



HU000229476B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **229 476**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 00 00717**(22) A bejelentés napja: **1998. 04. 15.**(40) A közzététel napja: **2000. 06. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2014. 01. 28.**(51) Int. Cl.: **C07K 147/15** (2006.01)**A61K 38/17** (2006.01)**A61K 393/95** (2006.01)**C12N 5/20** (2006.01)**C12P 21/02** (2006.01)**C12Q 1/68** (2006.01)**G01N 335/77** (2006.01)**G01N 33/53** (2006.01)**C12P 21/08** (2006.01)**C12N 15/12** (2006.01)**C07K 16/28** (2006.01)**A61K 45/00** (2006.01)

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/JP 98/01728

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 9846644

(30) Elsőbbségi adatok:

9/97808 1997. 04. 15. **JP****9/151434** 1997. 06. 09. **JP****9/217897** 1997. 08. 12. **JP****9/224803** 1997. 08. 21. **JP****9/332241** 1997. 12. 02. **JP**

(72) Feltaláló(k):

Higashio, Kanji, Saitama (JP)**Shima, Nobuyuki, Tochigi (JP)****Goto, Masaaki, Tochigi (JP)****Yamaguchi, Kyoji, Saitama (JP)****Tsuda, Eisuke, Tochigi (JP)****Yano, Kazuki, Tochigi (JP)****Kobayashi, Fumie, Tochigi (JP)****Washida, Naohiro, Tochigi (JP)****Morinaga, Tomonori, Tochigi (JP)****Yasuda, Hisataka, Tochigi (JP)****Nakagawa, Nobuaki, Tochigi (JP)****Kinosaki, Masahiko, Tochigi (JP)****Tomoyasu, Akihiro, Tochigi (JP)****Takahashi, Ken, Tochigi (JP)**

(73) Jogosult(ak):

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED, Tokyo
(JP)

(74) Képviselő:

Kovári és Társai Szabadalmi és Védjegy Iroda
Kft., Budapest

(54)

OBM elleni antitestek

(57) Kivonat

A találmány antitestre vonatkozik egy olyan fehérje ellen, ahol a fehérje a következő fizikokémiai jellemzőkkel és biológiai aktivitással rendelkezik: (a) affinitás: specifikusan kötődik az osteoclastogenesis inhibíciós faktorhoz (OCIF) és nagy affinitást mutat az OCIF felé (disszociációs konstans a sejtmembránon: $K_d=10^{-9}$ M vagy kisebb); (b) molekulatömeg: körülbelül 30.000-40.000 vagy körülbelül 40.000 ± 4.000 molekulatömeggel rendelkezik nem-redukáló körülmények között végzett SDS-poliakrilamid elektroforézis segítségével meghatározva és körülbelül 90.000-110.000-es látszólagos molekulatömeggel rendelkezik monomer alakú OCIF-hoz keresztkötve; és (c) biológiai aktivitás: az osteoclastok differenciációját és érését segítő vagy előmozdító aktivitást mutat olyan kokultúra rendszerben, amely osteoblast sztrómális sejteket és lépsejteket tartalmaz olyan csontreszorpciós stimuláló faktorok jelenlétében, mint a D3-vitamin aktív formája és a parathyroid hormon (PTH); ahol az antitest a fehérje osteoclastogenesis aktivitását gátolja. A találmány vonatkozik továbbá az antitest alkalmazására gyógyszerészeti készítmény előállítására, az antitestet tartalmazó gyógyszerészeti készítményre, az antitestet termelő hibridómára, és eljárásra az antitest előállítására.

OEM elleni antitestek

A találmány egyrészt egy új fehérjére (OCIF-kötő molekula, amely az OEM rövidített formában is kifejezhető) vonatkozik, amely az osteoclastogenesis inhibíciós faktorhoz (amely az OCIF rövidített formában is kifejezhető) kötődik, másrészt ezen fehérje előállítására szolgáló eljárásra vonatkozik.

A találmány arra a DNS-re is vonatkozik, amely kódolja ezt a fehérjét, vonatkozik továbbá ezen DNS által kódolt aminosav szekvenciát tartalmazó fehérjékre, eljárásra ezen fehérje génmanipulációs technikák segítségével történő előállításra és ezen fehérjét tartalmazó gyógyszerészeti készítményekre.

A találmány vonatkozik továbbá ezen fehérjét és DNS-t felhasználó szűrési eljárásokra, amelyek ezen fehérje expresszióját szabályozó anyagokra, ezen fehérje biológiai aktivitását gátló vagy szabályozó anyagokra vagy az ezzel a fehérjével létrejövő kölcsönhatás során a fehérje jelét közvetítő receptorokra irányulnak, valamint vonatkozik a szűrés során kapott anyagokra, illetve az így kapott anyagokat tartalmazó gyógyszerészeti készítményekre.

A találmány ezen fehérje elleni antitestekre, az antitestek előállítására szolgáló eljárásokra és ezeket az antitesteket tartalmazó gyógyszerészeti készítményekre is vonatkozik.

A csont-metabolizmus függ a csontképződés szabályozásáért felelős osteoblastok és a csontreszorpció szabályozásáért felelős osteoclastok összaktivitásától. A csont-metabolizmus rendellenessége a csontképződés és

csontreszorpció kiegyensúlyozatlanságából eredő következménynek tekinthető. Az osteoporosisról, a hypercalcaemiáról, a Paget-kórról, a renal osteodystrophyról, a krónikus rheumarthritisről, az osteoarthritisről és más hasonló betegségekről tudjuk, hogy a rendellenes csont-metabolizmus velejárói. Az osteoporosis a csont-metabolizmus ilyen rendellenessége által okozott tipikus kór. Ez a betegség akkor lép fel, amikor az osteoclastok általi csontreszorpció az osteoblastok általi csontképzést meghaladja. A betegség mind a csont meszesedő anyagában, mind a csont mátrixában bekövetkező csökkenéssel jellemezhető. Bár ezen betegség mechanizmusa nem teljesen tisztázott, a betegség csontban fellépő fájdalmakat okoz, törékennyé teszi őket és csonttöréshez vezethet. Ez a betegség egyre inkább szociális problémává válik, mivel az idős emberek mennyiségének növekedésével növeli az ágyhoz kötött idős személyek számát. Ezért sürgősen szükséges e betegség kezelésére terápiás ágenszt kifejleszteni. A csonttömeg csökkenésének következtében kialakuló kórt valószínűleg a csontreszorpció visszaszorításával, a csontképződés felgyorsításával vagy a csontreszorpció és csontképződés közötti egyensúly javításával lehet kezelni. A csontképződés várhatóan növelhető a csontképző osteoblastok szaporodásának, differenciációjának vagy aktiválásának gyorsításával, illetve a csontot lebontó osteoclastok szaporodásának, differenciációjának vagy aktiválásának gátlásával. Az utóbbi években komoly érdeklődés irányult az olyan hormonok, kis molekulatömegű anyagok vagy fiziológiailag aktív fehérjék felé, amelyek ilyen aktivitást mutatnak és erőteljes alapkutatás és fejlesztés indult meg ezen irányokba.

Az olyan gyógyszerek, mint a calcitonin ágensek, a D_3 -vitamin aktív-forma ágensei, ösztradiolt, ipriflavont, K_2 -vitamint tartalmazó hormonális ágensek és a biszfoszfonát vegyületek már ismertek, mint olyan gyógyszerek, amelyek a csonttal kapcsolatos betegségek kezelésére és a kezelési időszak rövidítésére alkalmasak. A D_3 -vitamin származékok aktív formái, az ösztradiol származékok és a második, illetve harmadik generációs biszfoszfonát vegyületek olyan klinikai vizsgálatai vannak folyamatban, melyek kitűnő hatékonyságú és minimális mellékhatású terápiás ágensek kifejlesztését célozzák.

Ennek ellenére azt találták, hogy ezen ágenseket használó terápiák nem szükségszerűen kielégítőek a hatékonyság és terápiás eredmények szempontjából. Sürgető az igény a biztonságosabb és nagyobb hatékonysággal rendelkező új terápiás ágensek kifejlesztésére. Néhány, csont-metabolizmussal kapcsolatos betegségek kezelésére használt ágens mellékhatásaik miatt csak korlátozott mértékben használhatók. Továbbá a kettő vagy több ágenszt kombinálva alkalmazó kezelések jelenleg a csont-metabolizmussal kapcsolatos betegségek, mint például az osteoporosis kezelésében a fő irányvonalat jelentik. Ebből a szempontból tekintve az olyan gyógyszerek kifejlesztése kívánatos, melyek a szokásos gyógyszerektől eltérő hatásmechanizmusokkal, valamint nagyobb hatékonysággal és minimális mellékhatásokkal rendelkeznek.

Mint azt fent említettük, a csont-metabolizmust szabályozó sejtek az osteoblastok és az osteoclastok. Ismeretes, hogy ezen sejtek szoros kölcsönhatással rendelkeznek, amit „coupling”-nak neveznek. Különösen az osteoblast sztrómális sejtek által szekretált citokinekről, mint például az interleukin 1 (IL-1), 3 (IL-3), 6 (IL-6) és 11 (IL-11), granulocita makrofág-kolónia

stimuláló faktorról (GM-CSF), makrofág-kolónia stimuláló faktorról (M-CSF), interferon- γ -ról (IFN- γ), tumor nekrozis faktor- α -ról (TNF- α) és transzformáló növekedési faktor- β -ról (TGF- β) ismert, hogy gyorsítják vagy gátolják az osteoclastok differenciációját vagy érését (Raisz: Disorders of Bone and Mineral Metabolism, 287-311, 1992; Suda és mtsai.: Principles of Bone Biology, 87-102, 1996; Suda és mtsai.: Endocrine Reviews, 4, 266-270, 1995, Lacey és mtsai.: Endocrinology, 186, 2369-2376, 1995). Leírták, hogy az osteoblast sztrómális sejtek fontos szerepet játszanak az osteoclastok differenciálódásában és érésében, valamint az osteoclast funkciókban, mint például az érett osteoclastok általi csontreszorpcióban, éretlen osteoclast prekursorokkal vagy érett osteoclastokkal fellépő sejt-sejt kontaktuson keresztül.

Az osteoclast differenciációs faktornak (ODF, Suda és mtsai.: Endocrine Rev., 13, 66-88, 1992; Suda és mtsai.: Bone 17, 87S-91S, 1995) nevezett faktorról úgy vélik, hogy az osteoblast sztrómális sejtek membránján expresszálódik és sejt-sejt kapcsolaton keresztül részt vesz az osteoclastok képződésében. E hipotézis szerint az osteoclastok prekursor sejtjeiben jelen van egy ODF receptor. Mégis mindeddig sem az ODF-et sem a receptort nem sikerült tisztítani vagy azonosítani. Továbbá nem jelent meg közlemény ezek jellemzőiről, működési mechanizmusukról vagy szerkezetükről. Így az osteoclastok differenciációjában és érésében szerepet játszó mechanizmus még nem eléggé tisztázott. Ezen mechanizmus felderítése nem csak az alap orvostudományhoz, hanem a csont-metabolizmus rendellenességeivel kapcsolatos betegségek kezeléséhez szükséges új gyógyszerek kifejlesztéséhez is nagyban hozzájárulna.

A feltalálók ezt a körülményt figyelembe véve kiterjedt vizsgálatokat folytattak és felfedeztek egy osteoclastogenesis inhibíciós faktort (OCIF) az IMR-90 humán embrionális tüdő fibroblastok tenyészet-táptalajában (ATCC letéti szám: CCL186) (WO 96/26217).

A feltalálóknak sikerült az OCIF-et kódoló DNS-t klónozniuk, állati sejtekben rekombináns OCIF-et előállítaniuk és a rekombináns OCIF in vivo gyógyszerészeti hatásait (a csont-metabolizmusban kifejtett jótékony hatás, stb.) igazolni. Az OCIF valószínűleg a csont-metabolizmus rendellenes működésével kapcsolatos betegségek megelőzésére vagy kezelésére szolgáló ágensként használható, amely a szokásos gyógyszerekhez képest nagyobb hatékonysággal és kevesebb mellékhatással rendelkezik.

A feltalálók egy olyan fehérje után kutattak, amely az osteoclastogenesis inhibíciós faktorhoz (OCIF) kötődik, és felfedezték, hogy egy OCIF-kötő fehérje specifikusan expresszálódik az olyan osteoblast sztrómális sejteken, melyeket olyan csontreszorpciós faktor, mint a D₃-vitamin aktív formája és a parathyroid hormon (PTH) jelenlétében növesztettek. Ezenkívül a feltalálók megvizsgálták ennek az OCIF-kötő fehérjének a jellemzőit és fiziológiai funkcióit és azt találták, hogy a fehérje egy olyan faktor biológiai aktivitását mutatja, amely az osteoclastok éretlen osteoclast prekurzorokból történő differenciálódását és érését segíti vagy előmozdítja. Ezek a felismerések vezettek a jelen találmány megalkotásához. A találmány szerinti fehérjén végzett további vizsgálatok bebizonyították, hogy ez egy fontos fehérje, amely szabályozza az éretlen osteoclast prekurzorokból származó osteoclastok differenciálódását és érését az osteoblast

sztrómális sejtek és lépsejtek ko-kultúrális rendszerében. A jelen találmányban ismertetett sikerek, melyeket az osteoclastok differenciálódását és érését segítő vagy előmozdító faktorként funkcionáló fehérje azonosításában és izolálásában értünk el, lehetővé tették a rendellenes csont-metabolizmushoz használható olyan új gyógyszerre történő szűrést a találmány szerinti fehérje felhasználásával, amely a csont-metabolizmus mechanizmusán alapszik.

A találmány egy célja, hogy szolgáltatson egyrészt egy olyan új fehérjét (OCIF-kötő molekula vagy OBM), amely az osteoclastogenesis inhibíciós faktorhoz (OCIF) kötődik, másrészt egy olyan eljárást, amelynek segítségével ez a fehérje előállítható.

A találmány egy másik célja, hogy szolgáltatson ezt a fehérjét kódoló DNS-t, szolgáltatson továbbá ezen DNS által kódolt aminosav szekvenciát tartalmazó fehérjéket, illetve ezen fehérje előállítására szolgáló olyan eljárást, amely génmanipulációs technikákat használ és szolgáltatson ezen fehérjét tartalmazó gyógyszerészeti készítményeket.

A találmány egy további célja, hogy olyan eljárásokat szolgáltatson, amelyek segítségével szűrni lehet ezen fehérje és DNS felhasználásával olyan anyagokra, amelyek ezen fehérje expresszióját szabályozzák, szűrni lehet ezen fehérje biológiai aktivitását gátló vagy szabályozó anyagokra, szűrni lehet olyan receptorokra, amelyek a fehérjéhez való kötődés által a fehérje hatását közvetítik, célja továbbá olyan anyagok szolgáltatása, amelyeket a szűrés során kaptunk, illetve olyan gyógyszerészeti készítmények szolgáltatása, amelyek ezen anyagokat tartalmazzák.

Egy további találmányi ismervnek megfelelően a találmány célja, hogy szolgáltatson ezen fehérje elleni antitesteket, az antitestek előállítására szolgáló eljárásokat és ezen antitesteket tartalmazó gyógyszerészeti készítményeket.

A találmány szerinti fehérje a következő fizikokémiai tulajdonságokkal és biológiai aktivitással rendelkezik.

- (a) Affinitás: specifikusan kötődik az osteoclastogenesis inhibíciós faktorhoz (OCIF) és nagy affinitást mutat az OCIF felé (disszociációs konstans a sejtmembránon: $K_d = 10^{-9}$ M vagy kisebb);
- (b) Molekulatömeg: körülbelül 30.000-40.000-es molekulatömeggel rendelkezik nem-redukáló körülmények között végzett SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) segítségével meghatározva és körülbelül 90.000-110.000-es látszólagos molekulatömeggel rendelkezik monomer alakú OCIF-hoz keresztkötve; és
- (c) Biológiai aktivitás: az osteoclast differenciációt és érést segítő vagy előmozdító aktivitást mutat olyan kokultúra rendszerben, amely egér osteoblast sztrómális sejteket és egér lépsejteket tartalmaz olyan csontreszorpciós faktorok jelenlétében, mint a D_3 -vitamin aktív formája és a parathyroid hormon (PTH).

Az ST2 egér osteoblast sztrómális sejtvonalból és egér lépsejtekből álló kokultúra rendszer, amelyben jelen van a D_3 -vitamin aktív formája vagy a PTH, jól ismert, osteoclast képződéshez való tipikus in vitro tenyésztérendszer. A találmány szerinti fehérjét expresszáló sejtek meghatározhatók az OCIF olyan egér osteoblast sztrómális sejtekhez vagy egér lépsejtekhöz való

kötődésének vizsgálatával, amelyek növesztése a D₃-vitamin aktív formájának jelenlétében vagy hiányában történt. A találmány szerinti fehérje olyan fehérjeként adható meg, amely specifikusan az olyan osteoblast sztrómális sejteken indukálódik, melyek egy osteotropikus faktor, mint például a D₃-vitamin aktív formája vagy a PTH jelenlétében voltak növesztve. Ezenkívül a következő eredmények alapján találmány szerinti fehérje olyan fehérjeként adható meg, amely osteoclastok differenciációját és érését segítő vagy előmozdító biológiai aktivitást mutat. Ezek alapján az osteoclast képződés dóziszfüggő módon gátolt 1-40ng/ml OCIF a fent említett kokultúra rendszerhez történő hozzáadása által, a D₃-vitamin aktív formájának jelenlétében, illetve a D₃-vitamin aktív formájának jelenlétében a találmány szerinti fehérje ST2 sejteken történő expressziójának időfüggése jól korrelál a ko-kultúrában történő osteoclast képződés időfüggésével. Ezenkívül az ST2 sejteken expresszált találmány szerinti fehérje mennyisége korrelál a sejtek osteoclast képződést segítő képességével, és az ST2 sejteken az OCIF találmány szerinti fehérjéhez való kötődése teljesen elnyomja az osteoclast képződést.

A találmány szerinti fehérje OCIF felé mutatott affinitása meghatározható az OCIF jelölésével és vizsgálható a jelölt OCIF állati sejtmembrán felületéhez történő kötődésével. Az OCIF jelölhető olyan hagyományos fehérje-jelölő eljárással, mint például a radioizotópos vagy a fluorescens jelölés. A tirozin aminosavak ¹²⁵I-tel történő jelölése az OCIF radioizotópokkal való jelölésének egy specifikus példája. Olyan jelölési módszerek használhatók, mint például a jodogén eljárás, a klóramin-T eljárás és enzimatisz módszerek. A jelölt OCIF állati sejt felszíni membránjához való kötődése a szokásos módszerekkel vizsgálható. A kötődési assay-hez használt

tápközeghez a jelölt OCIF koncentrációjához képest 100-400-szoros mennyiségű jelöletlen OCIF-ot adunk, ez teszi lehetővé a nem-specifikus kötődés kimérését. A specifikusan kötődött OCIF mennyisége kiszámítható úgy, hogy a nem-specifikus kötődés mennyiségét kivonjuk a jelölt OCIF kötődésének teljes mennyiségéből. A sejtmembránon expresszálandó találmány szerinti fehérje OCIF felé mutatott aktivitása meghatározható a jelölt OCIF mennyiségének változtatásával és a specifikus kötődés Scatchard grafikon segítségével történő elemzésével.

A találmány szerinti fehérje OCIF felé mutatott affinitását meghatároztuk, ami hozzávetőlegesen 100-500 pM-nal mutatkozott. A találmány szerinti fehérje nagy, az osteoclastogenesis inhibíciós faktor (OCIF) felé mutatott affinitással jellemezhető (a sejtmembránon mutatott disszociációs konstans: $K_d = 10^{-9}$ vagy kisebb). Az OBM molekulatömege meghatározható gélszűrési kromatográfiával, SDS-PAGE eljárással vagy más hasonló módszerrel. Az SDS-PAGE az előnyben részesített a pontos molekulatömeg meghatározása érdekében. Az OBM redukáló körülmények között egy hozzávetőleg 40.000-es (40.000 ± 4.000) molekulatömegű fehérjének mondható.

A találmány szerinti fehérje megkapható az ST2 egér osteoblast sztrómális sejtvonalból, a PA6 egér preadipocita sejtvonalból, humán osteoblast sejtvonalakból vagy más olyan osteoblast sejtekből, melyek az olyan emlősökől származnak, mint például az ember, az egér vagy a patkány. A találmány szerinti fehérje expresszióját indukáló anyagokként olyan osteotropikus faktorok adhatók meg, mint a D_3 -vitamin aktív formája (kalcitriol), a parathyroid hormon (PTH), az interleukin (IL)-1, IL-6, IL-11, az Oncostatin M, továbbá megadható a leukémia inhibíciós faktor (LIF). Ezeket az anyagokat 10^{-8} M

koncentrációban (D_3 -vitamin aktív formája és PTH), 10 ng/ml koncentrációban (IL-11) vagy 1 ng/ml koncentrációban (Oncostatin M) lehet adni. Az IL-6-ot előnyösen 20 ng/ml koncentrációban, 500 ng/ml koncentrációjú oldható IL-6 receptorral használják. Előnyösen olyan α -MEM tápközegeben növesztett összefolyó ST2 egér osteoblast sztrómális sejtvonal használható, amely tápközegehez 10^{-8} M aktív formájú D_3 -vitamint, 10^{-7} M dexametazont és 10% magzati borjúsérumot adtunk. A kitenyésztett sejtek sejtkaparóval végzett lekaparással gyűjthetők össze. Az összegyűjtött sejtek -80°C -on tárolhatók felhasználásig.

A találmány szerinti fehérje hatékonyan tisztítható az összegyűjtött sejtek membránfrakcióiból. A membránfrakciók előállíthatók olyan hagyományos eljárás segítségével, amely intracelluláris sejtservecskék előállítására használatos. Többféle típusú proteáz inhibitor adható ahhoz a pufferoldathoz, amelyet a membránfrakciók elkészítéséhez használunk. A proteáz inhibitorok lehetnek például szerin proteáz inhibitorok, tiol proteáz inhibitorok és metaproteáz inhibitorok. Speciális példaként a PMSF, az APMSF, az EDTA, az o-fenantrolin, a leupeptin, a pepsztatin A, az aprotinin és a szójabab tripszin inhibitor adhatók meg. A sejtek homogenizálásához Daunce homogenizátor, polytron homogenizátor vagy ultrahangos homogenizátor használható. A sejthomogenizátumot 0,5 M szacharózt tartalmazó puffer oldatban szuszpendáltuk és 10 percen keresztül $600 \times g$ sebességgel centrifugáltuk a nucleus és a precipitátumként megjelenő egyben maradt sejtek szétválasztásához. Ahhoz, hogy a membránfrakciókat precipitátumként megkapjuk, a felülúszót 90 percen át $150.000 \times g$ sebességgel centrifugáltuk. Az így kapott membránfrakciót többféle típusú detergenssel kezeltük, hogy a találmány szerinti

fehérjét a sejtmembránról eredményesen szolubilizáljuk és extraháljuk. Sejtmembrán fehérjék szolubilizálásához általánosan elterjedt detergenssek használhatók, mint például a CHAPS (3-[(3-cholamidopropil)-dimetilamonio]-1-propánszulfonát), a Triton X-100, a Nikkol és az n-oktil-glikozid. Előnyösen 0,5% CHAPS-t adtunk a membránfrakcióhoz és a keveréket a találmány szerinti fehérje szolubilizálása céljából 4°C-on 2 órán keresztül kevertettük. Az így elkészített mintát 60 percen át 150.000 x g sebességgel centrifugáltuk, hogy felülúszóként megkapjuk a szolubilizált membránfrakciót.

A találmány szerinti fehérje a szolubilizált membránfrakcióból tisztítható OCIF-fal összekapcsolt oszlop, gél vagy gyanta segítségével. Az immobilizált OCIF lehet a WO 96/26217-ben leírt IMR-90 humán embrionális tüdő fibroblast kultúrákból izolált OCIF, vagy génmanipulációs eljárások segítségével előállított rOCIF. Az rOCIF előállítható humán cDNS, egér cDNS vagy patkány cDNS szokásos eljárás alapján expressziós vektorba történő bevitelével, az így elkészített vektor olyan állati sejtekbe, mint a CHO sejtek, a BHK sejtek vagy a Namalwa sejtek, vagy rovarsejtekbe történő transzdukciójával az rOCIF előállítása céljából, és az rOCIF tisztításával. Az így kapott OCIF hozzávetőlegesen 60 kDa (monomer forma) vagy 120 kDa (dimer forma) molekulatömegű. Immobilizáláshoz a dimer formájú OCIF az előnyben részesített. Az olyan gélekre és gyantákra, amelyekhez OCIF-et immobilizáltunk, példaként adható meg az ECH Sepharose 4B, az EAH Sepharose 4B, a Thiopropyl Sepharose 6B, a CNBr által aktivált Sepharose 4B, az aktivált CH Sepharose 4B, az epoxi által aktivált Sepharose 6B, aktivált tiol Sepharose 4B (ezek a Pharmacia Co. gyártmányai), a TSKgel AF-Epoxy Toyopal 650, a TSKgel AF-

Amino Toyopal 650, a TSKgel AF-Formyl Toyopal 650, a TSKgel AF-Carboxy Toyopal 650, a TSKgel AF-Tresyl Toyopal650 (ezek a Tosoh Corporation gyártmányai), az Amino-Cellulofine, a Carboxy-Cellulofine, az EMP által aktivált Cellulofine, a Formyl-Cellulofine (ezek a Seikagaku Kogyo Co. gyártmányai), az Affigel 10, az Affigel 15 és az Affiprep 10 (ezek a BioRad Co. gyártmányai). Olyan oszlopként, amelyhez OCIF-ot immobilizáltunk, a HiTrap NHS-aktivált oszlop (Pharmacia Co.), a TSKgel Tresyl-5PW (Tosoh Corporation), stb. adható meg. OCIF HiTrap NHS-aktivált oszlophoz (1 ml, Pharmacia Co.) történő immobilizálásának egy speciális példájaként a következő eljárás adható meg. Bővebben, 13,0 mg OCIF-ot tartalmazó 1ml 0,2 M NaHCO_3 /0,5 M NaCl oldatot (pH 8,3) injektáltunk az oszlopra, hogy elvégezzük a kapcsolási reakciót, mely szobahőmérsékleten történt és 30 percig tartott. 0,5 M etanolamin/0,5 M NaCl (pH 8,3) és 0,1 M ecetsav/0,5 M NaCl (pH 4,0) oldatokat vittünk egymás után az oszlopra. Ezt követően az oszlopot ismét 0,5 M etanolamin/0,5 M NaCl (pH 8,3) oldattal mostuk és az oszlopot egy órán keresztül szobahőmérsékleten állni hagytuk, hogy a feleslegben lévő aktív csoportokat blokkoljuk. Az oszlopot egymás után kétszer mostuk 0,5 M etanolamin/0,5 M NaCl (pH 8,3) oldattal és 0,1 M ecetsav/0,5 M NaCl (pH 4,0) oldattal, és ezt követően 50 mM Tris/1 M NaCl/0,1% CHAPS oldattal (pH 7,5) mostuk, így kaptunk egy OCIF-immobilizált oszlopot. A találmány szerinti fehérje hatékonyan tisztítható egy ilyen módon elkészített OCIF-immobilizált oszlop, vagy egy OCIF-immobilizált gél vagy gyanta segítségével.

Kíváncos, hogy a fehérje tisztításához használt puffer oldatokhoz különböző fent említett proteáz inhibitorokat adjunk, hogy a találmány szerinti fehérje

degradációját elnyomjuk. A találmány szerinti fehérje a fent említett szolubilizált membránfrakció OCIF-immobilizált oszlopra töltésével vagy OCIF-immobilizált géllal vagy gyantával történő összekeverésével, és a fehérje az oszlopról, gélről vagy gyantáról savval, különböző fehérje denaturáló ágensekkel, kakodilát pufferrel és hasonlókkal történő eluálással tisztítható. Kívánatos, hogy az elúcióhoz savat használjunk és az elúció után azonnal semlegesítsük, hogy a találmány szerinti fehérje denaturációját minimalizáljuk. Az elúcióhoz használt savas oldatként 0,1 M glicin-hidroklorid savoldat (pH 3,0), 0,1 M glicin-hidroklorid savoldat (pH 2,0), 0,1 M nátrium-citrát oldat (pH 2,0) és hasonlóak adhatók meg.

A találmány szerinti fehérje tisztítható továbbá biológiai anyagokból származó különböző fehérjék tisztítására használatos szokásos tisztítási eljárásokkal és ezen fehérje fizikokémiai tulajdonságait kihasználó különböző tisztítási eljárásokkal. A találmány szerinti fehérjét tartalmazó oldatok koncentrálására fehérjék tisztítási eljárásaihoz használatos olyan szokásos technikák használhatók, mint például az ultraszűrés, fagyasztva szárítás és kisózás. Előnyös például az ultraszűrés Centricon-10 (BioRad Co.) felhasználásával. A tisztításhoz különböző olyan szokásosan alkalmazott fehérjetisztítási technikák kombinációját használtuk, mint az ioncserés kromatográfia, a gelszűrési kromatográfia, a hidrofób kromatográfia, a reverz fázisú kromatográfia és a preparatív elektroforézis. Konkrétabban, a találmány szerinti fehérje tisztítása lehetséges a Superose 12 oszloppal (Pharmacia Co.) végzett gelszűrési kromatográfia és a reverz fázisú kromatográfia kombinációjával. A tisztítás során a találmány szerinti

fehérje detektálásához a találmány szerinti fehérje immobilizált OCIF felé mutatott kötődési aktivitását vizsgáltuk vagy az immobilizált OCIF-hoz kötődő anyagot anti-OCIF antitesttel precipitáltattuk és SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk.

A kapott találmány szerinti fehérje olyan betegségek kezelésére hasznos ágens, amelyeket a csont-metabolizmus rendellenessége okoz, mint az osteoporosis, vagy hasznos reagens ezen betegségek kutatásához és diagnosztikájához.

A jelen találmány továbbá olyan új fehérjét (OCIF-kötő molekula vagy OBM) kódoló DNS-t szolgáltat, amely az osteoclastogenesis inhibíciós faktorhoz kötődik, szolgáltat továbbá ezen DNS által kódolt aminosav sorrendet tartalmazó fehérjéket, továbbá ezen fehérje előállítására szolgáló eljárást, amely génmanipulációs technikákat használ és ezen fehérjéket tartalmazó gyógyszerészeti készítményeket. Ezen felül a találmány szűrési eljárásokat is szolgáltat, amelyek az OBM expressziójának szabályozására szolgáló anyagokra irányulnak, szolgáltat olyan szűrésre vonatkozó eljárást, amely az OBM biológiai aktivitásának gátlására vagy módosítására szolgáló anyagokra irányul, vagy olyan recetorok szűrésére szolgáló eljárást, amelyek közvetítik az OBM OCIF-hoz kötődésének hatását és olyan gyógyszerészeti készítményeket szolgáltat, amelyek a szűrés eredményeképpen kapott anyagokat tartalmazzák.

A találmány szerinti DNS által kódolt új fehérje, az OBM a következő fizikokémiai tulajdonságokkal és biológiai aktivitással rendelkezik.

- (a) specifikusan kötődik az osteoclastogenesis inhibíciós faktorhoz (OCIF-hoz),

- (b) a molekulasúlya redukáló körülmények mellett SDS-PAGE módszerrel meghatározva hozzávetőlegesen 40.000 (± 4.000) és körülbelül 90.000-110.000-es látszólagos molekulatömeggel rendelkezik monomer alakú OCIF-hoz keresztkötve, és
- (c) osteoclast differenciációt és érést segítő vagy előmozdító aktivitást mutat.

A humán osteoclastogenesis inhibíciós faktor (OCIF), amely az OBM-et, a találmány szerinti OCIF kötő molekulát kódoló DNS azonosítására szolgáló próbaként és az OBM tulajdonságainak meghatározására szolgáló próbaként használatos, a WO 96/26217-ben leírt IMR-90 humán embrionális tüdő fibroblast sejtvonal tenyésztetáptalajából izolálható. OBM-et kódoló DNS izolálására és azonosítására használható továbbá rekombináns humán OCIF, rekombináns egér OCIF, rekombináns patkány OCIF és hasonló. Ezen rekombináns OCIF fehérjék előállíthatók a fehérjéket kódoló DNS fragmensek expressziós vektorokba hagyományos eljárások szerint történő bevitelével, állati sejtekben, mint például CHO sejtekben, BHK sejtekben vagy Namalwa sejtekben, vagy rovarsejtekben történő expresszióval és ezek tisztításával.

Célfehérjét kódoló cDNS izolálására szolgáló módszerként (cDNS klónozás) az a módszer alkalmazható, amely tartalmazza a fehérje parciális aminosav szekvenciájának meghatározását és a cél-cDNS hibridizáció segítségével történő izolálását az aminosav szekvenciának megfelelő nukleotid szekvencia felhasználásával. Egy másik rendelkezésre álló eljárás, amely még abban az esetben is használható, ha a fehérje aminosav sorrendje nem ismert, tartalmazza egy cDNS könyvtár expressziós vektorban történő elkészítését, a cDNS sejtekbe történő bevitelét és

a célfehérje expressziójára irányuló szűrést a cél-cDNS izolálása céljából (expressziós klónozási módszer, D'Andrea és mtsai.: Cell 57, 277-285, 1989; Fukunaga és mtsai.: Cell 61, 341-350, 1990). Az expressziós klónozási módszer esetén a céltől függően olyan megfelelő gazdasejtek kerülnek kiválasztásra, mint a baktérium, élesztő, állati sejtek és hasonlók. Sok esetben állati sejteket választunk ki gazdasejtként az olyan fehérjét, mint például a jelen találmány szerinti fehérjét kódoló cDNS klónozásához, amely fehérje elméletileg az állati sejtmembrán felszínén jelen van. Rendes körülmények között olyan gazdasejtek kerülnek kiválasztásra, amelyek nagy hatásfokkal képesek DNS transzfekcióra és a bevitt DNS nagyfokú expresszióját tudják megvalósítani. Az egyik ilyen állati sejt a COS-7 majom vesesejt, amelyet a jelen találmányban használtunk. Mivel a COS-7 sejtben SV40 T antigén expresszálódik, az SV40 replikátorával rendelkező plazmid többszörös kópiájú episzómaként lehet jelen a sejtben, ezáltal nagy mennyiségű expresszió várható. Ezenfelül, mivel a célfehérje COS-7 sejtek általi expressziója a DNS bevitelétől számított néhány napon belül elér egy maximumot, a sejt gyors szűrésre alkalmas. Ezen gazdasejt nagy expressziós képességű plazmiddal való kombinációja rendkívül nagy mértékű génexpressziót biztosít. A promoter az a faktor, amely egy plazmidon lévő gén expressziójára a legnagyobb hatással van. Olyan promoterek, mint az SR α promoter és a citomegalovirusból származó promoterek nagyfokú expressziós promoterekként használatosak. Membránfehérjét kódoló cDNS-re irányuló expressziós klónozási stratégia segítségével végzett szűréshez olyan szűrési eljárásokat használtunk, mint a kötődési eljárás, a mosási (panning) eljárás vagy a film emulziós eljárás.

A találmány vonatkozik az OCIF-hoz specifikusan kötődő fehérjét (OBM) kódoló DNS-re, amely DNS-t az expressziós klónozási stratégia és a kötődési eljárás segítségével történő szűrés kombinációjával izoláltunk, vonatkozik az expresszált fehérjére és vonatkozik a DNS vagy az expresszált fehérje felhasználásával végzett fiziológiailag aktív anyagok szűrésére. A találmány szerinti DNS által kódol OBM OCIF jelölésével és a jelölt OCIF állati sejt membránjának a felszínéhez való kötődésének a vizsgálatával detektálható. Az OCIF olyan hagyományos jelölő eljárásokkal jelölhető, mint a radioizotópos jelölő eljárás vagy a szokásos fehérjék jelölésére szolgáló fluorescens jelölő eljárás. OCIF radioizotóppal történő jelölésére specifikus példaként adható meg tirozinok ^{125}I -tel való jelölése. Olyan jelöléses eljárások, mint a jodogén eljárás, a klóramin-T eljárás és enzimátikus eljárások használhatók. Jelölt OCIF állati sejt membránjának felszínéhez való kötődése a szokásos eljárásokkal vizsgálható. A teszthez használt tápközeghez a jelölt OCIF koncentrációjához képest 100-400-szoros mennyiségű jelöletlen OCIF-et adunk, amely lehetővé teszi a nem-specifikus kötődés mennyiségének számszerűsítését. Az OCIF specifikusan kötődött mennyisége kiszámítható úgy, hogy a nem-specifikus kötődés mennyiségét kivonjuk a jelölt OCIF kötődésének teljes mennyiségéből.

Feltételezésünk szerint kölcsönhatás lép fel az osteoclastok differenciációjában szerepet játszó faktor és az OCIF között. Erre a feltevésre alapozva annak a fehérjének az izolálása céljából, amelyhez a rekombináns OCIF kötődik, a feltalálók az ST2 egér osteoblast sztrómális sejtvonalból származó mRNS segítségével készített expressziós könyvtárat szűrték a következő

eljárás szerint. Bővebben, az ST2 mRNS felhasználásával szintetizált DNS-t bevittünk egy állati sejthez való expressziós vektorba és az inzerttel rendelkező vektort COS-7 majom vese sejtekbe vittük be. A COS-7 sejtekből expresszálandó célfehérjét próbaként felhasznált ^{125}I -tel jelölt OCIF segítségével szűrtük. Ennek eredményeként OCIF-hoz specifikusan kötődő fehérjét kódoló DNS-t izoláltunk. Ezután ezen OCIF-kötő molekulát (OCIF-binding molecule; OBM) kódoló DNS nukleotid szekvenciáját meghatároztuk. Ezenfelül ezen DNS által kódolt OBM-ről azt találtuk, hogy specifikusan és erősen kötődik az OCIF-hoz, a sejtmembránon.

A jelen találmány esetében a DNS hibridizációjához viszonylag enyhe körülményeket használtunk, például a DNS-t egy nylon membránra vittük fel és szokásos eljárások segítségével ahhoz immobilizáltuk, és hibridizációs puffer oldatban hibridizáltuk izotóppal jelölt DNS próbával 40-70°C-os hőmérsékleten körülbelül 2 órától egy éjszakáig terjedő időtartamon keresztül, majd ezt követte a 0,5 x SSC-ben (0,075 M nátrium-klorid és 0,0075 M nátrium-citrát) 45°C-on, 10 percig tartó mosás. Konkrétan, nylon membránként Highbond N-t (Amersham Co.) használtunk, erre vittük fel és ezen immobilizáltuk a DNS-t. Ezután ^{32}P -ral jelölt DNS próbával hibridizáltuk a DNS-t egy gyors hibridizációs pufferben (Amersham Co.) 65°C-on, két órán keresztül, majd ezt követte a 0,5 x SSC-ben (0,075 M nátrium-klorid és 0,0075 M nátrium-citrát) 45°C-on, 10 percig tartó mosás.

Az ST2 egér osteoblast sztrómális sejtvonalból és egér lépsejtekből álló kokultúra rendszer, amelyben jelen van a D_3 -vitamin aktív formája vagy a PTH, jól ismert, osteoclast képződéshez való tipikus in vitro

tenyészszer. A találmány szerinti fehérje megadható, mint az a fehérje, amely specifikusan az olyan osteoblast sztrómális sejteken indukálódik, amelyeket csontreszorpciót gyorsító ágens, mint a D_3 -vitamin aktív formája vagy a PTH jelenlétében növesztettek. Ezenfelül abból a tényből következően, hogy az osteoclastok képződése a találmány szerinti DNS által kódolt fehérje olyan egyszerű lépésekhez történő hozzáadásával stimulálódik, amelyeket úgy növesztettek, hogy még a D_3 -vitamin aktív formája vagy a PTH is hiányzott a táptalajból, a találmány szerinti DNS által kódol OBM-et úgy tekinthetjük, mint ami szerepet játszik az osteoclastok differenciációjában ésérésében.

Rekombináns OBM előállítható a találmány szerinti DNS expressziós vektorba történő bevitelével, amely egy plazmid előállítását célozza és a plazmid különböző sejtekbe vagy mikroorganizmusokba való bevitelével a rekombináns OBM expresszálása céljából. Olyan gazdasejtként, amelyben a rekombináns OBM expresszálódik, emlős sejtek, mint a COS-7, CHO, Namalwa vagy baktériumok, mint az *Escherichia coli* használhatók. Az OBM-et lehet expresszáltatni membránkötött formájú fehérjeként a teljes hosszúságú DNS felhasználásával, illetve szekréción formájú vagy szolubilis formájú fehérjeként a transzmembrán domént kódoló rész eltávolításával. Az előállított rekombináns OBM hatékonyan tisztítható olyan hagyományos tisztítási eljárások megfelelő kombinációjával, amelyek szokásos fehérjék esetében használatosak, mint például OCIF-immobilizált oszlopokat felhasználva az affinitás kromatográfia, az ioncserés kromatográfia és a gélszűrési kromatográfia. Az így kapott találmány szerinti fehérje hasznos ágens a rendellenes csont-metabolizmus által okozott betegségek,

mint az osteopetrosis kezelésére, vagy reagensként az ilyen betegségek kutatásához és diagnosztikájához.

A találmány szerinti DNS által kódolt OBM fehérje felhasználásával el lehet végezni a következő szűrési műveleteket: (1) OBM expresszióját szabályozó anyagok szűrése, (2) OBM-hez specifikusan kötődő és az OBM biológiai aktivitását gátló anyagok szűrése és (3) osteoclast prekursor sejtekben jelenlevő és az OBM biológiai aktivitását közvetítő fehérjék (OBM receptorok) szűrése. Továbbá lehetséges ezen OBM receptorok felhasználásával antagonisták és agonisták kifejlesztése. A fent említett OBM vagy OBM receptor felhasználásával a kombinatorikus kémia segítségével az antagonisták vagy agonisták szűréséhez használatos peptid könyvtár állítható elő az alábbi eljárás segítségével. Bővebben, az egyik módszer egy hasításos eljárás (Lam és mtsai.; Nature 354, 82-84, 1991). Ezen módszer szerint olyan szintetikus hordozókat (gyöngyöket) állítanak elő, amelyek mindegyike tartalmaz egy kötött specifikus aminosavat (egységet) és az előállításuk elkülönítve történik minden egység esetében. Az előállított hordozókat teljesen összekeverik és az egységek számával megegyező részekre osztják. Ezt követően a következő egységeket kötik hozzájuk. Ezt az eljárást „n” alkalommal megismétlik, hogy egy olyan könyvtárat állítsanak elő, amely „n” egységet kötött hordozókat tartalmaz. Ennek a szintetikus eljárásnak megfelelően mindegyik hordozókészlet egy adott szekvenciával rendelkezik. Ezért lehetséges a találmány szerinti fehérjéhez specifikusan kötődő peptidet azonosítani oly módon, hogy a találmány szerinti fehérje felhasználásával kiválasztják azt a hordozókészletet, ami pozitív jelet ad ezen szűrési eljárás során és a hordozókészleten kötött peptid aminosav sorrendjét

meghatározzák. Egy másik eljárás a fág bemutatás módszere, amely olyan fágokat használ, amelyek véletlenszerű aminosav sorrenddel rendelkező peptideket kódoló szintetikus DNS-t hordoznak. Az eljárásnak megvan az az előnye, hogy a könyvtárban a fent említett szintetikus peptid könyvtár eljárással összehasonlítva a molekulák száma megnő, és megvan az a hátránya, hogy adott számú molekula esetében kisebb a változatosság, mivel lehetnek olyan részleges szekvenciák, amelyek hiányoznak a könyvtárból, ha a fágok nem képesek ezen szekvenciák expresszáására. A fág bemutatás módszere esetében a találmány szerinti fehérjét felhasználó szűrő rendszer felhasználható a peptidet kódoló nukleotid szekvencia meghatározására. Ugyanis a találmány szerinti fehérjéhez specifikusan kötődő fágot mosási (panning) eljárással koncentráljuk, a kiválasztott fágot *Escherichia coliban* amplifikáljuk és a peptidet kódoló nukleotid szekvenciát meghatározzuk. Továbbá OBM vagy OBM receptor felé nagy specifitást és nagy affinitást mutató peptid a fent (2)- és (3)-ban említett szűrő rendszer felhasználásával peptid könyvtárból szűrhető OBM vagy OCIF jelenlétében végzett szűréssel, miközben az OBM vagy OCIF koncentrációját növeljük. Csak a pozitív hordozókészletek vagy fágok kerülnek ezen a módon kiválasztásra. Például EPO (eritropoietin)-szerű aktivitást mutató alacsony molekulatömegű peptid agonistákat szűrtek peptid könyvtárból eritropoietin (EPO) receptor felhasználásával, az eritropoietin hematopoietikus hormon, amelynek megvizsgálták a harmadlagos szerkezetét és erre a harmadlagos szerkezetre alapozva EPO-szerű aktivitást mutató alacsony molekulatömegű anyagokat (antagonistákat) szintetizáltak (Nicholas és mtsai.: Science, 273, 458-463, 1996).

A korábbiakban az osteoclastogenesis inhibíciós faktor (OCIF) segítségével felfedeztük, hogy az ST2 osteoblast sztrómális sejtvonalon specifikusan expresszálódik egy OCIF-kötő fehérje, amely sejteket olyan osteotropikus faktor jelenlétében növesztettük, mint például a D₃-vitamin aktív formája vagy a parathyroid hormon (PTH). Azt találtuk továbbá, hogy ez a fehérje olyan biológiai aktivitást mutat, amely éretlen osteoclast prekursor sejtekből történő osteoclast differenciációt és érését segít vagy stimulál és tisztításával a fehérje számos fizikokémiai tulajdonságát és a biológiai aktivitását tisztáztuk. Annak érdekében, hogy összehasonlítsuk a találmány szerinti DNS által expresszált rekombináns OBM-et és a fent említett tisztított, OCIF-hoz specifikusan kötődő természetes típusú fehérjét, megvizsgáltuk a két fehérje fizikokémiai tulajdonságait és biológiai aktivitásait. Eredményként a két fehérjéről megerősítettük, hogy ① mindketten olyan membránkötött fehérjék, amelyek specifikusan kötődnek az OCIF-hoz, ② SDS-PAGE eljárással meghatározva molekulatömegük hozzávetőlegesen 40.000 és ③ látszólagos molekulatömegük körülbelül 90.000-110.000 monomer formájú OCIF-hoz keresztkötve. Nem csak ezen fizikokémiai tulajdonságok megegyezők, hanem mindkét fehérje olyan biológiai aktivitást mutat, amely osteoclastok differenciációját vagy érését segíti vagy stimulálja, ami annak a lehetőségét sugallja, hogy ezek ugyanazon fehérjék. Ezenfelül a találmány szerinti DNS génmanipulációs technikák segítségével történő expressziójával előállított tisztított fehérje (rekombináns OBM) felhasználásával előállított nyúl anti-OBM poliklonális antitestről megállapítottuk, hogy a fent említett tisztított természetes típusú fehérjével

keresztreakcióba lép és gátolja ennek a tisztított természetes típusú fehérjének és az OCIF-nak a specifikus kötődését ugyanazon módon, mint ahogy az antitest gátolja az OBM és az OCIF specifikus kötődését. Ezen eredmények alapján világos, hogy a találmány szerinti DNS által expresszált rekombináns OBM azonos az OCIF-hoz specifikusan kötődő természetes típusú fehérjével.

OCIF-hoz specifikusan kötődő és a természetes típusú vagy rekombináns egér OBM dózishoz hasonló módon az egér lépsejtekből származó osteoclastok differenciációját és érését elősegítő és stimuláló aktivitást mutató humán OCIF-kötő fehérjét (amit ezután humán OBM-nek fogunk hívni) kódoló gén (cDNS) izolálásához humán nyirokcsomókból származó mRNS-ből előállított cDNS könyvtárat szűrtünk, próbaként humán OBM cDNS fragmenst felhasználva. A humán OBM cDNS fragmenst polimeráz láncreakció (PCR) segítségével kaptuk a fent említett eljárásnak megfelelően mind a humán nyirokcsomóból előállított cDNS, mint templát, mind az egér OBM cDNS-ből előállított primer felhasználásával. Ennek eredményeképpen izoláltuk az OCIF-hoz specifikusan kötődő humán fehérjét kódoló cDNS-t és meghatároztuk ezt a humán OCIF-kötő fehérjemolekulát kódoló cDNS (azaz a humán OBM-et kódoló cDNS) nukleotid szekvenciáját. Az egér OBM-hez hasonlóan, ennek a cDNS által kódolt humán OBM-nek megvannak azok a jellemzői, hogy a sejtmembránon erősen és specifikusan kötődik az OCIF-hoz és egér lépsejtekből származó osteoclastok differenciációját és érését segítő és előmozdító aktivitással rendelkezik. Bővebben, a találmány új humán OBM fehérjét kódoló DNS-t szolgáltat, amely fehérje az osteoclastogenesis inhibíciós faktorhoz (OCIF) kötődik, szolgáltat olyan fehérjét, amely a DNS által kódolt aminosav szekvenciával rendelkezik, szolgáltat egy

olyan fehérje előállítására szolgáló génmanipulációs technikák segítségével végzendő eljárást, amely jellemzően specifikusan kötődik az OCIF-hoz és jellemzően rendelkezik az egér lépsejtekből származó osteoclastok differenciációját és érését segítő és előmozdító aktivitással, szolgáltat ezt a fehérjét tartalmazó gyógyszerészeti készítményeket a csont-metabolizmus rendellenessége által okozott betegségek kezeléséhez, szolgáltat a humán OBM expresszióját szabályozó anyagok szűrésére szolgáló eljárást, szolgáltat a humán OBM aktivitását hozzákötődése által gátló vagy moduláló anyagok szűrésére szolgáló eljárást, szolgáltat olyan receptorok szűrésére szolgáló eljárást, amelyek a humán OBM-hez kötődnek és az OBM hatását közvetítik, és szolgáltat ezen szűrések során kapott anyagokat tartalmazó gyógyszerészeti készítményeket.

A jelen találmány továbbá olyan új humán OBM fehérjét kódoló DNS-t szolgáltat, amely specifikusan kötődik az OCIF-hoz és osteoclastok differenciációját és érését segítő és előmozdító biológiai aktivitást mutat, szolgáltat olyan fehérjét, amely a DNS által kódolt aminosav szekvenciával rendelkezik, szolgáltat egy olyan fehérje előállítására szolgáló génmanipulációs technika segítségével végzendő eljárást, amely jellemzően specifikusan kötődik az OCIF-hoz és jellemzően rendelkezik az osteoclastok differenciációját és érését segítő és előmozdító aktivitással, és szolgáltat ezt a fehérjét tartalmazó gyógyszerészeti készítményeket a csont-metabolizmus rendellenessége által okozott betegségek kezeléséhez. Továbbá a találmány eljárást szolgáltat a humán OBM expresszióját szabályozó anyagok szűréséhez, eljárást szolgáltat a humán OBM aktivitását hozzákötődése által gátló vagy moduláló anyagok szűrésére, eljárást

szolgáltatót olyan receptorok szűrésére, amelyek a humán OBM-hez kötődnek és az OBM hatását közvetítik, szolgáltatót humán OCIF-kötő fehérje elleni antitesteket, és szolgáltatót ezen antitesteket tartalmazó gyógyszerészeti készítményeket csont-metabolizmus rendellenességét okozó betegségek megelőzéséhez vagy kezeléséhez.

Az új, humán OCIF-kötő fehérjemolekula (OBM), amelyet a találmány szerinti DNS kódol, a következő fizikokémiai tulajdonságokkal és biológiai aktivitással rendelkezik.

(a) specifikusan kötődik az osteoclastogenesis inhibíciós faktorkhoz (OCIF) (WO 96/26217),

(b) a molekulatömege redukáló körülmények között végzett SDS-PAGE eljárással meghatározva hozzávetőlegesen 40.000 (± 5.000) és monomer formájú OCIF-hoz keresztkötve hozzávetőlegesen 90.000-110.000 látszólagos molekulatömeggel rendelkezik és

(c) osteoclastok differenciációját és érését segítő és stimuláló aktivitást mutat.

Az egér OCIF-kötő fehérjét kódoló egér OBM cDNS-t, amit próbaként használtunk a találmány szerinti humán OBM-et kódoló cDNS izolálásához és azonosításához, a fent említett eljárás szerint lehet az ST2 egér osteoblast sztrómális sejtvonal cDNS könyvtárából izolálni. A humán OBM cDNS expressziója során kapott fehérje tulajdonságainak és biológiai aktivitásának meghatározásához szükséges humán osteoclastogenesis inhibíciós faktort (OCIF) a WO 96/26217 számú szabadalmi leírásban ismertetett eljárás szerint lehet előállítani IMR-90 humán fibroblast sejtvonal tenyésztés-táptalajából történő izolálással vagy OCIF-ot kódoló DNS felhasználásával génmanipulációs technikák alkalmazásával. Rekombináns humán OCIF, rekombináns egér OCIF, rekombináns

patkány OCIF és hasonlókat használhatók a humán OBM tulajdonságainak és biológiai aktivitásának értékeléséhez. Ezen rekombináns OCIF-ok szokásos eljárásokkal megkaphatók, melyek szerint cDNS-t expressziós vektorba viszünk be, a cDNS-t állati sejtekben, mint például CHO sejtekben, BHK sejtekben vagy Namalwa sejtekben, vagy rovarsejtekben expresszáljuk és az expresszált fehérjét tisztítjuk.

A következő eljárások használhatók a célfehérjét kódoló humán cDNS izolálására (cDNS klónozás). ① Eljárás, amely tartalmazza a fehérje tisztítását, a fehérje parciális aminosav sorrendjének meghatározását és a cél-cDNS hibridizációval történő izolálását az aminosav sorrendnek megfelelő nukleotid szekvenciát tartalmazó DNS fragmens próbaként való felhasználásával, ② eljárás, amely még abban az esetben is alkalmazható, amikor nem ismert a fehérje aminosav sorrendje, tartalmazza egy cDNS könyvtár expressziós vektorban történő elkészítését, a cDNS könyvtár sejtekbe történő bevitelét és a cél-cDNS izolálásához a célfehérje expressziójára történő szűrést (expressziós klónozási eljárás) és ③ a cél humán fehérjét kódoló cDNS humán sejtek vagy szövetek felhasználásával készített cDNS könyvtárból való izolálására szolgáló eljárás hibridizáció segítségével vagy polimeráz láncreakció (PCR) alkalmazásával emlősből (embertől különböző) származó fehérjét kódoló cDNS próbaként történő felhasználásával, amely fehérje ugyanazon jellemzőkkel és biológiai aktivitással rendelkezik, mint az emberből származó célfehérje, feltételezve, hogy a klónozendó, emberből származó cDNS a cDNS próbával összehasonlítva nagy homológiával rendelkezik. Azon feltételezés alapján, hogy a humán OBM cDNS az egér OBM cDNS-sel összehasonlítva nagy homológiával rendelkezik, egér OBM cDNS-t próbaként

felhasználva Northern hibridizációs eljárás segítségével lehetséges annak meghatározása, hogy mely sejtek vagy szövetek termelnek humán OBM-et. Egér OBM cDNS-ből készített egér OBM primer felhasználásával a következő eljárás segítségével humán OBM cDNS kapható. Humán OBM cDNS fragmentumok előállíthatók PCR eljárással humán OBM-termelő szövetekből, mint például humán nyirokcsomókból előállított cDNS, mint templát felhasználásával. Ezen humán OBM cDNS fragmenseket próbákként használjuk a fent említett eljárás szerint azonosított humán OBM-termelő sejtek vagy szövetek cDNS könyvtárának szűréséhez. A találmány a humán OBM-et kódoló DNS-re vonatkozik, amely humán OBM jellemzője az OCIF-hoz való specifikus kötődés és osteoclastok differenciációját és érését segítő és előmozdító aktivitást mutat. Mivel a találmány szerinti DNS által kódolt OBM membránkötött típusú fehérje, amely transzmembrán domént tartalmaz, ez a fehérje detektálható OCIF jelölésével és a jelölt OCIF olyan állati sejt felszínéhez való kötődésének vizsgálatával, amelyben a találmány szerinti cDNS expresszáldott. A fent leírt jelölési eljárás a fehérjék jelöléséhez hagyományosan alkalmazott radioizotóp vagy fluoresceín felhasználásával használható OCIF jelölésére.

A találmány szerinti humán OBM cDNS által expresszált fehérje molekulatömege meghatározható gél-szűrési kromatográfiával, SDS-PAGE eljárással vagy más hasonló módszerrel. A molekulatömeg pontos meghatározása érdekében az SDS-PAGE eljárás használata kívánatos, miáltal a humán OBM redukáló körülmények között hozzávetőlegesen 40.000-es (40.000 ± 5.000) molekulatömegű fehérjének mutatkozott.

A találmány szerinti DNS hibridizációjához viszonylag enyhe körülményeket alkalmaztunk, például a DNS-t hagyományos eljárás szerint nylon membránra vittük és

ahhoz immobilizáltuk, izotóppal jelölt próba DNS-sel hibridizáltuk hibridizációs pufferoldatban 40-70°C-os hőmérsékleten körülbelül 2 óra - egy éjszaka időtartamon keresztül, ezt követően 0,5 x SSC-ben (0,075 M nátrium-klorid és 0,0075 M nátrium-citrát) 45°C-on, 10 percig mostuk. Konkrétan, nylon membránként Highbond N-t (Amersham Co.) használtunk, erre vittük fel és ezen immobilizáltuk a DNS-t. Ezután ³²P-ral jelölt DNS próbával hibridizáltuk a DNS-t egy gyors hibridizációs pufferben (Amersham Co.) 65°C-on, két órán keresztül, majd ezt követte egy 0,5 x SSC-ben 45°C-on, 10 percig tartó mosás.

Az ST2 egér osteoblast sztrómális sejtvonalból és egér lépsejtekből álló kokultúra rendszer, amelyben jelen van a D₃-vitamin aktív formája vagy a PTH, jól ismert, osteoclast képződéshez való tipikus in vitro tenyészrendszer. Az osteoblast sztrómális sejtek és lépsejtek adhéziója általi kölcsönhatás és egy olyan osteotropikus faktor, mint a D₃-vitamin aktív formája vagy a PTH jelenléte az osteoclastok képződéséhez nélkülözhetetlen ebben az in vitro tenyészrendszerben. Ebben az in vitro tenyészrendszerben a COS sejtek, a majom vesesejtek nem rendelkeznek osteoclast képzést segítő képességgel, osteotropikus faktor hiányában a lépsejtektől szerzik az osteoclastok képződését segítő képességet, ha a találmány szerinti cDNS expresszáldott, mint ahogy azt az ST2 osteoblast sztrómális sejtvonal tette. Annak alapján, hogy a találmány szerinti cDNS olyan fehérjét kódol, amely transzmembrán domén formát tartalmaz, ez a cDNS szekréciós formában vagy ezt a transzmembrán domént kódoló rész eltávolítása által oldható formában expresszáldható. Igazoltuk, hogy osteotropikus faktorok hiánya esetén a humán OBM szekréciós formájának a fent említett in vitro

tenyésztéshoz történő hozzáadása esetén osteoclastok tudnak képződni. Ezen eredmények alapján a találmány szerinti cDNS által kódolt humán OBM olyan faktorként adható meg, amely osteoclastok differenciációjában és érésében játszik szerepet.

A rekombináns humán OBM előállítható a találmány szerinti cDNS expressziós vektorba történő bevitelével, humán OBM expressziós plazmid előállításával, a plazmid különböző sejtörzsekbe történő bevitelével és az OBM sejtekben történő expresszálasával. Az OBM expresszálasához gazdasejteként emlős sejtek, mint például a COS-7, a CHO, a Namalwa sejtek, vagy baktériumok, mint például az *Escherichia coli* használhatók. Ebben az esetben lehetséges a teljes hosszúságú DNS felhasználásával az OBM membránkötött formájú fehérjeként vagy szekréciós formában vagy a transzmembrán domént kódoló rész eltávolításával oldható formájú fehérjeként történő expresszálasa. Az így előállított rekombináns OBM hatékonyan tisztítható szokásos fehérjék tisztításához használatos hagyományos tisztítási eljárások, mint például az affinitás kromatográfia OCIF-immobilizált oszlopok felhasználásával, ioncserés kromatográfia és géliszűrési kromatográfia megfelelő kombinációjával. Az így kapott találmány szerinti humán OBM hasznos ágens a csont-metabolizmus rendellenessége, mint például az osteopetrosis által okozott betegségek kezeléséhez vagy reagensként ilyen betegségek kutatásához és diagnosztikájához.

A következő szűrési eljárások végezhetők el a találmány szerinti DNS által kódolt OBM fehérje felhasználásával: (1) olyan anyagok szűrése, amelyek a humán OBM expresszióját tudják szabályozni, (2) olyan anyagok szűrése, amelyek specifikusan kötődnek a humán

OBM-hez és gátolják vagy módosítják az OBM biológiai aktivitását, és (3) olyan humán fehérjék szűrése, amelyek jelen vannak az osteoclast prekursor sejtekben és a humán OBM biológiai aktivitását közvetítik (humán OBM receptor). Ezen humán OBM receptor felhasználásával antagonisták és agonisták kifejlesztése is lehetséges. A kombinatorikus kémiában a humán OBM vagy humán OBM receptor felhasználásával antagonisták és agonisták szűréséhez szükséges peptid könyvtárak állíthatók elő ugyanazzal az eljárással, amit az egér OBM felhasználásával végzett szűréshez használtunk. Peptid könyvtárak egér OBM helyett humán OBM-mel történő szűrése esetén kimagaslóan nagy specifitású és affinitású peptid kapható.

Bár ez az OBM, mint ahogy fent említettük, nagyon hasznos és az OBM koncentrációjának meghatározásához nélkülözhetetlenek az OBM-et specifikusan felismerő antitestek és ezen antitestek felhasználásával végrehajtott enzim immunoassay, még nem állnak rendelkezésre olyan antitestek, amelyek az OBM koncentrációjának meghatározásához felhasználhatóak lennének. Ezenfelül az OBM vagy az sOBM biológiai aktivitását semlegesítő anti-OBM antitest vagy anti-sOBM antitest feltételezhetően elnyomja az OBM vagy sOBM aktivitását, konkrétan az osteoclast képződés indukálódásának aktivitását. Ezek várhatóan hasznos terápiás ágensek a csont-metabolizmus rendellenességének kezelésére. Jóllehet, mindeddig nem álltak rendelkezésre ilyen antitestek.

Tekintettel erre a helyzetre, a kiterjedt vizsgálatokat folytattunk. Ennek eredményeképpen a találtunk olyan antitesteket (anti-OBM/sOBM antitesteket), amelyek mind az osteoclastogenesis inhibíciós faktorhoz (OCIF) specifikusan kötődő membránkötött fehérjét, az OBM-

et, mind a szolubilis OBM-et (sOBM), amelynek transzmembrán doménja hiányzik, felismerik. Ennek megfelelően a találmány olyan antitesteket (anti-OBM/sOBM antitestek) szolgáltat, amelyek mind az osteoclastogenesis inhibíciós faktorhoz (OCIF) specifikusan kötődő membránkötött fehérjét, az OBM-et, mind az sOBM-et, amelynek transzmembrán doménja hiányzik, felismerik; szolgáltat továbbá ezek előállítására szolgáló eljárást; ezen antitestek felhasználásával az OBM és sOBM koncentrációjának meghatározására szolgáló eljárást; és a csont-metabolizmus rendellenességének következtében fellépő betegségek megelőzésére vagy kezelésére szolgáló ágenseket.

A találmány olyan antitestekre (anti-OBM/sOBM antitestek) vonatkozik, amelyek mind az osteoclastogenesis inhibíciós faktorhoz (OCIF) specifikusan kötődő membránkötött fehérjét, az OBM-et, mind a szolubilis OBM-et (sOBM), amelynek transzmembrán doménja hiányzik, felismerik; vonatkozik továbbá ezek előállítására szolgáló eljárásra; ezen antitestek felhasználásával az OBM és sOBM kvantifikálására szolgáló eljárásra; és a csont-metabolizmus rendellenességének következtében fellépő betegségek megelőzésére vagy kezelésére szolgáló ágensekre.

A találmány szerinti antitestek az osteoclastogenesisist gyorsító aktivitást semlegesítő aktivitást mutatnak, amely osteoclastogenesisist gyorsító aktivitás az OBM és sOBM biológiai aktivitása és az antitestek a következő jellemzőkkel rendelkeznek:

- a) olyan poliklonális antitest, amely mind az egér OBM-et, mind az egér sOBM-et felismeri (anti-egér OBM/sOBM poliklonális antitest),

- b)olyan poliklonális antitest, amely mind a humán OBM-et, mind a humán sOBM-et felismeri (anti-humán OBM/sOBM poliklonális antitest),
- c)olyan monoklonális antitestek, amelyek mind az egér OBM-et, mind az egér sOBM-et felismerik (anti-egér OBM/sOBM monoklonális antitestek),
- d)olyan monoklonális antitestek, amelyek mind a humán OBM-et, mind a humán sOBM-et felismerik (anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitestek), és
- e)olyan anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitestek, amelyek mind az egér OBM felé, mind az egér sOBM felé keresztreakciót mutatnak.

Az olyan poliklonális antitestet, amely mind az egér OBM-et mind az egér sOBM-et felismeri (ezt követően anti-egér OBM/sOBM poliklonális antitestnek nevezve), és az olyan poliklonális antitestet, amely mind a humán OBM-et mind a humán sOBM-et felismeri (ezt követően anti-humán OBM/sOBM poliklonális antitestnek nevezve) a következő eljárás szerint állítottuk elő. A tisztított egér OBM, amit antigénként használtunk immunizációhoz, a fentebb említett eljárás szerint kapható meg. Bővebben, ST2 egér osteoblast sztrómális sejtvonalat a D₃-vitamin aktív formájával kezeltünk és a sejtmembránon lévő OBM-et OCIF-immobilizált oszlop és géliszűrőses kromatográfia segítségével tisztítottuk, így kaptuk meg a természetes egér OBM-et (natív OBM). A fent említett egér OBM cDNS-t (SEQ ID NO 15) vagy humán OBM cDNS-t (SEQ ID NO 12) expressziós vektorba vittük be szokásos módszerek szerint. A rekombináns egér OBM-et (SEQ ID NO 1) és a rekombináns humán OBM-et (SEQ ID NO 11) megkaphatjuk a cDNS állati sejtekben, mint például CHO sejtekben, BHK sejtekben,

Namalwa vagy COS-7 sejtekben, rovar sejtekben vagy *Escherichia coli*-ban való expresszáltatásával, és ezek a fent említettekkel megegyező tisztítási eljárások felhasználásával való tisztításával. Ezek immunizációhoz antigénként használhatók fel. Ebben az esetben az egér OBM vagy humán OBM, amelyek membrán kötött fehérjék, nagy mennyiségű és nagy koncentrációjú tisztítása sok laboratóriumi munkát igénylő feladat. Másrészt, mint ahogy fent említettük, az OBM-ről, amely egy membránkötött fehérje és a szolubilis OBM-ről (sOBM), amelyet úgy kaptunk, hogy az OBM transzmembrán doménjét kitöröltük, úgy tudjuk, hogy majdnem egyformák az osteoclast differenciációban és érésben szerepet játszó aktivitásukat tekintve. Az egér sOBM-et és humán sOBM-et, amelyek relatíve könnyen expresszáltathatók és tisztíthatók nagy koncentrációban, fel lehet használni immunizációhoz antigénként.

Az egér sOBM-et (SEQ ID NO 16) és humán sOBM-et (SEQ ID NO 17) megkaphatjuk úgy, hogy más szekréciós fehérjéből származó ismert szignál szekvenciát kódoló nukleotid szekvenciát toldunk az egér sOBM cDNS (SEQ ID NO 18), illetve a humán sOBM cDNS (SEQ ID NO 19) 5' végének felső szakaszához, ezeket génmanipulációs technikák felhasználásával expressziós vektorba visszük, kifejeztetve ezáltal ezen fehérjéket olyan gazdasejtekben, mint például különböző állati sejtek, rovar sejtek vagy *Escherichia coli*, és az így kapott termékeket tisztítjuk. Az így kapott immunizációhoz való antigéneket foszfáttal pufferelt konyhasóoldatban (PBS) feloldjuk, amennyiben szükséges, az oldat emulgeálása céljából ugyanakkora térfogatú Freund-féle komplett hatásjavítóval keverjük, és szubkután módon adjuk be az állatoknak körülbelül hetente egyszer az állatok többször történő immunizálásához.

Amennyiben az antitest titer eléri a maximumot, egy emlékeztető injekciót adunk be. Az emlékeztető injekció beadását követő 10 nap múlva vesszük le a vért. Az így kapott antiszérumot ammónium-szulfáttal kicsapatjuk. Az IgG frakciót anioncserélő kromatográfia vagy protein-A- vagy protein-G-Sepharose oszlopkromatográfia felhasználásával tisztítjuk, miután kötő pufferrel (Binding Buffer™, Biorad Co.) kétszeresen hígítottuk az antiszérumot, így kapjuk az anti-egér vagy anti-humán OBM/sOBM poliklonális antitestet.

A találmány szerinti monoklonális antitestek a következő eljárás szerint kaphatók meg. Ugyanúgy, mint a poliklonális antitestek esetében, természetes egér OBM-et (natív OBM), rekombináns egér vagy humán OBM-et, vagy rekombináns egér vagy humán sOBM-et lehet immunogénekként felhasználni monoklonális antitestek előállításához. Szokásos eljárásokkal hibridómákat állítunk elő emlősök ezen antigénekkal való immunizálásával, vagy limfociták in vitro immunizálásával és az immunizált sejtek mielóma sejtekkel történő fuzionálásával. Az így kapott hibridóma tenyészet felülúszóját szilárd fázisú ELISA eljárással analizálva kiválasztjuk az alaposan megtisztított antigéneket felismerő antitest termelő hibridómákat. Az így kapott hibridómákat klónozzuk és megállapítható, hogy ezek stabil antitesttermelő hibridóma klónok. Ezen hibridómákat antitest termelés céljából növesztjük. Kis emlősöket, mint például egereket vagy patkányokat használunk általában hibridómák előállításához. Az állatokat úgy immunizáljuk, hogy megfelelő oldószerben, mint például a fiziológiai sóoldat, megfelelő koncentrációra hígított antigént intravénásan vagy intraperitóniásan injekció formájában beadunk. Esetleg az antigénnel együtt használható a Freund-féle komplett

hatásjavító. Ezeket általában három-négy alkalommal injektáljuk, hetente egyszer vagy minden két hétben. Három nappal az utolsó immunizáció után az immunizált állatokat felboncoljuk. A kivett lépéből származó splenocitákat használjuk immunizált sejtekként. Az immunizált sejtekkel történő fúzióhoz való egér mielóma sejtekként a p3/x63-Ag8, a p3-U1, az NS-1, az MFC-11, az SP-2/0, az F0, a P3x63 Ag8.653, és az S194 adhatók meg. Patkányból származó sejtekként az olyan sejtvonal, mint az R-210 adható meg. Humán antitesteket humán B-limfociták in vitro immunizálásával állítunk elő és az immunizált sejteket humán mielóma sejtekkel vagy EB vírussal transzformált sejtvonallal fuzionáljuk. Az immunizált sejtek és mielóma sejtek fúzióját szokásos eljárások alapján lehet elvégezni, mint a például Koehler és Milstein-féle eljárás (Koehler és mtsai.: Nature 256, 495-497 (1975)). Elektromos pulzust használó eljárás is alkalmazható. Az immunizált limfocitákat és mielóma sejteket a szokásos, elfogadott arányban összekeverjük és egy olyan FCS-nélküli (magzati borjúsérum nélküli) tenyésztápközegben fuzionáljuk, amelyhez polietilén-glikolt adtunk, és egy FCS-tartalmú HAT szelekciós tápközegben növesztjük őket, hogy kiválasszuk a fuzionált sejteket (hibridómákat). A következő lépésben szokásos antitest felismerő eljárás, mint például ELISA, plakk-technika, Ouchterlony-eljárás vagy aggregációs módszer segítségével kiválasztjuk az antitest termelő hibridómákat, hogy stabil hibridómákat kapjunk. Az ilyen módon kapott hibridómákat kivánság szerint szokásos növesztési eljárás segítségével másodlagosan növeszthetjük vagy fagyasztva tárolhatjuk. Hibridómát szokásos eljárás segítségével növeszthetünk, hogy a tenyészet felülszóját összegyűjtsük, vagy emlősök hasüregébe ültethetjük, hogy a hasüregi fluidumból

megkapjuk az antitestet. A tenyészet fluidumában vagy a hasüregi folyadékban lévő antitestet olyan szokásos eljárás szerint tisztíthatjuk, mint a kisózás, ioncserélő és géliszűrési kromatográfia vagy protein-A- vagy protein-G affinitás kromatográfia. Antigénként sOBM felhasználásával kapott szinte mindegyik monoklonális antitest specifikusan fel tudja ismerni nem csak az sOBM-et, hanem az OBM-et is (az ilyen antitesteket ezt követően anti-OBM/sOBM monoklonális antitesteknek fogjuk nevezni). Ezen antitestek felhasználhatók az OBM vagy sOBM kvantifikálására. Az OBM vagy sOBM mennyisége kvantifikálható ezen antitestek radioizotóppal vagy enzimmal való jelölésével és a jelölt antitestek radioimmunoassay (RIA) vagy enzimimmunoassay (EIA) néven ismert kvantifikációs rendszerekkel való vizsgálatával. Ezen kvantifikációs rendszerek felhasználásával biológiai mintákban, mint például vérben vagy vizeletben könnyedén meghatározható az sOBM mennyisége nagy érzékenységgel. Továbbá ezen antitestek felhasználásával végzett kötődési assay segítségével nagy érzékenységgel könnyedén mérhető a szövethez vagy sejtfelszínhez kötődő OBM.

Amennyiben emberek gyógykezelésére használunk antitestet, kívánatos, hogy humán-típusú anti-humán OBM/sOBM antitestet használjunk tekintettel az antigenitásra. A humán-típusú anti-humán OBM/sOBM antitest előállítható a következő ①, ② vagy ③ eljárások alapján. Az ① eljárás szerint humán perifériális vérből vagy lépéből gyűjtött humán limfocitákat immunizálunk IL-4 jelenlétében humán OBM vagy humán sOBM antigénnel. Az így kapott immunizált humán limfocitákat K6H6/B5-tel (ATCC CRL1823) fuzionáljuk, amely egér és ember heterohibridómája, és szűrjük, hogy hozzájussunk a célantitestet termelő hibridómákhoz. Az így kapott

antitest-termelő hibridómák által termelt antitestek humán típusú anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitestek. Ezen antitestek közül kerülnek kiválasztásra a humán OBM/sOBM aktivitását semlegesítő antitestek. Ennek ellenére humán limfociták in vitro immunizálásának módszerével általában nehéz antigén felé nagy affinitást mutató antitestet előállítani. Ezért annak érdekében, hogy humán OBM és sOBM felé nagy affinitást mutató monoklonális antitesteket kapjunk, szükséges, hogy a fenti eljárás segítségével kapott humán típusú anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitestek affinitását megnöveljük. Ez a következő eljárás alapján végezhető el. Először egy humán típusú anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitest CDR régiójába (pontosabban a CDR3 régiójába) véletlenszerű mutációt viszünk be, ami semlegesíti az OBM-et, de alacsony az affinitása, és a fagot a fehérje expresszáására készíti. A fagokat, amelyek képesek a humán OBM/sOBM-hez erősen kötődni, fágmegjelenítési eljárással kiválasztjuk olyan lemezek segítségével, amelyeken humán OBM/sOBM antigéneket immobilizáltunk. A kiválasztott fagokat *Escherichia coliban* növesztjük. A nagy affinitást mutató CDR aminosav szekvenciáját a fágban klónozott DNS nukleotid szekvenciájából meghatározzuk. Az így kapott humán típusú anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitestet kódoló DNS-t emlős sejtekhez általánosan használt expressziós vektorba visszük a humán típusú anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitestek előállítása céljából. A nagy affinitást mutató és a humán OBM/sOBM biológiai aktivitásának semlegesítésére képes cél humán típusú anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitestek ezen monoklonális antitestek közül választhatók ki. A ② eljárás szerint egér típusú anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitesteket állítunk elő ugyanazon módszer szerint, mint a jelen találmányban,

BALB/c egér felhasználásával (Koehler és mtsai.: Nature 256, 495-49, 1975), és kiválasztjuk az olyan monoklonális antitesteket, amelyek semlegesíteni tudják a humán OBM/sOBM biológiai aktivitását és nagy affinitást mutatnak. Ezek a nagy affinitású egér anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitestek humán típusúvá alakíthatók CDR-átültetés eljárás (Winter és Milstein: Nature 349, 293-299, 1991) felhasználásával oly módon, hogy ennek CDR régióit (CDR 1, 2 és 3) a humán IgG CDR régióiba ültetjük. A ③ eljárás szerint humán perifériális vér limfocitákat ültetünk be súlyos, kombinált immunhiányos (SCID) egérbe. Mivel az implantált SCID egér humán antitesteket tud termelni (Mosier D. E. és mtsai.: Nature 335, 256-259, 1988; Duchosal M. A. és mtsai.: Nature 355, 258-262, 1992), ezért humán OBM-mel vagy sOBM-mel immunizált SCID egér szűrésével humán OBM/sOBM-re specifikus humán monoklonális antitesteket előállítani képes limfocitákat lehet összegyűjteni. A fent ismertetett humán antitestekre vonatkozó ① eljárásban leírt módszer szerint fuzionáljuk az így kapott limfocitákat K6H6/B5-tel (ATCC CRL1823), amely egér és ember heterohibridóma. Az így kapott hibridóákat szűrjük, hogy olyan hibridóákat kapjunk, amelyek a cél humán monoklonális antitesteket tudják termelni. Az így kapott hibridóákat nagy mennyiségű cél humán monoklonális antitest termelése céljából növesztjük. Az antitestek a fent említett tisztítási eljárással tisztíthatók. Lehetséges továbbá rekombináns humán monoklonális antitest nagy mennyiségben történő előállítása a cél humán monoklonális antitestek termelésére képes hibridómából történő cDNS könyvtár előállításával oly módon, hogy a cél humán típusú monoklonális antitesteket kódoló gént (cDNS) klónozással előállítjuk, ezen gént megfelelő expressziós vektorba

génmanipulációs technikák segítségével bevisszük és a gazdasejtekben, mint különféle állati sejtekben, rovarsejtekben vagy *Escherichia coliban* a monoklonális antitesteket expresszáljuk. Nagy mennyiségű tisztított humán monoklonális antitest megkapható úgy, hogy az előbbiek során kapott tenyészet felülűszojából a fent említett tisztítási eljárások segítségével tisztítjuk.

Az OBM/sOBM biológiai aktivitását semlegesíteni tudó antitestek megkaphatók ezen eljárás szerint előállított anti-OBM/sOBM monoklonális antitestekből. Az OBM/sOBM biológiai aktivitását semlegesítő antitestek hasznos ágensek lehetnek a csont-metabolizmus rendellenességének kezelésére vagy megelőzésére az OBM/sOBM biológiai aktivitásának *in vivo* blokkolásának képessége által, konkrétan az osteoclast képződés indukciójának megelőzésére való képessége által. Az anti-OBM/sOBM antitestek az OBM vagy sOBM biológiai aktivitását semlegesítő aktivitása mérhető az osteoclast képződést gátló aktivitásának *in vitro* rendszerben történő meghatározásával. Részletesebben, a következő *in vitro* osteoclastogenesis tenyésztérendszer adható meg: ① az ST2 egér osteoblast sztrómális sejtvonal és egér lépsejtek kokultúra rendszere, amelyben jelen van a D₃-vitamin aktív formája és a dexametazon, ② egy olyan kokultúra rendszer, amely tartalmazza az OBM-et expresszáló COS-7 majomvese sejtvonalat, az OBM-et expresszáló sejtek formaldehiddel történő immobilizálását és ezen sejteken egér lépsejtek növesztését M-CSF jelenlétében és ③ egér lépsejtek tenyésztérendszerét, amelyben rekombináns sOBM és M-CSF van jelen. Az anti-OBM/sOBM antitestek osteoclastogenesis gátló aktivitása anti-OBM/sOBM antitestek ezen tenyésztérendszerekhez különböző koncentrációkban történő hozzáadásával és az osteoclast képződésre kifejtett

hatásuk vizsgálatával mérhető. Az anti-OBM/sOBM antitestek osteoclastogenezist gátló aktivitása vizsgálható továbbá a csont-reszorpciót gátló aktivitásuk mérésével kísérleti állatok in vivo felhasználásával. Főképpen eltávolított petefészke állati modell adott olyan állati modellként, amely progresszív osteoclast képződéssel rendelkezik. Az anti-OBM/sOBM antitestek osteoclastogenezist gátló aktivitása meghatározható az anti-OBM/sOBM antitestek ilyen kísérleti állatoknak történő beadásával és a csontképződés visszaszorítotttságának (csontsűrűséget növelő aktivitás) számszerűsítésével.

Az OBM/sOBM biológiai aktivitásának semlegesítésére képes ilyen módon kapott antitestek hasznosak gyógyszerészeti készítményekben, különös tekintettel csont-metabolizmus rendellenességének megelőzéséhez vagy kezeléséhez való gyógyszerészeti készítményekben, vagy ilyen betegségek immunológiai diagnózisához antitestekként. A jelen találmány szerinti antitesteket tartalmazó készítményeket akár orális akár nem-orális úton lehet beadni. Az ilyen készítmények embereknek vagy állatoknak biztonságosan beadhatók olyan gyógyszerészeti készítményekként, amelyek az egyik aktív komponensként az OBM-et és/vagy sOBM-et felismerő antitesteket tartalmaznak. A gyógyszerészeti készítmények formáiként az intravénás cseppet magukba foglaló injekciós ágenseket, kúp-ágenseket, nyelv alatt használatos ágenseket, bőr alatti abszorpciós ágenseket és hasonlókat adunk meg. Mivel a monoklonális antitestek makromolekuláris fehérjék, nemcsak könnyen tapadnak az üvegedényhez, mint a fiolához vagy fecskendőhöz, hanem fizikokémiai faktorok, mint a hőmérséklet, pH vagy nedvesség hatására könnyen denaturálódnak. Ezért a készítményeket stabilizátorok, pH-beállítók, pufferelő ágensek, szolubilizáló ágensek vagy

detergensek hozzáadásával szükséges stabilizálni. Stabilizátorokként aminosavak, mint a glicin és alanin, szacharidok, mint a dextrán 40 és a mannóz és cukoralkoholok, mint a szorbitol, mannitol és xilitol adhatók meg. Ezen stabilizátorok akár egyenként, akár kettő vagy több kombinációjában használhatók. A hozzáadandó stabilizátorok mennyisége előnyösen az antitest mennyiségének 0,01-szorosától 100-szoros, még előnyösebben 0,1-szeresétől 10-szeres mennyiségig terjed. Ezen stabilizátorok hozzáadása megnöveli a folyékony készítmények vagy liofilizált termékek tárolási stabilitását. Pufferelő ágensekként megemlítjük például a foszfát puffereket és a citrát puffereket. A pufferelő ágensek nemcsak a liofilizált termékek visszaoldásakor kapott folyékony készítmények vagy vizes oldatok pH-értékét állítják be, hanem az antitest stabilitását és oldhatóságát is növelik. Kíváncos, hogy a pufferelő ágens akkor mennyiségben adjuk a liofilizált termékből készített folyékony készítményhez vagy vizes oldathoz, hogy ennek koncentrációja 1mM-től 10mM-ig terjedjen. Detergensre példaként a Polisolbate 20-at, a Pulluronic F-68-at és a polietilén-glikolt említjük. Különösen előnyös például a Polisolbate 80. Ezen detergenseket akár egyenként, akár kettő vagy több kombinációjaként lehet használni. A makromolekuláris fehérjék, mint például az antitestek, könnyen tapadnak az üvegedényekhez. Liofilizált termék visszaoldásával előállított folyékony készítményben vagy vizes oldatban lévő antitestek edényhez való tapadása megelőzhető ilyen detergensek 0,001-1,0%-os koncentrációban való hozzáadásával. A találmány szerinti antitesteket tartalmazó készítmények megkaphatók stabilizátorok, pufferelő ágensek vagy adszorpciót gátló ágensek hozzáadásával. Amennyiben a készítményeket

gyógykezelésre vagy állatok esetében használjuk injekciós ágensként, az ilyen injekciós ágenseknek előnyösen 1-től 2-ig terjedő ozmotikus nyomás aránnyal kell rendelkezniük. Az ozmotikus nyomás arány a készítmény előállításakor a nátrium-klorid mennyiségének növelésével vagy csökkentésével állítható be. Egy készítményben az antitest mennyisége a betegségtől, a beadás módjától és hasonlóktól függően megfelelően beállítható. Emberek számára a humán antitest dózisa változtatható az antitest humán OBM/sOBM felé mutatott affinitásának függvényében, különösen a humán OBM/sOBM disszociációs konstansának (K_d érték) függvényében. Minél nagyobb az affinitás (vagy minél kisebb a K_d érték), annál kisebb dózist kell az embernek beadni ahhoz, hogy egy bizonyos gyógyhatást elérjünk. Mivel egy humán-típusú antitest a vérben hosszú, 20 napos félélettartammal rendelkezik, elegendő ezt embereknek körülbelül 0,1-100 mg/kg dózisban egy 1-30 napos periódusban egyszer vagy többször beadni.

Az 1. ábra a 3. példában kapott, találmány szerinti egér OBM fehérje SDS-PAGE vizsgálatának eredményét mutatja.

A jelölések magyarázata:

(A): 1. sáv: molekulatömeg markerek

2. sáv: Egy részlegesen tisztított minta (Gly-HCl (pH 2,0) elúciós frakció), amit D_3 -vitamin aktív formájának és dexametazonnak a jelenlétében növesztett ST2 sejtekből kaptunk.

3. sáv: Egy részlegesen tisztított minta (Gly-HCl (pH 2,0) elúciós frakció), amit D_3 -vitamin aktív formájának és

dexametazonnak a hiányában növesztett ST2 sejtekből kaptunk.

(B): 1. sáv: molekulatömeg markerek

2. sáv: A találmány szerinti egér OBM fehérje a fordított fázisú nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiával való tisztítás után (3. példa).

A 2. ábrán a 4. példa szerinti, a ^{125}I -tel jelölt OCIF ST2 osteoblast sztrómális sejtekhez való kötődését vizsgáló assay eredménye látható.

A 3. ábra az 5.(1) példában említett különböző generációkból származó ST2 osteoblast sztrómális sejtek osteoclast képző képességét mutatja.

A jelölések magyarázata:

- 1: A körülbelül 10. szubkultúrából származó ST2 sejtek azon képessége, hogy az osteoclast képződést segítik.
- 2: A körülbelül 40. szubkultúrából származó ST2 sejtek azon képessége, hogy az osteoclast képződést segítik.

A 4. ábra az 5.(2) példa szerinti, D_3 -vitamin aktív formája és dexametazon jelenlétében növesztett osteoblast sztrómális sejtek sejtmembránján lévő találmány szerinti fehérje expressziójának időbeli változását mutatja.

Az 5. ábra az 5.(2) példa szerinti, a kokultúra rendszerben végbemenő osteoclast képződés időbeli változását mutatja.

A 6. ábrán az 5.(2) példa szerinti, OCIF-fal történt kezelés esetén az osteoclast képződésre kifejtett inhibíciós hatás látható különböző tenyészperiódusokban a kokultúra periódus során.

A 7. ábra a 6. példában említett ^{125}I -tel jelölt OCIF és a találmány szerinti fehérje keresztkötés tesztjének eredményeit szemlélteti.

A jelölések magyarázata:

1. sáv: ^{125}I -jelölt OCIF-CDD1
2. sáv: ^{125}I -jelölt OCIF-CDD1 ST2 sejtekkel keresztkötve
3. sáv: keresztkötött ^{125}I -jelölt OCIF-CDD1 jelöletlen OCIF 400-szoros feleslegének a jelenlétében.

A 8. ábra a 9. példa szerinti SDS-PAGE eredményét mutatja.

A jelölések magyarázata:

1. sáv: pOBM291-gyel transzfektált COS-7 sejtek fehérjéi, amelyeket immunoprecipitáltunk OCIF hiányában.
2. sáv: pOBM291-gyel transzfektált COS-7 sejtek fehérjéi, amelyeket immunoprecipitáltunk OCIF jelenlétében.

A 9. ábra a ^{125}I -tel jelölt OCIF pOBM291-gyel transzfektált COS-7 sejtekhez való kötődési képességének vizsgálatának eredményeit mutatja.

A jelölések magyarázata:

1. és 2. sávok: a pOBM291-gyel transzfektált COS-7 sejtekhez kötődő ^{125}I -tel jelölt OCIF mennyisége.
3. és 4. sávok: a pOBM291-gyel transzfektált COS-7 sejtekhez kötődő ^{125}I -tel jelölt OCIF mennyisége 400-szoros feleslegben jelen lévő jelöletlen OCIF esetén.

A 10. ábrán a 11. példában említett ^{125}I -tel jelölt OCIF felhasználásával végzett keresztkötési teszt eredménye látható.

A jelölések magyarázata:

1. sáv: ^{125}I -tel jelölt OCIF.
2. sáv: ^{125}I -tel jelölt OCIF pOBM291-gyel transzfektált COS-7 sejtekkel keresztkötve.
3. sáv: ^{125}I -tel jelölt OCIF pOBM291-gyel transzfektált COS-7 sejtekkel keresztkötve 400-szoros feleslegben jelenlévő jelöletlen OCIF esetén.

A 11. ábra a 12. példában kapott Northern Blott eredményét mutatja.

A jelölések magyarázata:

1. sáv: olyan ST2 sejtekből származó RNS, amelyeket D-vitamin és dexametazon hozzáadása nélkül növesztettünk.
2. sáv: olyan ST2 sejtekből származó RNS, amelyeket D-vitamin és dexametazon hozzáadásával növesztettünk.

A 12. ábra a 14.(2) példában közölteket szemlélteti, a kondicionált tápközegben lévő fehérjék OCIF kötő képességét mutatja különböző OCIF koncentrációk esetén.

A jelölések magyarázata:

O: pCEP4

●: pCEP sOBM

A 13. ábra a 13.(2) példában leírtakat szemlélteti, a kondicionált tápközegben lévő fehérjék OCIF kötő képességét mutatja különböző kondicionált tápközeg arányok esetén.

A jelölések magyarázata:

O: pCEP4

●: pCEP sOBM

A 14. ábra a 14.(2) példában leírt SDS-PAGE vizsgálatnak az eredményét mutatja, amelyet *Escherichia coliban* expresszált egér OBM-et és tioredoxint tartalmazó fúziós fehérjével végeztünk.

A jelölések magyarázata:

1. sáv: molekulatömeg markerek
2. sáv: GI724/pTrxFus-ból származó oldható fehérje frakciók.
3. sáv: GI724/pTrxOBM25-ből származó oldható fehérje frakciók.

A 15. ábra különböző arányú oldható fehérje frakciók esetén mutatja az OCIF-kötő képességet a 14.(3) példában leírtak alapján.

A jelölések magyarázata:

□: GI724/pTrxFus

O: GI724/pTrxOBM25

A 16. ábra az oldható fehérje frakciók (1%) OCIF-kötő képességét mutatja különböző OCIF koncentrációk esetén a 14.(3) példa alapján.

A jelölések magyarázata:

□: GI724/pTrxFus

O: GI724/pTrxOBM25

A 17. ábra a találmány szerinti egér OBM cDNS expressziója során kapott egér OBM OCIF-hoz való specifikus kötődésének gátlását mutató eredményeit és a természetes OCIF-kötő fehérje nyúl anti-egér OBM antitest segítségével történő tisztítását ábrázolja.

A jelölések magyarázata:

- 1: A cDNS antitest, OBM + ^{125}I -OCIF jelenlétében való expresszállása által előállított tisztított OBM.
- 2: Az antitest + ^{125}I -OCIF jelenlétében a természetes fehérje.
- 3: A cDNS antitest, egér OBM + ^{125}I -OCIF hiányában való expresszállása által előállított egér OBM.
- 4: Az antitest + ^{125}I -OCIF hiányában a természetes fehérje.
- 5: 3 + jelöletlen OCIF (a ^{125}I -OCIF-hoz képest 400-szoros mennyiségben).
- 6: 4 + jelöletlen OCIF (a ^{125}I -OCIF-hoz képest 400-szoros mennyiségben).

A 18. ábra a találmány szerinti cDNS által expresszált humán OBM fehérje SDS-PAGE vizsgálatának az eredményét mutatja.

A jelölések magyarázata:

1. sáv: molekulatömeg markerek
2. sáv: phOBM-mel transzfektált COS-7 sejtek (olyan expressziós vektor, amely a találmány szerinti cDNS-t tartalmazza) fehérjéi, amelyeket OCIF hiányában nyúl anti-OCIF poliklonális antitesttel immunprecipitáltunk.
3. sáv: phOBM-mel transzfektált COS-7 sejtek (olyan expressziós vektor, amely a találmány szerinti cDNS-t tartalmazza) fehérjéi, amelyeket OCIF jelenlétében nyúl anti-OCIF poliklonális antitesttel immunprecipitáltunk.

A 19. ábra az OCIF olyan phOBM-mel transzfektált COS-7 sejtekhez való kötődésének vizsgálatai eredményét mutatja, amely sejtek a találmány szerinti cDNS-t tartalmazó expressziós vektorok.

A jelölések magyarázata:

1. sáv: phOBM-mel transzfektált COS-7 sejtek és ^{125}I -OCIF hozzáadása.
2. sáv: phOBM-mel transzfektált COS-7 sejtek és ^{125}I -OCIF hozzáadása 400-szoros mennyiségű jelöletlen OCIF jelenlétében.

A 20. ábra a humán OBM ^{125}I -OCIF-fal végzett (monomer típus) keresztkötésének az eredményét mutatja, amely humán OBM a találmány szerinti cDNS által kódolt fehérje.

A jelölések magyarázata:

1. sáv: ^{125}I -OCIF
2. sáv: A ^{125}I -OCIF phOBM-mel transzfektált COS-7 sejtek membránján lévő fehérjékkel véghezvitt keresztkötések során kapott termékek.
3. sáv: A ^{125}I -OCIF phOBM-mel transzfektált COS-7 sejtek membránján lévő fehérjékkel véghezvitt keresztkötések során kapott termékek 400-szoros mennyiségű jelöletlen OCIF jelenlétében.

A 21. ábra a 24.(2) példában közölteket szemlélteti, a fehérje (szekretált formájú hOBM) OCIF-kötő kapacitását mutatja a kondicionált tápközegben, különböző OCIF koncentrációk esetén.

A jelölések magyarázata:

○: olyan pCEP4-gyel transzfektált 293-EBNA sejtek kondicionált tápközege, amely nem tartalmaz olyan cDNS-t, amely a szekretált formájú humán OBM-et kódolja.

●: olyan pCEPshOBM-mel transzfektált 293-EBNA sejtek kondicionált tápközege, amely tartalmaz olyan cDNS-t, amely a szekretált formájú humán OBM-et kódolja.

A 22. ábra a 23.(2) példában leírtakat szemlélteti, a fehérje (szekretált formájú humán OBM) OCIF-kötő kapacitását mutatja a kondicionált tápközegben egy specifikus OCIF koncentráció esetén, míg a hozzáadott kondicionált tápközeg mennyiségét változtattuk.

A jelölések magyarázata:

O: olyan pCEP4-gyel transzfektált 293-EBNA sejtek kondicionált tápközege, amely nem tartalmaz olyan cDNS-t, amely a szekretált formájú humán OBM-et kódolja.

●: olyan pCEPshOBM-mel transzfektált 293-EBNA sejtek kondicionált tápközege, amely tartalmaz olyan cDNS-t, amely a szekretált formájú humán OBM-et kódolja.

A 23. ábra az *Escherichia coli*-ban expresszált humán OBM-et és tioredoxint tartalmazó fúziós fehérje SDS-PAGE vizsgálatának eredményét mutatja.

A jelölések magyarázata:

1. sáv: molekulatömeg markerek

2. sáv: *Escherichia coli* GI724/pTrxFus-ból származó oldható fehérje frakciók.

3. sáv: *Escherichia coli* GI724/pTrxhOBM-ből származó oldható fehérje frakciók.

A 24. ábra a 24.(3) példában leírtakat szemlélteti, a humán OBM-et és tioredoxint tartalmazó fúziós fehérje OCIF felé mutatott OCIF-kötő képességét mutatja abban az esetben, amikor az *Escherichia coli*-ból származó oldható fehérje frakció mennyiségét, beleértve a hozzáadott fúziós fehérjét, változtattuk.

A jelölések magyarázata:

O: *Escherichia coli* GI724/pTrxFus-ból származó oldható fehérje frakciók.

- : *Escherichia coli* GI724/pTrxshOBM-ből származó oldható fehérje frakciók.

A 25. ábra a 24.(3) példában leírtakat szemlélteti, a humán OBM-et és tioredoxint tartalmazó fúziós fehérje OCIF felé mutatott, *Escherichia coli*ből származó oldható fehérje frakciókban meglévő OCIF-kötő képességét mutatja különböző koncentrációk esetén.

A jelölések magyarázata:

- O: *Escherichia coli* GI724/pTrxFus-ből származó oldható fehérje frakciók.
- : *Escherichia coli* GI724/pTrxshOBM-ből származó oldható fehérje frakciók.

A 26. ábra a humán OBM és humán sOBM kvantifikálásának eredményét mutatja, amelyet szendvics-ELISA eljárással végeztünk a találmány szerinti nyúl anti-humán OBM/sOBM poliklonális antitest felhasználásával.

A jelölések magyarázata:

- : Humán OBM
- : Humán sOBM

A 27. ábra a humán OBM és humán sOBM kvantifikálásának eredményét mutatja, amelyet szendvics-ELISA eljárással végeztünk a találmány szerinti anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitestek felhasználásával.

A jelölések magyarázata:

- : Humán OBM
- : Humán sOBM

A 28. ábra a egér OBM és sOBM kvantifikálásának eredményét mutatja, amelyet szendvics-ELISA eljárással végeztünk a találmány szerinti anti-humán OBM/sOBM

monoklonális antitestek felhasználásával, amelyek keresztreakcióba lépnek az egér OBM-mel és sOBM-mel.

A jelölések magyarázata:

□: Humán OBM

●: Humán sOBM

A 29. ábra az egér OBM-et és tioredoxint tartalmazó fúziós fehérje humán osteoclast-szerű sejtek képződésének stimulációjára irányuló aktivitását mutatja.

A 30. ábra az anti-OBM/sOBM antitest D_3 -vitamin által stimulált csont-reszorpciós aktivitásra gyakorolt gátlását mutatja.

A 31. ábra az anti-OBM/sOBM antitest prosztaglandin- E_2 (PGE_2) által stimulált csont-reszorpciós aktivitásra gyakorolt gátlását mutatja.

A 32. ábra az anti-OBM/sOBM antitest parathyroid hormon (PTH) által stimulált csont-reszorpciós aktivitásra gyakorolt gátlását mutatja.

A 33. ábra az anti-OBM/sOBM antitest interleukin 1 α (IL-1) által stimulált csont-reszorpciós aktivitásra gyakorolt gátlását mutatja.

Példák

A találmányt a továbbiakban példákon keresztül ismertetjük részletesen, azonban az oltalmi kör nem korlátozódik ezekre a példákra.

1. példa

A találmány szerinti fehérje előállítása

(1) ST2 sejtek nagyarányú termelése

Az ST2 egér osteoblast sztrómális sejtvonalat (Riken Sejtbank RCB0224) 10% magzati borjúsérumot tartalmazó α -MEM felhasználásával növesztettük. Egy 225 cm²-es tapadó sejttenyészet szolgáló T-edénybe összefolyásig növesztettünk ST2 sejteket és ezeket tripszinnel kezeltük és a T-edényből arattunk. Mosás után a sejteket öt darab 225 cm²-es T-edénybe vittük át. Miután 60 ml 10⁻⁶ M aktív formájú D₃-vitamint (kalcitriol), 10⁻⁷ M dexametazont és 10% magzati borjúsérumot tartalmazó α -MEM-et hozzáadtunk, mindegyik edény sejtjeit 7-10 napon keresztül növesztettük CO₂-inkubátorban. Az így növesztett ST2 sejteket sejtkaparó felhasználásával arattuk és felhasználásig -80°C-on tároltuk.

(2) A membrán frakció előállítása és a membránkötött fehérjék szolubilizálása

Az 1.(1) példában leírt ST2 sejtekhez (körülbelül 12 ml térfogat), amelyeket nyolcvan darab 225 cm²-es T-edény felhasználásával növesztettük, háromszoros térfogatú (36 ml) proteáz inhibitorokat (2 mM APMSFP, 2 mM EDTA, 2 mM o-fenantrolin, 1 mM leupeptin, 1 µg/ml pepstatin A és 100 egység/ml aprotinin) tartalmazó 10mM Tris-HCl puffert (pH 7,2) adtunk. 30 másodperces erőteljes, vortex keverővel végzett keverés után a sejteket 10 percig jégen hagytuk. A sejteket homogenizátor (Dounce Tissue Grinder, A fecskendő, Wheaton Scientific Co.) felhasználásával homogenizáltuk. A homogenizált sejtekhez ugyanakkora térfogatú (48 ml) olyan 10 mM Tris-HCl puffert (pH 7,2) adtunk, amely tartalmazta a fent említett proteáz

inhibitorokat, 0,5 M szacharózt, 0,1 M kálium-kloridot, 10 mM magnézium-kloridot és 2 mM kalcium-kloridot. Kevertetés után az elegyet 600 x g-vel 10 percen át 4°C-on centrifugáltuk, ezáltal elválasztva csapadékként a sejtmagokat és a nem-homogenizált sejteket. A centrifugálás által kapott felülúszót 150.000 x g-vel 90 percen át 4°C-on centrifugáltuk, hogy az ST2 sejtek membránfrakcióit csapadékként megkapjuk. Ehhez a membránfrakcióhoz 8 ml olyan 10 mM Tris-HCl puffert (pH 7,2) adtunk, amely tartalmazta a fent említett proteáz inhibitorokat, 150 mM nátrium-kloridot és 0,1 M szacharózt. 200 µl 20%-os CHAPS (3-[(3-cholamidopropil)-dimetilamonio]-1-propánszulfonát, Sigma Co.) hozzáadása után az elegyet 2 órán keresztül 4°C-on kevertettük. Ezt követően a keveréket 150.000 x g-vel 60 percen át 4°C-on centrifugáltuk, hogy a szolubilizált membránfrakciót felülúszóként megkapjuk.

2. példa

A találmány szerinti fehérje tisztítása

(1) Az OCIF-immobilizált affinitás oszlop elkészítése

Miután a HiTrap NHS-aktivált oszlopon (1 ml, a Pharmacia Co. gyártmánya) az izopropanolt 1 mM sósavra cseréltük, a WO 96/26217-ben leírt eljárás szerint előállított 13,0 mg rekombináns OCIF-ot tartalmazó 1 ml 0,2 M NaHCO₃/0,5 M NaCl oldatot (pH 8,3) vittünk fecskendő (5 ml, a Terumo Corp. gyártmánya) segítségével az oszlopra, hogy 30 perc alatt szobahőmérsékleten lejátszódjon a kapcsolási reakció. Az oszlopra 3 ml 0,5 M

etanolamin/0,5 M NaCl (pH 8,3) oldatot és 3 ml 0,1 M ecetsav/0,5 M NaCl (pH 4,0) oldatot vittünk fel háromszor felváltva, hogy a feleslegben lévő aktív csoportokat inaktiváljuk, majd az oldatot kicseréltük 0,5 M etanolamin/0,5 M NaCl (pH 8,3) oldatra. Miután 1 órán keresztül állni hagytuk szobahőmérsékleten, az oszlopot kétszer felváltva mostuk 0,5 M etanolamin/0,5 M NaCl (pH 8,3) és 0,1 M ecetsav/0,5 M NaCl (pH 4,0) oldatokkal és az oldatot ezután 50 mM Tris/1 M NaCl/0,1% CHAPS pufferrel (pH 7,5) cseréltük ki.

(2) A találmány szerinti fehérje tisztítása OCIF-immobilizált affinitás oszlop felhasználásával

Az OCIF-kötő fehérje tisztítását 4°C-on végeztük, hacsak nem adtunk meg más hőmérsékletértéket. A fent említett OCIF-immobilizált affinitás oszlopot olyan 10 mM Tris-sósav pufferrel (pH 7,2) hoztuk egyensúlyba, amelyhez az 1.(2) példában leírt proteáz inhibitorokat, 0,15 M NaCl-ot és 0,5% CHAPS-t adtunk. Az 1.(2) példában leírt szolubilizált membránfrakció körülbelül 8 ml-ét az oszlopra vittük 0,01 ml/perc térfogatárammal. Ezt követően az oszlopot 100 percen keresztül 0,5 ml/perc térfogatárammal olyan 10 mM Tris-sósav pufferrel (pH 7,2) mostuk, amelyhez a fent említett proteáz inhibitorokat, 0,15 M NaCl-ot és 0,5% CHAPS-t adtunk. Majd ezután az oszlophoz adszorbeálódott fehérjéket 50 percen át 0,1 ml/perc térfogatárammal olyan 0,1 M glicin-sósav pufferrel (pH 3,3) eluáltuk, amely tartalmazta a proteáz inhibitorokat, 0,2 M nátrium-kloridot és 0,5% CHAPS-t. Ugyanezen a módon az oszlophoz adszorbeálódott fehérjéket 50 percen át 0,1 ml/perc térfogatárammal olyan 0,1 M nátrium-citrát pufferrel (pH 2,0) eluáltuk, amely tartalmazta a proteáz inhibitorokat, 0,2 M nátrium-

kloridot és 0,5% CHAPS-t. Az eluátumot 0,5 ml-es frakciókban gyűjtöttük össze. Mindegyik frakciót azonnal semlegesítettük 2 M Tris oldat hozzáadásával. Az ezen pufferek eluálásával kapott frakciókat (mindegyik frakció 1.0ml-5.0ml eluátumot tartalmazott) 50-100 μ l-re koncentráltuk Centricon-10 (az Amicon of U.S.A. gyártmánya) felhasználásával. Mindegyik koncentrált frakció egy részéhez OCIF-ot adtunk és anti-OCIF poliklonális antitesttel immunprecipitáltuk. A kicsapatott frakciókat SDS-sel kezeltük és SDS-PAGE-ra vittük. Azon frakciókat (3-10 sorszámú frakciók), amelyekben a fehérje sávja az OCIF felé specifikus kötődési képességet mutat úgy tekintettük, mint a találmány szerinti fehérje frakciói.

(3) A találmány szerinti fehérje tisztítása gélszűrés segítségével

A koncentrált OCIF-kötő fehérjét (0,1 M glicin-sósav pufferrel (pH 3,3) történt eluálás során kapott frakciókat) és 0,1 M nátrium-citrát puffert (pH 2,0), amit a 2.(2) példában állítottunk elő, Superose 12 HR10/30 oszlopra (1,0 x 30 cm, a Pharmacia Co. gyártmánya) vittünk, amit 10mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl és 0,5% CHAPS (pH 7,0) tartalmú oldattal egyensúlyba hoztunk és ezt az egyensúlyi puffert mobil fázisként felhasználva 0,5 ml/perc térfogatárammal kifejlesztettük és mindegyik 0,5 ml-es frakciót összegyűjtöttük. A találmány szerinti fehérjét tartalmazó frakciókat (27-32 sorszámú frakciók) ugyanazon eljárás szerint azonosítottuk, mint amit fent ismertettünk. Mindegyik frakciót Centricon-10 (az Amicon terméke) felhasználásával koncentráltuk.

(4) Fordított fázisú nagy hatékonyságú
folyadékkromatográfiával történő tisztítás

A gélszűréssel tisztított fent említett OCIF-kötő fehérjét egy C_4 oszlopra (2,1 x 250 mm, Vydac, USA) vittük, amit 0,1% trifluor-ecetsavval (TFA) és 30% acetonitrillel hoztunk egyensúlyba. Az oszlophoz kötődött fehérjéket az acetonitril első 50 percben 30%-tól 55%-ig és a következő 10 percben 55%-tól 80%-ig terjedő lineáris gradiensevel eluáltuk 0,2 ml/perc térfogatárammal. Az eluált fehérjék csúcsait 215 nm-en mért optikai denzitás mérésével határoztuk meg. A különböző csúcsokhoz tartozó fehérjéket megvizsgáltuk abból a célból, hogy azonosítsuk a találmány szerinti fehérjét tartalmazó frakciókat, és a találmány szerinti fehérje nagymértékben megtisztított formáját kaptuk.

3. Példa

A találmány szerinti tisztított fehérje SDS-PAGE vizsgálata

A D_3 -vitamin aktív formájának jelenlétében vagy hiányában növesztett ST2 sejtekből előállított szolubilizált membránfrakciót OCIF-immobilizált affinitás oszlopra vittük tisztítás céljából. A tisztított készítményt SDS-PAGE módszerrel vizsgáltuk. Mint az az 1. ábrán (A) látszik, egy körülbelül 30.000-40.000-es molekulatömegű fő fehérjesávot figyeltük meg egyedül a D_3 -vitamin aktív formájának jelenlétében növesztett ST2 sejtek tisztított készítményében, ami megerősíti, hogy az OCIF-hoz specifikusan kötődő fehérje (azaz a találmány szerinti fehérje) szelektíven tisztítható az OCIF-

immobilizált affinitás oszloppal. Jóllehet, az OCIF-immobilizált oszlop hordozóihoz vagy távolságtartóihoz nem-specifikusan kötődő néhány fehérje (a találmány szerinti fehérjétől különböző) sávja megfigyelhető volt mindkét tisztított termékben. A találmány szerinti fehérjétől különböző fehérjéket a fent leírt eljárások szerint géliszűrőssel és C_4 fordított fázisú kromatográfiával eltávolítottuk. Az így kapott találmány szerinti nagy mértékben megtisztított fehérje SDS-PAGE képe az 1. ábrán (B) látható. A találmány szerinti nagy mértékben megtisztított fehérjét elektroforetikus szempontból homogénnek találtuk és hozzávetőlegesen 30,000-40,000-es molekulatömeggel rendelkezett.

4. Példa

OCIF osteoblastokhoz kötődésének vizsgálata

(1) ^{125}I -jelölt OCIF előállítás

Az OCIF-ot jodogén eljárás segítségével ^{125}I -tel jelöltük. Bővebben, 20 μl 2,5 mg/ml jodogén-kloroform oldatot tettünk egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe és 40°C -on elpárologtattuk a kloroformot, így kaptunk egy jodogénnel bevont csövet. A csövet háromszor mostuk 400 μl 0,5 M nátrium-foszfát pufferrel (Na-Pi, pH 7,0). 5 μl 0,5 M Na-Pi-t (pH 7,0) adtunk a csőbe. Az 1,3 μl (18,5 MBq) $\text{Na-}^{125}\text{I}$ oldat (NEZ-033H20, az Amersham Co. gyártmánya) hozzáadása után azonnal a csőbe adtunk 10 μl 1 mg/ml rOCIF oldatot (monomer típusút vagy dimer típusút). A vortex keverővel végzett keverés után az elegyet 30 másodpercre szobahőmérsékleten állni hagytuk. Az oldatot egy olyan

kémcsőbe vittük át, amely tartalmazott 80 μ l 0,5 M Na-Pi (pH 7,0) oldatban készített 10 mg/ml kálium-jodidot és 5 μ l 5% marha szérumalbumint tartalmazó foszfáttal pufferelt konyhasó oldatot és kevertettük. A keveréket forgóoszlopra (1 ml, G-25 fine, a Pharmacia Co. gyártmánya) vittük, amit 0,25% marha szérumalbumint tartalmazó foszfáttal pufferelt konyhasóoldattal hoztunk egyensúlyba és az oszlopot 5 percen keresztül 2,000 rpm sebességgel centrifugáltuk. 400 μ l 0,25% marha szérumalbumint tartalmazó foszfáttal pufferelt konyhasóoldatot adtunk az oszlopról eluált frakcióhoz és az elegyet kevertettük. Ebből kivettünk 2 μ l-t, hogy gamma számlálóval megmérjük a radioaktivitást. 10% TCA-val kicsapatott radioaktivitás méréseivel meghatároztuk a ^{125}I -tel jelölt OCIF radiokémiai tisztaságát. A ^{125}I -tel jelölt OCIF biológiai aktivitását a WO 96/26217-ben leírt eljárás szerint mértük meg. A ^{125}I -tel jelölt OCIF koncentrációját a következő eljárás szerinti ELISA módszerrel mértük meg.

(2) A ^{125}I -tel jelölt OCIF koncentrációjának mérése ELISA eljárással

Egy 96 lyukas immunlemez (MaxiSorp[™], a Nunc Co. terméke) minden egyes lyukába a WO 96/26217 számú szabadalmi bejelentésben ismertetett anti-OCIF nyúl poliklonális antitestet 2 μ g/ml koncentrációban tartalmazó 100 μ l 50 mM NaHCO_3 (pH 9,6) oldatot adtunk. A lemezt egy éjszakán át 4°C-os hőmérsékleten hagytuk állni. Miután az oldatot leszívással eltávolítottuk, 300 μ l Block Ace[™] (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.)/foszfáttal pufferelt konyhasóoldatot (25/75) adtunk minden egyes lyukba. A lemezt ezután két órán keresztül szobahőmérsékleten állni hagytuk. Miután az oldatot leszívással eltávolítottuk, a

lyukakat háromszor mostuk foszfáttal pufferelt konyhasóoldattal, amely 0,01% Polysorbate 80-t (P-PBS) tartalmazott. Ezt követően 300 μ l Block Ace[™]/foszfáttal pufferelt konyhasóoldatot (25/75) elkevertünk ¹²⁵I-jelölt OCIF vagy standard OCIF készítményekkel és minden egyes lyukba adtunk ilyet. A lemezt ezután két órán keresztül szobahőmérsékleten állni hagytuk. Miután az oldatot leszívással eltávolítottuk, minden lyukat hatszor mostunk 200 μ l P-PBS-sel.

Peroxidázzal jelölt nyúl anti-OCIF poliklonális antitestet tartalmazó 100 μ l Block Ace[™] (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.)/foszfáttal pufferelt konyhasóoldatot (25/75) adtunk minden egyes lyukba. A lemezt két órán keresztül szobahőmérsékleten hagytuk állni. Miután az oldatot leszívással eltávolítottuk, minden lyukat hatszor mostunk 200 μ l P-PBS-sel. Ezt követően 100 μ l TMB oldatot (nagy érzékenységgű oldható TMB reagens, Scytek Co.) adtunk minden egyes lyukba. 490 nm-en mikrolemez olvasóval megmértük minden lyuk abszorbanciáját. A ¹²⁵I-jelölt OCIF koncentrációját a standard OCIF készítmény felhasználásával készített kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg.

(3) OCIF osteoblastokhoz vagy lépsejtekhez kötődésének vizsgálata

ST2 egér osteoblast sztrómális sejtvonalat vagy lépsejteket 10^{-8} M aktív formájú D₃-vitamint (kalcitriol), illetve 10^{-7} M dexametazont tartalmazó vagy nem tartalmazó, 10% magzati borjúsérumot (FBS) tartalmazó α -MEM-ben szuszpendáltunk 4×10^4 sejt/ml (ST2 sejtek) vagy 2×10^6 sejt/ml (lépsejtek) koncentrációra. Mindegyik sejtszuszenziót egy 24-lyukas mikrolemezbe inokuláltuk. A

sejteket 4 napon keresztül CO_2 -inkubátorban növesztettük. Miután a sejteket α -MEM-mel mostuk, a 20 ng/ml fent leírt ^{125}I -tel jelölt OCIF-ot (monomer forma vagy dimer forma) tartalmazó, kötődési teszthez való tápközegből (olyan α -MEM, amelyet 0,2% marha szérumalbuminnal, 20 mM HEPES pufferrel és 0,2% NaN_3 -dal egészítettünk ki) 200 μl -t adtunk minden egyes lyukba. Azokhoz a lyukakhoz, amelyeket a nem-specifikus kötődés méréséhez használtunk, a 8 $\mu\text{g/ml}$ rOCIF-ot (400-szoros koncentrációban) és még ezenfelül 20 ng/ml ^{125}I -jelölt OCIF-ot tartalmazó, kötődési vizsgálathoz való tápközeg 200 μl -ét adtuk. A sejteket egy órán át CO_2 -inkubátorban növesztettük és háromszor mostuk 1 ml foszfáttal pufferelt konyhasóoldatban. Ezen eljárás során a lépsejteket a 24 lyukas lemez minden egyes mosási lépésben végzett centrifugálása által mostuk, mivel a lépsejtek nem-tapadó sejtek voltak. A mosás után a sejtek feloldása céljából 500 μl 0,1 N NaOH oldatot adtunk minden lyukba és a lemezt 10 percen át szobahőmérsékleten hagytuk állni. Gamma számláló segítségével minden lyukban megmértük az RI mennyiségét.

Mint az a 2. ábrán látható, a ^{125}I -jelölt OCIF nem kötődött a növesztett lépsejtekhez, azonban specifikusan csak azokhoz az osteoblast sztrómális sejtekhez kötődött, amelyeket a D_3 -vitamin aktív formájának a jelenlétében növesztettünk. Az eredmények azt mutatták, hogy a találmány szerinti fehérje egy membránkötött fehérje, amelyet a D_3 -vitamin aktív formája és a dexametazon indukál osteoblast sztrómális sejteken.

5. Példa

A találmány szerinti fehérje biológiai aktivitása

(1) Osteoblast sztrómális sejtek által segített osteoclast képződés

Az osteoblast sztrómális sejtek osteoclast képződést segítő képessége a keletkező osteoclastok borkósav rezisztens sav foszfátáz aktivitásának (TRAP aktivitás) a mérésével határozható meg. Konkrétan, ddy egérből (8-12 hetes) származó lépsejteket (2×10^5 sejt/100 μ l/lyuk) és ST2 egér osteoblast sztrómális sejteket (5×10^3 sejt/100 μ l/lyuk) olyan α -MEM-ben szuszpendáltunk, amihez 10^{-8} M aktív formájú D_3 -vitamint, 10^{-7} M dexametazont és 10% magzati borjúsérumot adtunk. A sejteket 96-lyukú lemezekbe inokuláltuk és egy héten keresztül CO_2 -inkubátorban növesztettük őket. Miután foszfáttal puffereelt konyhasóoldattal mostunk minden lyukat, 100 μ l etanol/aceton (1:1) elegyet adtunk minden lyukba és a sejteket szobahőmérsékleten egy percen át immobilizáltuk. Az immobilizálás után 5,5 mM p-nitrofenol-foszfátot és 10 mM nátrium-tartarátot tartalmazó 100 μ l 50 mM citrát puffert (pH 4,5) adtunk minden lyukba. 15 perc szobahőmérsékleten zajló reakció után 0,1 N NaOH oldatot adtunk mindegyik lyukhoz és egy mikrolemez olvasó segítségével 405 nm-en mértük az abszorbanciát. A 3. ábrán látható a körülbelül 10-es vagy 40-es passzálási számú ST2 sejtek általi osteoclast képződés eredménye, miután a sejteket a Riken Sejtbankból beszereztük. Az eredmények azt mutatják, hogy a nagyobb passzálási számú ST2 sejtek hatásosabb osteoclast képződést segítő képességet mutatnak.

(2) A találmány szerinti fehérje aktív formájú D_3 -vitamint és dexametazont tartalmazó

tenyésztérendszerben lévő osteoblast sztrómális sejtek membránján történő expressziójának időbeli változása és az osteoclast képződés kokultúra rendszerben mutatott időbeli változása

Ugyanolyan módon, mint a 4.(3) példában, 7 napon keresztül növesztettünk ST2 osteoblast sztrómális sejteket aktív formájú D₃-vitamin és dexametazon jelenlétében. Az OCIF-kötési vizsgálatot ¹²⁵I-tel jelölt OCIF (monomer típus) felhasználásával végeztük úgy, ahogy azt a 4.(1) példában ismertetett kísérletben leírtuk. A nem-specifikus kötődést úgy határoztuk meg, hogy a ¹²⁵I-OCIF és a 400-szoros koncentrációban lévő jelöletlen OCIF ST2 sejtekhez való kötődésének versengését mértük. Ennek eredményként megállapítottuk, hogy a D₃-vitamin aktív formája és dexametazon jelenlétében a ¹²⁵I-tel jelölt OCIF specifikus kötődésének mennyisége nő a tenyésztő növekedésének megfelelően. Bővebben, mint ahogy az a 4. és 5. ábrán látható, a találmány szerinti fehérje a D₃-vitamin aktív formája által az ST2 sejtek felszínén a tenyésztő növekedésének megfelelően expresszáldott és az expresszió a növesztés negyedik napján ért el maximumot. Másrészt az osteoclast szerű sejtek úgy képződnek, hogy egér lépsejteket és ST2 sejteket aktív formájú D₃-vitamin jelenlétében együtt növesztünk. TRAP (osteoclastok marker enzime)-pozitív egymagvú pre-osteoclast-szerű sejtek a növesztés harmadik vagy negyedik napján képződnek. Differenciáltabb és érett TRAP-pozitív többmagvú sejtek a növesztés ötödik-hatodik napján képződnek. Jó korreláció figyelhető meg a találmány szerinti fehérje expressziójának időbeli változása és az osteoclast képződése között.

(3) OCIF-fal való kezelés által gátolt osteoclast képződés az együtt-növesztés különböző időszakában

Annak érdekében, hogy világossá váljon, hogy a találmány szerinti fehérje az osteoclast képzésben szerepet játszó faktor, a sejteket különböző növesztési periódusokban 100 mg/ml OCIF-fal kezeltük a fenti 5.(2) példában leírt hat napos együtt-növesztési időtartam során (a hat napos időtartam két egymást követő napján, kivéve az ötödik napot, amelyen egy egynapos periódust alkalmaztunk). Eredményként, mint az a 6. ábrán látható, azt kaptuk, hogy a növesztés kezdetétől számított 48-96. órában végzett OCIF-kezelés, amikor a találmány szerinti fehérje ST2 sejteken történő expressziója maximális, a leghatékonyabb osteoclast képződés gátlására. Bővebben, azt is megállapítottuk, hogy az OCIF szabályozza az osteoclast képződést úgy, hogy a találmány szerinti fehérjén keresztül ST2 sejtekhez kötődik.

A fenti kísérletek eredményei alapján a találmány szerinti fehérjéről megállapítottuk, hogy aktív formájú D₃-vitamin és dexametazon segítségével osteoblast sztrómális sejtek sejtmembránján indukálódik és osteoclastok differenciációját vagy érését segítő vagy gyorsító biológiai aktivitást mutat.

6. Példa

¹²⁵I-jelölt OCIF és a találmány szerinti fehérje keresztkötési tesztje

A találmány szerinti fehérje még egyértelműbb azonosításához a találmány szerinti fehérjét ¹²⁵I-tel jelölt OCIF-fal keresztkötöttük. ST2 egér osteoblast

sztrómális sejtvonalat négy napon keresztül növesztettünk D₃-vitamin aktív formája és dexametazon jelenlétében vagy hiányában ugyanazon a módon, mint azt a 4.(3) példában leírtuk. Miután a sejteket 1 ml foszfáttal pufferelt konyhasóoldattal mostuk, 25 ng/ml ¹²⁵I-jelölt OCIF-ot (monomer forma) vagy 40 ng/ml, a SEQ ID NO 76 szekvencia szerinti fehérje (WO 96/26217) állati sejtekben végzett expresszálasa során kapott ¹²⁵I-jelölt OCIF-CDD1-et tartalmazó 200 µl kötési teszthez való tápközeget (olyan α-MEM, amelyhez 0,2% marha szérumalbumint, 20 mM Hepes puffert, 0,2% NaN₃-ot és 100 µg/ml heparint adtunk) adtunk hozzájuk. Az előbb említett, kötési teszthez való tenyésztápközeget kiegészítettük továbbá 400-szoros koncentrációjú OCIF-fal és a nem-specifikus kötődés meghatározása céljából a többi lyukhoz adtuk. Miután egy órán keresztül CO₂-inkubátorban növesztettük őket, mindegyik lyukat háromszor mostuk 100 µg/ml heparint tartalmazó 1 ml foszfáttal pufferelt konyhasóoldattal. 100 µg/ml keresztkötő ágenst, DSS-t (diszukcínimidil-szuberát, Pierce Co.) tartalmazó 500 µl foszfáttal pufferelt konyhasóoldatot adtunk minden egyes lyukhoz és a lemezt 10 percen keresztül 0°C-on tartottuk. A lyukakat kétszer mostuk 1 ml foszfáttal pufferelt konyhasóoldattal 0°C-on. 1% Triton X-100-at, 10 µM pepstatint, 10 µM leupeptint, 2 mM PMSF-et (fenilmetilszulfonil-fluorid), 10 µM antipain-t és 2 mM EDTA-t tartalmazó 100 µl 20 mM Hepes puffert adtunk minden egyes lyukhoz. A lemezt a sejtek feloldásához 30 percen át szobahőmérsékleten hagytuk állni. Ezen mintákból szokásos eljárással 15 µl-t kezeltünk SDS-sel nem-redukáló körülmények között és SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (4-20% poliakrilamid

gradiens, a Daiichi Chemical Co., Ltd. gyártmánya) vizsgáltuk. Az elektroforézis után a géleket megszárítottuk és BioMax MS filmre (a Kodak gyártmánya) exponáltuk BioMax MS erősítőernyő (a Kodak gyártmánya) felhasználásával 24 órán keresztül -80°C -on. Az expozíció után a filmet szokásos eljárással hívtuk elő. Egy 90.000-110.000 molekulatömegű keresztkötött termék sávját figyeltük meg abban az esetben, amikor a ^{125}I -jelölt OCIF-ot (monomer típus, 60kDa) használtuk. A ^{125}I -jelölt OCIF-CDD1 (31 kDa) esetén a körülbelül 70-80 kDa (átlagosan 78 kDa) molekulatömegű keresztkötött termék sávját figyeltük meg, mint az a 7. ábrán látható.

7. Példa

Az ST2 sejteken expresszált találmány szerinti fehérje Scatchard diagram segítségével történő analízise

A fent említett ^{125}I -tel jelölt OCIF-ot (monomer típus) 1.000 pM koncentrációban a kötési teszthez való tenyésztápközeghez (olyan α -MEM, amely 0,2% marha szérumalbumint, 20 mM Hepes puffert és 0,2% NaN_3 -ot tartalmazott) adtuk és a tenyésztápközegét sorozatosan felére hígítottuk olyan tenyésztápközeggel, amely nem tartalmazta a ^{125}I -tal jelölt OCIF-ot. A nem-specifikus kötődés méréséhez való oldatokat úgy állítottuk elő, hogy ezen oldatokhoz még 400-szoros koncentrációjú monomer formájú OCIF-ot is adtunk. A fent említett, 4 napon keresztül 10^{-8} M aktív formájú D_3 -vitamin (kalcitriol) és 10^{-7} M dexametazon jelenlétében növesztett ST2 sejteket (körülbelül 10-es passzálási szám) tartalmazó lyukakhoz 200 μl így előállított oldatot adtunk, hogy ugyanolyan

módon, mint azt a 4.(3) példában leírtuk, megbecsüljük a ^{125}I -jelölt OCIF kötődését. Az eredményeket Scatchard diagram analízisnek vetettük alá, hogy az OCIF és az OCIF-kötő fehérje disszociációs konstansát és az ST2 sejtenként meglévő OCIF-kötő fehérje számát (helyét) meghatározzuk. Eredményként azt kaptuk, hogy az OCIF és a találmány szerinti fehérje disszociációs konstansa 280 pM és az OCIF-kötő fehérje ST2 sejtenként meglévő helyeinek száma hozzávetőlegesen 33.000/sejt volt. Az 5.(1) példa során fellelt eredmény alapján, mely szerint a körülbelül 40-es passzálási számú ST2 sejtek által segített osteoclast képződés nagyobb mértékű volt, mint a körülbelül 10-es passzálási számúak által segített, a találmány szerinti fehérje körülbelül 40-es passzálási számú ST2 sejteken expresszáldott számát (helyét) határoztuk meg. Ez a szám (hely) 58.000/sejt volt és egyértelműen nagyobb volt, mint a 10-es passzálási számú ST2 sejtek esetében, ami azt mutatja, hogy az ST2 sejteken expresszáldott találmány szerinti fehérje mennyisége összefügg az osteoclast képződést segítő képességükkel. Az eredmények azt mutatják, hogy a találmány szerinti fehérje egy olyan faktor, amely osteoclastok differenciációját vagy érését segíti vagy indukálja.

8. Példa

Az OBM cDNS klónozása

(1) Az RNS kinyerése egér ST2 sejtekből

Az ST2 egér osteoblast sztrómális sejtvonalat (Riken Sejtbank, RCB0224) 10% magzati borjúsérumot tartalmazó α -MEM-ben (Gibco BRL Co.) növesztettük. Az így növesztett

ST2 sejteket egy 225 cm²-es tapadó sejttenyésztésre szolgáló T-edénybe összeöntöttük és tripszinnel kezeltük a T-edényből történő aratáshoz. A sejteket mostuk, majd öt darab 225 cm²-es T-edénybe vittük át. Mindegyik edénybe 60 ml 10⁻⁸ M aktív formájú D₃-vitamint (kalcitriol, Wako Pure Chemicals Co., Ltd.), 10⁻⁷ M dexametazont és 10% magzati borjúsérumot tartalmazó α -MEM-et adtunk és a sejteket 5 napon keresztül CO₂-inkubátorban növesztettük. Az így növesztett ST2 sejtekből kinyertük a teljes RNS-t ISOGEN (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.) felhasználásával. A teljes RNS körülbelül 600 μ g-jából poli A⁺RNS-t készítettünk egy oligo(dT)-cellulóz oszlop (5'-3' Prime Co.) segítségével. Körülbelül 8 μ g poli A⁺RNS-t kaptunk.

(2) Expressziós könyvtár elkészítése

A 8.(1) példában kapott poli A⁺RNS 2 μ g-jából állítottunk elő duplaszálú cDNS-t egy Great Lengths cDNA Synthesis kit (Clontech Co.) segítségével az útmutatóban leírtak alapján. Bővebben, 2 μ g poli A⁺RNS-t és oligo(dT)₂₅(dN) primert összekevertünk és a keverékhez desztillált vizet adtunk úgy, hogy a végtérfogata 6,25 μ l legyen. A körülbelül 3 perces, 70°C-on történő inkubáció után a keveréket jégen 2 percig hűtöttük. A keverékhez 2,2 μ l desztillált vizet, 2,5 μ l 5X elsőszálas puffert (First-strand buffer), 0,25 μ l 100 mM DTT-t (ditiotreitolt) 0,5 μ l Prime RNáz inhibitor (1U/ml) (5'-3' Prime Co.), 0,5 μ l [α -³²P]dCTP-t (Amersham Co., 3000 Ci/mmol) desztillált vízzel ötszörösen hígítva 2 μ Ci/ μ l készítéséhez, 0,65 μ l dNTP-t (mindegyik 20 mM) és 1,25 μ l (250 egység) MMLV (RNázH⁻) reverz transzkriptázt adtunk. A keveréket 90 percen keresztül 42°C-on inkubáltuk, majd ezután további

62,25 μ l desztillált vizet, 20 μ l 5X másodikszálas puffert (Second-strand buffer), 0,75 μ l dNTP-t (mindegyik 20 mM) és 5 μ l másodikszálas enzimkoktélt adtunk hozzá. Az így kapott keveréket két órán keresztül 16°C-on tartottuk. Ezt követően 7,5 egység T4DNS polimerázt adtunk ehhez a reakciókeverékhez. A 30 perces, 16°C-on végzett inkubáció után a reakciót 5 μ l 0,2 M EDTA hozzáadásával állítottuk meg. Egy fenol-kloroformos kezelés után a terméket etanollal kicsapattuk. Az így kapott dupla szálú cDNS végeihez egy EcoRI-SalI-NotI linkert (Clontech Co.) kapcsoltunk. Ezt követően a végeket foszfoliláltuk és a terméket méret-frakcionáló oszlopra vittük, hogy megkapjuk az 500 bp-nál nagyobb hosszúságú cDNS-t. A DNS-t etanollal kicsapattuk, vízben feloldottuk és pcDL-SR α 296-hoz ligáltuk (Molecular and Cellular Biology, 8. kötet, 466-472 oldalak, 1988), amit EcoRI restrikciós enzimmal (Takara Shuzo Co.) vágunk és CIAP-pal (borjú bél alkáli-foszfatáz, Takara Shuzo Co.) kezeltünk.

(3) Expressziós könyvtár szűrése OCIF-hoz való kötődés segítségével

Az XL2 Blue MRF⁺ Escherichia coli törzset (Toyobo Co., Ltd.) a 8.(2) példában előállított DNS felhasználásával transzformáltuk és L-Carbenisilin agaron (1% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 1% NaCl, 60 μ g/ml carbenisilin, 1,5% agar) növesztettük 24 lyukas műanyag lemezekben úgy, hogy lyukanként körülbelül 100 kolónia keletkezzen. A transzformánsokat mindegyik lyukban 3 ml Terrific Broth ampicillin tenyésztápközegben (1,2% tripton, 2,4% élesztőkivonat, 0,4% glicerin, 0,017 M KH_2PO_4 , 0,072 M K_2HPO_4 , 100 μ g/ml ampicillin) szuszpendáltuk és 37°C-on egy éjszakán át ráztatás mellett

növesztettük. A sejteket a plazmid DNS QIAwell kittel (Qiagen Co.) történő előállítására céljából centrifugálás segítségével összegyűjtöttük. A DNS koncentrációját 260 nm-en mért abszorbancia segítségével határoztuk meg. A DNS-t etanollal végzett kicsapatással koncentráltuk és desztillált vízben 200 ng/μl koncentrációban feloldottuk. Ötszáz DNS készletet állítottunk elő, melyek mindegyikét körülbelül 100 kolóniából kaptuk és ezeket a készleteket használtuk COS-7 sejtekbe (Riken Sejtbank, RCB0539) történő transzfekcióhoz. A COS-7 sejteket 8×10^4 sejt/lyuk sejtsűrűséggel olyan DMEM-be oltottuk be, amely a 24 lyukas lemez mindegyik lyukában 10% magzati borjúsérumot tartalmazott és egy éjszakán át 37°C-on CO₂-inkubátorban növesztettük őket. A következő napon eltávolítottuk a tenyésztápközeget és a sejteket szérummentes DMEM tenyésztápközzel mostuk. A fent leírt plazmid DNS-t előzőleg OPTI-MEM tenyésztápközzel (Gibco BRL Co.) hígítottuk és Lipofectamine-nal (transzfekciós reagens, a Gibco BRL Co. gyártmánya) kevertük a Lipofectamine mellé adott leírat szerint. A keveréket 15 perc elteltével mindegyik lyukba, a sejtekhez adtuk. Az itt használt Lipofectamine és DNS mennyisége lyukanként 1 μg, illetve 4 μl volt. 5 óra múlva a tenyésztápközeget eltávolítottuk és mindegyik lyukba 1 ml 10% magzati borjúsérumot tartalmazó DMEM tenyésztápközeget (Gibco BRL Co.) adtunk. A lemezeket 2-3 napon keresztül 37°C-on CO₂-inkubátorban (5% CO₂) inkubáltuk. A transzfektált és 2-3 napon keresztül ezen a módon növesztett COS-7 sejteket szérummentes DMEM tenyésztápközzel mostuk. Ezt követően 200 μl olyan kötődési assay-hez való tenyésztápközeget (olyan szérummentes DMEM tenyésztápközzel, amely 0,2% borjúszérumalbumint, 20 mM Hepes puffert, 0,1 mg/ml heparint és

0,02% NaN_3 -ot tartalmazott) adtunk minden lyukhoz, amelyhez 20 ng/ml ^{125}I -tel jelölt OCIF-ot adtunk hozzá. Miután CO_2 -inkubátorban (5% CO_2) 37°C -on egy órán keresztül növesztettük őket, a sejteket kétszer mostuk 500 μl 0,1 mg/ml heparint tartalmazó foszfáttal pufferelt konyhasóoldattal. Mosás után minden lyukhoz 500 μl 0,1 N NaOH oldatot adtunk. A lemezeket a sejtek roncsolódásához 10 percen át szobahőmérsékleten hagytuk állni. A ^{125}I mennyiségét minden lyukban gamma-számláló (Packard Co.) felhasználásával mértük. Az összesen 500 készlet szűrése során egy olyan DNS készletet találtunk, amely OCIF-hoz specifikusan kötődő fehérjét kódoló cDNS-t tartalmazott. A cDNS-t tartalmazó DNS készletet tovább osztottuk és a fent ismertetett transzfekciós és szűrési eljárásokat megismételtük, hogy az OCIF-hoz kötődő fehérjét kódoló cDNS-t izoláljuk. Ezt a cDNS-t tartalmazó plazmidot pOBM291-nek neveztük el. Ezt a plazmidot tartalmazó *Escherichia coli*-t 1997. május 23-án a FERM BP-5953 letéti számon pOBM291-ként a „The National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Biotechnology Laboratory”-nál letétbe helyeztük.

Az OCIF ^{125}I -tel történő jelölésére és a ^{125}I -tel jelölt OCIF ELISA-val történő kvantitatív analízisére szolgáló eljárásokat az alábbiakban mutatjuk meg. Az OCIF ^{125}I -tel történő jelölését a jodogén eljárás szerint végeztük el. 20 μl 25mg/ml jodogén-kloroform oldatot adtunk egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe és a kloroformot 40°C -on történő melegítéssel elpárologtattuk a jodogén bevonatú cső előállítására céljából. A csövet háromszor mostuk 400 μl 0,5 M nátrium-foszfát pufferrel (Na-Pi, pH 7,0) és 5 μl 0,5 M Na-Pi-t (pH 7,0) adtunk hozzá. Az 1,3

μl (18,5 MBq) $\text{Na-}^{125}\text{I}$ oldat (NEZ-033H20, Amersham Co.) hozzáadása után azonnal a csőbe adtunk 10 μl 1 mg/ml rOCIF oldatot (monomer vagy dimer típus). Miután vortex keverővel megkevertük a tartalmát, a csövet szobahőmérsékleten 30 másodpercig állni hagytuk. A csőben lévő oldatot egy olyan csőbe vittük át, amelybe előzőleg 80 μl 10 mg/ml kálium-jodidot, 0,5 M Na-Pi-t (pH 7,0) és 5% marha szérumalbumint tartalmazó 5 μl foszfáttal pufferelt konyhasóoldatot (BSA-PBS) adtunk. Kevertetés után az elegyet egy forgóoszlopra (1 ml, G-25 fine, a Pharmacia Co. gyártmánya) vittük, amit BSA-PBS-sel hoztunk egyensúlyba és az oszlopot 5 percen keresztül 2000 rpm sebességgel centrifugáltuk. 400 μl BSA-PBS-t adtunk az oszlopról eluált frakcióhoz. Elkeverés után ezen oldatból mintaként kivettünk 2 μl -t, hogy gamma számlálóval megmérjük a radioaktivitást. Az így előállított ^{125}I -tel jelölt OCIF oldat radiokémiai tisztaságát 10% TCA segítségével kicsapatott radioaktivitás méréssel határoztuk meg. A ^{125}I -tel jelölt OCIF biológiai aktivitását a WO 96/26217-ben leírt eljárás szerint mértük meg. A ^{125}I -tel jelölt OCIF koncentrációját ELISA segítségével határoztuk meg a következők szerint. Bővebben, 100 μl 50 mM NaHCO_3 (pH 9,6) oldatot, amelyben a WO 96/26217-ben ismertetett anti-OCIF nyúl poliklonális antitestet 2 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban feloldottuk, adtunk egy 96 lyukas immunlemez (MaxiSorp™, a Nunc Co. terméke) minden egyes lyukába. A lemezt egy éjszakán át 4°C-on hagytuk állni. Miután az oldatot leszívással eltávolítottuk, 300 μl Block Ace™ (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.)/foszfáttal pufferelt konyhasóoldatot (25/75) (B-PBS) adtunk minden egyes lyukba. A lemezt ezután két órán keresztül szobahőmérsékleten állni

hagytuk. Miután az oldatot leszívással eltávolítottuk, a lyukakat háromszor mostuk foszfáttal pufferelt konyhasóoldattal, amely 0,01% Polysorbate 80-t (P-PBS) tartalmazott. Ezt követően 100 μ l 125 I-tel jelölt OCIF-ot vagy standard OCIF-ot tartalmazó B-PBS-t adtunk minden lyukhoz. A lemezt ezután két órán keresztül szobahőmérsékleten állni hagytuk. Miután az oldatot leszívással eltávolítottuk, minden lyukat hatszor mostunk 200 μ l P-PBS-sel. 100 μ l, B-PBS-sel hígított peroxidázzal jelölt nyúl anti-OCIF poliklonális antitestet tartalmazó oldatot adtunk minden egyes lyukba. A lemezt két órán keresztül szobahőmérsékleten hagytuk állni. Miután az oldatot leszívással eltávolítottuk, minden lyukat hatszor mostunk 200 μ l P-PBS-sel. Ezt követően 100 μ l TMB oldatot (nagy érzékenységű oldható TMB reagens, Scytek Co.) adtunk minden egyes lyukba. Miután a lemezt szobahőmérsékleten 2-3 percen keresztül inkubáltuk, minden lyukhoz 100 μ l stop-oldatot (Stopping reagent, Scytek Co.) adtunk. 450 nm-en mikrolemez olvasóval megmértük minden lyuk abszorbanciáját. A 125 I-jelölt OCIF koncentrációját a standard OCIF készítmény felhasználásával készített kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg.

(4) Az OBM teljes aminosav sorrendjét kódoló cDNS nukleotid szekvenciájának meghatározása

A 8.(3) példában kapott OBM cDNS nukleotid szekvenciáját egy Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing kit (a Perkin Elmer Co. gyártmánya) felhasználásával határoztuk meg. Bővebben, az inzert fragmens nukleotid sorrendjét közvetlenül határoztuk meg a pOBM291, mint templát segítségével. A körülbelül 1,0 kb és 0,7 kb hosszúságú fragmenseket, amelyeket a pOBM291 EcoRI restrikciós enzimmel történő emésztése során kaptunk, a

pUC19 (Takara Shuzo Co.) plazmid EcoRI helyére vittük be. Ezen fragmensek nukleotid sorrendjét is meghatároztuk. A következő primereket használtuk: SRR2 primer, amelyet a pcDL-SR α 296-ba bevitt DNS fragmensek nukleotid sorrendjének meghatározásához használtunk, M13PrimerM3 és M13PrimerRV (mindkettő a Takara Shuzo Co. gyártmánya), amelyeket a pUC19 plazmidba bevitt DNS fragmensek nukleotid sorrendjének meghatározásához használtunk és az OBM#8 szintetizált primer, amelyet az OBM cDNS nukleotid sorrendjének alapján terveztünk meg. Ezen primerek szekvenciái a SEQ ID NO 3 - SEQ ID NO 6 alatt láthatók.

Továbbá az OBM cDNS meghatározott nukleotid sorrendje a SEQ ID NO 2 szekvenciaként látható és az ebből meghatározott aminosav sorrend a SEQ ID NO 1 szekvenciaként látható.

9. Példa

A találmány szerinti cDNS által kódolt fehérje expressziója

A pOBM291 plazmidot COS-7 sejtekbe transzfektáltuk egy 6 lyukas lemez minden lyukába Lipofectamine felhasználásával és a transzfektált COS-7 sejteket két napon keresztül 10% magzati borjúsérumot tartalmazó DMEM-ben növesztettük. A tápközeget ciszteín-metionin mentes DMEM-mel (Dainippon Seiyaku Co., Ltd.) cseréltük ki (800 μ l/lyuk), amely 5% dializált magzati borjúsérumot tartalmazott. A sejteket 15 percen keresztül növesztettük, majd ezt követően 14 μ l Express Protein Labeling Mix-et (10 mCi/ml, a NEN Co. gyártmánya) adtunk hozzá. Négy óra növesztés után 200 μ l 10% magzati borjúsérumot tartalmazó

DMEM-et adtunk hozzá. Majd egy óra növesztés után a sejteket kétszer mostuk PBS-sel. Ezt követően 0,5 ml, 1% TritonX-100-at, 1% marha hemoglobint, 10 µg/ml leupeptint, 0,2 TIU/ml aprotinint és 1 mM PMSF-et tartalmazó TSA puffert (0,14 M NaCl-ot és 0,025% NaN₃-ot tartalmazó 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)) adtunk hozzá és az elegyet egy órán keresztül jégen hagytuk állni. A sejteket pipettázással roncsoltuk és 4°C-on 10 percen keresztül 3000 x g-vel centrifugáltuk, hogy megkapjuk a felülúszót. 200µl hígító puffert (0,1% TritonX-100-at, 0,1% marha hemoglobint, 10 µg/ml leupeptint, 0,2 TIU/ml aprotinint és 1 mM PMSF-et tartalmazó TSA puffer) adtunk ezen felülúszó 100 µl-éhez. Az elegyet egy órán keresztül 4°C-on protein A Sepharose-zal (50 µl) rázattuk. Az így kapott keveréket 1 percig, 4°C-on 1500 x g-vel centrifugáltuk, hogy összegyűjtsük a felülúszót és ezáltal eltávolítottuk az(oka)t a frakció(ka)t, amely nem-specifikusan adszorbeálódott a Protein A Sepharose-hoz. OCIF-ot (1 µg) adtunk ezen felülúszóhoz és a keveréket 4°C-on egy órán át rázattuk, hogy véghezvigyük az OCIF OBM-hez történő kötődését. Anti-OCIF poliklonális antitestet (50 µg) adtunk hozzá és az elegyet egy órán át 4°C-on rázattuk. Ezt követően Protein A Sepharose-t (10 µl) adtunk hozzá és a keveréket egy további órán keresztül 4°C-on rázattuk, majd ezt követően egy 1 perces, 4°C-on 1500 x g-vel történő centrifugálással összegyűjtöttük a csapadékot. A csapadékot kétszer mostuk hígító pufferrel, kétszer marha hemoglobin mentes hígító pufferrel, egyszer TSA pufferrel és egyszer 50 mM Tris-HCl-val (pH 6,5). Mosás után 10% β-merkaptóetanolt tartalmazó SDS puffert (0,125 M Tris-HCl, 4% nátrium-dodecilszulfát, 20% glicerin, 0,002% brómfenol kék, pH

6,8) adtunk a csapadékhoz. Az elegyet 5 percen keresztül 100°C-on melegítettük és SDS-PAGE-ra vittük (12,5% poliakrilamid gél, Daiichi Chemical Co., Ltd.). A gélt szokásos eljárás szerint fixáltuk. Az izotóp jeleket Amplify™ (Amersham Co.) felhasználásával erősítettük és a mintát Bio Max MR filmre (Kodak Co.) exponáltuk -80°C-on. Az eredmények a 8. ábrán láthatók, ami azt mutatja, hogy a találmány szerinti cDNS által kódolt fehérje körülbelül 40.000-es molekulatömeggel rendelkezik.

10. Példa

A találmány szerinti cDNS által kódolt fehérje OCIF-hoz történő kötődése

A pOBM291 plazmidot COS sejtekbe transzfektáltuk egy 24 lyukas lemez minden lyukába Lipofectamine felhasználásával. 2-3 napos növesztés után a sejteket szérummentes DMEM tenyésztápközzel mostuk. A kötődési assay-hez való 200 µl tenyésztápközeget (olyan szérummentes DMEM tenyésztápközeg, amely 0,2% borjú szérumalbumint, 20 mM Hepes-t, 0,1mg/ml heparint és 0,2% NaN₃-ot tartalmaz), amelyet 20 ng/ml ¹²⁵I-tel jelölt OCIF-fal egészítettünk ki adtunk a lyukakba. A többi lyukba a kötődési assay-hez való 200 µl olyan tenyésztápközeget adtunk, amelyhez a 20 ng/ml ¹²⁵I-tel jelölt OCIF-on felül 8 µg/ml jelöletlen OCIF-ot is adtunk. Egy órás, 37°C-on CO₂-inkubátorban (5% CO₂) történő növesztést követően a sejteket kétszer mostuk 500 µl 0,1mg/ml heparint tartalmazó foszfáttal pufferelt konyhasóoldattal. Majd 500 µl 0,1 N NaOH-ot adtunk minden lyukba és a lemezt a sejtek feloldása céljából 10 percen át szobahőmérsékleten állni

hagytuk. Minden lyukban megmértük gamma számlálóval a ^{125}I mennyiségét. Eredményként, mint ahogy az a 9. ábrán látható, azt kaptuk, hogy a ^{125}I -tel jelölt OCIF csak azokhoz a sejtekhez kötődik, amelyekbe a pOBM291 plazmidot transzfektáltuk. Ezenfelül megállapítottuk, hogy a kötődés nyilvánvalóan a (jelöletlen) OCIF 400-szoros koncentrációban történő hozzáadása által gátlódott. Ezen eredmények azt mutatják, hogy a pOBM291 plazmidon lévő cDNS által kódolt OBM fehérje specifikusan kötődik a transzfektált COS-7 sejtek felszínén lévő OCIF-hoz.

11. Példa

A ^{125}I -tel jelölt OCIF és a találmány szerinti cDNS által kódolt fehérje keresztkötése

^{125}I -tel jelölt monomer típusú OCIF és a találmány szerinti cDNS által kódolt fehérje keresztkötését azért végeztük el, hogy a találmány szerinti cDNS által kódolt fehérje jellemzőit még részletesebben megvizsgáljuk. Miután a pOBM291 plazmidot a 8.(3) példában használt eljárás szerint COS-7 sejtekbe transzfektáltuk, a fent ismerttetett kötődési assay-hez való, ^{125}I -tel jelzett OCIF-ot tartalmazó (25 ng/ml) 200 μl tenyésztápközeget, adtunk a lyukakba. A többi lyukba olyan kötődési teszthez való tenyésztápközeget adtunk, amelyhez 400-szoros koncentrációban adtunk jelöletlen OCIF-ot a hozzáadott ^{125}I -tel jelölt OCIF-on felül. Egy órás 37°C -on CO_2 -inkubátorban (5% CO_2) történő növesztés után a sejteket kétszer mostuk 500 μl 0,1 mg/ml heparint tartalmazó foszfáttal pufferelt konyhasóoldattal. 100 $\mu\text{g/ml}$ keresztkötő ágens, DSS-t (diszukcinimidil-szuberát, a

Pierce Co. gyártmánya) tartalmazó 500 μ l foszfáttal puffereelt konyhasóoldatot adtunk a sejtekhez és ezt egy 10 perces 0°C-on lezajló reakció követte. A sejteket kétszer mostuk 1 ml hideg foszfáttal puffereelt konyhasóoldattal (0°C). 1% Triton X-100-at (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.), 2 mM PMSF-et (fenilmetilszulfonil-fluorid, Sigma Co.), 10 μ M Pepstatint (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.), 10 μ M Leupeptint (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.), 10 μ M antipain-t (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.) és 2 mM EDTA-t (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.) tartalmazó 100 μ l 20 mM Hepes puffert adtunk hozzá, majd ezt követően a lyukakat a sejtek feloldásához 30 percen át szobahőmérsékleten hagytuk állni. Ezen mintákból 15 μ l-t a szokásos eljárás szerint SDS jelenlétében redukáló körülmények között melegítettünk és 4-20% poliakrilamid gradiens gél (Daiichi Pure Chemical Co., Ltd.) felhasználásával SDS-elektroforézissel vizsgáltuk. Az elektroforézis után a géleket megszárítottuk és BioMax MS filmre (Kodak Co.) exponáltuk BioMax MS érzékenyítő ernyő (Kodak Co.) felhasználásával 24 órán keresztül -80°C-on. Az exponált filmet szokásos eljárás szerint hívtuk elő. Eredményként, mint azt a 10. ábra mutatja, egy 90.000-110.000 molekulasúlyú sávot kaptunk a 125 I-tel jelölt monomer típusú OCIF és a találmány szerinti cDNS által kódolt fehérje keresztkötése jóvoltából.

12. Példa

Northern blott analízis

A növesztett ST2 sejteket egy 25 cm²-es tapadó sejtnövesztésre szolgáló T-edénybe összeöntöttük,

tripszínnel kezeltük és a T-edényből arattunk. Mosás után a sejteket egy 225 cm²-es T-edénybe ültettük át és 4 napon keresztül CO₂-inkubátorban növesztettük őket 60 ml olyan α -MEM tenyésztápközegeben, amely 10⁻⁸ M aktív formájú D₃-vitamint, 10⁻⁷ M dezametazont és 10% magzati borjúsérumot tartalmazott. Az így növesztett ST2 sejtekből Isogen (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.) felhasználásával kivontuk az összes RNS-t. Továbbá ugyanilyen módon azokból az ST2 sejtekből is kivontuk az összes RNS-t, amelyeket aktív formájú D₃-vitamin és dexametazon hiányában növesztettünk. Miután 2,0 μ l 5X gélelektroforézis puffer oldatot (0,2 M morfolino propánszulfonsav, pH 7,0, 50 mM nátrium-acetát, 5 mM EDTA) és 3,5 μ l formaldehidet és 10 μ l formamidot hozzáadtunk mindegyik összes RNS 20 μ g-jához (4,5 μ l), az elegyeket 15 percen át 55°C-on inkubáltuk és elektroforézissel megvizsgáltuk. Az elektroforézishez való gél 1,0% agarózból, 2,2 M deionizált formaldehidből, 40 mM morfolino propánszulfonsavból (pH 7,0), 10 mM nátrium-acetátból és 1 mM EDTA-ból állítottuk elő. Az elektroforézist 40 mM morfolino propánszulfonsavból, pH 7,0, 10 mM nátrium-acetátból és 1 mM EDTA-ból álló puffer oldatban végeztük el. Az elektroforézis után az RNS-t nylon membránra vittük át. A pOBM291 EcoRI restrikciós enzimmel végzett emésztése során körülbelül 1,0 kb DNS fragmenst kaptunk. A hibridizációt ezen DNS fragmens felhasználásával végeztük, Megaprime DNS jelölő kittel (Amersham Co.) jelölve és próbaként α -³²P-dCTP-t (Amersham Co.) használva. Eredményként, mint az a 11. ábrán látható, megállapítottuk, hogy amennyiben ST2 sejteket aktív formájú D₃-vitamin és dexametazon jelenlétében növesztettünk, a találmány szerinti cDNS által kódolt fehérje (OBM) génexpressziója erősen indukált.

13. Példa

A találmány szerinti cDNS által kódolt fehérje osteoclast képzést segítő képessége

A 8.(3) példában ismertetett eljárás szerint pOBM291-et transzfektáltunk COS sejtekbe. Három nap elteltével a tripszinizált sejteket centrifugálás segítségével egyszer mostuk foszfáttal pufferelt konyhasóoldattal, majd 1% paraformaldehidet tartalmazó PBS-sel fixáltuk szobahőmérsékleten 5 percen át, ezt követően centrifugálás segítségével PBS-sel hatszor mostuk. 700 μ l 1×10^6 /ml egér lépsejtet és 350 μ l 4×10^4 /ml, 10^{-9} M aktív formájú D₃-vitamint, 10^{-7} M dexametazont és 10% magzati borjúsérumot tartalmazó α -MEM tenyésztápközegben szuszpendált ST2 sejtet adtunk egy 24 lyukas lemezbe. TC inzertet (Nunc Co.) raktunk minden lyukba. A fent leírt fixált COS sejteket (350 μ l) a fent említett tenyésztápközeggel különböző koncentrációkra hígítottuk és a TC inzerthez OCIF oldatot 50 μ l adtunk és 6 napon keresztül 37°C-on növesztettük őket. Eredményként megállapítottuk, hogy az OCIF osteoclast képzést gátló aktivitása a találmány szerinti cDNS által kódolt fehérjével gátolható.

14. Példa

A szekretált formájú OBM expressziója

- (1) A szekretált formájú OBM expressziójához való plazmid elkészítése

Primerként OBM HF-et (SEQ ID NO 7) és OBM XR-et (SEQ ID NO 8), templátként pOBM291-et felhasználva végeztünk PCR reakciót. Az agaróz gélelektroforézis segítségével végzett tisztítás után a terméket HindIII és EcoRI restriktációs enzimekkel emésztettük és tovább tisztítottuk agaróz gélelektroforézis segítségével. A tisztított fragmenst (0,6 kb), a pSec TagA (Invitrogen Co.) HindIII/EcoRI fragmensét (5,2 kb) és az OBM cDNS EcoRI/PmaCI fragmensét (0,32 kb) egy ligálás kit ver. 2 (Takara Shuzo Co.) felhasználásával ligáltuk. A reakciótermék felhasználásával transzformáltunk *Escherichia coli* DH5 α -t. A plazmidokat az így kapott ampicillin rezisztens törzsekből tisztítottuk alkáli SDS eljárással és restriktációs enzimekkel emésztettük, hogy kiválasszuk azt a plazmidot, amely 0,6 kb és 0,32 kb hosszúságú pSec TagA-ba bevitt fragmenseket tartalmaz. A kiválasztott plazmidot úgy azonosítottuk, hogy a szekretált formájú OBM-et kódoló szekvenciával rendelkezik (nukleotid sorrend: 338-1355 a SEQ ID NO 2-ben, aminosav sorrend: 72-316 a SEQ ID NO 1-ben), amit egy „dyeterminator cycle sequencing FS kit” (Perkin Elmer Co.) segítségével végzett szekvenálással határoztunk meg. Ezt a plazmidot NheI és XhoI restriktációs enzimekkel emésztettük, hogy a szekretált formájú OBM cDNS-t tartalmazó fragmenst (1,0kb) izoláljuk agaróz gélelektroforézissel. Ezt a fragmenst egy pCEP4 expressziós vektor NheI/XhoI fragmensébe (10,4 kb) (Invitrogen Co.) vittük be egy ligálási kit felhasználásával és ennek reakciótermékét felhasználva transzformáltunk *Escherichia coli* DH5 α sejteket. A plazmidokat az így kapott ampicillin rezisztens törzsekből tisztítottuk alkáli SDS eljárással és restriktációs enzimekkel emésztettük, hogy kiválasszuk azt az *Escherichia coli* törzset, amely tartalmazza a

szekretált formájú OBM expressziós plazmidjét (pCEP sOBM) a megfelelő szerkezettel. A pCEP sOBM-et tartalmazó *Escherichia coli* törzset növesztettük és a pCEP sOBM-et „QIA filter plasmid midi kit” (Qiagen Co.) segítségével tisztítottuk.

(2) A szekretált formájú OBM expressziója

293-EBNA sejteket szuszpendáltunk 10% FCS-t tartalmazó IMDM-ben (IMDM-10% FCS) és egy kollagénnel bevont 24 lyukas lemezbe (a Sumitomo Bakelite Co., Ltd. gyártmánya) ültettük 2×10^5 /2 ml/lyuk sejtsűrűséggel és egy éjszakán át növesztettük őket. A sejteket 1 μ g pCEP sOBM-mel vagy pCEP4-gyel transzfektáltuk 4 μ l Lipofectamine (Gibco Co.) felhasználásával. Miután 0,5 ml szérummentes IMDM-ben vagy IMDM-10% FCS-ben két napon keresztül növesztettük a sejteket, összegyűjtöttük a kondicionált tápközeget. A szekretált formájú OBM kondicionált tápközegekben végzett expresszióját a következők szerint vittük véghez. A kondicionált tápközegekhez annyi nátrium-hidrogénkarbonátot adtunk, hogy végső koncentrációja 0,1 M legyen és az oldatot egy 96 lyukas lemezbe adagoltuk. A lemezt egy éjszakán át 4°C-on állni hagytuk, így immobilizálva az OBM-et a kondicionált tápközegekben a 96-lyukas lemezen. A lemezt PBS-sel (B-PBS) négyszeresére hígított Block Ace™ (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) oldattal töltöttük fel és két órán át szobahőmérsékleten hagytuk állni, hogy a lemezen a visszamaradt kötőhelyeket blokkoljuk. Miután minden lyukhoz B-PBS-sel hígított 100 μ l 3-100 ng/ml OCIF-ot adtunk, a lemezt két órán át 37°C-on hagytuk állni, majd ezt követően 0,05% Tween 20-at (PBS-T) tartalmazó PBS-sel mostuk. Ezek után a WO96/26217-ben ismertetett, B-PBS-sel hígított 100 μ l peroxidázzal

jelölt nyúl anti-OCIF poliklonális antitestet adtunk minden lyukhoz. Miután két órán át 37°C-on állni hagytuk, a lyukakat hatszor mostuk PBS-T-vel. Ezt követően lyukanként 100 µl mennyiségű TMB oldatot (TMB oldható reagens, nagy érzékenységű, Scytek Co.) adtunk hozzá és szobahőmérsékleten körülbelül 10 percen át hagytuk állni, ami után a reakciót 100 µl stop-oldat (Stopping reagent, Scytek Co.) minden lyukhoz történő hozzáadásával leállítottuk. Egy mikrolemez olvasó segítségével minden lyuk abszorbanciáját 450 nm-en megmértük. Az eredmények a 12. ábrán láthatók, ami azt mutatja, hogy a 450 nm-en mért abszorbancia a hozzáadott OCIF koncentrációjának függvényében növekedett azon a lemezen, amely kondicionált tápközegében a pCEP sOBM-mel transzfektált sejtek voltak immobilizálva. Másrészt az abszorbancia szemmel láthatóan nem növekedett azon a lemezen, amely kondicionált tápközegében a pCEP4 vektorral transzfektált sejtek voltak immobilizálva. A 13. ábra egy olyan kísérlet eredményeit mutatja, ahol az immobilizációhoz használt kondicionált tápközeg arányát 5-90% tartományban változtattuk és az OCIF egy specifikus koncentrációját (50 ng/ml) adtuk hozzá. Látható, hogy a 450nm-en mért abszorbancia a kondicionált tápközeg növekedésének arányában növekedett azon a lemezen, amely kondicionált tápközegében a pCEP sOBM-mel transzfektált sejtek voltak immobilizálva, míg ellenben az abszorbancia ilyen növekedése nem volt látható azon a lemezen, amely kondicionált tápközegében a pCEP4 vektorral transzfektált sejtek voltak immobilizálva. Ezen eredmények alapján megállapítottuk, hogy a pCEP sOBM-mel transzfektált sejtek kondicionált tápközegében termelődik a szekretált formájú OBM.

15. Példa

A tioredoxin-OBM fúziós fehérje (Trx-OBM) expressziója

(1) A tioredoxin-OBM fúziós fehérje (Trx-OBM) expressziós vektor előállítása

10 μ l 10X ExTaq puffert (Takara Shuzo Co.), 8 μ l 10 mM dNTP-t (Takara Shuzo Co.), 77,5 μ l sterilizált desztillált vizet, 2 μ l pOBM291 (10 ng/ μ l) vizes oldatot, 1 μ l primer OBM3-at (100 pmol/ μ l, SEQ ID NO 9), 1 μ l primer OBMSalR2-öt (100 pmol/ μ l, SEQ ID NO 10) és 0,5 μ l ExTaq-t (5 u/ μ l) (Takara Shuzo Co.) kevertünk össze és egy mikrocentrifuga csőben reagáltattunk (PCR reakció). Miután 95°C-on 5 percig, 50°C-on egy másodpercig, 55°C-on egy percig, 74°C-on egy másodpercig és 72°C-on 5 percig reagáltattuk, egy olyan ciklikus reakciót ismételtünk 25-ször, ami 96°C-on egy percig, 50°C-on egy másodpercig, 55°C-on egy percig, 74°C-on egy másodpercig és 72°C-on 3 percig zajló reakciókból áll. Az összes reakciófolyadékból egy körülbelül 750bp DNS fragmenst tisztítottunk 1% agaróz gélelektroforézis segítségével QIAEX II gélextrakciós kit (Qiagen Co.) felhasználásával. A tisztított DNS fragmens teljes mennyiségét SalI és EcoRI restrikciós enzimekkel (Takara Shuzo Co.) emésztettük és egy 1.5% agaróz gélelektroforézisre vittük, hogy egy körülbelül 160 bp DNS fragmenst (1. fragmens) tisztítsunk ki, amit 20 μ l sterilizált desztillált vízben feloldottunk. Ugyanezen a módon egy körülbelül 580 bp DNS fragmenst (2. fragmens) kaptunk 4 μ g pOBM291 BamHI és EcoRI restrikciós enzimekkel (Takara Shuzo Co.) végzett emésztésével és egy körülbelül

3,6 kb DNS fragmenst (3. fragmens) 2 µg pTrxFus (Invitrogen Co.) BamHI és SalI restriktációs enzimekkel (Takara Shuzo Co.) végzett emésztésével, ezeket megtisztítottuk és 20 µl sterilizált desztillált vízben feloldottuk. A DNS fragmensek tisztításához QiaexII gélextrakciós kitet használtunk. Az 1-3. fragmenseket „DNA ligation kit ver. 2” (Takara Shuzo Co.) felhasználásával 16°C-on 2.5 órán át tartó inkubáció segítségével ligáltuk. A ligációs reakcióelegy felhasználásával transzformáltunk GI724 *Escherichia coli* törzset (Invirogen Co.) a ThioFusion Expression System (Invirogen Co.) használati útmutatójában leírt eljárás szerint. Egy olyan plazmiddal rendelkező mikroorganizmus törzset, amelyben az OBM cDNS fragmens (nukleotid sorrend: 350-1111 a SEQ ID NO 2-ben, aminosav sorrend: 76-316 a SEQ ID NO 1-ben) keretben fuzionált egy tioredoxin génhez, választottunk ki a kapott ampicillin rezisztens transzformánsok közül a restriktációs enzimekkel végzett emésztés során kapott restriktációs térképek vizsgálata és a DNS szekvencia meghatározása segítségével. Az így kapott mikroorganizmus törzset GI724/pTrxOBM25-nek neveztük el.

(2) OBM expressziója *Escherichia coliban*

GI724/pTrxOBM25-öt illetve pTrxFus-t tartalmazó GI724-et (GI724/pTrxFus) hat órán keresztül 30°C-on rázatva növesztettünk 2 ml RMG-Amp tenyésztápközegben (0,6% Na₂HPO₄, 0,3% KH₂PO₄, 0,05% NaCl, 0,1% NH₄Cl, 1,2% kazaminosav (Difco Co.), 1% glicerin, 1 mM MgCl₂ és 100 µg/ml ampicillin (Sigma Co.), pH 7,4). 0,5ml táptalajt adtunk 50 ml indukciós tenyésztápközeghez (0,6% Na₂HPO₄, 0,3% KH₂PO₄, 0,05% NaCl, 0,1% NH₄Cl, 0,2% kazaminosav, 0,5% glükóz, 1 mM MgCl₂ és 100 µg/ml ampicillin, pH 7,4) és

rázatással 30°C-on növesztettük. Amikor az OD_{600nm} elérte a körülbelül 0,5-öt, 0,1 mg/ml végső koncentrációban L-triptofánt adtunk hozzá, majd ezt követően további 6 órán keresztül 30°C-on ráztuk a tenyészetet. A tenyészet táptalaját 3000 x g sebességgel centrifugáltuk a sejtek összegyűjtése céljából és ezt 12,5 ml PBS-ben (10 mM foszfát puffer, 0,15 M NaCl, pH 7,4) szuszpendáltuk. A sejtek roncsolásához a szuszpenziót ultrahang generátorral (Ultrasonics Co.) kezeltük. A roncsolt sejteket 7000 x g sebességgel 30 percen át centrifugáltuk, hogy az oldható fehérje frakciónak megfelelő felülúszó folyadékot megkapjuk. 10 µl ilyen oldható fehérje frakciót redukáló körülmények között SDS poliakrilamid (10%) elektroforézissel megvizsgáltunk. Ennek eredménye, hogy egy 40 kDa molekulatömegű sávot találtunk a GI724/pTrxOBM25 oldható fehérje frakciójában, de ezt nem találtuk meg a GI724/pTrxFus oldható fehérje frakciójában (14. ábra). Következésképpen megállapítottuk, hogy a tioredoxin és OBM fúziós fehérjéjét (Trx-OBM) expresszáltattuk *Escherichia coli*-ban.

(3) A Trx-OBM OCIF felé mutatott kötődési képessége

Az expresszált Trx-OBM OCIF-hoz történő kötődését a következő kísérlet szerint igazoltuk. 10 mM nátrium-hidrogénkarbonát oldattal 5000-szeresére hígított anti-tioredoxin antitestet (Invirogen Co.) adtunk egy 96 lyukas immunlemezre (Nunc Co.) 100 µl/lyuk mennyiségben. Miután egy éjszakán át 4°C-on állni hagytuk, a lyukakban lévő folyadékot eltávolítottuk. 200 µl, PBS-sel (BA-PBS) kétszeresére hígított Block Ace™ (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) oldatot adtunk minden lyukba. Miután egy órán át szobahőmérsékleten állni hagytuk, az oldatot

eltávolítottuk és a fent ismertetett GI724/pTrxOBM25-ből vagy GI724/pTrxFus-ból származó oldható fehérje frakciókat BA-PBS-sel hígítva különböző koncentrációkban minden lyukhoz 100 µl mennyiségben adtuk hozzá. Miután két órán át szobahőmérsékleten állni hagytuk, mindegyik lyukat háromszor mostuk PBS-T-vel és BA-PBS-sel hígított 100 µl OCIF-fal (100 ng/ml) töltöttük fel. Miután két órán át szobahőmérsékleten állni hagytuk, mindegyik lyukat háromszor mostuk PBS-T-vel és BA-PBS-sel 2.000-szeresére hígított 100 µl peroxidázzal jelölt nyúl anti-OCIF poliklonális antitesttel (a WO 96/26217-ben ismertetett) töltöttük fel. Miután két órán át szobahőmérsékleten állni hagytuk, mindegyik lyukat hatszor mostuk PBS-T-vel és 100µl TMB oldattal (TMB oldható reagens, nagy érzékenységű, Scytek Co.) töltöttük fel. Miután körülbelül 10 percre szobahőmérsékleten állni hagytuk, mindegyik lyukat 100µl stop-oldattal (Stopping Reagent, Scytek Co.) töltöttük fel. Egy mikrolemez olvasó segítségével mindegyik lyuk abszorbanciáját megmértük 450 nm-en. Az eredmények a 15. ábrán láthatók. Nem volt abszorbanciabeli különbség a GI724/pTrxFus-ból származó hozzáadott oldható fehérje frakciót tartalmazó minta és ezen oldható fehérje frakció hozzáadása nélkül készített minta között. Másrészt az abszorbancia azon minták esetében az oldható fehérje frakció koncentrációjával arányosan megnőtt, amelyekhez a GI724/pTrxOBM25-ből származó oldható fehérje frakciót adtuk. A másik kísérlet eredményei, amelyben az oldható fehérje frakció hígítási mértékét állandó értéken (1%) tartottuk, ellenben BA-PBS-sel különböző koncentrációkra (0-100 ng/ml) hígított OCIF-et adtunk hozzá, a 16. ábrán láthatók. Látható, hogy az OCIF bármely koncentrációjánál az abszorbancia alacsony maradt azon minták esetében, ahol a GI724/pTrxFus-ból származó oldható fehérje frakciót

használtunk, míg az abszorbancia az OCIF koncentrációjával arányosan növekedett azon minták esetében, amelyekhez a GI724/pTrxOBM25-ből származó oldható fehérje frakciót adtuk. Ezen eredmények alapján megállapítottuk, hogy a GI724/pTrxOBM25-ből előállított Trx-OBM OCIF-hoz kötődő képességgel rendelkezik.

(4) Trx-OBM-et termelő Escherichia coli nagymértékű növesztése

A GI724/pTrxOBM25 sejteket RMG-Amp agaron (0,6% Na_2HPO_4 , 0,3% KH_2PO_4 , 0,05% NaCl , 0,1% NH_4Cl , 2% kazamínosav, 1% glicerin, 1 mM MgCl_2 és 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin, 1,5% agar, pH 7,4) szélesztettük platina oltókacccsal. A sejteket egy éjszakán át 30°C-on növesztettük. Az így növesztett sejteket 10 ml indukciós tápközegeben szuszpendáltuk. A szuszpenzióból mindkettő 2 literes, 500 ml indukciós tápközeget tartalmazó Erlenmeyer lombikba 5 ml-t adtunk és 30°C-on rázatás közben növesztettünk. Amikor az $\text{OD}_{600\text{nm}}$ elérte a körülbelül 0,5-öt, 0,1 mg/ml végső koncentrációban L-triptofánt adtunk hozzá. A rázatva növesztést hat órán keresztül 30°C-on folytattuk. A tenyészet táptalaját 20 percen keresztül 3000 x g sebességgel centrifugáltuk, hogy összegyűjtsük a sejteket, amelyeket 160 ml PBS-ben szuszpendáltunk. A szuszpenziót ultrahangos generátorban (Ultrasonics Co.) kezeltük a sejtek roncsolása céljából. A felülúszó folyadékot 30 percen át 7000 x g sebességgel centrifugáltuk, hogy megkapjuk az oldható fehérje frakciót.

(5) Az OCIF-immobilizált affinitás oszlop elkészítése

Összekevertünk 2 g TSKgel AF-Tolesyl Toyopal 650-et (Tosoh Corp.) és 35,0 mg, a WO96/26217-ben ismertetett eljárás szerint előállított rekombináns OCIF-ot tartalmazó 40 ml 1,0 M kálium-foszfát puffert (pH 7,5). A keveréket egy éjszakán át 4°C-on finoman rázattuk, hogy végbemenjen a kapcsolási reakció. A reakcióelegyet a felülúszó eltávolításához centrifugáltuk. Annak érdekében, hogy a felesleges visszamaradt anyagokat inaktiváljuk, 40 ml 0,1 M Tris-HCl puffert (pH 7,5) adtunk a kicsapatott hordozóhoz és a keveréket egy órán keresztül finoman rázattuk szobahőmérsékleten. Az oszlopban lévő hordozót 0,01% poliszorbát 80-at és 0,2 M NaCl-ot tartalmazó 0,1 M glicin-HCl pufferrel (pH 3,3) és 0,01% poliszorbát 80-at és 0,2 M NaCl-ot tartalmazó 0,1 M nátrium-citrát pufferrel (pH 2,0) mostuk. Az oszlopban lévő hordozót úgy hoztuk egyensúlyba, hogy kétszer feltöltöttük 0,01% poliszorbát 80-at tartalmazó 10 mM nátrium-foszfát pufferrel (pH 7,4).

(6) A Trx-OBM tisztítása OCIF-immobilizált affinitás oszlop felhasználásával

Hacsak nem adtunk meg más hőmérsékletértéket, a Trx-OBM tisztítását 4°C-on végeztük. A fent ismertetett OCIF-immobilizált affinitás hordozót (10 ml) és a 15.(4) példában előállított oldható fehérje frakciót (120 ml) összekevertük. Az elegyet egy éjszakán át finoman kevertettük 4°C-on négy darab 50 ml-es centrifugacsőben rotor segítségével. Egy Econo-column™-t (belső átmérője: 1,5 cm, hossza: 15 cm, a BioRad Co. gyártmánya) feltöltöttünk a keverékben lévő hordozóval. Az oszlopot 300 ml, 0,01% poliszorbát 80-at tartalmazó PBS-sel, 100 ml, 0,01% poliszorbát 80-at és 2 M NaCl-ot tartalmazó 10 mM nátrium-foszfát pufferrel (pH 7,0) és 100 ml, 0,01% poliszorbát 80-at és 0,2 M NaCl-ot tartalmazó 0,1 M

glicin-HCl pufferrel (pH 3,3) töltöttük fel ebben a sorrendben. Ezt követően az oszlopon adszorbeálódott fehérjét 0,01% poliszorbát 80-at és 0,2 M NaCl-ot tartalmazó 0,1 M nátrium-citrát pufferrel (pH 2,0) eluáltuk. Az eluátumot 5 ml-es adagokban gyűjtöttük össze. Mindegyik így kapott frakciót azonnal semlegesítettük 10 térfogat% 2 M Tris puffer (pH 8,0) hozzáadásával. Az eluált frakciókban a Trx-OBM jelenlétét vagy hiányát az előzőekben, a 15.(3) példában (OCIF felé mutatott kötődési képesség) ismertetett eljárás szerint határoztuk meg. A Trx-OBM-et tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük és tovább tisztítottuk.

(7) A Trx-OBM tisztítása gelszűrés segítségével

A 15.(6) példában kapott körülbelül 25 ml Trx-OBM frakciókat centrifugálással hozzávetőlegesen 0,5 ml-re koncentráltuk Centriplus 10 és Centricon 10 (Amicon Co.) felhasználásával. Ezt a mintát egy Superose 12 HR 10/30 oszlopra (1,0 x 30 cm, Pharmacia Co.) vittük, amit előzőleg 0,01% poliszorbát 80-at tartalmazó PBS-sel hoztunk egyensúlyba. Az elválasztáshoz mozgó fázisként 0,01% poliszorbát 80-at tartalmazó PBS-t használtunk 0,25 ml/perc térfogatárammal. Az oszlopról lejövő eluátumot 0,25 ml-es adagokban gyűjtöttük össze. Az így összegyűjtött frakciókban lévő Trx-OBM-et az előzőekben, a 15.(3) példában ismertetett eljárás szerint és Phast System (Pharmacia Co.), valamint ezüstfestés segítségével végzett SDS-poliakrilamid elektroforézissel (10-15% poliakrilamid gél, Pharmacia Co.) határoztuk meg. A tisztított Trx-OBM-et tartalmazó frakciókat (20-23. frakciók) összegyűjtöttük és meghatároztuk a Trx-OBM fehérje koncentrációját. A fehérjekoncentráció meghatározását standardként marha szérumalbumint

felhasználva végeztük el, DC-Protein assay kit (BioRad Co.) segítségével.

16. Példa

Az OBK osteoclast képzést indukáló aktivitása

pOBK291-et és pcDL-SR α 296-ot COS-7 sejtekbe transzfektáltuk Lipofectamine (Gibco Co.) felhasználásával. A sejteket egy napon keresztül 10% FCS tartalmú DMEM-ben növesztettük, tripszinizáltuk, 5×10^4 sejt/lyuk mennyiségben 24-lyukú lemezekre fedőlemezeken (15 mm-es kerek, a Matsunami Co. gyártmánya) szélesztettük és két napon át növesztettük. A tenyésztésműt PBS-sel egyszer mostuk. A sejteket 1% paraformaldehid tartalmú PBS-sel fixáltuk, szobahőmérsékleten 8 percen át. A lemezt, amelyekhez a fixált sejteket erősítettük, PBS-sel hatszor mostuk, majd ezt követően minden lyukhoz 700 μ l-t adtunk abból az oldatból, amely úgy készült, hogy 10^{-8} M aktív formájú D_3 -vitamint, 10^{-7} M dexametazont és 10% magzati borjúsérumot tartalmazó α -MEM-ben 1×10^6 /ml sejtsűrűséggel egér lépsejteket szuszpendáltunk. Minden lyukba Millicell PCF-et (Millipore Co.) helyeztünk, és a fent említett tenyésztésközegben szuszpendált ST2 sejtekből (4×10^4 /ml) 700 μ l-t adtunk a Millicell PCF-be, majd ezután hat napon keresztül 37°C-on inkubáltunk. A növesztés után a Millicell PCF-et eltávolítottuk, a lemezt PBS-sel egyszer mostuk és a sejteket acetone-etanol oldattal (50:50) egy percig fixáltuk. Ezután a borkősav rezisztens sav foszfátáz aktivitást (TRAP) mutató sejteket, amely aktivitás az osteoclastok specifikus jellemzője, Leukocyte Acid Phosphatase kit (Sigma Co.)

felhasználásával szelektíven festettük. A mikroszkópos megfigyelés eredményeképp azt kaptuk, hogy azokba a lyukakba, amelyekbe a pcDL-SR α 296-tal transzfektált COS-7 sejteket fixáltunk, nem figyeltünk meg TRAP-pozitív sejteket. Ezzel ellentétben 45 ± 18 (átlag $\pm$ szórás, $n=3$) TRAP-pozitív sejtet figyeltünk meg azokban a lyukakban, amelyekbe pOBM291-gyel transzfektált COS-7 sejteket fixáltunk. Továbbá azt is megállapítottuk, hogy ezen TRAP-pozitív sejtekhez kalcitonin kötődött. Ezen eredmények alapján bebizonyítottuk, hogy az OBM osteoclast képzést indukáló aktivitással rendelkezik.

17. Példa

A Trx-OBM és a szekretált formájú OBM osteoclast képzést indukáló aktivitása

10^{-8} M aktív formájú D_3 -vitamint, 10^{-7} M dexametazont és 10% magzati borjúsérumot tartalmazó α -MEM-ben szuszpendáltunk 2×10^6 /ml koncentrációban egér lépsejteket. A szuszpenziót 24-lyukas lemezbe töltöttük, lyukanként 350 μ l mennyiségben. Ezután minden lyukba a tisztított Trx-OBM fent említett tenyésztápközeggel hígított 350 μ l-ét (40 ng/ml), 350 μ l olyan IMDM-10% FCS-ben 293-EBNA sejtek növesztésével előállított kondicionált tápközeg a fent említett tenyésztápközeggel 10-szeresére hígított oldatát töltöttük, amelybe pCEP sOBM-et vagy pCEP4-et transzfektáltunk, vagy 350 μ l csak a fent említett tenyésztápközegbe töltöttük. Millicell PCF-et (Millipore Co.) helyeztünk minden lyukra, amelyhez a fent említett tenyésztápközegben szuszpendált ST2 sejtekből (4×10^4 /ml) 600 μ l-t adtunk. Hat napon keresztül tartó inkubáció után

eltávolítottuk a Millicell PCF-et. A lemezt PBS-sel egyszer mostuk és a sejteket acetón-etanol oldattal (50:50) egy percig fixáltuk. Ezután a borkősav rezisztens sav foszfatáz aktivitást (TRAP aktivitás) mutató sejteket Leukocita Acid Phosphatase kit (Sigma Co.) felhasználásával szelektíven festettük. A mikroszkópos megfigyelés eredményeképp azt kaptuk, hogy azokban a lyukakban, amelyekbe nem adtunk Trx-OBM-et, nem figyeltünk meg TRAP-aktivitást mutató sejteket, míg 106 ± 21 (átlag $\pm$ szórás, $n=3$) TRAP-pozitív sejtet figyeltünk meg azokban a lyukakban, amelyekbe adtunk Trx-OBM-et. Hasonlóan, nem figyeltünk meg TRAP-aktivitást mutató sejteket azokban a lyukakban, amelyekhez pCEP4-gyel transzfektált 293-EBNA kondicionált tápközegét adtuk, míg 120 ± 31 (átlag $\pm$ szórás, $n=3$) TRAP-pozitív sejtet figyeltünk meg azokban a lyukakban, amelyekhez pCEPsOBM-mel transzfektált 293-EBNA kondicionált tápközegét adtuk. Továbbá azt is megállapítottuk, hogy ezen TRAP-pozitív sejtekhez kalcitonin kötődött. Ezen eredmények bebizonyították, hogy a Trx-OBM és a szekretált formájú OBM osteoclast képzést indukáló aktivitással rendelkezik.

18. Példa

A találmány szerinti cDNS által expresszált OEM fehérje és a találmány szerinti természetes típusú OCIF-kötő fehérje azonossága

(1) Nyúl anti-OBM poliklonális antitest készítése

Három hím japán fehér nyulat (tömegük: 2,5-3,0 kg, a Kitayama Labes Co. szállította) immunizáltunk a 14.(6) és 14.(7) példákban ismertetett eljárás szerint előállított

tisztított OBM-mel (thioredoxin-OBM fúziós fehérje) oly módon, hogy hat alkalommal egy héten egyszer szubkután módon injektáltunk 1 ml/dózis úgy készített emulziót, hogy összekevertünk 200 µg/ml tisztított OBM-et azonos térfogatú Freund-féle komplett hatásjavítóval (Difco Co.). Az utolsó immunizációt követő tizedik napon vért vettünk a nyulaktól. Az antitestet a következők szerint tisztítottuk a szérumból. Az antiszérumhoz ammónium-szulfátot adtunk, amit PBS-sel kétszeresére hígítottunk 40% (w/v%) végső koncentrációra. Miután egy órán át 4°C-on állni hagytuk, a keveréket 20 percen keresztül 8000 x g sebességgel centrifugáltuk, hogy csapadékot kapjunk. A csapadékot kis mennyiségű PBS-ben feloldottuk, PBS-sel szemben 4°C-on dializáltuk és egy Protein G-Sepharose oszlopra (a Pharmacia Co. gyártmánya) töltöttük. Miután PBS-sel mostuk, az adszorbeálódott immunglobulin G-t 0,1 M glicin-HCl puffer oldattal (pH 3,0) eluáltuk. Az eluátumot azonnal semlegesítettük 1,5 M Tris-HCl pufferrel (pH 8,7). Miután az eluált fehérjefrakciókat PBS-sel szemben dializáltuk, 280 nm-en megmértük az abszorbanciát, hogy meghatározzuk a fehérjekoncentrációt ($E^{1\%}_{1\text{cm}}$ 13,5). Torma peroxidázzal jelölt anti-OBM antitestet készítettünk maleimiddel aktivált peroxidáz kit (Pierce Co.) segítségével a következők szerint. 80 µg N-szukcinimid-S-acetil-tioecetsavat adtunk 1mg tisztított antitesthez és szobahőmérsékleten reagáltattuk 30 percen át. Az így kapott keverékhez 5 mg hidroxilamint adtunk, hogy az antitestet deacetiláljuk. A módosított antitestet poliakrilamid kiszózó oszlop segítségével fracionáltuk. A fehérje frakciókat 1 mg maleimiddel aktivált peroxidázzal kevertük össze és egy órán át reagáltattuk szobahőmérsékleten, hogy megkapjuk az enzimmel jelölt antitestet.

- (2) A nyúl anti-OBM poliklonális antitest azon képessége, hogy a találmány szerinti cDNS által expresszált fehérje (OBM) vagy a találmány szerinti természetes típusú fehérje OCIF-hoz történő specifikus kötődését gátolja

A 15.(6) és 15.(7) példákban leírt eljárás szerint kapott tisztított OBM-et (tioeredoxin-OBM fuzionált fehérje) illetve a 2.(4) példa szerinti természetes típusú tisztított OCIF-kötő fehérjét 0,1 M nátrium-karbonát pufferben 2 µg/ml koncentrációra feloldottuk. Mindegyik oldatból lyukanként 100 µl-nyi mennyiséget adtunk egy 96-lyukas immunlemezre (a Nunc Co. gyártmánya). A lemezt egy éjszakán át 4°C-on állni hagytuk. Minden lyukhoz 200 µl 50%-os Block Ace-t adtunk és a lemezt szobahőmérsékleten egy órán át állni hagytuk. Miután mindegyik lyukat háromszor mostuk 0,1% Polysorbate 20 tartalmú PBS-sel (P20-PBS), 100 µl, 25%-os Block Ace-ban feloldott nyúl anti-OBM antitest oldatot adtunk mindegyik lyukhoz, amely oldatot P20-PBS-sel készítettünk 200 µg/ml koncentrációra vagy mindegyik lyukhoz 100 µl 25%-os Block Ace (antitestet nem tartalmazó) oldatot adtunk, majd ezt követően egy órán keresztül 37°C-on inkubáltuk. Mindegyik lyukat P20-PBS-sel háromszor mostuk és lyukanként 100µl kötési teszthez való oldattal (0,2% borjú szérumalbumint, 20mM Hepes és 0,1 mg/ml heparint tartalmazó P20-PBS) töltöttük fel, amelyhez a 8.(3) példában leírt, 20 ng/ml ¹²⁵I-tel jelölt OCIF-ot adtunk. Másik lehetőségként minden lyukba lyukanként 100 µl másik kötési teszthez való oldatot adtunk, amely 8 µg/ml jelöletlen OCIF-ot tartalmazott a 20 ng/ml ¹²⁵I-tel jelölt OCIF-on felül. Miután ezen immunlemezeket 37°C-on egy órán át inkubáltuk, a lyukakat

hatszor mostuk P20-PBS-sel. Minden lyukban megmértük a ^{125}I mennyiségét gamma számlálóval. Az eredmények a 17. ábrán mutatjuk meg. Mint az az ábrán látható, sem a találmány szerinti cDNS felhasználásával expresszált tisztított OBM, sem a természetes típusú OCIF-hoz specifikusan kötődő fehérje - a találmány szerinti specifikusan kötő fehérje, egyáltalán nem kapcsolódik a ^{125}I -tel jelölt OCIF-hoz abban az esetben, amikor nyúl anti-OBM poliklonális antitesttel kezeljük őket, ellenben mindkét fehérje hozzákötődött a ^{125}I -tel jelölt OCIF-hoz, ha ezeket nem kezeltük az antitesttel. Mindkét fehérje ^{125}I -tel jelölt OCIF-hoz való kötődéséről megállapítottuk, hogy egyértelműen specifikusak, mivel ezek a kötődések szignifikánsan gátoltak, ha jelöletlen OCIF-ot 400-szoros koncentrációban (8 $\mu\text{g/ml}$) adtunk hozzájuk. A fent leírt eredmények alapján a nyúl anti-OBM poliklonális antitest mind a találmány szerinti cDNS felhasználásával expresszált fehérjét, az OBM-et, mind a találmány szerinti természetes típusú OCIF-kötő fehérjét felismeri és ezen fehérjék OCIF-hoz történő specifikus kötődését gátolja.

19. Példa

A humán OBM cDNS klónozása

(1) Egér OBM primer készítése

Az egér OBM primereket a fent leírt példákban (OBM#3 és OBM#8) ismertetett eljárás alapján állítottuk elő és humán OBM cDNS szűréséhez használtuk. A szekvenciák a SEQ ID NO 9 és SEQ ID NO 6 szekvenciáiban láthatók.

(2) A humán OBM cDNS fragmens PCR segítségével történő izolálása

A humán OBM cDNS fragmenseket PCR felhasználásával kaptuk az (1)-ben készített egér OBM cDNS primerek és a Human Lymph Node Marathon kész cDNS (Clontech Co.), mint templát segítségével. A PCR-t a következő körülmények mellett végeztük el:

10x EX Taq puffer (Takara Shuzo Co.)	2 µl
2,5 mM dNTP	1,6 µl
cDNS oldat	1 µl
EX Taq puffer (Takara Shuzo Co.)	0,2 µl
Desztillált víz	14,8 µl
40 µM primer OBM#3	0,2 µl
40 µM primer OBM#8	0,2 µl

Ezen oldatokat egy mikrocentrifuga csőben összekevertük és 95°C-on 2 percig előinkubáltuk, majd ezt egy háromlépcsős reakció 40 ciklusa követte, amely egy 95°C-on 30 percen át, 57°C-on 30 percen át és 72°C-on 2,5 percen át tartó reakciókból állt. A reakció után az oldatot 5 percen át 72°C-on inkubáltuk és az oldat egy részét agaróz géllal végzett elektroforézisnek vetettük alá. A fent leírt egér OBM cDNS primerek által amplifikált DNS fragmenst (körülbelül 690 bp) figyeltünk meg.

(3) A PCR segítségével amplifikált humán OBM cDNS fragmens tisztítása és a nukleotid szekvencia meghatározása

A 19.(2) példában kapott humán OBM cDNS fragmenst agaróz géllal végzett elektroforézissel elválasztottuk és

tovább tisztítottuk Qiaex gél extrakciós kit (Qiagen Co.) segítségével. Ismét elvégeztük a PCR-t a humán OBM cDNS fragmens, mint templát és a fent leírt egér OBM cDNS primerek felhasználásával, hogy nagy mennyiségű humán OBM cDNS fragmenst állítsunk elő. A DNS fragmenst Qiaex gél extrakciós kit segítségével tisztítottuk ugyanolyan módon, mint feljebb. A tisztított humán OBM cDNS fragmens nukleotid sorrendjét Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing FS kit (Perkin Elmer Co.) segítségével, primerként OBM#3-at és OBM#8-at (SEQ ID NO 9, illetve SEQ ID NO 6) felhasználva határoztuk meg. Az egér OBM cDNS szekvenciájának megfelelő szakaszával összehasonlítva, a humán OBM cDNS fragmens nukleotid szekvenciája 80,7% homológiát mutatott az egér OBM cDNS-ével.

(4) Teljes hosszúságú humán OBM cDNS szűrése a humán OBM cDNS fragmens (körülbelül 690 bp), mint próba felhasználásával végzett hibridizáció segítségével

Teljes hosszúságú humán OBM cDNS-t szűrtünk a 19.(3) példában tisztított humán OBM cDNS fragmens (körülbelül 690 bp) felhasználásával és [α^{32} P] dCTP-vel jelöltük Megaprime DNA Labeling kit (Amersham Co.) segítségével. „Humán nyirokcsomó 5'-Stretch Plus cDNA” könyvtárat (Clontech Co., USA) szűrtünk a DNS próba felhasználásával. A gyártó utasításai szerint, *Escherichia coli* C600 Hfl törzset fertőztünk a rekombináns fággal 15 percen át 37°C-on. A fertőzött *Escherichia coli*-t LB agarba (1% tryptone, 0,5% élesztőkivonat, 1% NaCl, 0,7% agar) adtuk, amit 45°C-on melegítettünk. Az LB agart olyan LB agar lemezre öntöttük, ami 1,5% agart tartalmazott. Egy éjszakán át 37°C-on végzett inkubáció után HyBond-NTM-t (Amersham Co.) helyeztünk a lemezre, amelyen plakkok nőttek és körülbelül

3 percre elraktuk. A szokásos eljárás szerint a filtert alkálikus oldattal kezeltük, semlegesítettük és 2xSSC oldatba mártottuk. A DNS-t ezután a filterre immobilizáltuk UV Crosslinker (Stratagene Co.) segítségével. Az így kapott filtert Rapid-hyb pufferbe (Amersham Co.) merítettük. 15 perces 65°C-on történő előkezelés után a filtert Rapid-hyb pufferbe helyeztük, amely a fent leírt hődenaturált humán OBM cDNS fragmenst (körülbelül 690 bp, 5×10^5 cpm/ml) tartalmazta. Egy éjszakán át 65°C-on végzett hibridizációt követően a filtert a 2xSSC, 1xSSC és 0,1xSSC oldatokkal mostuk, melyek mindegyike tartalmazott 0,1% SDS-t, a mosásokat ebben a sorrendben végeztük, mindegyiket 15 percen át 65°C-on. Az így kapott számos pozitív klónt tovább tisztítottuk a szűrés kétszeri ismétlésével. Egy inzerttel rendelkező klónt (körülbelül 2,2kb) kiválasztottunk a tisztított klónok közül és használtunk fel a következő kísérletekben. Ezt a tisztított fagot λ hOBM-nek neveztük el. A tisztított λ hOBM-ből körülbelül 10 μ g DNS-t kaptunk Qiagen Lambda kit (Qiagen Co.) felhasználásával, a gyártó utasításai szerint eljárva. A DNS-t SaII restrikciós enzimmal emésztettük és agaróz géllal végzett elektroforézissel megvizsgáltuk, hogy elválasszuk a hOBM inzert cDNS-t (körülbelül 2,2 kb). Ezt a Qiaex gél extrakciós kit (Qiagen Co.) segítségével tisztított DNS fragmenst SaII restrikciós enzimmal emésztettük és a pUC19 (MBI Co.) plazmidba vittük be „DNA ligation kit ver. 2” (Takara Shuzo) felhasználásával, amit előzőleg SaII restrikciós enzimmal emésztettünk és defoszforiláltunk. Az így kapott DNS fragmenst tartalmazó pUC19-cel transzformáltunk Escherichia coli DH5 α sejteket (Gibco BRL Co.). Az így kapott transzformánst pUC19hOBM-nek neveztük el. A transzformánst növesztettük és a

pUC19hOBM-et, amelybe bevittük a humán OBM cDNS-t (körülbelül 2,2 kb), szokásos eljárással tisztítottuk.

(5) A humán OBM teljes aminosav sorrendjét kódoló cDNS nukleotid szekvenciájának meghatározása

A 19.(4) példában kapott humán OBM cDNS nukleotid szekvenciáját Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing FS kit (Perkin Elmer Co.) segítségével határoztuk meg. Konkrétan, a bevitt fragmens nukleotid szekvenciáját templátként pUC19hOBM-et felhasználva határoztuk meg. Primereként a pUC19hOBM-be bevitt DNS fragmens nukleotid sorrendjének meghatározásához M13 Primer M3-at és M13 Primer RV-t (a Takara Shuzo gyártmányai) és a humán OBM cDNS fragmens (körülbelül 690 bp) nukleotid szekvenciája alapján tervezett szintetikus primert, a humán OBM#8-at használtuk.

A felhasznált primerek nukleotid sorrendjét, az M13 Primer M3-at és az M13 Primer RV-t a SEQ ID NO 4 és SEQ ID NO 5 sorszámú szekvenciájában látható. A humán OBM cDNS nukleotid sorrendjéből származtatott humán OBM aminosav sorrend a SEQ ID NO 11-ben látható. A humán OBM cDNS nukleotid sorrendje a SEQ ID NO 12 sorszámú szekvenciában látható.

Az Escherichia coli-t, amelyet a kapott humán OBM cDNS-t tartalmazó plazmiddal, a pUC19hOBM-mel transzformáltunk, letétbe helyeztük a „National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology”-nál 1997. augusztus 13-án a FERM BP-6058 letéti számon.

20. Példa

Az OCIF radiojódozása ^{125}I -tel és a ^{125}I -tel jelölt OCIF ELISA-val végzett kvantitatív analízise

Az OCIF-ot jodogén eljárással ^{125}I -tel jelöltük. 20 μl 2,5 mg/ml jodogén-kloroform oldatot adtunk egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe és a kloroformot 40°C-on elpárologtattuk, így készítve egy jodogénnel bevont csövet. A csövet háromszor mostuk 400 μl 0,5 M nátrium-foszfát puffer oldattal (Na-Pi, pH 7,0), majd ezután hozzáadtunk 5 μl 0,5 M Na-Pi-t (pH 7,0). Ehhez a csőhöz 1,3 μl (18,5 MBq) Na- ^{125}I oldatot (Amersham Co. NEZ-033H) adtunk, majd azonnal 10 μl 1 mg/ml OCIF oldatot (monomer típus vagy dimer típus). Az elegyet vortex keverővel összekevertük és szobahőmérsékleten 30 másodpercig állni hagytuk. Ezt az oldatot egy olyan csőbe vittük át, amelyhez előzőleg 80 μl , 10 mg/ml kálium-jodidot és 5 μl , 5% marha szérumalbumint tartalmazó foszfáttal puffereelt konyhasóoldatot (BSA-PBS) tartalmazó 0,5 M Na-Pi-t (pH 7,0) adtunk. Az oldatot összekevertük és forgóoszlopra (1 ml, G-25 Sephadex fine, a Pharmacia Co. gyártmánya) vittük, amit előzetesen BSA-PBS-sel hoztunk egyensúlyba és 5 percen át 2.000rpm sebességgel centrifugáltuk. Az oszlopról eluált frakciókhoz 400 μl BSA-PBS-t adtunk. Elkeverés után az oldat 2 μl -ét használtuk a radioaktivitás gamma számlálóval történő méréséhez. Az így kapott ^{125}I -tel jelölt OCIF oldatának radiokémiai tisztaságát úgy mértük meg, hogy a 10% triklór-ecetsavval (TCA) kicsapatott frakciók radioaktivitását számláltuk.

A ^{125}I -tel jelölt OCIF biológiai aktivitását a WO 96/26217-ben ismertetett eljárás szerint mértük meg. A ^{125}I -tel jelölt OCIF koncentrációját a következők szerint végzett ELISA eljárással mértük meg. Konkrétan, a WO

96/26217-ben leírt nyúl anti-OCIF poliklonális antitestet 50 mM NaHCO₃-ban (pH 9,6) 2 µg/ml koncentrációban feloldottuk és egy 96 lyukas immunlemez (MaxiSorp™, a Nunc Co. gyártmánya) minden lyukába 100 µl/lyuk mennyiségben adtuk. Miután ezen lyukakat 4°C-on egy éjszakán át állni hagytuk, az oldatot eltávolítottuk. Ezt követően a lyukakat Block Ace™ (Snow Brand Milk Products C., Ltd.) vizes oldata és foszfáttal puffertelt konyhasóoldat (25:75) (B-PBS) keverékével töltöttük fel 200 µl/lyuk mennyiségben. Ezután a lemezt két órán keresztül szobahőmérsékleten állni hagytuk. Miután az oldatot eltávolítottuk, a lyukakat háromszor mostuk 0,01% Polysolvate 80-at tartalmazó foszfáttal puffertelt konyhasó oldattal (P-PBS). Ezt követően ¹²⁵I-tel jelölt OCIF mintát tartalmazó B-PBS-t vagy a standard OCIF-ot adtuk hozzá 100 µl/lyuk mennyiségben. Ezután a lemezt két órán át szobahőmérsékleten állni hagytuk. Az oldat eltávolítása után minden lyukat 200 µl P-PBS-sel hatszor mostunk. 100 µl/lyuk mennyiségben adtunk hozzá egy olyan oldatot, amely úgy készült, hogy peroxidázzal jelölt nyúl anti-OCIF poliklonális antitestet B-PBS-sel hígítottunk. A lemezt két órán keresztül szobahőmérsékleten állni hagytuk. Az oldat eltávolítása után a lyukakat 200 µl P-PBS-sel hatszor mostuk. Ezt követően 100 µl/lyuk mennyiségben TMB oldatot (TMB oldható reagens, nagy érzékenységű, Scytek Co.) adtunk hozzá. Miután 2-3 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, 100 µl stop-oldatot (Stopping Reagent, Scytek Co.) adtunk minden lyukhoz. Egy mikrolemez olvasó segítségével 450 nm-en megmértük minden lyuk abszorbanáciáját. A ¹²⁵I-tel jelölt OCIF koncentrációját a standard OCIF felhasználásával készített kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg.

21. Példa

A találmány szerinti cDNS által kódolt fehérje expressziója

(1) hOBM expressziós vektor készítése állati sejtekhez

A pUCHOBM-et *Sa*II restrikciós enzimmal emésztettük és 1%-os agaróz géllal végzett elektroforézis segítségével tisztítottunk egy DNS fragmenst (körülbelül 2,2kb). A DNS fragmens végeit DNA blunting kit (Takara Shuzo Co.) segítségével tompítottuk le (tompított hOBMcDNS fragmens). A pcDL-SR α 296 expressziós plazmidot (Molecular and Cellular Biology, 8. kötet, 466-472. oldalak (1988)) *Eco*RI restrikciós enzimmal emésztettük, a tompító kit segítségével tompítottuk és a tompított hOBM cDNS fragmenssel ligáltuk a „DNA ligation kit ver. 2.” felhasználásával. *Escherichia coli* DH α -t transzformáltunk a ligációs reakcióval. Az ennek eredményeképpen kapott ampicillin rezisztens transzformánsokban lévő plazmidot restrikciós enzimmal végzett emésztésnek vetettük alá, hogy analizálhassuk a DNS restrikciós térképet és meghatározzuk a DNS szekvenciát. Ennek eredményeképpen kiválasztottunk egy olyan plazmidot tartalmazó törzset, amelybe a hOBM cDNS-t az SR α promoterének megfelelő transzkripció irányba vittük be. Ezt a mikroorganizmus törzset DH5 α /phOBM-nek neveztük el.

(2) A humán OBM COS-7 sejtekben történő expressziója

Az *Escherichia coli* DH5 α /phOBM-et növesztettük és a phOBM plazmidot Qiafilter Plasmid Midi kit (Qiagen Co.) segítségével tisztítottuk. A phOBM-et Lipofectamine

segítségével COS-7 sejtekbe transzfektáltuk egy 6-lyukas lemez lyukaiban és két napon át 10% magzati borjúsérumot tartalmazó DMEM-ben növesztettük őket. A tenyésztápközeget cisztein és metionin mentes tenyésztápközeggel (Dainippon Seiyaku Co., Ltd.) cseréltük ki, amelyhez 5% dializált magzati borjúsérumot adtunk (88 µl/lyuk). A sejteket 15 percen keresztül inkubáltuk, majd 14 µl Express Protein Labeling Mix-et (Nen Co., 10mCi/ml) adtunk hozzá. Négy óra inkubáció után 200 µl 10% magzati borjúsérumot tartalmazó DMEM-et adtunk minden lyukhoz. Egy óra növesztés után a sejteket kétszer mostuk PBS-sel. Ezt követően 0,5 ml, 1% TritonX-100-at, 1% marha hemoglobint, 10 µg/ml leupeptint, 0,2 TIU/ml aprotinint és 1 mM PMSF-et tartalmazó TSA puffert (0,14 M NaCl-ot és 0,025% NaN₃-ot tartalmazó 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)) adtunk minden lyukhoz és az elegyeket egy órán keresztül jégen állni hagytuk. A sejteket pipettázással kevertük és 4°C-on 10 percen keresztül 3000 x g-vel centrifugáltuk, hogy megkapjuk a felülúszót. 200 µl hígító puffert (0,1% TritonX-100-at, 0,1% marha hemoglobint, 10 µg/ml leupeptint, 0,2 TIU/ml aprotinint és 1 mM PMSF-et tartalmazó TSA puffert) adtunk mindegyik lyuk felülúszójának 100 µl-éhez. Az így kapott elegyeket egy órán keresztül 4°C-on protein A Sepharose-zal (50 µl) rázattuk és 1 percig, 4°C-on 1,500 x g sebességgel centrifugáltuk, hogy összegyűjtsük a felülúszókat és ezáltal eltávolítsuk azokat a fehérjéket, amelyek nem-specifikusan adszorbeálódtak a Protein A Sepharose-hoz. OCIF-ot (1 µg) adtunk ezen felülúszókhoz és a keveréket 4°C-on egy órán át rázattuk, hogy megtörténjen a humán OBM és OCIF kapcsolódása. Ezután nyúl anti-OCIF poliklonális antitestet (50 µg) adtunk hozzá, majd az elegyet egy órán

át 4°C-on rázattuk. Ezután Protein A Sepharose-t (10 µl) adtunk az így kapott oldathoz és ezt követően a keveréket egy további órán át 4°C-on rázattuk. Az így kapott elegyeket egy 1 percig 4°C-on 1,500 x g sebességgel centrifugáltuk, hogy összegyűjtsük a csapadékokat. A csapadékokat kétszer mostuk hígító pufferrel, kétszer marha hemoglobin mentes hígító pufferrel, egyszer TSA pufferrel és egyszer 50 mM Tris-HCl oldattal (pH 6,5). Miután 10% β-merkaptoetanol tartalmazó SDS puffert (0,125 M Tris-HCl, 4% nátrium-dodecilszulfát, 20% glicerin, 0,002% brómfenol kék, pH 6,8) adtunk hozzá, az elegyet 5 percen keresztül 100°C-on melegítettük és SDS-PAGE-ra vittük (12,5% poliakrilamid gél, Daiichi Pure Chemical Co.). A gél szokásos eljárás szerint fixáltuk és szárítottuk. Miután az izotóp jeleket Amplify™ (Amersham Co.) segítségével erősítettük, a megszáritott gél Bio Max MR film (Kodak Co.) felhasználásával -80°C-on autoradiográfiás vizsgálatnak vetettük alá. Az eredmények a 18. ábrán láthatók, ami azt mutatja, hogy a találmány szerinti cDNS által kódolt fehérje körülbelül 40.000-es molekulatömeggel rendelkezik.

22. Példa

A találmány szerinti cDNS által kódolt fehérje és az OCIE kapcsolódása

A phOBM-et, amit ugyanazon a módon tisztítottunk, mint a 21.(2) példában, egy 24 lyukas lemez minden egyes lyukában COS-7 sejtekbe transzfektáltuk Lipofectamine segítségével. Kettőtől három napig terjedő időtartamú növesztés után a sejteket szérummentes DMEM-mel mostuk. A

kötődési assay-hez való 200 μ l, 20 ng/ml 125 I-tel jelölt OCIF-ot tartalmazó tenyésztápközeget (olyan szérumentes DMEM tenyésztápközeg, amelyhez 0,2% marha szérumalbumint, 20 mM Hepes puffer oldatot, 0,1 mg/ml heparint és 0,2% NaN_3 -ot adtunk) adtunk a lyukakba. A többi lyukba a kötődési assay-hez való 200 μ l olyan tenyésztápközeget adtunk, amelyhez a 20 ng/ml 125 I-tel jelölt OCIF-on felül 8 μ g/ml jelöletlen OCIF-ot is adtunk. Egy órás, 37°C-on CO_2 -inkubátorban (5% CO_2) történő inkubációt követően a sejteket kétszer mostuk 500 μ l 0,1 mg/ml heparint tartalmazó foszfáttal pufferelt konyhasóoldattal. Majd 500 μ l 0,1N NaOH-ot adtunk minden lyukba és a lemezt a sejtek feloldása céljából 10 percen át szobahőmérsékleten állni hagytuk. A lyukakban gamma számlálóval megmértük a 125 I radioaktivitását. Eredményként, mint ahogy az a 19. ábrán látható, megállapítottuk, hogy a 125 I-tel jelölt OCIF csak azokhoz a sejtekhez kötődik, amelyeket phOBM-mel transzfektáltunk. Ezenfelül megállapítottuk, hogy a kötődés szignifikánsan gátlódott a jelöletlen OCIF 400-szoros feleslegben (800 μ g/ml) történő hozzáadása által. Az itt leírt eredmények alapján megállapítottuk, hogy a fehérje, a phOBM-ben lévő cDNS által kódolt humán OBM specifikusan kötődik a COS-7 sejtek felszínén lévő OCIF-hoz.

23. Példa

A 125 I-tel jelölt OCIF és a találmány szerinti cDNS által kódolt fehérje keresztkötése

125 I-tel jelölt monomer típusú OCIF és a találmány szerinti cDNS által kódolt fehérje keresztkötését azért

végeztük el, hogy a találmány szerinti cDNS által kódolt fehérje jellemzőit még részletesebben megvizsgáljuk. Miután elkészítettük a phOBM expressziós vektort és a 21.(1) és 21.(2) példákban használt eljárás szerint COS-7 sejtekbe transzfektáltuk, a fent ismertetett kötődési assay-hez való, ^{125}I -tel jelzett OCIF-ot tartalmazó (25 ng/ml) 200 μl tenyésztápközeget adtunk hozzá. A többi lyukba olyan kötődési teszthez való tenyésztápközeget adtunk, amelyhez 400-szoros koncentrációban adtunk jelöletlen OCIF-ot a hozzáadott ^{125}I -tel jelölt OCIF-on felül. Egy órás 37°C -on CO_2 -inkubátorban (5% CO_2) történő növesztés után a sejteket kétszer mostuk 500 μl 0,1 mg/ml heparint tartalmazó foszfáttal pufferelt konyhasóoldattal. 100 $\mu\text{g/ml}$ keresztkötő ágenst, DSS-t (diszukcinimidil-szuberát, a Pierce Co. gyártmánya) 500 μl foszfáttal pufferelt konyhasóoldatban feloldottunk és a sejtekhez adtuk, majd ezt egy 10 perces 0°C -on végzett inkubáció követte. Ezen lyukakban lévő sejteket kétszer mostuk 1 ml jéghideg foszfáttal pufferelt konyhasóoldattal. Miután 1% Triton X-100-at (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.), 2 mM PMSF-et (fenilmetilszulfonil-fluorid, Sigma Co.), 10 μM Pepstatint (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.), 10 μM Leupeptint (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.), 10 μM antipain-t (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.) és 2 mM EDTA-t (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.) tartalmazó 100 μl 20 mM Hepes puffer oldatot adtunk hozzájuk, a lyukakat a sejtek feloldásához 30 percen át szobahőmérsékleten állni hagytuk. Ezen mintákat (15 μl -nyi mennyiségek) a szokásos eljárás szerint redukáló körülmények között SDS-sel kezeltük és 4-20% poliakrilamid gradiens gél (Daichi Pure Chemical Co., Ltd.) felhasználásával SDS-elektroforézisnek

vetettük alá. Az elektroforézis után a géleket megszárítottuk és BioMax MS film (Kodak Co.) és BioMax MS érzékenyítő ernyő (Kodak Co.) felhasználásával 24 órán keresztül -80°C -on autoradiográfiának vetettük alá. Az autoradiográfiának alávetett filmet szokásos eljárás szerint hívtuk elő. Eredményként, mint azt a 20. ábra mutatja, egy 90.000-110.000 molekulasúlyú sávot figyeltünk meg a ^{125}I -tel jelölt monomer típusú OCIF és a találmány szerinti cDNS által kódolt fehérje keresztkötése jóvoltából.

24. Példa

A szekretált formájú OBM expressziója

(1) A szekretált formájú humán OBM expressziós plazmid elkészítése

Primereként humán OBM SF-et (SEQ ID NO 13) és egér OBM#8-at (SEQ ID NO 6) és templátként pUC19hOBM-et felhasználva végeztünk PCR reakciót. Az agaróz gélelektroforézis segítségével végzett tisztítás után a terméket SphI és HindIII restriktációs enzimekkel emésztettük és tovább tisztítottuk agaróz géllel végzett elektroforézis segítségével, hogy egy tisztított fragmenst (0,27 kb) kapjunk. DraI restriktációs enzimmal részlegesen emésztettünk humán OBM cDNS-t és az egyik oldalon DraI-gyel emésztett DNS fragmenseket agaróz géllel végzett elektroforézissel tisztítottuk. A tisztított fragmenst tovább emésztettük HindIII restriktációs enzimmal. A 0,53 kb DraI/HindIII fragmenst agaróz géllel végzett elektroforézissel tisztítottuk. A tisztított fragmenst a fent leírt PCR-ből származó 0,27 kb SphI/HindIII fragmenssel ligáltuk a pSec TagA (Invitrogen Co.)

HindIII/EcoRI fragmenssel (5,2 kb) a „ligation kit ver. 2” segítségével. A reakciótermék felhasználásával transzformáltunk *Escherichia coli* DH5 α -t. A plazmidokat az így kapott ampicillin rezisztens transzformánsokból tisztítottuk alkáli SDS eljárással és restrikciós enzimekkel emésztettük, hogy kiválasszuk azt a plazmidot, amely 0,27 kb és 0,53 kb pSec TagA-ba inzertként bevitt fragmenseket tartalmaz. Ezen plazmidról Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing FS kit (Perkin Elmer Co.) segítségével megállapítottuk, hogy a szekretált humán OBM-et kódoló szekvenciával rendelkezik. Ezt a plazmidot NheI és XhoI restrikciós enzimekkel emésztettük, hogy a szekretált humán OBM cDNS-nek megfelelő fragmenst (0,8 kb) állítsunk elő agaróz géllal végzett elektroforézis segítségével. Ezt a fragmenst egy pCEP4 expressziós vektor (Invitrogen Co.) NheI és XhoI fragmensébe (10,4 kb) vittük be egy ligálási kit felhasználásával és ennek reakciótermékét felhasználva transzformáltunk *Escherichia coli* DH5 α sejteket. A plazmidokat az így kapott ampicillin rezisztens transzformánsokból tisztítottuk alkáli SDS eljárással és restrikciós enzimekkel emésztettük, hogy kiválasszuk azt az *Escherichia coli*-t, amely tartalmazza a szekretált formájú humán OBM expressziós plazmidját (pCEPshOBM). A pCEPshOBM-et tartalmazó *Escherichia coli*-t növesztettük és a pCEPshOBM-et „Qiafilter plasmid midi kit” (Qiagen Co.) segítségével tisztítottuk.

(2) A szekretált formájú OBM expressziója

293-EBNA sejteket szuszpendáltunk 10% FCS-t tartalmazó IMDM-ben (IMDM-10% FCS) és egy kollagénnel bevont 24 lyukas lemezbe (a Sumitomo Bakelite Co., Ltd. gyártmánya) ültettük 2×10^5 /2ml/lyuk sejtsűrűséggel és egy

éjszakán át növesztettük őket. A sejteket 1 μg pCEPshOBM-mel vagy pCEP4-gyel transzfektáltuk 4 μl Lipofectamine (Gibco Co.) felhasználásával. Miután 0,5 ml szérumentes IMDM-ben vagy IMDM-10% FCS-ben két napon keresztül növesztettük őket, összegyűjtöttük a tenyészet felülúszóját. A szekretált humán OBM tenyészet-felülúszóban végzett expresszióját a következők szerint vittük véghez. A tenyészet felülúszójához annyi nátrium-hidrogénkarbonátot adtunk, hogy végső koncentrációja 0,1 M legyen és az elegyeket egy 96 lyukas lemezbe adagoltuk. A lemezt egy éjszakán át 4°C-on állni hagytuk, így immobilizálva a humán OBM-et a tenyészet-felülúszókban a 96-lyukas lemezen. A lemezt PBS-sel (B-PBS) négyszeresére hígított Block Ace™ (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) oldattal blokkoltuk és két órán át szobahőmérsékleten állni hagytuk. Miután minden lyukhoz B-PBS-sel hígított 3-100 ng/ml OCIF-ot adtunk, a lemezt két órán át 37°C-on állni hagytuk, majd 0,05% Polysolvate 20-at (P-PBS) tartalmazó PBS-sel mostuk. Ezek után a WO96/26217-ben ismertetett, B-PBS-sel hígított 100 μl peroxidázzal jelölt nyúl anti-OCIF poliklonális antitestet adtunk minden lyukhoz. Miután két órán át 37°C-on állni hagytuk, a lyukakat hatszor mostuk P-PBS-sel. Ezt követően lyukanként 100 μl mennyiségű TMB oldatot (TMB oldható reagens, nagy érzékenységű, Scytek Co.) adtunk hozzá és a keveréket szobahőmérsékleten körülbelül 10 percen át állni hagytuk. A reakciót 100 μl stop-oldat (Stopping reagent, Scytek Co.) minden lyukhoz történő hozzáadásával állítottuk le. Egy mikrolemez olvasó segítségével minden lyuk abszorbanciáját 450 nm-en megmértük. Az eredmények a 21. ábrán láthatók, ami azt mutatja, hogy a 450 nm-en mért abszorbancia a hozzáadott OCIF koncentrációjának

függvényében növekedett azon a lemezen, amely kondicionált tápközegében a pCEPshOBM-mel transzfektált sejtek voltak immobilizálva. Másrészt nem lehetett abszorbancia-növekedést látni azon lyukak esetében, amelyek kondicionált tápközegében a pCEP4 vektorral transzfektált sejtek voltak immobilizálva. A 22. ábra egy olyan kísérlet eredményeit mutatja, ahol az immobilizációhoz használt kondicionált tápközeg arányát 5-90% tartományban változtattuk az OCIF konstans koncentrációjának (50 ng/ml) jelenlétében. A 450 nm-en mért abszorbancia a kondicionált tápközeg aránya növekedésének megfelelően növekedett azon a lemezen, amely kondicionált tápközegében a pCEPshOBM-mel transzfektált sejtek voltak immobilizálva, míg az abszorbancia ilyen növekedése nem volt látható azon a lemezen, amely kondicionált tápközegében a pCEP4 vektorral transzfektált sejtek voltak immobilizálva. Ezen eredmények alapján megállapítottuk, hogy a pCEPshOBM-mel transzfektált sejtek kondicionált tápközegében termelődik a szekretált formájú humán OBM.

25. Példa

A tioredoxin-humán OBM fúziós fehérje (Trx-hOBM) expressziója

(1) A tioredoxin-humán OBM fúziós fehérje (Trx-hOBM) expressziós vektor elkészítése

10 µl 10X ExTaq puffert (Takara Shuzo Co.), 8 µl 10 mM dNTP-t (Takara Shuzo Co.), 77,5 µl sterilizált desztillált vizet, 2 µl pUC19hOBM (10 ng/µl) vizes oldatot, 1 µl primert, egér OBM#3-at (100 pmol/µl, SEQ ID NO 9), 1 µl primer hOBM SalR2-öt (100 pmol/µl, SEQ ID NO

14) és 0,5 μ l ExTaq-t (5u/ μ l) (Takara Shuzo Co.) kevertünk össze és egy mikrocentrifuga csőben reagáltattunk (PCR reakció). Miután 95°C-on 5 percig, 50°C-on egy másodpercig, 55°C-on egy percig, 74°C-on egy másodpercig és 72°C-on 5 percig reagáltattuk, egy olyan ciklikus reakciót ismételtünk 25-ször, ami 96°C-on egy percig, 50°C-on egy másodpercig, 55°C-on egy percig, 74°C-on egy másodpercig és 72°C-on 3 percig zajló reakciókból áll. A teljes reakciókeverékből DNS fragmenst (750 bp) tisztítottunk. A tisztított DNS fragmens teljes mennyiségét SaII (Takara Shuzo Co.) és BspHI (New England Biolabs Co.) restriktációs enzimekkel emésztettük és egy 1% agaróz géllal végzett elektroforézisnek vetettük alá, hogy tisztított DNS fragmenst (1. fragmens, körülbelül 320 bp) kapjunk. A fragmenst 20 μ l sterilizált desztillált vízben feloldottunk. Ugyanezen a módon, 4 μ g pUC19hOBM BamHI és BspHI restriktációs enzimekkel (Takara Shuzo Co.) való emésztésével kapott DNS fragmenst (2. fragmens, körülbelül 450 bp) és 2 μ g pTrxFus (Invitrogen Co.) BamHI és SaII restriktációs enzimekkel (Takara Shuzo Co.) való emésztésével kapott DNS fragmenst (3. fragmens, körülbelül 3,6 kb) tisztítottunk és oldottunk fel 20 μ l sterilizált desztillált vízben. A DNS fragmensek tisztításához QiaexII gélextrakciós kitet használtunk. Az 1-3. fragmenseket „DNA ligation kit ver. 2” (Takara Shuzo Co.) felhasználásával 16°C-on 2,5 órán át tartó inkubáció segítségével ligáltuk. A ligációs reakcióelegy felhasználásával transzformáltunk GI724 *Escherichia coli*t (Invitrogen Co.) a ThioFusion Expression System (Invitrogen Co.) használati útmutatójában leírt eljárás szerint. Egy olyan plazmival rendelkező mikroorganizmus törzset, amelyben az hOBM cDNS fragmens

keretben fuzionált a tioredoxin génhez, választottunk ki a kapott ampicillin rezisztens transzformánsok közül a restriktációs enzimekkel végzett emésztés során kapott DNS restriktációs térképek vizsgálata és a DNS szekvencia meghatározása segítségével. Az így kapott mikroorganizmus törzset GI724/pTrxhOBM-nek neveztük el.

(2) Trx-hOBM expressziója Escherichia coliban

GI724/pTrxhOBM-et illetve pTrxFus-t tartalmazó GI724-et (GI724/pTrxFus) hat órán keresztül 30°C-on rázatva növesztettünk 2 ml RMG-Amp tápközegben (0,6% Na₂HPO₄, 0,3% KH₂PO₄, 0,05% NaCl, 0,1% NH₄Cl, 2% kazaminosav, 1% glicerin, 1 mM MgCl₂ és 100 µg/ml ampicillin, pH 7,4). Táptalajt (0,5ml) adtunk 50 ml indukciós tápközeghez (0,6% Na₂HPO₄, 0,3% KH₂PO₄, 0,05% NaCl, 0,1% NH₄Cl, 0,2% kazaminosav, 0,5% glükóz, 1 mM MgCl₂ és 100 µg/ml ampicillin, pH 7,4) és rázatással 30°C-on növesztettünk. Amikor az OD_{600nm} elérte a körülbelül 0,5-öt, 0,1 mg/ml végső koncentrációban L-triptofánt adtunk hozzá, majd ezt követően további 6 órán keresztül 30°C-on rázatással növesztettük. A tenyészet táptalaját 3000 x g sebességgel centrifugáltuk a sejtek összegyűjtése céljából, majd ezt 12,5 ml PBS-ben szuszpendáltuk. A sejtek roncsolásához a szuszpenziót ultrahang generátorral (Ultrasonics Co.) kezeltük. A roncsolt sejteket 7000 x g sebességgel 30 percen át centrifugáltuk, hogy az oldható fehérje frakciónak megfelelő felülúszó folyadékot megkapjuk. 10 µl ilyen oldható fehérje frakciót redukáló körülmények között SDS poliakrilamid (10%) elektroforézissel megvizsgáltunk. Eredményként, mint azt a 23. ábra mutatja, egy 40 kDa molekulatömegű sávot találtunk a GI724/pTrxhOBM oldható fehérje frakciójában, de ezt nem találtuk meg a

GI724/pTrxFus oldható fehérje frakciójában. Következésképpen megállapítottuk, hogy a tioredoxin és humán OBM fúziós fehérjéjét (Trx-hOBM) expressezáltattuk *Escherichia coliban*.

(3) A Trx-hOBM OCIF felé mutatott kötődési képessége

Az expresszált Trx-hOBM OCIF-hoz történő kötődését a következő kísérlet szerint igazoltuk. 10 mM nátrium-hidrogénkarbonát oldattal 5000-szeresére hígított anti-tioredoxin antitestet (Invirogen Co.) adtunk egy 96 lyukas immunlemezre (Nunc Co.) 100 µl/lyuk mennyiségben. Miután egy éjszakán át 4°C-on állni hagytuk, a lyukakban lévő folyadékot eltávolítottuk. 200 µl, PBS-sel (BA-PBS) kétszeresére hígított Block Ace[™] (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) oldatot adtunk minden lyukba. Miután egy órán át szobahőmérsékleten állni hagytuk, a lyukakat háromszor mostuk P-PBS-sel. A fent ismertetett GI724/pTrxhOBM-ból vagy GI724/pTrxFus-ból származó oldható fehérje frakciókat BA-PBS-sel hígítva különböző koncentrációkban minden lyukhoz 100 µl mennyiségben adtuk hozzá. Miután két órán át szobahőmérsékleten állni hagytuk, mindegyik lyukat háromszor mostuk P-PBS-sel és BA-PBS-sel hígított 100 µl OCIF-fal (100 ng/ml) töltöttük fel. Miután két órán át szobahőmérsékleten állni hagytuk, mindegyik lyukat háromszor mostuk P-PBS-sel és BA-PBS-sel 2.000-szeresére hígított 100 µl peroxidázzal jelölt anti-OCIF antitesttel (a WO 96/26217-ben ismertetett) töltöttük fel. Miután két órán át szobahőmérsékleten állni hagytuk, mindegyik lyukat hatszor mostuk P-PBS-sel és 100 µl TMB oldattal töltöttük fel. Miután körülbelül 10 percre szobahőmérsékleten állni hagytuk, mindegyik lyukat 100 µl stop-oldattal (Stopping Reagent) töltöttük fel. Egy mikrolemez olvasó segítségével

mindegyik lyuk abszorbanciáját megmértük 450 nm-en. Az eredmények a 24. ábrán láthatók. Nem volt abszorbanciabeli különbség a GI724/pTrxFus-ból származó hozzáadott oldható fehérje frakciót tartalmazó minta és ezen oldható fehérje frakció hozzáadása nélkül készített minta között. Másrészt az abszorbancia azon minták esetében az oldható fehérje frakció koncentrációjával arányosan megnőtt, amelyekhez a GI724/pTrxhOBM-ből származó oldható fehérje frakciót adtuk. A másik kísérlet eredményei, amelyben az oldható fehérje frakció hígítási mértékét állandó értéken (1%) tartottuk, ellenben BA-PBS-sel különböző koncentrációkra (0-100 ng/ml) hígított OCIF-ot adtunk hozzá, a 25. ábrán láthatók. Látható, hogy az OCIF bármely koncentrációjánál az abszorbancia alacsony maradt azon minták esetében, ahol a GI724/pTrxFus-ból származó oldható fehérje frakciót használtunk, míg az abszorbancia az OCIF koncentrációjával arányosan növekedett azon minták esetében, amelyekhez a GI724/pTrxhOBM-ből származó oldható fehérje frakciót adtuk. Ezen eredmények alapján megállapítottuk, hogy a GI724/pTrxhOBM-ből előállított Trx-hOBM OCIF-hoz kötődő képességgel rendelkezik.

(4) Trx-hOBM-et termelő Escherichia coli nagymértékű növesztése

A GI724/pTrxhOBM sejteket RMG-Amp agaron (0,6% Na_2HPO_4 , 0,3% KH_2PO_4 , 0,05% NaCl , 0,1% NH_4Cl , 2% kazamínosav, 1,5% agar, pH 7,4) szélesztettük platina oltókacccsal. A sejteket egy éjszakán át 30°C-on növesztettük. Az így növesztett sejteket 10 ml indukciós tápközegben szuszpendáltuk. A szuszpenzióból két darab 2 literes, 500ml indukciós tápközeget tartalmazó Erlenmeyer lombikba adtunk (mindegyikbe 5 ml-t) és 30°C-on rázatás közben növesztettük őket. Amikor az $\text{OD}_{600\text{nm}}$ elérte a

körülbelül 0,5-öt, 0,1 mg/ml végső koncentrációban L-triptofánt adtunk hozzá. A rázatva növesztést hat órán keresztül 30°C-on folytattuk. A tenyészet táptalaját 20 percen keresztül 3000 x g sebességgel centrifugáltuk, hogy összegyűjtsük a sejteket, amelyeket 160ml PBS-ben szuszpendáltunk. A szuszpenziót ultrahangos generátorban (Ultrasonics Co.) kezeltük a sejtek roncsolása céljából. A felülúszó folyadékot 30 percen át 7000 x g sebességgel centrifugáltuk, hogy megkapjuk az oldható fehérje frakciót.

(5) Az OCIF-immobilizált affinitás oszlop elkészítése

Összekevertünk 2 g TSKgel AF-Tolesyl Toyopal 650-et (Tosoh Corp.) és 35,0 mg, a WO96/26217-ben ismerttetett eljárás szerint előállított rekombináns OCIF-ot tartalmazó 40 ml 1,0 M kálium-foszfát puffert (pH 7,5). A keveréket egy éjszakán át 4°C-on finoman ráztattuk, hogy végbemenjen a kapcsolási reakció. A reakcióelegyet a felülúszó eltávolításához centrifugáltuk. Annak érdekében, hogy a feleslegben maradt aktív anyagokat inaktiváljuk, 40 ml 0,1 M Tris-HCl puffert (pH 7,5) adtunk a kicsapatott hordozóhoz és a keveréket egy órán keresztül finoman ráztattuk szobahőmérsékleten. Az oszlopban lévő hordozót 0,01% poliszorbát 80-at és 0,2 M NaCl-ot tartalmazó 0,1 M glicin-HCl pufferrel (pH 3,3) és 0,01% poliszorbát 80-at és 0,2 M NaCl-ot tartalmazó 0,1 M nátrium-citrát pufferrel (pH 2,0) mostuk. Az oszlopban lévő hordozót úgy hoztuk egyensúlyba, hogy kétszer feltöltöttük 0,01% poliszorbát 80-at tartalmazó 10 mM nátrium-foszfát pufferrel (pH 7,4).

(6) A Trx-hOEM tisztítása OCIF-immobilizált affinitás oszlop felhasználásával

Hacsak nem adtunk meg más hőmérsékletértéket, a Trx-hOBM tisztítását 4°C-on végeztük. A fent ismertetett OCIF-immobilizált affinitás hordozót (10 ml) és a 25.(4) példában előállított oldható fehérje frakciót (120 ml) összekevertük. Az elegyet egy éjszakán át finoman kevertettük 4°C-on négy darab 50 ml-es centrifugacsőben rotor segítségével. Egy Econo-column™-t (belső átmérője: 1,5 cm, hossza: 15 cm, a BioRad Co. gyártmánya) feltöltöttünk a keverékben lévő hordozóval. Az oszlopot 300 ml, 0,01% poliszorbát 80-at tartalmazó PBS-sel, 100 ml, 0,01% poliszorbát 80-at és 2 M NaCl-ot tartalmazó 10 mM nátrium-foszfát pufferrel (pH 7,0) és 100 ml, 0,01% poliszorbát 80-at és 0,2 M NaCl-ot tartalmazó 0,1 M glicin-HCl pufferrel (pH 3,3) töltöttük fel ebben a sorrendben. Ezt követően az oszlopon adszorbeálódott fehérjét 0,01% poliszorbát 80-at és 0,2 M NaCl-ot tartalmazó 0,1 M nátrium-citrát pufferrel (pH 2,0) eluáltuk. Az eluátumot 5 ml-es adagokban gyűjtöttük össze. Mindegyik így kapott frakciót azonnal semlegesítettük 10 térfogat% 2 M Tris puffer (pH 8,0) hozzáadásával. Az eluált frakciókban a Trx-hOBM jelenlétét vagy hiányát az előzőekben, a 25.(3) példában (OCIF felé mutatott kötődési képesség) ismertetett eljárás szerint határoztuk meg. A Trx-hOBM-et tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük és tovább tisztítottuk.

(7) A Trx-hOBM tisztítása géliszűrés segítségével

A 25.(6) példában kapott körülbelül 25 ml Trx-hOBM frakciókat centrifugálással hozzávetőlegesen 0,5ml-re koncentráltuk Centriplus 10 és Centricon 10 (Amicon Co.) felhasználásával. Ezt a mintát egy Superose 12 HR 10/30 oszlopra (1,0 x 30 cm, Pharmacia Co.) vittük, amit előzőleg 0,01% poliszorbát 80-at tartalmazó PBS-sel

hoztunk egyensúlyba. Az elválasztáshoz mozgó fázisként 0,01% poliszorbát 80-at tartalmazó PBS-t használtunk 0,25 ml/perc térfogatárammal. Az oszlopról lejöő eluátumot 0,25 ml-es adagokban gyűjtöttük össze. Az így összegyűjtött frakciókban lévő Trx-hOBM-et az előzőekben, a 25.(3) példában ismertetett eljárás szerint és SDS-PAGE eljárással határoztuk meg. A tisztított Trx-hOBM-et tartalmazó frakciókat összegyűjtöttük és meghatároztuk a Trx-hOBM fehérje koncentrációját. A fehérjekoncentráció meghatározását standardként marha szérumalbumint felhasználva végeztük el DC-Protein assay kit (BioRad Co.) segítségével.

26. Példa

A hOBM osteoclast képzést indukáló aktivitása

phOBM-et és pcDL-SR α 296-et COS-7 sejtekbe transzfektáltuk Lipofectamine (Gibco Co.) felhasználásával. A sejteket egy napon keresztül 10% FCS tartalmú DMEM-ben növesztettük, tripszinizáltuk, 5×10^4 sejt/lyuk mennyiségben 24-lyukú lemezekre fedőlemezekre (15 mm-es kerek, a Matsunami Co. gyártmánya) szélesztettük és két napon át növesztettük. A tenyésztet PBS-sel egyszer mostuk. A sejteket 1% paraformaldehid tartalmú PBS-sel fixáltuk, szobahőmérsékleten 8 percen át. A lemezt, amelyekhez a fixált sejteket erősítettük, PBS-sel hatszor mostuk, majd ezt követően minden lyukhoz 700 μ l-t adtunk abból az oldatból, amely úgy készült, hogy 10^{-9} M aktív formájú D_3 -vitamint, 10^{-7} M dexametazont és 10% magzati borjúsérumot tartalmazó α -MEM-ben 1×10^6 /ml sejtsűrűséggel egér lépsejteket szuszpendáltunk. Minden

lyukba Millicell PCF-et (Millipore Co.) helyeztünk, és a fent említett tenyésztápközegeben szuszpendált ST2 sejtekből (4×10^4 /ml) 700 μ l-t adtunk a Millicell PCF-be, majd ezután hat napon keresztül 37°C-on inkubáltunk. A növesztés után a Millicell PCF-et eltávolítottuk, a lemezt PBS-sel egyszer mostuk és a sejteket acetón-etanol oldattal (50:50) egy percre fixáltuk. Ezután a borkősav rezisztens sav foszfataz aktivitást (TRAP) mutató sejteket, amely aktivitás az osteoclastok specifikus jellemzője, Leukocita Acid Phosphatase kit (Sigma Co.) felhasználásával szelektíven festettük. A mikroszkópos megfigyelés eredményeképp azt kaptuk, hogy azokba a lyukakba, amelyekbe a pcDL-SR α 296-tal transzfektált COS-7 sejteket fixáltunk, nem figyeltünk meg TRAP-pozitív sejteket. Ezzel ellentétben 65 ± 18 (átlag $\pm$ szórás, $n=3$) TRAP-pozitív sejtet figyeltünk meg azokban a lyukakban, amelyekbe phOBM-mel transzfektált COS-7 sejteket fixáltunk. Továbbá abból a tényből következően, hogy ^{125}I -tel jelölt lazac kalcitonin (Amersham Co.) specifikusan kötődött ezen TRAP-pozitív sejtekhez, igazoltuk a kalcitonin receptor expresszióját. Ezen eredmények alapján bebizonyítottuk, hogy a humán OBM, amely a találmány szerinti cDNS által kódolt fehérje, osteoclast képzést indukáló aktivitással rendelkezik.

27. Példa

A Trx-hOBM és a szekretált formájú humán OBM osteoclast képzést indukáló aktivitása

10^{-8} M aktív formájú D_3 -vitamint, 10^{-7} M dexametazont és 10% magzati borjúsérumot tartalmazó α -MEM-ben

szuszpendáltunk 2×10^6 /ml koncentrációban egér lépsejteket. A szuszpenziót 24-lyukas lemezbe töltöttük, lyukanként 350 μ l mennyiségben. Ezután minden lyukba a tisztított Trx-hOBM fent említett tenyésztápközzel hígított 350 μ l-ét (40 ng/ml), 350 μ l olyan IMDM-10% FCS tenyésztápközzel 293-EBNA sejtek növesztésével előállított kondicionált tápközzel a fent említett tenyésztápközzel 10-szeresére hígított oldatát töltöttük, amelybe pCEPshOBM-et vagy pCEP4-et transzfektáltunk, vagy 350 μ l csak a fent említett tenyésztápközzel töltöttük. Millicell PCF-et (Millipore Co.) helyeztünk minden lyukra, amelyhez a fent említett tenyésztápközzel szuszpendált ST2 sejtekből (4×10^4 /ml) 600 μ l-t adtunk. Hat napon keresztül tartó növesztés után eltávolítottuk a Millicell PCF-et. A lemezt PBS-sel egyszer mostuk és a sejteket acetone-etanollal oldattal (50:50) egy percre fixáltuk. Ezután a borkősav rezisztens sav foszfatáz aktivitást (TRAP aktivitás) mutató sejteket „Leukocita Acid Phosphatase kit” (Sigma Co.) felhasználásával szelektíven festettük. A mikroszkópos megfigyelés eredményeképp azt kaptuk, hogy azokban a lyukakban, amelyekbe nem adtunk Trx-hOBM-et, nem figyeltünk meg TRAP-aktivitást mutató sejteket, míg 115 ± 19 (átlag $\pm$ szórás, $n=3$) TRAP-pozitív sejtet figyeltünk meg azokban a lyukakban, amelyekbe adtunk Trx-hOBM-et. Hasonlóan, nem figyeltünk meg TRAP-aktivitást mutató sejteket azokban a lyukakban, amelyekhez pCEP4-gyel transzfektált 293-EBNA sejtek kondicionált tápközzét adtuk, míg 125 ± 23 (átlag $\pm$ szórás, $n=3$) TRAP-pozitív sejtet figyeltünk meg azokban a lyukakban, amelyekhez pCEPshOBM-mel transzfektált 293-EBNA sejtek kondicionált tápközzét adtuk. Továbbá abból a tényből következően, hogy ^{125}I -tel jelölt lazac kalcitonin (Amersham Co.)

specifikusan kötődik ezen TRAP-pozitív sejtekhez, igazoltuk a kalcitonin receptor expresszióját. Ezen eredmények bebizonyították, hogy a Trx-hOBM és a szekretált formájú hOBM osteoclast képzést indukáló aktivitással rendelkeznek.

28. Példa

Poliklonális antitest készítése

A fent ismertetett eljárás alapján állítottunk elő immunogénként használt egér sOBM-et vagy humán sOBM-et. Konkrétan, az egér sOBM cDNS-t (az a cDNS (SEQ ID NO 18), amely az egér sOBM-et (SEQ ID NO 16) kódolja, amely nem rendelkezik az egér OBM membránköthő régiójával az N-terminálístól lefelé a 72. aminosavig tartó aminosavak hiányának következtében) vagy a humán sOBM cDNS-t (az a cDNS (SEQ ID NO 19), amely a humán sOBM-et (SEQ ID NO 17) kódolja, amely nem rendelkezik a humán OBM membránköthő régiójával az N-terminálístól lefelé a 71. aminosavig tartó aminosavak hiányának következtében) a pSec TagA expressziós vektor (InVitrogen Co.) HindIII/EcoRV fragmensével (5,2 kb) ligáltuk, amely fragmensben az immunglobulin κ -láncának szignál peptidjét kódoló nukleotid szekvencia is benne volt, együtt az OBM cDNS EcoRI/PmaCI fragmensével (0,32 kb), a „ligation kit ver 2” (Takara Shuzo Co.) felhasználásával. A reakciótermékkel *Escherichia coli* DH5 α -t transzformáltunk. Az így kapott ampicillin rezisztens törzsekből kapott plazmidokat alkális SDS eljárással tisztítottuk és restrikciós enzimmel emésztettük, hogy kiválasszuk azt a plazmidot, amely a pSec TagA-ba bevitt 0,6 kb és 0,32 kb fragmensekkel rendelkezik. Ezen plazmid szekvenciáját

Dyedeoxyterminator Cycle Sequencing FS kit (a Perkin Elmer Co. gyártmánya) felhasználásával határoztuk meg. Ennek eredményeképpen megállapítottuk, hogy ez a plazmid az egér vagy humán sOBM-et kódoló szekvenciával rendelkezik. Miután a plazmidot *NheI/XhoI* restrikciós enzimekkel emésztettük, a szekréción formájú OBM cDNS-nek megfelelő fragmenst (1,0 kb) kaptuk vissza agaróz gélelektroforézissel. Ezt a fragmenst a pCEP4 expressziós vektor (Invitrogen Co.) *NheI/XhoI* fragmensébe (10,4 kb) vittük be ligációs kit segítségével. *Escherichia coli* DH5 α -t transzformáltunk a reakciótermék felhasználásával. Az így kapott ampicillin rezisztens törzsekből a plazmidokat alkáli SDS eljárással tisztítottuk. Ezen plazmidokat restrikciós enzimmel végzett emésztéssel vizsgáltuk és kiválasztottuk a célszerkezettel rendelkező szekréción típusú OBM expressziós plazmidot (pCEP sOBM) tartalmazó *Escherichia coli*-t. A pCEP sOBM-mel rendelkező *Escherichia coli* törzset növesztettük és a pCEP sOBM-et Qiafilter plasmid midy kit (Qiagen Co.) segítségével tisztítottuk. Ezután 10% FCS-t tartalmazó IMDM-ben (IMDM-10% FCS) szuszpendáltunk 293-EBNA sejteket és kollagénnel bevont 24-lyukú lemezekre (a Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) szélesztettük őket 2×10^5 sejt/2 ml/lyuk sejtsűrűséggel. Egy éjszakán át tartó növesztés után a sejteket 1 μ g pCEP sOBM-mel vagy pCEP4-gyel transzformáltuk 4 μ l Lipofectamine (Gibco Co.) segítségével és tovább növesztettük őket két napon át 0,5 ml szérumentes IMDM-ben vagy IMDM-10% FCS-ben. Visszanyertük a tenyészet felülúszóját. A következők szerint szűrtünk rekombináns egér oldható OBM-re (msOBM) vagy humán oldható OBM-re (hsOBM) nézve magas termelékenységű sejtvonalat. 0,1 M végső koncentrációban nátrium-hidrogénkarbonátot adtunk ahhoz a tenyészet-felülúszóhoz, amely a várakozások

szerint tartalmazta az msOBM-et vagy hsOBM-et. 100 μ l tenyészet-felülűszót adtunk egy 96-lyukas immunlemez (Nunc Co.) minden lyukába és egy éjszakán át 4°C-on állni hagytuk, így a tenyészet-felülűszóban lévő msOBM vagy hsOBM a lyukakra immobilizálódott. Minden lyukhoz 200 μ l, PBS-sel (B-PBS) négyszeresére hígított Block Ace™ (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) oldatot adtunk és a lemezeket két órán át szobahőmérsékleten állni hagytuk. Miután a lemezen mindegyik lyukat háromszor mostuk 0,1% poliszorbát 20-at tartalmazó PBS-sel (B-PBS), P-PBS-sel sorozatosan hígított mindegyik rekombináns OCIF (rOCIF) oldatból (3-100 ng/ml) 100 μ l-t adtunk a lemezen lévő mindegyik lyukhoz. A lemezeket két órán át 37°C-on állni hagytuk. Miután a lemezeket PBS-sel háromszor mostuk, B-PBS-sel hígított 100 μ l peroxidázzal jelölt anti-OCIF poliklonális antitestet (WO 96/26217) adtunk mindegyik lyukhoz. Miután két órán át 37°C-on állni hagytuk, a lyukakat hatszor mostuk P-PBS-sel. Ezt követően 100 μ l TMB oldatot (TMB oldható reagens, nagy érzékenységű, ScyTek Co.) adtunk a lemezen lévő mindegyik lyukhoz és a lemezeket körülbelül 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd a reakciót 100 μ l stop-oldat (Stopping reagent, ScyTek Co.) minden lyukhoz való hozzáadásával megállítottuk. Egy mikrolemez olvasó segítségével megmértük minden lyuk abszorbanciáját 450 nm-en. Megállapítottuk, hogy az abszorbancia a hozzáadott OCIF koncentrációjával arányosan nagymértékben növekedett azon lemezek esetében, amelyekbe az msOBM-et vagy hsOBM-et termelő sejtvonal tenyészet-felülűszójában lévő msOBM-et vagy hsOBM-et immobilizáltuk.

A nagyfokú abszorbanciabeli növekedést mutató sejtvonalat választottuk ki magas produktivitású törzsként. Az ezzel kapcsolatos, msOBM-re vagy hsOBM-re nézve magas produktivitású 293-EBNA sejteket nagyléptékben növesztettük 5% FCS-t tartalmazó IMDM tápközegeben 25 T-edény (T-225) felhasználásával. Miután a sejtek összefolytak, friss tenyésztápközeget adtunk mindegyik T-225 edényhez, edényenként 100 ml mennyiségben és a sejteket 3-4 napon át növesztettük, majd összegyűjtöttük a tenyészet-felülúszót. Ezen eljárásokat négyszer ismételtük meg, hogy 10 liter, msOBM-et vagy hsOBM-et tartalmazó tenyészet-felülúszót kapjunk. Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézisen homogén sávot mutató (molekulatömeg: 32 kDa) tisztított msOBM-et (10 mg) vagy hsOBM-et (12 mg) a tenyészet felülúszóból kaptuk OCIF-immobilizált oszlopon végzett affinitás kromatográfia és gélaszűrési kromatográfia segítségével a 25.(6) és 25.(7) példákban ismertetett eljárás szerint. Mindegyik így kapott tisztított készítményt antigénként használtuk immunizációhoz. Mindegyik kapott fehérje antigént foszfáttal pufferelt konyhasóoldatban (PBS) 200 µg/ml koncentrációra feloldottuk és ugyanakkora térfogatú Freund-féle komplett hatásjavítóval emulzifikáltuk. A három japán fehér nyúl mindegyikét 1 ml emulzióval körülbelül egyszer egy héten szubkután módon immunizáltuk. Amikor az antitest titer elért egy csúcsot, egy emlékeztető injekciót adtunk be. A segédinjekció beadását követő 10. napon levettük a teljes vért. A szérumot a protein A Sepharose kromatográfiához való kötő pufferrel (BioRad Co.) kétszeresére hígítottuk és ugyanezzel a pufferrel egyensúlyba hozott protein A oszlopra vittük fel. Miután az oszlopot ezzel a pufferrel bőven mostuk, az oszlophoz adszorbeálódott anti-sOBM antitestet egy elúciós

pufferrel (BioRad Co.) vagy 0,1 M glicin-HCl pufferrel pH 3,0, eluáltuk. Az eluátum azonnali semlegesítése érdekében az eluátumot olyan kémcsövekbe gyűjtöttük, amelyek kis mennyiségű 1,0 M Tris-HCl-at (pH 8,0) tartalmaztak. Az eluátumot egy éjszakán át 4°C-on dializáltuk PBS-sel szemben. Az antitest oldat antitest tartalmát Lowry módszere segítségével mértük meg, standard fehérjeként marha IgG-t használva. Így 1 ml nyúl antiszérumból körülbelül 10 mg, a találmány szerinti poliklonális antitestet tartalmazó tisztított immunglobulint (IgG) kaptunk.

29. Példa

Az OBM és SOBM ELISA segítségével történő mérése poliklonális antitest felhasználásával

A 28. példában kapott nyúl anti-humán SOBM poliklonális antitest, mint szilárd fázisú antitest és enzim-jelölt antitest felhasználásával szendvics ELISA-t készítettünk. Ishikawa eljárása (Ishikawa és mtsai. J. Immunoassay, 4. kötet, 209-327, 1983) szerint peroxidázzal (POD) jelölt antitestet készítettünk.

A 28. példában kapott anti-humán SOBM poliklonális antitestet 0,1 M NaHCO_3 -ban 2 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációra feloldottuk. Az így kapott oldat 100 μl -ét adtuk egy 96-lyukas immunlemez (Nunc Co.) mindegyik lyukába, amit ezután egy éjszakán át szobahőmérsékleten állni hagytunk. Ezt követően 200 μl 50%-os Block AceTM-t (Snow Brand Milk Co., Ltd.) adtunk mindegyik lyukhoz és a lemezeket egy órán át szobahőmérsékleten állni hagytuk. A lyukakat 0,1%

poliszorbát 20-at tartalmazó PBS-sel (mosó puffer) háromszor mostuk.

A 26. példában ismertetett eljárás szerint humán OBM-et expresszáltattunk és a 2. példában ismertetett eljárás szerint tisztítottuk. A tisztított humán OBM-et és a 28. példában előállított tisztított humán sOBM-et sorozatosan hígítottuk az első reakciópufferrel (40% Block Ace-t és 0,1% poliszorbát 20-at tartalmazó 0,2 M Tris-HCl puffer, pH 7,2) és a lemezek mindegyik lyukába 100 µl ilyen hígított oldatot adtunk. A lemezeket két órán keresztül szobahőmérsékleten állni hagytuk és a fent említett mosópufferrel háromszor mostuk. Ezt követően a második reakciópufferrel (25% Block Ace-t és 0,1% poliszorbát 20-at tartalmazó 0,1 M Tris-HCl puffer, pH 7,2) 1000-szeresére hígított 100 µl POD-jelölt anti-humán sOBM poliklonális antitestet adtunk a lemezek mindegyik lyukába. Miután a lemezeket két órán keresztül szobahőmérsékleten állni hagytuk, mindegyik lyukat háromszor mostuk a mosópufferrel. Ezután 100 µl enzim szubsztrát oldatot (TMB, ScyTek Co.) adtunk a lemezek mindegyik lyukába és a lemezeket 10 percen át állni hagytuk, majd ezt követően 100 µl reakciót leállító oldatot (Stopping reagent, ScyTek Co.) adtunk hozzá, hogy megállítsuk az enzimreakciót. Egy mikrolemez olvasó felhasználásával megmértük minden lyuk abszorbanciáját 450 nm-en. Az eredmények a 26. ábrán láthatók. A nyúl anti-humán sOBM poliklonális antitestet felhasználó szendvics ELISA majdnem egyformán ismerte fel a humán sOBM-et (molekulatömege körülbelül 32 kDa) és a humán OBM-et (molekulatömege körülbelül 40 kDa) körülbelül $12,5 \times 10^{-3}$ pmol/ml mérési érzékenységgel (humán OBM: körülbelül 500 pg/ml, humán sOBM: körülbelül 400 pg/ml). A 28. példában

kapott nyúl anti-egér sOBM poliklonális antitest felhasználásával végzett egér sOBM és egér OBM ELISA eljárással végzett mérése alkalmas volt arra, hogy ugyanezen a módon végezzük el. Megállapítottuk, hogy rendkívül kis mennyiségű egér sOBM vagy egér OBM a fent leírtakkal majdnem egyező érzékenységgel mérhető.

Mint azt fent említettük, a 28. példában készített találmány szerinti anti-humán sOBM poliklonális antitest egyformán képes felismerni mind a humán sOBM, mind a humán OBM antigéneket. Ezért az antitestet anti-humán OBM/sOBM poliklonális antitestnek neveztük el. Hasonló módon, a 28. példában készített anti-egér sOBM poliklonális antitest egyformán képes felismerni mind az egér sOBM, mind az egér OBM antigéneket.

30. Példa

Monoklonális antitest készítése

A 28. példában készített tisztított humán sOBM-et használtuk antigénként immunizációhoz. A tisztított humán sOBM-et fiziológiás konyhasóoldatban 10 µg/ml koncentrációra feloldottuk és ugyanekkora térfogatú Freund-féle komplett hatásjavítóval való összekeveréssel emulzifikáltuk. Az emulziót háromszor 200 µl dózisban, hetente egyszer adtuk be BALB/c egereknek intraperitóniásan immunizálás céljából. Ezt követően ugyanakkora térfogatú Freund-féle komplett hatásjavítót adtunk 5 µg/ml humán sOBM-et tartalmazó fiziológiás konyhasóoldathoz és a keveréket eléggé emulzifikáltuk. Ezt az emulziót 200 µl-es dózisban injektáltuk intraperitóniásan BALB/c egerekbe hetente egyszer négy

hétén keresztül immunizálási célból. A negyedik immunizáció után egy héttel segédinjekcióként 100 μ l, 10 μ g/ml humán sOBM-et tartalmazó fiziológiás konyhasó oldatot adtunk be intravénásan a BALB/c egereknek. Három nap elteltével kivettük a lépet és elválasztottuk a lépsejteket. A lépsejteket P3x63-Ag8.653 egér mielóma sejtekkel fuzionáltattuk szokásos eljárás szerint (Koehler, G. és Milstein, C., Nature, 256, 495 (1975)). A szuszpendált fuzionált sejteket 10 napon át hipoxantint, aminopterint és timidint tartalmazó HAT tápközegben növesztettük. Miután a mielóma sejtek elpusztultak és a hibridómák feltűntek, a HAT tápközéget aminopterin-mentes HAT tápközegre cseréltük és tovább folytattuk a sejtnövesztést.

31. Példa

A hibridóma kiválasztása és klónozás

A hibridómák feltűnését 10 nappal a 30. példában ismerttetett sejtfúzió után figyeltük meg. A következő eljárás szerint kiválasztottuk a humán sOBM-et nagy affinitással felismerő monoklonális antitesteket és ezen antitesteket termelő hibridómákat az alább leírt javított szilárd fázisú ELISA felhasználásával. Továbbá ahhoz, hogy mind a humán sOBM-et, mind az egér sOBM-et felismerő anti-OBM monoklonális antitestet kiválasszuk, a 27. példában készített egér sOBM-et használtuk fel antigénként a humán sOBM-en felül a szilárd fázisú ELISA-hoz. A humán sOBM-et, illetve az egér sOBM-et 5 μ g/ml koncentrációban 0,1 M nátrium-hidrogénkarbonát oldatban feloldottuk. Mindegyik antigén oldatból 50 μ l-t adtunk egy 96 lyukas immunlemez

(Nunc Co.) mindegyik lyukába. A lemezeket egy éjszakán át 4°C-on állni hagytuk, hogy immobilizáljuk az antigéneket. Mindegyik lyukból eltávolítottuk az antigén oldatot. Ezután minden lyukat 200 µl 50% Block Ace™-val (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) feltöltöttünk és szobahőmérsékleten egy órán át állni hagytunk. Miután minden lyukat 0,1% poliszorbát 20-at tartalmazó foszfáttal pufferezt konyhasóoldattal (PBS-P) mostunk, 40 µl borjúsérumot (Hyclone Inc.) adtunk minden lyukhoz. Ezután mindegyik hibridóma tenyészet-felülszéből 10 µl-t adtunk a lyukakhoz és a lyukakat 80% borjúsérum jelenlétében szobahőmérsékleten két órán át inkubáltuk. A 80% borjúsérum jelenlétében végzett szilárd fázisú ELISA célja, hogy kiválasszuk azt a hibridómát, amely olyan antitestet termel, amely még magas fehérje koncentrációjú oldatban lévő nagyon kis mennyiségű humán sOBM-et vagy egér sOBM-et is képes érzékelni, akár sérumból származó, immunreakcióval interferáló anyag jelenlétében, azaz olyan hibridómát, amely humán sOBM-re vagy egér sOBM-re nézve nagy affinitású antitestet tud termelni. Miután két órán keresztül szobahőmérsékleten zajlott a reakció, a lemezeket PBS-P-vel mostuk és ezt követően 25% Block Ace-t tartalmazó fiziológiás konyhasóoldattal 5000-szeresére hígított peroxidázzal jelölt anti-egér IgG-ből (KPL Co.) 50 µl-t adtunk minden lyukhoz. Két órás szobahőmérsékleten zajló reakció után a lemezt PBS-P-vel háromszor mostuk. Miután 50 µl enzim szubsztrát oldatot (TMB, ScyTek Co.) adtunk minden lyukhoz, a reakciót öt percen át folytattuk szobahőmérsékleten. Az enzimreakciót 50 µl stop-oldat (Stopping reagent, ScyTek Co.) hozzáadásával állítottuk meg. A humán sOBM-et vagy egér sOBM-et felismerő antitesteket termelő hibridómákat a lyukak 450 nm-en

mikrolemez olvasóval (Immune Reader NJ2000™, Nippon InterMed Co.) mért abszorbanciájának mérése segítségével választottuk ki. A kiemelkedően nagy abszorbanciát (OD_{450nm}) mutató antitesteket termelő hibridómákat választottuk ki. Ezen hibridómák korlátozott hígítási eljárással végzett klónozását 3 - 5 alkalommal ismételtünk meg, hogy stabil hibridómákat hozzunk létre. Az így kapott antitest-termelő hibridóma klónok közül választottuk ki a kiemelkedően nagy antitest produktivitást mutató hibridómákat.

32. Példa

Monoklonális antitest termelése és tisztítása

A 31. példában kapott antitest-termelő hibridómákat növesztettük, azaz az olyan nagy affinitású antitestet termelő hibridómákat, amelyek felismerik a humán sOBM-et, illetve az olyan hibridómákat, amelyek egér sOBM-mel keresztreaktivitást mutató antitestet termelnek. Mindegyik hibridómát intraperitóniásan beültettük olyan BALB/c egerekbe (1×10^6 sejt/egér), amelyeknek egy héttel előtte prisztánt (Aldorich Co.) adtunk be. Körülbelül 2-3 héttel ezután összegyűjtöttük a felgyúlt hasvizet. A hasvízben lévő, a találmány szerinti humán sOBM-et vagy mind a humán sOBM-et és egér sOBM-et felismerő monoklonális antitestet a 28. példában leírt anti-OBM/sOBM poliklonális antitestek tisztítási eljárása szerint tisztítottuk Protein A oszlop felhasználásával. Így kaptuk a hasvízből a tisztított monoklonális antitestet Protein A oszlopkromatográfia (Pharmacia Co.) segítségével.

33. Példa

A monoklonális antitest antigén specifitása

A humán sOBM-et specifikusan felismerő monoklonális antitest antigén specifitását és a mind a humán sOBM, mind az egér sOBM felé keresztreaktivitást mutató monoklonális antitestet megvizsgáltuk humán sOBM, membránkötő régióval rendelkező humán intakt OBM, egér sOBM és membránkötő régióval rendelkező egér intakt OBM felhasználásával. Több mint harminc különböző monoklonális antitestet kaptunk. A több reprezentatív antitesten végzett vizsgálatok eredményeit az 1. táblázatban mutatjuk be. Eredményként azt találtuk, hogy a humán sOBM-et specifikusan felismerő legtöbb anti-humán sOBM monoklonális antitest a membránkötő régióval rendelkező humán intakt OBM-et is felismeri, de nem az egér OBM-et és a membránkötő régióval rendelkező egér intakt OBM-et. Másrészt azt találtuk, hogy csak néhány olyan monoklonális antitestet kaptunk, amely mind a humán sOBM-et, mind az egér sOBM-et felismeri és azt, hogy ezen antitestek mind a humán OBM, mind az egér OBM felé keresztreaktivitást mutatnak. Ezen eredmények azt mutatják, hogy van egy általános antigén-felismerő hely, nevezetesen egy általános epitóp mind a humán OBM-ben, mind az egér OBM-ben. Annak alapján, hogy immun antigénként humán sOBM-et felhasználva állítottunk elő anti-humán sOBM monoklonális antitestet, ez ugyanilyen mértékben a membránkötő régióval rendelkező humán OBM-et is felismeri. Az anti-humán sOBM monoklonális antitestet anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitestnek neveztük el.

1. Táblázat

Antitest	Antigén			
	hsOBM	hOBM	msOBM	mOBM

H-OBM 1	+	+	-	-
H-OBM 2	+	+	-	-
H-OBM 3	+	+	-	-
H-OBM 4	+	+	-	-
H-OBM 5	+	+	-	-
H-OBM 6	+	+	-	-
H-OBM 7	+	+	-	-
H-OBM 8	+	+	-	-
H-OBM 9	+	+	+	+
H-OBM 10	+	+	-	-
H-OBM 11	+	+	-	-
H-OBM 12	+	+	-	-
H-OBM 13	+	+	+	+
H-OBM 14	+	+	-	-

hsOBM: humán oldható OBM,

hOBM: humán membránkötött típusú OBM,

msOBM: egér oldható OBM,

mOBM: egér membránkötött típusú OBM.

34. Példa

A monoklonális antitest osztályának és alosztályának meghatározása

A találmány szerinti monoklonális antitest osztályát és alosztályát az immunglobulin osztály és alosztály analízis kit (Amersham Co.) segítségével, a mellékelt útmutató szerint határoztuk meg. A reprezentatív monoklonális antitesteken végzett vizsgálatok eredményeit a 2. táblázatban mutatjuk be. Mint az a 2. táblázatban látható, az anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitestek többsége IgG₁ volt, a többi IgG_{2a} és IgG_{2b}. Mindegyik antitest könnyű lánc κ lánc volt.

2. Táblázat

Antitest	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃	IgA	K
H-OBM 8	-	+	-	-	-	+
H-OBM 9	+	-	-	-	-	+
H-OBM 10	+	-	-	-	-	+
H-OBM 11	+	-	-	-	-	+
H-OBM 12	-	-	+	-	-	+
H-OBM 13	+	-	-	-	-	+
H-OBM 14	+	-	-	-	-	+

35. Példa

A monoklonális antitest disszociációs konstansának (K_d érték) mérése

A monoklonális antitest disszociációs konstansát ismert eljárás szerint (Betrand Friguet és mtsai.: Journal of Immunological Methods, 77, 305-319, 1986) határoztuk meg. Eszerint a 32. példában kapott tisztított antitestet 40% Block Ace-t és 0,1% poliszorbát 20-at tartalmazó 0,4 M Tris-HCl pufferben (elsődleges puffer, pH 7,4) 5 ng/ml koncentrációban feloldottuk. Az oldatot a 28. példában kapott tisztított humán oldható OBM (hsOBM) elsődleges pufferben hígított oldatának, amely koncentráció tartománya 6,25 µg/ml-től 10 µg/ml-ig terjedt, ugyanekkora térfogatával kevertük össze. Az elegyet 15 órán át 4°C-on állni hagytuk, hogy a hsOBM a monoklonális antitesthez kötődjön. 15 óra elteltével a hsOBM-hez (10 µg/ml, 100 µl/lyuk) nem kötődött antitestet immobilizált szilárd fázisú ELISA segítségével megmértük, hogy kiszámítsuk a monoklonális antitest hsOBM felé mutatott disszociációs állandóját. Továbbá ugyanezen eljárás szerint megmértük egy antitest msOBM felé mutatott affinitását azzal a

különbséggel, hogy a hsOBM helyett msOBM-et használtunk, amely antitest egy monoklonális antitest hsOBM-re és a keresztreaktivitást egér oldható OBM (msOBM) felé is mutatja. A 3. táblázatban láthatók azon antitestek disszociációs konstansai, amelyek mindegyik antigén felé nagy affinitást mutatnak és enzimátikus immunoassay-hez és kötési assay-hez használhatók.

3. Táblázat

Antitest	Alosztály	Antigén	Disszociációs konstans Kd(M)
H-OBM 1	IgG ₁ (κ)	hsOBM	$1 \times 10^{-11} < k_d < 1 \times 10^{-10}$
H-OBM 4	IgG ₁ (κ)	hsOBM	$1 \times 10^{-11} < k_d < 1 \times 10^{-10}$
H-OBM 9	IgG ₁ (κ)	hsOBM	$1 \times 10^{-9} < k_d < 1 \times 10^{-8}$
H-OBM 9	IgG ₁ (κ)	msOBM	$1 \times 10^{-8} < k_d < 1 \times 10^{-7}$

Eredményként azt kaptuk, hogy a H-OBM 1 és H-OBM 4 disszociációs konstansai (Kd), amelyek a humán oldható OBM-re (hsOBM) specifikus antitestek, 10^{-11} M nagyságrendben voltak, ami azt mutatja, hogy nagy az affinitásuk a hsOBM felé. Másrészt mind a hsOBM-et, mind az egér oldható OBM-et (msOBM) felismerő H-OBM 9 antitest Kd értéke msOBM felé 10^{-8} M és hsOBM felé 10^{-9} M nagyságrendben volt. Továbbá az 1. táblázatban lévő mindkét antigént felismerő másik antitest disszociációs konstansa, azaz a H-OBM 13 disszociációs konstansa mindegyik antigénre nézve ugyanakkora volt, mint a H-OBM 9-re nézve, és ezen két antitest ugyanabba az alosztályba tartozik. Ezen felismerések azon lehetőséget sugallják, hogy ezek mindegyik antigén ugyanazon epitópját felismerő azonos antitestek.

36. Példa

A humán OBM és sOBM szendvics ELISA-val végzett mérési eljárása anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitestek felhasználásával

A 35. példában kapott két nagy affinitású monoklonális antitest, a H-OBM 1, illetve a H-OBM 4 szilárd fázisú antitestként és enzimjelölt antitestként való felhasználásával készítettünk szendvics ELISA-t. Az antitest jelölését maleimiddel aktivált peroxidáz kit (Piers Co.) felhasználásával végeztük el. A H-OBM 1 antitestet 0,1 M nátrium-hidrogénkarbonát oldatban 10 µg/ml koncentrációra feloldottuk és ezen oldat 100 µl-ét adtuk egy 96-lyukú immunlemez (Nunc Co.) minden lyukába. Miután az antitest immobilizálódásához egy éjszakán át 4°C-on állni hagytuk, az oldatot eltávolítottuk és 300 µl 50% Block Ace[™] oldatot adtunk a lemez minden lyukához. Minden lyukat blokkoltunk a lemezen úgy, hogy szobahőmérsékleten hagytuk állni két órán át. Blokkolás után a lemezeket 0,1% poliszorbát 20-at tartalmazó foszfáttal pufferelt konyhasóoldattal (PBS-P) mostuk. Humán OBM-et (hOBM), illetve humán oldható OBM-et (hsOBM) hígítottunk 40% Block Ace[™]-t (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) és 0,1% poliszorbát 20-at (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.) tartalmazó 0,4 M Tris-HCl pufferrel 7,4-es pH értéken (első reakciópuffer) különböző koncentrációjú tesztminták előállítására céljából. Ezen különböző koncentrációjú tesztmintákat adtuk lyukanként 100 µl mennyiségben minden lyukhoz és a minden lyukra immobilizált H-OBM 1 antitesttel reagáltattuk szobahőmérsékleten két órán át tartó inkubációval. Két óra elteltével a lemezeket PBS-P-vel mostuk. Ezt követően 100 µl, 25% Block Ace[™]-t és 0,1% poliszorbát 20-at 7,4-es pH értéken 0,2 M Tris-HCl pufferben (második reakciópuffer)

POD-jelölt H-OBM 4 antitestet tartalmazó oldatot adtunk minden lyukba, majd ezt követően tovább inkubáltuk szobahőmérsékleten két órán keresztül. A lemezeket ezután PBS-P-vel mostuk és 100 μ l enzim szubsztrát oldatot (TME, ScyTec Co.) adtunk minden lyukhoz, hogy beindítsuk az enzimreakciót. Az enzimreakciót 100 μ l reakció stop-oldat (stopping reagent, ScyTek Co.) minden lyukhoz történő hozzáadásával állítottuk le. Egy mikrolemez olvasó segítségével 450 nm-en megmértük minden lyuk abszorbanciáját. Az eredmények a 27. ábrán láthatók.

Eredményként megállapítottuk, hogy a 35. példában előállított humán OBM/sOBM-re nézve nagy affinitású két anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitest, a H-OBM 1 és a H-OBM 4 felhasználásával készített szendvics ELISA egyformán ismeri fel a humán OBM-et és a humán sOBM-et, valamint alkalmas nagyon kis mennyiségű humán OBM vagy sOBM körülbelül $1,25 \times 10^{-3}$ -tól $2,5 \times 10^{-3}$ pmol/ml (40 kDa molekulatömegű humán OBM-re körülbelül 50-100 pg/ml és 32kDa molekulatömegű humán sOBM-re körülbelül 40-80 pg/ml) mennyiségi határig történő mérésére. Ezen két anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitestet, a H-OBM 1-et és H-OBM 4-et termelő hibridómákat H-OBM1-nek H-OBM4-nek neveztük el. H-OBM9-nek neveztük el azt a hibridómát, amely az egér OBM-et és egér sOBM-et felismerő anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitestet (H-OBM 9) termeli és osteoclast képződést gátló aktivitással is rendelkezik. Ezen hibridómákat 1993. november 5-én a FERM BP-6264 (H-OBM1), FERM BP-6265 (H-OBM4) és FERM BP-6266 (H-OBM9) letéti számokon a „National Institute of Bioscience and Human Technology, the Agency of Industrial Science and Technology”-nál letétbe helyeztük.

37. Példa

Egér OBM és egér sOBM mérése egér OBM-et és egér sOBM-et felismerő anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitest felhasználásával

A 33. és 35. példákban szilárd fázisú antitestként kapott, egér OBM-et és egér sOBM-et felismerő anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitest (H-OBM 9), valamint a 28. példában kapott anti-egér OBM/sOBM poliklonális antitest, mint enzimjelölt antitest felhasználásával készítettünk szendvics ELISA-t. Az egér OBM-et, illetve egér sOBM-et az első reakciópufferrel hígítottuk, hogy a 35. példában leírtakkal megegyező módon különböző koncentrációjú elegyeket kapjunk és ezt követően a 36. példában leírt eljárás szerint megmértük az sOBM-et. Az eredmények a 28. ábrán láthatók. Eredményként azt találtuk, hogy az egér OBM és egér sOBM ugyanúgy mérhető a H-OBM 9 felhasználásával, amely a találmány szerinti egér OBM-et és egér sOBM-et felismerő anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitest. Mint ahogy azt a 35. példa eredménye mutatja, ez a H-OBM 9 anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitest az egér sOBM felé nagy disszociációs konstanssal rendelkezik, azaz az egér sOBM felé összehasonlíthatóan alacsony az affinitása. Ezen ELISA assay érzékenysége az egér OBM (molekulatömeg: körülbelül 40 kDa) és egér sOBM (molekulatömeg: körülbelül 32 kDa) mérésekor körülbelül 25×10^{-3} pmol/ml (körülbelül 1 ng/ml egér OBM-re és 0,8 ng/ml egér sOBM-re) volt.

38. Példa

Az anti-OBM/sOBM antitest osteoclastogenezist gátló aktivitása

Ismeretes, hogy az osteoclast szerű sejtek (OCL) egér lépsejtek és ST2 sejtek (egér csontvelőből származó sztrómális sejtek, Endocrinology, 125, 1805-1813 (1989)) együttműködésével indukálhatók. A kokultúra rendszerhez történő hozzáadása során tanulmányoztuk az anti-OBM/sOBM antitest OCL képződést gátló képességét. Mivel az egér OBM ebben a kokultúra rendszerben expresszálódik, ebben a példában antitestekként olyan nyúl anti-egér OBM/sOBM poliklonális antitestet használtunk, amely felismeri az egér OBM-et, valamint olyan anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitestet (H-OBM 9) használtunk, amely mind a humán OBM, mind az egér OBM antigéneket felismeri. Egy 24-lyukú lemez (Nunc) minden lyukába 10% FCS-t tartalmazó α -MEM-mel sorozatosan hígított anti-OBM antitestből lyukanként 700 μ l-t adtunk, továbbá minden lyukhoz adtunk a fent leírt tápközegben szuszpendált hím egér splenocitát (2×10^6 /ml) 350 μ l/lyuk mennyiségben. Ezt követően 4×10^{-8} M D_3 -vitamint és 4×10^{-7} M dexametazont tartalmazó fent említett tenyésztápközegben tripszinizált és szuszpendált ST2 sejteket (8×10^4 sejt/ml) adtunk 350 μ l/lyuk mennyiségben minden lyukhoz, majd ezután hat napon keresztül 37°C-on növesztettük őket. Miután a lemezeket egyszer PBS-sel mostuk, mindegyik lyukban fixáltuk a sejteket etanol és aceton (50:50) elegyével egy órán át szobahőmérsékleten. A lemezeket levegőn megszárítottuk és mindegyik lyukhoz 500 μ l szubsztrát oldatot adtunk a Leukocyte Acid Phosphatase kit (Sigma Co.) útmutatója szerint, majd 55 percen át 37°C-on inkubáltuk. Csak a borkósav rezisztens sav foszfatáz aktivitást (TRAP aktivitás) mutató sejteket festettük ezzel a reakcióval,

amely aktivitás az osteoclastok specifikus jellemzője. A lemezeket egyszer mostuk desztillált vízzel, levegőn megszárítottuk és megszámoltuk a TRAP-pozitív sejteket. Az eredmények a 4. táblázatban láthatók. Mint az a 4. táblázatban látható, mind a nyúl anti-egér OBM/sOBM poliklonális antitest, mind az egér OBM-et felismerő H-OBM 9 anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitest dóziszfüggő módon gátolta az OCL képződést. Úgy találtuk, hogy ezen antitestek osteoclastogenezist gátló aktivitással rendelkeznek, mint az OCIF/OPG osteoclastogenezist gátló faktor és így ígéretes terápiás ágensek csont-metabolizmus rendellenességi szimptómák kezeléséhez.

4. Táblázat

Antitest mennyisége (µg/ml)	A TRAP-pozitív multinukleátumok száma	
	Nyúl anti-egér OBM/sOBM poliklonális antitest	Egér anti-humán OBM/sOBM monoklonális antitest (H-OBM 9)
0	1155±53	1050±45
10	510±24	650±25
100	10±3	15±4

(Átlag ± szórás, n=3)

39. Példa

A Trx-OBM humán osteoclast képződést indukáló aktivitása

Egészséges felnőttek vénájából gyűjtött teljes vérből állítottunk elő egymagvú sejteket sűrűséggradienssel Histopaque (Sigma Co.) felhasználásával az ehhez mellékelt használati útmutató szerint. Az egymagvú sejteket $1,3 \times 10^6/\text{ml}$ sejtsűrűséggel 10^{-7} M dexametazont, 200 ng/ml makrofág kolónia stimuláló faktort (The Green Cross

Corp.), 10% magzati borjúsérumot és a 15. példában kapott tisztított Trx-OBM-et (0-100 ng/ml) tartalmazó α -MEM-ben szuszpendáltuk. A sejtszuspenziót egy 48-lyukú lemez mindegyik lyukához 300 μ l/lyuk mennyiségben adtuk hozzá és a sejteket 37°C-on három napon át növesztettük. Miután a táptalajt a fent említett tenyésztápközeggel kicseréltük, a sejteket négy napon keresztül 37°C-on növesztettük. A borkósav rezisztens sav foszfataz aktivitással (TRAP aktivitás) rendelkező így növesztett sejteket szelektíven festettük az 5. példában leírt eljárás szerint. A megfestett multinukleátumok számát mikroszkópos megfigyeléssel határoztuk meg. Az eredmények a 29. ábrán láthatók. Megállapítottuk, hogy a TRAP-pozitív multinukleátumok dóziszfüggő módon indukálódtak a Trx-OBM hozzáadása által, míg nem figyeltünk meg TRAP-pozitív sejteket azokban a lyukakban, amelyekhez nem adtunk Trx-OBM-et. Továbbá azt találtuk, hogy ezen TRAP-pozitív multinukleátumok pozitívak a vitronektin receptorra, amely az osteoclastok egy jellemzője. Ezenfelül amikor egy 48-lyukú lemez mindegyik lyukában ugyanilyen sejtnövesztést végeztünk elefántcsont darabkákon, gödörképződést figyeltünk meg csak a Trx-OBM jelenlétében az elefántcsont darabkákon. Ezen felismerések alapján a Trx-OBM humán osteoclast képződést indukáló aktivitással rendelkezik.

40. Példa

Csont-reszorpciós aktivitás gátlása anti-OBM/sOBM antitest segítségével

A terhesség 15. napján szubkután módon injektáltunk ddY egérbe (Japan SLC Co.) [45 Ca]-CaCl₂ oldatot (Amersham

Co.) egerenként 25 μCi dózisban, hogy a magzat csontját ^{45}Ca -val jelöljük. A következő napon leöltük az egeret, hogy megkapjuk a magzatot. A magzat mellő lábát kihúztuk és eltávolítottuk a bőrt és izmot, hogy megkapjuk a hosszú csontokat. Eltávolítottuk a porcot, hogy megkapjuk a hosszú csontok szárát. A hosszú csontok szárát egy 24-lyukas lemez minden lyukában egyenként áztattuk 0,5 ml, 0,2% marha szérumalbumint (Sigma Co.) tartalmazó tenyésztápközegekben (BGJb tápközeg, Gibco BRL Co.) és 24 órán keresztül 37°C -on 5% CO_2 -ban növesztettük. Az előnővesztés után a csontokat különböző friss tenyésztápközegekbe (0,5 ml) vittük át, amelyek mindegyike a különböző csont-reszorpciós faktorok (D_3 -vitamin, E_2 -prostaglandinok, parathyroid hormon, interleukin 1α) egyikét tartalmazta, valamint normál nyúl IgG-t (100 $\mu\text{g/ml}$; kontrollként) vagy a 28. példában előállított nyúl anti-OBM/sOBM poliklonális antitestet, majd ezután 72 órán keresztül tovább növesztettük őket. A növesztés után a hosszú csontokat 0,5 ml 5% triklór-ecetsav (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.) vizes oldatába helyeztük és szobahőmérsékleten több, mint három órán keresztül állni hagytuk, hogy kalciummentesítsük őket. A táptalajhoz és a triklór-ecetsavas oldat extraktumához (mindegyik 0,5 ml) 5 ml szcintillátort (Aquasol-2, Packard Co.) adtunk, hogy megmérjük a ^{45}Ca radioaktivitását, amiből kiszámítottuk a csont-reszorpció által a tenyésztápközegekbe felszabadított ^{45}Ca arányát. Az eredmények a 30-33. ábrákon láthatók. Eredményként azt találtuk, hogy a D_3 -vitamin (10^{-6} M) növeli a csont-reszorpciós aktivitást, de a nyúl anti-OBM/sOBM poliklonális antitest koncentráció függő módon elnyomta a D_3 -vitamin által stimulált csont-reszorpciót és teljesen gátolta a megnövekedett csont-reszorpciót 100 $\mu\text{g/ml}$ koncentráció esetén (30. ábra). Az E_2 -

prosztaglandinok (10^{-6} M) és a parathyroid hormon (100 ng/ml) szintén növelték a csont-reszorpciós aktivitást. Bár 100 μ g/ml nyúl anti-OBM/sOBM poliklonális antitest hozzáadása csaknem teljesen gátolta az E_2 -prosztaglandinok és a parathyroid hormon által stimulált csont-reszorpciót (31. és 32. ábra). Másrészt a pozitív kontrollként használt normál nyúl IgG (100 μ g/ml) nem befolyásolta az E_2 -prosztaglandinok és a parathyroid hormon által indukált csont-reszorpciós aktivitást. Az interleukin 1α (10 ng/ml) szintén növelte a csont-reszorpciót, de a nyúl anti-OBM/sOBM poliklonális antitest (100 μ g/ml) hozzáadása szignifikánsan gátolta (33. ábra). Ezen eredmények alapján világos, hogy a jelen találmány szerinti antitest csont-reszorpciós inhibitorként elsőrendű anyag. A H-OBM 9 egér anti-humán OBM/sOBM antitest felhasználásával végzett hasonló kísérletből kapott eredmények megerősítették, hogy ez az antitest a nyúl anti-OBM/sOBM poliklonális antitesttel csaknem megegyező csont-reszorpciót gátló hatást mutat.

Ipari alkalmazhatóság

A jelen találmány az osteoclastogenesis inhibíciós faktorhoz (OCIF) specifikusan kötődő új fehérjét, a fehérje előállítására szolgáló eljárást, e fehérje felhasználásával ezen fehérje expresszióját szabályozó anyag szűrésére szolgáló eljárást, olyan anyag szűrésére szolgáló eljárást, amely gátolja vagy modulálja ezen fehérje aktivitását, olyan receptor szűrésére szolgáló eljárást, amely ezen fehérje aktivitását hozzákötődése által közvetíti, ezen szűrési eljárások segítségével kapott anyagot tartalmazó gyógyszerészeti készítményt,

antitestet erre a fehérjére és az antitest felhasználásával csont-metabolizmus rendellenességének kezelésére szolgáló ágenst szolgáltat.

Továbbá a jelen találmány az osteoclastogenesis inhibíciós faktorhoz (OCIF) kötődő új fehérjét (OCIF-kötő molekula) kódoló DNS-t, a DNS által kódolt aminosav szekvenciával rendelkező fehérjét, a DNS felhasználásával génmanipulációs technikák segítségével az OCIF-hoz specifikusan kötődő fehérje előállítására szolgáló eljárást és csont-metabolizmus acatastia kezelésére szolgáló, a fehérjét tartalmazó ágenst szolgáltat. Ezentúl a találmány az OCIF-kötő molekula expresszióját szabályozó anyag szűrésére szolgáló eljárást, az OCIF-kötő molekulához való hozzákötődése által az aktivitását gátló vagy moduláló anyag szűrésére szolgáló eljárást, olyan receptor szűrésére szolgáló eljárást, amely az OCIF-kötő molekula aktivitását hozzákötődése által közvetíti, és ezen szűrési eljárások segítségével kapott anyagot tartalmazó gyógyszerészeti készítményt szolgáltat.

A jelen találmány továbbá az osteoclastogenesis inhibíciós faktorhoz, az OCIF-hoz kötődni képes új humán fehérjét (humán OCIF-kötő molekula, humán OBM) kódoló DNS-t, a DNS által kódolt aminosav sorrendet tartalmazó fehérjét, egy olyan fehérje génmanipulációs technikák segítségével történő előállítására szolgáló eljárást, amely az OCIF-hoz való specifikus kötődés jellemzőivel és az osteoclast differenciációt és érést segítő és előmozdító biológiai aktivitást mutató jellemzőkkel rendelkezik és a fehérje felhasználásával a csont-metabolizmus rendellenességének kezelésére szolgáló ágenst szolgáltat. Ezenfelül a találmány OCIF-kötő molekula expresszióját szabályozó anyag szűrésére szolgáló

eljárást, az OCIF-kötő molekula aktivitását hozzákötődésével gátló vagy moduláló anyag szűrésére szolgáló eljárást, olyan receptor szűrésére szolgáló eljárást, amely az OCIF-kötő molekula biológiai aktivitását hozzákötődése által közvetíti, ezen szűrés eljáráások segítségével kapott anyagot tartalmazó gyógyszerészeti készítményt, antitestet a humán OCIF-kötő fehérjére és az antitest felhasználásával csont-metabolizmus rendellenességi szimptómák megelőzésére és/vagy kezelésére szolgáló ágenst szolgáltat.

Továbbá a jelen találmány olyan antitesteket szolgáltat, amelyek mindkét antigént felismerik (anti-OBM/sOBM antitestek), az egyik egy olyan membránkötött fehérje, amely specifikusan kötődik az OCIF-hoz (OCIF-kötő molekula; OBM) és a másik egy olyan oldható OBM (sOBM), amely nem rendelkezik membránkötő régióval, szolgáltat az antigén előállítására szolgáló eljárást, ezen antigének felhasználásával az OBM és sOBM mérésére szolgáló eljárást és az antitestet, mint hatékony komponenst felhasználva a csont-metabolizmus rendellenességi szimptómák megelőzésére és/vagy kezelésére szolgáló ágenst.

A jelen találmány szerinti eljárással készített fehérje és antitest gyógyszerekként és/vagy reagensekként hasznos kutatási és kísérleti célokra.

A letétbe helyezett mikroorganizmusok ismertetése

- (1) A letéti szervezet neve és címe, amelyhez a mikroorganizmust letétbe helyeztük:

Agency of Industrial Science and Technology
1-3, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken,
Japán (postai irányítószám: 305)

A letéti szervezethez történt letétbe helyezés dátuma:

1997. május 23.

A letéti szám:

FERM BP-5953

- (2) A letéti szervezet neve és címe, amelyhez a mikroorganizmust letétbe helyeztük:

Agency of Industrial Science and Technology
1-3, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken,
Japán (postai irányítószám: 305)

A letéti szervezethez történt letétbe helyezés dátuma:

1997. augusztus 13.

A letéti szám:

FERM BP-6058

- (3) A letéti szervezet neve és címe, amelyhez a mikroorganizmust letétbe helyeztük:

Agency of Industrial Science and Technology
1-3, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken,
Japán (postai irányítószám: 305)

A letéti szervezethez történt letétbe helyezés dátuma:

1997. november 5. (Eredeti letéti időpont)

A letéti szám:

FERM BP-6264

- (4) A letéti szervezet neve és címe, amelyhez a mikroorganizmust letétbe helyeztük:

Agency of Industrial Science and Technology
1-3, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken,
Japán (postai irányítószám: 305)

A letéti szervezethez történt letétbe helyezés dátuma:

1997. november 5. (Eredeti letéti időpont)

A letéti szám:

FERM BP-6265

- (5) A letéti szervezet neve és címe, amelyhez a mikroorganizmust letétbe helyeztük:

Agency of Industrial Science and Technology
1-3, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken,
Japán (postai irányítószám: 305)

A letéti szervezethez történt letétbe helyezés dátuma:

1997. november 5. (Eredeti letéti időpont)

A letéti szám:

FERM BP-6266

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Antitest alkalmazása rendellenes csont-metabolizmusból eredő csonttömeg csökkenés kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására, amely antitest aktív összetevőként egy olyan fehérje ellen irányul, amely fehérje a következő fizikokémiai jellemzőkkel és biológiai aktivitással rendelkezik:
 - (a) affinitás: specifikusan kötődik az osteoclastogenesis inhibíciós faktorhoz (OCIF) és nagy affinitást mutat az OCIF felé, ahol a disszociációs konstans a sejtmembránon: $K_d=10^{-9}$ M vagy kisebb;
 - (b) molekulatömeg: körülbelül 30.000-40.000 molekulatömeggel rendelkezik nem-redukáló körülmények között végzett SDS-poliakrilamid gélelektroforézis segítségével meghatározva és körülbelül 90.000-110.000-es látszólagos molekulatömeggel rendelkezik monomer alakú OCIF-hoz keresztkötvé; és
 - (c) biológiai aktivitás: az osteoclastok differenciációját és érését segítő vagy előmozdító aktivitást mutat olyan kokultúra rendszerben, amely osteoblast sztrómális sejteket és lépsejteket tartalmaz olyan csontreszorpciós stimuláló faktorok jelenlétében, mint a D₃-vitamin aktív formája és a parathyroid hormon (PTH).
2. Antitest 1. igénypont szerinti alkalmazása, azzal jellemezve, hogy a csont-metabolizmus rendellenesség egy a következőket tartalmazó csoportból kiválasztott betegség: osteoporosis, hypercalcemia, Paget-kór, renális osteodystrophia, rheumatoid arthritis és osteoarthritis.

A meghatalmazott:


 KOVÁRI ÉS TÁRSAI
 Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
 1012 Budapest, Árpád út 125.
 DR. KOVÁRI ZOLTÁN
 szabadalmi ügyvivő

FIG.1

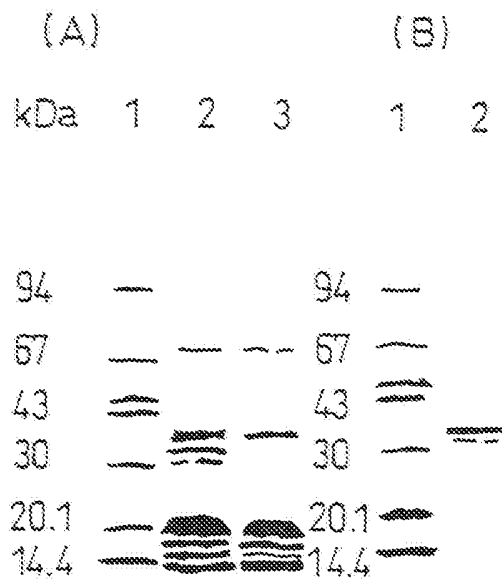
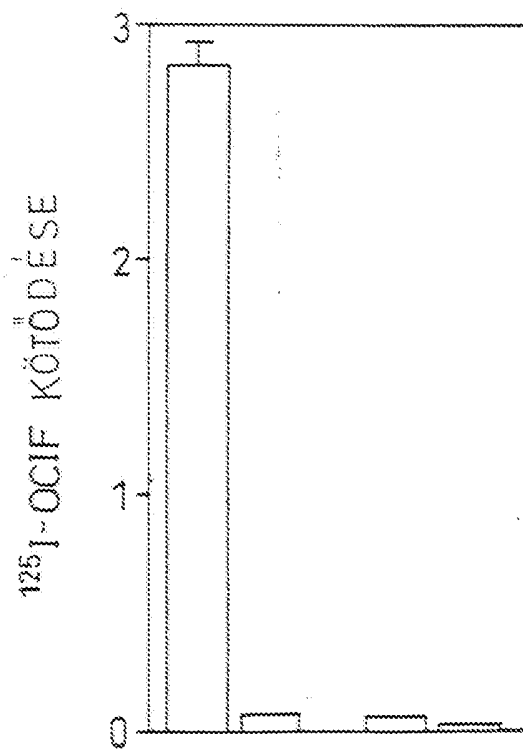


FIG.2



AKTIV FORMÁJÚ
D₃ VITAMIN
DEXAMETAZON
400-SZOROS OCIF

FIG. 3

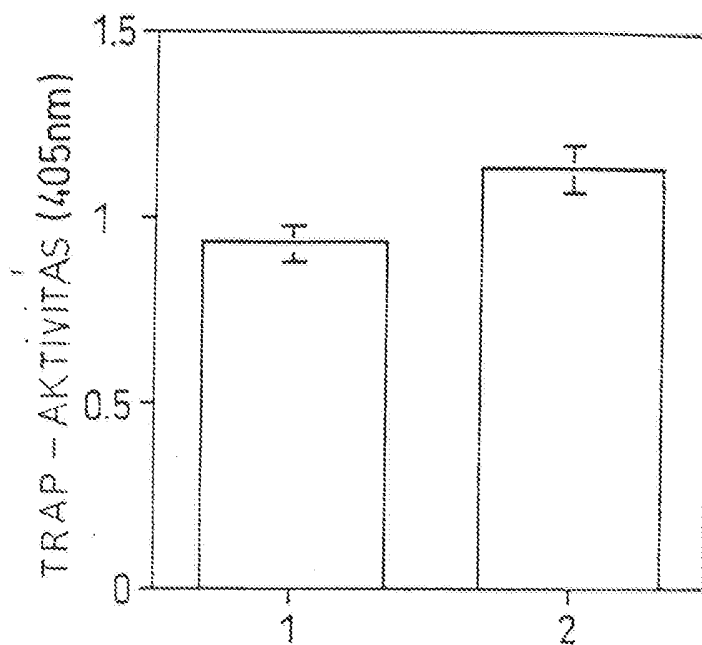


FIG. 4

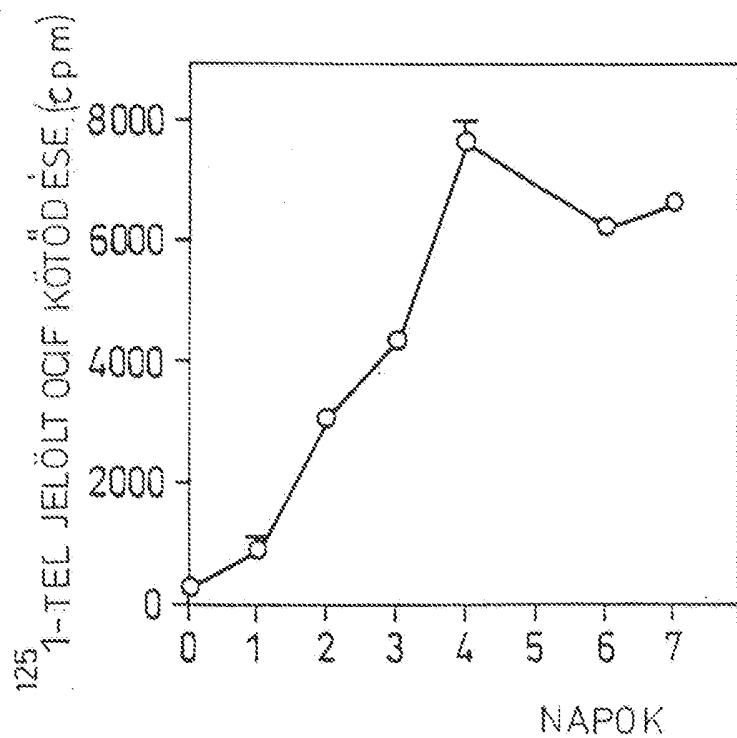


FIG.5

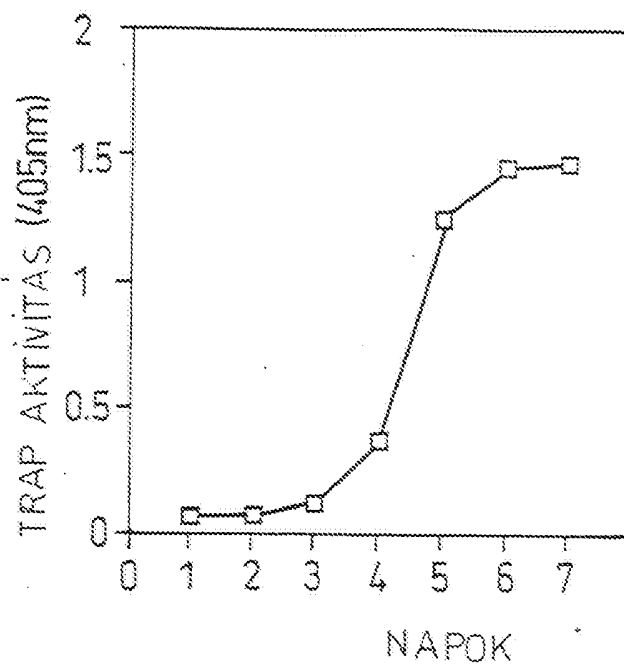
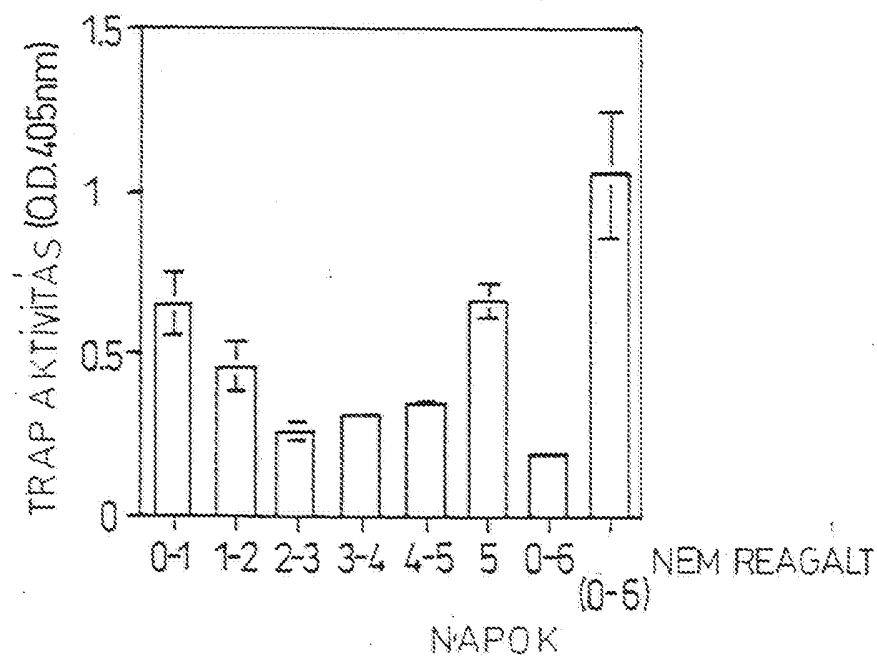


FIG.6



4 / 17

FIG.7

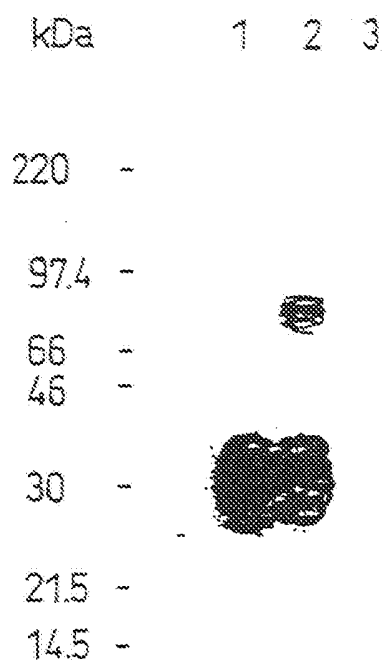


FIG.8

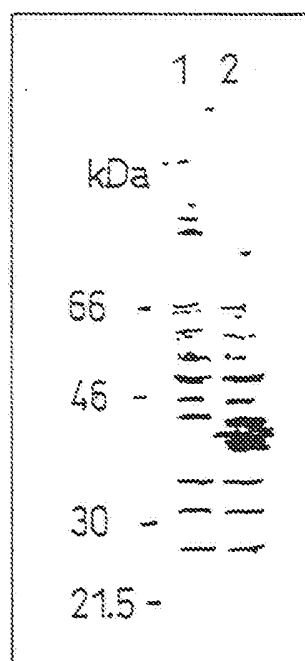


FIG.9

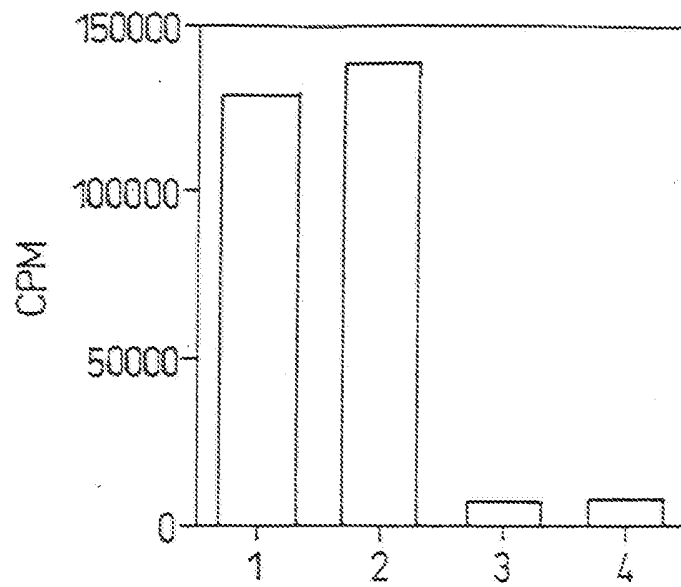


FIG.10

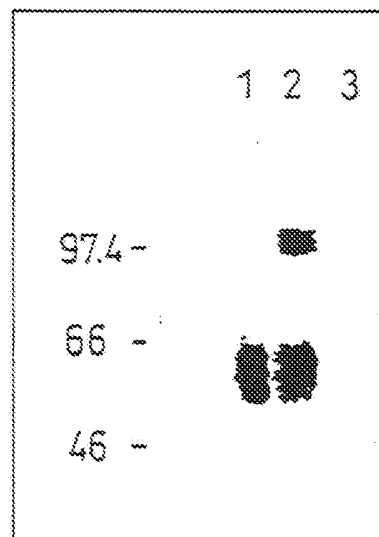


FIG.11

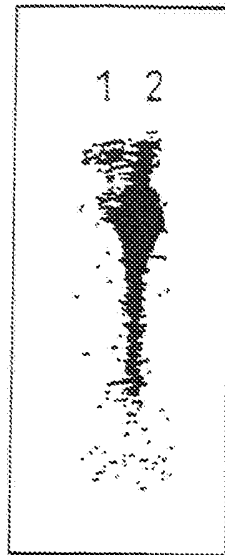


FIG.12

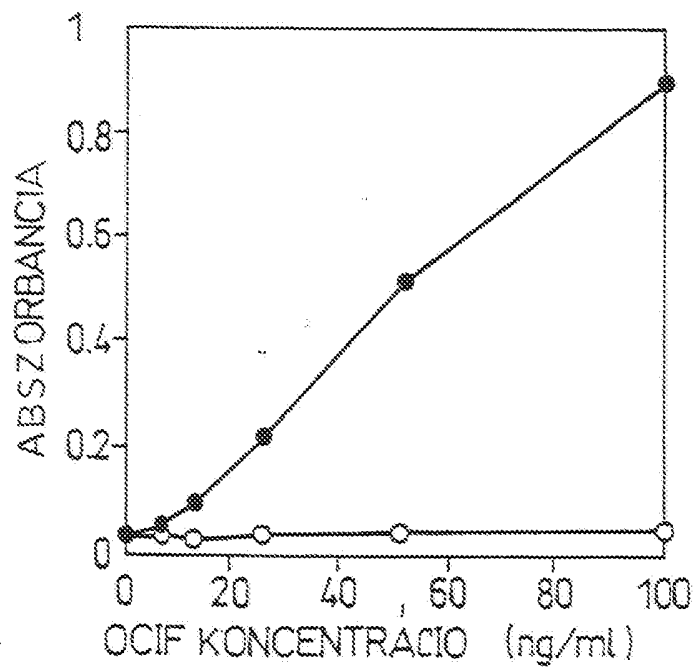


FIG.13

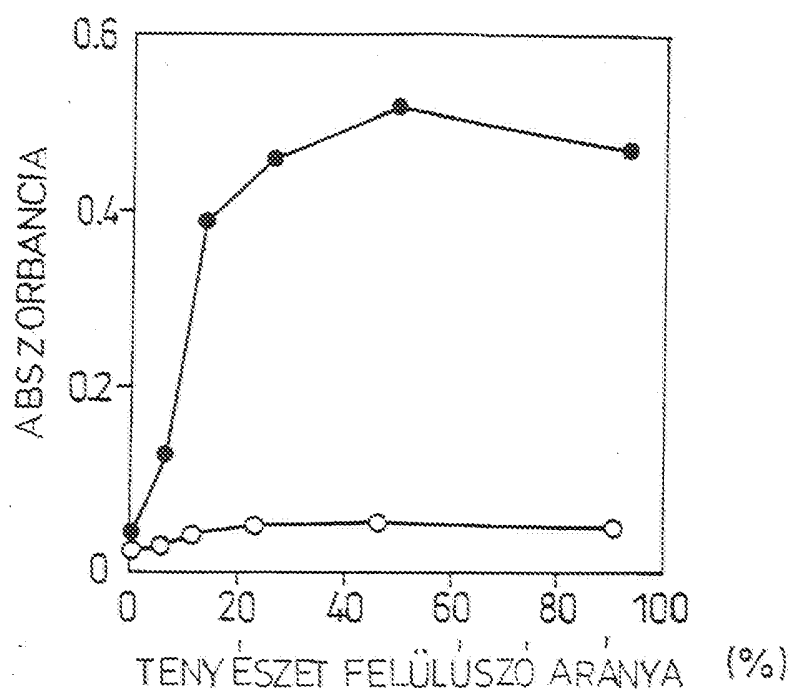
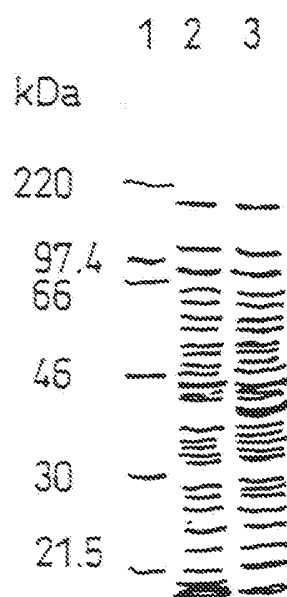


FIG.14



8 / 17

FIG.15

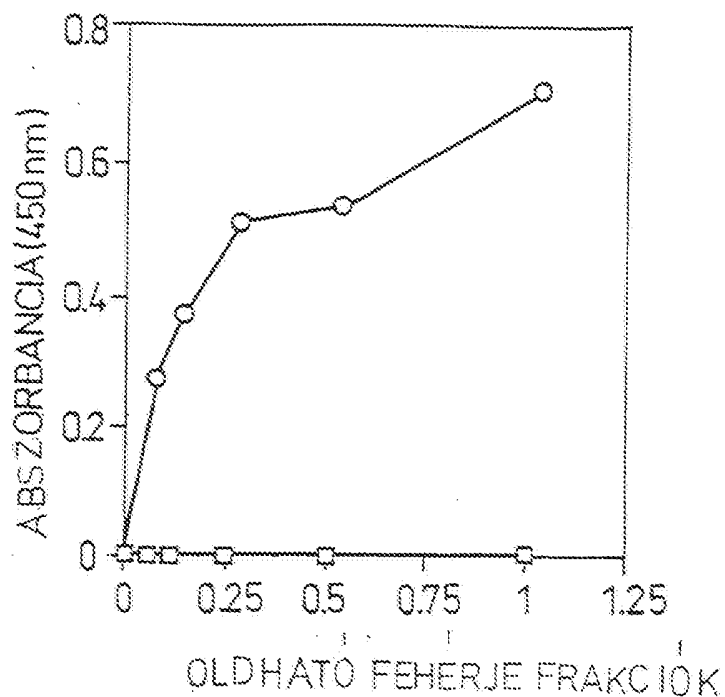
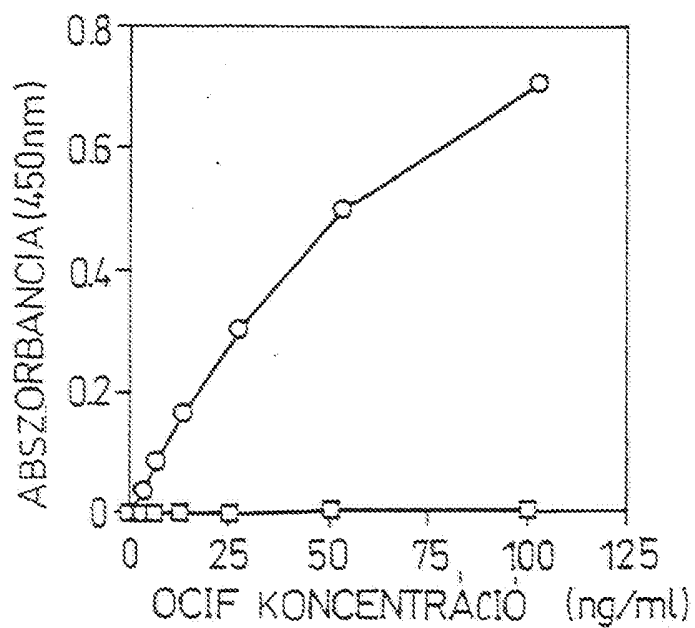


FIG.16



9/17

FIG. 17

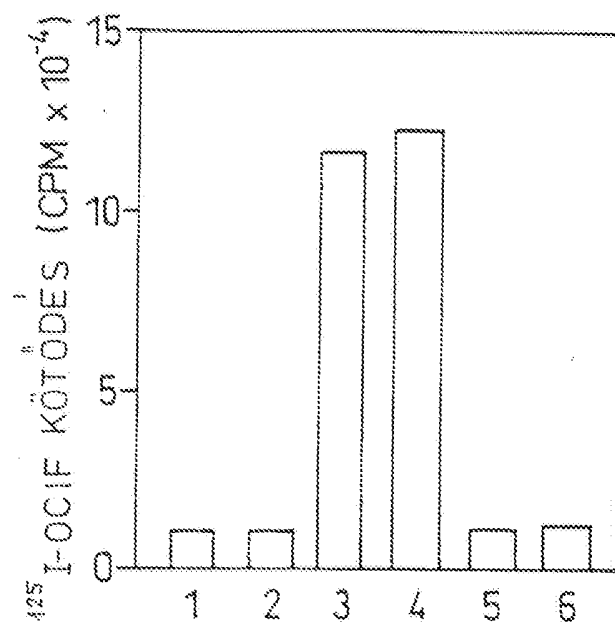


FIG. 18

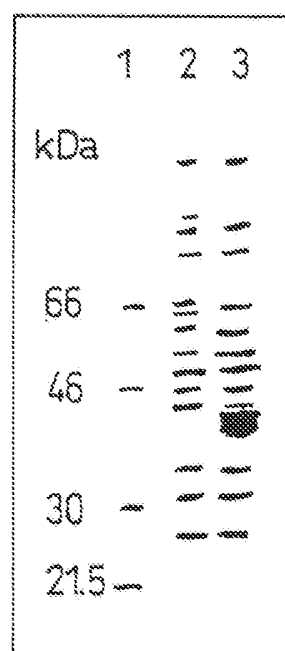


FIG.19

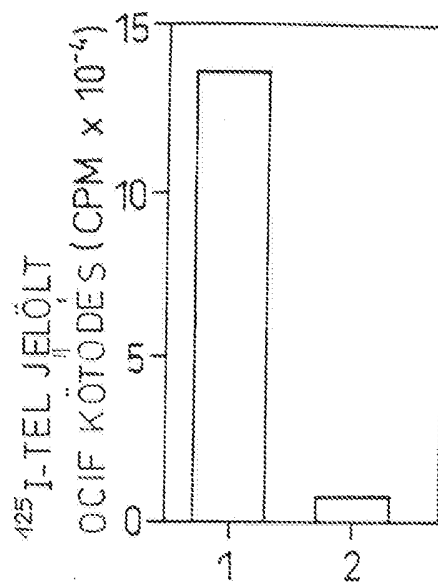
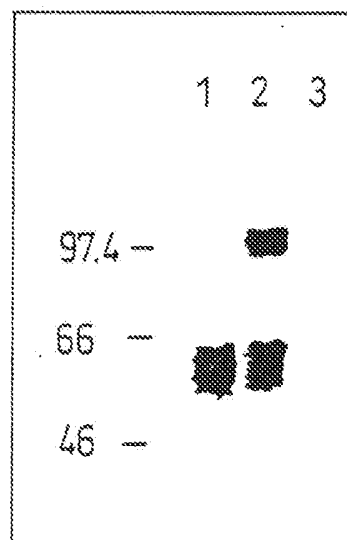


FIG.20



11 / 17

FIG. 21

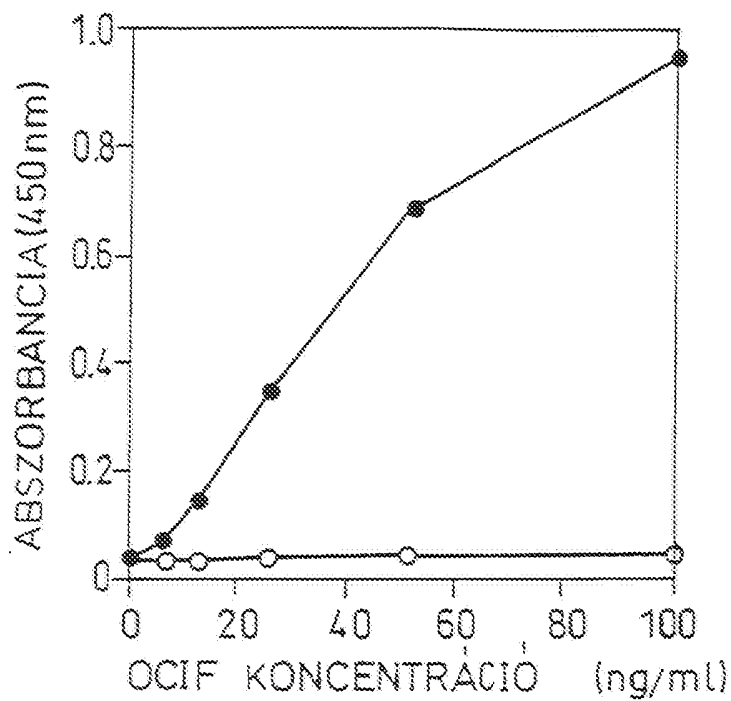


FIG. 22

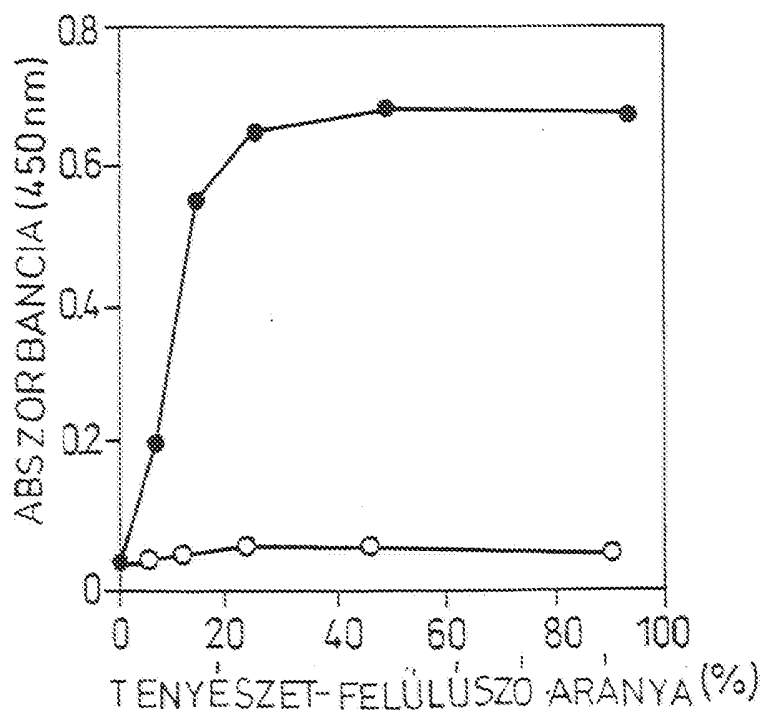


FIG. 23

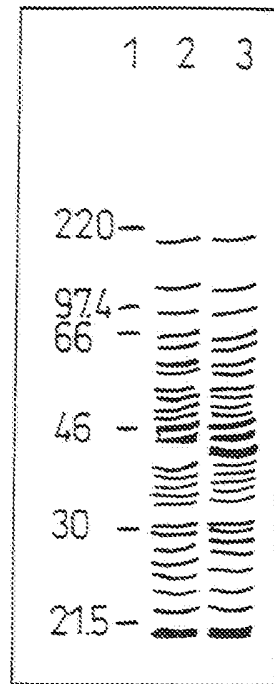


FIG. 24

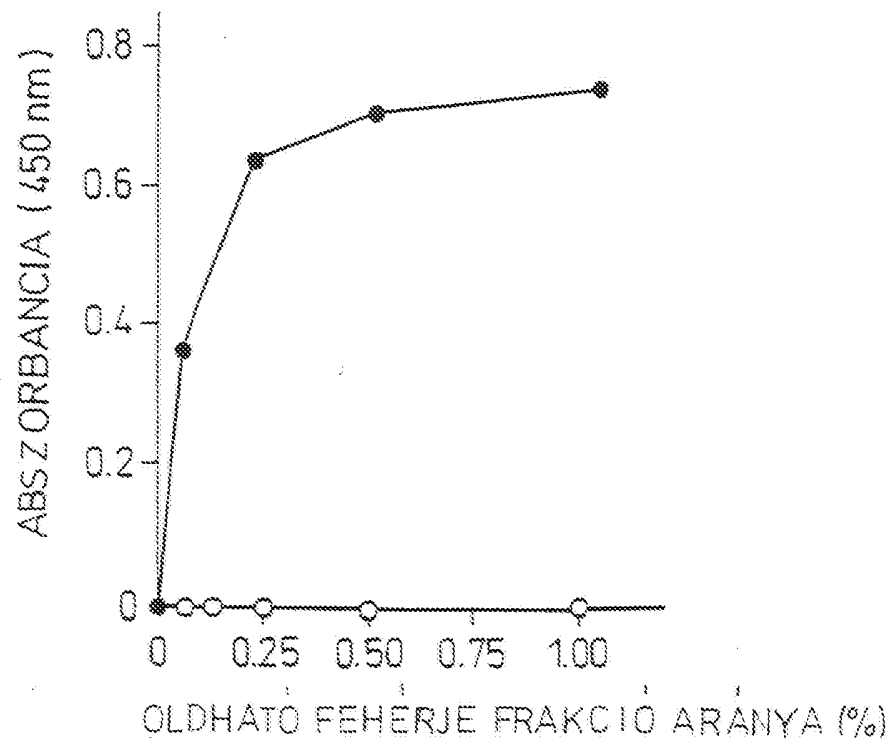


FIG. 25

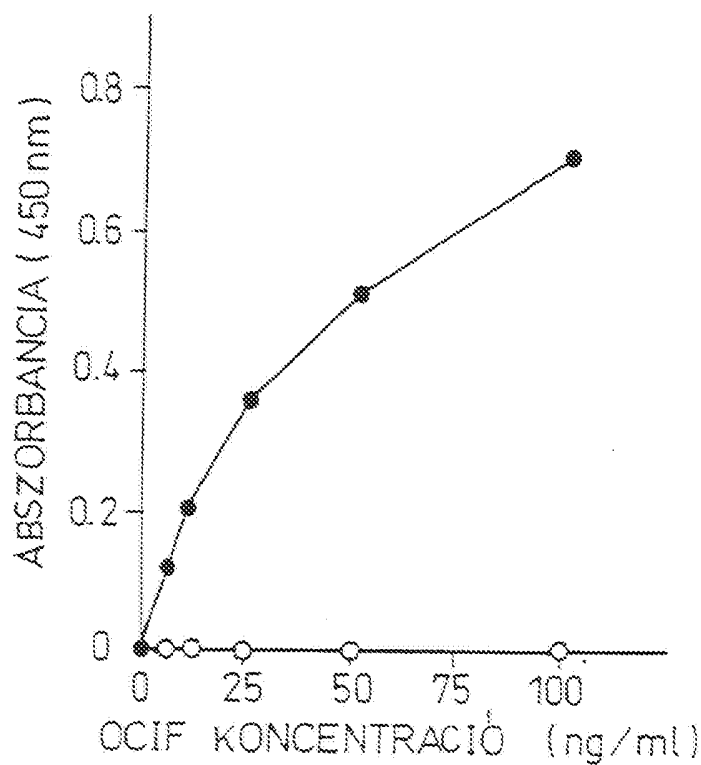


FIG. 26

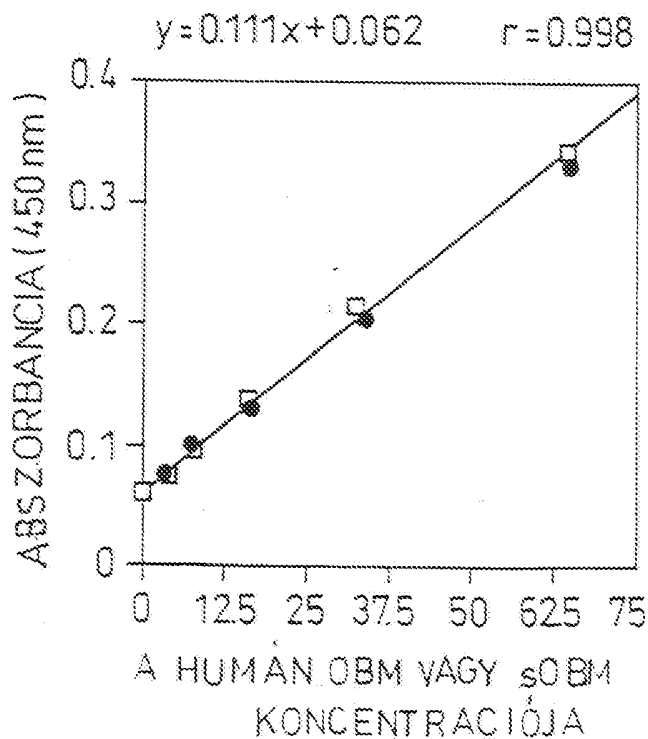


FIG. 27

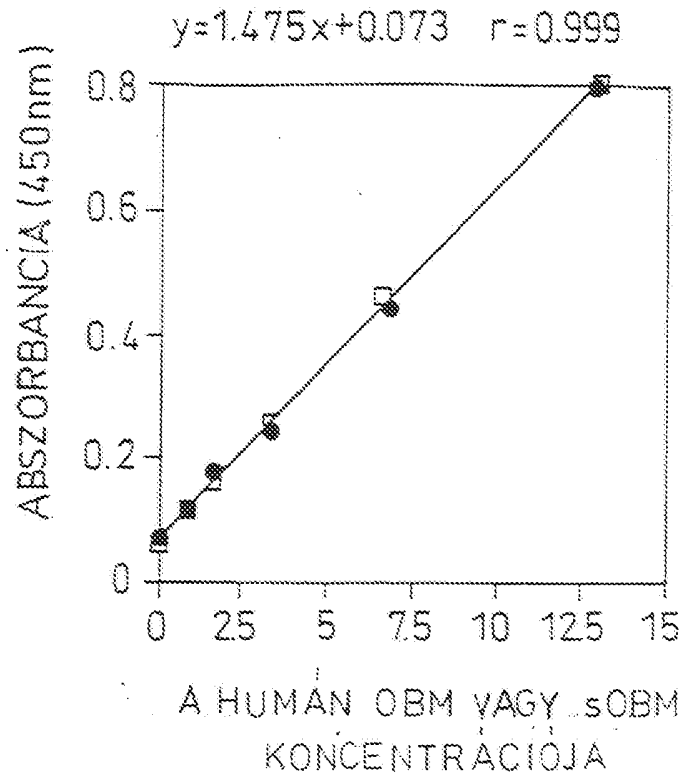


FIG. 28

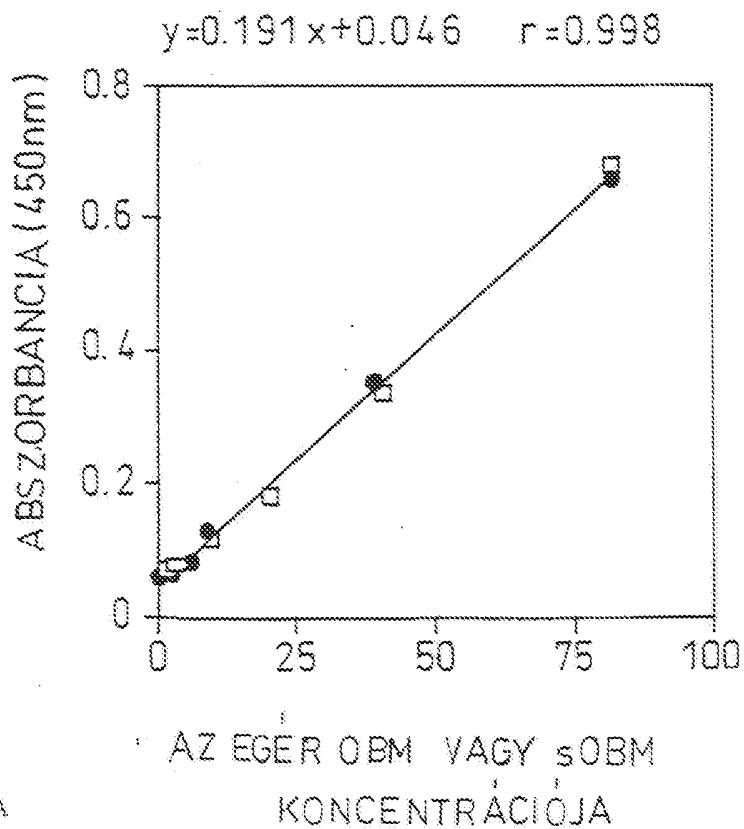


FIG. 29

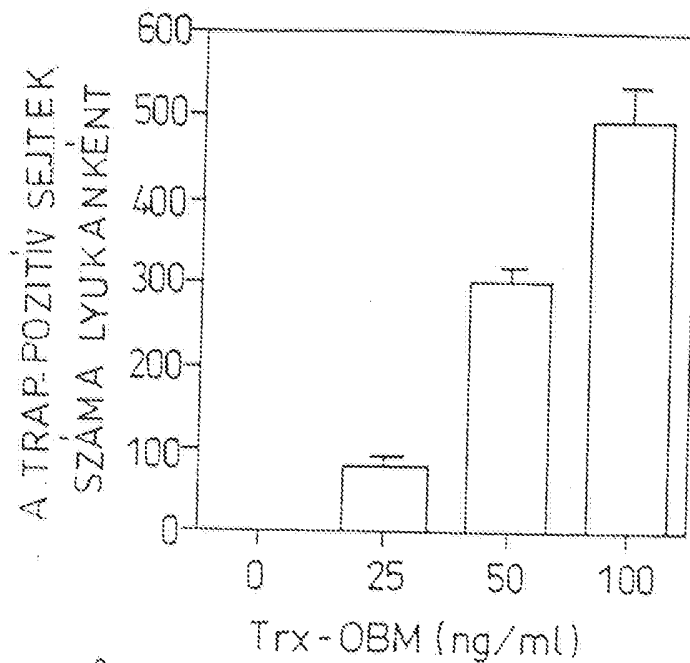


FIG. 30

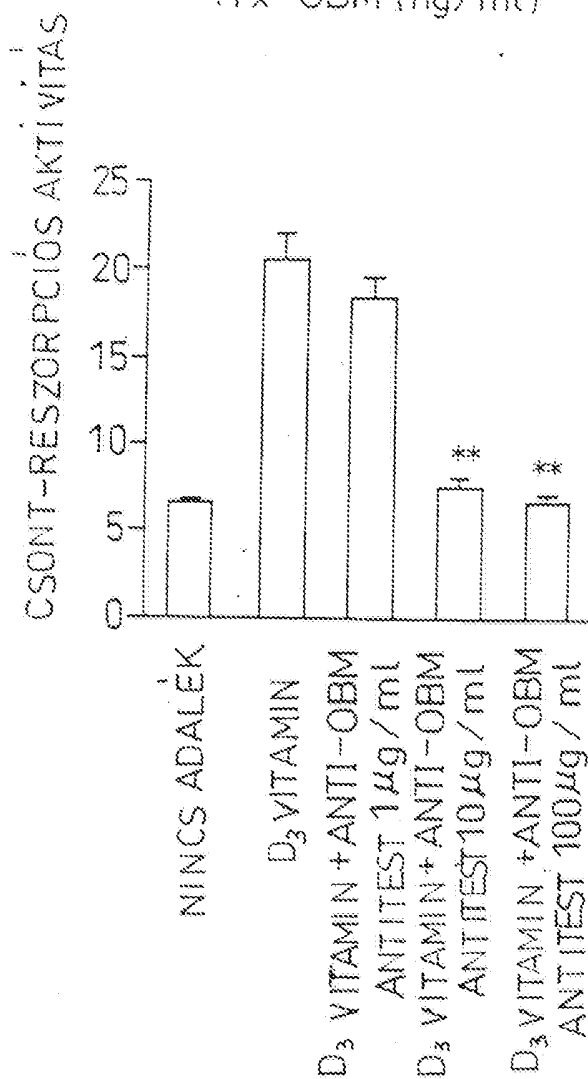


FIG. 31

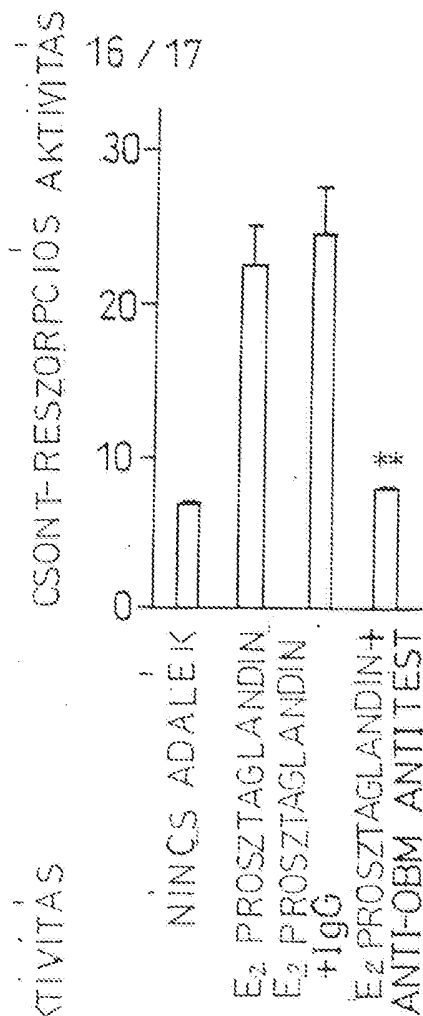


FIG. 32

