



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1133558 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/12 (2006.01) **C07K 14/51** (2006.01)
C07K 14/495 (2006.01) **C12N 15/63** (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) **C07K 16/22** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) **C12N 15/62** (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01) **A61P 19/10** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) **A01K 67/27** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1999.11.24**

(30) Prioridade(s): **1998.11.27 US 110283**

(43) Data de publicação do pedido: **2001.09.19**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.09.06**
001/2007

(73) Titular(es):

UCB, S.A.

ALLÉE DE LA RECHERCHE 60 1070
BRUXELLES

BE

(72) Inventor(es):

JEFFREY VAN NESS
MARY, E. BRUNKOW
DAVID, J. GALAS
BRIAN KOVACEVICH
JOHN, T. MULLIGAN

US
US
US
US
US

(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
R DAS FLORES 74 4 AND 1249-235 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA AUMENTAR A MINERALIZAÇÃO ÓSSEA**

(57) Resumo:

RESUMO

"Composições e métodos para aumentar a mineralização óssea"

É divulgada uma nova classe ou família de proteínas de ligação a TGF- β . São também divulgados ensaios para seleccionar moléculas para aumentar a mineralização óssea e métodos para utilização de tais moléculas.

Esqueleto de Cisteínas Comum

i	50
gremlin-humana.pro	
corbavirus-humana.pro	
dan-humana.pro	
boer-humana.pro	
81	306
gremlin-humana.pro	
corbavirus-humana.pro	
dan-humana.pro	
boer-humana.pro	
101	350
gremlin-humana.pro	
corbavirus-humana.pro	
dan-humana.pro	
boer-humana.pro	
151	396
gremlin-humana.pro	
corbavirus-humana.pro	
dan-humana.pro	
boer-humana.pro	
201	398
gremlin-humana.pro	
corbavirus-humana.pro	
dan-humana.pro	
boer-humana.pro	
251	398
gremlin-humana.pro	
corbavirus-humana.pro	
dan-humana.pro	
boer-humana.pro	
301	398
gremlin-humana.pro	
corbavirus-humana.pro	
dan-humana.pro	
boer-humana.pro	
351	398
gremlin-humana.pro	
corbavirus-humana.pro	
dan-humana.pro	
boer-humana.pro	

DESCRIÇÃO

"Composições e métodos para aumentar a mineralização óssea"

CAMPO TÉCNICO

O presente invento refere-se geralmente a produtos e métodos farmacêuticos e, mais especificamente, ao fabrico de medicamentos e composições adequados para aumentar o teor mineral dos ossos. Tais composições e medicamentos podem ser utilizados para tratar uma ampla variedade de condições, incluindo por exemplo, osteopenia, osteoporose, fracturas e outros distúrbios em que uma baixa densidade mineral óssea seja a principal característica da doença.

ANTECEDENTES DO INVENTO

Ao longo da vida de um indivíduo ocorrem duas ou três fases distintas de mudanças da massa óssea (ver Riggs, *West. J. Med.* 154: 63-77, 1991). A primeira fase ocorre tanto nos homens como nas mulheres, e prossegue até ser alcançado um pico de massa óssea. Esta primeira fase é conseguida através de crescimento linear das placas de crescimento endocondrais, e de crescimento radial devido a uma taxa de aposição periosteal. A segunda fase começa por volta dos 30 anos de idade para o osso trabecular (ossos planos tais como as vértebras e o pélvis) e por volta dos 40 anos para o osso cortical (p. ex., ossos longos que se encontram nos membros) e continua até uma idade avançada. Esta fase caracteriza-se pela perda lenta de osso e ocorre tanto nos homens como nas mulheres. Nas mulheres, ocorre também uma terceira fase de perda óssea, muito provavelmente devido às deficiências de estrogénio pós-menopausa. Só durante esta fase, as mulheres podem perder mais 10% de massa óssea do osso cortical e 25% do compartimento trabecular (ver Riggs, *supra*).

A perda de teor mineral ósseo pode ser causada por uma ampla variedade de condições e pode resultar em problemas médicos significativos. Por exemplo, a osteoporose é uma doença debilitante nos seres humanos caracterizada por marcadas diminuições na massa e na densidade mineral dos ossos esqueléticos, deterioração estrutural do osso incluindo

degradação da micro-arquitetura óssea e aumentos correspondentes na fragilidade óssea e susceptibilidade a fractura em indivíduos afligidos. A osteoporose nos seres humanos é precedida de osteopenia clínica (densidade mineral óssea que é maior que um desvio padrão mas menor que 2,5 desvios padrão abaixo do valor médio para osso de adulto jovem), uma condição verificada em aproximadamente 25 milhões de pessoas nos Estados Unidos. Outros 7-8 milhões de pacientes nos Estados Unidos foram diagnosticados com osteoporose clínica (definida como teor mineral ósseo superior a 2,5 desvios padrão abaixo do do osso maduro de adulto jovem). A osteoporose é uma das doenças mais caras para o sistema de cuidados de saúde, custando dezenas de bilhões de dólares anualmente nos Estados Unidos. Além dos custos relacionados com os cuidados de saúde, o cuidado residencial a longo prazo e os dias de trabalho perdidos adicionam-se aos custos financeiros e sociais desta doença. Por todo o mundo aproximadamente 75 milhões de pessoas estão em risco de osteoporose.

A frequência da osteoporose na população humana aumenta com a idade, e entre os caucasianos é predominante nas mulheres (que constituem 80% do banco de pacientes de osteoporose nos Estados Unidos). A maior fragilidade e susceptibilidade à fractura dos ossos esqueléticos nos idosos são agravadas pelo maior risco de quedas acidentais nesta população. Mais de 1,5 milhões de fracturas ósseas relacionadas com osteoporose são relatadas nos Estados Unidos todos os anos. Ancas, pulsos e vértebras fracturados estão entre os ferimentos mais comuns associados a osteoporose. Em particular, as fracturas da anca são extremamente incómodas e dispendiosas para o paciente, e para as mulheres correlacionam-se com taxas elevadas de mortalidade e morbilidade.

Embora a osteoporose tenha sido definida como um aumento no risco de fractura devido a menor massa óssea, nenhum dos tratamentos presentemente disponíveis para distúrbios esqueléticos pode aumentar substancialmente a densidade óssea de adultos. Há uma percepção forte entre todos os médicos de que são necessários fármacos que possam aumentar a densidade óssea nos adultos, particularmente nos ossos do pulso, da

coluna vertebral e da anca que estejam em risco em osteopenia e em osteoporose.

As estratégias actuais para a prevenção de osteoporose podem oferecer algum benefício aos indivíduos mas não podem assegurar a resolução da doença. Estas estratégias incluem a moderação da actividade física (particularmente em actividades de transporte de pesos) com o início da idade avançada, a inclusão do cálcio adequado na dieta, e o evitar o consumo de produtos que contenham álcool ou tabaco. Para pacientes que se apresentem com osteopenia ou osteoporose clínicas, todos os fármacos e estratégias terapêuticos actuais são dirigidos à redução de mais perda da massa óssea através da inibição do processo de absorção óssea, um componente natural do processo de remodelação óssea que ocorre constitutivamente.

Por exemplo, o estrogénio é agora prescrito para retardar a perda de osso. Há, no entanto, alguma controvérsia sobre se há qualquer benefício a longo prazo para os pacientes e se há algum efeito de todo em pacientes com mais de 75 anos de idade. Para além disso, crê-se que a utilização de estrogénio aumenta o risco de cancro da mama e do endométrio.

Doses elevadas de cálcio dietético, com ou sem vitamina D, foram também sugeridas para mulheres pós-menopausa. No entanto, doses elevadas de cálcio podem frequentemente ter efeitos secundários gastrointestinais desagradáveis e os níveis séricos e urinários de cálcio devem ser monitorizados continuamente (ver Khosla e Riggs, *Mayo Clin. Proc.* 70: 978-982, 1995).

Outros agentes terapêuticos que foram sugeridos incluem a calcitonina, os bisfosfonatos, os esteróides anabólicos e o fluoreto do sódio. No entanto, tais agentes terapêuticos têm efeitos secundários indesejáveis (p. ex., a calcitonina e os esteróides podem causar náuseas e provocar uma reacção imunitária, os bisfosfonatos e o fluoreto de sódio podem inibir a reparação de fracturas, mesmo aumentando modestamente a densidade óssea) que podem impedir a sua utilização (ver Khosla e Riggs, *supra*).

As entradas da base de dados EMBL AA393939 e AI11311 referem-se a Pedacos de Sequências Expressas (EST, do inglês "Expressed Sequence Tags") para as quais não está indicada qualquer função.

Nenhuma estratégia terapêutica presentemente praticada envolve um fármaco que estimule ou aumente o crescimento de nova massa óssea. O presente invento proporciona composições e o fabrico de medicamentos que podem ser utilizados para aumentar a mineralização óssea, e podem assim ser utilizados para tratar uma ampla variedade de condições onde se deseje aumentar a massa óssea. Mais, o presente invento proporciona outras vantagens relacionadas.

SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento proporciona uma nova classe ou família de proteínas de ligação a TGF-beta, assim como ensaios para seleccionar compostos que aumentem o teor mineral ósseo e a densidade mineral óssea, e utilização de tais compostos no fabrico dos medicamentos para o tratamento ou a prevenção de uma ampla variedade de condições.

O presente invento proporciona um ácido nucleico isolado seleccionado de entre o grupo que consiste em:

(a) uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo a sequência ID NO: 1, 5, 9, 11, 13 ou 15, ou uma sequência complementar destas;

(b) uma molécula de ácido nucleico isolada que hibrida especificamente com a molécula de ácido nucleico de (a) sob condições de elevado rigor onde a hibridação é efectuada em SSPE 5×, solução de Denhardt 5× e SDS a 0,5% de um dia para o outro a 55 a 60°C; e

(c) um ácido nucleico isolado que codifica uma proteína de ligação a TGF-beta de acordo com (a) e (b); onde o ácido nucleico não é o ácido nucleico de nenhum dos números de acesso da base de dados EMBL AC003098, AA393939 e AI113131.

Dentro de aspectos relacionados do presente invento, as moléculas de ácido nucleico isoladas são proporcionadas com base na hibridação com apenas uma porção de uma das

sequências acima identificadas (p. ex., para (a) a hibridação pode ser com uma sonda com pelo menos 20, 25, 50 ou 100 nucleótidos seleccionados de entre os nucleótidos 156 a 539 ou 555 a 687 da Sequência ID NO: 1). Como deve ser facilmente evidente, o rigor necessário a utilizar para a hibridação pode variar com base no tamanho da sonda. Por exemplo, para uma sonda 25-mero condições de elevado rigor poderiam incluir Tris 60 mM, pH 8,0, EDTA 2 mM, solução de Denhardt 5×, SSC 6×, N-laurilsarcosina a 0,1% (p/v), NP-40 (Nonidet P-40) a 0,5% (p/v) de um dia para o outro a 45 graus C, seguido de duas lavagens com SSC 0,2×/SDS a 0,1% a 45-50 graus. Para uma sonda 100-mero sob condições de baixo rigor, condições adequadas podem incluir o seguinte: SSPE 5×, solução de Denhardt 5× e SDS a 0,5% de um dia para o outro a 42-50 graus, seguido de duas lavagens com SSPE 2× (ou SSC 2×)/SDS a 0,1% a 42-50 graus.

São proporcionadas moléculas isoladas de ácido nucleico que têm homologia com as Sequências ID Nos: 1, 5, 7, 9, 11, 13 ou 15, a um nível de 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95% ou 98% de homologia utilizando um algoritmo de Wilbur-Lipman. Exemplos representativos de tais moléculas isoladas incluem, por exemplo, moléculas de ácido nucleico que codificam uma proteína compreendendo as Sequências ID Nos: 2, 6, 10, 12, 14 ou 16, ou possuindo homologia com estas sequências a um nível de 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95% ou 98% de homologia utilizando um algoritmo de Lipman-Pearson.

As moléculas de ácido nucleico isoladas têm tipicamente menos de 100 kb de tamanho, e, em certas concretizações, menos de 50 kb, 25 kb, 10 kb ou mesmo 5 kb de tamanho. Ainda, as moléculas de ácido nucleico isoladas, noutras concretizações, não existem numa "biblioteca" de outras moléculas de ácido nucleico não relacionadas (p. ex., um subclone BAC tal como descrito no N° de Acesso GenBank AC003098 e EMB N° AQ171546). No entanto, as moléculas de ácido nucleico isoladas podem ser encontradas em bibliotecas de moléculas relacionadas (p. ex., para recuperação, tal como é descrito nas Patentes U.S. N^{os} 5837458, 5830721 e 5811238). Finalmente, as moléculas de ácido nucleico isoladas tal como aqui descritas não incluem moléculas de ácido nucleico que

codificam Dan, Cerberus, Gremlin ou SCGF (Patente U.S. N° 5780263).

São também proporcionados pelo presente invento vectores de clonagem que contêm as moléculas de ácido nucleico acima observadas, e vectores de expressão que compreendem um promotor (p. ex., uma sequência reguladora) operativamente ligado a uma das moléculas de ácido nucleico acima observadas. Exemplos representativos de promotores adequados incluem promotores específicos de tecidos e promotores baseados em vírus (p. ex., promotores baseados em CMV tais como o promotor I-E de CMV, o promotor inicial de SV40 e a LTR de MuLV). Os vectores de expressão podem também ser baseados, ou ser derivados de vírus (p. ex., um "vector viral"). Exemplos representativos de vectores virais incluem vectores virais de herpes simples, vectores adenovirais, vectores viral associados a adenovírus e vectores retrovirais. São também proporcionadas células hospedeiras contendo ou compreendendo qualquer um dos vectores acima observados (incluindo, por exemplo, células hospedeiras de origem humana, de macaco, cão, rato, ou ratinho).

Noutros aspectos do presente invento são proporcionados métodos de produção de proteínas de ligação a TGF-beta, compreendendo o passo de cultura da célula hospedeira acima mencionada contendo o vector sob condições e durante um tempo suficiente para produzir a proteína de ligação a TGF-beta. Noutras concretizações, a proteína produzida através deste método pode ser mais purificada (p. ex., através de cromatografia de coluna, purificação de afinidade, e semelhantes). Assim, as proteínas isoladas que são codificadas pelas moléculas de ácido nucleico acima observadas (p. ex., Sequências ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 ou 16) podem ser facilmente produzidas dada a divulgação do presente pedido.

Deve-se também observar que as proteínas acima mencionadas, ou fragmentos destas, podem ser produzidas como proteínas de fusão. Por exemplo, num aspecto as proteínas de fusão são proporcionadas compreendendo um primeiro segmento polipeptídico compreendendo uma proteína de ligação a TGF-beta codificada por uma molécula de ácido nucleico tal como

descrita acima, ou uma porção desta de pelo menos 10, 20, 30, 50 ou 100 aminoácidos de comprimento, e um segundo segmento polipeptídico compreendendo uma proteína de não ligação a TGF-beta. Em certas concretizações, o segundo polipéptido pode ser uma etiqueta adequada para purificação ou reconhecimento (p. ex., um polipéptido compreendendo múltiplos resíduos de aminoácidos aniônicos - ver Patente U.S. N° 4851341), um marcador (p. ex., proteína fluorescente verde ou fosfatase alcalina) ou uma molécula tóxica (p. ex., rícino).

Noutro aspecto do presente invento, são proporcionados anticorpos que são capazes de se ligar especificamente à classe acima descrita de proteínas de ligação a TGF-beta (p. ex., BEER humana). Nas várias concretizações, o anticorpo pode ser um anticorpo policlonal ou um anticorpo monoclonal (p. ex., de origem humana ou de murídeo). Noutras concretizações, o anticorpo é um fragmento de um anticorpo que mantém as características de ligação de um anticorpo inteiro (p. ex., um fragmento $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab', Fab ou Fv, ou mesmo uma CDR). São também proporcionados hibridomas e outras células que são capazes de produzir ou expressar os anticorpos acima mencionados.

Dentro de aspectos relacionados com o presente invento, são proporcionados métodos que detectam uma proteína de ligação a TGF-beta, compreendendo os passos de incubação de um anticorpo tal como descrito acima sob condições e durante um tempo suficiente para permitir que o referido anticorpo se ligue a uma proteína de ligação a TGF-beta, e de detecção da ligação. Em várias concretizações o anticorpo pode ser ligado a um suporte sólido para facilitar a lavagem ou a separação, e/ou ser marcado (p. ex., com um marcador seleccionado a partir do grupo que consiste em enzimas, proteínas fluorescentes e radioisótopos).

Noutros aspectos do presente invento, são proporcionados oligonucleótidos isolados que hibridam com uma molécula de ácido nucleico de acordo com as Sequências ID Nos: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 ou 18 ou o complemento destas, sob condições de elevado rigor. Noutras concretizações, o oligonucleótido pode ser verificado na sequência que codifica

as Sequências ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 ou 16. Em certas concretizações, o oligonucleótido tem pelo menos 15, 20, 30, 50 ou 100 nucleótidos de comprimento. Noutras concretizações, o oligonucleótido é marcado com outra molécula (p. ex., uma enzima, uma molécula fluorescente ou um radioisótopo). São também proporcionados iniciadores que são capazes de amplificar especificamente toda ou uma porção das moléculas de ácido nucleico acima mencionadas que codificam proteínas de ligação a TGF-beta. Tal como aqui utilizado, o termo "que amplifica especificamente" deve ser entendido como referindo-se a iniciadores que amplificam as proteínas de ligação a TGF-beta acima mencionadas, e não outras proteínas de ligação a TGF-beta tais como Dan, Cerberus, Gremlin, ou SCGF (Patente U.S. N° 5780263).

Em aspectos relacionados do presente invento, são proporcionados métodos para detecção de uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína de ligação a TGF-beta, compreendendo os passos de incubação de um oligonucleótido tal como descrito acima sob condições de elevado rigor, e detecção da hibridação do referido oligonucleótido. Em certas concretizações, o oligonucleótido pode ser marcado e/ou ligado a um suporte sólido.

Noutros aspectos do presente invento, são proporcionadas ribozimas que são capazes de clivar ARN que codifica uma das proteínas de ligação a TGF-beta acima mencionadas (p. ex., as Sequências ID Nos: 2, 6, 8, 10, 12, 14 ou 16). Tais ribozimas podem ser constituídas por ADN, ARN (incluindo ácido 2'-O-metil-ribonucleico), análogos de ácidos nucleicos (p. ex., ácidos nucleicos possuindo ligações fosforotioato) ou misturas destes. São também proporcionadas moléculas de ácido nucleico (p. ex., ADN ou ADNc) que codificam estas ribozimas e vectores que são capazes de expressar ou produzir as ribozimas. Exemplos representativos de vectores incluem plasmídeos, retrotransposições, cosmídeos e vectores baseados em vírus (p. ex., vectores virais gerados pelo menos em parte a partir de um retrovírus, adenovírus ou vírus adeno-associado). São também proporcionadas células hospedeiras (p. ex., células humanas, de cão, de rato ou de ratinho) que contêm estes vectores. Em certas concretizações, a célula hospedeira pode ser estavelmente transformada com o vector.

Noutros aspectos do presente invento, são proporcionados métodos para produção de ribozimas sinteticamente ou através de transcrição *in vitro* ou *in vivo*. Noutras concretizações, as ribozimas assim produzidas podem ser ainda purificadas e/ou formuladas em composições farmacêuticas (p. ex., a ribozima ou molécula de ácido nucleico codificando a ribozima juntamente com um transportador ou diluente farmacêuticamente aceitável). Semelhantemente, os oligonucleótidos anti-sentido e anticorpos ou outras moléculas seleccionadas aqui descritos podem ser formulados em composições farmacêuticas.

Noutros aspectos do presente invento, são proporcionados oligonucleótidos anti-sentido compreendendo uma molécula de ácido nucleico que hibrida com uma molécula de ácido nucleico de acordo com as Sequências ID Nos: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 ou 15, ou o complemento destas, e em que o referido oligonucleótido inibe a expressão de uma proteína de ligação a TGF-beta tal como aqui descrito (p. ex., BEER humana). Em várias concretizações, o oligonucleótido tem 15, 20, 25, 30, 35, 40 ou 50 nucleótidos de comprimento. De preferência, o oligonucleótido tem menos de 100, 75 ou 60 nucleótidos de comprimento. Tal como deve ser facilmente evidente, o oligonucleótido pode ser constituído por um ou mais análogos de ácidos nucleicos, ácidos ribonucleicos ou ácidos desoxirribonucleicos. Mais, o oligonucleótido pode ser modificado através de uma ou mais ligações, incluindo por exemplo, uma ligação covalente tal como uma ligação fosforotioato, uma ligação fosfotriéster, uma ligação metilfosfonato, uma ligação metileno(metilimino), uma ligação morfolino, uma ligação amida, uma ligação poliamida, uma ligação inter-açúcares alquilo de cadeia curta, uma ligação inter-açúcares cicloalquilo, uma ligação inter-açúcares heteroatómica de cadeia curta e uma ligação inter-açúcares heterocíclica. Um exemplo representativo de um oligonucleótido quimérico é proporcionado na Patente US N° 5989912.

Ainda outro aspecto do presente invento proporciona a utilização de uma ribozima tal como descrita acima no fabrico de um medicamento para aumentar a mineralização óssea num animal de sangue quente onde o medicamento introduz uma quantidade eficaz de ribozima no animal. Em aspectos

relacionados, tais medicamentos introduzem num paciente uma quantidade eficaz da molécula de ácido nucleico ou vector tal como aqui descrito que é capaz de produzir a ribozima desejada, com o medicamento a ser introduzido sob condições que favoreçam a transcrição da molécula de ácido nucleico para produzir a ribozima.

Noutros aspectos do presente invento são proporcionados animais transgénicos não humanos. Numa concretização é proporcionado um animal transgénico cujas células da linha germinativa e células somáticas contêm uma molécula de ácido nucleico codificando uma proteína de ligação a TGF-beta tal como descrito acima que está operativamente ligada a um promotor eficaz para a expressão do gene, sendo o gene introduzido no animal ou num ancestral do animal, num estágio embrionário, com a condição de que o referido animal não seja humano. Noutras concretizações, são proporcionados animais transgénicos "knockout", compreendendo um animal cujas células da linha germinativa e células somáticas compreendem uma destruição de pelo menos um alelo de uma molécula de ácido nucleico endógena que hibrida com uma molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína de ligação a TGF tal como aqui descrito, em que a destruição impede a transcrição de ARN mensageiro do referido alelo em comparação com um animal sem a destruição, com a condição de que o animal não seja um ser humano. Em várias concretizações, a destruição é uma deleção, substituição ou inserção de ácido nucleico. Noutras concretizações o animal transgénico é um ratinho, rato, ovelha, porco ou cão.

Noutros aspectos do presente invento, são proporcionados estojos para a detecção de expressão de uma proteína de ligação a TGF-beta, compreendendo um recipiente que compreende uma molécula de ácido nucleico, em que a molécula de ácido nucleico é seleccionada de entre o grupo que consiste em (a) uma molécula de ácido nucleico compreendendo a sequência nucleotídica de Sequências ID Nos: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 ou 15; (b) uma molécula de ácido nucleico compreendendo o complemento da sequência nucleotídica de (a); (c) uma molécula de ácido nucleico que seja um fragmento de (a) ou (b) com pelo menos 15, 20, 30, 50, 75 ou 100 nucleótidos de comprimento. São também proporcionados estojos

para a detecção de uma proteína de ligação a TGF-beta que compreendem um recipiente que compreende um dos anticorpos de proteínas de ligação a TGF-beta aqui descritos.

Por exemplo, num aspecto do presente invento são proporcionados métodos para determinação de se uma molécula seleccionada é capaz de aumentar o teor mineral ósseo, compreendendo os passos de (a) misturar uma ou mais moléculas candidatas com a proteína de ligação a TGF-beta codificada pela molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1 e um membro seleccionado da família de proteínas TGF-beta (p. ex., BMP 5 ou 6), (b) determinar se a molécula candidata altera a sinalização do membro da família TGF-beta, ou altera a ligação da proteína de ligação a TGF-beta ao membro da família TGF-beta. Em certas concretizações, a molécula altera a capacidade de TGF-beta funcionar como regulador positivo da diferenciação das células do mesênquima. Neste aspecto do presente invento, a(s) molécula(s) candidata(s) pode(m) alterar a sinalização ou a ligação, por exemplo, através da diminuição (p. ex., inibindo) ou do aumento (p. ex., estimulando) a sinalização ou a ligação.

Ainda noutro aspecto, são proporcionados métodos para determinar se uma molécula seleccionada é capaz de aumentar o teor mineral ósseo, compreendendo o passo de determinação de se uma molécula seleccionada inibe a ligação da proteína de ligação a TGF-beta a osso, ou a um análogo deste. Exemplos representativos de osso ou análogos deste incluem hidroxiapatite e amostras de osso humano primário obtidas através de biopsia.

Em certas concretizações dos métodos acima citados, a molécula seleccionada está contida numa mistura de moléculas e os métodos podem ainda compreender o passo de isolamento de uma ou mais moléculas que sejam funcionais no ensaio. Ainda noutras concretizações, a família de proteínas TGF-beta é ligada a um suporte sólido e é medida a ligação da proteína de ligação a TGF-beta ou as proteínas de ligação a TGF-beta são ligadas a um suporte sólido e é medida a ligação das proteínas TGF-beta.

Utilizando métodos tais como os descritos acima, pode ser ensaiada uma ampla variedade de moléculas quanto à sua capacidade para aumentar o teor mineral ósseo através da inibição da ligação da proteína de ligação a TGF-beta à família de proteínas TGF-beta. Exemplos representativos de tais moléculas incluem proteínas ou péptidos, moléculas orgânicas e moléculas de ácido nucleico.

Noutros aspectos relacionados o presente invento proporciona a utilização de uma molécula identificada a partir dos ensaios aqui citados no fabrico de um medicamento para aumentar o teor mineral ósseo num animal de sangue quente onde os medicamentos administram a um animal sangue quente uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma molécula identificada a partir dos ensaios aqui citados. Noutro aspecto, o presente invento proporciona a utilização de uma molécula que inibe a ligação da proteína de ligação a TGF-beta à superfamília de proteínas TGF-beta, incluindo proteínas morfogénicas do osso (BMP), no fabrico de um medicamento para aumentar o teor mineral ósseo num animal de sangue quente. Os medicamentos proporcionam uma quantidade terapeuticamente eficaz da molécula. Exemplos representativos de moléculas adequadas incluem moléculas anti-sentido, ribozimas, genes de ribozimas e anticorpos (p. ex., um anticorpo humanizado) que reconheçam especificamente e alteram a actividade da proteína de ligação a TGF-beta.

Noutro aspecto o presente invento proporciona a utilização de células que se alojam no osso e que tiveram introduzido nelas um vector que dirige a expressão de uma molécula que inibe a ligação da proteína de ligação a TGF-beta à família de proteínas TGF-beta e proteínas morfogénicas do osso (BMP), no fabrico de um medicamento para aumentar o teor mineral ósseo num animal de sangue quente. Tal como aqui se utiliza, deve entender-se células "que se alojam no osso" se se localizarem dentro da matriz óssea após administração periférica. Numa concretização, o presente invento compreende ainda, antes do passo de introdução, o isolando de células da medula óssea que se alojem no osso. Noutra concretização, as células que se alojam no osso são seleccionadas a partir do grupo que consiste em células CD34+ e osteoblastos.

Noutros aspectos do presente invento, são proporcionadas moléculas (de preferência isoladas) que inibem a ligação da proteína de ligação a TGF-beta à superfamília de proteínas TGF-beta.

Noutras concretizações, as moléculas podem ser proporcionadas como uma composição, e podem ainda compreender um inibidor da reabsorção óssea. Exemplos representativos de tais inibidores incluem a calcitonina, o estrogénio, um bisfosfonato, um factor de crescimento possuindo actividade anti-reabsorção e tamoxifeno.

Exemplos representativos de moléculas que podem ser utilizadas nos contextos terapêuticos acima mencionados incluem, p. ex., ribozimas, genes de ribozimas, moléculas anti-sentido e/ou anticorpos (p. ex., anticorpos humanizados). Tais moléculas podem, dependendo da sua selecção, ser utilizadas para alterar, antagonizar ou agonizar a sinalização ou a ligação de um membro da família de proteínas de ligação a TGF-beta tal como aqui descrito.

Com várias concretizações do presente invento, as moléculas e os medicamentos acima descritos para tratamento ou prevenção podem ser utilizados em condições tais como osteoporose, osteomalacia, doença periodontal, escorbuto, Doença de Cushing, fractura óssea e condições devidas à imobilização de membros e utilização de esteróides.

Estes e outros aspectos do presente invento tornar-se-ão evidentes após referência à seguinte descrição detalhada e aos desenhos anexos. Adicionalmente, são aqui expostas várias referências que descrevem mais detalhadamente certos procedimentos ou composições (p. ex., plasmídeos, etc.).

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 é uma ilustração esquemática que compara a sequência de aminoácidos de Dan Humana, Gremlin Humana, Cerberus Humana e Beer Humana. As setas indicam o esqueleto de Cisteínas.

A Figura 2 resume os resultados obtidos a partir da sondagem de uma variedade de tecidos humanos quanto à expressão de um gene de uma proteína de ligação a TGF-beta, especificamente o gene da Beer Humana. Um procedimento semi-quantitativo de Transcrição Reversa-Reacção em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) foi utilizado para amplificar uma porção do gene a partir da primeira cadeia de ADNc sintetizada a partir de ARN total (descrito mais detalhadamente no EXEMPLO 2A).

A Figura 3 resume os resultados obtidos da hibridação *in situ* do ARN de secções de embrião de ratinho, utilizando uma sonda de ARNc que é complementar ao transcrito de Beer de ratinho (descrito mais detalhadamente no EXEMPLO 2B). O painel A é uma secção transversal de um embrião 10,5 dpc. O painel B é uma secção sagital de um embrião 12,5 dpc e os painéis C e D são secções sagitais de embriões 15,5 dpc.

A Figura 4 ilustra, através de análise de "western blot", a especificidade de três anticorpos policlonais diferentes para os seus antígenos respectivos (descritos mais detalhadamente no EXEMPLO 4). A Figura 4A mostra a reactividade específica de um anticorpo anti-Beer H. para o antígeno Beer H., mas não para Dan H. ou Gremlin H. A Figura 4B mostra a reactividade de um anticorpo anti-Gremlin H. para o antígeno Gremlin H., mas não para Beer H. ou Dan H. A Figura 4C mostra a reactividade de um anticorpo anti-Dan H. para Dan H., mas não para Beer H. ou Gremlin H.

A Figura 5 ilustra, através de análise de "western blot", a selectividade da proteína de ligação a TGF-beta, Beer, para BMP-5 e BMP-6, mas não para BMP-4 (descrito mais detalhadamente no EXEMPLO 5).

A Figura 6 demonstra que a interacção iónica entre a proteína de ligação a TGF-beta, Beer, e BMP-5 tem uma constante de dissociação no intervalo de 15-30 nM.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

DEFINIÇÕES

Antes de expor o presente invento em detalhe, pode ser útil para uma compreensão deste expor definições de certos termos e listar e definir as abreviaturas que serão utilizadas daqui para a frente.

“Molécula” deve entender-se como incluindo proteínas ou péptidos (p. ex., anticorpos, parceiros de ligação recombinantes, péptidos com uma afinidade de ligação desejada), ácidos nucleicos (p. ex., ADN, ARN, moléculas de ácido nucleico quiméricas, e análogos de ácidos nucleicos tais como PNA); e compostos orgânicos ou inorgânicos.

“TGF-beta” deve entender-se como incluindo qualquer membro conhecido ou novo da superfamília TGF-beta, que inclui também proteínas morfogénicas do osso (BMP).

“Receptor de TGF-beta” deve entender-se como referindo-se ao receptor específico de um determinado membro da superfamília TGF-beta (incluindo proteínas morfogénicas do osso (BMP)).

“Proteína de ligação a TGF-beta” deve entender-se como referindo-se a uma proteína com afinidade de ligação específica para um determinado membro ou subconjunto de membros da superfamília TGF-beta (incluindo proteínas morfogénicas do osso (BMP)). Exemplos específicos de proteínas de ligação a TGF-beta incluem proteínas codificadas pelas Sequências ID Nos: 1, 5, 7, 9, 11, 13 e 15.

Inibir a “ligação da proteína de ligação a TGF-beta à família de proteínas TGF-beta e a proteínas morfogénicas do osso (BMP)” deve entender-se como referindo-se a moléculas que permitem a activação de TGF-beta ou de proteínas morfogénicas do osso (BMP), ou permitem a ligação de membros da família TGF-beta incluindo proteínas morfogénicas do osso (BMP) aos seus respectivos receptores, removendo ou impedindo a ligação de TGF-beta à proteína de ligação a TGF. Tal inibição pode ser alcançada, por exemplo, por moléculas que

inibam a ligação da proteína de ligação a TGF-beta a membros específicos da superfamília TGF-beta.

“Vector” refere-se a uma montagem que seja capaz de dirigir a expressão da proteína desejada. O vector tem de incluir elementos promotores da transcrição que estejam operativamente ligados ao(s) gene(s) de interesse. O vector pode ser composto por ácidos desoxirribonucleicos (“ADN”), ácidos ribonucleicos (“ARN”) ou uma combinação dos dois (p. ex., um ADN-ARN quimérico). Opcionalmente, o vector pode incluir uma sequência de poliadenilação, um ou mais locais de restrição, bem como um ou mais marcadores seleccionáveis tais como neomicina-fosfotransferase ou higromicina-fosfotransferase. Adicionalmente, dependendo da célula hospedeira escolhida e do vector empregue, podem também ser incorporados nos vectores aqui descritos outros elementos genéticos tais como uma origem de replicação, mais locais de restrição do ácido nucleico, estimuladores, sequências conferindo indutibilidade da transcrição e marcadores seleccionáveis.

Uma “molécula de ácido nucleico isolada” é uma molécula de ácido nucleico que não está integrada no ADN genómico de um organismo. Por exemplo, uma molécula de ADN que codifique uma proteína de ligação a TGF que tenha sido separada do ADN genómico de uma célula eucariótica é uma molécula de ADN isolada. Outro exemplo de uma molécula de ácido nucleico isolada é uma molécula de ácido nucleico sintetizada quimicamente que não esteja integrada no genoma de um organismo. A molécula de ácido nucleico isolada pode ser ADN genómico, ADNc, ARN ou composta pelo menos em parte por análogos de ácido nucleico.

Um “polipéptido isolado” é um polipéptido que está essencialmente livre de componentes celulares contaminantes, tais como hidratos de carbono, lípidos ou outras impurezas proteínáceas associadas ao polipéptido na natureza. Em certas concretizações, uma determinada preparação proteica contém um polipéptido isolado se este aparecer nominalmente como uma banda única num gel de SDS-PAGE com coloração de Azul de Coomassie. “Isolado” quando se refere a moléculas orgânicas significa que os compostos são mais de 90 por cento puros

utilizando métodos que são bem conhecidos na arte (p. ex., RMN, ponto de fusão).

“Esclerosteose”. A esclerosteose é um termo que foi aplicado por Hansen (1967) (Hansen, H.G., Sklerosteose, Em: Opitz, H., Schmid, F., “Handbuch der Kinderheilkunde”, Berlim: Springer (pub.) 6, 1967, págs. 351-355) a um distúrbio semelhante à hiperosteose cortical generalizada de van Buchem mas diferindo possivelmente no aspecto radiológico das alterações ósseas e na presença de sindactilia cutânea assimétrica dos dedos indicador e médio em muitos casos. A maxila tem uma aparência invulgarmente quadrada nesta condição.

“Anticorpos humanizados” são proteínas recombinantes em que as regiões determinantes de complementaridade de murídeo de anticorpos monoclonais foram transferidas das cadeias variáveis pesada e leve da imunoglobulina de murídeo para um domínio variável humano.

Tal como aqui se utiliza, “um fragmento de anticorpo” é uma porção de um anticorpo tal como $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab e semelhantes. Não obstante a estrutura, um fragmento de anticorpo liga-se ao mesmo antigénio que é reconhecido pelo anticorpo intacto. Por exemplo, um fragmento de anticorpo monoclonal anti-proteína de ligação a TGF-beta liga-se a um epítopo da proteína de ligação a TGF-beta.

O termo “fragmento de anticorpo” inclui também qualquer proteína sintética ou geneticamente modificada que actue como um anticorpo através da ligação a um antigénio específico para formar um complexo. Por exemplo, fragmentos de anticorpo incluem fragmentos isolados consistindo na região variável da cadeia leve, fragmentos “Fv” consistindo nas regiões variáveis das cadeias pesada e leve, moléculas polipeptídicas de cadeia simples recombinantes nas quais as regiões variáveis das cadeias pesada e leve são unidas por um ligante peptídico (“proteínas sFv”) e unidades mínimas de reconhecimento consistindo nos resíduos de aminoácidos que imitam a região hipervariável.

Um "marcador detectável" é uma molécula ou átomo que possa ser conjugado com uma porção de anticorpo para produzir uma molécula útil para diagnóstico. Exemplos de marcadores detectáveis incluem quelantes, agentes fotoactivos, radioisótopos, agentes fluorescentes, iões paramagnéticos, enzimas e outras porções marcadoras.

Tal como aqui se utiliza, um "imunoconjugado" é uma molécula compreendendo um anticorpo anti-proteína de ligação a TGF-beta, ou um fragmento de anticorpo, e um marcador detectável. Um imunoconjugado possui quase a mesma capacidade, ou uma capacidade apenas ligeiramente reduzida, para se ligar à proteína de ligação a TGF-beta após a conjugação como antes da conjugação.

Abreviaturas: TGF-beta - "Factor de Crescimento Transformante-beta"; TGF-bBP - "proteína de ligação ao Factor de Crescimento Transformante-beta" (uma TGF-bBP representativa é designada "Beer H."); BMP - "proteína morfogénica do osso"; PCR - "reacção em cadeia da polimerase"; RT-PCR - processo de PCR no qual o ARN é primeiro transcrito em ADN no primeiro passo utilizando a transcriptase reversa (RT); ADNc - qualquer ADN produzido através da cópia de uma sequência de ARN na forma de ADN.

Tal como acima observado, o presente invento proporciona uma nova classe de proteínas de ligação a TGF-beta, bem como medicamentos e composições para aumentar o teor mineral ósseo em animais de sangue quente. Resumidamente, os presentes inventos baseiam-se na descoberta inesperada de que uma mutação no gene que codifica um novo membro da família de proteínas de ligação a TGF-beta resulta numa condição rara (esclerosteose) caracterizada por teores minerais ósseos que são uma a quatro vezes superiores aos dos indivíduos normais. Assim, tal como discutido mais detalhadamente abaixo esta descoberta conduziu ao desenvolvimento de ensaios que podem ser utilizados para seleccionar moléculas que inibam a ligação da proteína de ligação a TGF-beta à família de proteínas TGF-beta e a proteínas morfogénicas do osso (BMP), e medicamentos utilizando tais moléculas para aumentar o teor mineral ósseo de animais de sangue quente (incluindo for exemplo, seres humanos).

DISCUSSÃO DA DOENÇA CONHECIDA POR ESCLEROSTEOSE

A esclerosteose é um termo que foi aplicado por Hansen (1967) (Hansen, H.G., Sklerosteose, Em: Opitz, H., Schmid, F., "Handbuch der Kinderheilkunde", Berlim: Springer (pub.) 6 1967, págs. 351-355) a um distúrbio semelhante à hiperosteose cortical generalizada de van Buchem mas diferindo possivelmente no aspecto radiológico das alterações ósseas e na presença de sindactilia cutânea assimétrica dos dedos indicador e médio em muitos casos.

Sabe-se actualmente que a esclerosteose é um distúrbio autossómico semi-dominante que se caracteriza por lesões escleróticas do osso amplamente disseminadas no adulto. A condição é progressiva. A esclerosteose possui também um aspecto evolutivo que está associado a sindactilia (dois ou mais dedos fundidos). A Síndrome de Esclerosteose está associada a grande estatura e muitos indivíduos afectados alcançam uma altura de seis pés (2 metros) ou mais. O teor mineral ósseo dos homozigóticos pode ser 1 a 6 vezes acima dos indivíduos normais e a densidade mineral óssea pode ser 1 a 4 vezes acima dos valores normais (p. ex., de irmãos não afectados).

A Síndrome de Esclerosteose ocorre primeiramente em Afrikaans descendentes de holandeses na África do Sul. Aproximadamente 1/140 indivíduos da população Afrikaan são portadores do gene mutado (heterozigóticos). A mutação apresenta uma penetrância de 100%. Existem relatórios anedóticos de maior densidade mineral óssea em heterozigóticos sem patologias associadas (sindactilia ou sobre-crescimento do crânio).

Actualmente parece não haver nenhuma anomalia no eixo pituitária-hipotálamo na esclerosteose. Em particular, parece não haver sobre-produção de hormona do crescimento nem de cortisona. Adicionalmente, os níveis das hormonas sexuais são normais nos indivíduos afectados. No entanto, os marcadores de renovação do osso (fosfatase alcalina específica de osteoblastos, osteocalcina, propéptido do procologénio C' de tipo 1 (PICP) e fosfatase alcalina total; (ver Comier, C., *Curr. Opin. in Rheu.* 7: 243, 1995)) indicam que há actividade

hiperosteoblástica associada à doença mas que há uma actividade normal a ligeiramente diminuída dos osteoclastos mediada através de marcadores de reabsorção óssea (piridinolina, desoxipiridinolina, N-telopéptido, hidroxiprolina urinária, fosfatases plasmáticas ácidas resistentes a tartrato e galactosil-hidroxilisina (ver Comier, *supra*)).

A esclerosteose caracteriza-se pela deposição contínua de osso ao longo de todo o esqueleto durante toda a vida dos indivíduos afectados. Nos homozigóticos a deposição contínua de mineral ósseo conduz a um sobre-crescimento do osso em áreas do esqueleto onde há uma ausência de mecanorreceptores (caveira, maxila, crânio). Nos homozigóticos com esclerosteose, o sobre-crescimento dos ossos do crânio conduz a compressão craniana e eventualmente à morte devido a excessiva pressão hidrostática no tronco cerebral. Em todas as outras partes do esqueleto há uma esclerose generalizada e difusa. As áreas corticais dos ossos longos são grandemente espessadas resultando num aumento substancial na força óssea. As conexões trabeculares são aumentadas na espessura que aumenta por sua vez a força do osso trabecular. Os ossos escleróticos parecem invulgarmente opacos aos raios X.

Tal como descrito mais detalhadamente no Exemplo 1, a mutação genética rara que é responsável pela síndrome de esclerosteose foi localizada na região do cromossoma humano 17 que codifica um novo membro da família de proteínas de ligação a TGF-beta (um exemplo representativo da qual é designado "Beer H."). Tal como descrito mais detalhadamente abaixo, com base nesta descoberta, o mecanismo de mineralização óssea é compreendido mais inteiramente, permitindo o desenvolvimento de ensaios para moléculas que aumentem a mineralização óssea, e a utilização de tais moléculas no fabrico de medicamentos para aumentar o teor mineral ósseo, e no tratamento ou na prevenção de um grande número de doenças.

SUPERFAMÍLIA TGF-BETA

A superfamília de Factores de Crescimento Transformantes-beta (TGF-beta) contém uma variedade de

factores de crescimento que partilham elementos de sequência e motivos estruturais comuns (a ambos os níveis secundário e terciário). Sabe-se que esta família de proteínas exerce um amplo espectro de respostas biológicas numa grande variedade de tipos celulares. Muitas delas têm funções importantes durante o desenvolvimento embrionário na formação de padrões e na especificação de tecidos; nos adultos estão envolvidas, p. ex., na cicatrização de feridas e na reparação do osso e na remodelação do osso e na modulação do sistema imunitário. Para além dos três TGF-beta, a superfamília inclui as Proteínas Morfogénicas do Osso (BMP), Activinas, Inibinas, Factores de Crescimento e Diferenciação (GDF) e Factores Neurotróficos Derivados da Glia (GDNF). A classificação primária é estabelecida através das características gerais da sequência que arrumam uma proteína específica numa subfamília geral. A estratificação adicional dentro da subfamília é possível devido a uma conservação estrita da sequência entre os membros do grupo menor. Em certos casos, tal como com BMP-5, BMP-6 e BMP-7, isto pode ser tão elevado quanto 75 por cento de homologia de aminoácidos entre os membros do grupo menor. Este nível de identidade permite que uma única sequência representativa ilustre os elementos bioquímicos chave do subgrupo que o separam de outros membros da família maior.

Os TGF-beta sinalizam através de indução da formação de complexos hetero-oligoméricos de receptores de tipo I e de tipo II. A estrutura cristalina de TGF-beta2 foi determinada. A dobra geral do monómero de TGF-beta2 contém uma estrutura de cisteínas semelhante a nós estável, compacta formada por três pontes dissulfureto. A dimerização, estabilizada por uma ponte dissulfureto, é antiparalela.

Os membros da família TGF-beta iniciam a sua acção celular ligando-se a receptores com actividade de serina/treonina-cinase intrínseca. Esta família de receptores consiste em duas subfamílias, denominadas receptores de tipo I e de tipo II. Cada membro da família TGF-beta liga-se a uma combinação característica de receptores de tipo I e de tipo II, ambos os quais são necessários para a sinalização. No modelo actual para activação do receptor de TGF-beta, primeiro TGF-beta liga-se ao receptor de tipo II (TbR-II),

que ocorre na membrana celular numa forma oligomérica com cinase activada. A partir daí, o receptor de tipo 1 (TbR-I), que não se pode ligar ao ligando na ausência de TbR-II, é recrutado para o complexo. TbR-II fosforila então TbR-I predominantemente num domínio rico em resíduos de glicina e serina (domínio GS) na região justamembranar e activa desse modo TbR-I.

Até agora foram identificados sete receptores de tipo I e cinco receptores de tipo II.

AS PROTEÍNAS MORFOGÉNICAS DO OSSO (BMP) SÃO PROTEÍNAS
REGULADORAS CHAVE NA DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA
NOS SERES HUMANOS

Um principal avanço na compreensão da formação do osso foi a identificação das proteínas morfogénicas do osso (BMP), também conhecidas como proteínas osteogénicas (OP), que regulam a diferenciação de cartilagem e de osso *in vivo*. As BMP/OP induzem a diferenciação de osso endocondral através de uma cascata dos eventos que incluem a formação de cartilagem, hipertrofia e calcificação da cartilagem, invasão vascular, diferenciação de osteoblastos e formação de osso. Tal como descrito acima, as BMP/OP (BMP 2-14, e a proteína osteogénica 1 e 2, OP-1 e OP-2) são membros da superfamília TGF-beta. A impressionante conservação evolutiva entre os membros da subfamília BMP/OP sugere que são críticos no desenvolvimento e na função normais dos animais. Além disso, a presença de múltiplas formas de BMP/OP levanta uma questão importante sobre a relevância biológica desta aparente redundância. Para além da condrogénese e osteogénese pós-fetais, as BMP/OP desempenham múltiplos papéis na esqueletogénese (incluindo o desenvolvimento de tecidos craniofaciais e dentários) e no desenvolvimento embrionário e na organogénese de órgãos parenquimatosos, incluindo o rim. Compreende-se agora que a natureza se baseia em mecanismos moleculares comuns (e poucos) talhados para proporcionar o aparecimento de tecidos e órgãos especializados. A superfamília de BMP/OP é um elegante exemplo de parcimónia da natureza a programar múltiplas funções especializadas utilizando isoformas moleculares com uma variação mínima nos motivos de

aminoácidos dentro de regiões carboxi-terminais altamente conservadas.

ANTAGONISMO DE BMP

As subfamílias de BMP e Activina estão sujeitas a significativa regulação pós-tradução. Existe um sistema de controlo extracelular intricado, por meio do qual é sintetizado e exportado um antagonista de alta afinidade que subsequentemente se complexa selectivamente com BMP ou activinas para destruir a sua actividade biológica (W.C. Smith, *TIG* 15(1): 3-6, 1999). Vários destes antagonistas naturais foram identificados, e com base na divergência das sequências parecem ter evoluído independentemente devido à falta de conservação primária da sequência. Não houve até à data nenhum trabalho estrutural nesta classe de proteínas. Os estudos destes antagonistas destacaram uma preferência distinta para interagir e neutralizar BMP-2 e BMP-4. Para além disso, o mecanismo de inibição parece diferir para os diferentes antagonistas (S. Iemura *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9337-9342, 1998).

NOVAS PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO A TGF-BETA

1. Antecedentes das proteínas de ligação a TGF-beta

Como observado acima, o presente invento proporciona uma nova classe de proteínas de ligação a TGF-beta que possui uma armação de cisteína quase idêntica (dissulfureto) quando comparada com a DAN Humana, a Gremlin Humana e a Cerberus Humana, e SCGF (Patente U.S. Nº 5780263) mas quase sem homologia ao nível nucleotídico (para informação de fundo, ver geralmente Hsu, D.R., Economides, A.N., Wang, X., Eimon, P.M., Harland, R.M., "The *Xenopus* Dorsalizing Factor Gremlin Identifies a Novel Family of Secreted Proteins that Antagonize BMP Activities" *Molecular Cell* 1: 673-683, 1998).

Um exemplo representativo da nova classe de proteínas de ligação a TGF-beta é divulgado nas Sequências ID NOS: 1, 5, 9, 11, 13 e 15. Os membros representativos desta classe de proteínas de ligação devem também ser entendidos como incluindo variantes da proteína de ligação a TGF-beta (p.

ex., Sequências ID NOS: 5 e 7). Tal como aqui se utiliza, "um gene variante da proteína de ligação a TGF-beta" refere-se a moléculas de ácido nucleico que codificam um polipéptido possuindo uma sequência de aminoácidos que seja uma modificação de SEQ ID NOS: 2, 10, 12, 14 ou 16. Tais variantes incluem polimorfismos de ocorrência natural ou variantes alélicas de genes de proteínas de ligação a TGF-beta, bem como genes sintéticos que contenham substituições de aminoácidos conservativas destas sequências de aminoácidos. Formas variantes adicionais de um gene de uma proteína de ligação a TGF-beta são moléculas de ácido nucleico que contenham inserções ou deleções das sequências nucleotídicas aqui descritas. Os genes variantes de proteínas de ligação a TGF-beta podem ser identificados através da determinação de se os genes hibridam com uma molécula de ácido nucleico possuindo a sequência nucleotídica de SEQ ID NOS: 1, 5, 7, 9, 11, 13 ou 15 sob condições rigorosas. Para além disso, os genes variantes de proteínas de ligação a TGF-beta devem codificar uma proteína possuindo uma estrutura de cisteínas.

Como alternativa, os genes variantes de proteínas de ligação a TGF-beta podem ser identificados através de comparação de sequências. Tal como aqui se utiliza, duas sequências de aminoácidos possuem "100% de identidade de sequência de aminoácidos" se os resíduos de aminoácidos das duas sequências de aminoácidos forem os mesmos quando alinhados para uma correspondência máxima. Semelhantemente, duas sequências nucleotídicas possuem "100% de identidade de sequência nucleotídica" se os resíduos de nucleótidos das duas sequências nucleotídicas forem os mesmos quando alinhados para uma correspondência máxima. As comparações de sequências podem ser realizadas utilizando programas de suporte lógico padrão tais como os incluídos em LASERGENE bioinformatics computing suite, que é produzido por DNASTAR (Madison, Wisconsin). Outros métodos para comparar duas sequências nucleotídicas ou de aminoácidos através da determinação do alinhamento óptimo são bem conhecidos dos peritos na arte (ver, por exemplo, Peruski e Peruski, "The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research" (ASM Press., Inc. 1997), Wu et al. (eds.), Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic

Acids and Proteins em "Methods in Gene Biotechnology", páginas 123-151 (CRC Press., Inc. 1997), e Bishop (ed.), "Guide to Human Genome Computing", 2ª Edição (Academic Press, Inc. 1998)).

Uma proteína de ligação a TGF-beta variante deve ter pelo menos uma identidade de sequência de aminoácidos de 50% com SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 12, 14 ou 16 e, de preferência, mais de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% de identidade. Alternativamente, as variantes de proteínas de ligação a TGF-beta podem ser identificadas por possuírem pelo menos uma identidade de sequência nucleotídica de 70% com SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 11, 13 ou 15. Além disso, o presente invento contempla variantes de genes de proteínas de ligação a TGF-beta possuindo mais de 75%, 80%, 85%, 90% ou 95% de identidade com SEQ ID NO: 1. Não obstante o método utilizado em particular para identificar um gene variante de uma proteína de ligação a TGF-beta ou proteína de ligação a TGF-beta variante, uma proteína de ligação a TGF-beta variante ou um polipéptido codificado por um gene variante de uma proteína de ligação a TGF-beta podem ser funcionalmente caracterizados, por exemplo, pela sua capacidade para se ligarem e/ou inibirem a sinalização de um membro selecionado da família de proteínas TGF-beta, ou pela sua capacidade para se ligarem especificamente a um anticorpo anti-proteína de ligação a TGF-beta.

O presente invento inclui fragmentos funcionais de genes de proteínas de ligação a TGF-beta. No contexto deste invento, "um fragmento funcional" de um gene de uma proteína de ligação a TGF-beta refere-se a uma molécula de ácido nucleico que codifica uma porção de um polipéptido de uma proteína de ligação a TGF-beta que (1) possua a actividade funcional acima observada, ou (2) se ligue especificamente a um anticorpo anti-proteína de ligação a TGF-beta. Por exemplo, um fragmento funcional de um gene de uma proteína de ligação a TGF-beta aqui descrito compreende uma porção da sequência nucleotídica de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 11, 13 ou 15.

2. Isolamento do gene da proteína de ligação a TGF-beta

As moléculas de ADN que codificam um gene da proteína de ligação podem ser obtidas pesquisando uma biblioteca de ADNc

ou genómica humana utilizando sondas polinucleotídicas baseadas, por exemplo, em SEQ ID NO: 1.

Por exemplo, o primeiro passo na preparação de uma biblioteca de ADNc é isolar ARN utilizando métodos bem conhecidos dos peritos na arte. Em geral, as técnicas de isolamento de ARN devem proporcionar um método para romper as células, meios de inibir a degradação do ARN dirigida pela ARNase, e um método de separar o ARN dos contaminantes de ADN, proteínas e polissacáridos. Por exemplo, o ARN total pode ser isolado congelando o tecido em azoto líquido, moendo o tecido congelado com um almofariz e pilão para lisar as células, extraíndo o tecido moído com uma solução de fenol/clorofórmio para remover as proteínas, e separando o ARN das impurezas restantes através de precipitação selectiva com cloreto de lítio (ver, por exemplo, Ausubel *et al.* (eds.), "Short Protocols in Molecular Biology", 3ª Edição, páginas 4-1 a 4-6 (John Wiley & Sons, 1995) ["Ausubel (1995)"]; Wu *et al.*, "Methods in Gene Biotechnology", páginas 33-41 (CRC Press, Inc. 1997) ["Wu (1997)"]).

Alternativamente, o ARN total pode ser isolado extraíndo o tecido moído com isotiocianato de guanidínio, extraíndo com solventes orgânicos, e separando o ARN dos contaminantes utilizando centrifugação diferencial (ver, por exemplo, Ausubel (1995) nas páginas 4-1 a 4-6; Wu (1997) nas páginas 33-41).

A fim de construir uma biblioteca de ADNc, o ARN poli(A)+ deve ser isolado de uma preparação de ARN total. O ARN Poli(A)+ pode ser isolado do ARN total utilizando a técnica padrão de cromatografia de oligo(dT)-celulose (ver, por exemplo, Ausubel (1995) nas páginas 4-11 a 4-12).

São sintetizadas moléculas de ADNc de cadeia dupla a partir de ARN poli(A)+ utilizando técnicas bem conhecidas dos peritos na arte (ver, por exemplo, Wu (1997) nas páginas 41-46). Além disso, podem ser utilizados estojos comercialmente disponíveis para sintetizar moléculas de ADNc de cadeia dupla. Por exemplo, tais estojos estão disponíveis em Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, Maryland), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, California), Promega

Corporation (Madison, Wisconsin) e Stratagene Cloning Systems (La Jolla, California).

A abordagem básica para obter clones de ADNc de uma proteína de ligação a TGF-beta pode ser modificada construindo uma biblioteca de ADNc subtraída que seja enriquecida em moléculas de ADNc específicas de proteínas de ligação a TGF. As técnicas para construir bibliotecas subtraídas são bem conhecida dos peritos na arte (ver, por exemplo, Sargent, "Isolation of Differentially Expressed Genes," em *Meth. Enzymol.* 152: 423, 1987, e Wu et al., (eds.), "Construction and Screening of Subtracted and Complete Expression cDNA Libraries," em *Methods in Gene Biotechnology*, páginas 29-65 (CRC Press, Inc, 1997)).

Vários vectores de clonagem são apropriados para a construção de uma biblioteca de ADNc. Por exemplo, uma biblioteca de ADNc pode ser preparada num vector derivado de bacteriófagos, tais como o vector λ gt10 (ver, por exemplo, Huynh et al., Constructing and Screening cDNA Libraries in λ gt10 and λ gt11 em "DNA Cloning: A Practical Approach Vol. 1", Glover (ed.), página 49 (IRL Press, 1985); Wu (1997) nas páginas 47-52).

Alternativamente, as moléculas de ADNc de cadeia dupla podem ser inseridas num vector plasmídico, tal como um vector pBluescript (Stratagene Cloning Systems; La Jolla, California), um LambdaGEM-4 (Promega Corp.; Madison, Wisconsin) ou outros vectores comercialmente disponíveis. Vectores de clonagem adequados podem também ser obtidos a partir da American Type Culture Collection (Rockville, Maryland).

A fim de amplificar as moléculas de ADNc clonadas, a biblioteca de ADNc é inserida num hospedeiro procariótico, utilizando técnicas padrão. Por exemplo, uma biblioteca de ADNc pode ser inserida em células de *E. coli* DH5 competentes, que podem ser obtidas em Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, Maryland).

Uma biblioteca de ADN genómico humano pode ser preparada por meios bem conhecidos na arte (ver, por exemplo, Ausubel

(1995) nas páginas 5-1 a 5-6; Wu (1997) nas páginas 307-327). O ADN genómico pode ser isolado através de lise do tecido com o detergente Sarkosyl, digestão do lisado com proteinase K, eliminação dos restos insolúveis do lisado através de centrifugação, precipitação do ácido nucleico a partir do lisado utilizando isopropanol, e purificação do ADN ressuspensão num gradiente de densidade de cloreto de cézio.

Os fragmentos de ADN que são adequados para a produção de uma biblioteca genómica podem ser obtidos através de fragmentação aleatória do ADN genómico ou através da digestão parcial do ADN genómico com endonucleases de restrição. Os fragmentos de ADN genómico podem ser inseridos num vector, tal como um vector de bacteriófago ou cosmídeo, de acordo com técnicas convencionais, tais como a utilização de digestão com enzimas de restrição para proporcionar terminais apropriados, a utilização de tratamento com fosfatase alcalina para evitar a junção indesejável de moléculas de ADN e a ligação com ligases apropriadas. As técnicas para tal manipulação são bem conhecidas na arte (ver, por exemplo, Ausubel (1995) nas páginas 5-1 a 5-6; Wu (1997) nas páginas 307-327).

As moléculas de ácido nucleico que codificam um gene de uma proteína de ligação a TGF-beta podem também ser obtidas utilizando a reacção em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores oligonucleotídicos possuindo sequências nucleotídicas que se baseiem nas sequências nucleotídicas do gene da proteína de ligação a TGF-beta humana, tal como aqui descrito. Os métodos gerais para pesquisar bibliotecas por PCR são proporcionados, por exemplo, por Yu et al., Use of the Polymerase Chain Reaction to Screen Phage Libraries, em "Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications", White (ed.), páginas 211-215 (Humana Press, Inc. 1993). Para além disso, as técnicas para utilizar PCR para isolar genes relacionados são descritas, por exemplo, por Preston, Use of Degenerate Oligonucleotide Primers and the Polymerase Chain Reaction to Clone Gene Family Members, em "Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications", White (ed.), páginas 317-337 (Humana Press, Inc. 1993).

Alternativamente, podem ser obtidas bibliotecas genômicas humanas a partir de fontes comerciais tais como Research Genetics (Huntsville, AL) e a American Type Culture Collection, (Rockville, Maryland).

Uma biblioteca contendo clones de ADNc ou genômico pode ser pesquisada com uma ou mais sondas polinucleotídicas baseadas em SEQ ID NO: 1, utilizando métodos padrão (ver, por exemplo, Ausubel (1995) nas páginas 6-1 a 6-11).

Anticorpos anti-proteína de ligação a TGF-beta, produzidos tal como descrito abaixo, podem também ser utilizados para isolar sequências de ADN que codificam genes de proteínas de ligação a TGF-beta de bibliotecas de ADNc. Por exemplo, os anticorpos podem ser utilizados para pesquisar bibliotecas de expressão de λ gt11, ou os anticorpos podem ser utilizados para imunopesquisa após selecção de híbridos e tradução (ver, por exemplo, Ausubel (1995) nas páginas 6-12 a 6-16, Margolis *et al.*, Screening λ expression libraries with antibody and protein probes em "DNA Cloning 2: Expression Systems", 2ª Edição, Glover *et al.*, (eds.), páginas 1-14 (Oxford University Press 1995)).

A sequência de um ADNc de uma proteína de ligação a TGF-beta ou de um fragmento genômico da proteína de ligação a TGF-beta pode ser determinada utilizando métodos padrão. Para além disso, a identificação de fragmentos genômicos contendo um promotor da proteína de ligação a TGF-beta ou um elemento regulador pode ser alcançada utilizando técnicas bem estabelecidas, tais como análise de deleções (ver, geralmente, Ausubel (1995)).

Como uma alternativa, um gene de uma proteína de ligação a TGF-beta pode ser obtido através de síntese de moléculas de ADN utilizando oligonucleótidos longos que se iniciam mutuamente e as sequências nucleotídicas aqui descritas (ver, por exemplo, Ausubel (1995) nas páginas 8-8 a 8-9). As técnicas estabelecidas utilizando a reacção em cadeia da polimerase proporcionam a capacidade de sintetizar moléculas de ADN com pelo menos duas quilobases de comprimento (Adang *et al.*, *Plant Molec. Biol.* 21: 1131, 1993; Bambot *et al.*, *PCR Methods and Applications* 2: 266, 1993; Dillon *et al.*, Use of

the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes, em "Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications", White (ed.), páginas 263-268, (Humana Press, Inc. 1993); Holowachuk *et al.*, *PCR Methods Appl.* 4: 299, 1995)

3. Produção de genes de proteínas de ligação a TGF-beta

As moléculas de ácido nucleico codificando genes variantes das proteínas de ligação a TGF-beta podem ser obtidas pesquisando várias bibliotecas de ADNc ou genômico com sondas polinucleotídicas possuindo sequências nucleotídicas baseadas em SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13 ou 15, utilizando os procedimentos descritos acima. As variantes de genes de proteínas de ligação a TGF-beta podem também ser construídas sinteticamente. Por exemplo, pode ser considerada uma molécula de ácido nucleico que codifique um polipéptido que possua uma mudança de aminoácidos conservativa, em comparação com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NOS: 2, 6, 8, 10, 12, 14 ou 16. Isto é, podem ser obtidas variantes contendo uma ou mais substituições de aminoácidos de SEQ ID NOS: 2, 6, 8, 10, 12, 14 ou 16, em que um aminoácido alquilo substitui um aminoácido alquilo numa sequência de aminoácidos da proteína de ligação a TGF-beta, um aminoácido aromático substitui um aminoácido aromático numa sequência de aminoácidos da proteína de ligação a TGF-beta, um aminoácido contendo enxofre substitui um aminoácido contendo enxofre numa sequência de aminoácidos da proteína de ligação a TGF-beta, um aminoácido contendo hidroxilo substitui um aminoácido contendo hidroxilo numa sequência de aminoácidos da proteína de ligação a TGF-beta, um aminoácido ácido substitui um aminoácido ácido numa sequência de aminoácidos da proteína de ligação a TGF-beta, um aminoácido básico substitui um aminoácido básico numa sequência de aminoácidos da proteína de ligação a TGF-beta ou um aminoácido monocarboxílico dibásico substitui um aminoácido monocarboxílico dibásico numa sequência de aminoácidos da proteína de ligação a TGF-beta.

Entre os aminoácidos comuns, por exemplo, "uma substituição de aminoácidos conservativa" é ilustrada por uma

substituição entre aminoácidos dentro de cada um dos seguintes grupos: (1) glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina, (2) fenilalanina, tirosina e triptofano, (3) serina e treonina, (4) aspartato e glutamato, (5) glutamina e asparagina, e (6) lisina, arginina e histidina. Ao fazer tais substituições, é importante, onde possível, manter o esqueleto de cisteínas delineado na Figura 1.

Mudanças de aminoácidos conservativas num gene de uma proteína de ligação a TGF-beta podem ser introduzidas através da substituição dos nucleótidos citados em SEQ ID NO: 1 por outros nucleótidos. Tais variantes "de aminoácidos conservativas" podem ser obtidas, por exemplo, através de mutagénese dirigida por oligonucleótidos, mutagénese de pesquisa do ligante, mutagénese utilizando a reacção em cadeia da polimerase e semelhantes (ver Ausubel (1995) na páginas 8-10 a 8-22; e McPherson (ed.), "Directed Mutagenesis: A Practical Approach" (IRL Press 1991)). A capacidade funcional de tais variantes pode ser determinada utilizando um método padrão, tal como o ensaio aqui descrito. Alternativamente, um polipéptido variante da proteína de ligação a TGF-beta pode ser identificado através da capacidade para se ligar especificamente a anticorpos anti-proteína de ligação a TGF-beta.

Podem ser efectuadas análises de rotina de deleções de moléculas de ácido nucleico para obter "fragmentos funcionais" de uma molécula de ácido nucleico que codifique um polipéptido da proteína de ligação a TGF-beta. Como ilustração, moléculas de ADN possuindo a sequência nucleotídica de SEQ ID NO: 1 podem ser digeridas com a nuclease *Bal31* para obter uma série de deleções internas. Os fragmentos são então inseridos em vectores de expressão no enquadramento de leitura correcto, e os polipéptidos expressos são isolados e testados quanto à actividade, ou quanto à capacidade para se ligarem a anticorpos anti-proteína de ligação a TGF-beta. Uma alternativa à digestão com exonuclease é utilizar mutagénese dirigida por oligonucleótidos para introduzir deleções ou codões de terminação para especificar a produção de um fragmento desejado. Alternativamente, podem ser sintetizados

determinados fragmentos de um gene de proteína de ligação a TGF-beta utilizando a reacção em cadeia da polimerase.

Técnicas padrão para análise funcional de proteínas são descritas, por exemplo, por Treuter et al., *Molec. Gen. Genet.* 240: 113, 1993; Content et al., Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by human interferon, em "Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems", Cantell (ed.), páginas 65-72 (Nijhoff 1987); Herschman, The EGF Receptor, em "Control of Animal Cell Proliferation", Vol. 1, Boynton et al., (eds.) páginas 169-199 (Academic Press, 1985); Coumailleau et al., *J. Biol. Chem.* 270: 29270, 1995; Fukunaga et al., *J. Biol. Chem.* 270: 25291, 1995; Yamaguchi et al., *Biochem. Pharmacol.* 50: 1295, 1995; e Meisel et al., *Plant Molec. Biol.* 30: 1, 1996.

O presente invento contempla também fragmentos funcionais de um gene de proteína de ligação a TGF-beta que possua mudanças de aminoácidos conservativas.

Um gene variante da proteína de ligação a TGF-beta pode ser identificado com base na estrutura através da determinação do nível de identidade com as sequências nucleotídica e de aminoácidos de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 11, 13 ou 15 e 2, 6, 10, 12, 14 ou 16, tal como discutido acima. Uma abordagem alternativa para identificar um gene variante com base na estrutura é determinar se uma molécula de ácido nucleico codificando um potencial gene de proteína de ligação a TGF-beta variante pode hibridar sob condições rigorosas com uma molécula de ácido nucleico possuindo a sequência nucleotídica de SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 11, 13 ou 15, ou uma porção desta com pelo menos 15 ou 20 nucleótidos de comprimento. Como ilustração de condições de hibridação rigorosas, uma molécula de ácido nucleico possuindo uma sequência de proteína de ligação a TGF-beta variante pode ligar-se com um fragmento de uma molécula de ácido nucleico possuindo uma sequência de SEQ ID NO: 1 num tampão contendo, por exemplo, SSPE 5× (SSPE 1× = cloreto de sódio 180 mM, fosfato de sódio 10 mM, EDTA 1 mM (pH 7,7), solução de Denhardt 5× (solução de Denhardt 100× = albumina de soro bovino a 2% (p/v), Ficoll a 2% (p/v), polivinilpirrolidona a

2% (p/v)) e SDS a 0,5% incubados de um dia para o outro a 55-60°C. As lavagens pós-hibridação a elevado rigor são tipicamente efectuadas em SSC 0,5× (SSC 1× = cloreto de sódio 150 mM, citrato trissódico 15 mM) ou em SSPE 0,5× a 55-60°C.

Independentemente da sequência nucleotídica em particular de um gene de proteína de ligação a TGF-beta variante, o gene codifica um polipéptido que pode ser caracterizado pela sua actividade funcional, ou pela capacidade de se ligar especificamente a um anticorpo anti-proteína de ligação a TGF-beta. Mais especificamente, os genes de proteínas de ligação a TGF-beta variantes codificam polipéptidos que exibem pelo menos 50%, e de preferência, mais de 60, 70, 80 ou 90%, da actividade dos polipéptidos codificados pelo gene da proteína de ligação à TGF-beta humana aqui descrito.

4. Produção de proteína de ligação a TGF-beta em Células Cultivadas

Para expressar um gene de proteína de ligação a TGF-beta, uma molécula de ácido nucleico que codifica o polipéptido tem de estar operativamente ligada a sequências reguladoras que controlem a expressão transcricional num vector de expressão e ser então introduzida numa célula hospedeira. Para além das sequências reguladoras da transcrição, tais como promotores e estimuladores, os vectores de expressão podem incluir sequências reguladoras da tradução e um gene marcador que seja adequado para selecção das células que possuem o vector de expressão.

Vectores de expressão que são adequados para a produção de uma proteína estranha em células eucarióticas contêm tipicamente (1) elementos de ADN procarióticos que codificam para uma origem de replicação bacteriana e um marcador de resistência a antibióticos para proporcionar o crescimento e a selecção do vector de expressão num hospedeiro bacteriano; (2) elementos de ADN eucarióticos que controlam a iniciação da transcrição, tais como um promotor; e (3) elementos de ADN que controlam o processamento de transcritos, tais como uma sequência de terminação/poliadenilação da transcrição.

As proteínas de ligação a TGF-beta do presente invento são expressas de preferência em células de mamífero. Exemplos de células hospedeiras de mamífero incluem células de rim de macaco verde africano (Vero; ATCC CRL 1587), células de rim embrionário humano (293-HEK; ATCC CRL 1573), células de rim de *hamster* bebé (BHK-21; ATCC CRL 8544), células de rim canino (MDCK; ATCC CCL 34), células de ovário de *hamster* chinês (CHO-K1; ATCC CCL61), células da pituitária de rato (GH1; ATCC CCL82), células HeLa S3 (ATCC CCL2.2), células de hepatoma de rato (H-4-II-E; ATCC CRL 1548), células de rim de macaco transformadas com SV40 (COS-1; ATCC CRL 1650) e células embrionárias de murídeo (NIH-3T3; ATCC CRL 1658).

Para um hospedeiro mamífero, os sinais reguladores da transcrição e da tradução podem ser derivados de fontes virais, tais como adenovírus, vírus do papiloma bovino, vírus símio, ou semelhantes, em que os sinais reguladores estão associados a um determinado gene que tenha um elevado nível de expressão. As sequências reguladoras da transcrição e da tradução podem também ser obtidas a partir de genes de mamífero, tais como os genes da actina, do colagénio, da miosina e da metalotioneína.

As sequências reguladoras da transcrição incluem uma região promotora suficiente para dirigir a iniciação da síntese do ARN. Promotores eucarióticos adequados incluem o promotor do gene da metalotioneína I de ratinho (Hamer *et al.*, *J. Molec. Appl. Genet.* 1: 273, 1982), o promotor TK do vírus de herpes (McKnight, *Cell* 31: 355, 1982), o promotor inicial de SV40 (Benoist *et al.*, *Nature* 290: 304, 1981), o promotor do vírus do sarcoma de Rous (Gorman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6777, 1982), o promotor de citomegalovírus (Foecking *et al.*, *Gene* 45: 101, 1980) e o promotor do vírus do tumor mamário de ratinho (ver, geralmente, Etcheverry, Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture, em "Protein Engineering: Principles and Practice", Cleland *et al.* (eds.), páginas 163-181 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)).

Alternativamente, um promotor procariótico, tal como o promotor da ARN-polimerase do bacteriófago T3, pode ser utilizado para controlar a expressão do gene da proteína de

ligação a TGF-beta em células de mamífero se o promotor procariótico for regulado por um promotor eucariótico (Zhou et al., *Mol. Cell. Biol.* 10: 4529, 1990; Kaufman et al., *Nucl. Acids Res.* 19: 4485, 1991).

Os genes da proteína de ligação a TGF-beta podem também ser expressos em células bacterianas, de levedura, de insecto ou vegetais. Os promotores adequados que podem ser utilizados para expressar polipéptidos da proteína de ligação a TGF-beta num hospedeiro procariótico são bem conhecidos dos peritos na arte e incluem promotores capazes de reconhecer as polimerases de T4, T3, Sp6 e T7, os promotores P_r e P_i do bacteriófago lambda, os promotores *trp*, *recA*, de choque térmico, *lacUV5*, *tac*, *lpp-lacSpr*, *phoA* e *lacZ* de *E. coli*, promotores de *B. subtilis*, os promotores dos bacteriófagos de *Bacillus*, promotores de *Streptomyces*, o promotor *int* do bacteriófago lambda, o promotor *bla* de pBR322 e o promotor CAT do gene da cloranfenicol-acetil-transferase. Os promotores procarióticos foram revistos por Glick, J. *Ind. Microbiol.* 1: 277, 1987, Watson et al., "Molecular Biology of the Gene", 4ª Ed. (Benjamin Cummins, 1987), e por Ausubel et al., (1995).

Hospedeiros procarióticos preferidos incluem *E. coli* e *Bacillus subtilis*. Estirpes adequadas de *E. coli* incluem BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysE, DH1, DH4I, DH5, DH5I, DH5IF', DH5IMCR, DH10B, DH10B/p3, DH11S, C600, HB101, JM101, JM105, JM109, JM110, K38, RR1, Y1088, Y1089, CSH18, ER1451 e ER1647 (ver, por exemplo, Brown (Ed.), "Molecular Biology Labfax" (Academic Press, 1991)). Estirpes adequadas de *Bacillus subtilis* incluem BR151, YB886, MI119, MI120 e B170 (ver, por exemplo, Hardy, Bacillus Cloning Methods, em "DNA Cloning: A Practical Approach", Glover (Ed.) (IRL Press 1985)).

Os métodos para expressar proteínas em hospedeiros procarióticos são bem conhecidos dos peritos na arte (ver, por exemplo, Williams et al., Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies, em "DNA Cloning 2: Expression Systems", 2ª Edição, Glover et al., (eds.), página 15 (Oxford University Press, 1995); Ward et al., Genetic Manipulation

and Expression of Antibodies, em "Monoclonal Antibodies: Principles and Applications", página 137 (Wiley-Liss, Inc., 1995); e Georgiou, Expression of Proteins in Bacteria, em "Protein Engineering: Principles and Practice", Cleland et al., (eds.), página 101 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)).

O sistema de baculovírus proporciona um meio eficiente para introduzir genes clonados da proteína de ligação a TGF-beta em células de insecto. Os vectores de expressão adequados são baseados no vírus da poli-hedrose nuclear múltipla de *Autographa californica* (AcMNPV) e contêm promotores bem conhecidos tais como o promotor da proteína de choque térmico (hsp) 70 de *Drosophila*, o promotor do gene inicial imediato (ie-1) e o promotor 39K inicial atrasado do vírus da poli-hedrose nuclear de *Autographa californica*, o promotor p10 de baculovírus e o promotor da metalotioneína de *Drosophila*. Células hospedeiras de insecto adequadas incluem linhas celulares derivadas de IPLB-Sf-21, uma linha celular de ovário da pupa de *Spodoptera frugiperda*, tal como Sf9 (ATCC CRL 1711), Sf21AE e Sf21 (Invitrogen Corporation; San Diego, CA), bem como células Schneider-2 de *Drosophila*. As técnicas estabelecidas para produzir proteínas recombinantes em sistemas de baculovírus são proporcionadas por Bailey et al., Manipulation of Baculovirus Vectors, em "Methods in Molecular Biology, Volume 7: Gene Transfer and Expression Protocols", Murray (ed.), páginas 147-168 (The Humana Press, Inc., 1991), por Patel et al., The baculovirus expression system, em "DNA Cloning 2: Expression Systems", 2ª Edição, Glover et al., (eds.), páginas 205-244 (Oxford University Press, 1995), por Ausubel (1995) nas páginas 16-37 a 16-57, por Richardson (ed.), "Baculovirus Expression Protocols" (The Humana Press, Inc., 1995), e por Lucknow, Insect Cell Expression Technology, em "Protein Engineering: Principles and Practice", Cleland et al., (eds.), páginas 183-218 (John Wiley & Sons, Inc. 1996).

Promotores para expressão em levedura incluem os promotores de *GAL1* (galactose), *PGK* (fosfoglicerato-cinase), *ADH* (álcool-desidrogenase), *AOX1* (álcool-oxidase), *HIS4* (histidinol-desidrogenase) e semelhantes. Muitos vectores de clonagem de levedura foram desenhados e estão facilmente disponíveis. Estes vectores incluem vectores baseados em YIp,

tais como YIp5, vectores YRp, tais como YRp17, vectores YEp tais como YEpl3 e vectores YCp, tais como YCp19. Um perito na arte apreciará que há uma ampla variedade de vectores adequados para expressão em células de levedura.

Os vectores de expressão podem também ser introduzidos em protoplastos de plantas, em tecidos de plantas intactas ou em células vegetais isoladas. Métodos gerais de cultura de tecidos vegetais são proporcionados, por exemplo, por Miki *et al.*, Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants em "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology", Glick *et al.*, (eds.), páginas 67-88 (CRC Press, 1993).

Um vector de expressão pode ser introduzido em células hospedeiras utilizando uma variedade de técnicas padrão incluindo transfecção com fosfato de cálcio, transfecção mediada por lipossomas, distribuição mediada por microprojecteis, electroporação e semelhantes. De preferência, as células transfectadas são seleccionados e propagadas para proporcionar células hospedeiras recombinantes compreendendo o vector de expressão estavelmente integrado no genoma da célula hospedeira. As técnicas para introduzir vectores em células eucarióticas e as técnicas para seleccionar tais transformantes estáveis utilizando um marcador seleccionável dominante são descritas, por exemplo, por Ausubel (1995) e por Murray (ed.), "Gene Transfer and Expression Protocols" (Humana Press, 1991). Os métodos para introduzir vectores de expressão em células bacterianas, de levedura, de insecto e vegetais são também proporcionados por Ausubel (1995).

Métodos gerais para expressar e recuperar proteína estranha produzida por um sistema de células de mamífero são proporcionados, por exemplo, por Etcheverry, Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture, em "Protein Engineering: Principles and Practice", Cleland *et al.*, (eds.), página 163 (Wiley-Liss, Inc., 1996). As técnicas padrão para recuperar proteína produzida através de um sistema bacteriano são proporcionadas, por exemplo, por Grisshammer *et al.*, Purification of over-produced proteins from E. coli cells, em "DNA Cloning 2: Expression Systems", 2ª Edição, Glover *et al.*, (eds.), páginas 59-92 (Oxford

University Press, 1995). Os métodos estabelecidos para isolamento de proteínas recombinantes a partir de um sistema de baculovírus são descritos por Richardson (ed.), "Baculovirus Expression Protocols" (The Humana Press, Inc., 1995).

Mais geralmente, a proteína de ligação a TGF-beta pode ser isolada através de técnicas padrão, tais como cromatografia de afinidade, cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia de permuta iônica, HPLC e semelhantes. Podem ser planejadas variações adicionais no isolamento e na purificação da proteína de ligação a TGF-beta pelos peritos na arte. Por exemplo, anticorpos anti-proteína de ligação a TGF-beta, obtidos tal como descrito abaixo, podem ser utilizados para isolar grandes quantidades da proteína através de purificação por imunoafinidade.

5. Produção de Anticorpos para proteínas de ligação a TGF-beta

Podem ser obtidos anticorpos para proteínas de ligação a TGF-beta utilizando, por exemplo, o produto de um vector de expressão como antigénio. Anticorpos anti-proteína de ligação a TGF-beta particularmente úteis "ligam-se especificamente" à proteína de ligação a TGF-beta de SEQ ID Nos: 2, 6, 10, 12, 14 ou 16, mas não a outras proteínas de ligação a TGF-beta tais como Dan, Cerberus, SCGF ou Gremlin. Os anticorpos do presente invento (incluindo fragmentos e derivados destes) podem ser um anticorpo policlonal ou, especialmente, um anticorpo monoclonal. O anticorpo pode pertencer a qualquer classe do imunoglobulina e pode ser, por exemplo, um anticorpo IgG, por exemplo um anticorpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM ou IgA. Pode ser de animal, por exemplo de origem em mamífero, e pode ser por exemplo um anticorpo de murídeo, rato, humano ou de outro primata. Quando desejado o anticorpo pode ser um anticorpo internalizante.

Podem ser preparados anticorpos policlonais para uma proteína de ligação a TGF-beta recombinante utilizando métodos bem conhecidos dos peritos na arte (ver, por exemplo, Green *et al.*, Production of Polyclonal Antisera, em "Immunochemical Protocols" (Manson, ed.), páginas 1-5 (Humana

Press, 1992); Williams et al., Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies em "DNA Cloning 2: Expression Systems", 2ª Edição, Glover et al., (eds.), página 15 (Oxford University Press 1995)). Embora os anticorpos policlonais sejam tipicamente criados em animais tais como ratos, ratinhos, coelhos, cabras ou ovelhas, um anticorpo anti-proteína de ligação a TGF-beta do presente invento pode também ser derivado de um anticorpo de primata não humano. Técnicas gerais para criar anticorpos úteis em diagnóstico e terapêutica em babuínos podem ser encontradas, por exemplo, em Goldenberg et al., publicação de patente internacional N° WO 91/11465 (1991), e em Losman et al., *Int. J. Cancer* 46: 310, 1990.

O anticorpo deve compreender pelo menos um domínio da região variável. O domínio da região variável pode ser de qualquer tamanho ou composição de aminoácidos e compreenderá geralmente pelo menos uma sequência aminoácidos hipervariável responsável pela ligação ao antígeno embebida numa sequência estrutural. Em termos gerais o domínio da região variável (V) pode ser qualquer arranjo adequado de domínios variáveis das cadeias pesada (V_H) e/ou leve (V_L) da imunoglobulina. Assim por exemplo o domínio da região V pode ser monomérico e ser um domínio V_H ou V_L em que estes sejam capazes de se ligar independentemente ao antígeno com uma afinidade aceitável. Alternativamente o domínio da região V pode ser dimérico e conter dímeros V_H - V_H , V_H - V_L ou V_L - V_L em que as cadeias V_H e V_L estejam associadas de forma não covalente (abreviado daqui em diante como Fv). Quando desejado, no entanto, as cadeias podem estar ligadas covalentemente, directamente, por exemplo através de uma ligação dissulfureto entre os dois domínios variáveis, ou através de um ligante, por exemplo um ligante peptídico, para formarem um domínio de cadeia única (abreviado daqui em diante como scFv).

O domínio da região variável pode ser qualquer domínio variável de ocorrência natural ou uma versão modificada deste. Por versão modificada entenda-se um domínio de região variável que foi criado utilizando técnicas de engenharia de ADN recombinante. Tais versões modificadas incluem as criadas por exemplo a partir de regiões variáveis do anticorpo

natural através de inserções, deleções ou mudanças nas sequências de aminoácidos dos anticorpos naturais. Exemplos particulares deste tipo incluem aqueles domínios da região variável modificados contendo pelo menos uma CDR e opcionalmente um ou mais aminoácidos estruturais de um anticorpo e o restante do domínio da região variável de um segundo anticorpo.

O domínio da região variável pode ser covalentemente ligado num aminoácido C-terminal a pelo menos outro domínio de anticorpo ou a um fragmento deste. Assim, por exemplo quando está presente um domínio V_H no domínio da região variável, este pode ser ligado a um domínio C_{H1} de imunoglobulina ou a um fragmento deste. Semelhantemente um domínio V_L pode ser ligado a um domínio C_K ou a um fragmento deste. Deste modo, por exemplo, o anticorpo pode ser um fragmento Fab em que o domínio de ligação ao antigénio contém domínios V_H e V_L associados ligados covalentemente nos seus terminais C a um domínio C_{H1} e C_K , respectivamente. O domínio C_{H1} pode ser prolongado com mais aminoácidos, por exemplo para proporcionar um domínio da região charneira tal como verificado num fragmento Fab', ou para proporcionar mais domínios, tais como os domínios CH2 e CH3 do anticorpo.

Outra forma de um fragmento de anticorpo é um péptido codificando para uma única região determinante de complementaridade (CDR). Os péptidos CDR ("unidades mínimas do reconhecimento") podem ser obtidos construindo genes codificando as CDR de um anticorpo de interesse. Tais genes são preparados, por exemplo, utilizando a reacção em cadeia da polimerase para sintetizar a região variável a partir do ARN de células produtoras de anticorpo (ver, por exemplo, Larrick et al., *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2: 106, 1991; Courtenay-Luck, Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies, em "Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application", Ritter et al. (eds.), página 166 (Cambridge University Press, 1995); e Ward et al., Genetic Manipulation and Expression of Antibodies, em "Monoclonal Antibodies: Principles and Applications", Birch et al. (eds.), página 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995)).

Os anticorpos para utilizar no presente invento podem em geral ser monoclonais (preparados através de procedimentos convencionais de imunização e fusão celular) ou no caso dos fragmentos, derivados destes utilizando qualquer química padrão adequada, p. ex. redução ou clivagem enzimática e/ou técnicas de digestão, por exemplo através de tratamento com pepsina.

Mais especificamente, os anticorpos monoclonais anti-proteína de ligação a TGF-beta podem ser gerados utilizando uma variedade de técnicas. Podem ser obtidos anticorpos monoclonais de roedor para antígenos específicos através de métodos conhecidos dos peritos na arte (ver, por exemplo, Kohler et al., *Nature* 256: 495, 1975; e Coligan et al. (eds.), "Current Protocols in Immunology", 1: 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991) ("Coligan"); Picksley et al., Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in *E. coli*, em "DNA Cloning 2: Expression Systems", 2ª Edição, Glover et al. (eds.), página 93 (Oxford University Press, 1995)).

Resumidamente, os anticorpos monoclonais podem ser obtidos injectando ratinhos com uma composição compreendendo um produto do gene da proteína de ligação a TGF-beta, verificando a presença de produção de anticorpos retirando uma amostra de soro, removendo o baço para obter linfócitos B, fundindo os linfócitos B com células de mieloma para produzir hibridomas, clonando os hibridomas, seleccionando os clones positivos que produzem anticorpos para o antígeno, cultivando os clones que produzem anticorpos para o antígeno, e isolando os anticorpos a partir das culturas de hibridoma.

Adicionalmente, um anticorpo anti-proteína de ligação a TGF-beta do presente invento pode ser derivado de um anticorpo monoclonal humano. Os anticorpos monoclonais humanos são obtidos a partir de ratinhos transgênicos que foram modificados para produzir anticorpos humanos específicos em resposta a um confronto antígeno. Nesta técnica, elementos do *locus* das cadeias pesada e leve humanas são introduzidos em estirpes de ratinhos derivadas de linhas celulares estaminais embrionárias que contêm destruições

direccionadas dos *loci* das cadeias pesada e leve endógenas. Os ratinhos transgénicos podem sintetizar anticorpos humanos específicos para antígenos humanos e os ratinhos podem ser utilizados para produzir hibridomas que segregam anticorpos humanos. Os métodos para obter anticorpos humanos a partir de ratinhos transgénicos são descritos, por exemplo, por Green *et al.*, *Nature Genet.* 7: 13, 1994; Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856, 1994; e Taylor *et al.*, *Int. Immun.* 6: 579, 1994.

Os anticorpos monoclonais podem ser isolados e purificados a partir de culturas de hibridoma através de uma variedade de técnicas bem estabelecidas. Tais técnicas de isolamento incluem cromatografia de afinidade com Proteína-A-Sepharose, cromatografia de exclusão de tamanho e cromatografia de permuta iónica (ver, por exemplo, Coligan nas páginas 2.7.1-2.7.12 e nas páginas 2.9.1-2.9.3; Baines *et al.*, Purification of Immunoglobulin G (IgG), em "Methods in Molecular Biology", Vol. 10, páginas 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992)).

Para determinadas utilizações, pode ser desejável preparar fragmentos de anticorpos anti-proteína de ligação a TGF-beta. Tais fragmentos de anticorpo podem ser obtidos, por exemplo, através de hidrólise proteolítica do anticorpo. Os fragmentos de anticorpo podem ser obtidos através de digestão com pepsina ou papaína de anticorpos inteiros através de métodos convencionais. Como ilustração, os fragmentos de anticorpo podem ser produzidos através de clivagem enzimática de anticorpos com pepsina para proporcionar um fragmento 5S denominado $F(ab')_2$. Este fragmento pode ainda ser clivado utilizando um agente redutor de tiol para produzir fragmentos 3.5S Fab' monovalentes. Opcionalmente, a reacção de clivagem pode ser efectuada utilizando um grupo de bloqueio para os grupos sulfidriolo que resultam da clivagem de ligações dissulfureto. Como alternativa, uma clivagem enzimática utilizando pepsina produz directamente dois fragmentos Fab monovalentes e um fragmento Fc. Estes métodos são descritos, por exemplo, por Goldenberg, Patente U.S. N° 4331647, Nisonoff *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 89: 230, 1960, Porter, *Biochem. J.* 73: 119, 1959, Edelman *et al.*, em *Methods in Enzymology* 1: 422 (Academic Press, 1967), e por Coligan nas páginas 2.8.1-2.8.10 e 2.10-2.10.4.

Outros métodos de clivar anticorpos, tais como a separação de cadeias pesadas para formar fragmentos de cadeia leve-pesada monovalentes, clivagem adicional de fragmentos ou outras técnicas enzimáticas, químicas ou genéticas podem também ser utilizados, desde que os fragmentos se liguem ao antigénio que é reconhecido pelo anticorpo intacto.

Alternativamente, o anticorpo pode ser um anticorpo recombinante ou modificado obtido através da utilização de técnicas de ADN recombinante envolvendo a manipulação e a re-expressão de ADN codificando regiões variáveis e/ou constantes do anticorpo. Tal ADN é conhecido e/ou está facilmente disponível a partir de bibliotecas de ADN incluindo por exemplo bibliotecas fágicas de anticorpos (ver Chiswell, D.J. e McCafferty, J., *Tibtech.* 10: 80-84, 1992) ou quando desejado pode ser sintetizado. Os procedimentos padrão de biologia molecular e/ou de química podem ser utilizados para sequenciar e manipular o ADN, por exemplo, para introduzir codões para criar resíduos de cisteína, para modificar, adicionar ou suprimir outros aminoácidos ou domínios conforme desejado.

A partir daqui, um ou o mais vectores de expressão replicáveis contendo o ADN podem ser preparados e utilizados para transformar uma linha celular apropriada, p. ex. uma linha celular de mieloma não produtora, tal como uma linha NSO de ratinho ou uma linha bacteriana, p. ex. de *E. coli*, na qual ocorrerá a produção do anticorpo. A fim de obter uma transcrição e tradução eficientes, a sequência de ADN em cada vector deve incluir sequências reguladoras apropriadas, particularmente uma sequência promotora e uma líder operativamente ligadas à sequência do domínio variável. Métodos particulares para produzir anticorpos desta forma são geralmente bem conhecidos e utilizados rotineiramente. Por exemplo, procedimentos básicos de biologia molecular são descritos por Maniatis *et al.* ("*Molecular Cloning*", Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989); a sequenciação de ADN pode ser efectuada tal como descrito em Sanger *et al.* (*PNAS* 74: 5463, 1977) e pelo "Amersham International plc sequencing handbook"; e a mutagénesse dirigida ao local pode ser realizada de acordo com o método de Kramer *et al.* (*Nucl. Acids Res.* 12: 9441, 1984) e o "Anglian Biotechnology Ltd

handbook". Adicionalmente, há numerosas publicações, detalhando as técnicas adequadas para a preparação de anticorpos através da manipulação de ADN, criação de vectores de expressão e transformação de células apropriadas, por exemplo tal como revisto por Mountain A. e Adair, J.R. em "Biotechnology and Genetic Engineering Reviews" (ed. Tombs, M.P., 10, Capítulo 1, 1992, Intercept, Andover, UK) e no Fascículo de Patente Internacional N° WO 91/09967.

Onde desejado, o anticorpo de acordo com o presente invento pode ter uma ou mais moléculas efectoras ou repórter unidas a ele e o presente invento estende-se a tais proteínas modificadas. As moléculas efectoras ou repórter podem ser unidas ao anticorpo através de qualquer cadeia lateral de aminoácidos disponível, aminoácido terminal ou, quando estiver presente, um grupo funcional de hidrato de carbono situado no anticorpo, sempre desde que, como é claro, este não afecte adversamente as propriedades de ligação e a eventual utilidade da molécula. Grupos funcionais particulares incluem, por exemplo, qualquer grupo amino, imino, tiol, hidroxilo, carboxilo ou aldeído livre. A união do anticorpo e da(s) molécula(s) efectora(s) e/ou repórter pode ser alcançada através de tais grupos e de um grupo funcional apropriado nas moléculas efectoras ou repórter. A ligação pode ser directa ou indirecta, através de grupos espaçadores ou de ponte.

As moléculas efectoras incluem, por exemplo, agentes anti-neoplásicos, toxinas (tais como toxinas enzimaticamente activas de origem bacteriana ou vegetal e fragmentos destas, p. ex. rícino e fragmentos deste), proteínas biologicamente activas, por exemplo enzimas, ácidos nucleicos e fragmentos destes, p. ex. ADN, ARN e fragmentos destes, polímeros de ocorrência natural e sintéticos, p. ex. polímeros de polialquileno tais como poli(etilenoglicol) e derivados destes, radionúclidos, particularmente radioiodeto, e metais quelantes. Grupos repórter adequados incluem metais quelantes, compostos fluorescentes ou compostos que podem ser detectados através de RMN ou espectroscopia ESR.

Agentes anti-neoplásicos particulares incluem agentes citotóxicos e citostáticos, por exemplo agentes alquilantes,

tais como mostardas de azoto (p. ex. clorambucilo, melfalano, mecloretamina, ciclofosfamida ou mostarda de uracilo) e derivados destas, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida, bussulfano ou cisplatina; anti-metabolitos, tais como metotrexato, fluorouracilo, floxuridina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, ácido fluoroacético ou ácido fluorocítrico, antibióticos, tais como bleomicinas (por exemplo sulfato de bleomicina), doxorubicina, daunorrubicina, mitomicinas (por exemplo mitomicina C), actinomicinas (p. ex., dactinomicina), plicamicina, caliqueamicina e derivados destes, ou esperamicina e derivados desta; inibidores mitóticos, tais como etoposido, vincristina ou vinblastina e derivados destes; alcalóides, tais como elipticina; polióis tais como taxicina-I ou taxicina-II, hormonas, tais como androgénios (p. ex., dromostanolona ou testolactona), progestinas (p. ex., acetato de megestrol ou acetato de medroxiprogesterona), estrogénios (p. ex., difosfato de dimetilestilbestrol, fosfato de poliestradiol ou fosfato de estramustina) ou anti-estrogénios (p. ex., tamoxifeno); antraquinonas, tais como mitoxantrona, ureias, tais como hidroxiurea; hidrazinas, tais como procarbazona; ou imidazoles, tais como dacarbazina.

Grupos efectores particularmente úteis são a caliqueamicina e derivados desta (ver por exemplo Fascículos de Patente Sul Africana N^{os} 85/8794, 88/8127 e 90/2839).

Metais quelados incluem quelatos de metais di- ou tripositivos possuindo um número de coordenação de 2 a 8 inclusive. Exemplos particulares de tais metais incluem tecnécio (Tc), rénio (Re), cobalto (Co), cobre (Cu), ouro (Au), prata (Ag), chumbo (Pb), bismuto (Bi), índio (In), gálio (Ga), ítrio (Y), térbio (Tb), gadolínio (Gd), e escândio (Sc). Em geral o metal é de preferência um radionúclido. Radionúclidos particulares incluem ^{99m}Tc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ⁵⁸Co, ⁶⁰Co, ⁶⁷Cu, ¹⁹⁵Au, ¹⁹⁹Au, ¹¹⁰Ag, ²⁰³Pb, ²⁰⁶Bi, ²⁰⁷Bi, ¹¹¹In, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁸⁸Y, ⁹⁰Y, ¹⁶⁰Tb, ¹⁵³Gd e ⁴⁷Sc.

O metal quelado pode ser por exemplo um dos tipos de cima de metal quelado com qualquer agente quelante polidentado adequado, por exemplo poliaminas acíclicas ou

cíclicas, poliéteres, (p. ex. éteres coroa e derivados destes); poliamidas; porfirinas; e derivados carbocíclicos.

Em geral, o tipo de agente quelante dependerá do metal em utilização. No entanto, um grupo particularmente útil de agentes quelantes em conjugados de acordo com o presente invento são as poliaminas acíclicas e cíclicas, especialmente ácidos poliaminocarboxílicos, por exemplo ácido dietilenotriaminopentaacético e derivados deste, e aminas macrocíclicas, p. ex. derivados tri-aza e tetra-aza cíclicos (por exemplo tal como descrito no Fascículo de Patente Internacional N° WO 92/22583); e poliamidas, especialmente desferrioxamina e derivados desta.

Assim, por exemplo, quando se deseja utilizar um grupo tiol no anticorpo como ponto de união, isto pode ser alcançado através de reacção com um grupo reactivo tiol presente na molécula efectora ou repórter. Exemplos de tais grupos incluem um ácido ou éster α -halocarboxílico, p. ex. iodoacetamida, uma imida, p. ex. maleimida, uma vinil-sulfona, ou um dissulfureto. Estes e outros procedimentos de ligação adequados são descritos geralmente e mais particularmente nos Fascículos de Patente Internacional N^{os} WO 93/06231, WO 92/22583, WO 90/091195 e WO 89/01476.

ENSAIOS PARA SELECIONAR MOLÉCULAS QUE AUMENTEM A DENSIDADE ÓSSEA

Tal como discutido acima, o presente invento proporciona métodos para selecção e/ou isolamento de compostos que sejam capazes de aumentar a densidade óssea. Por exemplo, num aspecto do presente invento são proporcionados métodos para determinar se uma molécula seleccionada é capaz de aumentar o teor mineral ósseo, compreendendo os passos de (a) misturar uma molécula seleccionada com a proteína de ligação a TGF-beta e um membro seleccionado da família de proteínas TGF-beta, (b) determinar se a molécula seleccionada estimula a sinalização através da família de proteínas TGF-beta, ou inibe a ligação da proteína de ligação a TGF-beta à família de proteínas TGF-beta. Em certas concretizações, a molécula aumenta a capacidade de TGF-beta para funcionar como regulador positivo da diferenciação de células do mesênquima.

Noutros aspectos do presente invento, são proporcionados métodos para determinar se uma molécula seleccionada é capaz de aumentar o teor mineral ósseo, compreendendo os passos de (a) expor uma molécula seleccionada a células que expressam a proteína de ligação a TGF-beta e (b) determinar se a expressão (ou actividade) da proteína de ligação a TGF-beta das referidas células expostas diminui, e a partir daí determinar se o composto é capaz de aumentar o teor mineral ósseo. Numa concretização, as células são seleccionadas a partir do grupo que consiste em osteoblastos de osso humano normal de biópsias de osso espontaneamente transformados ou não transformados e de osso parietal de rato. Tais métodos podem ser realizados numa ampla variedade de formatos de ensaio incluindo, por exemplo, Imuno-Electroforese Contracorrente (CIEP), Radioimunoensaios, Radioimunoprecipitações, Imunoensaios Enzimáticos (ELISA), ensaios "Dot Blot", ensaios de Inibição ou Competição e ensaios em sanduíche (ver Patentes U.S. N^{os} 4376110 e 4486530; ver também "Antibodies: A Laboratory Manual", *supra*).

Concretizações representativas de tais ensaios são proporcionadas abaixo nos Exemplos 5 e 6. Resumidamente, um membro da super-família TGF-beta ou uma proteína de ligação a TGF-beta são primeiramente ligados a uma fase sólido, seguido da adição de uma molécula candidata. O membro da família marcado da super-família TGF-beta ou uma proteína de ligação a TGF-beta é então adicionado ao ensaio, a fase sólida é lavada, e é determinada a quantidade de membro da super-família TGF-beta ou proteína de ligação a TGF-beta ligado ou marcado no suporte sólido. As moléculas que são adequadas para utilização no aumento do teor mineral ósseo tal como aqui descritas são aquelas moléculas que diminuem a ligação da proteína de ligação a TGF-beta a um membro ou membros da super-família TGF-beta de um modo estatisticamente significativo. Obviamente, os ensaios adequados para utilização no presente invento não devem ser limitados às concretizações descritas nos Exemplos 2 e 3. Em particular, numerosos parâmetros podem ser alterados, tal como através da ligação de TGF-beta a uma fase sólida, ou através da eliminação de uma fase sólida totalmente.

Noutros aspectos do presente invento, são proporcionados métodos para determinar se uma molécula seleccionada é capaz de aumentar o teor mineral ósseo, compreendendo os passos de (a) expor uma molécula seleccionada a células que expressam TGF-beta e (b) determinar se a actividade de TGF-beta das referidas células expostas é alterada, e a partir daí determinar se o composto é capaz de aumentar o teor mineral ósseo. De forma semelhante aos métodos acima descritos, pode ser utilizada uma grande variedade de métodos para avaliar as mudanças da expressão da proteína de ligação a TGF-beta devidas a um composto de teste seleccionado.

Por exemplo, dentro de um aspecto do presente invento são proporcionados métodos para determinar se uma molécula seleccionada é capaz de aumentar o teor mineral ósseo, compreendendo os passos de (a) misturar uma molécula seleccionada com a proteína de ligação a TGF-beta e um membro seleccionado da família de proteínas TGF-beta, (b) determinar se a molécula seleccionada sobre-regula a sinalização da família de proteínas TGF-beta, ou inibe a ligação da proteína de ligação a TGF-beta à família de proteínas TGF-beta. Em certas concretizações, a molécula aumenta a capacidade de TGF-beta para funcionar como regulador positivo da diferenciação de células do mesênquima.

De modo semelhante aos métodos acima descritos, pode ser utilizada uma ampla variedade de métodos para avaliar a estimulação de TGF-beta devido a um composto de teste seleccionado. Um tal método representativo é proporcionado abaixo no Exemplo 6 (ver também Durham *et al.*, *Endo.* 136: 1374-1380).

Ainda noutros aspectos do presente invento, são proporcionados métodos para determinar se uma molécula seleccionada é capaz de aumentar o teor mineral ósseo, compreendendo o passo de determinar se uma molécula seleccionada inibe a ligação da proteína de ligação a TGF-beta ao osso, ou a um análogo deste. Tal como aqui se utiliza, deve entender-se que o osso ou análogo deste se refere a hidroxapatite ou uma superfície composta de uma forma de osso pulverizada, osso esmagado ou osso intacto. De modo semelhante aos métodos acima descritos, pode ser

utilizada uma ampla variedade de métodos para avaliar a inibição da localização da proteína de ligação a TGF-beta na matriz óssea. Um tal método representativo é proporcionado abaixo no Exemplo 7.

Deve observar-se que embora os métodos aqui citados se possam referir à análise de uma molécula de teste individual, o presente invento não deve ser tão limitado. Em particular, a molécula seleccionada pode estar contida dentro de uma mistura de compostos. Assim, os métodos citados podem ainda compreender o passo de isolamento de uma molécula que iniba a ligação da proteína de ligação a TGF-beta a um membro da família TGF-beta.

MOLÉCULAS CANDIDATAS

Uma ampla variedade de moléculas pode ser ensaiada quanto à sua capacidade para inibir a ligação da proteína de ligação a TGF-beta a um membro da família TGF-beta. Exemplos representativos que são discutidos mais detalhadamente abaixo incluem moléculas orgânicas, proteínas ou péptidos e moléculas de ácido nucleico. Embora deva ser evidente a partir da discussão abaixo que as moléculas candidatas aqui descritas podem ser utilizadas nos ensaios aqui descritos, deve ser também facilmente aparente que tais moléculas podem também ser utilizadas numa variedade de cenários de diagnóstico e terapêuticos.

1. Moléculas Orgânicas

Numerosas moléculas orgânicas podem ser ensaiadas quanto à sua capacidade para inibir a ligação da proteína de ligação a TGF-beta a um membro da família TGF-beta.

Por exemplo, dentro de uma concretização do presente invento, moléculas orgânicas adequadas podem ser seleccionadas a partir de uma biblioteca química, em que os produtos químicos são ensaiados individualmente, ou a partir de bibliotecas químicas combinatórias onde múltiplos compostos são ensaiados de uma só vez, depois desconvoluídos para determinar e isolar os compostos mais activos.

Exemplos representativos de tais bibliotecas químicas combinatórias incluem as descritas por Agrafiotis *et al.*, "System and method of automatically generating chemical compounds with desired properties", Patente U.S. N° 5463564; Armstrong, R.W., "Synthesis of combinatorial arrays of organic compounds through the use of multiple component combinatorial array syntheses", WO 95/02566; Baldwin, J.J. *et al.*, "Sulfonamide derivatives and their use," WO 95/24186, Baldwin, J.J. *et al.*, "Combinatorial dihydrobenzopyran library", WO 95/30642; Brenner, S., "New kit for preparing combinatorial libraries," WO 95/16918; Chenera, B. *et al.*, "Preparation of library of resin-bound aromatic carbocyclic compounds", WO 95/16712; Ellman, J.A., "Solid phase and combinatorial synthesis of benzodiazepine compounds on a solid support", Patente U.S. N° 5288514; Felder, E. *et al.*, "Novel combinatorial compound libraries," WO 95/16209; Lerner, R. *et al.*, "Encoded combinatorial chemical libraries," WO 93/20242; Pavia, M.R. *et al.*, "A method for preparing and selecting pharmaceutically useful non-peptide compounds from a structurally diverse universal library," WO 95/04277; Summerton, J.E. e D.D. Weller, "Morpholino-subunit combinatorial library and method", Patente U.S. N° 5506337; Holmes, C., "Methods for the Solid Phase Synthesis of Thiazolidinones, Metathiazanones, and Derivatives thereof", WO 96/00148; Phillips, G.B. e G.P. Wei, "Solid-phase Synthesis of Benzimidazoles", *Tet. Letters* 37: 4887-90, 1996; Ruhland, B. *et al.*, "Solid-supported Combinatorial Synthesis of Structurally Diverse β -Lactams," *J. Amer. Chem. Soc.* 111: 253-4, 1996; Look, G.C. *et al.*, "The Identification of Cyclooxygenase-1 Inhibitors from 4-Thiazolidinone Combinatorial Libraries," *Bioorg and Med. Chem. Letters* 6: 707-12, 1996.

2. Proteínas e Péptidos

Uma ampla variedade de proteínas e péptidos pode ser igualmente utilizada como moléculas candidatas para inibidores da ligação da proteína de ligação a TGF-beta a um membro da família TGF-beta.

a. Bibliotecas Combinatórias de Péptidos

As moléculas peptídicas que são putativos inibidores da ligação da proteína de ligação a TGF-beta a um membro da família TGF-beta podem ser obtidas através da pesquisa de bibliotecas combinatórias de péptidos. Tais bibliotecas podem ser preparadas por um perito na arte (ver, p. ex., Patentes U.S. N^{os} 4528266 e 4359535, e Publicações de Patente do Tratado de Cooperação N^{os} WO 92/15679, WO 92/15677, WO 90/07862, WO 90/02809, ou adquiridas a partir de fontes comercialmente disponíveis (p. ex., Ph.D.TM Phage Display Peptide Library Kit de New England Biolabs).

b. Anticorpos

Os anticorpos que inibem a ligação da proteína de ligação a TGF-beta a um membro da família TGF-beta podem ser facilmente preparados dada a divulgação aqui proporcionada. No contexto do presente invento, os anticorpos são entendidos como incluindo anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos anti-idiotípicos, fragmentos de anticorpo (p. ex., Fab e F(ab')₂, regiões variáveis Fv ou regiões determinantes de complementaridade). Tal como discutido acima, os anticorpos são entendidos como sendo específicos contra a proteína de ligação a TGF-beta ou contra um membro específico da família TGF-beta, se se ligarem com uma K_a superior ou igual a 10⁷ M⁻¹, de preferência superior ou igual a 10⁸ M⁻¹, e não se ligam a outras proteínas de ligação a TGF-beta, ou ligam-se com uma K_a inferior ou igual a 10⁶ M⁻¹. Para além disso, os anticorpos do presente invento devem bloquear ou inibir a ligação da proteína de ligação a TGF-beta a um membro da família TGF-beta.

A afinidade de um anticorpo monoclonal ou de um parceiro de ligação, assim como a inibição da ligação podem ser facilmente determinadas por um vulgar perito na arte (ver Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51: 660-672, 1949).

Resumidamente, anticorpos policlonais podem ser facilmente gerados por um perito na arte a partir de uma variedade de animais de sangue quente tais como cavalos, vacas, várias aves da capoeira, coelhos, ratinhos ou ratos.

Tipicamente, a proteína de ligação a TGF-beta ou o péptido único desta de 13-20 aminoácidos (de preferência conjugado com hemocianina da lapa através de ligação cruzada com glutaraldeído) são utilizados para imunizar o animal através de injeções intraperitoneais, intramusculares, intra-oculares ou subcutâneas, juntamente com um adjuvante tal como adjuvante completo ou incompleto de Freund. Após diversas imunizações de reforço, são recolhidas amostras de soro e testadas quanto a reactividade com a proteína ou péptido. Anti-soros policlonais particularmente preferidos darão um sinal num destes ensaios que é pelo menos três vezes superior ao fundo. Assim que o título do animal alcançar um patamar em termos da sua reactividade com a proteína, quantidades maiores de anti-soro podem facilmente ser obtidas através de sangrias semanais ou retirando todo o sangue do animal.

Anticorpos monoclonais podem também ser facilmente gerados utilizando técnicas convencionais (ver Patentes U.S. N^{os} RE 32011, 4902614, 4543439 e 4411993, ver também "Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses", Plenum Press, Kennett, McKearn, e Bechtol (eds.), 1980, e "Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow e Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

Resumidamente, numa concretização um animal tal como um rato ou ratinho é imunizado com proteína de ligação a TGF-beta ou uma porção desta tal como descrito acima. A proteína pode ser misturada com um adjuvante tal como adjuvante completo ou incompleto de Freund para aumentar a resposta imunitária resultante. Entre uma e três semanas após a imunização inicial o animal pode ser re-imunizado com outra imunização de reforço e testado quanto à reactividade com a proteína utilizando ensaios descritos acima. Assim que o animal alcançar um patamar na sua reactividade com a proteína injectada, este é sacrificado e os órgãos que contêm um grande número de células B tais como o baço e os nódulos linfáticos são colhidos.

As células que são obtidas do animal imunizado podem ser imortalizadas através de infecção com um vírus tal como o vírus de Epstein-Barr (EBV) (ver Glasky e Reeding, *Hybridoma*

8(4): 377-389, 1989). Alternativamente, numa concretização preferida, as suspensões celulares do baço e/ou dos nódulos linfáticos colhidos são fundidas com uma célula de mieloma adequada para criar um "hibridoma" que secrete o anticorpo monoclonal. Linhas de mieloma adequadas incluem, por exemplo, NS-1 (ATCC N° TIB 18) e P3X63 - Ag 8.653 (ATCC N° CRL 1580).

Após a fusão, as células podem ser colocadas em placas de cultura contendo um meio adequado, tal como RPMI 1640 ou DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas), bem como ingredientes adicionais, tais como soro fetal bovino (FBS, i.e., de Hyclone, Logan, Utah ou JRH Biosciences). Adicionalmente, o meio deve conter um reagente que permita selectivamente o crescimento de células fundidas do baço e de mieloma tal como HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri). Após cerca de sete dias, as células fundidas ou os hibridomas resultantes podem ser seleccionados para determinar a presença de anticorpos que sejam reactivos contra a proteína de ligação a TGF-beta (dependendo do antigénio utilizado), e que bloqueiem ou inibam a ligação da proteína de ligação a TGF-beta a um membro da família TGF-beta.

Pode ser utilizada uma ampla variedade de ensaios para determinar a presença de anticorpos que sejam reactivos contra as proteínas do presente invento, incluindo por exemplo imuno-electroforese contracorrente, radioimunoensaios, radioimunoprecipitações, imunoensaios enzimáticos (ELISA), ensaios "Dot Blot", "Western blots", imunoprecipitação, ensaios de inibição ou competição e ensaios em sanduíche (ver Patentes U.S. N°s 4376110 e 4486530; ver também "Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow e Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Após várias diluições clonais e reensaaios, pode ser isolado um hibridoma que produza anticorpos reactivos contra a proteína desejada.

Podem também ser utilizadas outras técnicas para construir anticorpos monoclonais (ver William D. Huse et al., "Generation of a Large Combinational Library of the Immunoglobulin Repertoire in Phage Lambda", *Science* 246: 1275-1281, Dezembro de 1989; ver também L. Sastry et al.,

"Cloning of the Immunological Repertoire in *Escherichia coli* for Generation of Monoclonal Catalytic Antibodies: Construction of a Heavy Chain Variable Region-Specific cDNA Library", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5728-5732, Agosto de 1989; ver também Michelle Alting-Mees et al., "Monoclonal Antibody Expression Libraries: A Rapid Alternative to Hybridomas", *Strategies in Molecular Biology* 3: 1-9, Janeiro de 1990). Estas referências descrevem um sistema comercial disponível em Stratagene (La Jolla, Califórnia) que permite a produção de anticorpos através de técnicas recombinantes. Resumidamente, o ARNm é isolado a partir de uma população de células B e utilizado para criar bibliotecas de expressão de ADNc de imunoglobulinas de cadeia pesada e leve nos vectores λ ImmunoZap(H) and λ ImmunoZap(L). Estes vectores podem ser pesquisados individualmente ou co-expressos para formar fragmentos Fab ou anticorpos (ver Huse et al., *supra*; ver também Sastry et al., *supra*). As placas fágicas positivas podem ser subsequentemente convertidas num plasmídeo não lítico que permita um elevado nível de expressão de fragmentos de anticorpo monoclonal a partir de *E. coli*.

Semelhantemente, porções ou fragmentos, tais como fragmentos Fab e Fv, de anticorpos podem também ser construídos utilizando digestão enzimática convencional ou técnicas de ADN recombinante para incorporar as regiões variáveis de um gene que codifique um anticorpo que se ligue especificamente. Numa concretização, os genes que codificam a região variável de um híbrido produtor de um anticorpo monoclonal de interesse são amplificados utilizando iniciadores nucleotídicos para a região variável. Estes iniciadores podem ser sintetizados por um perito na arte ou podem ser adquiridos de fontes comercialmente disponíveis. Stratagene (La Jolla, Califórnia) vende iniciadores para as regiões variáveis de rato e humana incluindo, entre outros, iniciadores para as regiões V_{Ha} , V_{Hb} , V_{Hc} , V_{Hd} , C_{H1} , V_L e C_L . Estes iniciadores podem ser utilizados para amplificar regiões variáveis das cadeias pesada ou leve, que podem então ser inseridas em vectores tais como ImmunoZAP™ H ou ImmunoZAP™ L (Stratagene), respectivamente. Estes vectores podem então ser introduzidos em *E. coli*, levedura ou sistemas baseados em mamífero para expressão. Utilizando estas técnicas, podem ser produzidas grandes quantidades de uma

proteína de cadeia simples contendo uma fusão dos domínios V_H e V_L (ver Bird *et al.*, *Science* 242: 423-426, 1988). Adicionalmente, tais técnicas podem ser utilizadas para alterar um anticorpo "de murídeo" num anticorpo "humano", sem alterar a especificidade de ligação do anticorpo.

Uma vez obtidos anticorpos adequados, estes podem ser isolados ou purificados através de muitas técnicas bem conhecidas dos vulgares peritos na arte (ver "Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow e Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). As técnicas adequadas incluem colunas de afinidade de péptidos ou proteínas, HPLC ou RP-HPLC, purificação em colunas de proteína A ou proteína G ou qualquer combinação destas técnicas.

c. Proteínas de Ligação a TGF-beta Mutantes

Tal como aqui descrito e abaixo nos Exemplos (p. ex., Exemplos 8 e 9), versões alteradas de proteína de ligação a TGF-beta que competem com a capacidade da proteína de ligação a TGF-beta nativa para bloquear a actividade de um determinado membro da família TGF-beta devem conduzir a uma maior densidade óssea. Assim, mutantes da proteína de ligação a TGF-beta que se liguem ao membro da família TGF-beta mas não inibam a função do membro da família TGF-beta verificariam os critérios. As versões mutantes devem competir eficazmente com as funções inibidoras endógenas da proteína de ligação a TGF-beta.

d. Produção das Proteínas

Embora vários genes (ou porções destes) sejam aqui proporcionados, deve entender-se que dentro do contexto do presente invento, a referência a um ou mais destes genes inclui derivados dos genes que sejam substancialmente semelhantes aos genes (e, quando apropriado, as proteínas (incluindo péptidos e polipéptidos) que são codificadas pelos genes e seus derivados). Tal como aqui se utiliza, uma sequência nucleotídica é julgada ser "substancialmente semelhante" se: (a) a sequência nucleotídica for derivada da região de codificação dos genes acima descritos e incluir, por exemplo, porções da sequência ou variações alélicas das

sequências discutidas acima, ou, alternativamente, codificar uma molécula que iniba a ligação da proteína de ligação a TGF-beta a um membro da família TGF-beta; (b) a sequência nucleotídica for capaz de hibridar com sequências nucleotídicas do presente invento sob rigor moderado, elevado ou muito elevado (ver Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989); ou (c) as sequências de ADN forem degeneradas em consequência do código genético para as sequências de ADN definidas em (a) ou (b). Mais, a molécula de ácido nucleico aqui divulgada inclui tanto sequências complementares como não complementares, desde que as sequências verifiquem de outro modo os critérios aqui expostos. No contexto do presente invento, rigor elevado significa condições padrão de hibridação (p. ex., SSPE 5x, SDS a 0,5% a 65°C, ou equivalente).

A estrutura das proteínas codificadas pelas moléculas de ácido nucleico aqui descritas pode ser prevista a partir dos produtos primários de tradução utilizando a função do gráfico de hidrofobicidade, por exemplo, de P/C Gene ou Intelligenetics Suite (Intelligenetics, Mountain View, Califórnia) ou de acordo com os métodos descritos por Kyte e Doolittle (*J. Mol. Biol.* 157: 105-132, 1982).

As proteínas do presente invento podem ser preparadas na forma de sais ácidos ou básicos ou na forma neutra. Adicionalmente, resíduos de aminoácidos individuais podem ser modificados através de oxidação ou redução. Para além disso, podem ser feitas várias substituições, deleções ou adições às sequências de aminoácidos ou de ácido nucleico, sendo o efeito líquido destas manter ou aumentar ou diminuir mais a actividade biológica da proteína mutante ou de tipo selvagem. Para além disso, devido à degenerescência do código genético, por exemplo, pode haver uma variação considerável nas sequências nucleotídicas que codificam a mesma sequência de aminoácidos.

Outros derivados das proteínas aqui divulgadas incluem conjugados das proteínas juntamente com outras proteínas ou polipéptidos. Isto pode ser alcançado, por exemplo, através da síntese de proteínas de fusão N-terminais ou C-terminais

que podem ser adicionadas para facilitar a purificação ou identificação das proteínas (ver Patente U.S. Nº 4851341, ver também, Hopp et al., *Bio/Technology* 6: 1204, 1988). Alternativamente, podem ser construídas proteínas de fusão tais como Flag/proteína de ligação a TGF-beta para ajudar na identificação, expressão e análise da proteína.

As proteínas do presente invento podem ser construídas utilizando uma ampla variedade de técnicas aqui descritas. Mais, podem ser introduzidas mutações em determinados *loci* através da síntese de oligonucleótidos contendo uma sequência mutante, flanqueada por locais de restrição que permitam a ligação a fragmentos da sequência nativa. Após a ligação, a sequência reconstruída resultante codifica um derivado possuindo a inserção, substituição ou deleção de aminoácidos desejada.

Alternativamente, podem ser empregues procedimentos de mutagênese específica do local (ou específica do segmento) dirigida por oligonucleótidos para proporcionar um gene alterado possuindo determinados códons alterados de acordo com a substituição, deleção ou inserção necessária. Métodos exemplares de fazer as alterações expostas acima são divulgados por Walder et al. (*Gene* 42: 133, 1986); Bauer et al. (*Gene* 37: 73, 1985); Craik (*BioTechniques*, Janeiro de 1985, 12-19); Smith et al. ("Genetic Engineering: Principles and Methods", Plenum Press, 1981); e Sambrook et al. (*supra*). Os derivados de deleção ou truncagem das proteínas (p. ex., uma porção extracelular solúvel) podem também ser construídos através da utilização de locais convenientes de endonucleases de restrição adjacentes à deleção desejada. Subsequente à restrição, as extremidades salientes podem ser preenchidas e o ADN religado. Métodos exemplares de fazer as alterações expostas acima são divulgados por Sambrook et al. ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

As mutações que são feitas nas moléculas de ácido nucleico do presente invento conservam de preferência o enquadramento de leitura das sequências de codificação. Para além disso, de preferência as mutações não criarão regiões complementares que poderiam hibridar para produzir estruturas

de ARNm secundárias, tais como laços ou ganchos, que afectariam adversamente a tradução do ARNm. Embora um local de mutação possa ser predeterminado, não é necessário que a natureza da mutação esteja *per se* predeterminada. Por exemplo, para seleccionar características óptimas dos mutantes num dado local, pode ser efectuada metagénese aleatória no codão alvo e os mutantes expressos pesquisados quanto a actividade biológica indicativa. Alternativamente, as mutações podem ser introduzidas em determinados *loci* através de síntese de oligonucleótidos contendo uma sequência mutante, flanqueada por locais de restrição permitindo a ligação a fragmentos da sequência nativa. Após a ligação, a sequência reconstruída resultante codifica um derivado possuindo a inserção, substituição ou deleção de aminoácidos desejada.

As moléculas de ácido nucleico que codificam proteínas do presente invento podem também ser construídas utilizando técnicas de mutagénese por PCR, mutagénese química (Drinkwater e Klinedinst, *PNAS* 83: 3402-3406, 1986), através de má incorporação nucleotídica forçada (p. ex., Liao e Wise *Gene* 88: 107-111, 1990), ou através da utilização de oligonucleótidos mutagenizados de forma aleatória (Horwitz *et al.*, *Genome* 3: 112-117, 1989).

O presente invento proporciona também a manipulação e expressão dos genes acima descritos através de cultura de células hospedeiras contendo um vector capaz de expressar os genes acima descritos. Tais vectores ou construções de vector incluem moléculas de ácido nucleico sintéticas ou derivadas de ADNc codificando a proteína desejada, que são operativamente ligadas a elementos reguladores da transcrição ou da tradução adequados. Os elementos reguladores adequados podem ser derivados de uma variedade de fontes, incluindo genes bacterianos, fúngicos, virais, de mamífero, de insecto ou vegetais. A selecção dos elementos reguladores apropriados está dependente da célula hospedeira escolhida e pode ser facilmente realizada por um vulgar perito na arte. Exemplos de elementos reguladores incluem: um promotor e estimulador da transcrição ou uma sequência de ligação à ARN-polimerase, um terminador da transcrição e uma sequência de ligação ao ribossoma, incluindo um sinal de iniciação da tradução.

As moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma das proteínas descritas acima podem ser facilmente expressas por uma ampla variedade de células hospedeiras procarióticas e eucarióticas, incluindo células bacterianas, de mamífero, de levedura ou outros fungos, virais, de insecto ou vegetais. Os métodos para transformar ou transfectar tais células para expressar ADN estranho são bem conhecidos na arte (ver, p. ex., Itakura et al., Patente U.S. N° 4704362; Hinnen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1929-1933, 1978; Murray et al., Patente U.S. N° 4801542; Upshall et al., Patente U.S. N° 4935349; Hagen et al., Patente U.S. N° 4784950; Axel et al., Patente U.S. N° 4399216; Goeddel et al., Patente U.S. N° 4766075; e Sambrook et al. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; para células vegetais ver Czako e Marton, *Plant Physiol.* 104: 1067-1071, 1994; e Paszkowski et al., *Biotech.* 24: 387-392, 1992).

As células hospedeiras bacterianas adequadas para realizar o presente invento incluem *E. coli*, *B. subtilis*, *Salmonella typhimurium* e várias espécies dentro dos géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Staphylococcus*, bem como muitas outras espécies bacterianas bem conhecidas dos peritos na arte. Exemplos representativos de células hospedeiras bacterianas incluem DH5 α (Stratagene, La Jolla, Califórnia).

Os vectores de expressão bacterianos compreendem de preferência um promotor que funciona na célula hospedeira, um ou mais marcadores fenotípicos seleccionáveis e uma origem de replicação bacteriana. Promotores representativos incluem o sistema promotor da β -lactamase (penicilinase) e lactose (ver Chang et al., *Nature* 275: 615, 1978), o promotor da ARN-polimerase T7 (Studier et al., *Meth. Enzymol.* 185: 60-89, 1990), o promotor lambda (Elvin et al., *Gene* 87: 123-126, 1990), o promotor *trp* (Nichols e Yanofsky, *Meth. in Enzymology* 101: 155, 1983) e promotor *tac* (Russell et al., *Gene* 20: 231, 1982). Marcadores seleccionáveis representativos incluem vários marcadores de resistência a antibióticos tais como os genes de resistência a canamicina ou a ampicilina. Muitos plasmídeos adequados para transformar células hospedeiras são bem conhecidos na arte, incluindo entre outros, pBR322 (ver Bolivar et al., *Gene* 2: 95, 1977),

os plasmídeos pUC pUC18, pUC19, pUC118, pUC119 (ver Messing, *Meth. in Enzymology* 101: 20-77, 1983 e Vieira e Messing, *Gene* 19: 259-268, 1982), e pNH8A, pNH16a, pNH18a e Bluescript M13 (Stratagene, La Jolla, Califórnia).

As células hospedeiras de levedura e fungos adequadas para realizar o presente invento incluem, entre outras, *Saccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, os gêneros *Pichia* ou *Kluyveromyces* e várias espécies do gênero *Aspergillus* (McKnight et al., Patente U.S. N° 4935349). Vectores de expressão adequados para levedura e fungos incluem, entre outros, YCp50 (ATCC N° 37419) para levedura e o vector de clonagem amdS pV3 (Turnbull, *Bio/Technology* 7: 169, 1989), YRp7 (Struhl et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1035-1039, 1978), YEp13 (Broach et al., *Gene* 8: 121-133, 1979), pJDB249 e pJDB219 (Beggs, *Nature* 275: 104-108, 1978) e derivados destes.

Promotores preferidos para utilização em levedura incluem promotores de genes glicolíticos de levedura (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* 255: 12073-12080, 1980; Alber e Kawasaki, *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 419-434, 1982) ou de genes da álcool-desidrogenase (Young et al., em "Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals", Hollaender et al. (eds.), pág. 355, Plenum, New York, 1982; Ammerer, *Meth. Enzymol.* 101: 192-201, 1983). Exemplos de promotores úteis para vectores fúngicos incluem os derivados de genes glicolíticos de *Aspergillus nidulans*, tais como o promotor *adh3* (McKnight et al., *EMBO. J.* 4: 2093-2099, 1985). As unidades de expressão podem também incluir um terminador da transcrição. Um exemplo de um terminal adequado é o terminador *adh3* (McKnight et al., *ibid.*, 1985).

Tal como com os vectores bacterianos, os vectores de levedura incluirão geralmente um marcador seleccionável, que pode ser um de vários genes que exibem um fenótipo dominante para o qual existe um ensaio fenotípico para permitir que os transformantes sejam seleccionados. Marcadores seleccionáveis preferidos são os que complementam a auxotrofia da célula hospedeira, proporcionam resistência a antibióticos ou permitem que uma célula utilize fontes específicas de carbono, e incluem *leu2* (Broach et al., *ibid.*), *ura3*

(Botstein *et al.*, *Gene* 8: 17, 1979) ou *his3* (Struhl *et al.*, *ibid.*). Outro marcador seleccionável adequado é o gene *cat*, que confere resistência a cloranfenicol em células de levedura.

As técnicas para transformar fungos são bem conhecidas na literatura e foram descritas, por exemplo, por Beggs (*ibid.*), Hinnen *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1929-1933, 1978), Yelton *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1740-1747, 1984) e Russell (*Nature* 301: 167-169, 1983). O genótipo da célula hospedeira pode conter um defeito genético que seja complementado pelo marcador seleccionável presente no vector de expressão. A escolha de um determinado hospedeiro e marcador seleccionável está bem dentro do nível da vulgar perícia na arte.

Os protocolos para a transformação de levedura são também bem conhecidos dos peritos na arte. Por exemplo, a transformação pode ser facilmente realizada através da preparação de esferoplastos de levedura com ADN (ver Hinnen *et al.*, *PNAS USA* 75: 1929, 1978) ou através de tratamento com sais alcalinos tais como LiCl (ver Itoh *et al.*, *J. Bacteriology* 153: 163, 1983). A transformação de fungos pode também ser realizada utilizando polietilenoglicol tal como descrito por Cullen *et al.* (*Bio/Technology* 5: 369, 1987).

Vectores virais incluem os que compreendem um promotor que dirige a expressão de uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica uma proteína desejada tal como descrito acima. Uma ampla variedade de promotores pode ser utilizada no contexto do presente invento, incluindo, por exemplo, promotores tais como LTR de MoMLV, LTR de RSV, LTR de MuLV de Friend, promotor adenoviral (Ohno *et al.*, *Science* 265: 781-784, 1994), promotor/estimulador da neomicina-fosfotransferase, promotor tardio de parvovírus (Koering *et al.*, *Hum. Gene Therap.* 5: 457-463, 1994), promotor de TK de Herpes, promotor de SV40, promotor/estimulador do gene da metalotioneína IIa, promotor inicial imediato de citomegalovírus e o promotor tardio imediato de citomegalovírus. Em concretizações particularmente preferidas do presente invento, o promotor é um promotor específico de tecido (ver por exemplo, WO 91/02805; EP 0415731; e WO

90/07936). Exemplos representativos de promotores específicos de tecido adequados incluem o promotor da enolase específico dos nervos, o promotor do factor de crescimento beta derivado de plaquetas, o promotor da proteína morfogénica do osso, o promotor da quimaerina alfa 1 humana, o promotor da sinapsina I e o promotor da sinapsina II. Para além dos promotores acima observados, podem ser utilizados outros promotores específicos de vírus (p. ex., promotores retrovirais (incluindo os observados acima, bem como outros tais como promotores de HIV), de hepatite, herpes (p. ex., EBV)) e promotores específicos de bactérias, fungos ou parasitas (p. ex., da malária) a fim de direccionar para uma célula ou um tecido específico que seja infectado com um vírus, bactéria fungo ou parasita.

Células de mamífero adequadas para realizar o presente invento incluem, entre outras, COS, CHO, SaOS, osteossarcomas, KS483, MG-63, osteoblastos primários e estroma da medula óssea humana ou de mamífero. Os vectores de expressão de mamífero para utilizar na realização do presente invento incluirão um promotor capaz de dirigir a transcrição de um gene ou ADNc clonado. Os promotores preferidos incluem promotores virais e promotores celulares. Promotores específicos do osso incluem o promotor da sialo-proteína do osso e o promotor para a osteocalcina. Promotores virais incluem o promotor inicial imediato de citomegalovírus (Boshart *et al.*, *Cell* 41: 521-530, 1985), o promotor tardio imediato de citomegalovírus, o promotor de SV40 (Subramani *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 1: 854-864, 1981), LTR de MMTV, LTR de RSV, da metalotioneína-1, do adenovírus Ela. Promotores celulares incluem o promotor da metalotioneína-1 de ratinho (Palmiter *et al.*, Patente U.S. N° 4579821), um promotor de V_k de ratinho (Bergman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7041-7045, 1983; Grant *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 15: 5496, 1987) e um promotor de V_H de ratinho (Loh *et al.*, *Cell* 33: 85-93, 1983). A escolha do promotor dependerá, pelo menos em parte, do nível de expressão desejado ou da linha celular receptora a transfectar.

Tais vectores de expressão podem também conter um conjunto de locais de processamento do ARN situados a jusante do promotor e a montante da sequência de ADN que codifica o

péptido ou a proteína de interesse. Os locais de processamento do ARN preferidos podem ser obtidos a partir de genes de adenovírus e/ou de imunoglobulinas. Está também contido nos vectores de expressão um sinal de poliadenilação situado a jusante da sequência de codificação de interesse. Sinais de poliadenilação adequados incluem os sinais de poliadenilação inicial e tardio de SV40 (Kaufman e Sharp, *ibid.*), o sinal de poliadenilação da região ElB do Adenovírus 5 e o terminador do gene da hormona do crescimento humana (DeNoto *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 9: 3719-3730, 1981). Os vectores de expressão podem incluir uma sequência líder viral não codificante, tal como o líder tripartido do Adenovírus 2, situada entre o promotor e os locais de processamento do ARN. Os vectores preferidos podem também incluir sequências estimuladoras, tais como o estimulador de SV40. Os vectores de expressão podem também incluir sequências codificando os ARNs do Adenovírus VA. Os vectores de expressão adequados podem ser obtidos a partir de fontes comerciais (p. ex., Stratagene, La Jolla, Califórnia).

As construções de vectores compreendendo sequências de ADN clonadas podem ser introduzidas em células de mamífero em cultura, por exemplo, através de transfecção mediada por fosfato de cálcio (Wigler *et al.*, *Cell* 14: 725, 1978; Corsaro e Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7: 603, 1981; Graham e Van der Eb, *Virology* 52: 456, 1973), electroporação (Neumann *et al.*, *EMBO J.* 1: 841-845, 1982), ou transfecção mediada por DEAE-dextrano (Ausubel *et al.* (eds.), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987). Para identificar as células que integraram de forma estável o ADN clonado, é geralmente introduzido nas células um marcador seleccionável juntamente com o gene ou o ADNc de interesse. Os marcadores seleccionáveis preferidos para utilizar em células de mamífero em cultura incluem os genes que conferem resistência a fármacos, tais como neomicina, higromicina e metotrexato. O marcador seleccionável pode ser um marcador seleccionável amplificável. Os marcadores seleccionáveis amplificáveis preferidos são o gene de DHFR e gene de resistência à neomicina. Os marcadores seleccionáveis são revistos por Thilly ("Mammalian Cell Technology", Butterworth Publishers, Stoneham, Massachusetts).

As células de mamífero contendo um vector adequado são deixadas a crescer durante um período de tempo, tipicamente 1-2 dias, para começarem a expressar a(s) sequência(s) de ADN de interesse. A selecção por fármacos é então aplicada para seleccionar o crescimento das células que estão a expressar o marcador seleccionável de uma forma estável. Para as células que foram transfectadas com um marcador seleccionável amplificável a concentração do fármaco pode ser aumentada de um modo gradual para aumentar o número de cópias das sequências clonadas, aumentando desse modo os níveis de expressão. As células que expressam as sequências introduzidas são seleccionadas e pesquisadas quanto à produção da proteína de interesse na forma desejada ou ao nível desejado. As células que satisfizerem estes critérios podem então ser clonadas e propagadas para produção.

Os protocolos para a transfecção de células de mamífero são bem conhecidos dos vulgares peritos na arte. Métodos representativos incluem transfecção mediada por fosfato de cálcio, electroporação, lipofecção, transfecção retroviral, adenoviral e mediada por fusão de protoplastos (ver Sambrook *et al.*, *supra*). Construções de vectores nus podem também ser tomadas por células musculares ou por outras células adequadas após injeção no músculo de um mamífero (ou de outros animais).

Numerosas células hospedeiras de insecto conhecidas na arte podem também ser úteis no presente invento, à luz do presente fascículo. Por exemplo, a utilização de baculovírus como vectores para expressar sequências de ADN heterólogas em células de insecto foi revista por Atkinson *et al.* (*Pestic. Sci.* 28: 215-224, 1990).

Numerosas células hospedeiras vegetais conhecidas na arte podem também ser úteis no presente invento, à luz do presente fascículo. Por exemplo, a utilização de *Agrobacterium rhizogenes* como vectores para expressar genes em células vegetais foi revista por Sinkar *et al.* (*J. Biosci. (Bangalore)* 11: 47-58, 1987).

Dentro de aspectos relacionados do presente invento, as proteínas do presente invento podem ser expressas num animal

transgénico cujas células germinativas e somáticas contenham um gene que codifique a proteína desejada e que esteja operativamente ligado a um promotor eficaz para a expressão do gene. Alternativamente, de um modo semelhante podem ser preparados animais transgénicos que não tenham o gene desejado (p. ex., ratinhos "knock-out"). Tais transgénicos podem ser preparados numa variedade de animais não humanos, incluindo ratinhos, ratos, coelhos, ovelhas, cães, cabras e porcos (ver Hammer et al., *Nature* 315: 680-683, 1985, Palmiter et al., *Science* 222: 809-814, 1983, Brinster et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4438-4442, 1985, Palmiter e Brinster, *Cell* 41: 343-345, 1985, e Patentes U.S. N^{os} 5175383, 5087571, 4736866, 5387742, 5347075, 5221778, e 5175384). Resumidamente, um vector de expressão, incluindo uma molécula de ácido nucleico a expressar juntamente com sequências de controlo da expressão apropriadamente posicionadas, é introduzido nos pronúcleos de ovos fertilizados, por exemplo, através de microinjecção. A integração do ADN injectado é detectada através da análise "blot" de ADN de amostras de tecido. É preferido que o ADN introduzido seja incorporado na linha germinativa do animal de modo a que seja passado para a descendência do animal. Expressão específica de tecido pode ser alcançada através da utilização de um promotor específico do tecido, ou através da utilização de um promotor indutível, tal como o promotor do gene da metalotioneína (Palmiter et al., 1983, *ibid*), que permite a expressão regulada do transgene.

As proteínas podem ser isoladas, entre outros métodos, através da cultura de sistemas hospedeiros e vectores adequados para produzir os produtos de tradução recombinantes do presente invento. Os sobrenadantes de tais linhas celulares, ou inclusões proteicas ou células inteiras quando a proteína não é excretada para o sobrenadante, podem então ser tratados através de uma variedade de procedimentos de purificação para isolar as proteínas desejadas. Por exemplo, o sobrenadante pode ser primeiro concentrado utilizando filtros de concentração de proteínas comercialmente disponíveis, tais como uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Depois da concentração, o concentrado pode ser aplicado numa matriz de purificação adequada tal como, por exemplo, um anticorpo anti-proteína ligado a uma

suporte adequado. Alternativamente, podem ser empregues resinas de permuta aniónica ou catiónica para purificar a proteína. Como outra alternativa, pode ser empregue um ou mais passos de cromatografia líquida de alta resolução de fase inversa (RP-HPLC) para purificar mais a proteína. Outros métodos de isolamento das proteínas do presente invento são bem conhecidos dos peritos na arte.

Uma proteína é considerada como estando "isolada" no contexto do presente invento se nenhuma outra proteína (indesejada) for detectada após análise de SDS-PAGE seguida de coloração de azul de Coomassie. Noutras concretizações, a proteína desejada pode ser isolada para que nenhuma outra proteína (indesejada) seja detectada após análise de SDS-PAGE seguida de coloração de prata.

3. Moléculas de Ácido Nucleico

Noutros aspectos do presente invento, são proporcionadas moléculas de ácido nucleico que são capazes de inibir a ligação da proteína de ligação a TGF-beta a um membro da família TGF-beta. Por exemplo, numa concretização são proporcionadas moléculas oligonucleotídicas anti-sentido que inibem especificamente a expressão das sequências de ácido nucleico da proteína de ligação a TGF-beta (ver geralmente, Hirashima *et al.* em "Molecular Biology of RNA: New Perspectives" (M. Inouye e B.S. Dudock, eds., 1987, Academic Press, San Diego, pág. 401); "Oligonucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression" (J.S. Cohen, ed., 1989 MacMillan Press, London); Stein e Cheng, *Science* 261: 1004-1012, 1993; WO 95/10607; Patente U.S. N° 5359051; WO 92/06693; e EP-A2-612844). Resumidamente, tais moléculas são construídas de forma a serem complementares a, e capazes de formar pares de bases Watson-Crick com, uma região da sequência de ARNm da proteína de ligação a TGF-beta transcrita. O ácido nucleico de cadeia dupla resultante interfere com o processamento subsequente do ARNm, impedindo desse modo a síntese da proteína (ver Exemplo 10).

Noutros aspectos do presente invento, são proporcionadas ribozimas que são capazes de inibir a ligação da proteína de ligação a TGF-beta a um membro da família TGF-beta. Tal como

aqui se utiliza, "ribozimas" pretende incluir moléculas de ARN contendo sequências anti-sentido para reconhecimento específico, e uma actividade enzimática de clivagem de ARN. A cadeia catalítica cliva um local específico num ARN alvo a uma concentração superior à estequiométrica. Uma ampla variedade de ribozimas pode ser utilizada no contexto do presente invento, incluindo por exemplo, a ribozima cabeça-de-martelo (por exemplo, tal como descrita por Forster e Symons, *Cell* 48: 211-220, 1987; Haseloff e Gerlach, *Nature* 328: 596-600, 1988; Walbot e Bruening, *Nature* 334: 196, 1988; Haseloff e Gerlach, *Nature* 334: 585, 1988); a ribozima de gancho (por exemplo, tal como descrita por Haseloff *et al.*, Patente U.S. N° 5254678, concedida a 19 de Outubro de 1993 e Hempel *et al.*, Publicação de Patente Europeia N° 0360257, publicada a 26 de Março de 1990); e ribozimas baseadas em ARN ribossómico de *Tetrahymena* (ver Cech *et al.*, Patente U.S. N° 4987071). As ribozimas do presente invento consistem tipicamente em ARN, mas podem também ser compostas por ADN, análogos de ácidos nucleicos (p. ex., fosforotioatos) ou quiméricos destes (p. ex., ADN/ARN/ARN).

4. Marcadores

O produto do gene ou qualquer uma das moléculas candidatas descritas acima e abaixo, podem ser marcados com uma variedade de compostos, incluindo por exemplo, moléculas fluorescentes, toxinas e radionúclidos. Exemplos representativos de moléculas fluorescentes incluem a fluoresceína, proteínas de *Phycobili*, tais como a ficoeritrina, a rodamina, o vermelho de Texas e a luciferase. Exemplos representativos de toxinas incluem rícino, abrina, toxina da difteria, toxina da cólera, gelonina, proteína antiviral da tintureira, tritina, toxina de *Shigella* e exotoxina A de *Pseudomonas*. Exemplos representativos de radionúclidos incluem Cu-64, Ga-67, Ga-68, Zr-89, Ru-97, Tc-99m, Rh-105, Pd-109, In-111, I-123, I-125, I-131, Re-186, Re-188, Au-198, Au-199, Pb-203, At-211, Pb-212 e Bi-212. Adicionalmente, os anticorpos descritos acima podem também ser marcados ou conjugados com um parceiro de um par de ligação de ligando. Exemplos representativos incluem as proteínas de ligação avidina-biotina e riboflavina-riboflavina.

Os métodos para conjugar ou marcar as moléculas aqui descritas com os marcadores representativos expostos acima podem ser facilmente alcançados por um vulgar perito na arte (ver "Trichothecene Antibody Conjugate", Patente U.S. N° 4744981; "Antibody Conjugate" Patente U.S. N° 5106951; "Fluorogenic Materials and Labeling Techniques", Patente U.S. N° 4018884; "Metal Radionuclide Labeled Proteins for Diagnosis and Therapy", Patente U.S. N° 4897255; e "Metal Radionuclide Chelating Compounds for Improved Chelation Kinetics", Patente U.S. N° 4988496; ver também Inman, "Methods In Enzymology, Vol. 34, Affinity Techniques, Enzyme Purification: Part B", Jakoby e Wilchek (eds.), Academic Press, New York, pág. 30, 1974; ver também Wilchek e Bayer, The Avidin-Biotin Complex in Bioanalytical Applications, *Anal. Biochem.* 171: 1-32, 1988).

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

Como observado acima, o presente invento proporciona também uma variedade de composições farmacêuticas, compreendendo uma das moléculas acima descritas que inibe a ligação da proteína de ligação a TGF-beta a um membro da família TGF-beta juntamente com um transportador, excipientes ou diluentes farmacêuticamente ou fisiologicamente aceitáveis. Geralmente, tais transportadores não devem ser tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações empregues. Vulgarmente, a preparação de tais composições envolve a combinação do agente terapêutico com tampões, antioxidantes tais como ácido ascórbico, polipéptidos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos), proteínas, aminoácidos, hidratos de carbono incluindo glucose, sacarose ou dextrinas, agentes quelantes tais como EDTA, glutatona e outros estabilizantes e excipientes. Solução salina tamponada neutra ou solução salina misturada com albumina de soro não específica são diluentes exemplares apropriados.

Adicionalmente, as composições farmacêuticas do presente invento podem ser preparadas para administração através de uma variedade de vias diferentes. Adicionalmente, as composições farmacêuticas do presente invento podem ser colocadas dentro de recipientes, juntamente com material de

empacotamento que proporcione instruções sobre a utilização de tais composições farmacêuticas. Geralmente, tais instruções incluirão uma expressão perceptível descrevendo a concentração do reagente, bem como, em certas concretizações, as quantidades relativas dos ingredientes do excipiente ou diluentes (por exemplo, água, solução salina ou PBS) que possam ser necessárias para reconstituir a composição farmacêutica.

MÉTODOS DE TRATAMENTO

O presente invento proporciona também o fabrico de medicamentos para aumentar o teor mineral e a densidade mineral do osso. Resumidamente, várias condições resultam na perda de teor mineral ósseo, incluindo por exemplo, doença, predisposição genética, acidentes que resultam na falta de utilização do osso (por exemplo, devido a fractura), terapêuticos que efectuem reabsorção de osso, ou que matem as células que formam o osso, e o envelhecimento normal. Através da utilização das moléculas aqui descritas que inibem a ligação da proteína de ligação a TGF-beta a um membro da família TGF-beta para o fabrico de medicamentos, tais condições podem ser tratadas ou prevenidas. Tal como aqui se utiliza, deve entender-se que o teor mineral ósseo foi aumentado, se o teor mineral ósseo tiver sido aumentado de um modo estatisticamente significativo (p. ex., mais de metade do desvio padrão) num local seleccionado.

As moléculas aqui descritas podem ser utilizadas no fabrico de medicamentos para tratar uma ampla variedade de condições que resultam na perda de teor mineral ósseo. Os pacientes com tais condições podem ser identificados através de diagnóstico clínico utilizando técnicas bem conhecidas (ver p. ex., "Harrison's Principles of Internal Medicine", McGraw-Hill, Inc.). Exemplos representativos de doenças que podem ser tratadas incluem displasias, em que há um crescimento ou desenvolvimento anormal do osso. Exemplos representativos de tais condições incluem acondroplasia, disostose cleidocraniana, encondromatose, displasia fibrosa, doença de Gaucher, raquitismo hipofosfatémico, doença de Marfan, exostoses múltiplas hereditárias, neurofibromatose, osteogénese imperfeita, osteopetrose, osteopoiquiloze, lesões

escleróticas, fracturas, doença periodontal, pseudartrose e osteomielite piogénica.

Outras condições que podem ser tratadas ou prevenidas utilizando os medicamentos do presente invento incluem uma ampla variedade de causas de osteopenia (i.e., uma condição que causa mais de um desvio padrão do teor ou densidade mineral óssea abaixo do pico do teor mineral esquelético na juventude). Exemplos representativos de tais condições incluem estados anémicos, condições causadas por esteróides, condições causadas por heparina, distúrbios da medula óssea, escorbuto, má-nutrição, deficiência de cálcio, osteoporose idiopática, osteopenia ou osteoporose congénita, alcoolismo, doença de fígado crónica, senilidade, estado de pós-menopausa, oligomenorreia, amenorreia, gravidez, diabetes mellitus, hipertiroidismo, doença de Cushing, acromegalia, hipogonadismo, imobilização ou inactividade, síndrome de distrofia do reflexo simpático, osteoporose regional transiente e osteomalácia.

Num aspecto o presente invento proporciona a utilização de uma molécula que inibe a ligação da proteína de ligação a TGF-beta a um membro da família TGF-beta no fabrico de um medicamento para aumentar o teor ou a densidade mineral óssea de um animal de sangue quente com o medicamento a proporcionar uma quantidade eficaz da molécula. Exemplos de animais de sangue quente que podem ser tratados incluem vertebrados e mamíferos, incluindo por exemplo, cavalos, vacas, porcos, ovelhas, cães, gatos, ratos e ratinhos. Exemplos representativos de moléculas terapêuticas incluem ribozimas, genes de ribozimas, oligonucleótidos anti-sentido e anticorpos (p. ex., anticorpos humanizados).

Noutros aspectos o presente invento compreende a introdução em células que se alojam no osso de um vector que dirija a expressão de uma molécula que iniba a ligação de uma proteína de ligação a TGF-beta a um membro da família TGF-beta podendo tais células ser então utilizadas no fabrico de um medicamento para aumentar a densidade óssea num animal de sangue quente. Resumidamente, as células que se alojam no osso podem ser obtidas directamente do osso de pacientes (p. ex., células obtidas da medula óssea tais como CD34+,

osteoblastos, osteócitos e semelhantes), do sangue periférico ou de culturas.

Um vector que dirige a expressão de uma molécula que inibe a ligação da proteína de ligação a TGF-beta a um membro da família TGF-beta é introduzido nas células. Exemplos representativos de vectores adequados incluem vectores virais tais como vectores virais de herpes (p. ex., Patente U.S. N° 5288641), vectores adenovirais (p. ex., WO 94/26914, WO 93/9191; Kolls *et al.*, *PNAS* 91(1): 215-219, 1994; Kass-Eisler *et al.*, *PNAS* 90(24): 11498-502, 1993; Guzman *et al.*, *Circulation* 88(6): 2838-48, 1993; Guzman *et al.*, *Cir. Res.* 73(6): 1202-1207, 1993; Zabner *et al.*, *Cell* 75(2): 207-216, 1993; Li *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 4(4): 403-409, 1993; Caillaud *et al.*, *Eur. J. Neurosci.* 5(10): 1287-1291, 1993; Vincent *et al.*, *Nat. Genet.* 5(2): 130-134, 1993; Jaffe *et al.*, *Nat. Genet.* 1(5): 372-378, 1992; e Levrero *et al.*, *Gene* 101(2): 195-202, 1991), vectores virais adeno-associados (WO 95/13365; Flotte *et al.*, *PNAS* 90(22): 10613-10617, 1993), vectores de baculovírus, vectores de parvovírus (Koering *et al.*, *Hum. Gene Therap.* 5: 457-463, 1994), vectores de poxvírus (Panicali e Paoletti, *PNAS* 79: 4927-4931, 1982; e Ozaki *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 193(2): 653-660, 1993), e retrovírus (p. ex., EP 0415731; WO 90/07936; WO 91/0285, WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; Patente U.S. N° 5219740; WO 93/11230; WO 93/10218). Do mesmo modo podem ser construídos vectores virais contendo uma mistura de diferentes elementos (p. ex., promotores, sequências do envelope e semelhantes) de diferentes vírus ou de fontes não virais. Em várias concretizações, quer o próprio vector viral quer uma partícula viral que contenha o vector viral podem ser utilizados nos métodos e nas composições descritos abaixo.

Noutras concretizações do presente invento, moléculas de ácido nucleico que codificam uma molécula que inibe a ligação da proteína de ligação a TGF-beta a um membro da família TGF-beta podem ser elas próprias administradas através de uma variedade de técnicas, incluindo, por exemplo, administração de asialo-osomucóide (ASOR) conjugado com complexos poli-L-lisina-ADN (Cristano *et al.*, *PNAS* 92122-92126, 1993), ADN ligado a adenovírus mortos (Curiel *et al.*, *Hum. Gene Ther.*

3(2): 147-154, 1992), introdução mediada por citofectina (DMRIE-DOPE, Vical, Califórnia), injeção directa de ADN (Acsadi et al., *Nature* 352: 815-818, 1991); ligando de ADN (Wu et al., *J. Biol. Chem.* 264: 16985-16987, 1989); lipofecção (Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7417, 1989); lipossomas (Pickering et al., *Circ.* 89(1): 13-21, 1994; e Wang et al., *PNAS* 84: 7851-7855, 1987); bombardeamento de microprojecteis (Williams et al., *PNAS* 88: 2726-2730, 1991); e distribuição directa de ácidos nucleicos que codificam a própria proteína sozinhos (Vile e Hart, *Cancer Res.* 53: 3860-3864, 1993) ou utilizando complexos PEG-ácido nucleico.

Exemplos representativos de moléculas que podem ser expressas pelos vectores do presente invento incluem ribozimas e moléculas anti-sentido, cada uma das quais é discutida mais detalhadamente acima.

A determinação do teor mineral ósseo aumentado pode ser determinada directamente através da utilização de raios X (p. ex., Absortometria de Raio X de Dupla Energia "DEXA"), ou por inferência através de marcadores de renovação óssea (fosfatase alcalina específica de osteoblastos, osteocalcina, pró-peptido do pró-colagénio C' de tipo 1 (PICP) e fosfatase alcalina total; ver Comier, C., *Curr. Opin. in Rheu.* 7: 243, 1995), ou marcadores de reabsorção óssea (piridinolina, desoxipiridinolina, N-telopéptido, hidroxiprolina urinária, fosfatases ácidas plasmáticas resistentes a tartrato e galactosil-hidroxilisina; ver Comier, *supra*). A quantidade de massa óssea pode também ser calculada a partir dos pesos corporais ou utilizando outros métodos (ver Guinness-Hey, *Metab. Bone Dis. and Rel. Res.* 5: 177-181, 1984).

Tal como será evidente para um perito na arte, a quantidade e frequência de administração dependerão, naturalmente, de factores tais como a natureza e a gravidade da indicação a tratar, da resposta desejada, da condição do paciente e assim por diante. Tipicamente, as composições podem ser administradas através de uma variedade de técnicas, tal como observado acima.

Os seguintes exemplos são oferecidos como ilustração e não como limitação.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

A ESCLEROSTEOSE ESTÁ MAPEADA NO BRAÇO LONGO DO CROMOSSOMA HUMANO 17

O mapeamento genético do defeito responsável pela esclerosteose em humanos localizou o gene responsável por este distúrbio na região do cromossoma humano 17 que codifica um novo membro da família das proteínas de ligação a TGF-beta. Na esclerosteose, o osso esquelético apresenta um aumento substancial na densidade mineral em relação à de indivíduos não afligidos. O osso na cabeça também apresenta sobre-crescimento. Os pacientes de esclerosteose são geralmente saudáveis embora possam exibir graus variáveis de sindactilia no nascimento e graus variáveis de compressão craniana e de compressão dos nervos no crânio.

A análise do "linkage" do defeito génico associado à esclerosteose foi conduzida através da aplicação do método de mapeamento de homozigotia a amostras do ADN recolhidas de 24 famílias de Afrikanos da África do Sul nas quais a doença ocorria (Sheffield *et al.*, *Human Molecular Genetics* 3: 1331-1335, 1994. "Identification of a Bardet-Biedl syndrome locus on chromosome 3 and evaluation of an efficient approach to homozygosity mapping"). A população Afrikan de África do Sul é geneticamente homogénea; a população é descendente de um pequeno número de fundadores que colonizou a área há vários séculos e ficou isolada por barreiras geográficas e sociais desde a fundação. A esclerosteose é rara em todo o mundo fora da comunidade Afrikan, o que sugere que uma mutação no gene estava presente na população fundadora e tem aumentado em número desde então juntamente com o aumento da população. A utilização de mapeamento de homozigotia baseia-se na suposição de que é provável que os marcadores de mapeamento de ADN adjacentes a uma mutação recessiva sejam homozigóticos em indivíduos afectados de famílias consanguíneas e populações isoladas.

Um conjunto de 371 marcadores microsatélites (Research Genetics, Conjunto 6) dos cromossomas autossómicos foi seleccionado para tipificar bancos de ADN de amostras de pacientes de esclerosteose. As amostras de ADN para esta análise vieram de 29 pacientes de esclerosteose de 24 famílias, 59 membros das famílias não afectados e um conjunto de indivíduos de controlo não aparentados da mesma população. Os bancos consistiram em 4-6 indivíduos, indivíduos afectados, indivíduos afectados de famílias consanguíneas, pais e irmãos não afectados, ou controlos não aparentados. Nos bancos de indivíduos não aparentados e na maioria dos bancos com indivíduos afectados ou membros da família a análise dos marcadores mostrou diversos tamanhos dos alelos para cada marcador. Um marcador, D17S1299, mostrou uma indicação de homozigotia: uma banda em vários dos bancos de indivíduos afectados.

Todas as 24 famílias de esclerosteose foram tipificadas com um total de 19 marcadores na região de D17S1299 (em 17q12-q21). Mostrou-se que os indivíduos afectados de cada família eram homozigóticos nesta região, e 25 dos 29 indivíduos eram homozigóticos para um haplotipo central; cada um tinha os mesmos alelos entre D17S1787 e D17S930. Os outros quatro indivíduos tinham um cromossoma que correspondia a este haplotipo e um segundo que não. Em resumo, os dados sugeriram fortemente que esta região de 3 megabases continha a mutação de esclerosteose. A análise da sequência da maioria dos exões nesta região de 3 megabases identificou uma mutação "nonsense" na sequência de codificação da nova proteína de ligação a TGF-beta (a mutação C>T na posição 117 de Sequência ID NO:1 resulta num codão stop). Mostrou-se que esta mutação era única para os pacientes de esclerosteose e portadores de descendentes de Afrikaners. A identidade do gene foi ainda confirmada através da identificação de uma mutação no seu intrão (mutação A>T na posição +3 do intrão) que resulta em processamento impróprio do ARNm num único paciente, não aparentado, com esclerosteose diagnosticada.

EXEMPLO 2ESPECIFICIDADE DE TECIDO DA EXPRESSÃO DO GENE DA PROTEÍNA DE
LIGAÇÃO A TGF-BETA

A. Expressão do Gene de Beer Humana através de RT-PCR:

A primeira cadeia de ADNc foi preparada a partir das seguintes amostras de ARN total utilizando um estojo comercialmente disponível ("Superscript Preamplification System for First-Strand cDNA Synthesis", Life Technologies, Rockville, MD): cérebro humano, fígado humano, baço humano, timo humano, placenta humana, músculo esquelético humano, tiróide humana, pituitária humana, osteoblastos humanos (NH0st de Clonetics Corp., San Diego, CA), linha celular de osteossarcoma humano (Saos-2, ATCC# HTB-85), osso humano, medula óssea humana, cartilagem humana, osso de macaco verde africano, *Saccharomyces cerevisiae* e monócitos de sangue periférico humano. Todas as amostras de ARN foram adquiridas numa fonte comercial (Clontech, Palo Alto, CA), excepto as seguintes que foram preparadas no laboratório: osteoblastos humanos, linha celular de osteossarcoma humano, osso humano, cartilagem humana e osso de macaco verde africano. Estas amostras de ARN do laboratório foram preparadas utilizando um estojo comercialmente disponível ("TRI Reagent", Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH).

A PCR foi executada nestas amostras e adicionalmente numa amostra genómica humana como controlo. O iniciador oligonucleotídico com sentido de Beer tinha a sequência 5'-CCGGAGCTGGAGAACAACAAG-3' (SEQ ID NO: 19). O iniciador oligonucleotídico anti-sentido de Beer tinha a sequência 5'-GCACTGGCCGGAGCACACC-3' (SEQ ID NO: 20). Adicionalmente, foi efectuada PCR utilizando iniciadores para o gene humano da beta-actina como controlo. O iniciador oligonucleotídico com sentido da beta-actina tinha a sequência 5'-AGGCCAACCGCGAGAAGATGACC-3' (SEQ ID NO: 21). O iniciador oligonucleotídico anti-sentido da beta-actina tinha a sequência 5'-GAAGTCCAGGGCGACGTAGCA-3' (SEQ ID NO: 22). A PCR foi efectuada utilizando condições padrão em reacções de 25 µl, com uma temperatura de ligação de 61 graus Celsius. Trinta e dois ciclos de PCR foram efectuados com os

iniciadores de Beer e vinte e quatro ciclos foram efectuados com os iniciadores da beta-actina.

Após a amplificação, foram analisados 12 µl de cada reacção através de electroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etídio. Ver Figura 2A.

B. Hibridação In-situ de ARN de Secções de Embrião de Ratinho:

O ADNc inteiro de Beer de ratinho (Sequência ID NO: 11) foi clonado no vector pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) na direcção anti-sentido e com sentido utilizando o protocolo do fabricante. Os transcritos com sentido e anti-sentido de ARNc marcado com ³⁵S-alpha-GTP foram sintetizados utilizando reagentes de transcrição *in vitro* fornecidos por Ambion, Inc (Austin, TX). A hibridação *in situ* foi efectuada de acordo com os protocolos de Lyons *et al.* (*J. Cell Biol.* 111: 2427-2436, 1990).

A sonda de ARNc de Beer de ratinho detectou uma mensagem específica expressa no tubo neural, nos botões dos membros, nos vasos sanguíneos e nas cartilagens em ossificação dos embriões de ratinho em desenvolvimento. O painel A na Figura 3 mostra expressão na crista ectodérmica apical (aer) do botão do membro (l), nos vasos sanguíneos (bv) e no tubo neural (nt). O painel B mostra expressão no 4º ventrículo do cérebro (4). O painel C mostra expressão na mandíbula (ma), nas vértebras cervicais (cv), no osso occipital (oc), no palato (pa) e num vaso sanguíneo (bv). O painel D mostra expressão nas costelas (r) e numa válvula cardíaca (va). O painel A é uma secção transversal de um embrião 10,5 dpc. O painel B é uma secção sagital de um embrião 12,5 dpc e os painéis C e D são secções sagitais de embriões 15,5 dpc.

ba = arco branquial, h = coração, te = telencéfalo (cérebro anterior), b = cérebro, f = massa frontonasal, g = intestino, h = coração, j = maxilar, li = fígado, lu = pulmão, ot = vesícula ótica, sc = espinal-medula, skm = músculo-esquelético, ns = seio nasal, th = timo, to = língua, fl = membro anterior, di = diafragma

EXEMPLO 3

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA BEER RECOMBINANTE

A. Expressão em Células COS-1:

A sequência de ADN codificando a proteína Beer humana inteira foi amplificada utilizando os seguintes iniciadores de PCR oligonucleotídicos: O iniciador oligonucleotídico 5' tinha a sequência 5'-**AAGCTT**GGTACCATGCAGCTCCCAC-3' (SEQ ID NO: 23) e continha um local da enzima de restrição *HindIII* (a cheio) seguido de 19 nucleótidos do gene *Beer* que começa 6 pares de bases antes do presumido codão de iniciação amino-terminal (ATG). O iniciador oligonucleotídico 3' tinha a sequência 5'-**AAGCTT**CTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCGTAGGCGTTCTCCAGCT-3' (SEQ ID NO: 24) e continha um local da enzima de restrição *HindIII* (a cheio) seguido de um codão stop do complemento inverso (CTA) seguido do complemento inverso do epitopo FLAG (sublinhado, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) flanqueado pelo complemento inverso dos nucleótidos que codificam os 5 aminoácidos carboxi-terminais da Beer. O produto de PCR foi clonado em TA ("Original TA Cloning Kit", Invitrogen, Carlsbad, CA) e os clones individuais foram pesquisados através de sequenciação do ADN. Um clone com a sequência verificada foi então digerido por *HindIII* e purificado num gel de agarose a 1,5% utilizando reagentes comercialmente disponíveis ("QIAquick Gel Extraction Kit", Qiagen Inc., Valencia, CA). Este fragmento foi então ligado ao plasmídeo pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) digerido com *HindIII* com ADN-ligase T4. *E. coli* DH10B foram transformadas e plaqueadas em placas de LB, ampicilina a 100 µg/ml. As colónias que possuem o recombinante desejado na orientação correcta foram identificadas através de uma pesquisa baseada em PCR, utilizando um iniciador 5' correspondente ao local promotor/iniciador T7 em pcDNA3.1 e um iniciador 3' com a sequência 5'-GCACTGGCCGGAGCACACC-3' (SEQ ID NO: 25) que corresponde ao complemento inverso da sequência interna de BEER. A sequência do fragmento clonado foi confirmada através de sequenciação do ADN.

Para transfecção foram utilizadas células COS-1 (ATCC# CRL-1650). 50 µg do plasmídeo de expressão pcDNA-Beer-Flag

foram transfectados utilizando um estoque comercialmente disponível seguindo os protocolos fornecidos pelo fabricante ("DEAE-Dextran Transfection Kit", Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Os meios finais após a transfecção foram DMEM (Life Technologies, Rockville, MD) contendo Soro Fetal Bovino a 0,1%. Após 4 dias em cultura, os meios foram removidos. A expressão de BEER recombinante foi analisada através de SDS-PAGE e "Western blot" utilizando o anticorpo monoclonal M2 anti-FLAG (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). A purificação da proteína BEER recombinante foi efectuada utilizando uma coluna de afinidade de M2 anti-FLAG ("Mammalian Transient Expression System", Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). O perfil da coluna foi analisado através de SDS-PAGE e "Western blot" utilizando o anticorpo monoclonal M2 anti-FLAG.

B. Expressão em células do insecto SF9:

A sequência do gene *Beer* humano foi amplificada utilizando PCR com condições padrão e os seguintes iniciadores:

Iniciador com sentido: 5'-GTCGTCGGATCCATGGGGTGGCAGGCGTTCAAGAATGAT-3' (SEQ ID NO: 26)

Iniciador anti-sentido: 5'-GTCGTCAAGCTTCTACTTGTTCATCGTCCTTGTAGTCGTAGGCGTTCTCCAGCTCGGC-3' (SEQ ID NO: 27)

O ADNc resultante continha a região de codificação de *Beer* com duas modificações. O sinal de secreção N-terminal foi removido e foi fundido um epitopo marcador FLAG (Sigma) enquadrado com a extremidade C-terminal da inserção. Foram adicionados locais de clonagem *Bam*HI e *Hind*III e o gene foi subclonado no vector pMelBac (Invitrogen) para transferência para um vector de expressão baculoviral utilizando métodos padrão.

Os baculovírus recombinantes expressando a proteína *Beer* foram produzidos utilizando o estoque de transfecção Bac-N-Blue (Invitrogen) e purificados de acordo com as instruções dos fabricantes.

As células SF9 (Invitrogen) foram mantidas em meios TNM_FH (Invitrogen) contendo soro fetal de vitelo a 10%. Para a expressão da proteína, as culturas de SF9 em balões de

centrifugação foram infectadas a uma MOI superior a 10. Amostras dos meios e das células foram tomadas diariamente durante cinco dias, e expressão de Beer foi monitorizada através de "Western blot" utilizando um anticorpo monoclonal M2 anti-FLAG (Sigma) ou um anti-soro policlonal de coelho anti-Beer.

Após cinco dias as células SF9 infectadas com baculovírus foram colhidas através de centrifugação e a proteína associada às células foi extraída a partir do sedimento celular utilizando um tampão de extracção de elevada concentração salina (NaCl 1,5 M, Tris 50 mM, pH 7,5). O extracto (20 ml por 300 ml de cultura) foi clarificado por centrifugação, dialisado três vezes contra quatro litros de solução salina tamponada com Tris (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, pH 7,5) e novamente clarificado por centrifugação. Esta fracção de elevada concentração salina foi aplicada a Hitrap Heparin (Pharmacia; 5 ml de volume de leito), lavada extensivamente com solução salina tamponada com HEPES (HEPES 7,5 25 mM, NaCl 150 mM) e proteínas ligadas foram eluídas com um gradiente de NaCl 150 mM a NaCl 1200 mM. A eluição de Beer foi observada a aproximadamente NaCl 800 mM. As fracções contendo Beer foram suplementadas até 10% de glicerol e DTT 1 mM e congeladas a -80 graus C.

EXEMPLO 4

PREPARAÇÃO E TESTE DE ANTICORPOS POLICLONAIS PARA BEER, GREMLIN E DAN

A. Preparação do antigénio:

As sequências de ADN de *Beer* Humano, *Gremlin* Humano e *Dan* Humano foram amplificadas utilizando métodos padrão de PCR com os seguintes iniciadores oligonucleotídicos:

Beer H.

Com sentido: 5'-GACTTGGATCCCAGGGGTGGCAGGCGTTC-3' (SEQ ID NO: 28)

Anti-sentido 5'-AGCATAAGCTTCTAGTAGGCGTTCTCCAG-3' (SEQ ID NO: 29)

Gremlin H.

Com sentido: 5'-GACTTGGATCCGAAGGGAAAAAGAAAGGG-3' (SEQ ID NO: 30)

Anti-sentido: 5'-AGCATAAGCTTTTAATCCAAATCGATGGA-3' (SEQ ID NO: 31)

Dan H.

Com sentido: 5'-ACTACGAGCTCGGCCCCACCAACCATCAACAAG-3' (SEQ ID NO: 32)

Anti-sentido: 5'-ACTTAGAAGCTTTCAGTCCTCAGCCCCCTCTTCC-3' (SEQ ID NO: 33)

Em cada caso os iniciadores listados amplificaram toda a região de codificação menos a sequência sinal de secreção. Estes incluem locais de restrição para subclonagem no vector de expressão bacteriano pQE-30 (Qiagen Inc., Valencia, CA) nos locais *Bam*HI/*Hind*III para Beer e Gremlin, e locais *Sac*I/*Hind*III para Dan. pQE30 contém uma sequência de codificação para um marcador de 6x His na extremidade 5' da região de clonagem. As construções completas foram transformadas na estirpe M-15/pRep de *E. coli* (Qiagen Inc) e os clones individuais verificados através de sequenciação. A expressão da proteína em M-15/pRep e a purificação (ligação do marcador de afinidade 6xHis a Ni-NTA conjugada com Sepharose) foram efectuadas tal como descrito pelo fabricante (Qiagen, The QIAexpressionist).

A proteína Beer derivada de *E. coli* foi recuperada em quantidade significativa utilizando solubilização em guanidina 6 M e dialisada a 2-4 M para impedir precipitação durante o armazenamento. As proteínas Gremlin e Dan foram recuperadas numa quantidade mais elevada com solubilização em guanidina 6 M e uma concentração de guanidina após a purificação de 0,5 M.

B. Produção e teste de anticorpos policlonais:

Anticorpos policlonais para cada um dos três antigénios foram produzidos em hospedeiros coelhos e galinhas utilizando protocolos padrão (R&R Antibody, Stanwood, WA; protocolo padrão para imunização de coelhos e recuperação de anti-soros; "Short Protocols in Molecular Biology", 2ª edição, 1992, 11.37-11.41. Contributos de Helen M. Cooper e Yvonne

Paterson; os anti-soros de galinha foram criados com Strategic Biosolutions, Ramona, CA)

Os anti-soros de coelho e a fração Igy de ovo de galinha foram selecionados quanto à actividade através de "Western blot". Cada um dos três antigénios foi separado através de PAGE e transferido para nitrocelulose de 0,45 μ m (Novex, San Diego, CA). A membrana foi cortada em tiras com cada tira contendo aproximadamente 75 ng de antigénio. As tiras foram bloqueadas em Blotting Grade Block a 3% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) e lavadas 3 vezes em tampão solução salina tamponada com Tris 1x (TBS)/TWEEN a 0,02%. O anticorpo primário (sangrias pré-imunização, anti-soros de coelho ou IgY de ovo de galinha em diluições que variaram de 1:100 a 1:10000 em tampão de bloqueio) foi incubado com as tiras durante uma hora com agitação suave. Uma segunda série de três lavagens TBS 1x/TWEEN a 0,02% foi seguida por uma incubação de uma hora com o anticorpo secundário (anti-coelho de burro conjugado com peroxidase, Amersham Life Science, Piscataway, NJ; ou anti-galinha de burro conjugado com peroxidase, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Foi efectuado um ciclo final de 3X lavagens em TBS 1x/TWEEN a 0,02% e as tiras foram reveladas com Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).

C. Teste de reactividade cruzada do anticorpo:

Após o protocolo descrito na secção anterior, as tiras de nitrocelulose de Beer, Gremlin ou Dan foram incubadas com diluições (1:5000 e 1:10000) dos seus respectivos anti-soros de coelho ou de IgY de ovo de galinha bem como com os anti-soros ou Igy de ovo de galinha (diluições 1:1000 e 1:5000) produzidos para os dois antigénios restantes. Os níveis aumentados de anticorpos não correspondentes foram efectuados para detectar baixa afinidade de ligação pelos anticorpos que podem ser observados apenas a uma concentração aumentada. O protocolo e a duração da revelação são os mesmos para todos os três eventos de ligação utilizando o protocolo descrito acima. Não se observou qualquer reactividade cruzada para nenhum dos antigénios testados.

EXEMPLO 5

INTERAÇÃO DE BEER COM PROTEÍNAS DA SUPERFAMÍLIA TGF-BETA

A interação de Beer com proteínas de diferentes braços filogenéticos da superfamília TGF- β foi estudada utilizando métodos de imunoprecipitação. TGF β -1, TGF β -2, TGF β -3, BMP-4, BMP-5, BMP-6 e GDNF purificadas foram obtidas a partir de fontes comerciais (R&D systems; Minneapolis, MN). Um protocolo representativo é como segue. Beer parcialmente purificada foi dialisada para solução salina tamponada com HEPES (HEPES 7,5 25 mM, NaCl 150 mM). As imunoprecipitações foram feitas em 300 μ l do tampão IP (NaCl 150 mM, Tris pH 7,5 25 mM, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 1,4 mM, Triton X-100 a 0,5% e glicerol a 10%). 30 ng de proteína BMP-5 humana recombinante (R&D systems) foram aplicados em 15 μ l de uma matriz de afinidade FLAG (Sigma; St Louis MO) na presença e na ausência de 500 ng de Beer marcada com o epitopo FLAG. As proteínas foram incubadas durante 4 horas a 4°C e depois as proteínas associadas à matriz de afinidade foram lavadas 5 vezes em tampão IP (1 ml por lavagem). As proteínas ligadas foram eluídas da matriz de afinidade em 60 microlitros de tampão de amostra de SDS-PAGE 1 $\times$. As proteínas foram resolvidas através de SDS-PAGE e a Beer associada a BMP-5 foi detectada através de "Western blot" utilizando anti-soro anti-BMP-5 (Research Diagnostics, Inc) (ver Figura 5).

Ensaio de Ligação do Ligando de BEER:

A proteína FLAG-Beer (20 ng) é adicionada a 100 μ l de PBS/BSA a 0,2% e adsorvida em cada poço de uma placa de microtítulo de 96 poços previamente revestida com anticorpo monoclonal anti-FLAG (Sigma; St Louis MO) e bloqueada com BSA a 10% em PBS. Isto é conduzido à temperatura ambiente durante 60 minutos. Esta solução proteica é removida e os poços são lavados para remover a proteína não ligada. BMP-5 é adicionada a cada poço em concentrações que variam de 10 pM a 500 nM em PBS/BSA a 0,2% e incubada durante 2 horas à temperatura ambiente. A solução de ligação é removida e a placa é lavada três vezes com volumes de 200 μ l de PBS/BSA a 0,2%. Os níveis de BMP-5 são então detectados utilizando

anti-soro de BMP-5 através de ELISA (F.M. Ausubel et al., "Current Protocols in Mol Biol.", Vol 2: 11.2.1-11.2.22, 1998). A ligação específica é calculada subtraindo a ligação não específica da ligação total e analisada através do programa LIGAND (Munson e Podbard, *Anal. Biochem.* 107: 220-239, 1980).

Numa variação deste método, Beer é modificada e expressa como uma proteína de fusão de Fc humana. Do mesmo modo o ligando BMP é modificado e expresso como uma fusão de Fc de ratinho. Estas proteínas são incubadas juntas e o ensaio é conduzido tal como descrito por Mellor et al. utilizando detecção de fluorescência homogênea resolvida no tempo (G.W. Mellor et al., *J. of Biomol Screening* 3(2): 91-99, 1998).

EXEMPLO 6

ENSAIO DE PESQUISA PARA INIBIÇÃO DA LIGAÇÃO DA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO A TGF-BETA A MEMBROS DA FAMÍLIA TGF-BETA

O ensaio descrito acima é replicado com duas exceções. Primeira, a concentração de BMP é mantida fixa na Kd previamente determinada. Segunda, uma colecção de candidatos a antagonistas é adicionada a uma concentração fixa (20 μ M no caso das colecções de pequenas moléculas orgânicas e 1 μ M em estudos de anticorpos). Estas moléculas candidatas (antagonistas) da ligação à proteína de ligação a TGF-beta incluem compostos orgânicos derivados de colecções comerciais ou internas que representam diversas estruturas químicas. Estes compostos são preparados como soluções de reserva em DMSO e adicionados aos poços de ensaio a $\leq 1\%$ do volume final sob as condições padrão de ensaio. Estes são incubados durante 2 horas à temperatura ambiente com BMP e Beer, a solução é removida e a BMP ligada é quantificada tal como descrito. Os agentes que inibem 40% da ligação da BMP observada na ausência do composto ou do anticorpo são considerados antagonistas desta interação. Estes são ainda avaliados como potenciais inibidores com base em estudos de titulação para determinar as suas constantes de inibição e a sua influência na afinidade de ligação da proteína de ligação a TGF-beta. Podem também ser conduzidos ensaios de controlo da especificidade comparáveis para estabelecer o perfil de

selectividade do antagonista identificado através de estudos utilizando ensaios dependentes da acção do ligando BMP (p. ex. um estudo de competição BMP/receptor de BMP).

EXEMPLO 7

INIBIÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO A TGF-BETA NA MATRIZ ÓSSEA

A avaliação da inibição da localização na matriz óssea (hidroxiapatite) é conduzida utilizando modificações ao método de Nicolas (Nicolas, V., *Calcif. Tissue Int.* 57: 206, 1995). Resumidamente, a proteína de ligação a TGF-beta marcada com ^{125}I é preparada tal como descrito por Nicolas (*supra*). É adicionada hidroxiapatite a cada poço de uma placa de microtítulo de 96 poços equipada com uma membrana de filtração de polipropileno (Polyfiltroninc, Weymouth, MA). A proteína de ligação a TGF-beta é adicionada a albumina a 0,2% em tampão PBS. Os poços contendo a matriz são lavados 3 vezes com este tampão. A proteína de ligação a TGF-beta adsorvida é eluída utilizando NaOH 0,3 M e quantificada.

A identificação do inibidor é conduzida através de incubação da proteína de ligação a TGF-beta com moléculas de teste e aplicação da mistura na matriz tal como descrito acima. A matriz é lavada 3 vezes com albumina a 0,2% em tampão PBS. A proteína de ligação a TGF-beta adsorvida é eluída utilizando NaOH 0,3 M e quantificada. Os agentes que inibem 40% da ligação da proteína de ligação a TGF-beta observados na ausência do composto ou do anticorpo são considerados inibidores da localização óssea. Estes inibidores são ainda caracterizados através de estudos de resposta à dose para determinar as suas constantes de inibição e a sua influência na afinidade de ligação da proteína de ligação a TGF-beta.

EXEMPLO 8

CONSTRUÇÃO DE UM MUTANTE DE PROTEÍNA DE LIGAÇÃO A TGF-BETA

A. Mutagénese:

Um ADNc inteiro da proteína de ligação a TGF-beta em pBluescript SK serve como molde para mutagénese.

Resumidamente, iniciadores apropriados (ver a discussão proporcionada acima) são utilizados para gerar o fragmento de ADN através de reacção em cadeia da polimerase utilizando a ADN-polimerase Vent (New England Biolabs, Beverly, MA). A reacção em cadeia da polimerase é corrida durante 23 ciclos nos tampões proporcionados pelo fabricante utilizando uma temperatura de ligação de 57°C. O produto é então exposto a duas enzimas de restrição e após isolamento utilizando electroforese em gel de agarose, novamente ligado em pRBP4-503 do qual foi removida a sequência correspondente através de digestão enzimática. A integridade do mutante é verificada através de sequenciação do ADN.

B. Expressão em Células de Mamífero e Isolamento da Proteína de Ligação a TGF-beta Mutante:

Os ADNcs da proteína de ligação a TGF-beta mutante são transferidos para o vector de expressão de mamífero pcDNA3.1 descrito no EXEMPLO 3. Após verificação da sequência, as construções resultantes são transfectadas para células COS-1, e a proteína secretada é purificada tal como descrito no EXEMPLO 3.

EXEMPLO 9

MODELOS ANIMAIS-I

CRIAÇÃO DE RATINHOS TRANSGÊNICOS QUE SOBRE-EXPRESSAM O GENE *BEER*

O clone BAC 15G5 de ~200 quilobases (kb), isolado a partir da biblioteca de ADN genómico de ratinho CITB (distribuída por Research Genetics, Huntsville, AL) foi utilizado para determinar a sequência completa do gene *Beer* de ratinho e as suas regiões flangeadoras 5' e 3'. Um fragmento *SalI* de 41 kb, contendo o corpo inteiro do gene, mais ~17 kb da sequência flangeadora 5' e ~20 kb da sequência flangeadora 3' foi sub-clonado no local *BamHI* do vector cosmídico SuperCosI (Stratagene, La Jolla, CA) e foi propagado na estirpe DH10B de *E. coli*. A partir desta construção cosmídica, um fragmento de restrição *MluI*-*AviII* de 35 kb (Sequência N° 6), incluindo o gene *Beer* de ratinho

inteiro, assim como a sequência flanqueadora 5' e 3' de 17 kb e 14 kb, respectivamente, foi então purificado em gel, utilizando meios convencionais, e utilizado para microinjecção de zigotos de ratinho (DNX Transgenics; Patente U.S. N° 4873191). Os animais fundadores nos quais o fragmento de ADN clonado foi integrado aleatoriamente no genoma foram obtidos a uma frequência de 5-30% de nados vivos. A presença do transgene foi verificada através da realização de análise "Southern blot" do ADN genómico extraído de uma pequena quantidade de tecido de ratinho, tal como a ponta de uma cauda. O ADN foi extraído utilizando o seguinte protocolo: o tecido foi digerido de um dia para o outro a 55° C num tampão de lise contendo NaCl 200 mM, Tris 100 mM pH 8,5, EDTA 5 mM, SDS a 0,2% e 0,5 mg/ml de Proteinase K. No dia seguinte, o ADN foi extraído uma vez com fenol/clorofórmio (50:50), uma vez com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e precipitado com etanol. Após ressuspensão em TE (Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM), 8-10 µg de cada amostra de ADN foram digeridos com uma endonuclease de restrição, tal como *EcoRI*, sujeitos a electroforese em gel e transferidos para uma membrana de nylon carregada, tal como HyBondN+ (Amersham, Arlington Heights, IL). O filtro resultante foi então hibridado com um fragmento de ADN marcado radioactivamente derivado do locus do gene *Beer* de ratinho, e capaz de reconhecer tanto um fragmento do locus do gene endógeno como um fragmento de um tamanho diferente derivado do transgene. Os animais fundadores foram cruzados com ratinhos não transgénicos normais para gerar um número suficiente de descendentes transgénicos e não transgénicos nos quais determinar os efeitos da sobre-expressão do gene *Beer*. Para estes estudos, animais em várias idades (por exemplo, 1 dia, 3 semanas, 6 semanas, 4 meses) são sujeitos a vários ensaios diferentes desenhados para verificar a formação esquelética bruta, a densidade mineral óssea, o teor mineral ósseo, a actividade dos osteoclastos e dos osteoblastos, a extensão da ossificação endocondral, a formação de cartilagem, etc. A actividade transcricional do transgene pode ser determinada através da extracção de ARN de vários tecidos, e utilizando um ensaio de RT-PCR que tire partido de polimorfismos de nucleótidos únicos entre a estirpe de ratinho da qual o transgene é derivado (129Sv/J) e a estirpe de ratinho utilizada para microinjecção de ADN [(C57BL5/J x SJL/J)F2].

MODELOS ANIMAIS-II

DESTRUIÇÃO DO GENE DE BEER DE RATINHO ATRAVÉS DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA

A recombinação homóloga em células estaminais embrionárias (ES) pode ser utilizada para inactivar o gene *Beer* endógeno de ratinho e gerar subsequentemente animais possuindo a mutação de perda de função. Um gene repórter, tal como o gene da β -galactosidase de *E. coli* foi modificado no vector direccionador de modo a que a sua expressão fosse controlada pelo promotor do gene *Beer* endógeno e pelo sinal de iniciação da tradução. Desta forma, podem ser determinados os padrões espacial e temporal da expressão do gene *Beer* em animais possuindo um alelo atingido.

O vector direccionador foi construído primeiro através de clonagem da cassette do gene de *resistência à neomicina* (neo) seleccionável por fármacos dirigido pelo promotor da fosfoglicerato-cinase (PGK) de pGT-N29 (New England Biolabs, Beverly, MA) no vector de clonagem pSP72 (Promega, Madison, WI). Foi utilizada PCR para flanquear a cassette PGKneo com locais loxP do bacteriófago P1, que são locais de reconhecimento para a recombinase Cre de P1 (Hoess *et al.*, *PNAS USA* 79: 3398, 1982). Isto permite a remoção subsequente do marcador de resistência a neo em células ES ou em animais derivados de células ES atingidas (Patente U.S. N° 4959317). Os iniciadores de PCR eram constituídos pela sequência de loxP de 34 nucleótidos (ntd), 15-25 ntd complementares às extremidades 5' e 3' da cassette PGKneo, bem como por locais de reconhecimento de enzimas de restrição (*Bam*HI no iniciador com sentido e *Eco*RI no iniciador anti-sentido) para clonagem em pSP72. A sequência do iniciador com sentido foi 5'-AATCTGGATCCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATCTGCAGGATTCGAGGGCCCCT-3' (SEQ ID NO: 34); a sequência do iniciador anti-sentido foi 5'-AATCTGAATTCCACCGGTGTTAATTAAATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATAGATCTAGAGTCAGCTTCTGA-3' (SEQ ID NO: 35).

O passo seguinte foi clonar um fragmento *Xho*I-*Hind*III de 3,6 kb, contendo o gene da β -galactosidase de *E. coli* e o sinal de poliadenilação de SV40 de pSV β (Clontech, Palo Alto,

CA) para o plasmídeo pSP72-PGKneo. O "braço curto" de homologia do locus do gene *Beer* de ratinho foi gerado através de amplificação de um fragmento de 2,4 kb do clone BAC 15G5. A extremidade 3' do fragmento coincidiu com o local de iniciação da tradução do gene *Beer*, e o iniciador anti-sentido utilizado na PCR incluiu também 30 ntd complementares à extremidade 5' do gene da β -galactosidase de modo que sua região de codificação pudesse ser fundida enquadrada com o local de iniciação de *Beer*. A abordagem seguida para introduzir o "braço curto" no plasmídeo pSP72- β gal-PGKneo foi linearizar o plasmídeo num local a montante do gene β -gal e depois co-transformar este fragmento com o produto de PCR do "braço curto" e seleccionar os plasmídeos em que o produto de PCR foi integrado através de recombinação homóloga. O iniciador com sentido para a amplificação do "braço curto" incluiu 30 ntd complementares ao vector pSP72 para permitir este acontecimento de recombinação. A sequência do iniciador com sentido foi 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAACTCGAGCAGCTGAAGCTTAACCACATGGTGGCTCACAACCA T-3' (SEQ ID NO: 36) e a sequência do iniciador anti-sentido foi 5'-AACGACGGCCAGTGAATCCGTAATCATGGTCATGCTGCCAGGTGGAGGAGGGCA-3' (SEQ ID NO: 37).

O "braço longo" do locus do gene *Beer* foi gerado através de amplificação de um fragmento de 6,1 kb do clone BAC 15G5 com iniciadores que também introduzem os locais de enzimas de restrição de corte raro *SgrAI*, *FseI*, *AscI* e *PacI*. Especificamente, a sequência do iniciador com sentido foi 5'-ATTACCACCGGTGACACCCGCTTCCTGACAG-3' (SEQ ID NO: 38); a sequência do iniciador anti-sentido foi 5'-ATTACTTAATTAAACATGGCGCGCCATATGGCCGCCCCCTAATTGCGGCGCATCGTTAATT-3' (SEQ ID NO: 39). O produto de PCR resultante foi clonado no vector TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) como passo intermédio.

A construção direccionadora do gene *Beer* de ratinho incluiu também um segundo marcador seleccionável, o gene da timidina-cinase do vírus de herpes simples I (HSVTK) sob o controlo do elemento de repetição terminal longa do vírus do sarcoma de rous (LTR de RSV). A expressão deste gene torna as células de mamífero sensíveis (e inviáveis) a ganciclovir; é

portanto uma forma conveniente para seleccionar células resistentes à neomicina nas quais se integrou a construção através de um acontecimento homólogo (Patente U.S. Nº 5464764). A cassette RSVLTR-HSVTK foi amplificada a partir de pPS1337 utilizando iniciadores que permitem a subsequente clonagem nos locais *FseI* e *AscI* do vector plasmídico TA do "braço longo". Para esta PCR, a sequência do iniciador com sentido foi 5'-ATTACGGCCGGCCGCAAAGGAATTCAAGATCTGA-3 (SEQ ID NO: 40); a sequência do iniciador anti-sentido foi 5'-ATTACGGCGCGCCCCTCACAGGCCGCACCCAGCT-3 (SEQ ID NO: 41).

O passo final na construção do vector direccionador envolveu a clonagem do fragmento *SgrAI-AscI* de 8,8 kb contendo o "braço longo" e o gene RSVLTR-HSVTK nos locais *SgrAI* e *AscI* do plasmídeo pSP72-"braço curto"- β gal-PGKneo. Este vector direccionador foi linearizado através de digestão com *AscI* ou *PacI* antes de electroporação em células ES.

EXEMPLO 10

INACTIVATION DE BEER MEDIADA POR ANTI-SENTIDO

São preparados oligonucleótidos anti-sentido de 17 nucleótidos num formato sobreponível, de tal maneira que a extremidade 5' dos primeiros oligonucleótidos se sobrepõe ao AUG de iniciação da tradução do transcrito de Beer, e as extremidades 5' dos sucessivos oligonucleótidos ocorrem com aumentos de 5 nucleótidos movendo-se na direcção 5' (até 50 nucleótidos de distância), relativamente ao AUG de Beer. Os correspondentes oligonucleótidos de controlo são desenhados e preparados utilizando uma composição de bases equivalente mas redistribuída em sequência para inibir qualquer hibridação significativa com o ARNm de codificação. A distribuição de reagente ao sistema celular de teste é conduzida através de distribuição por lípidos catiónicos (P.L. Felgner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413, 1987). 2 μ g de oligonucleótido anti-sentido são adicionados a 100 μ l de meio de soro reduzido (meio de soro reduzido Opti-MEM I, Life Technologies, Gaithersburg, MD) e isto é misturado com o reagente Lipofectin (6 μ l) (Life Technologies, Gaithersburg MD) nos 100 μ l de meio de soro reduzido. Estes são

misturados, deixados a complexar durante 30 minutos à temperatura ambiente e a mistura é adicionada às células MC3T3E21 ou KS483 previamente semeadas. Estas células são cultivadas e o ARNm é recuperado. O ARNm de Beer é monitorizado utilizando RT-PCR em conjunto com iniciadores específicos de Beer. Adicionalmente, poços experimentais separados são recolhidos e os níveis da proteína são caracterizados através de métodos de “Western blot” descritos no Exemplo 4. As células são colhidas, ressuspensas em tampão de lise (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 20 mM, EDTA 1 mM, SDS a 1%) e a proteína solúvel é recolhida. Este material é aplicado num SDS-PAGE desnaturante de 10-20% de gradiente. As proteínas separadas são transferidas para nitrocelulose e o “Western blot” é conduzido tal como acima utilizando os reagentes de anticorpo descritos. Em paralelo, os oligonucleótidos de controlo são adicionados a culturas idênticas e as operações experimentais são repetidas. A diminuição nos níveis do ARNm ou da proteína Beer é considerada significativa se o tratamento com o oligonucleótido anti-sentido resultar numa mudança de 50% em qualquer dos casos em comparação com o oligonucleótido misturado de controlo. Esta metodologia permite a inactivação selectiva do gene e a subsequente caracterização fenotípica dos nódulos mineralizados no modelo de cultura de tecidos.

Sequência ID No. 1: ADNc de BEER Humana (região de codificação completa mais UTRs 5' e 3')

Sequência ID No. 2: Proteína BEER Humana (sequência completa)

Sequência ID No. 3: ADNc da Beer Humana contendo a mutação “nonsense” da esclerosteose

Sequência ID No. 4: Proteína Beer Humana Truncada de Esclerosteose

Sequência ID No. 5: ADNc da BEER Humana codificando uma variante da proteína (V10I)

Sequência ID No. 6: Variante da proteína BEER Humana (V10I)

Sequência ID No. 7: ADNc da Beer Humana codificando uma proteína variante (P38R)

Sequência ID No. 8: Variante da proteína Beer Humana (P38R)

Sequência ID No. 9: ADNc da BEER de Macaco Verde Africano (região de codificação completa)

Sequência ID No. 10: Proteína BEER de Macaco Verde Africano (sequência completa)

Sequência ID No. 11: ADNc da BEER de Ratinho (apenas a região de codificação)

Sequência ID No. 12: Proteína BEER de Ratinho (sequência completa)

Sequência ID No. 13: ADNc da BEER de Rato (região de codificação completa mais UTR 5')

Sequência ID No. 14: Proteína BEER de Rato (sequência completa)

Sequência ID No. 15: ADNc da BEER Bovina (região de codificação parcial)

Sequência ID No. 16: Proteína BEER Bovina (sequência parcial - sem a sequência sinal nem os últimos 6 resíduos)

Sequência ID No. 17: Fragmento de restrição *MluI*-*AviII* utilizado para produzir o transgene de Beer de ratinho

Sequência ID No. 18: Sequência Genómica da Beer Humana (Este gene possui dois exões, nas posições 161-427 e 3186-5219).

Lisboa,

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ácido nucleico isolada seleccionada a partir do grupo que consiste em:

(a) uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13 ou 15, ou uma sequência complementar desta;

(b) uma molécula de ácido nucleico isolada que hibrida especificamente com a molécula de ácido nucleico de (a) sob condições de elevado rigor onde a hibridação é efectuada em SSPE 5×, solução de Denhardt 5× e SDS a 0,5% de um dia para o outro a 55 a 60°C; e

(c) um ácido nucleico isolado que codifica uma proteína de ligação a TGF-beta de acordo com (a) e (b); onde o ácido nucleico não é o ácido nucleico de nenhum dos números de acesso da base de dados EMBL AC003098, AA393939 e AI113131.

2. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a reivindicação 1, em que referida molécula de ácido nucleico codifica uma proteína compreendendo a proteína de SEQ ID NO: 2.

3. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a reivindicação 1, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica uma proteína compreendendo a proteína de SEQ ID NO: 6.

4. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a reivindicação 1, em que referida molécula de ácido nucleico codifica uma proteína compreendendo a proteína de SEQ ID NO: 10.

5. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a reivindicação 1, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica uma proteína compreendendo a proteína de SEQ ID NO: 12.

6. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a reivindicação 1, em que referida molécula de ácido nucleico codifica uma proteína compreendendo a proteína de SEQ ID NO: 14.

7. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a reivindicação 1, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica uma proteína compreendendo a proteína de SEQ ID NO: 16.

8. Vector de expressão, compreendendo um promotor operativamente ligado a uma molécula de ácido nucleico codificando uma proteína de ligação a TGF-beta, em que a molécula de ácido nucleico é seleccionada de entre o grupo que consiste em:

(a) uma molécula de ácido nucleico compreendendo SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13, ou 15; e

(b) uma molécula de ácido nucleico que hibrida especificamente com o complemento da molécula de ácido nucleico de (a) sob condições de elevado rigor, onde a hibridação é efectuada em SSPE 5×, solução de Denhardt 5× e SDS a 0,5% de um dia para o outro a 55 a 60°C.

9. Vector de expressão de acordo com a reivindicação 8, em que o referido promotor é seleccionado a partir do grupo que consiste no promotor I-E de CMV, no promotor inicial de SV40 e na LTR de MuLV.

10. Vector de expressão de acordo com a reivindicação 8, em que o referido promotor é um promotor específico de tecido.

11. Vector de expressão de qualquer uma das reivindicações 8 a 10, onde a molécula de ácido nucleico codifica uma proteína compreendendo a proteína de SEQ ID NO: 2, 6, 10, 12, 14 ou 16.

12. Método de produzir uma proteína de ligação a TGF-beta, compreendendo a cultura de uma célula que contém um vector de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 11 sob condições e durante um tempo suficiente para produzir a referida proteína.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, compreendendo ainda o passo de purificação da referida proteína.

14. Vector viral capaz de dirigir a expressão de uma molécula de ácido nucleico codificando uma proteína de ligação a TGF-beta, em que a molécula de ácido nucleico é seleccionada de entre o grupo que consiste em:

(a) uma molécula de ácido nucleico compreendendo SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13 ou 15; e

(b) uma molécula de ácido nucleico que hibrida especificamente com o complemento da molécula de ácido nucleico de (a) sob condições de elevado rigor onde a hibridação é efectuada em SSPE 5×, solução de Denhardt 5× e SDS a 0,5% de um dia para o outro a 55 a 60°C.

15. Vector viral de acordo com a reivindicação 14, em que o referido vector é seleccionado a partir do grupo que consiste em vectores virais de herpes simples, vectores adenovirais, vectores virais associados a adenovírus e vectores retrovirais.

16. Vector de expressão viral da reivindicação 14 ou 15, em que a molécula de ácido nucleico codifica uma proteína compreendendo a proteína de SEQ ID NO: 2, 6, 10, 12, 14 ou 16.

17. Célula hospedeira possuindo um vector de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 11 e 14 a 16.

18. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 17, em que a referida célula é seleccionada a partir do grupo que consiste numa célula humana, célula de cão, célula de macaco, célula de rato e célula de ratinho.

19. Proteína isolada, compreendendo uma proteína de ligação a TGF-beta codificada por um ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7.

20. Anticorpo ou fragmento deste, onde o anticorpo ou fragmento se liga a uma proteína de ligação a TGF-beta codificada por um ácido nucleico seleccionado a partir do grupo que consistem em:

(a) uma molécula de ácido nucleico compreendendo SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13, ou 15; e

(b) uma molécula de ácido nucleico que hibrida especificamente com o complemento da molécula de ácido nucleico de (a) sob condições de rigor elevado, onde a hibridação é efectuada em SSPE 5×, solução de Denhardt 5× e SDS a 0,5% de um dia para o outro a 55 a 60°C; em que o anticorpo não se liga à proteína Dan nem à proteína Gremlin.

21. Anticorpo ou fragmento da reivindicação 20, em que o anticorpo ou o fragmento se liga a uma proteína compreendendo a proteína de SEQ ID NO: 2, 6, 10, 12 ou 14.

22. Anticorpo ou fragmento de acordo com a reivindicação 20 ou 21 em que o referido anticorpo ou fragmento é um anticorpo monoclonal.

23. Anticorpo ou fragmento de acordo com a reivindicação 22, em que o referido anticorpo monoclonal ou fragmento é um anticorpo ou fragmento de murídeo ou humano.

24. Fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 23, em que o referido fragmento é seleccionado a partir do grupo que consiste em $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab e Fv .

25. Anticorpo ou fragmento de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 24 que é humanizado.

26. Anticorpo de acordo com a reivindicação 20 ou 21 que é um anticorpo policlonal.

27. Anticorpo ou fragmento de qualquer uma das reivindicações 20 a 26, em que o anticorpo ou fragmento se liga a uma proteína de ligação a TGF-beta com uma K_a superior ou igual a $10^7 M^{-1}$.

28. Anticorpo ou fragmento da reivindicação 27 que possui uma K_a superior ou igual a $10^8 M^{-1}$.

29. Método de produção de um hibridoma produzindo anticorpos monoclonais contra uma proteína de ligação a TGF-beta compreendendo:

(i) imunização de um roedor com uma proteína de ligação a TGF-beta tal como definida na reivindicação 19 ou uma porção de tal proteína;

(ii) sacrifício do roedor e colheita do baço e/ou dos nódulos linfáticos do animal; e

(iii) fusão de suspensões de células do baço ou dos nódulos linfáticos com células de mieloma para gerar hibridomas.

30. Método da reivindicação 29, onde o método compreende ainda pesquisa dos hibridomas para identificar os hibridomas que podem produzir anticorpos contra a proteína de ligação a TGF-beta.

31. Método de acordo com a reivindicação 29 ou 30, em que o roedor é um rato ou um ratinho.

32. Método da reivindicação 31 em que o ratinho foi modificado para produzir anticorpos humanos.

33. Célula que produz um anticorpo ou um fragmento de acordo com qualquer das reivindicações 20 a 28.

34. Célula de acordo com a reivindicação 33 que é um hibridoma.

35. Método de produção de um anticorpo monoclonal ou de um fragmento de anticorpo contra uma proteína de ligação a TGF-beta que é tal como definido na reivindicação 22 compreendendo o isolamento e a purificação do anticorpo ou do fragmento a partir de um hibridoma tal como definido na reivindicação 34 ou a manipulação e re-expressão do ADN que codifica as regiões variáveis.

36. Proteína da fusão compreendendo um primeiro segmento polipeptídico compreendendo uma proteína de ligação a TGF-beta ou uma porção desta de pelo menos 10 aminoácidos de comprimento e um segundo segmento polipeptídico compreendendo uma proteína que não se liga a TGF-beta, onde a proteína de ligação a TGF-beta do primeiro segmento polipeptídico é codificada por uma molécula de ácido nucleico seleccionada a partir do grupo que consiste em:

(a) uma molécula de ácido nucleico compreendendo SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13 ou 15; e

(b) uma molécula de ácido nucleico que hibrida especificamente com o complemento da molécula de ácido nucleico de (a) sob condições de rigor elevado, onde a hibridação é efectuada em SSPE 5×, solução de Denhardt 5× e SDS a 0,5% de um dia para o outro a 55 a 60°C.

37. Proteína de fusão da reivindicação 36, em que a proteína de ligação a TGF-beta compreende a proteína de SEQ ID NO: 2, 6, 10, 12, 14 ou 16.

38. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 36 ou 37, em que o referido primeiro segmento polipeptídico tem pelo menos 20 aminoácidos de comprimento.

39. Proteína de fusão de acordo com a reivindicação 38, em que o referido primeiro segmento polipeptídico tem pelo menos 50 aminoácidos de comprimento.

40. Proteína de fusão de acordo com qualquer uma das reivindicações 36 a 39, em que o referido segundo polipéptido compreende múltiplos resíduos de aminoácidos aniónicos.

41. Oligonucleótido isolado que hibrida com uma molécula de ácido nucleico de acordo com SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 ou 15, ou com o complemento desta, sob condições de elevado rigor e que não é o ácido nucleico de nenhum dos números de acesso da base de dados EMBL AC0030908, AA393939 e AI113131, em que a hibridação é efectuada em SSPE 5×, solução de Denhardt 5× e SDS a 0,5% de um dia para o outro a 55 a 60°C.

42. Oligonucleótido isolado de acordo com a reivindicação 41, em que o referido oligonucleótido possui pelo menos 20 nucleótidos de comprimento.

43. Oligonucleótido isolado de acordo com a reivindicação 42, em que o referido oligonucleótido possui pelo menos 30 nucleótidos de comprimento.

44. Oligonucleótido isolado de acordo com a reivindicação 43, em que o referido oligonucleótido possui pelo menos 50 nucleótidos de comprimento.

45. Oligonucleótido isolado de acordo com a reivindicação 44, em que o referido oligonucleótido possui entre 50 e 100 nucleótidos de comprimento.

46. Par de iniciadores que é um dos seguintes pares de iniciadores:

- (i) os iniciadores de SEQ ID NOS: 19 e 20;
- (ii) os iniciadores de SEQ ID NOS: 23 e 24;
- (iii) os iniciadores de SEQ ID NOS: 26 e 27; e
- (iv) os iniciadores de SEQ ID NOS: 28 e 29.

47. Ribozima que cliva ARN codificando uma proteína de acordo com a reivindicação 19, onde a ribozima compreende sequências anti-sentido para reconhecer o ARN a clivar e uma actividade enzimática de clivagem de ARN.

48. Ribozima de acordo com a reivindicação 47, em que a referida proteína compreende a proteína de SEQ ID NO: 2, 6, 10, 12, 14 ou 16.

49. Ribozima de acordo com a reivindicação 47 ou 48, em que a referida ribozima é composta por ácidos ribonucleicos.

50. Ribozima de acordo com a reivindicação 49, em que um ou mais dos referidos ácidos ribonucleicos são ácidos 2'-O-metil-ribonucleicos.

51. Ribozima de acordo com a reivindicação 47 ou 48, em que a referida ribozima é composta por uma mistura de ácidos desoxirribonucleicos e ácidos ribonucleicos.

52. Ribozima de acordo com a reivindicação 47 ou 48 em que a referida ribozima é composta por ácidos nucleicos possuindo ligações fosfotioato.

53. Molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica uma ribozima de acordo com a reivindicação 47.

54. Molécula de ácido nucleico da reivindicação 53, em que o ácido nucleico é ADN ou ADNc.

55. Molécula de ácido nucleico da reivindicação 53 ou 54, sob o controlo de um promotor para transcrever o ácido nucleico.

56. Célula hospedeira compreendendo a ribozima de qualquer uma das reivindicações 47 a 52.

57. Vector, compreendendo a molécula de ácido nucleico de qualquer uma das reivindicações 53 a 55.

58. Vector da reivindicação 57, em que o vector é um plasmídeo, um vírus, um retrotransposão ou um cosmídeo.

59. Vector da reivindicação 58, em que o referido vírus é seleccionado de entre o grupo que consiste em retrovírus, adenovírus e vírus adeno-associados.

60. Célula hospedeira contendo o vector de acordo com qualquer uma das reivindicações 57 a 59.

61. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 60, em que a referida célula hospedeira é transformada estavelmente com o referido vector.

62. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 60 ou 61, em que a célula hospedeira é uma célula humana.

63. Método para produção *in vitro* de uma ribozima compreendendo o proporcionar de ADN codificando a ribozima de acordo com a reivindicação 47, sob o controlo transcricional de um promotor e transcrevendo o ADN para produzir a ribozima.

64. Método da reivindicação 63 compreendendo ainda a purificação da ribozima.

65. Ribozima de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 52 ou um anticorpo ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a

28, para utilização num método de aumento da mineralização óssea num animal de sangue quente.

66. Utilização de uma ribozima de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 52 ou um anticorpo ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 28 no fabrico de um medicamento para aumentar a mineralização óssea num animal de sangue quente.

67. Utilização de acordo com a reivindicação 66 em que o animal de sangue quente possui osteopenia.

68. Utilização de acordo com a reivindicação 66, onde a osteopenia é causada por um estado anémico, esteróides, heparina, um distúrbio da medula óssea, escorbuto, má-nutrição, deficiência de cálcio, osteoporose idiopática, osteopenia ou osteoporose congénita, alcoolismo, doença de fígado crónica, senilidade, estado de pós-menopausa, oligomenorreia, amenorreia, gravidez, diabetes mellitus, hipertireoidismo, doença de Cushing, acromegalia, hipogonadismo, imobilização ou inactividade, síndrome de distrofia do reflexo simpático, osteoporose regional transiente ou osteomalacia.

69. Utilização de acordo com a reivindicação 66 em que o animal tem osteoporose.

70. Utilização de acordo com a reivindicação 66, em que o animal tem acondroplasia, disostose cleidocraniana, encondromatose, displasia fibrosa, doença de Gaucher, raquitismo hipofosfatémico, doença de Marfan, exostoses múltiplas hereditárias, neurofibromatose, osteogénese imperfeita, osteopetrose, osteopoiquiose, lesões escleróticas, fracturas, doença peridontal, pseudo-artrose ou osteomielite pirogénica.

71. Composição farmacêutica, compreendendo uma ribozima de acordo com qualquer uma das reivindicações 47 a 52 ou um anticorpo ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 28 e um transportador ou diluente farmacêuticamente aceitável.

72. Método para detectar uma molécula de ácido nucleico que codifique uma proteína de ligação a TGF-beta, compreendendo a incubação de um oligonucleótido de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 45 sob condições de elevado rigor e a detecção da hibridação do referido oligonucleótido.

73. Método de acordo com a reivindicação 72, em que o referido oligonucleótido é marcado.

74. Método de acordo com a reivindicação 72 ou 73, em que o referido oligonucleótido é ligado a um suporte sólido.

75. Método para detecção de uma proteína de ligação a TGF-beta, compreendendo a incubação de um anticorpo ou fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 28 sob condições e durante um tempo suficiente para permitir que o referido anticorpo ou fragmento se ligue a uma proteína de ligação a TGF-beta, e detecção da referida ligação.

76. Método de acordo com a reivindicação 75, em que o referido anticorpo é ligado a um suporte sólido.

77. Método de acordo com a reivindicação 75 ou 76, em que o referido anticorpo é marcado.

78. Método de acordo com a reivindicação 77, em que o referido anticorpo é marcado com um marcador seleccionado de entre o grupo que consiste em enzimas, proteínas fluorescentes e radioisótopos.

79. Animal transgénico cujas células germinativas e células somáticas contêm uma molécula de ácido nucleico codificando uma proteína de ligação a TGF-beta onde a molécula de ácido nucleico é seleccionada de entre o grupo que cosiste em:

(a) uma molécula de ácido nucleico compreendendo SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13 ou 15; e

(b) uma molécula de ácido nucleico que hibrida especificamente com o complemento da molécula de ácido nucleico de (a) sob condições de elevado rigor onde a

hibridação é efectuada em SSPE 5×, solução de Denhardt 5× e SDS a 0,5% de um dia para o outro a 55 a 60°C; onde a molécula de ácido nucleico está operativamente ligada a um promotor eficaz para a expressão do referido gene, sendo o referido gene introduzido no referido animal, ou num antepassado do referido animal, num estágio embrionário, com a condição do referido animal não ser humano.

80. Animal transgénico de acordo com a reivindicação 79, em que a proteína de ligação a TGF-beta é expressa a partir de um vector de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 11.

81. Animal transgénico de acordo com a reivindicação 79 ou 80, em que a proteína de ligação a TGF-beta compreende a proteína de SEQ ID NO: 2, 6, 10, 12, 14 ou 16.

82. Animal transgénico "knockout", compreendendo um animal cujas células germinativas e células somáticas compreendem uma destruição de pelo menos um alelo de uma molécula de ácido nucleico endógena codificando uma proteína de ligação a TGF-beta, sendo a molécula de ácido nucleico endógena seleccionada de entre o grupo que consiste em:

(a) uma molécula de ácido nucleico compreendendo SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13 ou 15; e

(b) uma molécula de ácido nucleico que hibrida especificamente com o complemento da molécula de ácido nucleico de (a) sob condições de elevado rigor onde a hibridação é efectuada em SSPE 5×, solução de Denhardt 5× e SDS a 0,5% de um dia para o outro a 55 a 60°C; onde a referida destruição impede a transcrição do ARN mensageiro a partir do referido alelo em comparação com um animal sem a referida destruição, com a condição do referido animal não ser humano.

83. Animal transgénico de acordo com a reivindicação 82, em que a referida destruição é uma deleção, substituição ou inserção de ácido nucleico.

84. Animal transgénico de acordo com qualquer uma das reivindicações 80 a 83, em que o animal é seleccionado a partir do grupo que consiste num ratinho, um rato e um cão.

85. Método para determinar se uma molécula candidata é capaz de aumentar o teor mineral ósseo, compreendendo:

(a) misturar uma ou mais moléculas candidatas com uma proteína de ligação a TGF-beta codificada por uma molécula de ácido nucleico e um membro seleccionado da família de proteínas TGF-beta onde o ácido nucleico é seleccionado de entre o grupo que consiste em:

(i) uma molécula de ácido nucleico compreendendo SEQ ID NO: 1, 5, 9, 11, 13 ou 15; e

(ii) uma molécula de ácido nucleico que hibrida especificamente com o complemento da molécula de ácido nucleico de (a) sob condições de elevado rigor onde a hibridação é efectuada em SSPE 5×, solução de Denhardt 5× e SDS a 0,5% de um dia para o outro a 55 a 60°C; e

(b) determinar se a molécula candidata altera a sinalização do membro da família TGF-beta, ou altera a ligação da proteína de ligação a TGF-beta ao membro da família TGF-beta.

86. Método de acordo com a reivindicação 85, em que o referido membro da família de proteínas TGF-beta é BMP6.

87. Método para determinar se uma molécula candidata é capaz de aumentar o teor mineral ósseo, compreendendo: determinar se uma molécula candidata inibe a ligação de uma proteína de ligação a TGF-beta da reivindicação 19 ao osso ou a um análogo deste.

88. Método de acordo com a reivindicação 87, em que o referido análogo de osso é hidroxapatite.

89. Estojo para detecção de expressão do gene da proteína de ligação a TGF-beta, compreendendo um recipiente que compreende uma molécula de ácido nucleico, em que a referida molécula de ácido nucleico é seleccionada a partir do grupo que consiste em:

(a) uma molécula de ácido nucleico compreendendo a sequência nucleotídica de SEQ ID NO: 1, 5, 7, 9, 11, 13 ou 15;

(b) uma molécula de ácido nucleico compreendendo o complemento da sequência nucleotídica de (a); e

(c) uma molécula de ácido nucleico que é um fragmento de (a) ou (b) com pelo menos 50 nucleótidos de comprimento, onde o ácido nucleico não é o ácido nucleico de nenhum dos números de acesso da base de dados EMBL AC003098, AA393939 e AI113131.

90. Estojo para detecção da proteína de ligação a TGF-beta, compreendendo um recipiente que compreende um anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 28.

91. Oligonucleótido anti-sentido, compreendendo uma molécula de ácido nucleico que hibrida com uma molécula de ácido nucleico de acordo com SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 ou 15, ou o complemento desta, e em que o referido oligonucleótido inibe a expressão da proteína de ligação a TGF-beta de acordo com a reivindicação 19, em que o oligonucleótido anti-sentido não é o ácido nucleico de nenhum dos números de acesso da base de dados EMBL AC003098, AA393939 e AI113131.

92. Oligonucleótido de acordo com a reivindicação 91, em que o referido oligonucleótido tem 15 nucleótidos de comprimento.

93. Oligonucleótido de acordo com a reivindicação 92, em que o referido oligonucleótido tem 20 nucleótidos de comprimento.

94. Oligonucleótido de acordo com a reivindicação 91, em que o referido oligonucleótido tem 50 nucleótidos de comprimento.

95. Oligonucleótido de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 94, em que o referido oligonucleótido é constituído por um ou mais análogos de ácido nucleicos.

96. Oligonucleótido de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 95, em que o referido oligonucleótido é constituído por um ou mais ácidos ribonucleicos.

97. Oligonucleótido de acordo com qualquer uma das reivindicações 91 a 95, em que o referido oligonucleótido é constituído por um ou mais ácidos desoxiribonucleicos.

98. Oligonucleótido de acordo com qualquer das reivindicações 91 a 95, em que a referida sequência do oligonucleótido compreende uma ou mais ligações covalentes modificadas.

99. Oligonucleótido de acordo com a reivindicação 98, em que a referida ligação covalente modificada é seleccionada de entre o grupo que consiste numa ligação fosforotioato, numa ligação fosfotriéster, numa ligação metilfosfonato, numa ligação metileno(metilimino), numa ligação morfolino, numa ligação amida, numa ligação poliamida, numa ligação alquilo inter-açúcares de cadeia curta, numa ligação cicloalquilo inter-açúcares, numa ligação heteroatómica inter-açúcares de cadeia curta e numa ligação heterocíclica inter-açúcares.

Lisboa,

Esqueleto de Cisteínas Comum

1				50	
gremlin-humana.pro	-----	-----	-----	-----	-----
cerberus-humana.pro	MHLLLFQLLV	LLPLGKTTRH	QDGRNQSSL	SPVLLPRNQR	ELPTGNHEEA
dan-humana.pro	-----	-----	-----	-----	-----
beer-humana.pro	-----	-----	-----	-----	-----
	51				100
gremlin-humana.pro	-----	-----M	SRTAYTVGAL	LLLLGTLLPA	AEGKKKGSQG
cerberus-humana.pro	EEKPDLFVAV	PHLVAT.SPA	GEGQRQREKM	LSRFGRFWKK	PEREMHPSRD
dan-humana.pro	-----	-----	-----	-----	-----
beer-humana.pro	-----	-----	-----	----MQLPLA	LCLVCLLVHT
	101				150
gremlin-humana.pro	AI.PPPDKAQ	HNDSEQTQSP	QQPGSRNRGR	GQGRGTAMPG	EEVLESSQEA
cerberus-humana.pro	SDSEPFPPGT	QSLIQPID.G	MKMEKSPLRE	EAKKFWHHFM	FRKTPASQGV
dan-humana.pro	-----	-----	-----	MLRVLVGAVL	PAMLLAAPPP
beer-humana.pro	AFRVVEGQGW	QAFKNDATEI	IPELGEYPEP	PPELENNKTM	NRAENGGRPP
	151	↓	↓	↓	↓
gremlin-humana.pro	LHVTERKYLK	RDWCKTQPLK	QTIHEEGCNS	RTIINRF.CY	GQCNSFYIPR
cerberus-humana.pro	ILPIKSHEVH	WETCRTVPFS	QTITHEGCEK	VVVQNNL.CF	GKCGSVHFP.
dan-humana.pro	INKLALFPDK	SAWCEAKNIT	QIVGHSGCEA	KSIQNRA.CL	GQCFSYSVPN
beer-humana.pro	HHPFETKDVS	EYSCRELHFT	RYVTDGPCRS	AKPVTELVCS	GQCGPARLLP
	201	↓	↓		250
gremlin-humana.pro	HIRKEEGSFQ	SCSF...CKP	KKFTTMMVTL	NCPQLQPPTK	K.KRVTRVKQ
cerberus-humana.pro	.GAAQHSHT	SCSH...CLP	AKFTTMHLPL	NCTELSSVIK	V...VMLVEE
dan-humana.pro	TFPQSTESLV	HCDS...CMP	AQSMWEIVTL	ECPGHEEVPR	VDKLVEKILH
beer-humana.pro	NAIGRGKWWR	PSGPDFRCIP	DRYRAQRVQL	LCPGGEAPRA	RKVRLVAS..
	↓↓				
	251				300
gremlin-humana.pro	CRC.ISIDLD	-----	-----	-----	-----
cerberus-humana.pro	CQCKVKTEHE	DGHILHAGSQ	DSFIPGVSA-	-----	-----
dan-humana.pro	CSCQACGKEP	SHEGLSVYVQ	GEDGPGSQPG	THPHPHPHPH	PGGQTPEPED
beer-humana.pro	CKCKRLTRFH	NQSELKDFGT	EAARPQKGRK	PRPRARSACA	NQAELENAY-
	301	314			
gremlin-humana.pro	-----	-----			
cerberus-humana.pro	-----	-----			
dan-humana.pro	PPGAPHTEEE	GAED			
beer-humana.pro	-----	-----			

Figura 1

Expressão do Gene de Beer Humana através de RT-PCR

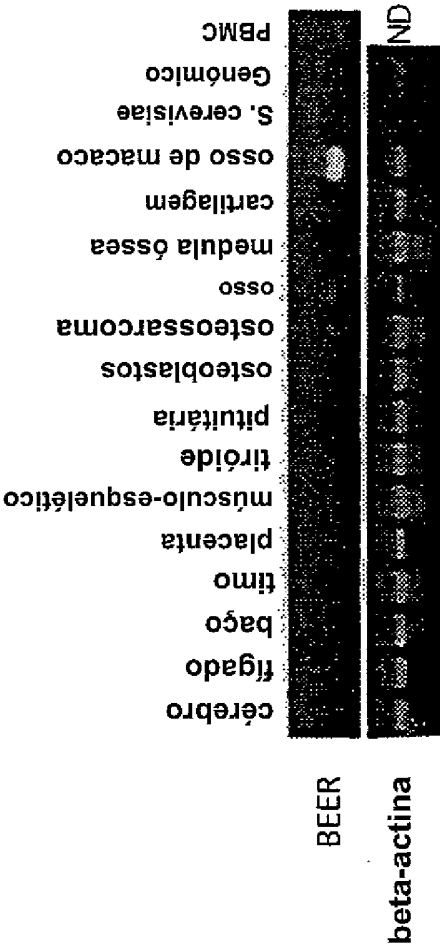


Fig. 2

Hibridação in situ de ARN de Secções de Embrião de Ratinho

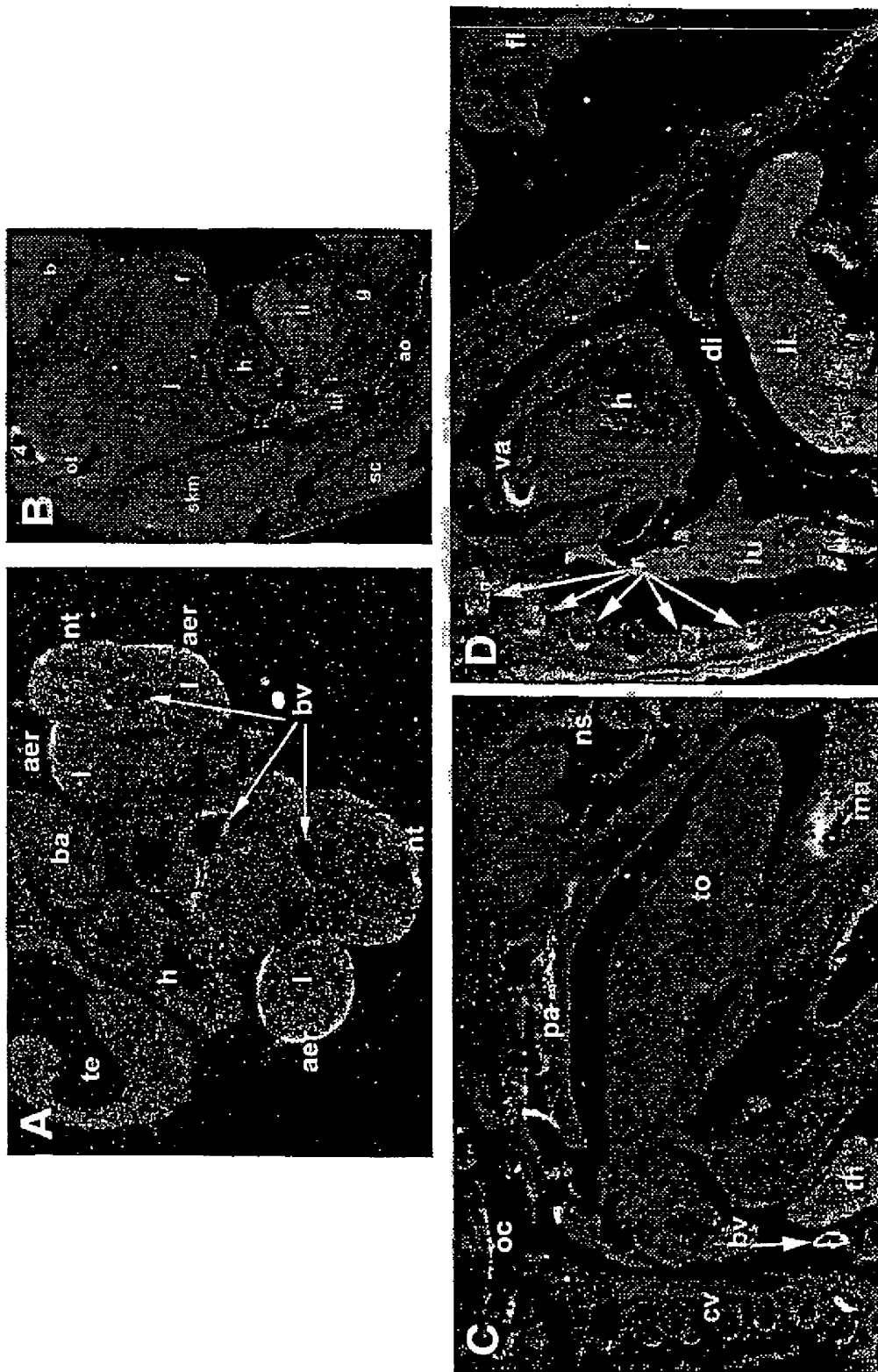
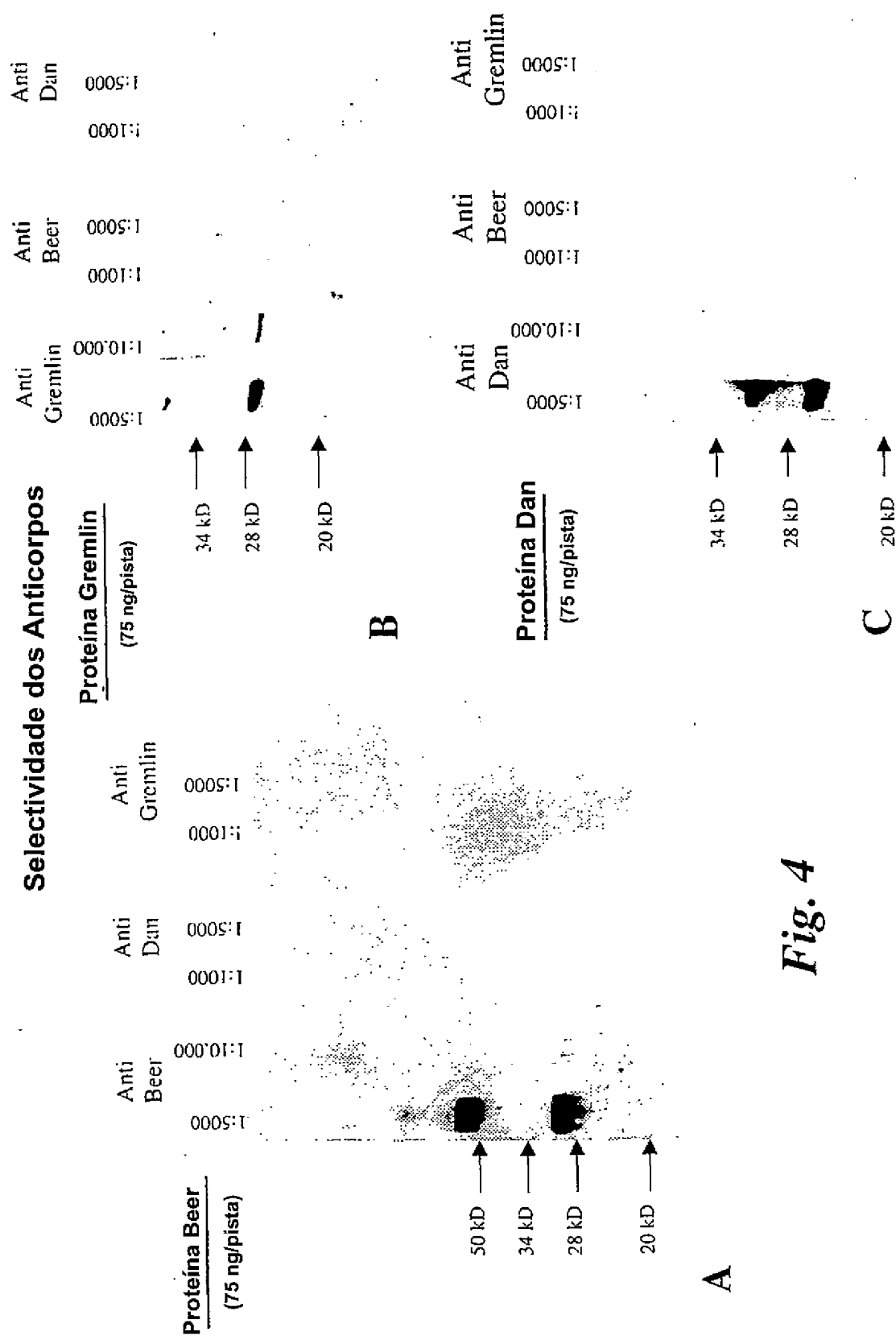


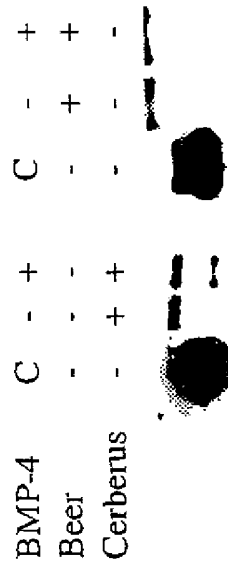
Fig. 3



Avaliação da ligação de Beer aos membros da família de BMP
Imunoprecipitação com Anti-FLAG



* Western blot" com anti-BMP-6



* Western blot" com anti-BMP-5

* Western blot" com anti-BMP-4

Fig. 5

Caracterização da Constante de Dissociação de BMP-5/Beer

.75 1.5 7.5 15 30 60 120 nM BMP-5



* Imunoprecipitação com Anti-FLAG
* "Western blot" com anti-BMP-5

Destruição Iônica da Ligação BMP-5/Beer

NaCl(mM)	500	150	150	BMP-5 western
Beer	+	+	-	controle
BMP-5	+	+	+	



* Imunoprecipitação com Anti-FLAG
**"Western blot" com anti-BMP-5

Fig. 6