1. Seqüências similares seriam considera-

das para outras Dkks. Esses fragmentos biologicamente ativos também podem incluir proteínas completas menos um ou mais aminoácidos na terminação carbóxi, ou terminação amio ou dentro do polipeptídio que forma a proteína, mas
5 que tenham a mesma atividade que a proteína de comprimento total, e em que esses fragmentos polipeptídicos biologicamente ativos não ajam como um inibidor de bloqueio, quando comparados com a atividade induzida pelo polipeptídio de comprimento total.

10 "Parâmetro lipídico" pretende incluir, mas não se limita a, um parâmetro medido *in vitro* ou *in vivo* para analisar uma alteração da concentração de lipídios, com base na exposição a um reagente. O parâmetro lipídico pode incluir a medição de apoE, HDL, LDL, VLDL, triglicerídeos,
15 deos, colesterol, o número de adipócitos, uma alteração na expressão do gene de adipócitos ou uma combinação desses parâmetros. Um parâmetro lipídico também se refere a razões de, por exemplo HDL:VLDL. No estudo de alterações *in vivo*, podem-se fazer perfis lipídicos, como perfis lipídicos em jejum (colesterol total, triglicerídeos, LDL e
20 HDL) para avaliar a modulação dos níveis de lipídios devidos à administração de um reagente de teste.

"Transtornos lipídicos", "doenças lipídicas" e "condições lipídicas" que possam ser mediadas por Norrin
25 pretendem incluir, mas não se limitam a, deficiência de lipoproteína lipase familiar, deficiência de apoproteína

CII familiar, hiperlipoproteinemia do tipo 3 familiar, hipercolesterolemia familiar, hipertrigliceridemia familiar, hiperlipidemia do tipo lipoproteínas múltiplas, níveis de lipídios elevados devido a diálise e/ou diabetes e níveis de lipídios elevados de etiologias desconhecidas.

“Desenvolvimento ósseo” se refere genericamente a qualquer processo envolvido na alteração do osso com o tempo, incluindo, por exemplo, desenvolvimento normal, alterações que ocorrem durante um estado patológico e alterações que ocorrem durante o envelhecimento ou alterações do padrão hormonal. Isso pode se referir a alterações estruturais e alterações de taxa dinâmica, como taxas de crescimento, taxas de resorção, taxas de reparo ósseo e outras. “Transtorno do desenvolvimento ósseo” se refere particularmente a qualquer transtorno no desenvolvimento ósseo, incluindo, por exemplo, alterações que ocorrem durante estados patológicos e alterações que ocorrem durante o envelhecimento. O desenvolvimento ósseo pode ser de natureza progressiva ou cíclica. Aspectos dos ossos que podem se alterar durante o desenvolvimento incluem, por exemplo, mineralização, formação de características anatômicas específicas e números relativos ou absolutos de vários tipos de células. Outros transtornos ósseos considerados que podem não estar relacionados ao desenvolvimento incluem, mas não se limitam a, perda ós-

sea relacionada à idade, fraturas ósseas (por exemplo, fratura do quadril, fratura de Colle, fraturas por esmagamento de vértebras), condrodistrofias, transtornos induzidos por fármacos (por exemplo, osteoporose devida à administração de glicocorticóides ou heparina e osteomalacia devida à administração de hidróxido de alumínio, anticonvulsivantes ou glutetímida), elevado turnover ósseo, hipercalcemia, hiperostose, osteogenese imperfeita, osteomalacia, osteomielite, osteoporose, doença de Paget, osteoartrite e raquitismo.

“Modulação óssea” ou “modulação da formação óssea” se refere à capacidade de afetar qualquer um dos processos fisiológicos envolvidos na remodelagem óssea, conforme será percebido por aqueles versados na técnica, incluindo, por exemplo, ressorção óssea e crescimento ósseo aposicional por , entre outras coisas, atividade osteoclástica e osteoblástica, e pode compreender algumas ou todas as formações ou desenvolvimentos ósseos, conforme aqui usado.

O osso é um tecido dinâmico que está continuamente se adaptando e renovando mediante a renovação de osso velho ou desnecessário por osteoclastos e a reconstrução de osso novo por osteoblastos. A natureza do acoplamento entre esses processos é responsável tanto pela modelagem do osso durante o crescimento, quanto pela manutenção da integridade esquelética do adulto mediante

remodelagem e reparo para atender às necessidades diárias de uso mecânico. Há inúmeras doenças que resultam de um desacoplamento do equilíbrio entre a ressorção e a formação óssea. Com o envelhecimento, há um desequilíbrio

5 "fisiológico" gradual no turnover ósseo, que é particularmente exacerbado em mulheres devido à perda de suporte estrogênico na menopausa, que leva a uma progressiva perda de osso. Quando a densidade mineral óssea cai abaixo das normas populacionais, há um conseqüente aumento na

10 fragilidade óssea e suscetibilidade a fraturas espontâneas. Para cada 10 por cento de osso que são perdidos, o risco de fratura dobra. Indivíduos com densidade mineral óssea (BMD) na espinha ou fêmur proximal 2,5 ou mais desvios padrão abaixo da massa óssea de pico normal são

15 classificados como osteoporóticos. Entretanto, indivíduos osteopênicos com BMD entre 1 e 2,5 desvios padrão abaixo da norma também estão em risco.

O osso é medido por várias formas diferentes de absorciometria de raios X. Todos os instrumentos medem o

20 teor inorgânico ou mineral ósseo do osso. Medições DXA padronizadas dão um valor que é uma densidade de área, não uma medição de densidade verdadeira pela definição clássica de densidade (massa/unidade de volume). Todavia, esse é o tipo de medição usada clinicamente para diagnos-

25 tificar osteoporose. Entretanto, embora a BMD seja o principal fator contribuinte para a resistência óssea, até

40% da resistência óssea derivam de outros fatores, incluindo, mas não limitados a: (1) tamanho do osso (isto é, diâmetros maiores aumentam a rigidez no nível do órgão, mesmo em face de uma menor densidade); (2) a conectividade das estruturas trabeculares; (3) o nível de remodelagem (loci de remodelagem são concentrações locais de distorção); e (4) a resistência intrínseca do próprio material ósseo, que, por sua vez, é função da história de cargas (isto é, mediante lesões de fadiga acumuladas) e o grau de reticulação do colágeno e nível de mineralização. Há boa evidência de que todos esses fatores de resistência/fragilidade desempenhem algum papel em fraturas osteoporóticas, assim como também um conjunto de influências extra-esqueléticas (como, mas não limitadas a, padrões de quedas, amortecimento com tecido macio e respostas reflexas do sistema nervoso central).

Instrumentos analíticos adicionais podem ser usados para verificar essas características do osso. Por exemplo, a pQCT permite a medição de compartimentos trabeculares e corticais separados quanto ao tamanho e à densidade. A μ CT (micro CT) fornece informações quantitativas de características arquitetônicas, como conectividade trabecular. A μ CT também fornece uma medida verdadeira da densidade óssea. Com essas ferramentas, os importantes parâmetros não BMD podem ser medidos para diag-

nosticar a extensão da doença e a eficácia dos tratamentos. Os atuais tratamentos para osteoporose se baseiam na capacidade de fármacos de prevenirem ou retardarem a resorção óssea. Embora os novos agentes anti-ressortivos estejam se mostrando úteis na terapia de osteoporose, eles são vistos como soluções de curto prazo para o desafio mais definitivo de se desenvolverem tratamentos que aumentem a massa óssea e/ou os parâmetros de qualidade óssea acima mencionados. Assim, a modulação óssea pode ser avaliada por medição de parâmetros como a densidade mineral óssea (BMD) e o teor mineral ósseo (BMC) por métodos de raios X pDXA, tamanho, espessura ou volume do osso, conforme medido por raios X, taxas de formação óssea, conforme medidas, por exemplo, por marcação com calcieno, densidade total, trabecular e no meio do eixo (conforme medida por métodos de pQCT e/ou μ CT), conectividade e outros parâmetros histológicos (conforme medidos por métodos de μ CT), resistências mecânicas de dobramento e compressiva (conforme medido, de preferência, no fêmur e nas vértebras, respectivamente). Assim, parâmetros mensuráveis incluem, mas não se limitam a, densidade óssea, resistência óssea, número de trabéculas, tamanho do osso e conectividade do tecido ósseo. Devido à natureza dessas medições, cada uma pode ser mais ou menos apropriada para uma dada situação, conforme perceberão aqueles versados

na técnica. Além disso, parâmetros e metodologias, como história clínica livre de fraturas, formato do osso, morfologia óssea, conectividade, histologia normal, taxas de reparo de fraturas e outros parâmetros de qualidade óssea são conhecidos e usados na técnica. Mais preferivelmente, a qualidade óssea pode ser avaliada pela resistência compressiva de vértebras, quando essa medição é apropriada. A modulação óssea também pode ser avaliada pelas taxas de alterações nos vários parâmetros. Mais preferivelmente, a modulação óssea é avaliada em mais de uma idade. Podem-se avaliar compostos quanto a qualquer um ou mais dos parâmetros aqui relacionados para determinar a modulação da densidade óssea.

“Densidade óssea normal” se refere a uma densidade óssea dentro de dois desvios padrão de uma contagem Z de 0 no contexto do estudo de ligação HBM. Em um contexto genérico, a faixa de parâmetros normais de densidade óssea é determinada por métodos estatísticos de rotina. Um parâmetro normal está dentro de cerca de 1 ou 2 desvios padrão do parâmetro normalizado para idade e sexo, de preferência cerca de 2 desvios padrão. Uma medida estatística de significância é o valor P, que pode representar a probabilidade de que a medição associada seja significativamente diferente da média. Valores P significativos são $P < 0,05$, $0,01$, $0,005$, e $0,001$, de preferência pelo menos $P < 0,01$.

Os termos "força", "carga", "tensão" e "distorção" são aqui usados de maneira intercambiável e se referem aos princípios de força que, em mecânica, são qualquer ação que tenda a manter ou alterar a posição de um corpo ou distorcê-lo, e esse termo é usado de maneira intercambiável com carga neste documento. A força, conforme medida por unidade de área, é definida como "tensão" e também é aqui chamada de "tensão mecânica" e pode ser classificada como compressiva, de tração ou cisalhamento, dependendo de como as forças (carga) são aplicadas. Especificamente, desenvolvem-se tensões compressivas se as cargas forem aplicadas de modo que o material se torne mais curto, ao passo que tensões de tração se desenvolvem quando o material é estirado. Tensões de cisalhamento se desenvolvem quando uma região de um material desliza com relação a uma região adjacente. O resultado da tensão é definido como deformação, e a porcentagem da deformação relativa ou alteração de comprimento é chamada de "distorção". Se, por exemplo, um material for estirado a 101% de seu comprimento original, tem uma distorção de 0,01 ou 1%. Como a distorção não tem unidades, é relatada como deformação relativa, em que a distorção de 0,01 é igual a 1% de deformação, ou em termos de microdistorção, em que uma microdistorção de 10.000 é igual a uma distorção de 0,01 ou 1% de deformação (Turner *et al.*, 1993 *Bone*, 14: 595-608).

“Agente de teste” e “reagente de teste” pretendem incluir pequenos compostos, composições, peptídios, miméticos, polipeptídios, siRNAs e imunoglobulinas. Composições incluem combinações de dois ou mais compostos
5 ativos, em que um ou mais dos compostos ativos são moduladores da via (cascata) de Wnt.

“Imunoglobulinas” pretende incluir anticorpos e fragmentos de anticorpos. Conforme aqui usado, o termo “anticorpo” pretende se referir a anticorpos completos,
10 intactos, diacorpos e fragmentos de anticorpos, como fragmentos Fab, Fab’ e fragmentos F(ab)₂. Anticorpos completos incluem anticorpos monoclonais (mAb), como anticorpos monoclonais murídeos, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos primatizados e anticorpos
15 humanos. A produção de anticorpos e partes geneticamente manipuladas ou enzimaticamente produzidas de anticorpos e a organização das seqüências genéticas que codificam essas moléculas são bem conhecidas e estão descritas, por exemplo, em Harlow *et al.*, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL,
20 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988); Harlow *et al.*, USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, (Cold Spring Harbor Press, New York, 1998); e Breitling *et al.*, RECOMBINANT ANTIBODIES (Wiley-Spektrum, 1999), que são aqui incorporados por referência para todas as finalidades.
25 Imunoglobulinas também incluem fragmentos como scFv.

"Imunologicamente ativo" significa qualquer proteína de imunoglobulina ou seu fragmento que reconheça e se ligue a um antígeno. De preferência, a proteína imunologicamente ativa ou seu fragmento modula o antígeno ao qual se liga. Por exemplo, se ela se liga a Norrin ou a um ligante de Norrin, a proteína imunologicamente ativa ou seu fragmento modularia a atividade de Norrin ou a atividade do ligante de Norrin.

"Fvs de cadeia simples" ("scFvs") são fragmentos de anticorpos recombinantes consistindo apenas na cadeia leve variável (V_L) e cadeia pesada variável (V_H) covalentemente conectadas entre si por um elo polipeptídico. V_L ou V_H pode ser o domínio NH_2 -terminal. O elo polipeptídico pode ser de comprimento e composição variáveis, contanto que os dois domínios variáveis formem uma ponte sem interferência estérica grave. Tipicamente, os elos são compostos principalmente por trechos de resíduos glicina e serina com alguns resíduos ácido glutâmico ou lisina interpostos para solubilidade.

"Diacorpos" são scFvs diméricos. Os componentes de diacorpos tipicamente têm elos peptídicos mais curtos do que a maioria dos scFvs e mostram uma preferência pela associação como dímeros.

Um fragmento "Fv" é um fragmento de anticorpo que consiste em um domínio V_H e um V_L mantidos juntos por interações não covalentes. O termo "dsFv" é aqui usado

para se referir a um Fv com uma ligação dissulfeto intermolecular manipulada para estabilizar o par V_H-V_L .

Um fragmento "F(ab')₂" é um fragmento de anticorpo essencialmente equivalente ao obtido a partir de imunoglobulinas (tipicamente IgG) por digestão com a enzima pepsina a pH 4,0-4,5. O fragmento também pode ser produzido de maneira recombinante.

Um fragmento "Fab" é um fragmento de anticorpo essencialmente equivalente ao obtido por redução da ponte ou pontes dissulfeto que unem os dois pedaços de cadeia pesada no fragmento F(ab')₂. O fragmento Fab' também pode ser produzido de maneira recombinante.

O termo "agente de captura de proteína" significa uma molécula ou complexo multi-molecular que possa ligar uma proteína a si mesmo. Agentes de captura de proteína de preferência se ligam a seus parceiros de ligação de maneira substancialmente específica. Agentes de captura de proteína com uma constante de dissociação (K_D) de menos de cerca de 10^{-6} são preferidos (por exemplo, 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10}). Anticorpos ou fragmentos de anticorpos são altamente adequados como agentes de captura de proteína. Antígenos também podem servir de agentes de captura de proteína, pois são capazes de se ligar a anticorpos. Um receptor que se ligue a um ligante de proteína é outro exemplo de um possível agente de captura de proteína. Deve-se entender que agentes de captura de proteína não se

limitam a agentes que apenas interajam com seus parceiros de ligação mediante interações não covalentes. Agentes de captura de proteína também podem opcionalmente se tornar covalentemente ligados às proteínas às quais se ligam.

5 Por exemplo, o agente de captura de proteína pode ser foto-reticulado a seu parceiro de ligação após a ligação.

O termo "parceiro de ligação" significa uma proteína que seja ligada por um agente de captura de proteína particular, de preferência de maneira substancialmente específica. Em alguns casos, o parceiro de ligação
10 pode ser a proteína normalmente ligada *in vivo* por uma proteína que seja um agente de captura de proteína. Em outras modalidades, entretanto, o parceiro de ligação pode ser a proteína ou peptídeo no qual o agente de captura
15 de proteína foi selecionado (mediante seleção *in vitro* ou *in vivo*) ou gerado (como no caso de anticorpos). Um parceiro de ligação pode ser compartilhado por mais de um agente de captura de proteína. Por exemplo, um parceiro de ligação que seja ligado por vários anticorpos policlo-
20 nais pode possuir inúmeros epítopos diferentes. Um agente de captura de proteína também pode se ligar a uma multiplicidade de parceiros de ligação (por exemplo, se os parceiros de ligação compartilharem o mesmo epítipo).

"Condições adequadas para ligação de proteína"
25 significa aquelas condições (em termos de concentração de sal, pH, detergente, concentração de proteína, temperatu-

ra e outras) que permitem que a ligação ocorra entre uma proteína seu parceiro de ligação em solução. De preferência, as condições não são tão suaves para que ocorra uma quantidade significativa de ligação de proteína não específica.

Um "arranjo" é um arranjo de entidades em um padrão sobre um substrato. Embora o padrão seja frequentemente um padrão bidimensional, o padrão também pode ser um padrão tridimensional para uma maior aplicação de material ao substrato do arranjo.

O termo "substrato" se refere ao material de volume, subjacente e de núcleo dos arranjos da invenção. O substrato é o material ao qual ácidos nucleicos, anticorpos, imunoglobulinas e outros compostos se fixam.

"Animal transgênico" significa um animal portando em uma linhagem germinativa um gene ou ácido nucleico que tenha sido introduzido por tecnologia de cDNA. Isso pode ser, por exemplo, introdução de genes humanos em roedores ou um gene de camundongo em um camundongo. O termo pode incluir animais com desativação e animais com ativação e combinações, por exemplo, em que um animal tenha tido seu gene do tipo selvagem desativado e, então, substituído. O gene substituído pode ser um gene nativo do tipo selvagem, um gene cognato de outro animal, como um gene humano, ou uma variante, como LRP5. O gene introduzido também pode estar sob o controle de um promotor

induzível. O cDNA da variante HBM pode ser uma variante nativa ou não nativa. Por exemplo, a variante HBM humana de G171V pode ser introduzida em um camundongo. Alternativamente, a contrapartida de camundongo ao G171V também
5 pode ser introduzida em um camundongo, fornecendo um camundongo HBM transgênico que expressa uma variante HBM nativa. Animal transgênico não pretende incluir seres humanos transgênicos, mas pode incluir primatas não humanos e outros animais. O animal transgênico pode ter desativação ou introdução de qualquer uma ou mais de Dkk, Norrin,
10 LRP5, LRP6, Kremen, Wnt ou Frizzled4. Considera-se que um animal transgênico seja um animal não humano, mas pode incluir primatas não humanos.

“Animal transgênico LRP5” pretende incluir um
15 animal que expresse tanto uma forma nativa, quanto de cDNA de LRP5 ou apenas uma forma de cDNA de LRP5 se o animal tiver a forma nativa de LRP5 removida ou incapaz de função (desativada). A forma de cDNA de LRP5 pode estar sob um elemento induzível. O animal pode ser um em que o
20 gene nativo esteja desativado, e LRP5 nativa ou não nativa tenha sido introduzida ou ativada. Esses animais com ativação também podem ter os genes de preferência sob controle induzível.

“Animais transgênico HBM” significa um animal
25 em que a LRP5 nativa esteja presente ou desativada, e um cDNA que codifica a variante HBM esteja presente.

“Quantidade eficaz” ou “quantidade de dose eficaz” ou “quantidade terapeuticamente eficaz” significa uma quantidade de um agente que module uma atividade biológica de Norrin suficiente para modular um parâmetro ósseo e/ou um parâmetro lipídico.

O termo “reconhece e se liga a”, quando usado para definir interações de nucleotídeos anti-sentido, siRNAs (pequenos RNA inibidores) ou shRNAs (RNAs em forma de grampo curto) com uma seqüência alvo, significa que uma seqüência anti-sentido, de siRNA ou shRNA é substancialmente complementar à seqüência alvo e, portanto, se ligará especificamente a uma parte de um mRNA que codifique um polipeptídio. Assim, tipicamente, as seqüências serão altamente complementares à seqüência alvo de mRNA e terão no máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 faltas de correspondência de bases em toda a seqüência. Em muitos casos, pode ser desejável que as seqüências sejam correspondências exatas, isto é, sejam completamente complementares à seqüência à qual o oligonucleotídeo se liga especificamente e, conseqüentemente, tenham zero faltas de correspondência ao longo do trecho complementar. Seqüências altamente complementares tipicamente se ligam muito especificamente à região de seqüência alvo do mRNA e, conseqüentemente, são altamente eficientes na redução e/ou mesmo inibição da tradução da seqüência de mRNA alvo no produto polipeptídico.

Seqüências de oligonucleotídeos substancialmente complementares são mais do que cerca de 80 por cento complementares (ou "% de identidade") à seqüência alvo de mRNA correspondente à qual o oligonucleotídeo se liga especificamente e, mais preferivelmente, são mais de 85 por cento complementares à seqüência alvo de mRNA complementar à qual o oligonucleotídeo se liga especificamente. Em certos aspectos, conforme acima descrito, será desejável ter seqüências oligonucleotídicas ainda mais substancialmente complementares para uso na prática da invenção e, nesses casos, as seqüências oligonucleotídicas serão mais de cerca de 90 por cento complementares à seqüência alvo de mRNA correspondente à qual o oligonucleotídeo se liga especificamente, e podem, em certas modalidades, ser mais de cerca de 95 por cento complementares à seqüência alvo de mRNA correspondente à qual o oligonucleotídeo se liga especificamente, e ainda até e incluindo 96%, 97%, 98%, 99% e mesmo 100% complementares com correspondência exata ao mRNA alvo ao qual o oligonucleotídeo desejado se liga especificamente.

A porcentagem de similaridade ou porcentagem de complementariedade de qualquer uma das seqüências expostas pode ser determinada, por exemplo, por comparação de informações de seqüências usando o programa de computador GAP, versão 6.0, disponível no Grupo de Genética Computacional da Universidade de Wisconsin (UWGCG). O programa

GAP utiliza o método de alinhamento de Needleman e Wunsch, 1970 *J. Mol. Biol.* 48(3): 443-53. Resumidamente, o programa GAP define a similaridade como o número de símbolos alinhados (isto é, nucleotídeos ou aminoácidos) que sejam similares, dividido pelo número total de símbolos na mais curta das duas seqüências. Os parâmetros de default preferidos para o programa GAP incluem: (1) uma matriz de comparação binária (contendo um valor de 1 para identidades e 0 para não identidades) para nucleotídeos, e a matriz de comparação ponderada de Gribskov e Burgess (1986 *Nucleic Acids Res.* 14(1): 327-34), (2) uma penalidade de 3,0 para cada vão e uma penalidade adicional de 0,10 para cada símbolo em cada vão; e (3) nenhuma penalidade para vãos nas extremidades.

"Mimético" significa uma molécula que desempenha a mesma função ou se comporta de maneira similar ao agente imitado ou tenha uma atividade que seja intensificada com relação àquela do agente que está sendo imitado. Por exemplo, um mimético de Norrin interagiria com LRP5 e/ou LRP6 e Frizzled4 como o polipeptídeo Norrin e modularia a massa óssea e/ou os níveis lipídicos como Norrin ou em um nível intensificado com relação ao observado para Norrin. Por exemplo, o mimético poderia induzir um fenótipo do tipo alta massa óssea, como o observado para o fenótipo HBM (que resulta, por exemplo, da mutação G171V no polipeptídeo LRP5 humano, ou a localização cognata em

outra LRP5 vertebrada). A molécula mimética pode ser um polipeptídeo, peptídeo, imunoglobulina ou um pequeno composto químico.

5 "Elemento repórter" significa um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo capaz de ser detectado em um ensaio de triagem. Exemplos de polipeptídios codificados por elementos repórteres incluem, mas não se limitam a, lacZ, GFP, YFP (ou outro repórter fluorescente), luciferase e cloranfenicol acetiltransferase.

10 "Célula" ou "célula hospedeira" pretende incluir células de vertebrados, assim como células de leveduras ou certas células procarióticas para uso em ensaios de triagem. Por exemplo, uma célula adequada pode ser uma célula de levedura em um ensaio de dois híbridos de levedura.
15

"Célula óssea" pretende incluir células de cultura de tecidos ("célula cultivada") ou células obtidas de tecido ósseo. Essas células incluem, mas não se limitam a, osteoblastos, pré-osteoblastos, células osteoprogenitoras, osteoclastos, osteócitos, células tronco mesenquimais, quaisquer das células aqui discutidas ou quaisquer combinações delas. Tecido ósseo pretende incluir uma combinação dessas células, conforme obtida em uma biópsia de osso.
20

25 "Antagonista de Dkk" pretende incluir, mas não se limita a, anticorpos policlonais ou seus fragmentos

imunogenicamente ativos, aptâmeros peptídicos, uma proteína de ligação a GSK, uma molécula anti-sentido para um ácido nucléico de GSK, uma molécula de interferência com RNA, um morfolino oligonucleotídeo, um ácido nucléico peptídico (PNA), uma ribozima e um peptídeo que possa inibir a atividade de Dkk na via da Wnt.

Da mesma forma, "antagonista de Kremen" pretende incluir, mas não se limita a, anticorpos monoclonais ou policlonais ou seus fragmentos ativos imunogênicos, aptâmeros peptídicos, uma molécula de interferência com RNA, um morfolino oligonucleotídeo, um ácido nucléico peptídico (PNA), uma ribozima e um peptídeo que possa inibir a atividade de Kremen na via da Wnt.

"Agonista de Wnt 3A" pretende incluir reagentes que possam regular positivamente a síntese e/ou atividade de Wnt 3A. "Mimético de Wnt 3A" significa uma molécula que imite a atividade de Wnt3A. "Variante de Wnt 3A" incluiria qualquer variante funcional que, quando administrada com carga possa intensificar a ativação com uma resposta de Wnt/ β -catenina.

O termo "proteína de fusão" se refere a uma proteína composta por dois ou mais polipeptídios que, embora tipicamente não unidos entre si em seu estado nativo, estejam unidas por suas respectivas terminações amino e carboxila mediante uma ligação peptídica, para formar um único polipeptídeo contínuo. Deve-se entender que os

dois ou mais componentes polipeptídicos podem estar diretamente unidos ou indiretamente unidos mediante um elo/espaçador peptídico.

2. Ensaios de Triagem de Agentes de Teste que 5 Modulem Norrin

Os materiais e métodos aqui apresentados se referem em parte a métodos de triagem de agentes que modulem genes NDP ou das proteínas Norrin codificadas por esses genes ou identificação de miméticos de Norrin e agonistas de Norrin. Os ensaios também se referem a materiais e métodos de triagem de agentes que modulem reagentes que interajam com proteínas Norrin, identificação de agonistas de Norrin e identificação de miméticos de Norrin. Esses poderiam ser reagentes que, por ligação com Frizzled4, 10 modulassem a atividade de Norrin. Esses também podem ser reagentes que, por modulação da atividade de Dkk1 (o gene ou a proteína), modulem a atividade de Norrin. Outro exemplo seria Kremen2 , em que a modulação de Kremen2 (o gene ou a proteína) modulasse a atividade de Norrin. 15 Nos casos de Dkk1 e Kremen2, de preferência o reagente que modula a atividade desses compostos seria um antagonista de Dkk1 ou Kremen2. De preferência, os ensaios resultariam em reagentes que também modulassem a atividade de LRP5 mediante interação com Frizzled4 e Norrin. 20 A modulação de LRP5 preferida seria na forma de atividade intensificada, como a produzida por um agonista ou um mi-

mético (por exemplo, um mimético de Norrin ou mimético de Frizzled4).

Sistemas de ensaio podem incluir uma etapa em que agentes de teste são triados quanto à sua capacidade de se liga a Frizzled4, Norrin, Dkk1, Kremen2, LRP5, ou agir como um mimético de Norrin. Esse pode ser qualquer sistema tanto envolvendo substratos, quanto livre em solução, em que se deixe ocorrer a ligação dos agentes de teste a qualquer um dos substratos acima mencionados ocorrer, e, então, se ensaie a ligação determinada. Agentes de teste podem ser misturados com Frizzled4, Norrin, Dkk1, Kremen2 ou LRP5 sob condições fisiológicas (por exemplo, pH de cerca de 7,0 a cerca de 7,4; 24°C a cerca de 40°C) durante um período de tempo suficiente para permitir a ligação, por exemplo, de cerca de 1 minuto to 6 horas.

Os agentes de teste podem ser submetidos a uma triagem de ligação conforme acima discutido ou podem ser candidatos de qualquer biblioteca química. Os agentes de teste podem ser ensaiados em um sistema de ensaio à base de células. Esse sistema de ensaio à base de células pode ser um em que as células sejam transfectadas de maneira transitória ou estável com um ácido nucléico que codifique pelo menos uma das seguintes: Frizzled4, Norrin, Dkk1, Kremen2 ou LRP5, ou qualquer de suas combinações. Assim, as células expressariam individualmente pelo menos

Frizzled4 e Norrin, assim como os três genes restantes. Também haveria uma série de células co-transfectadas de maneira estável ou transitória com as seguintes combinações de ácidos nucleicos:

- 5 (a) Norrin e LRP5 e/ou LRP6
- (b) Norrin, uma Dkk (por exemplo, Dkk 1 a Dkk4) e LRP5 e/ou LRP6
- (c) Norrin, uma Kremen (por exemplo, Kremen 1 ou 2) e LRP5 e/ou LRP6
- 10 (d) Norrin, uma Kremen, uma Dkk e LRP5 e/ou LRP6
- (e) Frizzled4 e Norrin;
- (f) Frizzled4, Norrin e LRP5
- (g) Frizzled4, Norrin e uma Dkk (por exemplo, 15 Dkk1 to Dkk4);
- (h) Frizzled4, Norrin e uma Kremen (por exemplo, Kremen 1 e/ou 2);
- (i) Frizzled4, Norrin, uma Dkk e Kremen2;
- (j) Frizzled4, Norrin, LRP5 e Dkk1;
- 20 (k) Frizzled4, Norrin, LRP5 e Kremen2; e/ou
- (l) Frizzled4, Norrin, LRP5, Dkk1 e Kremen2, e/ou
- (m) ou qualquer combinação.

Também são consideradas para qualquer uma das 25 combinações acima LRP6, HBM, outras Dkks (por exemplo, Dkk2, Dkk3 e/ou Dkk4), Wnts e/ou Kremen1.

Aqueles versados na técnica compreenderão que esse sistema de ensaio também pode requerer controles de vetor, em que o vetor é um em que o ácido nucléico que codifica qualquer uma das proteínas acima esteja operacionalmente ligado para expressão nas células. O controle de vetor pode consistir na transfecção transitória ou estável de células com apenas o vetor e/ou sem nenhum vetor. A transfecção transitória e a transfecção estável de células pode ser efetuada usando-se técnicas conhecidas na arte. Veja, por exemplo, Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-3 (3ª ed., Cold Spring Harbor Press, NY 2001) ou qualquer das edições anteriores de Sambrook. Co-transfecções podem ser preparadas de maneira transitória ou estável, conforme se sabe na técnica. Sambrook et al., 2001

Ácidos nucléicos que codificam Frizzled4, Norrin, LRP5, Dkk1 e Kremen são relacionados na parte abaixo, juntamente com suas seqüências de proteínas associadas. As modalidades deste pedido não se limitam às seqüências aqui apresentadas.

Gene	Organismo	Nº de Acesso no GenBank da Proteína	Nº de Acesso no GenBank do Ácido Nucléico
Norrin	<i>Homo sapiens</i>	AAH29901	BC029901.1
	<i>Homo sapiens</i>	CAA46639	X65724.1
	<i>Mus musculus</i>	AAH90623	BC090623
	<i>Mus musculus</i>	CAA58725	X83794.1
Dkk1	<i>Homo sapiens</i>	AAF02674	AF177394.1
	<i>Mus musculus</i>	AAH50189	BC050189.1

Gene	Organismo	Nº de Acesso no GenBank da Proteína	Nº de Acesso no GenBank do Ácido Nucléico
	<i>Mus musculus</i>	AAC02426.1	AF030433.1
	<i>Danio rerio</i>	BAA82135	AB023488.1
	<i>Danio rerio</i>	AAD2246.1	AF116852.1
Dkk2	<i>Homo sapiens</i>	AAF02675	AF177395
	<i>Homo sapiens</i>	AAH75078	BC075078.2
	<i>Mus musculus</i>	CAP6010.1	AJ243963.2
Dkk3	<i>Homo sapiens</i>	AAF02676	AF177396.1
	<i>Homo sapiens</i>	AAH07660	BC007660.2
	<i>Homo sapiens</i>	AAQ88744	AY358378.1
	<i>Mus musculus</i>	AAF02680	AF177400.1
	<i>Mus musculus</i>	AAH46304	BC046304.1
	<i>Mus musculus</i>	AAH50934	BC050934.1
Dkk4	<i>Homo sapiens</i>	AAF02677	AF177397.1
	<i>Homo sapiens</i>	BAA33438.1	AB01778
	<i>Mus musculus</i>	AAH18400	BC018400
Frizzled4	<i>Homo sapiens</i>	BAA86286.1	AB032417.1
	<i>Homo sapiens</i>	BAB40811.1 Variante de união FZD4S	AB054881
	<i>Homo sapiens</i>	AAR23924.1	AY462097.1
	<i>Mus musculus</i>	AAH15256	BC015256.1
	<i>Mus musculus</i>	AAC52430	U43317.1
	<i>Drosophila melanogaster</i>	AAF81195	AF241270.1
LRP5	<i>Homo sapiens</i>	AAC36467.1	AF064548.1
	<i>Homo sapiens</i>	AAC72791	AF077820.1
	<i>Homo sapiens</i>	AAK52433	AF283320.1
	<i>Mus musculus</i>	AAC36468	AF064984.1
	<i>Mus musculus</i>	AAC70183	AF077847.1
	<i>Mus musculus</i>	AAH11374	BC011374.1
	<i>Drosophila melanogaster</i>	AAF58373	AE003818.3
LRP6	<i>Homo sapiens</i>	AAC33006	AF074264.1
	<i>Mus musculus</i>	AAC33007	AF074265.1
	<i>Mus musculus</i>	AAH60704	BC060704.1
	<i>Drosophila melanogaster (arr)</i>	AAF58373	AE003818.3
Kremen1	<i>Homo sapiens</i>	AAH63787	BC063787.1
	<i>Homo sapiens</i>	BAB40969.1	AB059618
	<i>Mus musculus</i>	BAB40968.1	AB059617
	<i>Mus musculus</i>		BC049771
Kremen2	<i>Homo sapiens</i>	AAH03533	BC003533.1
	<i>Homo sapiens</i>	AAH09383	BC009383.2
	<i>Homo sapiens</i>	BAC00823.1	AB086355

Gene	Organismo	N° de Acesso no GenBank da Proteína	N° de Acesso no GenBank do Ácido Nucléico
	<i>Mus musculus</i>	CAD29805	AJ457192

Seqüências adicionais de HBM e LRP5 (por exemplo, Zmax1) são apresentadas nos pedidos norte-americanos n° 09/544.398 (agora patente norte-americana n° 6.770.461) e 10/240.851, que são aqui incorporados por referência em sua inteireza para todas as finalidades.

As células que podem ser transfectadas podem ser qualquer linhagem celular de mamíferos. Linhagens celulares preferidas são linhagens celulares humanas, particularmente quando se usam ácidos nucléicos que codificam proteínas humanas para qualquer uma das acima. Assim, as transfecções podem ocorrer para ácidos nucléicos de camundongo em linhagens de camundongo ou para ácidos nucléicos humanos em linhagens humanas. As linhagens celulares podem ser linhagens celulares de osso, linhagens celulares de rim, linhagens de células tronco de seres humanos ou outros vertebrados. Linhagens celulares de rim exemplificativas incluem, mas não se limitam a, células HEK-293 cells (ATCC® No. CRL-1573) e células HepG2. Linhagens celulares de osso exemplificativas incluem, mas não se limitam a, KHOS/NP (R-970-5) (ATCC® No. CRL-1544), KHOS-240S (ATCC® No. CRL-1545), KHOS-321H (ATCC® No. CRL-1546), DSDh (ATCC® No. CRL-2131), VA-ES-BJ (ATCC® No. CRL-2138), 7F2 (ATCC® No. CRL-12557), U-2 OS (também co-

nhecida como U2OS; ATCC® No. HTB-96), HOSTE85, ROS, MC3T3-E6, UMR-106, Saos2, MG63, e HOBs. Linhagens de células tronco exemplificativas incluem, mas não se limitam a, células tronco mesenquimais adultas humanas (Cambrex Bioscience) e a linhagem de células tronco de camundongo, C3H10T1/2 (ATCC).

Os ácidos nucléicos que codificam quaisquer das proteínas incluiriam os quadros de leitura abertos (ORFs), assim como qualquer informação transcricional necessária para transcrição e tradução. Os ácidos nucléicos que codificam as proteínas estariam, por sua vez, operacionalmente ligados a um vetor adequado para transfecção estável e/ou transitória em uma célula. Vetores adequados incluem, mas não se limitam a, TK-renila, pcDNA3.1 (Invitrogen), e pUSE (Upstate Biotech). Podem-se usar outros vetores operacionais capazes de expressão em células de vertebrados.

Qualquer sistema repórter que forneça informações sobre a regulação de genes e suas proteínas associadas poderia ser utilizado, incluindo, mas não limitados a, TK-renila, β -galactosidase (β -gal), fosfatase alcalina, proteína fluorescente verde (GFP) ou outro marcador de proteína fluorescente. Um sistema preferido, conforme aqui descrito é a combinação de TCF-luci e TK-renila, conforme descrito nos exemplos. Também se podem utilizar

outras combinações de repórter e vetor operacionais em células de vertebrados.

Em um aspecto, as quantidades relativas de Norrin ou de uma proteína de interação com Norrin de uma população de células que tenha sido exposta ao agente a ser testado são comparadas a uma população de células de controle não expostas. Podem-se usar anticorpos para monitorizar a expressão diferencial da proteína nas diferentes populações celulares. Linhagens ou populações celulares são expostas ao agente a ser testado sob condições e tempo apropriados. Podem-se preparar lisados celulares a partir da linhagem ou população celular exposta e um controle, linhagem ou população celular não exposta. Os lisados celulares são, então, analisados com a sonda, conforme se sabe na técnica. Veja, por exemplo, Ed Harlow e David Lane, *ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL* (Cold Spring Harbor, NY, 1988) e Ed Harlow e David Lane, *USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL* (Cold Spring Harbor, NY 1998).

Por exemplo, fragmentos N- e C-terminais de Norrin podem ser expressados em bactérias e usados para a pesquisa de proteínas que se liguem a esses fragmentos. Podem-se preparar proteínas de fusão, como His-tag ou fusão de GST às regiões N- ou C-terminais de Norrin (ou a domínios biologicamente ativos de Norrin) ou uma proteína Norrin inteira. Essas proteínas de fusão podem ser acopladas, por exemplo, a glóbulos de Talon ou Glutational-

Sepharose e, então, sondados com lisados celulares para identificar quais se ligam a Norrin. Antes da lise, as células podem ser tratadas com proteínas Wnt purificadas, RNA ou fármacos que modulem a sinalização de Wnt ou proteínas que interajam com elementos a jusante da via de Wnt. Proteínas do lisado que se ligam às proteínas de fusão podem ser resolvidas por SDS-PAGE, isoladas e identificadas, por exemplo, por seqüenciamento de proteína ou espectroscopia de massa, conforme se sabe na técnica. Veja, por exemplo, *PROTEIN PURIFICATION APPLICATIONS: A PRACTICAL APPROACH* (Simon Roe, ed., 2ª ed. Oxford Univ. Press, 2001) e "Guide to Protein Purification" em *Meth. Enzymology* vol. 182 (Academic Press, 1997).

A atividade de Norrin, de um mimético de Norrin, de uma proteína de interação com Norrin (por exemplo, agonista de Norrin ou antagonista de Norrin) ou de um complexo de Norrin com LRP5/LRP6/HBM e/ou uma proteína Kremen ou proteína Dkk pode ser afetada por compostos que modulem a interação entre Norrin e uma proteína de interação com Norrin, e/ou Norrin e LRP5/LRP6/HBM, Norrin e/ou Frizzled4, uma proteína Dkk ou uma proteína Kremen. Apresentam-se aqui métodos e ferramentas de pesquisa para a descoberta e caracterização desses compostos. A interação entre Norrin ou um mimético de Norrin e uma proteína de interação com Norrin/Frizzled4 e/ou Norrin e LRP5/6/HBM, e Norrin/Dkk, e Norrin/Kremen pode ser moni-

torizada *in vivo* e *in vitro*. Ensaio similares também podem ser usados para avaliar agonistas e antagonistas de Norrin. Compostos que modulam a estabilidade de um complexo Norrin/Fz4 são compostos terapêuticos em potencial.

5 Métodos *in vitro* exemplificativos incluem: a ligação de LRP5/6/HBM, Norrin/Fz4 ou de uma proteína de interação com Norrin/Fz4 a um chip sensor projetado para um instrumento, como o fabricado pela Biacore (Uppsala, Suécia) para realizar uma observação por espectroscopia
10 de ressonância de plasmon. Por exemplo, usando-se esse método, um chip com uma de Norrin/Fz4, uma proteína de interação com Norrin/Fz4 ou LRP5/LRP6 pode ser primeiro exposto ao outro sob condições que permitam a formação de um complexo. Introdúz-se, então, um composto de teste, e
15 o sinal de saída do instrumento proporciona uma indicação de qualquer efeito exercido pelo composto de teste. Com esse método, podem-se ensaiar compostos rapidamente. Esse método pode ser usado para qualquer combinação de Norrin/Fz com LRP5, LRP6, HBM, qualquer Dkk, qualquer Kre-
20 men, qualquer Wnt e qualquer combinação delas.

Outro método *in vitro* é exemplificado pelos métodos SAR-por-NMR (Shuker *et al.*, 1996 *Science* 274: 1531-4). Por exemplo, um domínio de ligação a Norrin/Fz4 e/ou LRP5/LRP6/HBM LBD pode ser expressado e purificado
25 como proteína marcada com ^{15}N por expressão em meios mar-

cados. Deixa-se que a(s) proteína(s) marcada(s) forme(m) o complexo em solução em um tubo de amostra de ressonância magnética nuclear (NMR). O espectro de correlação heteronuclear na presença e ausência de um composto de teste fornece dados no nível de resíduos individuais com relação a interações com o composto de teste e a alterações na interface proteína-proteína do complexo. Esse método pode ser usado com qualquer combinação de Norrin/Frizzled4 com LRP5, LRP6, HBM, qualquer Dkk, qualquer Kremen, qualquer Wnt e qualquer de suas combinações.

Aqueles versados na técnica conhecem muitos outros protocolos, por exemplo, eletroforese capilar de afinidade (Okun et al., 2001 *J. Biol. Chem.* 276: 1057-1062), espectroscopia de fluorescência, ressonância paramagnética de elétrons e outros, que também podem ser usados para monitorizar a modulação de um complexo e/ou medir afinidades de ligação para formação de complexos na presença e ausência de um agente de teste para qualquer uma das combinações acima relacionadas de proteínas ou seus fragmentos biologicamente ativos.

Protocolos para monitorizar a modulação de uma interação Norrin/Frizzled4, uma interação Norrin/LRP5/Frizzled4 ou a interação de um mimético de Norrin com qualquer uma ou mais de LRP5, LRP6, HBM, Kremen1, Kremen2, qualquer Dkk e qualquer Wnt podem ser realizados usando-se um protocolo de híbrido de levedura. O método

de dois ou mais híbridos de levedura pode ser usado para monitorizar a modulação de um complexo por monitorização da expressão de genes ativados pela formação de um complexo de proteínas de fusão de Norrin/Frizzled4 e/ou qualquer outra proteína acima relacionada. Se for usada LRP5, LRP6 ou HBM, então, a proteína completa pode ser usada ou os domínios de ligação a ligante (LBDs) ou partes da hélice beta contendo as repetições YWTD. Ácidos nucleicos de acordo com a invenção que codificam domínios de interação Norrin e Frizzled4 ou Norrin e LRP5/LRP6/HBM LBD são incorporados em plasmídios de isca e presa. O método de dois híbridos de levedura (Y2H) ou o método de híbrido de levedura para três ou mais proteínas é realizado na presença de um ou mais compostos de teste. A modulação do complexo é observada por uma alteração na expressão do gene ativado no complexo. Aqueles versados na técnica perceberão que compostos de teste podem ser adicionados ao ensaio diretamente ou, no caso de proteína, podem ser co-expressados na levedura com os compostos de isca e presa. Da mesma forma, proteínas de fusão de Norrin e proteínas de interação com Norrin também podem ser usadas em uma triagem Y2H para identificar outras proteínas que modulem o complexo Norrin/Frizzled4 (como Dkk, Kremen, outros reguladores negativos e reguladores positivos). As tecnologias de híbrido de levedura são conhe-

cidas na técnica. Veja, por exemplo, LI ZHU E GREGORY J. HANNON, YEAST HYBRID TECHNOLOGIES (2000).

Protocolos de ensaio como esses podem ser usados em métodos para a triagem de compostos, fármacos, 5 tratamentos que modulem o complexo Norrin/Frizzled4, quer essa modulação ocorra por ligação competitiva, agindo como um mimético de Norrin, ou por alteração da estrutura do complexo Norrin/Frizzled4, ou por estabilização ou de-
10 antecipar que aptâmeros peptídicos possam se ligar competitivamente, embora a indução de uma estrutura de sítio de ligação alterada por efeitos estéricos também seja possível. Conforme aqui usado, um processo biológico ou patológico modulado por Norrin/Frizzled4 e o complexo
15 Norrin/Fz4/LRP5 pode incluir a ligação de Norrin a Frizzled4 ou a uma proteína que interaja com o complexo Norrin/Frizzled4/LRP5, ou impeça a regulação negativa de Dkk e/ou Kremen do complexo Norrin/Frizzled4. Isso pode incluir compostos que interajam com a Norrin ou modulem a
20 síntese das proteínas envolvidas com o complexo, assim como miméticos de Norrin.

Podem-se observar marcadores relacionados a osso adicionais, como atividade de fosfatase alcalina, produção de osteocalcina ou mineralização, além de outros
25 fatores relacionados a ossos que possam ser avaliados em

conjunto com a análise bioquímica da modulação do complexo Norrin/Frizzled4/LRP5, conforme aqui discutido.

Processos patológicos se referem a uma categoria de processos biológicos que produzem um efeito prejudicial. Por exemplo, a expressão ou regulação positiva da expressão de LRP5 ou LRP6 e/ou Dkk e/ou uma proteína de interação com Dkk pode estar associada a certas doenças ou condições patológicas. Conforme aqui usado, diz-se que um agente modula um processo patológico quando o agente altera o processo a partir de seu nível basal no sujeito para um nível estatisticamente significativo. Por exemplo, o agente pode reduzir o grau ou gravidade do processo mediado por essa proteína no sujeito ao qual o agente foi administrado. Por exemplo, uma doença ou condição patológica pode ser prevenida, ou a progressão de uma doença modulada pela administração de agentes que reduzam ou modulem de alguma forma a expressão ou pelo menos uma atividade de uma proteína da invenção.

Como Frizzled4/Norrin e LRP5/LRP6 (assim como Kremen, Dkk e Wnt) estão envolvidas direta e/ou indiretamente na modulação de massa óssea, uma modalidade desta invenção é usar o complexo Norrin/Frizzled4 e ligantes do complexo Norrin/Frizzled4 como um método de diagnóstico de uma condição ou doença óssea. Certos marcadores estão associados a condições de sinalização de Wnt específicas (por exemplo, ativação de TCF/LEF). Testes diagnósticos

para condições ósseas podem incluir as etapas de teste de uma amostra ou seu extrato quanto à presença de ácidos nucleicos de Dkk ou de proteína de interação com Dkk (isto é, DNA ou RNA), oligômeros ou seus fragmentos ou produtos protéicos da expressão regulada de TCF/LEF. Por exemplo, hibridização *in situ* padrão ou outras técnicas de formação de imagem podem ser utilizadas para observar produtos da sinalização de Wnt.

Também se discutem aqui métodos e materiais para a modulação do desenvolvimento ósseo ou condições de perda óssea. A inibição da perda óssea pode ser conseguida por inibição ou modulação de alterações no complexo Norrin/Frizzled4 e, dessa forma, a via de sinalização de Wnt. Por exemplo, a ausência de atividade de Norrin ou uma atividade de Dkk1 aumentada pode estar associada a baixa massa óssea. Uma atividade aumentada de Norrin e Frizzled4 pode estar associada a alta massa óssea. Conseqüentemente, a modulação da atividade de Norrin/Frizzled4 modulará, por sua vez, a massa óssea. A modulação de uma interação de Dkk com o complexo Norrin/Frizzled4 mediante agonistas e antagonistas é uma modalidade de um método para regular o desenvolvimento ósseo.

Os agentes da presente invenção podem ser apresentados isoladamente ou em combinação com outros agentes que modulem um processo patológico particular. Conforme aqui usado, diz-se que dois agentes são administrados em

combinação quando os dois agentes são administrados simultaneamente ou são administrados independentemente, mas de modo que os agentes ajam ao mesmo tempo.

Os agentes da presente invenção podem ser administrados a um animal de teste não humano, por exemplo, pelas vias parenteral, subcutânea (s.c.), intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.), intraperitoneal (i.p.), transdérmica ou bucal. Alternativamente, ou concomitantemente, a administração pode ser pela via oral. A dosagem administrada dependerá da idade, saúde e peso do receptor, do tipo de tratamento concomitante, caso haja, da frequência do tratamento e da natureza do efeito desejado.

A presente invenção também apresenta composições contendo um ou mais agentes que modulem a expressão ou pelo menos uma atividade de Norrin ou do complexo Norrin/Frizzled4 ou que ajam como um mimético de Norrin. Embora as necessidades individuais variem, a determinação de faixas ótimas de quantidades eficazes de cada componente está ao alcance da técnica. Dosagens típicas do agente ativo, que incluem um mimético de Norrin ou um agente que medeia Norrin, uma proteína de interação com Norrin, ou um ligante do complexo Norrin/Frizzled4 (ou complexo Norrin/Frizzled4/LRP5, que também é considerado sempre que complexos Norrin/Frizzled4 são discutidos), podem compreender de cerca de 0,0001 a cerca de 50 mg/kg

de peso corporal. As dosagens preferidas podem compreender de cerca de 0,001 a cerca de 50 mg/kg de peso corporal. As dosagens mais preferidas podem compreender de cerca de 0,1 a cerca de 1 mg/kg de peso corporal. Em um ser humano médio de 70 kg, a faixa seria de cerca de 7 µg a cerca de 3,5 g, com uma faixa preferida de cerca de 0,5 mg a cerca de 5 mg (e, por exemplo, qualquer valor de 0,1 mg dentro dessa faixa).

Além do agente farmacologicamente ativo, as composições da presente invenção podem conter veículos farmacologicamente aceitáveis adequados, compreendendo excipientes, veículos e auxiliares que facilitem o processamento dos compostos ativos em preparações que possam ser usadas farmacologicamente para distribuição no sítio de ação. Formulações adequadas para administração parenteral incluem soluções aquosas dos compostos ativos em forma solúvel em água, por exemplo, sais solúveis em água. Além disso, podem-se administrar suspensões dos compostos ativos, como suspensões para injeção oleosa apropriadas. Solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos graxos (por exemplo, óleos vegetais, como óleo de gergelim) ou ésteres de ácidos graxos sintéticos (por exemplo, oleato de etila ou triglicerídeos). Suspensões aquosas para injeção podem conter substâncias que aumentem a viscosidade da suspensão e incluem, mas não se limitam a, carboximetil celulose sódica, sorbitol e/ou dextrano. Op-

cionalmente, a suspensão também pode conter estabilizadores. Lipossomos e outros vetores não virais também podem ser usados para encapsular o agente para distribuição na célula.

5 A formulação farmacêutica para administração sistêmica de acordo com a invenção pode ser formulada para administração enteral, parenteral ou tópica (top). De fato, todos os três tipos de formulações podem ser usados simultaneamente para se conseguir uma administração sis-
10 têmica do ingrediente ativo.

 Formulações adequadas para administração oral incluem cápsulas de gelatina dura ou macia, pílulas, comprimidos, incluindo comprimidos revestidos, elixires, suspensões, xaropes ou inalações e suas formas de libera-
15 ção controlada.

 Potencialmente, qualquer composto que se ligue a e, dessa forma, module Norrin, um mimético de Norrin, um ligante de Norrin ou o complexo Norrin/Frizzled4 pode ser um composto terapêutico. Em uma modalidade da inven-
20 ção, um aptâmero peptídico ou de ácido nucléico de acordo com a invenção é usado em uma composição terapêutica. Essas composições podem compreender um aptâmero ou um fragmento de Norrin/Frizzled4, não modificado ou modificado. Em outra modalidade, o composto terapêutico compreende
25 uma proteína de interação com Norrin ou com complexo Norrin/Frizzled4 ou seu fragmento biologicamente ativo.

Aptâmeros de ácido nucléico são usados em composições, por exemplo, por ligação química a uma molécula de veículo, como polietileno glicol (PEG), que pode facilitar a captação ou estabilizar o aptâmero. Uma fração 5 dialquiliglicerol ligada a um RNA pode ser usada para incrustar o aptâmero em lipossomos, estabilizando, dessa forma, o composto. A incorporação de substituições químicas (isto é, a troca do grupo 2'-OH da ribose por um 2'-NH no RNA confere resistência a ribonuclease) e remate, e 10 outros, pode evitar a degradação. Várias dessas técnicas são discutidas para aptâmeros de RNA em Brody e Gold, 2000 *Rev. Mol. Biol.* 74: 3-13.

Aptâmeros peptídicos podem ser usados em aplicações terapêuticas pela introdução de um vetor de expressão 15 que dirija a expressão do aptâmero no tecido afetado como, por exemplo, por distribuição retroviral, por encapsulação do DNA em um complexo de distribuição ou simplesmente por injeção de DNA nu. Ou o próprio aptâmero ou um análogo sintético pode ser usado diretamente como 20 um fármaco. A encapsulação em polímeros e lipídios pode auxiliar na distribuição. O uso de aptâmeros peptídicos como agentes terapêuticos e diagnósticos é revisado em Hoppe-Syler e Butz, 2000 *J. Mol. Med.* 78: 426-430.

Em outro aspecto, a estrutura de um aptâmero 25 peptídico restringido da invenção pode ser determinada por NMR ou cristalografia de raios X (Cavanagh et al.,

PROTEIN NMR SPECTROSCOPY: PRINCIPLES AND PRACTICE, Academic Press, 1996; Drenth, PRINCIPLES OF PROTEIN X-RAY CRYSTALLOGRAPHY, Springer Verlag, 1999). De preferência, a estrutura pode ser determinada no complexo com a proteína alvo. Um análogo de molécula pequena é, então, projetado de acordo com as posições de elementos funcionais da estrutura tridimensional do aptâmero. (GUIDEBOOK ON MOLECULAR MODELING IN DRUG DESIGN, Cohen, Ed., Academic Press, 1996; MOLECULAR MODELING AND DRUG DESIGN (TOPICS IN MOLECULAR AND STRUCTURAL BIOLOGY), Vinter e Gardner Eds., CRC Press, 1994). Apresentam-se aqui métodos para a identificação e projeto de fármacos eficazes e específicos que modulem a atividade de Norrin, ajam um mimético de Norrin, proteínas de interação com Norrin, proteínas de interação com Norrin/Frizzled4 e o complexo Norrin/Frizzled4. Métodos de molécula pequena dos aptâmeros peptídicos também são considerados dentro do âmbito.

2.1 Ensaio Repórter Funcional de Norrin à Base de Células

Os ensaios repórteres de TCF descritos nos exemplos abaixo podem ser desenvolvidos em ensaios de triagem para identificar miméticos de Norrin (FIGS. 1 e 2) ou para identificar antagonistas de inibidores do sinal de Norrin, como antagonistas de Dkk1/Kremen2 (FIG. 3). Em ambos os tipos de ensaios, quando efetuados em células do tipo ósseo ou não ósseo, as moléculas ativas intensifica-

riam os sinais de TCF-luciferase ou outro método de sinal adequado.

2.2 Ensaios de Norrin/LRP5/LRP6 e DKK/LRP5/LRP6/Kremen

5 Outro método que pode ser usado para a triagem de reagentes que modulem a interação de Norrin com Frizzled4/LRP5/LRP6 é mediante um ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA). Duas possíveis permutações desse ensaio são exemplificadas, mas outras também podem ser uti-

10 lizadas. Por exemplo, LRP5 pode ser imobilizadas em uma superfície sólida, como um poço de placa de cultura de tecido. Aqueles versados na técnica reconhecerão que outros suportes, como, mas não limitados a, uma membrana de náilon ou nitrocelulose, um chip de silício, uma lâmina

15 de vidro, glóbulos e outros, podem ser usados como substitutos. Uma maneira de fazer isso pode ser com a forma de LRP5/LRP6/Fz4 como uma proteína de fusão, em que o domínio extracelular de LRP5/LRP6/Fz4 é fusionado à parte Fc de uma IgG humana ou outra IgG. A proteína de fusão

20 LRP5/LRP6/Fz4-Fc pode ser produzida em células de ovário de hamster chinês (CHO) (ou outra linhagem celular adequada), em que as proteínas de fusão são extraídas das linhagens celulares ou dos meios. A proteína de fusão

25 sólida mediante um anticorpo anti-Fc humano ou por placas revestidas com Proteína-A ou Proteína G, por exemplo. O

substrato pode ser, então, lavado para remover qualquer proteína não ligada. Meios condicionados contendo proteína Norrin secretada ou proteína etiquetada no epítopo de Norrin secretada (ou Norrin purificada, proteína etiquetada no epítopo de Norrin purificada, mimético de Norrin ou um fragmento contendo uma parte biologicamente ativa de Norrin envolvida na modulação óssea) podem ser incubados nos poços ou recipientes. Alternativamente, um reagente de teste pode ser incubado com a proteína de fusão fixada para a triagem de miméticos de Norrin. A ligação de Norrin ou de um mimético de Norrin a LRP5/LRP6/Fz4 pode ser avaliada usando-se anticorpos contra Norrin ou contra uma etiqueta no epítopo. Por exemplo, uma proteína etiquetada no epítopo de Norrin-V5 ou seu fragmento pode ser detectada com um anticorpo anti-V5. Esse ensaio pode ser, então, usado, por exemplo, para identificar miméticos de Norrin, agonistas de Norrin e imunoglobulinas que se liguem de maneira similar à Norrin à proteína de fusão LRP5/LRP6/Fz4. Os ensaios podem, por exemplo, estar na forma de um ensaio competitivo, reagentes de teste etiquetados e outros. Esses sistemas de ensaio também podem ser utilizados com HBM. O ensaio também pode ser modificado para ter lavagens que incluem uma proteína Dkk, Kremen e/ou Wnt ou seu fragmento biologicamente ativo, quando da triagem de agentes de teste que modulem a interação e formação de complexos entre esas proteínas e polipeptí-

dios.

Alternativamente, a proteína Norrin ou seu fragmento biologicamente ativo (todas as referências à proteína Norrin consideram que um fragmento biologicamente ativo também pode ser usado) ou um mimético de Norrin, que esteja envolvido na modulação óssea, poderia ser diretamente fusionado a um marcador de detecção, como fosfatase alcalina. Aqui, a detecção da interação Norrin-LRP5/LRP6/Fz4 pode ser diretamente investigada, sem experimentos baseados em anticorpos subsequentes. A Norrin ou mimético de Norrin ligado é detectado em um ensaio de fosfatase alcalina ou por outro ensaio de detecção. Se a proteína de fusão Norrin-fosfatase alcalina estiver ligada à LRP5/LRP6/Fz4 imobilizada, a atividade de fosfatase alcalina seria detectada em uma leitura colorimétrica, radioativa ou fluorescente. Como resultado, pode-se ensaiar a capacidade de compostos de molécula pequena de alterar a ligação de Norrin a LRP5/LRP6/Fz4 usando-se esse sistema ou se o reagente de teste é um mimético de Norrin ou agonista de Norrin. Por exemplo, compostos, quando adicionados com Norrin (ou Norrin etiquetada no epítipo) a cada poço da placa, podem ser classificados quanto a sua capacidade de modular a interação entre Norrin e LRP5/LRP6/Fz4 com base na intensidade do sinal de Norrin ligada presente no poço após um tempo de incubação adequado e lavagem. O ensaio pode ser calibrado fazendo-

se experimentos de competição com Norrin não marcada ou com um segundo tipo Norrin etiquetada no epítipo. Qualquer molécula que seja capaz de modular (por exemplo, intensificar) a interação Norrin-LRP5/LRP6/Fz4 pode ser um candidato terapêutico adequado, mais preferivelmente um candidato terapêutico osteogênico ou um candidato capaz de modular um lipídio (por exemplo, ApoE, LDL, HDL, VLDL, triglicerídeo, colesterol). Essas moléculas incluem compostos químicos pequenos, peptídios e imunoglobulinas; (anticorpos, fragmentos de anticorpos) todos podendo ser examinados com um sistema de ensaio.

2.3 Ensaio Homogêneo de Norrin-LRP5/6/Fz4

Outro método para investigar a modulação de interações proteína-proteína é mediante Transferência de Energia por Ressonância de Fluorescência (FRET). A FRET é um processo mecânico quântico, em que uma molécula fluorescente, a doadora, transfere energia para uma molécula cromófora receptora que esteja em íntima proximidade. Da mesma forma, um Ensaio Homogêneo de Proximidade Luminescente Amplificada (triagem ALFA) também pode ser usado para avaliar domínios de interação com Norrin-LRP5/6 ou Fz4 e a função de miméticos de Norrin no complexo Fz4/LRP5. Esses sistemas foram usados com sucesso na literatura para caracterizar as interações intermoleculares entre LRP5 e Axina (veja, por exemplo, Maio et al., *Molec. Cell Biol.* 7: 801-9). Há muitas etiquetas fluores-

centes diferentes para esses estudos, e há muitas maneiras para etiquetar de maneira fluorescente as proteínas de interesse. Por exemplo, CFP (isto é, proteína fluorescente ciano) e YFP (isto é, proteína fluorescente amarela) podem ser usadas como doador e receptor, respectivamente. Proteínas de fusão, com um doador e um receptor, podem ser manipuladas, expressadas e purificadas ou conjugadas a glóbulos doadores e receptores específicos.

Por exemplo, em ensaios do tipo FRET, proteínas Norrin purificadas, ou seus polipeptídeos biologicamente ativos, ou agentes que estejam sendo triados como miméticos de Norrin podem ser fusionados a CFP (ou outra proteína fluorescente), e proteína LRP5/6/Fz4 purificada ou seus polipeptídeos biologicamente ativos (por exemplo, LBD ou domínio contendo hélice beta) fusionada a YFP pode ser gerada e purificada usando-abordagens padronizadas. Se Norrin-CFP e LRP5/Fz4-YFP forem encontradas em íntima proximidade, a transferência de energia de CFP para YFP resultará em uma redução na emissão de CFP e um aumento na emissão de YFP. A energia é suprida com um comprimento de onda de excitação de 450 nm, e a transferência de energia é registrada a comprimentos de onda de emissão de 480 nm e 570 nm. A razão de emissão de YFP para emissão de CFP proporciona um calibre para alterações na interação entre Norrin (ou mimético de Norrin) e LRP5/Fz4. Esse sistema é capaz de fazer a triagem de compostos de molé-

cula pequena que possam alterar a interação proteína-proteína Norrin-LRP5/Fz4 e a atividade na cascata de Wnt. Compostos que intensificam ou rompem a interação seria identificados por um aumento ou diminuição, respectivamente, na razão de emissão de YFP para emissão de CFP. Compostos que modulam a interação LRP5/Fz4 da mesma maneira que Norrin seriam, então, considerados candidatos a moléculas miméticas de Norrin. Também seria feita a triagem de agentes que intensificassem a atividade do tipo Norrin. Esses sistemas de ensaio também podem ser modificados com diferentes proteínas fluorescentes, para incluir Kremen, Dkk e/ou Wnt em várias combinações. A caracterização adicional dos compostos pode ser feita usando-se os ensaios de TCF-luciferase ou embrião de *Xenopus* para elucidar os efeitos dos compostos sobre a sinalização de Norrin funcional.

2.4 Ensaio de Híbrido de Levedura

O sistema de dois híbridos, três híbridos ou outros de levedura ou outro sistema de híbrido de levedura é extremamente útil para estudar interações proteína:proteína. Veja, por exemplo, Chien et al., 1991 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 88: 9578-82; Fields et al., 1994 *Trends Genetics* 10: 286-92; Harper et al., 1993 *Cell* 75: 805-16; Vojtek et al., 1993 *Cell* 74: 205-14; Luban et al., 1993 *Cell* 73: 1067-78; Li et al., 1993 *FASEB J.* 7:

957-63; Zang et al., 1993 *Nature* 364: 308-13; Golemis et al., 1992 *Mol. Cell. Biol.* 12: 3006-14; Sato et al., 1994 *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 91: 9238-42; Coghlan et al., 1995 *Science* 267: 108-111; Kalpana et al., 1994 *Science* 5 266: 2002-6; Helps et al., 1994 *FEBS Lett.* 340: 93-8; Yeung et al., 1994 *Genes & Devel.* 8: 2087-9; Durfee et al., 1993 *Genes & Devel.* 7: 555-569; Paetkau et al., 1994 *Genes & Devel.* 8: 2035-45; Spaargaren et al., 1994 *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 91: 12609-13; Ye et al., 1994 *Proc.* 10 *Nat'l Acad. Sci. USA* 91: 12629-33; e patentes norteamericanas nº 5.989.808, 6.251.602 e 6.284.519.

Variações do sistema são disponíveis para a triagem de fagemídio de levedura (veja, por exemplo, Harper, *CELLULAR INTERACTIONS AND DEVELOPMENT: A PRACTICAL APPROACH*, 15 153-179 (1993); e Elledge et al., 1991 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 88: 1731-5), ou bibliotecas de cDNA de plasmídios (Bartel, 1993 *Cell* 14: 920-4); Finley et al., 1994 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 91: 12980-4) para clonar proteínas que interajam, assim como para estudar pares de 20 proteínas conhecidas.

O sucesso do sistema de dois híbridos se baseia no fato de que os domínios de ligação a DNA e de ativação de polimerase de muitos fatores de transcrição, como GAL4, podem ser separados e, então, reunidos para 25 restaurar a funcionalidade (Morin et al., 1993 *Nuc. Acids*

Res. 21: 2157-63). Embora esses exemplos descrevem triagens de dois híbridos no sistema de levedura, deve-se entender que uma triagem de dois híbridos pode ser conduzida em outros sistemas, como linhagens celulares de mamíferos. A invenção, portanto, não se limita ao uso de um sistema de dois híbridos de levedura, mas engloba esses sistemas alternativos.

Cepas de leveduras com cópias integradas de vários cassetes de gene repórter como, por exemplo, GAL→LacZ, GAL→HIS3 ou GAL→URA3 (Bartel, IN CELLULAR INTERACTIONS AND DEVELOPMENT: A PRACTICAL APPROACH, 153-179 (1993); Harper et al., 1993 *Cell* 75: 805-16; Fields et al., 1994 *Trends Genetics* 10: 286-92) são co-transfectadas com dois plasmídios, cada um expressando uma proteína de fusão diferente. Um plasmídio codifica uma fusão entre a proteína "X" e o domínio de ligação a DNA de, por exemplo, o ativador de transcrição de levedura GAL4 (Brent et al., 1985 *Cell* 43: 729-36; Ma et al., 1987 *Cell* 48: 847-53; Keegan et al., 1986 *Science* 231: 699-704), enquanto o outro plasmídio codifica uma fusão entre a proteína "Y" e o domínio de ativação de RNA polimerase de GAL4 (Keegan et al., 1986). Os plasmídios são transformados em uma cepa da levedura que contém um gene repórter, como lacZ, cuja região reguladora contém sítios de ligação a GAL4. Se as proteínas X e Y

interagirem, elas reconstituem uma proteína ativadora de transcrição GAL4 funcional por colocação dos dois componentes GAL4 em proximidade suficiente para ativar a transcrição. Compreende-se bem que o papel das proteínas de isca e presa pode ser alternativamente trocado e, portanto, as modalidades desta invenção consideram ambos os arranjos alternativos.

Qualquer proteína híbrida isoladamente tem de ser incapaz de ativar a transcrição do gene repórter. O híbrido de domínio de ligação a DNA tem de ser incapaz de ativar a transcrição, porque não apresenta uma função de ativação, e o híbrido de domínio de ativação tem de ser incapaz de ativar a transcrição, porque não pode localizar os sítios de ligação a GAL4. A interação das duas proteínas de teste reconstitui a função de GAL4 e resulta na expressão do gene repórter. Os cassetes de gene repórter consistem em promotores mínimos que contêm o sítio de reconhecimento de DNA de GAL4 (Johnson et al., 1984 *Mol. Cell. Biol.* 4: 1440-8; Lorch et al., 1984 *J. Mol. Biol.* 186: 821-824) clonado em 5' com relação a sua caixa TATA. A ativação da transcrição é classificada medindo-se a expressão de β -galactosidase (ou outro repórter) ou o crescimento dos transformantes em meio mínimo desprovido do nutriente específico que permita a seleção auxotrófica do produto de transcrição, por exemplo, URA3 (seleção de uracila) ou HIS3 (seleção de

histidina). Veja, por exemplo, Bartel, 1993; Durfee et al., 1993 *Genes & Devel.* 7: 555-569; Fields et al., 1994 *Trends Genet.* 10: 286-292; e patente norte-americana nº 5.283.173.

5 Genericamente, esses métodos incluem duas proteínas a serem testadas quanto à interação, que são expressadas como híbridos no núcleo de uma célula de levedura. Uma das proteínas é fusionada ao domínio de ligação a DNA (DBD) de um fator de transcrição, e a outra
10 é fusionada a um domínio de ativação de transcrição (AD). Se as proteínas interagirem, elas reconstituem um fator de transcrição funcional que ativa um ou mais genes repórteres que contêm sítios de ligação para o DBD. Ensaio de dois híbridos exemplificativos são de Norrin,
15 Norrin/Frizzled4 ou fusões Frizzled4/LRP5.

3. Métodos *In vivo* de Ensaio de Agentes

 Além dos métodos *in vitro* aqui identificados, os métodos e materiais também podem incluir o uso de animais para estudar o efeito de agentes de teste triados e
20 identificados por análises *in vitro*. Por exemplo, animais transgênicos em que um (ou mais) dos genes de Norrin, Kremen (Kremen 1 e/ou 2), Dkk (Dkk1, Dkk2, Dkk3 e/ou Dkk4), LRP5, LRP6, HBM, Wnt (Wnt1 a Wnt19) e Frizzled4 genes são introduzidos como cDNAs. Exemplos de animais
25 transgênicos de LRP5 e HBM podem ser encontrados no Pedi-

do Internacional PCT nº PCT/US02/14876 e no pedido de patente norte-americana nº 10/680.287. A matéria desses pedidos é aqui incorporada por referência em sua inteireza para todas as finalidades.

5 Assim, em um aspecto, depois das etapas de triagem do agente de teste contra qualquer uma das linhagens celulares transfectadas acima discutidas e/ou depois que os agentes tiverem sido testados para se observar se eles se ligam a qualquer uma de Dkk, Norrin, Frizzled4, LRP5, 10 LRP6, HBM, Wnt e/ou Kremen, esses agentes de teste também podem ser avaliados *in vivo*. A adição da etapa de teste de reagentes *in vivo* acrescenta uma etapa de validação aos testes obtidos por qualquer um dos meios discutidos na Seção 2 acima. Os reagentes podem ser administrados 15 aos animais mediante qualquer meio de administração adequado para o composto, por exemplo, oral, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, cutânea e outros. A administração pode depender da formulação do composto de teste. Por exemplo, pequenos RNAs inibidores (siRNAs) e imunoglobulinas podem ser administrados por via intravenosa, 20 em vez de oral. Pequenos compostos químicos podem ser administrados por via oral ou intravenosa. As quantidades do composto de teste seriam administradas com base no peso do animal.

Os animais também poderiam ser utilizados para testar a biodisponibilidade e os produtos de degradação dos compostos.

Os animais receberiam a administração do composto de teste durante um período de dias, semanas ou meses. A administração pode ser diária, semanal, bimensal, mensal ou outra. Os animais podem receber apenas a administração do agente ou em conjunto com exercício, o que causa distorção dos ossos do animal. A discussão de como a distorção pode ser imposta aos ossos dos animais é descrita no Pedido Internacional PCT nº PCT/US2004/17951. O conteúdo desse pedido é aqui incorporado por referência em sua inteireza para todas as finalidades.

Por exemplo, o pDXA pode ser medido em animais do tipo selvagem e transgênicos que recebam a administração de várias dosagens dos agentes. Por exemplo, camundongos do tipo selvagem e transgênicos são anestesiados, pesados, e varreduras de raios X de corpo inteiro no esqueleto são geradas usando-se o dispositivo LUNAR PIXImus para pequenos animais. As varreduras podem ser realizadas quando os camundongos são desmamados (isto é, com 3 semanas de idade) e repetidas a intervalos de 2 semanas. Animais do tipo selvagem podem receber varreduras em 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 27 e 29 semanas. A varredura de animais transgênicos pode ser realizada durante períodos de até 17 semanas. As varreduras podem ser ana-

lisadas quanto a BMD (densidade mineral óssea), BMC (teor mineral ósseo), TTM (massa tissular total) e porcentagem (%) de gordura para várias regiões do corpo.

Além disso ou alternativamente, podem-se obter radiografias faxitron dos animais acima. Por exemplo, após a varredura pDXA de animais anestesiados, pode-se tirar um raio X adicional usando-se um dispositivo Faxitron que permita a medição do tamanho do osso.

Além disso ou alternativamente, pode-se realizar a marcação com calceína dos animais acima. Por exemplo, os animais podem ser dosados com calceína a 15 mg/kg de peso do animal em duas ocasiões consecutivas. A primeira dose pode ser dada 9 dias antes do animal ser submetido à eutanásia, e a segunda dose dois dias antes da eutanásia. Também se pode determinar a medição da formação óssea.

Certos tipos de análises *ex vivo* dos animais acima também podem ser opcionalmente realizadas. Por exemplo, pode-se fazer o isolamento de RNA do tecido, pQCT e microCT (μ CT), histologia, análise de resistência ao dobramento, análise de resistência compressiva de vértebras e análises séricas podem ser realizadas. Por exemplo, RNA pode ser isolado da tíbia e outros tecidos usando-se TRIzol⁷ para determinar a expressão de mRNA. A análise pQCT de qualquer um dos animais acima pode ser rea-

lizada por obtenção de um fêmur e limpeza de tecidos moles. O fêmur pode ser, então, armazenado em etanol a 70% para a determinação de densidade total e trabecular da metáfise distal, e a densidade cortical do meio do eixo, então, determinada.

A análise do fêmur do animal também pode ser usada para determinar índices trabeculares da metáfise distal.

Opcionalmente, pode-se realizar uma análise histológica dos animais acima. Por exemplo, o fêmur de um camundongo pode ser usado para determinar a área óssea e parâmetros estáticos e dinâmicos da metáfise distal. Alternativamente ou além disso, pode-se realizar uma imunohistoquímica (por exemplo, hibridização *in situ* de marcadores osteogênicos e coloração TUNEL das células que sofrem apoptose).

Qualquer um dos animais acima também pode ter seus ossos examinados quanto à resistência ao dobramento ou resistência compressiva de vértebras. Para a resistência ao dobramento, o fêmuro do animal (ou outro osso adequado) pode ser limpado do tecido mole e armazenado a cerca de -20°C antes da análise da resistência ao dobramento em 3 pontos do eixo médio. A resistência compressiva pode ser medida por remoção da espinha, por exemplo, de um camundongo em T10 a L6 ou L7. O tecido mole é deixado na espinha, que é, então, congelada a cerca de -20°C

até a análise. A resistência compressiva é freqüentemente medida na vértebra L5.

Para fins de análise de lipídios, pode-se avaliar o soro dos animais. Por exemplo, os animais podem ser submetidos à eutanásia, e o soro preparado a partir do sangue para medir o colesterol total, triglicerídeos, osteocalcina e outros marcadores bioquímicos substitutos.

Os transcritos de gene e a modulação da expressão também podem ser avaliados nos animais. Por exemplo, sabe-se que a carga sobre os ossos tem um impacto sobre os genes da seguinte maneira:

TABELA 1

Efeito da Carga Sobre a Expressão de Gene *In vivo* Comparando Animais HBM TG e Não-TG

Gene	Via	Efeito da Carga Sobre a Expressão do Gene
ACP5	HBM	Regulado positivamente de maneira igual nos machos e é induzido mais significativamente em fêmeas HBM-TG
Coll1A1	HBM	Sem alteração significativa em nenhum
Conexina 43	Wnt	Regulado positivamente; Mais significativo em HBM-TG
CTSK	HBM	Regulado positivamente em ambos os animais de maneira igual
Ciclina D1	Wnt	Regulado positivamente; Mais significativo em HBM-TG
ENOS	Sensor de Carga	Regulado positivamente; Mais significativo em HBM-TG
Frizzled 2	Wnt	Regulado positivamente; Mais significativo em HBM-TG
GADD45A	HBM	Regulado negativamente em ambos os animais
IGF2	HBM	Regulado positivamente em ambos os animais machos
IGFBP6	HBM	Regulado positivamente; Mais

Gene	Via	Efeito da Carga Sobre a Expressão do Gene
		significativo em HBM-TG
IL-6	Sensor de Carga	Regulado positivamente; Mais significativo em HBM-TG
IL-8	Tensão e Função de Osteoclasto	Regulado positivamente; Mais significativo em HBM-TG
LRP5	-	Sem alteração significativa em nenhum
MK2	Tensão e Função de Osteoclasto	Regulado positivamente apenas em animais não TG
OPG	Tensão e Função de Osteoclasto	Regulado positivamente apenas em animais HBM-TG
Osteonectina	HBM	Regulado positivamente; Mais significativo em HBM-TG
PTGS	Sensor de Carga	Regulado positivamente; Mais significativo em HBM-TG
RANKL	Tensão e Função de Osteoclasto	Sem alteração significativa em nenhum
SFRP1	Wnt	Regulado positivamente; Mais significativo em HBM-TG
SFRP4	Wnt	Regulado positivamente; Mais significativo em HBM-TG
TGF β	HBM	Sem alteração significativa em nenhum
TIMP3	HBM	Sem alteração significativa em nenhum
WISP2	Wnt	Regulado positivamente; Mais significativo em HBM-TG
Wnt10B	Wnt	Regulado positivamente; Mais significativo em HBM-TG

Qualquer um ou mais dos genes acima mencionados, em qualquer combinação, pode ser avaliado quanto a alterações na expressão devido à administração de um agente de teste, agente de controle, tensão sobre o osso ou célula óssea e assim por diante. O perfil de genes pode ser produzido e, então, avaliado em conjunto com o efeito que o agente tem sobre a *Norrin-Frizzled4* ou o com-

plexo Frizzled4-LRP5 e sua atividade na via de Wnt. Por exemplo, o perfil de gene/proteína obtido pelo agente que modulou o complexo Norrin-Frizzled4-LRP5 ou um mimético de Norrin produz um perfil como o observado com a administração de um antagonista de Dkk ou antagonista de Kremen ou por tensão sobre o osso ou célula óssea.

A carga óssea e a comparação da carga óssea com com a modulação por um agente também pode ser realizada *in vitro*. Por exemplo, a carga gravitacional pode ser usada para induzir tensão sobre qualquer uma das células ósseas aqui discutidas, e o perfil da expressão de gene de qualquer um ou mais dos genes ou qualquer combinação dos seguintes genes pode ser avaliado como parte de um perfil de tensão óssea. O perfil de tensão óssea pode ser avaliado para ver se, por exemplo, um mimético de Norrin induz uma intensificação no perfil de tensão óssea ou diminui a inibição de Dkk e/ou Kremen nos genes de um perfil de tensão óssea.

TABELA 2

Efeito da Carga Sobre a Expressão de Gene <i>In vitro</i>		
Gene	Tipo de Gene	Resposta de Células MC3T3 à Carga Gravitacional
AP1B1	Gene regulado por tensão	Regulado positivamente
AXIN	Componente da via de Wnt	Regulado positivamente
BMP1	Indução observada por iGSK-3	Regulado positivamente
CBFB	Função de osteoblasto	Regulado positivamente
CCND1	Gene alvo de Wnt	Regulado positivamente

Gene	Tipo de Gene	Resposta de Células MC3T3 à Carga Gravitacional
CCND3	Ciclo celular	Regulado positivamente
CELSR2	Receptor do tipo G	Regulado positivamente
CHUK/IKK alfa	Facilita a translocação nuclear de β -catenina	Regulado positivamente
CK1 alfa	Componente da via de Wnt	Regulado positivamente
CKB	Quinase	Regulado positivamente
CRABP2	Diferenciação de osteoblastos	Regulado positivamente
CSF1R	Osteoclastogênese	Regulado positivamente
CTGF	Fator de crescimento	Regulado positivamente
DVL1	Intermediário de sinalização de Wnt	Regulado positivamente
EPHB6	Gene alvo de Wnt	Regulado positivamente
FOSL1	Gene regulado por tensão	Regulado positivamente
GADD45B	Ciclo celular	Regulado positivamente
GADD45G	Ciclo celular	Regulado positivamente
GJA1	Gene alvo de Wnt	Regulado positivamente
GJB3	Gene alvo de Wnt	Regulado positivamente
HERPUD1	Gene alvo de Wnt	Regulado positivamente
IGFBP6		Regulado positivamente
IL1R1	Sinalização mediada por IL-1, inflamação	Regulado positivamente
IL1RL1	Sinalização mediada por IL-1, Inflamação	Regulado positivamente
IL4RA	Inflamação	Regulado positivamente
ITGA5	Sinalização de integrina	Regulado positivamente
JUN	Gene regulado por tensão	Regulado positivamente
JUND1	Gene regulado por tensão	Regulado positivamente

Gene	Tipo de Gene	Resposta de Células MC3T3 à Carga Gravitacional
LDLR	Receptor de lipoproteína	Regulado positivamente
LOX	Lisil oxidase	Regulado positivamente
MAPKAPK2	Quinase na sinalização regulada por tensão	Regulado positivamente
MSX1	Gene alvo de Wnt	Regulado positivamente
MYCS	Gene alvo de Wnt	Regulado positivamente
NCAM1	Gene alvo de Wnt	Regulado positivamente
NFATC1	Inflamação	Regulado positivamente
NFKB1	Inflamação, proliferação	Regulado positivamente
PDGFA	Fator de crescimento, desenvolvimento de osteoblastos	Regulado positivamente
PRDC-PENDING	Proteína do tipo Cereberus	Regulado positivamente
PTGS1	Inflamação	Regulado positivamente
PTGS2	Gene alvo de Wnt	Regulado positivamente
RAMP3	Sinalização de cálcio	Regulado positivamente
RUNX	Função de osteoblasto	Regulado positivamente
RUNX2/CBFA1	Função de osteoblasto	Regulado positivamente
SDC1	Proteoglicano requerido para sinalização de Wnt	Regulado positivamente
SERPINE1	Protease	Regulado positivamente
SPARCL1	Função de osteoblasto	Regulado positivamente
STAT3	Proliferação e crescimento celular	Regulado positivamente
TANK	Inflamação, Sinalização de NF-kB	Regulado positivamente
TGFB1	Gene de sinalização de TGF beta	Regulado positivamente
THBD	Função de célula endotelial	Regulado positivamente
TIEG	Gene de sinalização de TGF beta	Regulado positivamente

Gene	Tipo de Gene	Resposta de Células MC3T3 à Carga Gravitacional
TIMP1	Metaloproteinase de matriz	Regulado positivamente
TIMP3	Metaloproteinase de matriz	Regulado positivamente
TNFRSF11B/OPG	Gene alvo de Wnt	Regulado positivamente
TRAF3	Sinalização de NF-κB	Regulado positivamente
WISP1	Gene alvo de Wnt	Regulado positivamente

A determinação de se os agentes de teste administrados podem induzir um efeito modulador ósseo pode ser avaliada por raios X quanto a alterações da densidade óssea ou por sacrifício do animal e exame de osso cortical, conforme descrito no pedido de patente norte-americana nº 10/680.287 e Pedido Internacional PCT nº PCT/US2004/17951, ou qualquer um dos métodos aqui descritos ou conhecidos na técnica. O conteúdo desses pedidos é aqui incorporado por referência em sua inteireza para todas as finalidades.

4. Métodos de Estudo da Carga Óssea *In vitro*

Um aspecto da invenção é o estudo do efeito da carga óssea *in vitro* e meios pelos quais os benefícios da carga óssea (isto é, mineralização óssea aumentada) podem ser intensificados. O estudo da intensificação da carga óssea pode ser feito tanto *in vivo* (conforme acima discutido), quanto *in vitro*. A intensificação da carga óssea

pode ser primeiro realizada *in vitro*, seguida, então, por experimentos *in vivo*, como aqueles acima discutidos.

Conseqüentemente, um aspecto da invenção envolve a colocação das células sob condições que simulem estímulos de carga. Há vários métodos disponíveis para a 5 distorção de culturas celulares para simular a resposta de carga óssea observada *in vivo*. Esses métodos incluem, mas não se limitam a, cisalhamento com fluido, compressão hidrostática, estiramento uniaxial, estiramento biaxial, 10 carga gravitacional e carga induzida usando-se um Flexercell[®] ou sistema equivalente.

4.1 Estímulos de Carga Óssea

Genes preferidos que são modulados por um estímulo de carga óssea, como aqueles proporcionados por qualquer um dos métodos acima, incluem, mas não se limitam a, SFRP1, conexina, WISP2 43, CCND1, Wnt10b, Jun, Fos, PTGS2 (COX-2) e eNOS. Genes adicionais podem ser monitorizados quanto a aumentos em sua atividade (por exemplo, transcritos de mRNA aumentados e proteína), conforme 20 refletido nas presentes Tabelas. Pelo menos seis genes que se mostraram consistentemente regulados positivamente em resposta à carga óssea (isto é, Jun, Fos, eNOS, SFRP1, COX-2 e Conexina 43) também são intensificados pela adição de um agente que ative a via de Wnt. Outros genes, 25 como Wnt2, não são intensificados pela adição de reagentes que ativaram a via de Wnt (por exemplo, inibidores de

GSK-3 e Wnt 3A e seus agonistas, miméticos e variantes) e apenas respondem à carga óssea. Assim, um aspecto incluiria o uso desses sistemas *in vitro* para estudar a intensificação dos genes de perfil de tensão em resposta a, por exemplo, um mimético de Norrin, um agonista de Norrin, um mimético de Frizzled4 ou um mimético de Frizzled4.

4.1.1 Estímulo de Cisalhamento com Fluido

Um método de indução da carga óssea é por cisalhamento com fluido. O cisalhamento com fluido pode utilizar um viscosímetro de cone e placa que gera um cisalhamento lamina contínuo por um mecanismo de agitação. Alternativamente, um aparelho de alça de fluxo pode produzir esse cisalhamento em uma câmara de cultura de fluxo paralelo. Estes últimos método e aparelho são exemplificados pelo sistema Streamer produzido pela Flexcell International Corporation. Também se sabe que o aparelho de alça de fluxo produz um estímulo reprodutível e consistente. As únicas desvantagens são que os pontos extremos são tipicamente de curta duração e se essas alterações têm impacto sobre a função de osteoblastos diferenciados (Basso et al., 2002 *Bone* 30(2): 347-51).

4.1.2 Estímulo de Compressão Hidrostática

Um segundo método de indução de carga óssea é o uso de compressão hidrostática. A compressão hidrostática pode utilizar ar comprimido para gerar uma força contínua

ou intermitente que se acredita que localiza a força especificamente em regiões em que as células interagem com a proteína de matriz extracelular/proteínas de adesão.

4.1.3 Estímulo de Estiramento Uniaxial

5 Um terceiro meio de induzir carga óssea *in vitro* é o uso de um estímulo de estiramento uniaxial. O método de estiramento uniaxial utiliza força de estiramento em uma direção. O método envolve o crescimento de células em uma cultura de tecido em uma tira tratada de película
10 de poliestireno ou outra película, que é fixada a uma camada flexível de silicone. A camada de silicone é adicionalmente fixada a duas barras metálicas. As barras metálicas podem ser manipuladas uma com relação à outra usando-se um eletromagneto ou algum outro meio de movimentação.
15 ção. Esse método não cria nenhum cisalhamento com fluido. A falta de cisalhamento com fluido torna esse método menos preferido, porque o fluxo de fluido intersticial pode desempenhar um papel maior na remodelagem óssea que o estiramento mecânico. Portanto, esse método pode não simular
20 lar completamente o que ocorre *in vivo*, a despeito do estímulo reproduzível e consistente produzido (Basso et al., 2002 *Bone* 30(2): 347-51).

4.1.4 Estímulo de Estiramento Biaxial

25 O estiramento biaxial é essencialmente o sistema Flexercell[®] aqui discutido. Esse método usa uma mem-

brana de silastic revestida com colágeno, sobre a qual as células são cultivadas. As placas são, então, colocadas em uma bandeja especial, que é fixada a uma bomba de vácuo. A bomba de vácuo estira e relaxa a membrana, por estiramento ou outra forma de distorção da membrana celular. Além disso, qualquer movimentação do meio ou fluido aumentará ainda mais o cisalhamento com fluido.

4.1.5 Estímulo de Carga Gravitacional

A carga gravitacional é outro método pelo qual a carga óssea pode ser induzida *in vitro*. Essencialmente, aplica-se força às células, fazendo com que as células se achatem. Para detalhes adicionais, veja, por exemplo, Hatton et al., 2003 *J. Bone & Min. Res.* 18(1): 58-66; e Fitzgerald et al., 1996 *Exp. Cell. Res.* 228: 168-71. Especificamente, as células são cultivadas sobre placas ou lamínulas e, então, expostas a forças G crescentes.

4.1.6 Estímulo Flexercell®

Um método preferido para a avaliação da intensificação a base de reagentes da via de Wnt e da mineralização óssea é o uso do sistema Flexercell®, um estímulo de estiramento biaxial. Resumidamente, células ósseas (por exemplo, células MC3T3) são expostas a cerca de 3.400 $\mu\epsilon$. Cargas de cerca de 50 $\mu\epsilon$ a cerca de 5.000 $\mu\epsilon$ (e qualquer valor intermediário) também podem ser usadas para estímulos de carga mecânica. Qualquer estímulo nessa faixa simula estímulos fisiológicos de carga óssea. Estí-

mulos acima de 5.000 μe resultam em cargas patofisiológicas e, portanto, não são preferidas. As células também podem ser expostas a um modulador da via de Wnt (por exemplo, um inibidor de GSK) antes da exposição ao estiramento biaxial.

Os genes regulados positivamente pela administração apenas da carga ou com um inibidor de GSK-3 incluem, mas não se limitam a, COX-2, eNOS, conexina 43, Fos, Jun, WISP2, Wnt10b, Ciclina D1 e SFRP1. O perfil de expressão obtido *in vitro* com os estudos Flexercell[®] simulam o perfil de expressão de genes sob carga *in vivo* (isto é, análise de RNA realizada em células de tíbias de camundongos HBM TG em que os camundongos tenha sido submetidos a carga óssea usando um sistema de quatro pontos). Assim, esse ensaio de carga mecânica, ou o uso de outro meio de carga mecânica com as várias linhagens celulares aqui apresentadas, pode ser usado para identificar moléculas pequenas, peptídios, imunoglobulinas e outras que modulem e, de preferência, ativem a via de Wnt canônica e que simulem o fenótipo HBM. Um mimético de Norrin pode produzir a mesma resposta que Norrin ou uma resposta intensificada, como a resposta intensificada da variante HBM de LRP5 de massa óssea aumentada. Assim, o uso desse sistema seria útil para a triagem de reagentes que intensifiquem os genes regulados positivamente do

perfil de tensão de da maneira HBM, assim como uma ação de maneira equivalente à Norrin de tipo selvagem.

Os métodos *in vitro* de indução de estímulos de tensão mecânica sobre células também podem ser usados para estudar a proliferação celular e a apoptose, o que é relevante para a remodelagem óssea, e a necessidade de proliferação de osteoblastos e osteoclastos e resorção de osteoclastos. Por exemplo, células osteoblásticas HBM e não afetadas podem ser vistas em placas bioflex de 6 poços e cultivadas durante 2-3 dias em meios de crescimento contendo 10% de FBS até que as células estejam cerca de 60% confluentes. Vinte e quatro horas antes da carga mecânica, o meio é substituído por 1 mL de meio basal contendo de cerca de 2 a cerca de 4% de FBS. As células são, então, submetidas de cerca de 50 a cerca de 5.000 μe de carga durante cerca de 1 a cerca de 5 horas. As células podem ser adicionalmente estudadas quanto a reagentes que sejam miméticos de Norrin ou que sejam agonistas do complexo LRP5/Norrin/Frizzled4 (por exemplo, agonistas de Norrin, agonistas de Frizzled4 ou agonistas de LRP5), assim como seus antagonistas.

Depois da carga, as células são cultivadas durante um período de tempo adicional. Subseqüentemente, o número de células e a proliferação podem ser avaliados usando-se inúmeros ensaios comerciais ou ensaios conhecidos na técnica, incluindo, mas não limitados a, incorpo-

ração de [³H]-timidina, incorporação de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), ensaio de sais de 3-(4,5 dimetil-
azol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-
5 triazólio (MTS), ensaio TUNEL (isto é, etiquetagem de ex-
tremidade de entalhe dUTP de desoxinucleotidiltransferase
terminal) ou ensaio de Anexina V.

Os seguintes genes podem ser analisados com re-
lação ao perfil. Em outra modalidade, antagonistas de Wnt
podem ser triados ou usados para tratar indivíduos em que
10 seja necessária a desmineralização óssea (por exemplo,
osteopetrose). Antagonistas de Wnt incluem, mas não se
limitam a, antagonistas de Dkk1 e antagonistas de Kremen.
Agonistas de Norrin e miméticos de Norrin juntamente com
agonistas e miméticos de Frizzled4, agonistas e miméticos
15 de Wnt e agonistas e miméticos de LRP5 e LRP6 também po-
dem ser avaliados com esse sistema.

TABELA 3

Genes Para o Desenvolvimento de Microarranjo de Alta
Massa Óssea ou Arranjo de Proteína/Anticorpo

GENE	DESCRIÇÃO	ONDE É EXPRESSADO
ACP5	fosfatase ácida 5, resis- tente a tartarato	Osso e cân- cer de cólon
CCND1	ciclina D1 (PRAD1: adenoma- tose de paratireóide 1)	Osso HBM
CNK1	homólogo 3 do oncogene vi- ral de leucemia eritroblás- tica v-erb-b2 (aviária)	Osso e cân- cer de cólon
COL1A1	colágeno, tipo I, alfa 1	Osso HBM
COL6A3	colágeno, tipo VI, alfa 3	Osso HBM
CTGF	fator de crescimento de te- cido conjuntivo	Osso HBM

GENE	DESCRIÇÃO	ONDE É EXPRESSADO
CTSK	catepsina K (picnodisosteose)	Osso HBM
CX3CR1	Receptor 1 de quimiocina (C-X3-C)	Inflamação em osso
DELTEX	deltex homólogo 2 (<i>Drosophila</i>), EphB2	Osso e câncer de cólon
EPHB2	intensificador de conector do tipo KSR (supressor quinase de ras de <i>Drosophila</i>)	Osso e câncer de cólon
ERBB3	Oncogene GRO1 (atividade estimuladora do crescimento de melanoma, alfa)	Osso e câncer de cólon
FAP	proteína de ativação de fibroblastos, alfa	Osso e câncer de cólon
FBLN1	fibulina 1	Osso HBM
FGF-2	fator de crescimento de fibroblastos 2 (básico)	Inflamação em osso
FGF-7	fator de crescimento de fibroblastos 7 (fator de crescimento de queratinócitos)	Inflamação em osso
FOS	Homólogo do oncogene viral de osteossarcoma murídeo fos FBJ	Osso e câncer de cólon/gene de percepção de carga
FZD2	Homólogo 2 de frizzled (<i>Drosophila</i>)	Osso HBM
GADD45A	Parada do crescimento e inidutível por lesão a DNA, alfa	Osso HBM
GAS6	Específico para parada de crescimento 6	Osso HBM
GJA1	Proteína de junção de vão, alfa 1, 43 kD (conexina 43)	Osso HBM
IGF2	fator de crescimento do tipo insulina 2 (somatomedina A)	Inflamação em osso
IGF2R	Receptor 2 fator de crescimento do tipo insulina	Inflamação em osso
IGFBP6	Proteína 6 de ligação a fator de crescimento do tipo insulina	Osso HBM
IL-6	interleucina 6 (interferon, beta 2)	Inflamação em osso
ITGB5	integrina, beta 5	Osso HBM
ITGBL1	integrina, beta-like 1 (com domínios repetidos do tipo EGF)	Osso HBM

GENE	DESCRIÇÃO	ONDE É EXPRESSADO
JUN	Homólogo do oncogene do vírus 17 de sarcoma aviário jun	Osso e câncer de cólon/gene de percepção de carga
LOX	lisil oxidase	Osso HBM
LRP5	Proteína 5 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade	Osso HBM
LRP6	Proteína 6 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade	Osso HBM
LSP1	Proteína 1 específica para linfócitos	Inflamação em osso
MAPKAPK2	proteína quinase 2 ativada por proteína quinase ativada por mitógeno	Atividade de osteoclastos
MCC	com mutação em cânceres colo-retais	Osso e câncer de cólon
MET	proto-oncogene met (receptor fator de crescimento de hepatócitos)	Osso HBM
MYBL1	Homólogo do oncogene viral de mieloblastose v-myb (aviário)-tipo 1	Osso HBM
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	Osso e câncer de cólon
eNOS	óxido nítrico sintetase 3 (célula endotelial)	Genes sensíveis a carga
OSMR	Receptor de oncostatina M	Osso HBM
PDGFRA	receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas, polipeptídio alfa	Osso HBM
PTGS2/COX-2	prostaglandina endoperóxido sintetase 2 (prostaglandina G/H sintetase e ciclooxigenase)	Genes sensíveis a carga
SFRP1	proteína relacionada a frizzled secretada 1	Osso HBM
SFRP4	proteína relacionada a frizzled secretada 4	Osso HBM
SPARC	Proteoglicano de domínios do tipo sparc/osteonectina, cwcv e kazal (testicano)	Inflamação em osso
STAT1	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1, 91 kD	Inflamação em osso

GENE	DESCRIÇÃO	ONDE É EXPRESSADO
TGFBR2	fator de crescimento transformador, beta receptor II (70-80 kD)	Inflamação em osso
THBS1	trombospondina 1	Osso HBM
TIMP2	inibidor tissular de metaloproteinase 2	Osso HBM
TIMP3	inibidor tissular de metaloproteinase 3 (distrofia de Sorsby fundus, pseudo-inflamatória)	Osso HBM
TNF	fator de necrose tumoral (superfamília TNF, membro 2)	Atividade de osteoclastos
TNFRSF10B	superfamília de receptor de fator de necrose tumoral, membro 10b	Inflamação em osso
TNFRSF11B/OPG	superfamília de receptor de fator de necrose tumoral, membro 11b (osteoprotegerina)	Atividade de osteoclastos
TNFSF11/RANKL	Superfamília de fator de necrose tumoral (ligante), membro 11	Atividade de osteoclastos
UNK_D83402	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	Osso HBM
VCAM1	Molécula de adesão de células vasculares 1	Inflamação em osso
WISP2	proteína 2 da via de sinalização induzível por Wnt1	Osso HBM
WNT10B	Família dos sítios de integração MMTV sem abas, membro 10B	Osso e câncer de cólon
WNT6	Família dos sítios de integração MMTV sem abas, membro 6	Osso HBM

Os materiais e métodos relacionados aos arranjos de proteínas e ácidos nucleicos para carga óssea são discutidos em maiores detalhes no Pedido Internacional 5 PCT n° PCT/US2004/17951, que é aqui incorporado em sua inteireza para todas as finalidades.

4.2 Avaliação Funcional de Norrin em *Xenopus*

Embriões de *Xenopus* são um sistema de ensaio *in vivo* informativo e bem estabelecido para avaliar a modulação da sinalização de Wnt veja, por exemplo, McMahon *et al.*, 1989 *Cell* 58: 1075-84; Smith e Harland 1991 *Cell* 67: 753-65, revisado em Wodarz e Nusse, 1998 *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 14: 59-88).

A modificação da via de sinalização de Wnt por impacto sobre o complexo Norrin-Frizzled4-LRP5 pode ser visualizada por exame dos embriões quanto a um fenótipo de dorsalização (eixo corporal duplicado) após injeção de RNA no blastômero ventral no estágio de 4 ou 8 células. No nível molecular, os fenótipos podem ser analisados buscando-se a expressão de vários genes marcadores em embriões no estágio de 10,5 dias. Esses marcadores incluiriam marcadores genéricos de endoderma, mesoderma e ectoderma, assim como vários transcritos específicos para tecido.

A análise dos embriões pode ser feita usando-se RT-PCR/TaqMan® e pode ser feita em tecido embrionário total ou de maneira mais restrita (microdissecção). Como esse sistema é muito flexível e rápido, pela injeção de combinações de transcritos, como Norrin, LRP5/LRP6 e Fz4, pode-se dissecar o mecanismo da via de sinalização de Norrin. Estudos anteriores demonstraram que LRP6 isolada-

mente ou em combinação com LRP5 + Wnt5a era capaz de induzir duplicação do eixo (dorsalização) nesse sistema (Tamai *et al.*, 2000 *Nature* 407: 530-35). Uma vez estabelecida a sinalização de Norrin, pode ser usada para avaliar por antagonistas de Dkk e Kremen e agonistas de Norrin e miméticos de Norrin.

4.2.1 Construtos Para Expressão em *Xenopus* (Vetor pCS2⁺)

cDNAs de Norrin, LRP5/6, Fz4, Dkk (por exemplo, Dkk1), Wnt e Kremen1/2 podem ser subclonados em um vetor, como pCS2⁺, na orientação em sentido com relação ao promotor do vetor SP6. O vetor pCS2⁺ contém um sinal de poliadenilação do vírus SV40 e a sequência do promotor T3 (para geração de mRNA anti-sentido) a jusante do enxerto. Outros vetores também podem ser utilizados para expressão das proteínas, em qualquer combinação.

4.2.2 Protocolo de Síntese e Microinjeção de mRNA

mRNA para microinjeção em embriões de *Xenopus* pode ser gerado por transcrição *in vitro* usando-se os construtos de cDNA no vetor pCS2⁺, por exemplo, conforme acima descrito, como molde. O RNA é sintetizado usando-se o kit de transcrição de RNA rematado de alto rendimento Ambion mMessage mMachine (Ambion Cat. N° 1340) segundo as especificações do fabricante para as reações de polimera-

se Sp6. Os produtos de RNA podem ser levados a um volume final de 50 μ L em água estéril e destilada em vidro e purificada em Colunas Quick Spin para Purificação de RNA Radiomarcado usando-se uma coluna de G50-Sephadex (Roche, 5 Cat. N° 1274015) segundo as especificações do fabricante. O eluído resultante foi finalmente extraído com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e precipitado com isopropanol usando-se protocolos padronizados (Sambrook *et al.*, 1989). Os volumes de RNA finais normalmente são de 10 aproximadamente 50 μ L. A concentração de RNA pode ser determinada por valores de absorbância a 260 nm e 280 nm. A integridade do RNA pode ser visualizada por coloração com brometo de etídio de eletroforese em gel de agarose desnaturante (formaldeído) (Sambrook *et al.*, 1989). Várias 15 quantidades de RNA (de cerca de 2 pg a cerca de 1 ng) são injetadas no blastômero ventral do embrião de 4 ou 8 células de *Xenopus*. Esses protocolos são descritos em Moon *et al.*, 1989 *Technique-J. Meth. Cell & Mol. Biol.* 1: 76-89, e Peng, 1991 *Meth. Cell. Biol.* 36: 657-62.

20 Moléculas identificadas como moduladoras da função de Norrin ou que ajam como miméticos de Norrin em qualquer dos ensaios aqui descritos podem ser adicionalmente validadas usando-se modelos animais ou outros ensaios de triagem *in vitro*.

25 4.3 Avaliação de Norrin Quanto ao Efeito Oste-

ogênico em Células Tronco Mesenquimais

Células tronco mesenquimais humanas (hMSCs) (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD) e células tronco de camundongo (por exemplo, C3H10T1/2, ATCC) podem ser
5 induzidas a se diferenciarem em nódulos ósseos mineralizados (Jaiswal et al., 1997 *J. Cell Biol.* 64: 295-312) ou tecidos adiposos (Pettinger et al., 1999 *Science* 284: 143-147) *in vitro* por meio osteogênico ou adipogênico, respectivamente. A ativação do sinal de Wnt intensifica a
10 osteogênese e inibe a adipogênese em hMSCs. Espera-se que a sinalização mediada por Norrin-Fz4-LRP5 proporcione um tipo similar de padrões de diferenciação em hMSCs. Assim, a identificação de miméticos de Norrin e agonistas de Norrin usando hMSCs (ou outra célula MSC de outro verte-
15 brado) é um ensaio de triagem considerado.

Além de células tronco mesenquimais humanas, células tronco de outros animais vertebrados também podem ser usadas. Células tronco mesenquimais são células pro-
genitoras de várias células ósseas (por exemplo, osteo-
20 blastos), assim como de adipócitos (veja, por exemplo, Bennett et al., 2005 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 102(9): 3324-3329). Alternativamente, podem-se substituir por células mais diferenciadas como pré-osteoblastos, osteócitos e osteoblastos maduros. Deve-se notar que, em casos
25 em que a linhagem celular é indicada como sendo uma li-

nhagem celular derivada de seres humanos, estas podem ser substituídas por células análogas de outro animal vertebrado.

4.3.1 Avaliação da Atividade Osteogênica por Superexpressão de Norrin

Resumidamente, a Norrin pode ser adicionada a hMSCs (passagem 3-6) como uma proteína purificada ou como parte de um meio condicionado, ou expressada por infecção de hMSCs usando-se vetores virais. Alternativamente, Norrin, agonistas de agonistas de Norrin e miméticos de Norrin podem ser adicionados às hMSCs juntamente com o meio osteogênico (meio de crescimento suplementado com 10 nM de dexametasona, 50 µg/mL de ácido L-ascórbico e 5 mM de beta-glicerofosfato). Depois de cerca de 1 a cerca de 3 semanas de incubação juntamente com o meio de controle apropriado a cerca de 37°C, e com reabastecimento semanal de meio fresco com ou sem Norrin, a atividade osteogênica pode ser medida por técnicas padronizadas. Por exemplo, a atividade osteogênica pode ser medida por coloração das células quanto à expressão da proteína fosfatase alcalina (AlkPhos), determinação da atividade enzimática da AlkPhos, indução de mRNAs de AlkPhos ou osteocalcina e detecção da mineralização por Vermelho Alizerina ou colorações von-Kossa juntamente com controles apropriados.

4.3.2 Avaliação da Modulação de Adipogênese por Superexpressão de Norrin

Norrin, agonistas de Norrin ou miméticos de Norrin podem ser adicionados a hMSCs por expressão usando-se vetores virais ou de outros tipos juntamente com meio de diferenciação adipogênica (isto é, meio de crescimento contendo 10 nM de dexametasona, 50 µg/mL de fosfato de ácido L-ascórbico, 500 µM de isobutilmetilxantina e 60 µM de indometacina) durante 1-3 semanas. O efeito de Norrin, agonistas de Norrin ou miméticos de Norrin sobre a modulação de adipócitos pode ser determinado pela alteração da expressão de genes marcadores adipogênicos (por exemplo, Adipsina) ou por coloração das células com reagente óleo vermelho O.

Alterações na expressão devidas à administração de agentes de teste podem ser realizadas usando-se tecnologia de arranjo de DNA. Essa tecnologia já é usada para testar obesidade e diabetes. Conseqüentemente, um aspecto seria a triagem de agentes de teste usando-se tecnologia de arranjo de DNA desenvolvida para obesidade. Veja, por exemplo, Nadler et al., 2000 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(21): 11371-11376, e os genes indicados por metabolismo lipídico, proteínas secretadas, assim como outros genes com expressão diminuída ou aumentada associados à obesidade. As células usadas juntamente com a tecnologia de arranjo de DNA podem ser células mesenquimais, adipócitos ou pré-adipócitos ou outras células aqui discutidas.

Alterações *in vivo* nos níveis de lipídios e a-

dipogênese podem ser medidas por vários testes diferentes. Sangue e soro podem ser coletados e analisados quanto à química sanguínea. Assim, miméticos de Norrin ou agonistas de Norrin podem ser triados quanto aos efeitos *in vivo*. Da mesma forma, inibidores de Dkk e/ou inibidores de Kremen podem ser triados quanto a seu impacto sobre a atividade de Norrin (na presença ou ausência de um agonista de Norrin) ou mimético de Norrin com o complexo LRP5/LRP6/Frizzled4.

4.3.3 Avaliação da Modulação de Osteogênese e Adipogênese por Desativação do Gene de Norrin

Com o uso de um meio osteogênico ou adipogênico, hMSCs se diferenciam em linhagens osteogênicas ou adipogênicas. RNAs em forma de grampo pequeno de Norrin, Frizzled4 ou LRP5 podem ser usados como um controle para demonstrar os efeitos intensificadores de Norrin e Frizzled4 na via e para mostrar o impacto que a inibição dessas proteínas tem sobre a adipogênese e osteogênese. Por exemplo, na presença de meio osteogênico e infecção do vetor viral contendo shRNA de Norrin, a transcrição do gene de Norrin pode ser bloqueada e a diferenciação de hMSCs em osteoblastos ou a produção de nódulos ósseos mineralizados que possam ser detectados por vários dos métodos acima indicados.

A desativação de gene em cultura de tecido e *in vivo* pode ser conseguida por análogos de DNA ou RNA espe-

cíficos para seqüência que possam bloquear a atividade de seqüências genéticas de fita simples selecionadas. Exemplos dessas abordagens incluem a tecnologia de oligonucleotídeos anti-sentido e a introdução de um RNA de fita dupla homólogo (dsRNA) ou RNA de interferência curto (siRNA), que também é chamada de silenciamento de gene pós-transcrição (PTGS) ou interferência de RNA (RNAi). Isso pode ser conseguido pela introdução na célula de siRNAs específicos para os mRNAs do gene alvo dados mediante shRNAs (RNAs em forma de grampo curto) usando-se vários vetores de distribuição de gene viral ou por transfecção de vetores plasmídicos. Métodos para a realização de interferência de RNA e silenciamento de gene são conhecidos conforme discutido, por exemplo, em Meister e Tuschl, 2004 "Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA," *Nature* 431: 343-349; Dorsett e Tuschl, 2005 "siRNAs: applications in functional genomics e potential as therapeutics," *Nat. Rev. RNA Interference Collection* 40-51, e referências aí citadas. Uma vez que o siRNA seja introduzido, a extensão da desativação do gene alvo é medida por técnicas padronizadas, incluindo qRT-PCR, Northern Blots para RNAs ou por Western blots para expressão de proteínas.

5. Kits Para Agentes de Teste que Modulam Norrin

Outro aspecto considera kits para teste de agentes que modulem a atividade de Norrin e, de preferência, para agentes que, mediante modulação da atividade de Norrin, modulem a via de Wnt. Esses kits podem ser usados para a triagem de miméticos de Norrin e agonistas de Norrin, assim como outros miméticos e agonistas do complexo LRP5/Norrin/Frizzled4.

Os kits considerados incluiriam células e ácidos nucléicos que codificam pelo menos Norrin e Frizzled4. De preferência, haveria ácidos nucléicos que codificam LRP5, Dkk (qualquer uma das Dkks), HBM e/ou Kremen (Kremen 1 e 2), assim como Norrin e Frizzled4 e/ou qualquer de suas combinações. LRP6 e Wnts também podem estar incluídas. Ácidos nucléicos que codificam os polipeptídeos acima estariam operacionalmente ligados a um vetor. O vetor também estaria de preferência incluído para fins de controle. Os kits poderiam ser planejados para uso de transfecção transitória ou para transfecção estável de células.

Alternativamente, os kits podem conter proteínas purificadas de quaisquer das proteínas acima para uso em sistemas de ensaio *in vitro*, como aqueles aqui descritos. Podem incluir substratos como nitrocelulose, placas ELSA ou outros substratos adequados.

Os kits incluiriam, de preferência, um sistema repórter apropriado para o ensaio, se de fosfatase alcalina, ou proteínas mais fluorescentes, e outras.

Em um aspecto, o kit poderia vir com linhagens
5 celulares congeladas para uso na triagem. Em outro aspecto, o kit poderia vir com instruções relacionado células apropriadas, previamente testadas, que sejam adequadas para os ensaios *in vitro* aqui descritos.

Em outro aspecto, o kit poderia vir com os vá-
10 rios repórteres, enzimas e reagentes necessários para detectar o repórter usado para detectar a modulação. Por exemplo, se for usado o sistema de ensaio TCF-luci e TK-renila, o kit poderia vir com TCF-luci e TK-renila luciferases e reagentes de detecção. Os kits também poderiam
15 vir com animais transgênicos, em que um cDNA para Dkk, Norrin, LRP5, LRP6, HBM, Kremen, Wnt e/ou Frizzled4 foi introduzido em um animal(ais). Os kits podem incluir uma série desses animais para elucidação da atividade de um reagente de teste particular.

20 6. Linhagens Celulares

Outro aspecto é a preparação de linhagens celulares que não expressem Norrin e/ou Frizzled4. Essas linhagens celulares podem ter, então, expressado de maneira transitória ou estável formas não nativas de LRP5, LRP6,
25 Frizzled, Norrin, Dkk, Kremen, Wnt e Norrin em qualquer das combinações aqui discutidas. Conseqüentemente, as li-

nhagens celulares podem ser usadas para a triagem de reagentes que sejam miméticos de Norrin ou agonistas de Norrin. Por exemplo, em uma linhagem celular que tenha formas não nativas (não endógenas) de LRP5 e Frizzled4 expressadas e seja desprovida de Norrin, não haveria meio pelo qual ativar a via de Wnt através do mecanismo de LRP5-Frizzled4-Norrin. Entretanto, com a introdução de um mimético de Norrin, as vias seriam ativadas. Essas linhagens celulares seriam controles úteis para a identificação de miméticos de Norrin. As células poderiam ter, então, transcritos não endógenos adicionais de Dkk e/ou Kremen introduzidos, com a triagem examinada para agentes de teste que modulem a interação de Dkk e/ou Kremen com o complexo Frizzled4-LRP5/6-Norrin. Usando-se esse processo, antagonistas de Dkk e/ou antagonistas de Kremen podem ser identificados. A introdução de Norrin não endógena em uma dessas linhagens livres de Norrin pode ser usada para avaliar agonistas de Norrin sobre a interação Norrin-LRP5-Frizzled4.

20 A expressão estável e transitória de ácidos nucleicos que codifiquem qualquer uma das proteínas ou seus fragmentos polipeptídicos biologicamente ativos pode ser realizada por meios conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, R. IAN FRESHNEY, *CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC*
25 *TECHNIQUE* (2000) e JOSEPH SAMBROOK E DAVID W. RUSSELL, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL* (3rd ed. 2001).

Células que não têm Norrin endógeno incluem, mas não se limitam a, células renais. Conseqüentemente, células renais proporcionam uma ferramenta útil para a triagem de miméticos de Norrin. Alternativamente, podem-se preparar linhagens celulares que estejam desativadas, em que um ou mais dos genes que codificam LRP5, LRP6, Norrin, uma Wnt, uma Dkk, uma Kremen e/ou Frizzled4 estão desativados, de modo que um polipeptídeo endógeno não possa mais ser sintetizado. Esse procedimento pode ser realizado em qualquer células, como, mas não limitadas a, adipócitos, pré-adipócitos, células mesenquimais, várias células ósseas e células renais.

Ficará claro para aqueles versados na técnica que várias modificações e variações podem ser feitas nos materiais e métodos aqui descritos, sem sair do espírito ou âmbito da invenção. Assim, pretende-se que a presente invenção cubra as modificações e variações desta invenção, contanto que estejam dentro do âmbito das reivindicações anexas e seus equivalentes.

20

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: Ensaio de Sinal de Norrin/Wnt-TCF

Isolamento do clone de Norrin. cDNA foi clonado por métodos de PCR padronizados a partir dos clones IMAGE. Especificamente, a seqüência de quadro de leitura aberta (ORF) de Norrin do NCBI (NM_000266) foi usada para buscar clones IMAGE disponíveis. O clone nº 5179578 foi

25

identificado como um cDNA de comprimento total previsto. O clone IMAGE foi adquirido na Open Biosystems (Huntsville, AL). O ORF foi amplificado por técnicas de PCR padronizadas usando-se os seguintes primers: 5'-
5 CATATGAATTCACCATGAGAAAACATGTACTAGCTGCATC-3' (SEQ ID NO:1)
(que traz um sítio *EcoRI* para clonagem, assim como um consenso Kozak imediatamente em 5' do ATG de iniciação), e 5'-GATATGCGGCCGCTCTAGATCAGGAATTGCATTCCCTCGCAGTG-3' (SEQ ID NO:2) (que traz tanto um sítio *XbaI*, quanto um *NotI* após
10 o códon de parada). O produto de PCR resultante foi digerido com *EcoRI* e *NotI* e clonado nos sítios *EcoRI* e *NotI* de pcDNA3.1 (Invitrogen). Isolados positivos foram identificados por digestão de restrição e confirmados por análise de seqüência de DNA quanto à correspondência à se-
15 quência publicada (N° de Acesso NM_000266).

Isolamento do clone de Kremen. O fragmento de comprimento total amplificado por PCR foi subclonado no vetor pcDNA3.1 nos sítios de enzima de restrição *EcoRI/BamHI*. A seqüência isolada foi, então, verificada
20 quanto à correspondência com a seqüência de Kremen2 humana publicada (N° de Acesso NM_172229/ AB086405.1 e NP_757384.1). O cDNA foi isolado do RNA total da linhagem celular U2OS do tipo osteoblasto humano. O RNA total de cerca de $2,5 \times 10^6$ células U2OS foi purificado usando-se o
25 kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA) segundo o protocolo do

fabricante. Isolado de cDNA de Kremen2 foi amplificado segundo métodos de PCR padronizados. Os primers de PCR usados foram:

5 primer 5': 5'-GGACGAATTCACCATGGGGACACAAGCCCTGCAG-
3' (SEQ ID NO:3)

primer 3': 5'-CTCGCTCATCTCCGCTCTCTGAGGATCCCAGG-3'
(SEQ ID NO:4). Fragmento de comprimento total amplificado por PCR foi subclonado no vetor pcDNA3.1 nos sítios de enzima de restrição *EcoRI/BamHI*, e a seqüência inteira
10 foi verificada quanto à correspondência com a seqüência de Kremen2 humana publicada (N° de Acesso NM_172229/AB086405.1, NP_757384).

Isolamento do clone de Dkk. Um cDNA humano com o número de acesso no GenBank AF127563 estava disponível
15 na base de dados pública. Usando-se essa seqüência, projetaram-se primers de PCR para amplificar o quadro de leitura aberto com uma seqüência de consenso Kozak imediatamente a montante do ATG de iniciação. Oligos 117162 (5'-CAATAGTCGACGAATTCACCATGGCTCTGGGCGCAGCGG-3'; SEQ ID NO:5)
20 e 117163 (5'-GTATTGCGCCGCTCTAGATTAGTGTCTCTGACAAGTGTGAA-3'; SEQ ID NO:6) foram usados para a triagem de uma biblioteca de cDNA de útero humano por PCR. O produto de PCR resultante foi purificado, subclonado em pCRII-TOPO (Invitrogen Corp.), teve sua seqüência verificada e foi digerido com *EcoRI/XhoI*. Esse enxerto foi subclonado no vetor
25 pCS2⁺ nos sítios *EcoRI-XhoI*.

Um cDNA de comprimento total codificando Dkk2 humana foi isolado para investigar a especificidade da interação Zmax/LRP5/HBM com a família de moléculas Dkk. Dkk1 foi identificada em levedura como um parceiro de ligação em potencial de Zmax/LRP5/HBM. Dkk1 também foi demonstrada na literatura como um antagonista da via de sinalização de Wnt, ao passo que Dkk2 não é (Krupnik et al., 1999). O cDNA de comprimento total de Dkk2 serve de ferramenta para discriminar a especificidade e significado biológico de interações Zmax/LRP5/HBM com a família Dkk (por exemplo, Dkk1, Dkk2, Dkk3, Dkk4, Soggy, seus homólogos e variantes e outros). Uma seqüência de cDNA humano para Dkk2 (Nº de Acesso no GenBank NM_014421) estava disponível na base de dados pública. Usando-se essa seqüência, projetaram-se primers de PCR para amplificar o quadro de leitura aberto com uma seqüência de consenso Kozak imediatamente a montante do ATG de iniciação. Oligos 51409 (5'-CTAACGGATCCACCATGGCCGCGTTGATGCGG-3'; SEQ ID NO:7) e (5'-GATTCGAATTCTCAAATTTTCTGACACACATGG-3'; SEQ ID NO:8) foram usados para a triagem de bibliotecas de cDNA de embrião e cérebro humano por PCR. O produto de PCR resultante foi purificado, subclonado em pCRII-TOPO, teve sua seqüência verificada e foi digerido com *Bam*HI/*Eco*RI. Esse enxerto foi subclonado no vetor pCS2⁺ nos sítios *Bam*HI-*Eco*RI. Para uma discussão adicional referen-

te a clones de Dkk1 e Dkk2, veja o Pedido Internacional PCT n° PCT/US02/15982. Construções similares para Dkk3 e Dkk4 podem ser preparadas usando-se as seqüências aqui mencionadas.

5 *Clones de LRP6 clones.* LRP6 de comprimento total foi isolado do vetor pED6dpc4 por digestão com *XhoI-XbaI*. O cDNA de comprimento total foi remontado nos sítios *XhoI-XbaI* de pCS2⁺. A orientação do enxerto foi confirmada por seqüenciamento de DNA.

10 *LRP5 (Zmax1) e HBM.* O cDNA de enxerto foi isolado dos construtos de retrovírus de cDNA de comprimento total (com seqüências de Kozak otimizadas) por digestão com *BglIII-EcoRI* e subclonado nos sítios *BamHI-EcoRI* do vetor pCS2⁺. Para maiores detalhes quanto a construtos de
15 LRP5 e HBM, veja a patente norte-americana n° 6.770.461 e o Pedido Internacional PCT n° PCT/US01/16946, intitulado "Regulação dos níveis de lipídios pelo gene de Zmax1 ou HBM".

Clones de Wnt. Os genes de Wnt utilizados nos
20 experimentos aqui mostrados foram obtidos da seguinte maneira. Dez cDNAs diferentes de Wnt de comprimento total foram adquiridos na Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY) no vetor pUSEamp(+). Os genes são: Wnt1 (Cat. No. 21-121), Wnt2 (Cat. No. 21-122), Wnt3 (Cat. No. 21-123),
25 Wnt3a (Cat. No. 21-124), Wnt4 (Cat. No. 21-125), Wnt5a

(Cat. No. 21-133), Wnt5b (Cat. No. 12-126), Wnt6 (Cat. No. 21-127), Wnt7a (Cat. No. 21-128) e Wnt7b (Cat. No. 21-129). Os enxertos foram liberados por digestão com *XbaI* e subclonados no sítio *XbaI* do vetor pCS105 para expressão em *Xenopus*. A orientação foi confirmada por análise de seqüência.

cDNA de Wnt11 de comprimento total foi isolado de 1×10^6 células de osteoblasto humanas (HOBs, passagem nº 13) por RT-PCR usando-se o Kit GCRich (Clontech, Mountain View, CA) e os seguintes primers específicos: (Direto): 5'-GGGAATTCGCGACGATGAGGGCGCGGCCGCA-3' (SEQ ID NO:9) (inclui o sítio *EcoRI*) e (Reverso): 5'-GGGCGGCCGCGAGGGCCTCACTTGCAGACATAGC-3' (SEQ ID NO:10) (inclui o sítio *NotI*). O fragmento de DNA gerado por RT-PCR foi digerido com *EcoRI* e *NotI* e enxertado nos sítios criados *EcoRI* e *NotI* do vetor pcDNA3.1. A seqüência de comprimento total foi verificada quanto à correspondência à seqüência de Wnt11 publicada (Nº de Acesso Y12692).

cDNAs de comprimento total para outros genes de *Wnt* podem ser obtidos por técnicas de PCR padronizadas a partir de várias fontes de bibliotecas de cDNA humano, usando-se a seqüência pública para projetar primers para a amplificação do quadro de leitura aberto do gene e facilitar a suclonagem no vetor pCS105 ou vetor de mamífero do tipo pcDNA3.1 ou outro vetor de mamífero adequado.

Primers adequados para outros genes de *Wnt* são apresentados na Tabela 1 abaixo. "F" significa primer "direto" e "R" primer "reverso".

		TABELA 1		
Oligo		Seqüência		SEQ
No.				ID NO
		Wnt 10b - N° de Acesso U81787		
51304	F	5-CTAACGGATCCACCATGCTGGAGGAGCCCCG-3		11
51306	R	5-GATTCGAATTCTCACTTACACACATTCACCC-3		12
		Wnt 10a - N° de Acesso AY009400		
118978	F	5-CTAACGGATCCACCATGGGCAGCGCCCACCC-3		13
118977	R	5-GATTCGAATTCTCACTTGCAGACGCTGACC-3		14
		Wnt16a - N° de Acesso AF169963		
51294	F	5-CTAACGGATCCACCATGGAAAGGCACCCACCC-3		15
51296	R	5-GATTCGAATTCTTACTTGCAAGTGTGGACATC-3		16
		Wnt16 - N° de Acesso AF152584		
51298	F	5-CTAACGGATCCACCATGGACAGGGCGGGCGCTC-3		17
51296	R	5-GATTCGAATTCTTACTTGCAAGTGTGGACATC-3		18
		Wnt8d - N° de Acesso AY009402)		
51300	F	5-CTAACGGATCCACCATGGGGGAACCTGTTTATGC-3		19
51302	R	5-GATTCTCTAGACTAGATATAGACCCCAAACC-3		20
		Wnt8b - N° de Acesso Y11094		
118973	F	5-CTAACGGATCCACCATGTTTCTTTCAAAGCCTTCTGTG-3		21
118980	R	5-GATTCGAATTCTTAGGGTTTCTCCCGGGTTTG-3		22
		Wnt2b2 - N° de Acesso AB045117		
118979	F	5-CTAACGATTCAACATGCTGAGACCGGGTGGTG-3		23
118974	R	5-GATTCTCTAGATCAGGTCTGGTCCAGCCAC-3		24
		Wnt2b1 - N° de Acesso AB045116		
118975	F	5-CTAACTCTAGAATGTTGGATGGCCTTGGAG-3		25
118976	R	5-GATTCTCTAGATCAGGTCTGGTCCAGCCAC-3		26

5

Ensaio Repórter. O ensaio TCF envolve um repórter 16x-TCF (contendo 16 cópias do elemento TCF sensível ao sinal de Wnt-beta-catenina com promotor TK basal) e

gene de Luciferase. O construto contém 16 cópias dos sítios de ligação a TCF localizados a montante de um promotor TK mínimo (timidina quinase) e gene de luciferase no vetor pGL3 (Promega, Madison, WI). A seqüência dos quatro

5 sítios de ligação a TCF (vejas as seqüências pareadas abaixo) foi gerada por abordagem de síntese de oligonucleotídeos e contém a seguinte seqüência com sítios de enzimas de restrição *NheI* e *XhoI* nas extremidades 5' e 3', respectivamente. Os domínios sublinhados indicam os sítios de ligação a TCF. Apresentam-se ambas as fitas.

10 Quando as duas fitas são aneladas, sítios de restrição compatíveis *NheI* (5') e *XhoI* (3') são introduzidos para clonagem adicional e contém sítios de ligação a TCF (SEQ ID NOS: 27 e 28 respectivamente):

15 5'-CTAGCGAGAACAAAGGAGATTCAAAGGAGATCAAAGGAGATCAAAGGACTAGTTC-3'
 3'-TCGAGAACTAGTCCTTTGATCTCCTTTGATCTCCTTTGAATCTCCTTTGTTCTCG-5'

TK-renila (Promega Corp., WI) como controle de normalização de ensaio interno; e construtos baseados no vetor pcDNA de cDNAs de *Norrin*, *Wnt1*, *Wnt3a*, *Dkk1* e *Kremen2* conforme acima discutidos, e um construto de *Frizzled4* (Origene Tech. Inc.; Rockville, MD) também fazem

20 parte do ensaio. Pode-se substituir por outros vetores capazes de expressar diferentes formas de *Norrin*, *Wnt1*, *Wnt3a*, *Dkk1* e *Kremen2* de vertebrados.

25 Os clones individualmente contendo esses genes são co-transfectados em células Renais Embrionárias Huma-

nas (HEK)-293A (ATCC, Manassas, VA) ou em uma linhagem celular do tipo osso/osteoblasto derivada de osteossarcoma humano, U2OS (ATCC). As células foram cultivadas em Meio Essencial Mínimo de Dulbecco (DMEM) (Invitrogen) ou
5 meio RPMI (Invitrogen) suplementado com 10% de soro bovino fetal termicamente inativado (FBS), 1% de glutamax (Invitrogen) e 1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen).

Células HEK-293A (50.000 células por poço) ou
10 células U2OS (25.000 células por poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação depois do plaqueamento (aproximadamente 80-90% confluentes), o meio foi substituído com 100 µL de meio OPTIM livre de soro fresco (Gibco/BRL). Ambos os tipos de células foram
15 transfectadas com 16x-TCF(TK)-Luciferase de Vaga-lume (0,3 µg/poço) e TK-Renila-luciferase (0,06 µg/poço) usando-se o reagente de transfecção Lipofectamine 2000 (Promega; Madison, WI) de acordo com as instruções do fabricante. Os experimentos foram realizados em duplicata.

20 Os construtos de cDNA de teste foram transfectados a diferentes concentrações, conforme necessário. Cerca de 0,0005 µg/poço a 0,05 µg/poço de cDNA de cada um dos construtos foram usados. A transfecção foi realizada com Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) de acordo com as
25 instruções do fabricante. A mistura de DNA e o reagente foram incubados durante 30 min. 50 µL/poço da mistura de

DNA-reagente foram adicionados aos 100 μ L de meio OPTIM. As células foram, então, cultivadas durante quatro horas a 37°C. O meio de transfecção foi substituído por 150 μ L de meio DMEM ou RPMI nas células HEK 293A e U2OS, respectivamente. Após 20-24 horas de incubação a 37°C em um incubador de CO₂, o meio foi removido. As monocamadas de células transfectadas foram lisadas pela adição de 150 μ L de 1X tampão de lise Dual Luci Reagent (Promega Corp.).

Depois de 10 minutos, 20 μ L do lisado foram transferidos para uma nova placa branca de 96 poços (Packard/Costar). Os lisados de células foram misturados com 100 μ L/poço de tampão LARII (Dual Luci Reagent), e as Unidades de Luciferase Relativas (RLUs) foram medidas usando-se um contador de luminescência Packard Topcount NXT™ (Meriden, CT). Isso foi seguido pela adição de 100 μ L/poço de reagente "stop & glo" (Dual Luci Reagent), e a renila luciferase de controle de ensaio interno foi medida usando-se o contador de luminescência Packard Topcount NXT™.

A razão de TCF-luciferase de vaga-lume para renila foi calculada e é apresentada como gráficos de barras nas FIGS. 1-4. Os experimentos foram feitos em quadruplicata, com os desvios padrão calculados para o grau de erro mostrado.

A FIG. 1 indica que, quando o cDNA de Norrin era transfectado em células U2OS humanas, proporcionava

uma indução de aproximadamente 2 a 3 vezes (barra inclinada rosa) do sinal de TCF na ausência de transfecção com cDNA de Wnt. Entretanto, as células HEK-293A transfectadas não produziram nenhuma ativação significativa do sinal de TCF. A FIG. 1 também mostra que a co-transfecção de Norrin e LRP5, um de seus co-receptores em células HEK-293A, não ativou o sinal de TCF (barra quadriculada roxa).

Interessantemente, quando os vetores contendo os genes para Norrin (Nr) ou LRP5 (L5) eram co-transfectadas em células U2OS, o sinal de TCF era intensificado. Os materiais e métodos foram utilizados conforme acima descrito. Veja a FIG. 1, lado direito. Quando tanto Norrin, quanto LRP5 eram co-transfectadas em células U2OS, o sinal de TCF era sinergicamente intensificado (barra mais à direita, FIG. 1) - aproximadamente 6 vezes mais que apenas vetor (controle). Como Norrin requer o receptor de Frizzled4 (Fz4), além do co-receptor de LRP5/6, os dados indicam que as células U2OS contêm Fz4, ao passo que as células HEK-293A são desprovidas de Fz4. Sem Fz4, Norrin não pode induzir o sinal de TCF e, portanto, a falta de resposta nas células HEK-293A (lado esquerdo da FIG. 1).

EXEMPLO 2: Fz4 é Requerida Para Sinalização de Norrin

Para avaliar a interação Fz4-Norrin, os cDNAs de Fz4 e LRP5 foram transfectados em ambos os tipos de células que também foram transfectados com Norrin. As transfecções foram realizadas conforme acima discutido no Exemplo 1. A detecção de TCF foi realizada, e os construtos foram usados conforme discutido no Exemplo 1. Os dados foram obtidos em quadruplicata, com a análise estatística sendo um cálculo do desvio padrão.

As células HEK-293A mostram que não há nenhuma resposta de TCF para apenas vetor (V), apenas LRP5 (L5), apenas Fz4 (F4) ou LRP5 e Norrin (L5+Nr). A adição de Norrin e Fz4 (F4+Nr) proporciona um aumento de aproximadamente 6 vezes no TCF com relação a vetor ou Fz4 apenas. Os dados na FIG. 2 demonstram que, em células HEK-293A, a Fz4 funcional era o fator limitativo para a ativação do sinal de Norrin-TCF. Também indicam que, em células HEK-293A, a interação Norrin-Fz4 provavelmente utiliza os receptores de LRP5/6 endógenos das células. Além disso, a co-transfecção de LRP5 juntamente com Fz4 e Norrin (L5+F4+Nr) em células HEK-293 resulta em uma intensificação adicional do sinal de TCF, até 16 vezes com relação a células HEK293A transfectadas com apenas LRP5 (L5) e apenas Norrin (Nr). Veja o lado esquerdo da FIG. 2.

Em contraste, os mesmos testes foram conduzidos com células U2OS. As células U2OS proporcionaram uma atividade de TCF significativamente maior por co-transfecção

de Fz4 e Norrin (F4+Nr) com relação a apenas vetor (V), apenas LRP5 (L5), apenas Frizzled4 (F4) e células U2OS co-transfectadas com LRP5 e Norrin (L5+Nr). Veja a FIG. 2. A resposta em células U2OS foi adicionalmente intensificada quando Fz4, LRP5 e Norrin (F4+L5+Nr) foram todas co-transfectadas nas células (de cerca de 2 vezes a cerca de 6 vezes). Esses dados em células U2OS provavelmente indicam a presença de componentes de sinal de Wnt endógenos, incluindo receptores de Fz4 e LRP5/6.

10 EXEMPLO 3: O Sinal de LRP5-Fz4-TCF Induzido por Norrin Pode ser Inibido Sinergicamente por Dkk1 e Kremen2 em Células U2OS

As células U2OS foram transfectadas ou co-transfectadas com vetor em branco (V), LRP5 (L5), Frizzled4 (Fz4), Norrin (Nr), Kremen2 (Krm2) ou Dkk1, conforme indicado na FIG. 3, de acordo com os procedimentos de ensaio apresentados no Exemplo 1. Os resultados foram obtidos em quadruplicata, e o desvio padrão foi calculado a partir deles.

20 A FIG. 3 apresenta a razão de modulação do sinal de TCF-luci para renila em ensaios U2OS-TCF quando transfectados com os vários construtos de cDNA. No lado direito da FIG. 3, as barras indicam que a transfecção de LRP5 (L5), Fz4 (Fz4) ou Norrin (Nr) proporcionou uma
25 indicação de 2 a 5 vezes com relação ao controle de vetor. Entretanto, a co-transfecção tanto de Fz4, quanto

de Norrin (Fz4 + Nr) resultaram em uma indução de 15 vezes do sinal de TCF.

O efeito de Fz4 e Norrin foi adicionalmente intensificado pela expressão do cDNA de LRP5 (L5) (isto é, barra mais alta e mais escura). A atividade máxima de Fz4+Nr+L5 foi inibida parcialmente pela co-transfecção das células com Dkk1. Quando tanto Dkk1, quanto Krm2 foram adicionados às células co-transfectadas com LRP5, Fz4 e Norrin (L5+Fz4+Nr), o sinal de TCF foi quase completamente inibido (lado direito, barra mais à direita).

Os resultados apresentados na FIG. 3 indicam que o sinal de TCF mediado por Norrin-LRP5-Fz4 pode ser inibido por Dkk1. Dkk1 é considerada um inibidor eficiente da via canônica de Wnt induzida por Wnt-LRP5-Fz. Interessantemente, a adição de Kremen2 (Krm2) faz sinergia com Dkk1 e, por sua vez, resultou no bloqueio da ação de Norrin de intensificação da via de Wnt.

EXEMPLO 4: Sinais de TCF Mediados por Norrin com HBM e LRP5 São Diferencialmente Inibidos por Dkk1 e Kremen2

Uma comparação da modulação do sinal de Norrin-TCF por LRP5 ou seu mutante de ganho de função, HBM, foi estudada em células U2OS transfectadas com cDNA. Os resultados são apresentados na FIG. 4. A transfecção de células U2OS com cDNA de HBM forneceu um sinal de TCF li-

geiramente maior do que com a transfecção com cDNA de LRP5. Veja o lado esquerdo da FIG. 4, que mostra apenas vetor (V), apenas LRP5 (L5), apenas HBM (H), apenas Frizzled4 (Fz4) e Norrin (Nr). As construções e condições são
5 conforme descritas para o Exemplo 1. O experimento foi realizado em quadruplicata, com o o padrão de erro calculado a partir dele.

A co-transfecção das células U2OS com Norrin e Fz4, assim como LRP5 (Nr+Fz4+L5) ou HBM (Nr+Fz4+H), re-
10 sultou em sinal de TCF máximo tanto com cDNAs de LRP5, quanto de HBM, isto é, cerca de 25 vezes com relação à atividade basal. A co-transfecção de Dkk1 com Norrin, Frizzled4, LRP5 ou as combinações de Norrin, Frizzled4 e HBM resultou em um ainibição de cerca de 38-40% do sinal
15 de TCF. A inibição por Dkk1 foi adicionalmente intensificada com a adição de Kremen2 (Krm2). Veja o lado direito da FIG. 2, duas barras mais à direita.

A análise comparativa do sinal de Norrin-TCF implica que o sinal de Norrin-Fz4-TCF mediado por LRP5
20 mutação G171V confere uma resistência parcial da ação inibidora de Kremen2 e Dkk1. Essa observação interessante é muito similar aos resultados anteriormente observados com o sinal de TCF mediado por Wnt3a e Wnt1 com LRP5 e HBM na presença de Dkk1 e Kremen2. Relatou-se que a sina-
25 lização de LRP5-Wnt-TCF modula a osteogenese, ao passo que a mutação HBM leva a um fenótipo de alta massa óssea

em seres humanos e em camundongos transgênicos. Com base nesses resultados, é provável que Norrin, como um ligante mais específico do complexo LRP5-Fz4 do que Wnts, desempenhe um papel significativo no metabolismo ósseo.

5 Em cada um dos exemplos acima, Dkk1 pode ser substituído por Dkk2, Dkk3 e/ou Dkk4. Além disso, nos exemplos que usam Kremen2, entende-se que esta poderia ser substituída por Kremen1, que seria usada da mesma maneira. Além disso, as proteínas ou polipeptídeos biologicamente ativos podem ser introduzidos por co-transfecções
10 ou pela adição da proteína purificada e/ou meios condicionados contendo a proteína e/ou polipeptídeos biologicamente ativos.

 Com os dados *in vitro* acima discutidos, demonstrou-se que Norrin intensifica a via canônica de Wnt mediada por LRP5-Frizzled4 por ativação do repórter TCF e células ósseas U2OS e não em células HEK-293A sem a transfecção da sincells without the transfection of Frizzled4. A sinalização de Wnt mediada por LRP5 é importante
15 na formação/manutenção óssea, conforme evidenciado pelo fenótipo de alta massa óssea ("HBM") na mutação LRP5-G171V em seres humanos e animais transgênicos. Os dados também mostram que o sinal de TCF mediado por Norrin na presença do mutante LRP5-G171V (HBM) é menos sensível à
20 inibição mediada por Dkk1, em comparação com LRP5. Com a hipótese de que uma inibição diminuída devido à mutação
25

G171V em LRP5 seja uma das causas do fenótipo HBM, esperaríamos que a Norrin, sua expressão, sua indução e/ou miméticos de Norrin pudessem intensificar a formação ou manutenção óssea *in vivo*. Assim, uma desativação de Norrin *in vivo* poderia mostrar osteopenia. Os ensaios acima são ensaios representativos para uso na triagem, entre outros, de miméticos de Norrin, agonistas de Norrin e agonistas de Frizzled4.

Todas as referências aqui citadas são incorporadas por referência em sua inteireza para todas as finalidades.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de identificação de um agente que module ossos ou um lipídio, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

5 (a) a colocação de uma proteína Frizzled4 ou um fragmento polipeptídico de Frizzled4 biologicamente ativo com uma proteína LRP5 ou uma proteína LRP5 biologicamente ativa na presença do agente; e

(b) a determinação de se o dito agente interage
10 com Frizzled4 ou fragmento polipeptídico biologicamente ativo de Frizzled4 e/ou LRP5 ou fragmento polipeptídico biologicamente ativo de LRP5 e modula pelo menos um parâmetro de osso e/ou um lipídio.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1,
15 **caracterizado** pelo fato de que a proteína Frizzled4 ou fragmento polipeptídico biologicamente ativo de Frizzled4 está ligado à proteína LRP5 ou fragmento polipeptídico biologicamente ativo de LRP5.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1,
20 **caracterizado** pelo fato de que o agente é um mimético de Norrin.

4. Método de identificação de um agente que module o metabolismo ósseo ou metabolismo lipídico, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(a) a colocação de uma proteína Norrin ou um fragmento polipeptídico de Norrin biologicamente ativo e uma proteína Frizzled4 ou um fragmento polipeptídico biologicamente ativo de Frizzled4 fusionado a proteínas LRP5 e/ou LRP6 ou fragmentos polipeptídicos biologicamente ativos de LRP5 e/ou LRP6 na presença do agente; e

(b) a medição de pelo menos um parâmetro de modulação óssea e/ou modulação lipídica para identificar o agente que module metabolismo ósseo ou metabolismo lipídico.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 4, **caracterizado** pelo fato de que o parâmetro de modulação óssea é um de densidade óssea, resistência óssea, número de trabéculas, tamanho do osso ou conectividade do tecido, ou qualquer de suas combinações.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o parâmetro de modulação lipídica é uma alteração no nível de HDL, VLDL, colesterol, triglicerídeos, apoE ou LDL.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 4, **caracterizado** pelo fato de que o parâmetro ósseo medido é a expressão alterada de uma ou mais de COX-2, Jun, Fos, ciclina D1, Wnt10B, SFRP1, conexina 43, eNOS, Wnt10B, ciclina D1, Frizzled2, e a WISP2 é modulada.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que o parâmetro ósseo medido é a expressão alterada de uma ou mais de COX-2, Jun, Fos, ciclina D1, Wnt10B, SFRP1, conexina 43, e eNOS é modula-
5 da.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 4, **caracterizado** adicionalmente pelo fato de que compreende uma proteína Dkk ou um fragmento polipeptídico de Dkk biologicamente ativo.

10 10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 4, **caracterizado** adicionalmente pelo fato de que compreende uma proteína Kremen ou um fragmento polipeptídico de Kremen biologicamente ativo.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10,
15 **caracterizado** adicionalmente pelo fato de que compreende uma proteína Dkk ou um fragmento polipeptídico de Dkk biologicamente ativo.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 4, **caracterizado** adicionalmente pelo
20 fato de que compreende uma proteína Wnt ou um fragmento polipeptídico de Wnt biologicamente ativo.

13. Método de identificação de um agente que module a atividade de Norrin-Frizzled4, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(a) a colocação do agente, uma proteína Norrin ou fragmento polipeptídico biologicamente ativo de Norrin e uma proteína Frizzled4 ou fragmento polipeptídico biologicamente ativo de Frizzled4 fusionado a LRP5 e/ou LRP6 ou fragmento polipeptídico biologicamente ativo de LRP5 e/ou LRP6, ou fusionada a um domínio de ligação a ligante (LBD) contendo um fragmento polipeptídico de LRP5, e:

(i) uma proteína Kremen; e/ou

(ii) uma proteína Dkk; e

(b) a determinação de se o agente modula uma atividade de Norrin-Frizzled4.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que o agente é um mimético de Norrin, antagonista de Dkk ou um antagonista de Kremen.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 4, ou 13, **caracterizado** pelo fato de que uma ou mais proteínas estão fixadas em um substrato.

16. Método de identificação de um agente que regule a modulação óssea ou modulação lipídica, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(a) a administração do agente a uma célula que expresse Frizzled4 e LRP5, em que Frizzled4 é uma proteína Frizzled4 ou um polipeptídeo de Frizzled4 biologicamente ativo, e LRP5 é uma proteína LRP5 ou um polipeptídeo biologicamente ativo de LRP5;

(b) a determinação de se a dita administração do agente modula uma interação LRP5-Frizzled4; e

(c) a determinação de se o agente modula um parâmetro ósseo ou parâmetro lipídico.

5 17. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que o agente é um mimético de Norrin, a antagonista de Dkk ou um antagonista de Kremen.

18. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que a célula não expressa Nor-
10 rin.

19. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que a célula expressa uma Frizzled4, LRP5 e/ou Norrin não endógena.

20. Método de identificação de um agente que
15 regule modulação óssea ou modulação lipídica, **caracteri-**
zado pelo fato de que compreende:

(a) a administração do agente a uma célula que expresse LRP5, Norrin e Frizzled4, em que LRP5 é uma proteína LRP5 ou um polipeptídeo de LRP5 biologicamente ati-
20 vo, Norrin é uma proteína Norrin ou um polipeptídeo de Norrin biologicamente ativo, e Frizzled4 é uma proteína Frizzled4 ou um polipeptídeo biologicamente ativo de Frizzled4;

(b) a determinação de se a dita administração
25 do agente modula a interação Norrin-Frizzled4; e

(c) a determinação de se o agente modula um parâmetro de modulação óssea ou modulação lipídica.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que a célula expressa uma Norrin, LRP5 e/ou Frizzled4 não endógena.

22. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que a célula não expressa uma Norrin endógena.

23. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que o agente é um mimético de Norrin, a antagonista de Dkk ou um antagonista de Kremen.

24. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que LRP5 é co-expressada como um polipeptídeo de fusão com Frizzled4.

25. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que as células são células de vertebrados.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que as células são células ósseas, células renais, células mesenquimais, adipócitos, pré-adipócitos ou células de *Xenopus*.

27. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que o parâmetro de modulação lipídica é uma alteração no nível de HDL, VLDL, colesterol, apoE e/ou LDL, ou qualquer de suas combinações.

28. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que o parâmetro de modulação óssea é densidade óssea, resistência óssea, número de trabéculas, tamanho do osso ou conectividade do tecido, ou qualquer de suas combinações.

29. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que o parâmetro de modulação óssea é expressão alterada induzida por administração do agente de um ou mais de COX-2, Jun, Fos, ciclina D1, Wnt10B, SFRP1, conexina 43, eNOS, Wnt10B, ciclina D1, Frizzled2, e WISP2 é modulada pela administração do agente.

30. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que o parâmetro de modulação óssea é expressão alterada induzida por administração do agente de um ou mais de COX-2, Jun, Fox, ciclina D1, Wnt10B, SFRP1, conexina 43 e eNOS.

31. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que outra série de células co-expressa Norrin-Frizzled4 e Dkk, e determinação de se o dito agente modulação a inibição por Dkk de Norrin-Frizzled4.

32. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que outra série de células co-expressa Norrin, Frizzled4 e Kremen, e determinação de se

o dito agente modula a inibição por Kremen de Norrin-Frizzled4.

33. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que outra série de células expressa Norrin, Frizzled4, Kremen e Dkk, e determinação de se o dito agente modula a inibição por Kremen e/ou Dkk de Norrin-Frizzled4.

34. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de que outra série de células expressa Norrin, Frizzled4, Wnt e Dkk, e determinação de se o dito agente modula a inibição por Dkk de Norrin-Frizzled4.

35. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9, 11, 13, 14, 17, 23, 31, 33, ou 34, **caracterizado** pelo fato de que a Dkk é Dkk1, Dkk2, Dkk3 ou Dkk4, ou um polipeptídeo biologicamente ativo de Dkk1, Dkk2, Dkk3 ou Dkk4.

36. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10, 32 e 33, **caracterizado** pelo fato de que Kremen é Kremen1 ou Kremen2, ou um polipeptídeo biologicamente ativo de Kremen1 ou Kremen2.

37. Método, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** adicionalmente pelo fato de que compreende a triagem do agente quanto à intensificação da atividade de LRP5 nas células.

38. Método, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que as células são células ósseas, adipócitos, pré-adipócitos, células tronco, ou células renais.

5 39. Método, de acordo com a reivindicação 38, **caracterizado** pelo fato de que as células ósseas são células KHOS/NP, células KHOS-240S, células KHOS-321H, células DSDh, células VA-ES-BJ, células 7F2, células U2OS, células HOSTE85, células ROS, células MC3T3-E6, células
10 UMR-106, células Saos2, células MG63 ou células HOB.

40. Método, de acordo com a reivindicação 41, **caracterizado** pelo fato de que as células ósseas são células U2OS.

41. Método, de acordo com a reivindicação 38,
15 **caracterizado** pelo fato de que as células tronco são células tronco mesenquimais e células C3H10T1/2.

42. Método, de acordo com a reivindicação 41, **caracterizado** pelo fato de que as células tronco mesenquimais são células tronco mesenquimais adultas humanas.

20 43. Método, de acordo com a reivindicação 38, **caracterizado** pelo fato de que as células renais são células HEK293A ou células HEK293T.

44. Método, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** adicionalmente pelo fato de que compreende
25 a etapa de administração do agente a um animal, e a de-

terminação de se o dito agente induz uma alteração na massa óssea do dito animal.

45. Método, de acordo com a reivindicação 44, **caracterizado** pelo fato de que o dito animal é um animal transgênico.

46. Método, de acordo com a reivindicação 44, **caracterizado** pelo fato de que o dito animal transgênico é um animal transgênico LRP5 ou HBM.

47. Método, de acordo com a reivindicação 44, **caracterizado** pelo fato de que o animal transgênico é um animal com desativação de Norrin ou um animal com desativação de Frizzled4.

48. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 44-47, **caracterizado** pelo fato de que o dito animal é um camundongo.

49. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12, 34 e 47, **caracterizado** pelo fato de que Wnt é Wnt 1 a Wnt 19.

50. Método, de acordo com a reivindicação 49, **caracterizado** pelo fato de que Wnt é Wnt1, Wnt3, Wnt3a ou Wnt10b.

51. Kit para identificar um agente que module a atividade de LRP5-Norrin-Frizzled4, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

(a) uma série de células incapazes de expressar

Norrin que sejam co-transfectadas com ácidos nucleicos que codifiquem Frizzled4 e LRP5 ou fragmentos polipeptídicos biologicamente ativos de Frizzled4 e LRP5;

5 (b) opcionalmente, um ácido nucleico de Dkk para co-expressão em uma série de células que co-expressem Frizzled4 e LRP5 ou seus fragmentos polipeptídicos biologicamente ativos;

10 (c) opcionalmente, um ácido nucleico de Kremen para co-expressão em uma série de células que co-expressem Frizzled4 e LRP5 ou seus fragmentos polipeptídicos biologicamente ativos, e/ou para co-expressão em uma série de células que co-expressem Frizzled4, LRP5, e Dkk ou seus fragmentos polipeptídicos biologicamente ativos;

15 (d) opcionalmente, um ácido nucleico de LRP6 para co-expressão em uma série de células que co-expressem Frizzled4 e LRP5, ou seus fragmentos polipeptídicos biologicamente ativos; e

20 (e) opcionalmente, um ácido nucleico de Wnt para co-expressão em uma série de células que co-expressem Frizzled4 e LRP5, ou seus fragmentos polipeptídicos biologicamente ativos.

25 52. Kit, de acordo com a reivindicação 51, **caracterizado** pelo fato de que as células são células de vertebrados.

53. Kit, de acordo com a reivindicação 51, **caracterizado** adicionalmente pelo fato de que compreende um sistema repórter para medir a modulação da atividade de LRP5-Norrin-Frizzled4.

5 54. Kit, de acordo com a reivindicação 51, **caracterizado** pelo fato de que Dkk é Dkk1, Dkk2, Dkk3 ou Dkk4, e Kremen é Kremen1 ou Kremen2.

55. Kit, de acordo com a reivindicação 52, **caracterizado** pelo fato de que as células de vertebrados
10 são células ósseas, adipócitos, células renais, células de *Xenopus* ou células tronco.

56. Kit, de acordo com a reivindicação 55, **caracterizado** pelo fato de que as células ósseas são células KHOS/NP, células KHOS-240S, células KHOS-321H, células DSDh, células VA-ES-BJ, células 7F2, células U2OS,
15 células HOSTE85, células ROS, células MC3T3-E6, células UMR-106, células Saos2, células MG63 e células HOB.

57. Kit, de acordo com a reivindicação 55, **caracterizado** pelo fato de que as células renais são células HEK293A ou células HEK293T.
20

58. Kit, de acordo com a reivindicação 55, **caracterizado** pelo fato de que as células tronco são células tronco mesenquimais e células C3H10T1/2.

59. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 55 e 56, **caracterizado** pelo fato de que as
25

células ósseas são células U2OS.

60. Kit, de acordo com a reivindicação 51, **caracterizado** pelo fato de que Wnt é Wnt 1 a Wnt 19.

61. Kit, de acordo com qualquer uma das reivindicações 51 e 60, **caracterizado** pelo fato de que Wnt é Wnt1, Wnt3, Wnt3a ou Wnt10b.

62. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, 13, 16, ou 20, **caracterizado** pelo fato de que compreende a etapa de determinação de se o agente modula um lipídio em um vertebrado.

63. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, 13, 16, ou 20, **caracterizado** pelo fato de que compreende a etapa de determinação de se o agente modula ossoem um vertebrado.

64. Célula ou linhagem celular desprovida de Norrin nativo e que expresse uma LRP5 não nativa e uma Frizzled4 não nativa, **caracterizada** pelo fato de que a LRP5 não nativa é uma proteína LRP5 não nativa ou a seu fragmento biologicamente ativo e a Frizzled4 não nativa é uma proteína Frizzled4 não nativa ou seu fragmento biologicamente ativo.

65. Linhagem celular, de acordo com a reivindicação 64, **caracterizada** pelo fato de que a LRP5 não nativa e/ou a Frizzled4 não nativa são expressadas de maneira estável.

66. Linhagem celular, de acordo com a reivindicação 64, **caracterizada** adicionalmente pelo fato de que expressa uma Dkk não nativa e/ou uma Kremen não nativa ou fragmentos polipeptídicos biologicamente ativos de uma Dkk não nativa ou Kremen não nativa.

67. Linhagem celular, de acordo com a reivindicação 64, **caracterizada** pelo fato de que a Dkk não nativa é Dkk1, Dkk2, Dkk3 ou Dkk4 e a Kremen não nativa é Kremen1 ou Kremen2.

FIG. 1

Ratio of TCF-Luci/Renilla = Razão de TCF-Luci/Renila

HEK-293A cells = células HEK-293A

U2OS cells = células U2OS

Vector = Vetor

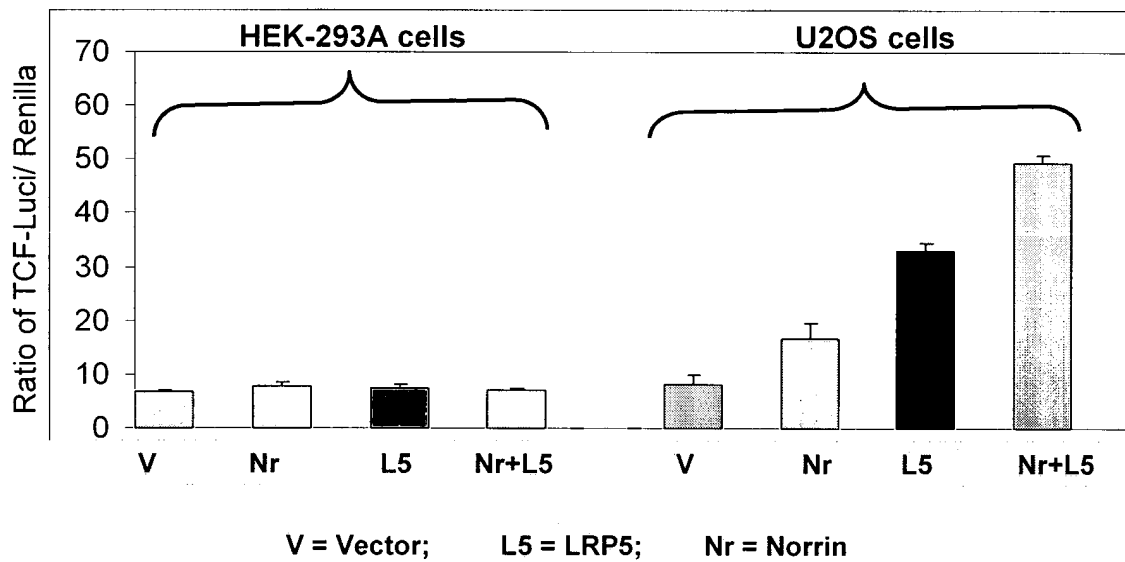


FIG. 2

Ratio of TCF-Luci/Renilla = Razão de TCF-Luci/Renila

HEK-293A cells = células HEK-293A

U2OS cells = células U2OS

Vector = Vetor

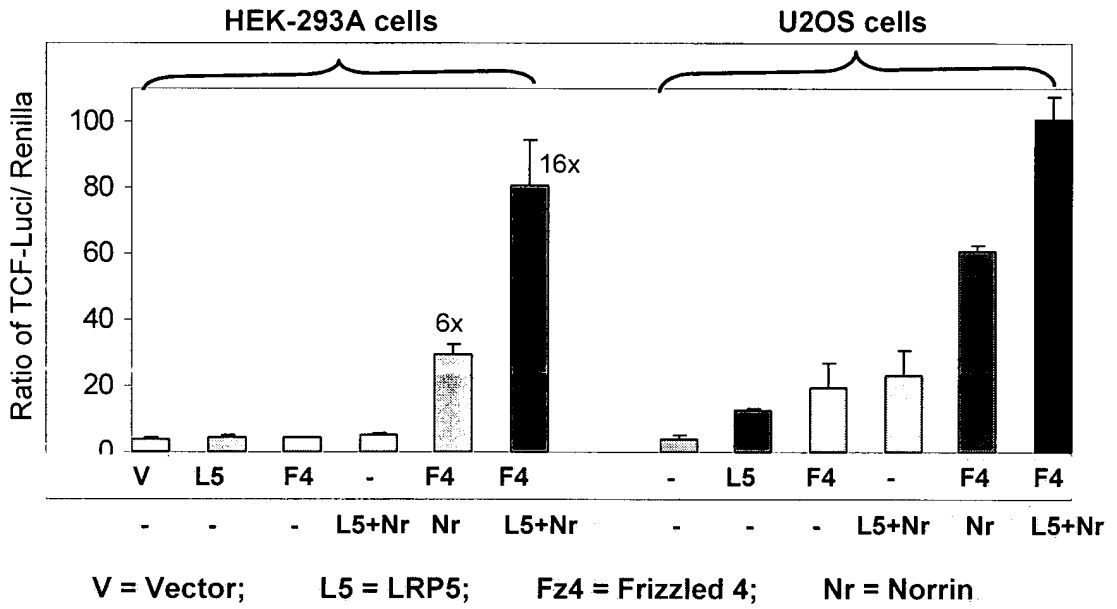
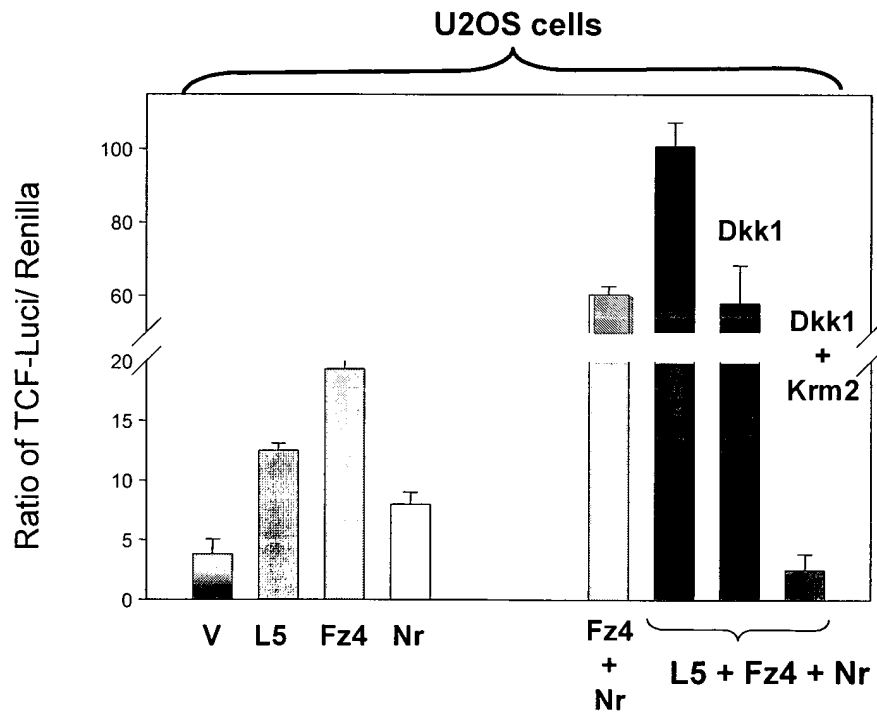


FIG. 3

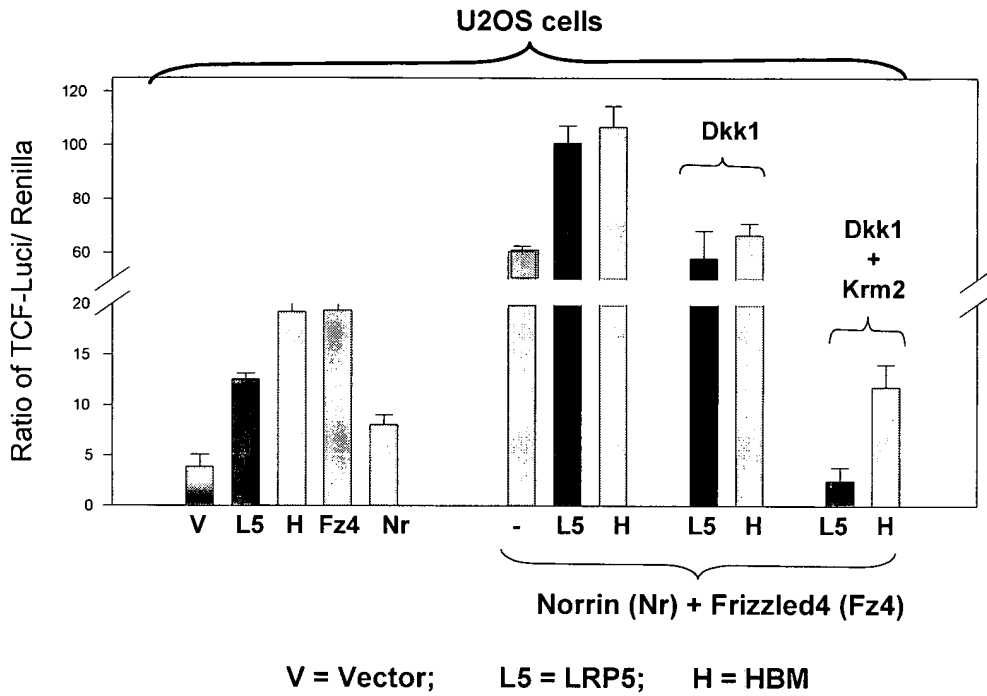
Ratio of TCF-Luci/Renilla = Razão de TCF-Luci/Renilla
 U2OS cells = células U2OS
 Vector = Vetor



V = Vector; L5 = LRP5; Fz4 = Frizzled 4; Nr = Norrin

FIG. 4

Ratio of TCF-Luci/Renilla = Razão de TCF-Luci/Renilla
 U2OS cells = células U2OS
 Vector = Vetur



PI0707514-6

RESUMO

"MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE UM AGENTE QUE
MODULE OSSOS OU UM LIPÍDIO; MÉTODO DE IDENTIFICAÇÃO DE UM
AGENTE QUE MODULE A ATIVIDADE DE NORRIN-FRIZZLED4; KIT
5 PARA IDENTIFICAR UM AGENTE QUE MODULE A ATIVIDADE DE
LRP5-NORRIN-FRIZZLED4; CÉLULA OU LINHAGEM CELULAR
DESPROVIDA DE NORRIN NATIVO E QUE EXPRESSE UMA LRP5 NÃO
NATIVA E UMA FRIZZLED4 NÃO NATIVA"

O relatório apresenta materiais e métodos para
10 a triagem e identificação de reagentes que modulem a ati-
vidade de Norrin conforme se relacionada com a sinaliza-
ção da via de Wnt. De preferência, os agentes assim iden-
tificados modulam a remodelagem óssea e/ou os níveis de
lipídios e podem ser miméticos de Norrin e agonistas de
15 Norrin, assim como outros agonistas e miméticos do com-
plexo LRP5/Norrin/Frizzled4.