

(11) Número de Publicação: **PT 1387854 E**

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

(51) Classificação Internacional:

C07K 2/00 (2011.01) **C07K 4/00** (2011.01)
C07K 7/06 (2011.01) **C07K 14/00** (2011.01)
A61K 38/02 (2011.01) **A61K 38/03** (2011.01)
A61K 38/16 (2011.01) **C07H 21/00** (2011.01)
C12N 15/00 (2011.01) **A61P 19/08** (2011.01)
A61P 19/10 (2011.01) **A61P 21/00** (2011.01)

(22) Data de pedido: **2002.01.10**

(30) Prioridade(s): **2001.01.10 US 260908 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.02.11**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.03.21**
121/2012

(73) Titular(es):

**THE UNITED STATES GOVERNMENT AS
REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF
HEALTH AND HUMAN SERVICES
OFFICE OF TECHNOLOGY TRANSFER, SUITE
325, 6011 EXECUTIVE BOULEVARD
ROCKVILLE, MD 20852-3804** US
**ST. VINCENT`S INSTITUTE OF MEDICAL
RESEARCH** AU

(72) Inventor(es):

JEFFREY S. RUBIN US
AYKUT UREN US
NICOLE JOY HORWOOD AU
MATTHEW TODD GILLESPIE AU
BRIAN K. KAY US

(74) Mandatário:

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

(54) Epígrafe: **SFRP E MOTIVOS DE PEPTÍDEOS QUE INTERAGEM COM A SFRP E RESPECTIVOS MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO**

(57) Resumo:

ESTE EVENTO DIZ RESPEITO A UM MOTIVO DE PEPTIDEOS E A PROTEÍNAS CONTENDO ESSE MOTIVO, CAPAZES DE SE LIGAREM A MEMBROS DA FAMÍLIA DE PROTEÍNAS RELACIONADAS COM FRIZZLED SECRETADAS. POR CONSEQUENTE, A INVENÇÃO TAMBÉM INCLUI MÉTODOS DE REGULAÇÃO DA INTERACÇÃO DE SFRP-1 COM AS PROTEÍNAS CONTENDO O MOTIVO.

RESUMO

SFRP E MOTIVOS DE PEPTÍDEOS QUE INTERAGEM COM A sFRP E RESPECTIVOS MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO

Este evento diz respeito a um motivo de peptídeos e a proteínas contendo esse motivo, capazes de se ligarem a membros da família de proteínas relacionadas com Frizzled secretadas.

Por conseguinte, a invenção também inclui métodos de regulação da interacção de sFRP-1 com as proteínas contendo o motivo.

DESCRIÇÃO

SFRP E MOTIVOS DE PEPTÍDEOS QUE INTERAGEM COM A sSFRP E RESPECTIVOS MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO

OBJECTO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se à diferenciação de osteoclastos, nomeadamente a um motivo de peptídeos e a 10 proteínas contendo esse motivo, capazes de se ligarem a membros da família de proteínas relacionadas com Frizzled secretadas.

DESCRIÇÃO

A remodelação óssea, um processo responsável pela renovação contínua do esqueleto humano adulto, é efectuada através dos osteoclastos e dos osteoblastos, dois tipos de células especializadas com origem, respectivamente, nos progenitores hematopoiéticos e mesenquimáticos da medula óssea. Um fornecimento contínuo e regular destas células é fundamental para a homeostase do esqueleto, uma vez que a produção (maior ou menor) de osteoclastos ou osteoblastos e/ou alterações na velocidade da respectiva apoptose são largamente responsáveis pelo desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea subjacentes a várias doenças sistémicas ou localizadas dos ossos.

A actividade aumentada dos osteoclastos desempenha um papel importante na patogénese da osteoporose pós-menopáusica, doença de Paget, metástases líticas dos ossos, mieloma múltiplo, hiperparatiroidismo, artrite reumatóide, periodontite e hipercalcemia com malignidade. Estes problemas clínicos estão associados a uma morbilidade ou mortalidade

significativa, afectando mais de 10 milhões de pacientes nos Estados Unidos da América. Contudo, apenas está disponível um número limitado de agentes que inibe a formação de osteoclastos ou a ressorção óssea, e desconhece-se a maior parte dos seus mecanismos de acção. Além disso, muitos destes agentes têm efeitos secundários significativos que limitam a sua utilidade. Logo, existe a necessidade de identificar e caracterizar os inibidores da formação de osteoclastos e da ressorção óssea como parte relevante de uma investigação contínua destinada a proporcionar benefícios terapêuticos a estes pacientes.

Em contrapartida, a actividade reduzida dos osteoclastos desempenha um papel importante na patogénese da osteopetrose, na osteodistrofia de Albright e na acondroplasia, para as quais não existe qualquer terapia específica. Nesse sentido, torna-se igualmente necessário conjugar a identificação e a caracterização de tratamentos que optimizem a formação de osteoclastos e a ressorção óssea visando disponibilizar a estes pacientes terapias eficazes.

A identificação dos mecanismos envolvidos nos distúrbios ósseos é essencial para compreendermos a fisiologia do nosso esqueleto. Embora numerosos genes e famílias de genes (e os polipeptídeos por eles codificados) que participam na regulação das células ósseas tenham sido identificados e clonados, as suas funções não foram claramente delineadas devido à complexidade das vias de formação dos ossos. É imperativo identificar definitivamente os alvos de tratamento dos distúrbios ósseos, incluindo os relacionados com a ressorção óssea, tais como a osteoporose pós-menopáusica, doença de Paget, metástases líticas dos ossos, mieloma múltiplo, artrite reumatóide, hipercalcemia com malignidade, osteopetrose, osteodistrofia de Albright e acondroplasia.

W001/19855A revela o conceito geral das sFRPs e as composições farmacêuticas contendo sFRPs.

Baranski et al, *Developmental Biology*, vol. 217, no. 1 (2000) páginas 25-41 relativo aos padrões de expressão dinâmica de frzrb-1.

Hausler et al, *Bone*, vol. 27, no. 4 (2000) página 335 relativo às sFRPs expressas por osteoblastos.

Rattner et al, *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, vol. 94, no. 7 (1997) páginas 2859-2863 relativo a uma família de proteínas secretadas com homologia aos receptores frizzled.

Hijikata et al, *FEBS*, vol. 457, no. 3 (1999) páginas 405-408 relativo à indução de apoptose de células da linhagem de monocitomacrófagos.

Van Der Pluijm et al, *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 9, no. 7 (1994) páginas 1021-1028 relativo a integrinas e à ressorção osteoclástica em três culturas de órgãos ósseos.

Finch et al, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol 94, no. 13 (1997) páginas 6770-6775 relativo à purificação e à clonagem molecular de um antagonista de acção Wnt.

RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve proteínas que se ligam à proteína-1 relacionada com Frizzled secretada (-sFRP-1). Numa configuração, o peptídeo de ligação da sFRP-1 é um peptídeo purificado.

Numa outra configuração, é inventado um método para aumentar a diferenciação dos osteoclastos. Num exemplo

específico não limitativo, o método inclui a administração, a um indivíduo, de uma dose terapeuticamente eficaz de peptídeos purificados conforme descrito (ou fragmentos, fusões ou mimetismos efectivos) a fim de aumentar a diferenciação de osteoclastos.

Numa configuração posterior, é fornecido um método destinado a inibir a formação de osteoclastos no indivíduo. O método inclui a administração de uma dose terapeuticamente eficaz de sFRP-1 (SEQ ID NO: 3), fragmentos de SEQ ID NO: 3, ou fusões ou variantes de SEQ ID NO: 3, a um indivíduo, em que o polipeptídeo se liga a uma molécula de RANKL conforme estabelecido em GenBank Accession No. AF 013171, GenBank Accession AF019047, GenBank Accession No. AP053712 ou a um outro membro da família TNF.

Numa outra configuração, é proposto um método destinado a modular a actividade das células T. Num exemplo específico não limitativo, o método inclui a administração, a um indivíduo, de uma dose terapeuticamente eficaz de peptídeos de ligação da sFRP-1 purificada, conforme descrito, a fim de modular a actividade das células T.

A presente invenção encontra-se definida nas reivindicações.

O polipeptídeo não apresenta a sequência para a SARP-2 humana, referida em Melcomyant et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 13636 - 13641, com alanina na posição 174 (Uni Prot IDNo.Q8N474).

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A **FIG. 1** consiste num gráfico que mostra o resultado da proteína de fusão A-C2 (SEQ ID NO: 14)/AP (fosfatase alcalina) que se liga à sFRP-1 (SEQ ID NO: 3). Caldos de colónias bacterianas independentes, infectados com fagos expressando a

quimera A-C2/AP, foram incubados em poços ELISA revestidos com sFRP-1 (e, subsequentemente, bloqueados com BSA) ou apenas com BSA. Cada um dos caldos (identificado como I-1, I-2, I-6, I-12, I-13 e I-14) continha actividade de AP, conforme medida por reacção com pNPP e desenvolvimento de coloração a 405 nm, ligando-se especificamente aos poços revestidos com sFRP-1 (SEQ ID NO: 3) (barras cinzentas) em comparação com os poços apenas revestidos com BSA (barras pretas). Cada amostra foi testada individualmente; este gráfico é representativo de várias experiências.

A **FIG. 2** consiste num gráfico que mostra os resultados de um ensaio de ligação competitiva de A-C2/AP (SEQ ID NO: 14) e peptídeos do tipo 12-mer A-C2 (SEQ ID NO: 14) e A-F7 (SEQ ID NO: 12) a BSA ou sFRP-1 (SEQ ED NO: 3). Os peptídeos solúveis do tipo 12-mer, A-C2 (SEQ ID NO: 14) e A-F7 (SEQ ID NO: 12) foram incubados previamente durante 30 minutos nas concentrações indicadas de caldo bacteriano contendo a quimera A-C2/AP antes da adição aos poços ELISA revestidos com sFRP-1 (quadradinhos abertos para A-C2 e losangos abertos para A-F7) ou BSA (círculos abertos para A-C2 e triângulos abertos para A-F7). As amostras foram testadas em triplicado e os resultados indicados como a média +/-DP. Este gráfico é representativo de três experiências.

A **FIG. 3** consiste num gráfico que mostra os resultados de ensaios de ligação de proteínas de fusão A-C2 (SEQ ID NO: 14)/fosfatase alcalina substituída por alanina a sFRP-1 (SEQ ID NO: 3) num teste ELISA. O gráfico de barras indica a média +/- DP de medições em triplicado a partir de uma única experiência representativa. Uma análise paralela destas amostras em poços revestidos com o anticorpo monoclonal contra o epítopo FLAG revelou que a concentração da quimera nos diferentes caldos foi semelhante.

A **FIG. 4** consiste num conjunto de diagramas que mostra a análise calorimétrica da interacção entre o peptídeo A-C2 e a proteína sFRP-1. A FIG. 4A é uma equação representativa do calor gerado quando aliquotas da solução A-C2 foram adicionadas a uma câmara contendo sFRP-1 dissolvida em PBS. A FIG. 4B é uma equação representativa do calor gerado no PBS controlo correspondente. Com base na quantidade de calor libertada, foram calculados vários parâmetros da reacção de ligação incluindo a entalpia (ΔH) e a constante de dissociação (K_d).

A **FIG. 5** consiste num gráfico que mostra os resultados de ensaios de ligação ELISA usando RANKL solúvel (sRANKL) e sFRP-1 (SEQ ID NO: 3). O losango aberto representa a molécula de sRANKL a ligar-se à sFRP-1 e o sinal "+" representa a ligação de sRANKL à albumina de soro bovino (BSA).

A **FIG. 6** consiste num conjunto de gráficos que mostra que a sFRP-1 inibe a formação de osteoclastos em dois modelos experimentais diferentes. A **FIG. 6A** é um gráfico representativo dos resultados de experiências de co-cultura, em que os osteoblastos primários e a medula óssea foram incubados com diferentes concentrações de sFRP-1. Subsequentemente, os poços foram corados para determinar o número de células TRAP+ multinucleadas (MNC). Os resultados demonstram que à medida que a concentração de sFRP-1 aumenta, a maturação dos osteoclastos diminui (conforme evidenciado pela diminuição de TRAP+). Os resultados obtidos são a média +/- DP de medições em quadruplicado. A **FIG. 6B** é um gráfico representativo dos resultados de experiências, em que células esplénicas adultas foram tratadas com RANKL, com um factor de estimulação de colónias de macrófagos (M-CSF) e diferentes concentrações de sFRP-1 (SEQ ID NO: 3). Subsequentemente, os poços foram corados para determinar o número de células TRAP+ multinucleadas (MNC). Os dados apresentados são a média +/- DP

de medições em quadruplicado. Os resultados demonstram que à medida que a concentração de sFRP-1 aumenta, a maturação dos osteoclastos diminui.

A **FIG. 7** consiste num par de gráficos que mostra que o anti-soro de sFRP-1 estimula a formação de osteoclastos em co-culturas de osteoblastos primários e células esplénicas adultas. A **FIG. 7A** é um gráfico representativo de que a ligação de anticorpos específicos da sFRP-1 à sFRP-1 provoca um aumento da formação de osteoclastos. A formação de osteoclastos, conforme medida pela coloração com TRAP+, foi calculada em co-culturas de osteoblastos primários e células esplénicas adultas sem suplementos hormonais ou com doses suboptimizadas de $1\alpha,25(\text{OH}_2)$ vitamina D₃ (10^{-10}M) e dexametasona (10^{-9}M) na presença ou na ausência de imunoglobulina purificada (~2 µg/ml) de coelho imunizado com sFRP-1 recombinante. Os resultados são a média +/- DP de células TRAP+ mononucleadas e multinucleadas detectadas em amostras quadruplicadas após 7 dias em meio de cultura. A **FIG. 7B** é um gráfico representativo de que a ligação de anticorpos específicos da sFRP-1 à sFRP-1 provoca um aumento da formação de osteoclastos na presença de doses optimizadas de $1\alpha,25(\text{OH}_2)$ vitamina D₃ (10^{-8}M) e prostaglandina E2 (PGE2, 10^{-7} M). A formação de osteoclastos, conforme medida pela coloração com TRAP+, foi calculada em co-culturas de osteoblastos primários e células esplénicas adultas sem suplementos hormonais ou com doses optimizadas de $1\alpha,25(\text{OH}_2)$ vitamina D₃ (10^{-8}M) e prostaglandina E2 (PGE2, 10^{-7}M) na presença ou na ausência de imunoglobulina purificada (-1 µg/ml) de coelho imunizado com sFRP-1 recombinante. Os resultados são a média +/- DP de células TRAP+ mononucleadas e multinucleadas detectadas em amostras quadruplicadas após 7 dias em meio de cultura.

A **FIG. 8** consiste num gráfico que mostra que o peptídeo A-C2 estimula a formação de osteoclastos em co-culturas de

osteoblastos e células esplénicas adultas. A formação de osteoclastos em resposta às doses optimizadas de $1\alpha,25(\text{OH}_2)$ vitamina D₃ (10^{-8}M) e PGE2 (10^{-7}M) não foi posteriormente aumentada pela adição concomitante do domínio de homologia com netrina (NHD) da sFRP-1 (SEQ ID NO: 13; 5 µg/ml), mas foi acentuadamente estimulada através da incubação simultânea com o peptídeo A-C2 (SEQ ID NO: 14; 5 µg/ml). Como controlo positivo no caso da osteoclastogénesis aumentada, as células foram tratadas com doses suboptimizadas de $1\alpha,25(\text{OH}_2)$ vitamina D₃ (10^{-10}M) e PGE2 (10^{-9}M) na ausência ou na presença de anticorpos específicos de sFRP-1 de 1/500. O gráfico de barras apresenta a média +/- DP de células TRAP+ multinucleadas testadas em quadruplicado.

A **FIG. 9** consiste num gráfico que mostra os resultados de uma experiência em que A-C2 (SEQ ID NO: 14) foi incubado durante diferentes períodos de tempo com células esplénicas adultas. O grupo 1 constituiu o controlo que não continha o peptídeo A-C2 (SEQ ID NO: 14). O grupo 2 foi tratado com A-C2 (SEQ ID NO: 14) entre os dias 0-3, o grupo 4 foi tratado com A-C2 (SEQ ID NO: 14) entre os dias 4-7, o grupo 4 foi tratado com A-C2 (SEQ ID NO: 14) entre os dias 7-10 e o grupo 5 foi tratado com A-C2 (SEQ ID NO: 14) entre os dias 0-10. Todos os grupos tratados receberam RANKL a 50 ng/ml e M-CSF a 25 ng/ml. A presença de A-C2 (SEQ ID NO: 14) entre os dias 0-3 causou um aumento da produção de osteoclastos.

As **FIGs. 10A e 10B** ilustram gráficos com os resultados obtidos da incubação de A-C2 (SEQ ED NO: 14) com células esplénicas adultas contendo células T (FIG. 10A) e células esplénicas sem células T (FIG. 10B): As células T foram separadas das células esplénicas imunomagneticamente. A formação de osteoclastos foi induzida por RANKL (50 ng/ml) e M-CSF (25 ng/ml) e avaliada pela contagem de células TRAP+ multinucleadas após 9 dias de cultura. A formação de

osteoclastos foi medida em culturas de células esplénicas adultas (FIG. 14A) ou em culturas sem células T (FIG. 10B) na ausência (Controlo +ve) ou na presença de A-C2 (5 mg/ml). Estas culturas não contêm quaisquer osteoblastos, pelo que os efeitos do A-C2 ficaram limitados às células linfocíticas ou hematopoiéticas. Os gráficos de barras apresentam a média +/- DP das células TRAP+ multinucleadas de amostras quadruplicadas. Os controlos desta experiência incluíram células esplénicas [ricos (FIG. 10A) ou pobres em células T (FIG. 10B)] na ausência de RANKL e M-CSF (Controlo -ve) e nestas condições não foram produzidos quaisquer osteoclastos. Como controlo positivo para o sistema de ensaio (Controlo +ve), as culturas foram tratadas com RANKL (50 ng/ml) e M-CSF (25 ng/ml) e o efeito da adição de A-C2 foi comparado com esta cultura.

As **FIGs. 11A e 11B** consistem em gráficos que lustram a estimulação de A-C2 (SEQ ID NO: 14) na diferenciação de células TRAP+ multinucleadas em culturas de células RAW264.7 (TIB-71). O grupo 1 constituiu o controlo positivo que continha 50 ng/ml de RANKL. Os grupos 2, 3 e 4 continham 50 ng/ml de RANKL e 5 µg/ml, 1 µg/ml ou 0,5 µg/ml de A-C2 (SEQ ID NO: 14), respectivamente. A estimulação foi observada quando as células T foram adicionadas às culturas (FIG. 15A) em comparação quando não foram adicionadas às culturas (FIG. 15B).

A **FIG. 12** consiste num gráfico representativo da avidez de ligação de vários mutantes de deleção da sFRP-1 em termos de RANKL em testes ELISA. Os poços foram revestidos com a sFRP-1 completa, com qualquer um dos conjuntos de mutantes de deleção da sFRP-1 etiquetados com epítopos (Uren et al, J. Biol. Chem. 275:4374-382, 2000) ou com um controlo de BSA e a seguir incubados sequencialmente com RANKL solúvel e reagentes para detectar a ligação de RANKL aos poços. Os resultados

apresentados são a média +/- DP das medições em triplicado a partir de uma experiência representativa.

A **FIG. 13** consiste num conjunto de quatro gráficos que mostram que a ligação de RANKL ao CRD de expressão bacteriana em testes ELISA é forte e pode apresentar duas afinidades. A **FIG. 13A** constitui um gráfico representativo da ligação de RANKL aos poços revestidos com CRD. A densidade óptica dos poços indica a quantidade de RANKL retido nos poços e é equacionada como uma função da concentração de RANKL solúvel incubada nos poços. A **FIG. 13B** constitui uma equação de Scatchard com os dados da ligação de RANKL ilustrados na FIG. 13A. A ligação parece ser caracterizada por mais do que uma afinidade. A **FIG. 13C** constitui a reformatação da análise de Scatchard da FIG. 13B, relativa a um ponto de ligação de maior afinidade putativa. A **FIG. 13D** constitui a reformatação da análise de Scatchard da FIG. 13B, relativa a um ponto de ligação de menor afinidade putativa.

A **FIG. 14** consiste num conjunto de três gráficos que mostram que o CRD de expressão bacteriana da sFRP-1 inibe a formação de osteoclastos em diversos modelos experimentais, incluindo um independente de RANKL. Nomeadamente: (1) RAW264.7 + TNF- α + TGF- β (FIG. 14A); Horwood et al, Journal of Immunology 166:4915-4921, 2001; Quinn et al, Journal of Bone and Mineral Research. 16, 1787-1794, 2001 (2) linha de células macrofágicas/monocíticas RAW264.7 + RANKL (FIG. 14B) e (3) células da medula óssea + RANKL + M-CSF (FIG. 14C). Em ambos os sistemas, o modelo dependente de RANKL (FIG. 14B e FIG. 14C) e o modelo independente de RANKL (FIG. 14A, formação de osteoclastos dependente de TNF- α), o CRD de expressão bacteriana mimetizou a acção da sFRP-1 completa e com potência semelhante.

A **FIG. 15** consiste num gráfico que mostra que a sFRP-1 pode inibir a formação de osteoclastos em células RAW264.7

tratadas com uma combinação de citoquinas que inclui TNF- α , mas não RANKL. O efeito da sFRP-1 foi avaliado através da aplicação do método independente de RANKL de formação de osteoclastos utilizando a linha de células macrofágicas/monocíticas RAW264.7 (Quinn et al., Journal of Bone and Mineral Research. 16, 1787-1794, 2001) e comparado com o da osteoprotegerina. O TGF α foi adicionado durante os primeiros trés dias da cultura a fim de aumentar o número de osteoclastos. A sFRP-1 inibiu a formação de osteoclastos dependente de TNF- α quando presente durante os primeiros três dias de cultura, embora não tivesse sido observado qualquer efeito de OPG que sugerisse que a sFRP-1 actuou independentemente de RANKL, através da ligação ao TNF- α ou através da sinalização de WNT.

A **FIG. 16** consiste num diagrama esquemático de um possível mecanismo de ligação sFRP-1 (SEQ ID NO: 3)/RANKL. É de notar que o motivo de ligação da sFRP-1 na sequência de RANKL está localizado exactamente abaixo dos pontos de clivagem da TACE (setas). TACE é a enzima de conversão do TNF- α , conhecida por processar o RANKL (L. Lum et al, J. Biol. Chem. 274:13613-13618, 1999). A ligação da sFRP-1 ao RANKL pode alterar o processamento de RANKL por TACE, que por sua vez pode modificar a actividade de RANKL.

A **FIG. 17** consiste num diagrama que mostra um possível modelo do papel da sFRP-1 na formação de osteoclastos. Um RANKL de expressão celular de suporte aos osteoclastos interage com a sFRP-1 (SEQ ID NO: 3) levando à inibição da formação de osteoclastos. Quando o motivo de peptídeos (SEQ ID NO: 9) é adicionado à solução, liga-se à sFRP-1 (SEQ ID NO: 3) e promove a diferenciação dos osteoclastos.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

As sequências de aminoácidos e ácidos nucleicos enumeradas na listagem inclusa estão indicadas usando abreviaturas padrão para bases de nucleótidos e códigos de três letras para aminoácidos. É apenas exibida uma cadeia de cada sequência de ácido nucleico, mas a cadeia complementar é interpretada conforme incluída por qualquer referência à cadeia apresentada.

SEQ ID NO: 1 Mostra a sequência de cDNA da sFRP-1 humana.

SEQ ID NO: 2 Mostra a sequência do ácido nucleico do quadro de leitura aberto da sFRP-1 humana.

SEQ ID NO: 3 Mostra a sequência de aminoácidos da sFRP-1 humana.

SEQ ID NO: 4 Mostra a sequência de aminoácidos da sFRP-1-M/H humana.

SEQ ID NO: 5 Mostra a sequência de aminoácidos da sFRP-Δ1-M/H humana.

SEQ ID NO: 6 Mostra a sequência de aminoácidos da sFRP-Δ2-M/H humana.

SEQ ID NO: 7 Mostra a sequência de aminoácidos da sFRP-Δ3-M/H humana.

SEQ ID NO: 8 Mostra a sequência de aminoácidos da sFRP-ΔCRD-M/H humana.

SEQ ID NO: 9 Mostra a sequência de aminoácidos do motivo de peptídeos.

SEQ ID NO: 10 Mostra o motivo de peptídeos do receptor A do ANP (humano).

SEQ ID NO: 11 Mostra a sequência de aminoácidos do peptídeo A-E4.

SEQ ID NO: 12 Mostra a sequência de aminoácidos do peptídeo A-F7.

SEQ ID NO: 13 Mostra a sequência de aminoácidos do domínio de homologia com netrina da sFRP-1.

SEQ ID NO: 14 Mostra a sequência de aminoácidos do peptídeo A-C2.

SEQ ID NOs: 15-26 Mostra peptídeos gerados para serem utilizados em experiências de exploração de alanina.

SEQ ID NO: 27 Mostra a sequência de aminoácidos de B-B9.

SEQ ID NO: 28 Mostra a sequência de aminoácidos detectada em RANKL que contém uma sequência semelhante à da SEQ ID NO: 9.

SEQ ID NO: 29 Mostra a sequência de aminoácidos detectada num receptor de netrina que contém uma sequência semelhante à da SEQ ID NO: 9.

SEQ ID NOs: 30-39 Mostra as sequências de ácidos nucleicos de vários iniciadores e sondas utilizados em PCR e em experiências de hibridização.

SEQ ID NO: 40 Mostra a sequência de aminoácidos do peptídeo A-D9.

Descrição Detalhada

I. Acrónimos

BSA: albumina do soro bovino

CRD: domínio rico em cisteína

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática

HSPG: proteoglicanos de sulfato de heparina

mAb: anticorpo monoclonal

MDCK: rim canino Madin-Darby

M/H: etiquetas de epítópos Myc-His

PAGE: electroforese em gel de poliacrilamida

PBS: solução salina tamponada com fosfato

sFRP: proteína relacionada com Frizzled secretada

Wnt: proteínas Wnt

II. Terminologia

Salvo observação em contrário, os termos técnicos são empregues de acordo com o seu uso convencional. As definições de termos comuns em biologia molecular podem ser encontradas em Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); e Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

A fim de facilitar a revisão das várias configurações da invenção, são fornecidas 35 explicações dos termos específicos que se seguem:

Anormal: Desvio das características normais. As características normais podem ser detectadas num controlo, num padrão de população, etc. Por exemplo, sempre que a condição anormal constituir um estado de doença, tal como osteoporose (caracterizada pela diminuição de massa óssea), algumas fontes adequadas de características normais podem incluir um indivíduo que não sofra dessa doença (ex. osteoporose), uma população padrão de indivíduos que se considere não estar afectada pela doença, etc.

Do mesmo modo, anormal pode referir-se a uma condição associada à doença. A expressão "associada a" inclui um maior risco de desenvolver a doença, bem como a própria doença. Por exemplo, uma certa anomalia (como uma redução na expressão de SFRP, que por sua vez regula positivamente a formação de osteoclastos) pode ser descrita como estando associada à condição biológica da osteoporose (diminuição da massa óssea); logo, a anomalia é preditiva não só de um maior risco de desenvolver osteoporose como também da existência de osteoporose.

Uma expressão proteica anormal, tal como a expressão anormal da sFRP, refere-se à expressão de uma proteína que, de algum modo, é diferente da expressão da proteína numa situação normal (tipo selvagem). Tal abrange, mas não se limita necessariamente a: (1) uma mutação na proteína, em que um ou mais resíduos de aminoácidos é diferente; (2) uma pequena deleção ou adição de um ou alguns resíduos de aminoácidos à sequência da proteína; (3) uma maior deleção ou adição de resíduos de aminoácidos, em que um domínio integral ou parcial da proteína é removido ou acrescido; (4) a expressão de uma quantidade aumentada da proteína, comparada a um controlo ou nível padrão; (5) a expressão de uma quantidade reduzida da proteína, comparada a um controlo ou nível padrão; (6) a alteração da localização subcelular ou alvo da proteína; (7) a alteração da expressão temporariamente regulada da proteína (em que a proteína é expressa quando normalmente não o seria ou, em alternativa, não é expressa quando normalmente seria); (8) a alteração no processamento pós-traducional; e (9) a alteração da expressão localizada (ex. órgão ou tecido específico) da proteína (em que a proteína não é expressa onde normalmente o seria ou é expressa onde normalmente não o seria), quando comparada a um controlo ou padrão.

Os controlos ou padrões adequados para comparação a uma amostra, visando a determinação de anomalia, incluem amostras consideradas normais bem como valores laboratoriais, mesmo que possivelmente definidos de modo arbitrário, tendo em atenção que os referidos valores podem variar de laboratório para laboratório. Os padrões e valores laboratoriais podem ser definidos com base num valor populacional conhecido ou determinado e fornecidos em forma de gráfico ou tabela que facilite a comparação de valores medidos, determinados experimentalmente.

cDNA (ADN complementar): Uma peça de ADN sem segmentos internos não codificantes (ítrons) e sequências regulatórias que determinam a transcrição. O cDNA é sintetizado em laboratório por transcrição reversa a partir do RNA mensageiro extraído das células.

CRD: Domínio rico em cisteína, que habitualmente possui cerca de 120 aminoácidos de comprimento e se encontra na extremidade amino-terminal das proteínas Fz. Na sFRP prototípica aqui descrita, o CRD compreende os resíduos de sFRP-1 38-166. Met (ATG) foi adicionado ao N-terminal a fim de facilitar a expressão proteica. Habitualmente, o Met fica clivado nas bactérias, à medida que a proteína é processada. A sequência do CRD é apresentada a seguir:

MFQSDIGPYQ SGRFYTKPPQ CVDIPADLRL CHNVGYKKMV
LPNLLEHETM AEVKQQASSW.VPLLKNCHAGTQVFLCSLF

APVCLDRPTY PCRWLCEAVRDSCEPVMQFF

GFYWPEMLKC.DKFPEGDVCI (amino acids 38-166 of SEQ ID NO:3) (aminoácidos)

Marcador detectável ou etiqueta: Um "marcador detectável" ou uma "etiqueta" é qualquer molécula ou composição detectável por meios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, imunoquímicos, eléctricos, ópticos ou químicos. Exemplos de etiquetas, incluindo isótopos radioactivos, substratos enzimáticos, cofactores, ligantes, agentes quimioluminescentes ou fluorescentes, haptenos, enzimas, partículas de ouro coloidal, partículas de látex coloridas e etiquetas de epítopos, foram anteriormente inventados e são do conhecimento dos profissionais qualificados (consulte, por exemplo, as patentes norte-americanas nº 4,275,149; 4,313,734; 4,373,932; e 4,954,452).

Etiquetas de epítopos: são fitas curtas de aminoácidos, nas quais pode ser criado um anticorpo específico que, em

certas configurações, permite identificar e seguir especificamente a proteína etiquetada que foi adicionada a um organismo vivo ou a células de cultura. É possível detectar a molécula etiquetada recorrendo a algumas técnicas distintas. Exemplos de tais técnicas incluem: imunohistoquímica, imunoprecipitação, citometria de fluxo, microscopia de imunofluorescência, ELISA, imunomarcação ("western") e cromatografia de afinidade. Exemplos de etiquetas de epítópos úteis incluem FLAG, T7, HA (hemaglutinina) e myc.

Fluoróforo: Composto químico que, quando estimulado por exposição a um determinado comprimento de onda de luz, emite luz (ou seja, entra em fluorescência), por exemplo num comprimento de onda diferente. Os fluoróforos podem ser descritos em termos do seu perfil de emissão ou "cor". Os fluoróforos verdes, por exemplo Cy3, FITC e Verde Oregon, são caracterizados pela respectiva emissão em comprimentos de onda geralmente entre 515-540 λ . Os fluoróforos vermelhos, por exemplo Vermelho Texas, Cy5 e tetrametilrodamina, são caracterizados pela respectiva emissão em comprimentos de onda geralmente entre 590-690 λ .

Exemplos de fluoróforos passíveis de serem utilizados são descritos na Patente Norte-americana No. 5,866,366 e incluem, nomeadamente: ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-dissulfônico, acridina e derivados tais como acridina e isotiocianato de acridina, ácido 5-(2,-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfônico (EDANS), 4-amino-N-[3-vinilsulfônico]fenil]naftalimida-3,5 dissulfonato (Amarelo Lúcifer VS), N-(4-anilino-1-naftil)maleimida, antranilamida, Amarelo Brilhante, cumarina e derivados tais como cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Cumaria 120), 7-amino-4-trifluorometilcumarina (Cumaria 151); cianosina; 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI); 5", 5"-dibromopirogalol-sulfoneftaleína (Vermelho de Bromopirogalol); 7-dietilamino-3-

(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; pentaacetato de dietilenetriamina; ácido 4,4'-diisotiocianatodihidrostilbeno-2,2'- dissulfônico; ácido 4,4'-diisotiocianatodihidrostilbeno-2,2'- dissulfônico; cloreto 5-[dimetilamino]naftaleno-1-sulfônico (DNS, cloreto de dansil); ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzóico (DABCYL); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina e derivados tais como eosina e isotiocianato de eosina; eritrosina e derivados tais como eritrosina B e isotiocianato de eritrosina; etídio; fluoresceína e derivados tais como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazina-2-il)aminofluoresceína (DTAF), 27'-dimetoxi-4'5,-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC) e QFITC (XRITC); fluorescamina; IR144; IR1446; isotiocianato de Verde Malaquita; 4-metilumbeliferona; orto cresolftaleína; nitrotrosina; pararosanilina; Vermelho Fenol; B-ficoeritrina; oftaldialdeído; pireno e derivados tais como pireno, butirato de pireno e butirato de succinimidil 1-pireno; Vermelho Reactivo (Cibacron .RTM. Vermelho Brilhante 3B-A); rodamina e derivados tais como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirodamina (R6G), cloreto de B-sulfônico rodamina lisamina, rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X, sulfurodamina B, sulfurodamina 101 e cloreto de sulfônico derivado de sulfurodamina 101 (Vermelho Texas); NNN'N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA); tetrametil rodamina; isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC); riboflavina; ácido rosólico e derivados de quelato de tório.

Outros fluoróforos aplicáveis incluem proteína fluorescente verde (GFP), LissamineTM, dietilaminocumarina, clorotriazinil de fluoresceína, naftofluoresceína, 4,7-diclororodamina, xanteno e seus derivados. Podem igualmente

ser utilizados outros fluoróforos conhecidos dos especialistas nesta matéria.

Proteína de fusão: Proteína que comprehende duas sequências de aminoácidos não detectadas em conjunto na natureza. A expressão "proteína de fusão" do motivo de peptídeos da sFRP" refere-se a uma proteína com uma primeira sequência de aminoácidos que liga a sFRP e uma segunda sequência de aminoácidos. O motivo de ligação da sFRP e a segunda sequência de aminoácidos podem ser referidos alternativamente como domínios da proteína de fusão. Assim, por exemplo, a presente invenção fornece proteínas de fusão que abrangem o primeiro e o segundo domínio, em que o primeiro inclui um motivo de peptídeos que se liga à sFRP. O elo entre o primeiro e o segundo domínio da proteína de fusão é regra geral, mas não necessariamente, uma ligação de peptídeos.

Isolado: Um componente biológico "isolado" (tal como um ácido nucleico, proteína ou organelo) substancialmente separado ou purificado face a outros componentes biológicos na célula do organismo em que o componente existe de forma natural (isto é, outros DNA e RNA cromossómicos e extra-cromosómicos, proteínas e organelos). Os ácidos nucleicos e as proteínas que foram "isolados" incluem ácidos nucleicos e proteínas purificados por métodos de purificação padrão. O termo abrange também ácidos nucleicos e proteínas preparados por expressão recombinante numa célula hospedeira, bem como ácidos nucleicos sintetizados quimicamente.

Grupo de ligação: Um grupo de ligação é um "ramo químico" entre uma proteína ou um peptídeo e um marcador detectável. Como os especialistas na matéria reconhecerão, para estabelecer a ligação de um ramo químico, cada um dos reagentes tem de conter os grupos necessários para ligar o peptídeo ao marcador detectável. As combinações representativas desses grupos são amino com carboxila para

formar ligações amídicas, carboxila com hidroxila para formar ligações ésteres, amino com halogenetos de alquil para formar ligações alquilamínicas, tióis com tióis para formar dissulfuretos ou tióis com maleimidas ou halogenetos de alquil para formar tioéteres. Sempre que não estiverem presentes as funções de hidroxila, carboxila, amino e outras, estas podem ser introduzidas por métodos conhecidos. Do mesmo modo, conforme reconhecido por especialistas na matéria, pode ser empregue uma vasta gama de grupos de ligação. A estrutura da ligação deve ser co-valente estável, formada para anexar a proteína ou o peptídeo ao marcador detectável ou etiqueta. Em certos casos, o grupo de ligação pode ser designado como hidrofílico ou hidrofóbico para aumentar as características pretendidas do ligante e do receptor. As ligações co-valentes devem ser estáveis relativamente às condições da solução às quais o ligante e o grupo de ligação são sujeitos. Regra geral, os grupos de ligação preferidos encontram-se entre 1-20 carbonos e 0-10 heteroátomos (NH, O, S) e podem constituir uma cadeia ramificada ou recta. Sem limitar o que precede, é óbvio para os especialistas na matéria que apenas as combinações de átomos quimicamente compatíveis integram o grupo de ligação. Por exemplo, os grupos de amidos, ésteres, tioéteres, tioésteres, cetos, hidroxilas, carboxilas e éteres em combinação com ligações carbono-carbono são modelos aceitáveis de grupos de ligação quimicamente compatíveis.

Mimética: Uma molécula (tal como um composto químico orgânico) que mimetiza a actividade de uma proteína, nomeadamente da sFRP ou dos seus fragmentos, do motivo de peptídeos (SEQ ID NO: 9 e SEQ ID NO: 40) ou das suas variantes ou fusões. As configurações peptidomiméticas e organomiméticas enquadram-se no âmbito deste termo, onde a disposição tridimensional dos constituintes químicos das referidas péptido- e organomiméticas imitam a disposição tridimensional da estrutura peptídica e das cadeias laterais dos aminoácidos

componentes, levando a que as péptido- e organomiméticas dos peptídeos produzam uma actividade inibidora específica substancial ou uma actividade agonista. Para aplicações de modelos informáticos, um farmacóforo é a definição tridimensional idealizada dos requisitos estruturais para a actividade biológica. As moléculas péptido- e organomiméticas podem ser desenhadas para ajustar cada farmacóforo ao software do modelo informático actual (usando a formulação de fármacos assistida por computador ou CADD). Consulte Walters, "Computer-Assisted Modeling of Drugs," in Klegerman & Groves, eds., *Pharmaceutical Biotechnology*, Interpharm Press: Buffalo Grove, IL, pp. 165-174, 1993 e *Principles of Pharmacology* (ed. Munson), chapter 102, 1995, para uma descrição das técnicas utilizadas na formulação de fármacos assistida por computador.

Oligonucleótidos: Uma sequência de polinucleótidos linear de aproximadamente 100 bases de nucleótidos de comprimento. Em várias configurações, um oligonucleótido tem pelo menos 10, 20, 30, 40 ou 50 nucleótidos de comprimento.

Funcionalmente ligada: Uma primeira sequência de ácidos nucleicos está funcionalmente ligada a uma segunda sequência de ácidos nucleicos quando a primeira sequência se encontra numa relação funcional com a segunda sequência de ácidos nucleicos. Por exemplo, um promotor está funcionalmente ligado a uma sequência codificante caso o promotor afecte a transcrição ou expressão da sequência codificante. Regra geral, as sequências de DNA funcionalmente ligadas são contíguas e, sempre que necessário, destinam-se a unir duas regiões codificantes de proteína, no mesmo quadro de leitura.

ORF (quadro de leitura aberto): Uma série de tripletos de nucleótidos (codões) que codificam aminoácidos sem quaisquer codões de terminação. Estas sequências são geralmente traduzidas num peptídeo.

Osteoclasto: Os osteoclastos são células multinucleadas grandes que activamente reabsorvem massa óssea. Os osteoclastos derivam de células estaminais hematopoiéticas e partilham características fenotípicas com monócitos circulantes e macrófagos tecidulares. São constituídos a partir de uma população de células mononucleares circulantes, recrutadas do sangue para a superfície óssea, onde passam por um processo de diferenciação e fusão para formarem células multinucleadas.

A osteopetrose consiste numa família de doenças caracterizada pela incapacidade de reconstituição dos ossos longos. Consequentemente, os ossos longos apresentam uma infiltração cartilaginosa, direcionada para o centro a partir da placa de crescimento, e um centro fracamente reconstituído. Enquanto que a osteoporose pode ser causada pela presença excessiva de osteoclastos, a osteopetrose é provocada por um número insuficiente destas células.

A perda da função ovárica após a menopausa resulta com frequência numa perda progressiva de massa óssea trabecular e eventualmente em osteoporose. Esta perda óssea é, em parte, devida à produção aumentada de osteoclastos. Tal parece ser consequência de uma maior elaboração, por parte das células auxiliares, de citoquinas osteoclastogénicas tais como a IL-1, factor de necrose tumoral e IL-6, todas elas reguladas negativamente por estrogénios.

Os osteoclastos são habitualmente detectados em doenças ósseas degenerativas em locais de osteólise. A produção excessiva de osteoclastos encontra-se associada a doenças como o hiperparatiroidismo e a doença de Paget. Os osteoclastos são também encontrados em locais de reacções inflamatórias associadas ao afrouxamento asséptico na prótese total da anca, artrite reumatóide e periodontite. As duas citoquinas produzidas pelas células inflamatórias que podem ter efeitos

directos na formação e na função dos osteoclastos são a interleuquina-1 (IL-1) e o factor de necrose tumoral (TNF- α).

Motivo de peptídeos: Uma sequência de aminoácidos que se liga à sFRP-1. Regra geral, um motivo de peptídeos consiste numa sequência de dois ou mais aminoácidos ligados a peptídeos que proporciona uma estrutura e/ou uma função característica. Numa configuração, um motivo de peptídeos pode ser detectado em mais do que uma proteína ou até mais do que uma vez numa proteína simples. Por exemplo, o motivo de peptídeos apresentado na SEQ ID NO: 9 é caracterizado pela capacidade de se ligar à sFRP e de modular a actividade da sFRP. Sem estarem teoricamente ligados, os três resíduos nucleares patentes na SEQ ID NO: 9 (D-G-R) são considerados importantes para a ligação da sFRP-1. Por conseguinte, numa configuração, um motivo de peptídeos inclui estes três aminoácidos. Numa outra, um motivo de peptídeos inclui os cinco aminoácidos nucleares patentes na SEQ ID NO: 9 (V-D-G-R-W). Para além do motivo de peptídeos prototípicos existem vários outros exemplos de motivos (SEQ ID NOS: 9-11, 14-17 e 24-26) que se ligam à sFRP e são capazes de modular a actividade da mesma.

Enquanto a sequência de aminoácidos de uma configuração do motivo de peptídeos que se liga à sFRP-1 é apresentada na SEQ ID NO: 9, um especialista na matéria valorizará o facto das variações nesta sequência de aminoácidos, tais como 1, 2 ou 3 deleções, adições ou substituições, poderem ser realizadas sem afectarem significativamente as actividades do motivo de peptídeos. Logo, a expressão "motivo de peptídeos" abrange tanto o motivo apresentado na SEQ ID NO: 9 como os motivos de peptídeos adicionais referidos nas SEQ ID NOS: 10, 11 e 14-26, além das sequências de aminoácidos baseadas nestas sequências, mas que incluem uma ou mais variantes e fragmentos contendo pelo menos 3, 4, 5 ou 6 aminoácidos contíguos do motivo de peptídeos. As variantes ou fragmentos dessas

sequências podem igualmente ser definidos quanto ao grau de identidade sequencial dos aminoácidos que partilham com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 9. Habitualmente, as variantes da sequência do motivo de peptídeos partilham no mínimo 80% de identidade sequencial com as sequências apresentadas nas SEQ ID NOS: 9-12 e 14-26. Variantes melhor preservadas partilham no mínimo 90%, 95% ou 98% de identidade sequencial com as sequências apresentadas nas SEQ ID NOS: 9-12, 14-17 e 24-26.

O motivo de peptídeos é caracterizado pela sua capacidade de se ligar à sFRP. Esta actividade pode ser comprovada através do teste ELISA a seguir descrito na secção de métodos. A capacidade do motivo de peptídeos de se ligar à sFRP e modular a actividade da mesma é benéfica em diversas aplicações, incluindo aplicações clínicas como o tratamento de doenças associadas à reconstrução anormal dos ossos e, mais especificamente, quando se pretende uma actividade aumentada dos osteoclastos.

Etiqueta de peptídeos: Uma sequência de peptídeos que se encontra ligada (por exemplo, através de engenharia genética) a um outro peptídeo ou a uma proteína a fim de fornecer uma função à fusão daí resultante. As etiquetas de peptídeos são, por norma, relativamente curtas em comparação com uma proteína à qual se fundiram; a título de exemplo, as etiquetas de peptídeos possuem quatro ou mais aminoácidos de comprimento, tais como 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 ou 25+ aminoácidos. Regra geral, uma etiqueta de peptídeos não tem mais do que 100 aminoácidos de comprimento, podendo não exceder 75, 50, 40 ou 30.

As etiquetas de peptídeos conferem uma ou mais funções diferentes a uma proteína de fusão (por conseguinte "funcionalizam" essa proteína), sendo que tais funções incluem a ligação de anticorpos (uma etiqueta de epítopos), a

purificação e a diferenciação (ex. de uma proteína nativa). Além disso, um local de reconhecimento para uma protéase, relativamente ao qual se conhece um anticorpo de ligação, pode ser utilizado como etiqueta de epítopo especificamente clivável. O uso desta etiqueta possibilita a clivagem e a activação selectiva de uma proteína (ex. por substituição do ponto de clivagem em TGF- β 1 pelo de pró-caspase 3).

É possível detectar a molécula etiquetada recorrendo a várias técnicas diferentes. Nomeadamente: imunohistoquímica, imunoprecipitação, citometria de fluxo, microscopia de imunofluorescência, ELISA, imunomarcação ("western") e cromatografia de afinidade.

As etiquetas de epítopos adicionam um epítopo conhecido (ponto de ligação de anticorpos) à proteína do indivíduo, estabelecendo a ligação de um anticorpo conhecido e frequentemente de elevada afinidade, permitindo identificar e seguir especificamente a proteína etiquetada, adicionada a um organismo vivo ou a células de cultura. Exemplos de etiquetas de epítopos incluem myc, T7, GST, GFP, HA (hemaglutinina) e FLAG. Os primeiros quatro exemplos são epítopos com origem em moléculas existentes. Por outro lado, FLAG é uma etiqueta de epítopo sintética, concebida para uma antigenicidade elevada (consulte as Patentes Norte-americanas N°s. 4,703,004 e 4,851,341).

As etiquetas de purificação destinam-se a facilitar a purificação da proteína etiquetada, através da cromatografia de afinidade. Uma etiqueta de purificação muito conhecida é a hexa-histidina (6x His), literalmente uma sequência de seis resíduos de histidina. O sistema de purificação de proteínas 6x His é comercialmente disponibilizado pela QIAGEN (Valencia, CA), sob a designação QIAexpress®.

Uma etiqueta de peptídeo simples aplica-se a mais do que um propósito; qualquer etiqueta fixada, por exemplo, aumenta o peso molecular da proteína de fusão, permitindo assim a diferenciação entre as proteínas etiquetada e nativa. Os anticorpos específicos de uma "etiqueta de epítopos" podem ser utilizados para criar uma coluna de imunoafinidade, possibilitando uma etiqueta de epítopo a ser empregue na purificação da proteína etiquetada. Do mesmo modo, em alguns casos, encontram-se disponíveis anticorpos monoclonais específicos de uma etiqueta de purificação (ex. anticorpos monoclonais de peptídeos anti-6x His, comercializados pela QIAGEN ou CLONTECH, Palo Alto, CA).

Transportadores farmaceuticamente aceitáveis: Os transportadores farmaceuticamente aceitáveis e úteis para a presente invenção são convencionais. Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975) descreve as composições e as formulações adequadas para a distribuição farmacêutica das proteínas de fusão constantes desta invenção.

Em termos gerais, a natureza do transportador depende do modo de administração particular a ser empregue. Por exemplo, as formulações parentéricas compreendem habitualmente fluidos injectáveis, farmacêutica- e fisiologicamente aceitáveis, como água, soro fisiológico, solução salina equilibrada, dextrose aquosa, glicerol ou outros como veículo. Para composições sólidas (sob a forma de pó, comprimidos, tabletas ou cápsulas), os transportadores sólidos, não tóxicos, convencionais podem incluir, por exemplo, níveis farmacêuticos de manitol, lactose, amido ou estearato de magnésio. Para além de transportadores biologicamente neutros, as composições farmacêuticas a serem administradas podem conter quantidades menores de substâncias auxiliares não tóxicas, como agentes emulsionantes ou de humedecimento, conservantes, agentes de

tamponamento de pH e afins, por exemplo, acetato de sódio ou monolaurato de sorbitano.

Polinucleótido: Uma sequência de ácidos nucleicos que inclui pelo menos dois resíduos de ácidos nucleicos.

Polipeptídeo: Um fragmento de proteína que inclui pelo menos dois resíduos de aminoácidos.

Fragmento de proteína: Uma sequência de aminoácidos que contém menos resíduos de aminoácidos do que aqueles encontrados numa proteína que ocorra naturalmente e que inclui pelo menos dois resíduos de aminoácidos. Por exemplo, se a proteína que ocorre naturalmente, ou seja, uma proteína expressa a partir de um gene, tem 300 resíduos de aminoácidos de comprimento, um polipeptídeo derivado da proteína pode ter 299 ou menos resíduos de aminoácidos. Em determinados exemplos, o polipeptídeo pode ter menos de 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50 ou 25 resíduos de aminoácidos.

Purificada: O termo “purificada” não requer uma pureza absoluta; em vez disso, deve ser interpretado como um termo relativo. Por exemplo, uma preparação de peptídeos ou de proteínas purificada é aquela em que a proteína ou o peptídeo é mais puro do que a proteína ou o peptídeo no seu ambiente natural no interior de uma célula. Tais proteínas ou peptídeos podem ser produzidos por técnicas de purificação padrão ou por expressão recombinante. Em algumas configurações, a preparação de uma proteína ou de um peptídeo é purificada no sentido em que a proteína ou o peptídeo representa pelo menos 50% ou 70% do teor proteico total da preparação.

RANK e RANKL: O activador receptor de NF- β (RANK) é um membro da superfamília de receptores do factor de necrose tumoral (TNF). O ligante, activador receptor do ligante de NF- β (RANKL), é um membro da superfamília de TNF que tem sido caracterizado em múltiplos cenários e variavelmente designado

por Factor de Diferenciação de Osteoclastos (ODF), Citoquina Indutora da Activação Relacionada com o Factor de Necrose Tumoral (TRANCE) e Ligante da Osteoprotegerina (OPGL). RANK é uma proteína transmembranar do Tipo 1 com 616 resíduos de aminoácidos que interage com o factor 3 associado ao receptor de TNF (TRAF3). A activação de RANK por expressão excessiva, co-expressão de RANK e ligante de RANK ligado à membrana (RANKL) ou a adição de RANKL solúvel ou anticorpos agonistas a RANK resulta na regulação positiva do factor de transcrição NF- β , um factor de transcrição ubíquo extensivamente utilizado em células do sistema imunitário (Patente Norte-americana No. 6,017,729).

RANK é expresso sobre precursores de osteoclastos e osteoclastos maduros. O RANKL produzido por osteoblastos estimula a formação e a actividade de osteoclastos, o que facilita o desenvolvimento e a reconstituição normais dos ossos. A recombinação genética de RANKL ou RANK provoca osteopetrose (massa óssea aumentada), bem como falhas graves na formação dos nódulos linfáticos. A osteoprotegerina (OPG) é um factor solúvel que também pertence à família de receptores TNF. A OPG liga-se ao RANKL e inibe a formação *in vitro* de osteoclastos multinucleados funcionais. A expressão excessiva de OPG em ratos transgénicos provoca osteopetrose grave, com perda de cavidades medulares e depleção profunda de osteoclastos. Foram observados os mesmos efeitos após a administração de OPG em ratos normais. Tais efeitos foram integralmente atribuídos à ligação da OPG ao RANKL, que impediu a ligação do ligante e a activação do RANK. Alternativamente, a expressão do RANKL por células T nas articulações de indivíduos que sofriam de artrite reumatóide julga-se ter contribuído para o aumento da actividade de osteoclastos e para a perda de massa óssea característica desta doença.

Recombinante: Um ácido nucleico recombinante é aquele que apresenta uma sequência que não ocorre naturalmente ou que tem uma sequência obtida por uma combinação artificial de dois segmentos de sequência que de outra forma estariam separados. Esta combinação artificial é com frequência conseguida por síntese química ou, mais vulgarmente, pela manipulação artificial de segmentos isolados de ácidos nucleicos, por exemplo por técnicas de engenharia genética.

Identidade sequencial: A semelhança entre sequências de aminoácidos é expressa em termos de semelhança entre as sequências, de outro modo referida como identidade sequencial. A identidade sequencial é com frequência medida em termos de identidade percentual (semelhança ou homologia); quanto mais alta for a percentagem, mais semelhantes são as duas sequências. Homólogos ou variantes da sFRP (membro prototípico apresentado na SEQ ID NO: 1) ou o motivo de peptídeos que se liga à sFRP (por exemplo SEQ ID NO:9), aqui divulgado, possui um grau relativamente elevado de identidade sequencial quando alinhado através de métodos padrão.

Os métodos de alinhamento das sequências para comparação são bem conhecidos nesta área. Vários programas e algoritmos de alinhamento encontram-se descritos em: Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, 1988; Higgins and Sharp, Gene 73:237-244, 1988; Higgins and Sharp, CABIOS 5:151-153, 1989; Corpet et al, Nucleic Acids Research 16:10881-10890, 1988; e Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, 1988. Altschul et al, Nature Genet. 6:119-129, 1994.

A Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local (BLAST™) do NCBI (Altschul et al, J. Mol Biol. 215:403-410, 1990) encontra-se disponível a partir de várias fontes, incluindo o próprio National Center for Biotechnology

Information. (NCBI, Bethesda, MD) e na Internet, para ser utilizada em associação com os programas de análise de sequências blastp, blastn, blastx, tblastn e tblastx.

As variantes da sFRP, os fragmentos da sFRP ou o motivo de peptídeos que se liga à sFRP são habitualmente caracterizados por possuírem pelo menos 50% de identidade sequencial medida ao longo do alinhamento integral com a sequência de aminoácidos da sFRP, fragmentos da sFRP ou do motivo de peptídeos (por exemplo SEQ ID NO: 9) utilizando o Blast 2.0 do NCBI, o blastp intervalado regulado para parâmetros predefinidos. Para a comparação de sequências de aminoácidos superiores a 30, a função de sequências do Blast 2 é empregue recorrendo à matriz BLOSUM62 predefinida, regulada para parâmetros predefinidos (o custo de existência de intervalo é de 11 e o custo do intervalo por resíduos é de 1). Ao alinhar peptídeos curtos (menos de 30 aminoácidos), o alinhamento deve ser feito recorrendo à função de sequências do Blast 2, empregando a matriz PAM30 regulada para parâmetros predefinidos (intervalo aberto 9, penalizações de intervalo de extensão 1). As proteínas com ainda maior semelhança relativamente às sequências de referência mostram identidades de percentagem crescente quando avaliadas por este método, tais como identidades sequenciais de pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% ou 98%. Quando é comparada parte de uma sequência completa relativamente à sua identidade sequencial, os homólogos e as variantes possuem por norma pelo menos 75% de identidade sequencial numa pequena janela de 10-20 aminoácidos e podem ter identidades sequenciais de 85% ou pelo menos 90%, 95% ou 98% dependendo da respectiva semelhança com a sequência de referência. Os métodos para determinar a identidade sequencial nessas pequenas janelas encontram-se descritos no website mantido pelo National Center for Biotechnology Information em Bethesda, Maryland. Um especialista na matéria apreciará que estes valores de

identidade sequencial sejam fornecidos apenas para orientação; é perfeitamente possível obter homólogos muito significativos que recaiam fora dos valores fornecidos.

sFRP: A proteína relacionada com Frizzled secretada (sFRP) é uma proteína secretada que compreende aproximadamente 300 aminoácidos, incluindo um domínio rico em cisteína (CRD) habitualmente entre 30% e 50% idêntico ao CRD dos membros da família da proteína Fz. Existem várias proteínas sFRP diferentes, sendo a sequência de ácidos nucleicos do membro prototípico, a sFRP-1, apresentada na SEQ ID NO: 1. As sequências de ácidos nucleicos e aminoácidos de outros membros da família da sFRP podem ser encontradas no website do National Center for Biotechnology, por exemplo GenBank Accession No. AF218056 (Gallus gallus FRP-2), GenBank Accession No AV354083 (Mus musculus-FKP-1), GenBank Accession No AV304328 (Mus musculus s-FRP-2), GenBank Accession No U24163 (Homo sapiens sFRP-3/FrzB) e GenBank Accession No AI587049 (Homo sapiens sFRP-1). O quadro de leitura aberto da sFRP prototípica é apresentado na SEQ ID NO: 2, enquanto a sequência da proteína é apresentada na SEQ ID NO: 3. Conforme aqui divulgado, a sFRP liga-se ao RANKL e inibe a formação de osteoclastos.

A actividade de ligação da sFRP-1 e a sua capacidade de modular a formação de osteoclastos podem ser calculadas usando o teste ELISA e os métodos de bioensaio da osteoclastogénese referidos. A capacidade da proteína sFRP-1 ou de um seu fragmento de realizar estas actividades é benéfica para um determinado número de aplicações, incluindo aplicações clínicas nomeadamente no tratamento de doenças associadas à reconstrução anormal dos ossos.

Enquanto que a sequência de aminoácidos de uma sFRP prototípica é apresentada na SEQ ID NO: 3, um especialista na matéria valorizará o facto das variações nesta sequência de

aminoácidos, tais como 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40 ou 50, deleções, adições ou substituições (incluindo substituições de aminoácidos conservadores) poderem ser realizadas sem afectarem significativamente as actividades da proteína (ou dos fragmentos de proteína) acima mencionadas. Logo, a expressão fragmentos de "sFRP" abrange tanto as proteínas com sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOS: 4-8, como as sequências de aminoácidos baseadas nestas sequências, mas que incluem uma ou mais variantes. As variantes dessas sequências podem igualmente ser definidas quanto ao grau de identidade sequencial de aminoácidos que partilham com a sequência de aminoácidos apresentada nas SEQ ID NOS: 4-8. Habitualmente, as variantes da sequência partilham no mínimo 80% da identidade sequencial com as sequências apresentadas nas SEQ ID NOS: 4-8. Variantes melhor preservadas partilham no mínimo 90%, 95% ou 98% da identidade sequencial com as sequências apresentadas nas SEQ ID NOS: 4-8. Para além de partilharem a identidade sequencial com a sequência da proteína sFRP prototípica, as tais variantes possuem a capacidade de se ligarem aos membros da família TNF como RANKL.

Indivíduo: Organismo vertebrado multicelular vivo, uma categoria que inclui tanto humanos como mamíferos não-humanos.

Dose terapeuticamente eficaz: Uma dose suficiente para prevenir o avanço ou para provocar a regressão da doença ou que seja capaz de aliviar os sintomas causados pela doença.

Família de proteínas do TNF: A família de proteínas do Factor de Necrose Tumoral (TNF) contém ligantes ligados à membrana e a proteínas solúveis. Alguns membros da família, como o TNF e o RANKL, são activos tanto na forma ancorada à membrana como na forma solúvel, sendo esta última libertada enzimaticamente na solução, sobretudo por TACE (enzima de conversão TNF- α) (J. Hardy, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

94:2095-2097, 1997; J.D. Buxbaum et al, Proc. Natl. Acad. Sci. V.S.A. 89: 10075-10078, 1992). A principal área de homologia entre os membros da família do TNF é uma fita de 150 resíduos de aminoácidos no domínio carboxi-terminal que se situa no espaço extracelular. Este domínio é responsável pela ligação a membros análogos da família de receptores de TNF. Esta família de proteínas receptoras é caracterizada por quatro domínios com resíduos de cisteína a espaços regulares: cada um apresenta um domínio transmembranar simples e liga os membros da família TNF- α ou TNF β incluindo, por exemplo, TNFRI, TNFRII, Faz e CD30.

Transformada: Uma célula transformada é aquela em que foi introduzida uma molécula de ácido nucleico por técnicas de biologia molecular. Conforme aqui usado, o termo transformação abrange todas as técnicas através das quais uma molécula de ácido nucleico pode ser introduzida na referida célula, incluindo transfecção com vectores virais, transformação com vectores plasmídeos e introdução de DNA nu por electroporação, lipofecção e aceleração de partículas.

Vector: Uma molécula de ácido nucleico quando introduzida numa célula hospedeira, produzindo assim uma célula hospedeira transformada. Um vector pode incluir sequências de ácidos nucleicos que permitam a sua replicação numa célula hospedeira, como uma fonte de replicação. Do mesmo modo, o vector pode conter um ou mais genes marcadores seleccionáveis e outros elementos genéticos conhecidos. Um vector pode igualmente conter uma sequência codificante de um motivo de aminoácidos que facilita o isolamento do produto proteico desejado, tal como uma sequência que codifica a proteína ligante de maltose, c-myc ou GST.

WNT: Um grupo de genes e as proteínas por eles codificadas que desempenham um importante papel na regulação do desenvolvimento celular é a família de glicoproteínas Wnt.

As proteínas Wnt constituem uma família de factores de crescimento, que compreende mais do que uma dúzia de moléculas estruturalmente relacionadas, e estão envolvidas na regulação de processos biológicos fundamentais, como a apoptose, embriogénese, organogénese, morfogénese e tumorigénese. Estes polipeptídeos são factores multipotentes e possuem actividades biológicas semelhantes a outras proteínas secretoras como o factor de crescimento de transformação (TGF- β), os factores de crescimento de fibroblastos (FGFs), o factor de crescimento dos nervos (NGF) e as proteínas morfogenéticas dos ossos (BMPs).

Um membro da família do factor de crescimento Wnt é preferencialmente expresso no tecido ósseo e nas células derivadas do osso, parecendo estar envolvido na manutenção do fenótipo de osteoblastos maduros (célula de formação dos ossos).

Salvo explicação em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado, conforme vulgarmente interpretados pelos especialistas na matéria à qual pertence esta invenção. "Compreender" significa "incluir." Os artigos "o", "a", "um" e "uma" podem implicar referências ao plural, excepto se o contexto claramente indicar o contrário. Logo, "compreender A e B" significa "incluir A e B" sem excluir outros elementos. Embora métodos e materiais semelhantes ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser aplicados na prática ou em testes da presente invenção, os métodos e materiais mais adequados são a seguir indicados. Em caso de discrepancia, prevalece a actual especificação, incluindo as explicações de termos. Além disso, os materiais, métodos e exemplos são apenas ilustrativos e não limitativos.

III. Descrição de diversas configurações

Esta invenção fornece métodos para inibir a formação de osteoclastos num indivíduo. Estes métodos incluem a administração da sFRP-1 (SEQ ID NO: 3), variantes da sFRP-1 (SEQ ID NO: 3) ou 3 fusões ou fragmentos da sFRP-1 (SEQ ID NO: 3). A Administração destes peptídeos engloba a administração e a expressão de ácidos nucleicos que codificam os peptídeos. As proteínas ou os peptídeos administrados são caracterizados pela sua capacidade de se ligarem ao RANKL, por exemplo, ao RANKL humano designado por "TRANCE" (AF013171), ao RANKL humano (AF019047) e ao RANKL humano designado por "OPGI" (AF053712) e inibirem a formação de osteoclastos. A inibição da formação de osteoclastos será útil para o tratamento de distúrbios osteopáticos, tais como a osteoporose pós-menopáusica, doença de Paget, metástases líticas dos ossos, mieloma múltiplo, hipoparatiroidismo, artrite reumatóide, periodontite e hipercalcemia com malignidade.

A invenção fornece igualmente métodos de selecção de proteínas sFRP, seus fragmentos e variantes, que se ligam a membros da família de proteínas TNF. Tais métodos incluem o contacto de uma sFRP com pelo menos um membro da família de proteínas TNF e a detecção do membro da família de proteínas TNF que se liga à sFRP. Os membros da família de proteínas TNF com particular interesse incluem RANKL, Apo2/TRAIL, FasL, CD40L, CD27L, CD30L, Apo3I/TWEAK, TNF e LT-alfa (SI. Baker and EP Reddy, Oncogene 17:3261-3270, 1998). Os membros da família de proteínas sFRP com particular interesse são a sFRP-1 (SEQ ID NO: 3), a sFRP-2 (GenBank Accession No. MMU88567), a sFRP-3 (GenBank Accession No. MMU88568), a sFRP-4 (GenBank Accession No. AF012891) e a sFRP-5 (GenBank Accession No. AF117758).

A invenção oferece igualmente o peptídeo purificado, apresentado na SEQ ID NO: 14. Este peptídeo é útil para estimular a diferenciação *in vitro* e *in vivo* dos osteoclastos. Sempre que o peptídeo é utilizado *in vivo*, pode ser também

administrado a indivíduos com o objectivo de aumentar a diferenciação de osteoclastos.

IV. Expressão e purificação da sFRP, seus fragmentos, fusões e variantes, bem como do motivo de peptídeos

Os fragmentos e as variantes da sFRP podem ser purificados a partir de células MDCK (ATCC NO CCL-34) transfectadas com vectores codificantes de sFRP conforme a seguir descrito. Os fragmentos e as variantes da sFRP podem também ser purificados a partir de uma fonte de tecido através de técnicas bioquímicas convencionais ou produzidos, de forma recombinante, em células procarióticas ou eucarióticas aplicando métodos bem conhecidos (por exemplo, os descritos em Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989). A expressão recombinante de fragmentos da sFRP é descrita em Uren et al, J. Biol. Chem., 275:4374 4382, 2000. Além disso, as sequências de ácidos nucleicos codificantes dos membros da família de proteínas sFRP estão disponíveis no GenBank e incluem a sequência de cDNA apresentada na SEQ ID NO: 1.

É possível obter fragmentos, fusões e variantes da sFRP recombinante através de sistemas comerciais, concebidos para a expressão e a purificação optimizadas de proteínas de fusão. Estas incluem geralmente uma etiqueta de proteína que facilita a purificação. Exemplos dos referidos sistemas incluem: o sistema de fusão e purificação de proteínas pMAL (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA); o sistema de fusão de genes GSI (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, Piscataway, NJ); e o sistema de vectores de expressão pTrcHis (Invitrogen, Carlsbad, CA). Por exemplo, o sistema de expressão pMAL utiliza um vector que adiciona uma proteína ligante de maltose à proteína de expressão. A proteína de fusão é expressa em *E. coli* e a proteína de fusão é purificada a partir do extracto de células brutas, utilizando uma coluna de amilose. Se necessário, o

domínio da proteína ligante de maltose pode ser clivado da proteína de fusão através de tratamento com uma protéase adequada, como o Factor Xa. O fragmento ligante da maltose pode então ser removido da preparação por passagem sobre uma segunda coluna de amilose. É igualmente possível utilizar os sistemas de expressão de células eucarióticas, incluindo os sistemas de expressão Pichia, Tobacco e Baculovirus, à semelhança dos comercialmente disponibilizados pela Invitrogen.

Para cada um destes sistemas, a sFRP total, seus fragmentos e variantes, podem ser produzidos através da ligação do quadro de leitura aberta (ORF) da sequência pretendida ao vector. Para garantir uma expressão eficaz, o ORF tem de ser funcionalmente ligado ao vector, ou seja, unido de forma a que o quadro de leitura do ORF fique alinhado com o quadro de leitura da etiqueta da proteína. Quando tiverem de ser expressos fragmentos da sFRP, é possível amplificar um ORF codificante do fragmento pretendido pela reacção em cadeia da polimerase (PCR) a partir do cDNA da sFRP, clonado, purificado e depois ligado ao vector de expressão. Em alternativa, o fragmento amplificado pode ser directamente ligado ao vector de expressão. É também possível, dependendo da disponibilidade de pontos de restrição adequados no cDNA da sFRP, obter o fragmento pretendido por digestão com endonuclease de restrição aplicável, de forma a poder ser directamente clonado no vector de expressão.

A purificação da proteína expressa pode ser realizada quer através do regime de purificação adequado à etiqueta de expressão (no caso de ser utilizado um sistema de expressão/purificação comercial) ou de cromatografia de afinidade convencional utilizando anticorpos, de preferência anticorpos monoclonais que reconhecem as regiões apropriadas

da sFRP, ou procedimentos de cromatografia estabelecidos para as sFRPs.

Quando tiverem de ser usados fragmentos da sFRP, esses fragmentos podem ser alternativamente gerados através da digestão de uma proteína completa com várias proteases. De seguida, os fragmentos podem ser separados com base no seu tamanho único, carga ou outras características. Tais fragmentos podem igualmente ser produzidos sinteticamente, aplicando métodos de síntese peptídica conhecidos.

V. Métodos que inibem a formação de osteoclastos

Os osteoclastos são células multinucleadas grandes que activamente reabsorvem massa óssea, derivam de células estaminais hematopoiéticas e partilham características fenotípicas com monócitos circulantes e macrófagos tecidulares. São constituídos a partir de uma população de células mononucleares circulantes, recrutadas do sangue para a superfície óssea, onde passam por um processo de diferenciação e fusão para formarem células multinucleadas.

A osteopetrose consiste numa família de doenças caracterizada pela incapacidade de reconstituição dos ossos longos. Consequentemente, os ossos longos apresentam uma infiltração cartilaginosa, direcionada para o centro a partir da placa de crescimento, e um centro fracamente reconstituído. Enquanto a osteoporose pode ser causada pela presença excessiva ou demasiado activa de osteoclastos, a osteopetrose pode ser provocada por um número insuficiente destas células ou pela sua actividade inadequada. Nesse sentido, o aumento da diferenciação de osteoclastos é desejável em indivíduos com reconstituição óssea anormal, como acondroplasia e osteopetrose. Os métodos de administração da FRP-1 para inibir a diferenciação de osteoclastos num indivíduo é a seguir descrita.

Em contrapartida, a sFRP-1 pode ser utilizada para inibir a formação de osteoclastos. A perda da função ovárica após a menopausa resulta com frequência numa perda progressiva de massa óssea trabecular e eventualmente em osteoporose. Esta perda óssea é, em parte, devida à produção aumentada de osteoclastos. Tal parece ser consequência de uma maior elaboração, por parte das células auxiliares, de citoquinas osteoclastogénicas tais como a IL-1, factor de necrose tumoral e IL-6, todas elas reguladas negativamente por estrogénios.

Os osteoclastos estão também implicados em doenças ósseas degenerativas em locais de osteólise. Do mesmo modo, a produção excessiva de osteoclastos encontra-se associada a doenças como o hiperparatiroidismo e a doença de Paget. Os osteoclastos são também encontrados em locais de reacções inflamatórias associadas ao afrouxamento asséptico na prótese total da anca, artrite reumatóide e periodontite. As duas citoquinas produzidas pelas células inflamatórias que podem ter efeitos directos na formação e na função dos osteoclastos são a interleuquina-1 (IL-1) e o factor de necrose tumoral (TNF- α). Logo, é recomendável a inibição da formação de osteoclastos em indivíduos com distúrbios ósseos caracterizados por ressorção óssea indesejável.

Dada a capacidade da sFRP-1 de inibir a osteoclastogénese, a referida proteína pode ser de utilidade clínica nos casos em que a actividade excessiva de osteoclastos tem consequências patológicas. A osteoporose e a artrite reumatóide são exemplos de doenças que constituem alvos particularmente aconselháveis para uma terapia com sFRP-1, porque o RANKL solúvel das células T é considerado ter um papel significativo na perda óssea inerente a essas doenças. Os métodos de administração da sFRP-1 para inibir a formação de osteoclastos no indivíduo são aqui divulgados.

Os problemas decorrentes da homeostase do cálcio podem também estar relacionados com a actividade dos osteoclastos. Por exemplo, os osteoclastos são capazes de mobilizar o cálcio dos ossos, levando a estados hipocalcémicos. Em alternativa, a inibição de osteoclastos pode ajudar a minimizar a mobilização nesses estados. Assim, a modulação da actividade de osteoclastos pode ser utilizada como uma intervenção terapêutica para tratar a hipo- e a hipercalcemia.

VI. Incorporação de fragmentos, fusões e variantes da sFRP terapeuticamente eficazes em composições farmacêuticas e métodos de tratamento

Para administração em animais, a sFRP purificada e os fragmentos ou variantes da sFRP são geralmente combinados com um transportador farmaceuticamente aceitável. A preparação farmacêutica pode conter apenas um único peptídeo ou ser composta por mais de uma variedade de fragmentos de sFRP. Por norma, a natureza do transportador depende do modo específico de administração a ser empregue. Por exemplo, as formulações parentéricas compreendem habitualmente fluidos injectáveis, farmacêutica- e fisiologicamente aceitáveis, como água, soro fisiológico, solução salina equilibrada, dextrose aquosa, glicerol, albumina humana ou outros como veículos. Para composições sólidas (sob a forma de pó, comprimidos, tabletas ou cápsulas), os transportadores sólidos, não tóxicos, convencionais podem incluir, por exemplo, níveis farmacêuticos de manitol, lactose, amido ou estearato de magnésio. Para além de transportadores biologicamente neutros, as composições farmacêuticas a serem administradas podem conter quantidades menores de substâncias auxiliares não tóxicas, como agentes emulsionantes ou de humedecimento, conservantes, agentes de tamponamento de pH e afins, por exemplo, acetato de sódio ou monolaurato de sorbitano.

Como se sabe, os fármacos à base de proteínas apenas podem ser ineficazes quando ingeridos. Contudo, as formas de proteínas farmacêuticas à base de comprimidos podem, em alternativa, ser administradas subcutaneamente, em particular se formuladas em composições de libertação lenta. As formulações de libertação lenta podem ser produzidas combinando a proteína alvo com uma matriz biocompatível, como o colesterol. Um outro método possível de administrar fármacos proteicos é através do uso de minibombas osmóticas. Conforme acima mencionado, um transportador biocompatível seria também utilizado em conjunto com este método de administração.

Está também contemplado que a sFRP pode ser administrada às células sob a forma de ácidos nucleicos e subsequentemente traduzida pela célula hospedeira. Tal pode ser feito, por exemplo, através do uso de vectores virais ou lipossomas. Estes podem também ser utilizados para administrar a própria proteína.

As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser administradas por qualquer meio que satisfaça o objectivo pretendido. As quantidades e os regimes de administração de fragmentos da sFRP podem ser prontamente determinados por especialistas no tratamento das doenças associadas à reconstituição óssea anormal. No tratamento destas doenças, as proteínas descritas são administradas na dose eficaz para aumentar ou diminuir a actividade osteoclastogénica. Tais dosagens incluem quantidades que aumentam as concentrações do tecido alvo para níveis em que a actividade terapêutica foi observada *in vitro*. As proteínas aqui referidas podem igualmente ser utilizadas para modular as interacções das células T e as funções do sistema imunitário. Doses suficientes para atingir a concentração do tecido que causa um aumento ou uma diminuição da osteoclastogénese e/ou da actividade das células T podem ser determinadas utilizando as

quantidades descritas nos exemplos que se seguem. Os peptídeos ou as proteínas podem ser administrados a um hospedeiro *in vivo*, como por exemplo, por administração sistémica, isto é, administração intravenosa ou intraperitoneal. Do mesmo modo, os peptídeos ou proteínas podem ser administrados por via intralesão: o peptídeo ou a proteína é injectado directamente no tumor ou na área afectada.

As doses eficazes dos peptídeos destinados a aplicação terapêutica referidos nesta invenção variam segundo a natureza e a gravidade da doença a ser tratada, a idade e o estado do indivíduo e outros factores clínicos. Assim, a determinação final do regime de tratamento adequado é calculada pelo clínico. Normalmente, a dose varia entre 0,1 µg/kg e 100 mg/kg de peso corporal. Outras variações aplicáveis incluem doses de cerca de 1 µg/kg a 10 mg/kg de peso corporal. A periodicidade da dosagem pode ir de uma toma seminal a diária, dependendo de diversos factores clínicos, como a sensibilidade do indivíduo à proteína. Exemplos da periodicidade da dosagem são 3 µg/kg administrados duas vezes por semana, três vezes por semana ou diariamente; uma dose de 7 µg/kg duas vezes por semana, três vezes por semana ou diariamente; uma dose de 10 µg/kg duas vezes por semana, três vezes por semana ou diariamente; ou uma dose de 30 µg/kg duas vezes por semana, três vezes por semana ou diariamente. No caso de uma doença mais agressiva, é preferível a administração de doses como as acima descritas por vias alternativas, nomeadamente por via intravenosa ou intratecal. A infusão contínua pode igualmente ser adequada.

EXEMPLOS

A análise ELISA, utilizando RANKI e sFRP-1, revelou que sFRP-1 se liga a RANKL. RANKL é conhecida por estar envolvida na diferenciação de osteoclastos. Posteriormente, foi comprovado que a sFRP-1 (SEQ ID NO:3) inibe a osteoclastogénese. Estes

materiais e métodos aqui divulgados são meramente exemplares e não são considerados limitativos

Exemplo de referência 1
Materiais e Métodos

1. Materiais

A sFRP-1 humana recombinante foi preparada conforme descrito (Uren et al, J. Biol. Chem. 275:4374-4382, 2000). A sequência codificante da sFRP-2 no rato foi amplificada por RI PCR, usando o RNA total do rim de um embrião de rato como fonte, subclonado no vector de expressão pcDNA3.1, transfetado para células MDCK e a proteína recombinante purificada por cromatografia de afinidade de heparina conforme descrito para a sFRP-1 em Uren et al, J. Biol. Chem. 275:4374-4382, 2000. O anti-soro policlonal do coelho foi produzido a partir da sFRP-1 humana recombinante através de injecção de aproximadamente 10 µg de proteína purificada com adjuvante completo de Freund nos nódulos linfáticos inguinais e, subsequentemente, por injecção via intramuscular a intervalos de 2-3 semanas de quantidades semelhantes do antígeno dissolvido no adjuvante incompleto de Freund. Após vários aumentos, foi obtida a partir do soro uma fracção de imunoglobulina por cromatografia em Sefarose de ligação à proteína G (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia).

Os peptídeos foram sintetizados através de química de fase sólida padrão, purificados por HPLC de fase reversa e a sua identidade confirmada por análise espectroscópica de massa (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL).

Para testes ELISA, o RANKL solúvel recombinante, o TRAIL e os anticorpos dirigidos contra estas proteínas foram obtidos através de PeproTech (Rocky Hill, NJ). O anticorpo monoclonal

do rato (designado por anti-FLAG M2) dirigido contra o epítopo FLAG foi adquirido à Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY. Os conjugados com fosfatase alcalina de IgG de cabra anti-coelho e de IgG de coelho anti-rato e o paranitrofenolfosfato (pNPP) foram adquiridos à Sigma (St. Louis, MO).

Para bioensaios, o RANKL solúvel recombinante foi adquirido à Peprotech, Rocky Hill, New Jersey, ou os resíduos 158-317 de RANKL murínico foram preparados como uma proteína de expressão de GST. M-CSF foi obtido no Research Genetics Institute (Boston, MA, EUA).

A biblioteca de peptídeos aleatórios apresentada em fagos M13 foi interpretada conforme descrito (Adey et al. Methods in Molecular and Cellular Biology 6:3-14, 1995/1996).

Os ratos C57BL/6J recém-nascidos (0-1 dia) e os ratos C57BL/6J machos com 6 a 9 semanas foram adquiridos ao Monash University Animal Services Centre (Clayton, Austrália). As linhas celulares do estroma de murino, tsJ2, tsJ10 e tsJ14, foram geradas por transfecção com um vector retroviral expressando a variante sensível à temperatura do gene imortalizante de SV40 (ts A58; Chambers et al, Proc Natl. Acad. Sci. USA 90:5578-5582, 1993; Owens et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 222:225-229, 1996). As células RAW264.7 foram obtidas a partir de ATCC e as linhas celulares KUSA/O e mc-3T3-e1 encontram-se descritas em Horwood et al. Endocrinology 139:4743-4746, 1998. Os agentes osteotrópicos regulam a expressão do factor de diferenciação de osteoclastos e a osteoprotegerina nas células do estroma osteoblástico. A $1\alpha,25(OH_2)$ vitamina D3 foi adquirida à Wako Pure Chemicals Co. (Osaka, Japão). A PGE2 foi adquirida à Sigma (St Louis, MO). Outros produtos químicos e reagentes eram de qualidade analítica.

2. Cultura de Células

As células MDCK (Colecção Americana de Culturas-Tipo - ATCC) foram cultivadas no meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Life Technologies, Inc., Rockville, Maryland) contendo 10% de soro fetal bovino (Colorado Serum Company, Denver, Colorado) em 5% de CO₂ à temperatura de 37°C.

3. Seleção da Biblioteca de Peptídeos de Apresentação em Fagos

O isolamento de fagos contendo segmentos de peptídeos de ligação à sFRP-1 na sua superfície foi conduzido conforme anteriormente descrito (Sparks et al. Screening phage-displayed random peptide libraries, in Phage Display Peptides and Proteins Eds. BK Kay et al. Academic Press, NY, 227-253, 1996). Em resumo, um único poço de uma placa ELISA de 96 poços (Costar #3590, superfície de poliestireno) foi incubado durante 1 hora com a sFRP-1 recombinante purificada (1 µg/50 µl). Esta e outras manipulações com placas ELISA foram realizadas à temperatura ambiente. Subsequentemente, 150 µl de BSA a 1% foram adicionados ao poço e incubados durante 2 horas. Após 3 lavagens com PBS/0,1% Tween 20, 2,5 x 10¹⁰ fagos da biblioteca de peptídeos 12-mer aleatórios de apresentação em fagos M13 foram adicionados ao poço pré-revestido e incubados durante 3,5 horas. Após uma lavagem com PBS/0,1% Tween 20, o poço foi incubado durante 10 minutos com 50 µl de 0,05 M de glicina, com pH 2 para libertar o fago da superfície. A suspensão de fagos foi aspirada do poço, neutralizada com 50 µl de 0,2 M de fosfato de sódio, com pH 7,4 e amplificada durante 6 a 8 horas no caldo bacteriano DH5aF' IQ.

Os fagos amplificados recolhidos do caldo bacteriano após esta primeira fase de enriquecimento foram sujeitos a dois novos ciclos de "panning" em poços revestidos com sFRP-1 conforme mencionado no parágrafo anterior, à excepção de que os fagos foram incubados durante apenas 2 horas e 1 hora no

segundo e no terceiro ciclos, respectivamente. Após o terceiro ciclo, os fagos obtidos a partir do poço revestido com sFRP-1 foram titulados e semeados numa cultura de bactérias a fim de permitir o isolamento dos fagos de 200 colónias separadas. As bactérias de cada uma destas colónias foram cultivadas em caldo, particuladas por centrifugação e os fagos recuperados no sobrenadante. Cada um destes sobrenadantes com fagos foi testado para ligação em poços ELISA revestidos com sFRP-1 em comparação a poços apenas revestidos com solução de bloqueio de BSA. Os fados foram detectados neste ensaio com anticorpos primários dirigidos contra a proteína revestida com fagos (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia, #27-9411-01) e reagentes de detecção padrão. Cerca de 100 isolados de fagos foram seleccionados para análise sequencial, com base na exibição de uma ligação pelo menos 5 vezes superior à da sFRP-1 em comparação a poços revestidos com BSA.

4. Análise Sequencial de Segmentos de Peptídeos Presentes na Superfície de Fagos Isolados

A sequência de inserção de DNA codificante do segmento de peptídeo ligado à proteína revestida com fagos M13 gene III de cada isolado de fago foi determinada através da sequenciação de iniciadores correspondentes à sequência de vectores adjacente. Foi efectuada uma análise de pesquisa avançada com a ferramenta BLAST das bases de dados do GenBank para identificar proteínas que contivessem sequências correspondentes a porções das sequências de peptídeos identificadas por selecção da biblioteca de peptídeos de apresentação em fagos.

5. Produção de Peptídeos/Moléculas Quiméricas de Fosfatase Alcalina

Os oligonucleótidos sintéticos codificantes dos peptídeos de interesse foram ligados ao vector de fusão de fosfatase

alcalina bacteriana, pMY101, que tinha sido digerido com Sal I e Xho I (Yamabhai and Kay, Anal Biochem. 247:143-151, 1997). Todos os recombinantes foram confirmados através da análise sequencial de DNA. As bactérias (*E. coli*, estirpe DH5 α F') transformadas com construções peptídicas/AP foram cultivadas no caldo Luria contendo ampicilina (50 μ g/ml) para uma densidade óptica de 0,5 (a 600 nm), tratadas com 1 mM isopropil- β -D-tiogalactopiranosideo e de seguida incubadas durante a noite a uma temperatura de 37°C. O meio condicionado contendo a quimera peptídeos/AP foi recuperado por centrifugação a 7000 g durante 15 minutos. As proteínas quiméricas em meio condicionado tornaram-se estáveis quando armazenadas durante algumas semanas a 4°C ou durante vários meses a -80°C.

6. Análise ELISA de Peptídeos e Proteínas de Ligação à sFRP

Os testes ELISA foram realizados conforme anteriormente descritos (Uren et al., J. Biol. Chem. 275:4374-4382, 2000), com modificações dependendo do parceiro de ligação da sFRP a ser testado. Por norma, os poços foram revestidos com 0,5 ou 1 μ g de sFRP-1, bloqueados com BSA (0,2%, 1% ou 4%) e de seguida incubados com o parceiro de ligação putativo durante a noite à temperatura ambiente. Ao investigar a ligação de quimeras de peptídeos/AP, após aspiração dos caldos bacterianos, os poços foram lavados e incubados com p-nitrofenolfosfato (pNPP). O desenvolvimento da coloração foi determinado a 405 nm com um leitor ELISA. Para experiências concorrentiais, os peptídeos solúveis foram pré-incubados com quimeras de peptídeos/AP em caldo bacteriano durante 30 min à temperatura ambiente antes de serem transferidos para poços ELISA revestidos com sFRP-1 ou BSA. Ao testar a ligação do RANKL à sFRP-1, foram ensaiadas diluições em série do RANKL solúvel em replicado. Após a incubação durante a noite à temperatura ambiente, as soluções de RANKL foram aspiradas e o RANKL ligado foi detectado por

incubações sequenciais com anticorpo primário contra RANKL, anticorpo secundário conjugado com AP e pNPP. Modelos experimentais idênticos foram empregues quando outros membros da família de TNF- α foram examinados quanto à ligação às sFRPs, e quando os derivados da sFRP-1 ou da sFRP-2 constituíram os alvos de ligação do RANKL.

7. Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

Foram realizadas experiências de ITC com um MicroCalorímetro VP-ITC (MicroCal, LLC, Northhampton, MA) de acordo com as Instruções de Utilização do fabricante. Resumidamente, aliquotas de 6 μ l de A-C2 (200 μ M, dissolvidas em PBS) foram injectadas a intervalos regulares numa câmara contendo sFRP-1 (10 μ M, também em PBS). As subidas de temperatura na câmara resultantes da ligação de A-C2 e sFRP-1 foram determinadas como medida do calor produzido pela reacção de ligação. Vários parâmetros, incluindo entalpia e constante de dissociação, foram calculados a partir destas medições. Esta técnica é vulgarmente usada para quantificar as propriedades termodinâmicas das interacções de ligação entre proteínas e peptídeos. Consultar, por exemplo, o artigo publicado por McNemar et al., Biochemistry 36:10006-10014, 1997.

8. Apresentação Diferencial por PCR

O RNA celular total foi extraído de linhas de células ou de tecidos de rato pelo método de tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio e usado para PCR com transcriptase reversa (RT-PCR) conforme descrito (Southby et al. Endocrinology 137:1349-1357, 1996 e Traianedes et al, J. Biol. Chem. 270:20891-20894, 1995). A ddPCR foi realizada conforme descrito (Liang et al, Science 257:967-971, 1992 e Traianedes et al, J. Biol. Chem. 270:20891-20894, 1995), salvo 1 μ g de RNA total que foi transcrito reversamente. Os produtos de PCR foram clonados

para pCRScriptII (Stratagene, LaJolla, CA) ou pGEM-T (Promega, Madison, WI). A análise sequencial de DNA foi realizada com um kit de sequenciação T7 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). Os oligonucleótidos foram sintetizados num sintetizador de DNA Oligo 1000M (Beckman Instruments Inc., Fullerton CA, EUA). Os oligonucleótidos foram: para ddPCR, DDMR-2 (5'-CTTGATTGCC-3'; SEQ ID NO: 37) e T12VA (5-TTTTTTTTTT[A,C,G]A; SEQ ID NO: 32-3').

Para ddPCR, o oligonucleótido 3' é T12VC, onde V = A, C ou G. Este oligonucleótido emparelhou-se às transcrições de mRNA tendo G e B (B = C, G ou T) como o último e o penúltimo nucleótidos antes da cauda poli-A. Os fragmentos de cDNA parciais foram amplificados através de 5'-10 mers provocando a síntese de cDNAs de comprimento variável devido ao pareamento aleatório a diferentes espécies de mRNA reversamente transcritas. Esta PCR é feita a uma temperatura de pareamento de 40°C e na presença de $[\alpha^{35}\text{S}]\text{-dATP}$ para permitir a visualização dos produtos resultantes. Os produtos de PCR foram resolvidos em géis de sequenciação de poliacrilamida a 6% e expostos a película de raio-X durante 1 a 3 dias. Os fragmentos de cDNA diferencialmente regulados foram extraídos do gel por sobreposição da película e recorte da região de interesse. Usando os mesmos oligonucleótidos, o fragmento de cDNA foi reamplificado por dois ciclos de PCR (um total de 80 ciclos de PCR). O produto reamplificado foi então clonado molecularmente em pGEM-T (Promega Inc., Madison, Wisconsin) e a sequência de ácidos nucleicos da inserção amplificada determinada.

9. Análise de Expressão da sFRP-1 por RT-PCR

O RNA total isolado a partir de linhas celulares ou tecidos foi transcrito reversamente com oligo-dT e PCR através dos iniciadores sFRP-1a (5'-TTAAAATTGCTGCCTGCCTGAG-3'; SEQ ID NO: 38) e sFRP-1b (5'-TCCGAACTACAGGGACAACAGG-3*; SEQ ID NO:

39) durante 22 ciclos, e considerado estar na fase log-linear da amplificação relativamente às transcrições da sFRP-1 de fontes osteoblásticas. As amplificações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos resultantes da PCR foram electroforesados, transferidos para membrana de nylon e hibridizados com o oligonucleótido de detecção interna etiquetado com α -32P, sFRP-1c (5'-GCCAGAGGTATTCTCAAAGTTG-3'; SEQ ID NO: 39). A gapdh-2 (5'-ATGAGGTCCACCACCTGTT-3'; SEQ ID NO: 33, nucleótidos 640-659; Tso et al, Nucl. Acids Res. 13:2485-2502, 1985) e a gapdh-4 foram utilizadas para amplificar o gene normalizante, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, durante 20 ciclos de PCR e os produtos foram detectados com gapdh-1 etiquetada com α -32P conforme descrito (Suda et al, J. Cell Physiol. 166:94-104, 1996).

10. Análise de Hibridização *in situ* da sFRP-1 em Amostras Tecidulares

Uma ribossonda da sFRP-1 murínica foi gerada por PCR utilizando RNA derivado de células tsJ2. O fragmento resultante de 750 bp foi clonado em pGEM-T (Promega, Madison, WI, EUA). O plasmídeo foi linearizado e transcrito com polimerase de RNA T7 ou SP6 para gerar ribossondas de sentido ou anti-sentido. As ribossondas foram etiquetadas com digoxigenina (DIG) durante a transcrição de RNA utilizando um kit de etiquetagem de RNA (Boehringer Mannheim, Mannheim GmbH, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. A hibridização *in situ* foi realizada conforme descrito anteriormente (Kartsogiannis et al., Bone 21:385-392, 1997).

11. Bioensaios de Osteoclastogénesis

A. Sistemas de Co-cultura

As células osteoblásticas foram preparadas a partir da calvária de ratos recém-nascidos por digestão de colagenase a

0,1% (Worthington Biochemical Co., Freefold, Austrália) e dispõe a 0,2% (Godo Shusei, Tóquio, Japão). A medula óssea e as células esplénicas foram obtidas a partir de ratos adultos e recém-nascidos,

respectivamente (Udagawa et al., *J. Exp. Med.* 182: 1461-1468, 1995). As células osteoblásticas foram co-cultivadas com medula óssea ou células esplénicas conforme descrito anteriormente (Udagawa et al., *J. Exp. Med.* 182: 1461-1468, 1995.). Em resumo, as células osteoblásticas primárias (2×10^4 /poço) e as células esplénicas nucleadas (1×10^6 /poço) ou as células de medula (5×10^5 /poço) foram co-cultivadas em placas de 48 poços (Corning Glass Inc., Coming, NY) com 0,4 ml de α -MEM (GIBCO/BRL, Grand Island, NY) contendo soro fetal bovino a 10% (Cytosystems, Castle Hill, NSW, Austrália) na presença de produtos químicos de teste. As culturas foram incubadas em quadruplicado e as células foram reabastecidas no dia 3 com meio fresco. A formação de osteoclastos foi avaliada após 6 a 7 dias de cultura. As células aderentes foram fixadas e coloridas com fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e o número de osteoclastos TRAP-positivos calculado conforme descrito (Udagawa et al., *J. Exp. Med.* 182: 1461-1468, 1995.). Para a coloração com TRAP, as células aderentes foram fixadas com formaldeído a 4% em PBS durante 3 minutos. Após o tratamento com etanol-acetona (50/50, vol/vol) durante 1 minuto, a superfície do poço foi secada ao ar e incubada durante 10 minutos à temperatura ambiente num tampão de acetato (0,1 M de acetato de sódio, pH 5.0) contendo fosfato de naftol AS-MX a 0,01% (Sigma) como substrato e sal LB vermelho-violeta a 0,03% (Sigma) como coloração para o produto de reacção na presença de 50 mM de tartarato de sódio. As células TRAP-positivas apresentaram uma cor vermelho-escura e aquelas com três ou mais núcleos foram classificadas como multinucleadas e consideradas como osteoclastos. A validação da formação de osteoclastos foi conseguida através do marcador

específico da expressão do receptor de calcitonina (CTR) e da ressorção óssea. A expressão CTR foi determinada quer por auto-radiografia com calcitonina de salmão ^{125}I ou por localização imunohistoquímica utilizando um conjunto de anticorpos por nós desenvolvidos conforme descrito por Quinn et al, Bone 25:1-8, 1999.

B. Formação de Osteoclastos Induzidos por RANKL a partir de Células Hematopoiéticas

Em alguns casos, as experiências foram feitas quer com células esplénicas de rato adulto ou com células RAW264.7 tratadas com M-CSF e RANKL, conforme descrito por Quinn et al, Endocrinology 139:4424-4427, 1998. Sempre que indicado, estes ensaios foram conduzidos na presença ou ausência de células T esplénicas. As fracções de células T foram preparadas conforme mencionado em Horwood et al, Journal of Clinical Investigation 101:595-603, 1998.

Exemplo

2

Identificação de Peptídeos que Ligam a sFRP-1

Para identificar as sequências peptídicas que ligam a sFRP-1, foram seleccionados $\sim 25 \times 10^9$ fagos de uma biblioteca contendo um acervo diversificado de doze segmentos de resíduos de aminoácidos ligados à proteína de gene III revestida pelo fago M13. Após três ciclos sucessivos de "panning" para fagos ligados a poços ELISA pré-incubados com sFRP-1, a preparação de fagos seleccionada pela sua capacidade de ligação de sPREM foi titulada e de seguida colocada em placas numa cultura de bactérias. Os fagos de 200 colónias separadas de bactérias lisadas foram colhidos, cultivados em caldo bacteriano durante a noite, recuperados do sobrenadante e testados quanto à sua capacidade de ligarem preferencialmente a sFRP-1 versus a BSA num teste ELISA. Os fagos que se ligaram pelo menos cinco vezes mais avidamente a poços revestidos com sFRP-1 em

comparação com BSA foram sujeitos a análise sequencial dos nucleótidos a fim de determinar a identidade da sequência de peptídeos responsável por esta especificidade de ligação.

De aproximadamente 100 isolados de fagos que foram sequenciados, foram deduzidas onze sequências únicas de peptídeos. De notar que três destas onze sequências continham um motivo conservado, composto pelos sete resíduos de aminoácidos seguintes: L/V-V-D-G-R-W-L/V (SEQ ID NO: 9). A significância deste motivo de heptapeptídeos foi acentuada pelo facto de dois terços dos fagos que exibiam uma especificidade elevada quanto à sFRP-1 no teste ELISA apresentarem na respectiva superfície uma das três sequências com este motivo (Tabela 1)

Tabela 1

SEQ ID NO:	Código de Referência	Sequência de Aminoácidos	Frequência	Especificidade (sFRP-1/BSA)
14	A-C2	QGTLVDGRWL QL SEQ ID NO: 14	54	10:1
11	A-E4	VVDGRWVQOG LED SEQ ID NO: 11	9	10:1
27	B-B9	LVDGRWLYNP HH SEQ ID NO:27	4	5:1

Dada a predominância deste padrão, foram posteriormente examinadas as propriedades de ligação destes três peptídeos designados por A-C2 (SEQ ID NO: 14), A-E4 (SEQ ID NO: 11) e B-B9 (SEQ ID NO: 27), bem como a significância geral do motivo

de peptídeos. Por conseguinte, foi efectuada uma análise semelhante com a segunda sequência mais frequentemente observada, identificada pela análise de peptídeos apresentada em fagos, designada por A-D9: WECAMYDGRCLT (SEQ ID NO: 40).

Exemplo

3

Confirmação da Actividade de Ligação do Motivo de Peptídeos à sFRP-1

Foi gerado um conjunto de proteínas de fusão peptídeo/fosfatase alcalina contendo motivos de peptídeos (SEQ ID NOS: 14, 11 e 27). Estas proteínas de fusão foram testadas quanto à ligação específica à sFRP-1 (SEQ ID NO: 3) num formato ELISA. Conforme ilustrado na FIG. 1, todos os caldos de isolados múltiplos da proteína de fusão A-C2 (SEQ ID NO: 14)/fosfatase alcalina apresentaram uma ligação forte, altamente específica aos poços pré-incubados com sFRP-1. Resultados idênticos foram obtidos com a proteína de fusão A-E4 (SEQ ID NO: 11)/fosfatase alcalina. Contudo, a proteína de fusão B-B9 (SEQ ID NO: 27)/fosfatase alcalina não apresentou uma ligação específica à sFRP-1. Esta diferença qualitativa entre os derivados A-C2 (SEQ ID NO: 14), A-E4 (SEQ ID NO: 11) e B-B9 (SEQ ID NO: 27) foi consistente com a diferença quantitativa observada durante a selecção ELISA do fago respectivo. Os fagos de expressão A-C2 (SEQ ID NO: 14) e A-E4 (SEQ ID NO: 11) foram mais abundantes na preparação de fagos seleccionada para ligação da sFRP-1 (Tabela 1) e apresentaram uma proporção superior da ligação sFRP-1:BSA do que o fago B-B9 (SEQ ID NO: 27). O mais dramático contraste observado com as proteínas de fusão é atribuível à diferença na valência das entidades de ligação: cada partícula de fago possui cinco cópias do peptídeo existente à superfície, enquanto as proteínas de fusão peptídeo/fosfatase alcalina existem como dímeros na solução. Assim, a avidez de ligação relativamente mais fraca da sequência B-B9, conforme inicialmente

interpretada com a partícula do fago pentavalente, tornou-se mais óvia quando os reagentes diméricos foram testados. Tais resultados indicam que a ligação associada ao motivo de peptídeos pode ser influenciada pela composição dos resíduos de aminoácidos adjacentes.

Experiências posteriores demonstraram que o motivo de peptídeos (SEQ ID NO: 9) constituiu um factor relevante na ligação da proteína de fusão A-C2 (SEQ ID NO: 14)/fosfatase alcalina à sFRP-1. Por exemplo, a inibição dependente da dosagem da ligação da proteína de fusão A-C2 (SEQ ID NO: 14)/fosfatase alcalina à sFRP-1 foi observada com A-C2 (SEQ ID NO: 14) mas não com o peptídeo sintético de controlo (FIG. 2). A própria fosfatase alcalina não apresentou uma ligação preferencial aos poços revestidos com sFRP-1. Substituições individuais de um resíduo de alanina em cada um dos doze pontos da sequência de A-C2 (SEQ ID NO: 14) da proteína de fusão A-C2 (SEQ ID NO: 14)/fosfatase alcalina estabeleceram que os cinco resíduos nucleares (V-D-G-R-W) do motivo de peptídeos nativo aumentaram a ligação da sFRP-1, à semelhança dos resíduos imediatamente adjacentes a esta sequência nuclear (FIG. 3). As substituições de alanina noutros pontos também influenciaram a ligação aumentando, em alguns casos, a respectiva avidez de ligação à sFRP-1 (SEQ ID NO: 3).

Em conjunto, a análise de peptídeos apresentados em fagos seguida de testes ELISA com proteínas de fusão peptídeo/fosfatase alcalina estabeleceu a existência de um motivo de peptídeos (SEQ ID NO: 9) que se liga à sFRP-1. Além disso, a ligação de proteínas contendo este motivo de peptídeos, L/V-V-D- G-R-W-L/V (SEQ ID NO: 9), pode ser aumentada ou diminuída por alterações na composição de resíduos em estreita proximidade com o motivo de peptídeos (SEQ ID NO: 9).

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foi utilizada para demonstrar a ligação do peptídeo A-C2 e da sFRP-1 na solução e calcular a afinidade da respectiva interacção. A ligação foi evidente, à medida que foi produzido calor quando as alíquotas da solução de A-C2 foram adicionadas à câmara com sFRP-1 dissolvida em PBS. Em contrapartida, não foi produzido calor quando o A-C2 foi adicionado à câmara contendo apenas PBS. O Kd calculado foi de 3,9 +/- 0 46 μmol (FIG. 4A e 4B).

Os testes ELISA foram realizados conforme acima mencionado, com uma série de mutantes de deleção de sFRP-1 (Uren et al, J. Biol. Chem., 275: 4374-4382, 2000) a fim de determinar que regiões da proteína foram necessárias para ligar a quimera A-C2/fosfatase alcalina. A ligação ideal foi observada com o derivado Δ3, que contém o Fz CRD integral e uma porção da região C-terminal. Foi detectada uma menor ligação com os derivados que continham apenas o CRD ou a região C-terminal.

Logo, foi necessária uma combinação dos elementos do CRD e do domínio C-terminal para a ligação de A-C2. Como os derivados de fraca ligação à quimera A-C2 ligaram outros reagentes e, em alguns casos, apresentaram actividade biológica, é pouco provável a sua desnaturação.

Um outro peptídeo, o A-D9, foi analisado de maneira semelhante à rotina seguida para o A-C2. Em particular, os testes ELISA efectuados com uma quimera A-D9/AP demonstraram que a mesma se ligou especificamente aos poços revestidos com sFRP-1 em comparação com BSA. Esta ligação foi bloqueada num modo dependente da dosagem com um peptídeo sintético solúvel contendo a sequência de A-D9. A ligação da quimera A-D9/AP à sFRP-1 em poços ELISA foi afectada pelas substituições de alanina na sequência de A-D9. É interessante notar que o peptídeo A-C2 pode também inibir a ligação da quimera A-D9/AP

à sFRP-1 e que o peptídeo A-D9 inibiu a ligação da quimera A-C2/AP à sFRP-1. Tal implica que o A-C2 e o A-D9 reconheceram os pontos de ligação sobrepostos na sFRP-1, o que é consistente com a presença de um elemento comum (DGR) em ambos os peptídeos.

Exemplo

4

Identificação de Proteínas com Sequências Semelhantes ao Motivo de Peptídeos

A análise BLAST de sequências no GenBank indicou que o motivo de peptídeos recentemente descoberto (SEQ ID NO: 9) não está presente em quaisquer proteínas Wnt. Porém, sequências semelhantes foram observadas em muitas outras proteínas, conforme ilustrado na Tabela 2

Tabela 2

SEQ ID NO:	Proteína Identificada com Homologia ao Motivo de Peptídeos	Sequência de Aminoácidos
29	Receptor de netrina (UNC5H3)	TLCPWDGRW
28	RANKL	MVDGSWLDL
10	Receptor A de ANP (humano)	VVDGGRFVLKTTD

O segmento V-D-G-R-W em UNC5H3 foi interessante porque esta proteína é um receptor de netrina. Neste sentido, é possível que a sFRP-1 (SEQ ID NO: 3) interaja com UNC5H3 numa relação de ligante/receptor. A presença da sequência M-V-D-G-S-W-L (SEQ ID NO: 28) em RANKL/TRANCE/OPGI é também digna de nota pela evidência acrescida de que a sFRP-1 (SEQ ID NO: 3) e o RANKL são co-expressos em muitos tecidos, incluindo no osso, onde o RANKL desempenha um papel fundamental na formação de

osteoclastos (ver abaixo). A sequência V-V-D-G-R-F-V (SEQ ID NO: 10) no receptor A do peptídeo natriurético auricular (ANP) humano é igualmente relevante, dada a co-expressão deste produto génico e da sFRP-1 nos tecidos renais e oculares. Conforme aqui descrito, a sFRP-1 (SEQ ID NO: 3) e o RANKL interagem entre si, de tal modo que as consequências biológicas são significativas, e a sua interacção pode ser modulada a fim de afectar a osteoclastogénesis.

Exemplo

5

sFRP-1 e Expressão no Osso

Foram efectuadas análises de hibridização *in situ* das transcrições da sFRP-1 (SEQ ID NO: 1) nas estruturas do esqueleto de embriões de rato (Dia 19), ratos recém-nascidos (Dia 1) e ratos adultos (5 semanas) para examinar o papel da sFRP-1 no desenvolvimento ósseo. Os condrócitos hipertróficos foram fortemente positivos em embriões murínicos (E19). Na espinha medula de ratos do Dia 1, houve uma expressão muito forte no centro de ossificação no primórdio da cartilagem da região vertebral lombar e do núcleo pulposo na parte central do disco intervertebral lombar. No adulto, as células de revestimento do osso foram positivas, bem como várias células medulares isoladas, sendo os osteócitos fracamente positivos. O mRNA da sFRP-1 foi também observado na epiderme. O RANKL é expresso num padrão semelhante (Kartsogiannis et al, Bone 25:525-534, 1999). Foi também detectada a expressão de sFRP-1 em pontos do esqueleto. Logo, é provável que a sFRP-1 esteja envolvida na morfogénesis do esqueleto e que a sua expressão continue em vários pontos durante a fase adulta.

Foi estudada a expressão da sFRP-1 em osteoblastos (células tsJ12) (para uma descrição das linhas de células tsJ12 e tsJ14, consulte Chambers et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA 90:5578-5582, 1993). Os resultados demonstraram que a sFRP-1 é preferencialmente expressa em osteoblastos (células

tsJ2) que promovem a formação de osteoclastos. As transcrições da sFRP-1 murínica foram amplificadas através dos oligonucleótidos sFRP-1a e sFRP-1b. Os produtos amplificados foram verificados por análise Southern usando o oligonucleótilo sFRP-1b etiquetado no terminal [α -³²P]dATP como sonda. A PCR de apresentação diferencial (ddPCR) demonstrou ainda que a sFRP-1 é regulada positivamente nas linhas de osteoblastos que estimulam a osteoclastogénese, mas não nos produtos obtidos a partir de duas outras linhas que não auxiliam a diferenciação de osteoclastos. A análise RT-PCR semi-quantitativa da expressão da sFRP-1 confirmou que o nível de transcrição era muito mais elevado nas linhas capazes de promover a formação de osteoclastos em co-culturas com células progenitoras hematopoiéticas. Este padrão foi observado quando foram comparadas as linhas adicionais de osteoblastos, reforçando a descoberta de que a expressão da sFRP-1 se encontra associada à osteoclastogénese.

Porém, em termos gerais, os factores osteotrópicos tais como 1 α ,25(OH₂) vitamina D₃ causaram uma estimulação limitada da expressão de sFRP-1 em linhas osteoblásticas. O RNA total foi isolado a partir de células não tratadas ou de células tratadas com 1 α ,25(OH₂) vitamina D₃ durante 24 horas, transcritas reversamente com oligo (dT) e sujeitas a PCR para sFRP-1 murínica e GAPDH. Uma co-cultura de osteoblastos e de medula óssea tratadas durante 24 horas com 1 α ,25(OH₂) vitamina D₃ foi incluída como controlo positivo. A combinação dos iniciadores sFRP-1a (5'- AGC CTT GGC AGT CAA CGA CG-3' SEQ ID NO: 30) e sFRP-1b (5'- GTT GTG GCT TTT GCA TTG CAC-3' SEQ ID NO: 31) foi utilizada para a amplificação da sFRP-1 e a combinação dos iniciadores gapdh-2 (5'-ATG AGG TCC ACC ACC CTG TT-3' SEQ ID NO: 33) e gapdh-4 (5'-CAT GGA GAA GGC TGG GGC TC-3' SEQ ID NO: 34) para a amplificação de GAPDH. Os produtos resultantes da PCR foram electroforeados, transferidos para membrana de nílon e hibridizados através do oligonucleótilo de

detecção interna etiquetado com [α - ^{32}P], sFRP-1c (5'-TGT TGA AAA CTA GTA GCT G-3' SEQ ID NO: 35) e gapdh-1 (5'-GCT GTG GGC AAG GTC ATC CC-3' SEQ ID NO: 36), respectivamente, conforme descrito (Southby et al., Endocrinology 137:1349-1357, 1996). A análise de RT-PCR foi repetida em triplicado. A análise de RT-PCR semi-quantitativa foi efectuada três vezes em cada reacção de RT, tendo sido examinadas duas reacções de RT independentes.

Estes resultados indicam que a sFRP-1 pode ser um mediador na formação de osteoclastos hormonalmente dependentes. Por outro lado, a expressão da sFRP-1 aumentou de forma acentuada quando os progenitores dos osteoblastos e dos osteoclastos foram co-cultivados. O período de tempo deste aumento correspondeu ao acréscimo no aparecimento de células TRAP+, um marcador da diferenciação de osteoclastos. Tais resultados mostram que a regulação positiva da expressão de sFRP-1 depende da comunicação intracelular entre as linhagens de osteoblastos e osteoclastos. Em particular, a correlação entre a expressão de sFRP-1 e a formação de osteoclastos sugeriu que a indução de sFRP-1 poderia ser consequência da osteoclastogénesis.

Exemplo

6

A sFRP-1 Bloqueia a Osteoclastogénesis em Bioensaios de Culturas Celulares

A possibilidade da sFRP-1 (SEQ ID NO: 3) e do RANKL interagirem directamente entre si foi testada por ELISA. O teste ELISA envolveu o uso de poços revestidos com sFRP-1 recombinante (SEQ ID NO: 3) e, subsequentemente, bloqueados com BSA. O RANKL foi de seguida incubado nestes poços, assim como em poços adjacentes que tinham sido tratados apenas com BSA. A detecção posterior com anti-soro de RANKL e reagentes secundários revelou a ligação específica do RANKL à sFRP-1 (FIG. 5). Tal resultado foi confirmado em várias experiências

independentes. O uso de reagentes recombinantes indica que a sFRP-1 (SEQ ID NO: 3) e o RANKL se ligam directamente entre si.

O efeito da sFRP-1 foi avaliado mediante o método independente de RANKL relativo à formação de osteoclastos usando a linha de células macrofágicas/monocíticas RAW264.7 (Quinn et al., Journal of Bone and Mineral Research. 16, 1787-1794, 2001) e foi comparado com o da osteoprotegerina (FIG. 14). Na ausência de TGF α , apenas números limitados de osteoclastos foram produzidos a partir de células RAW264.7 tratadas com TNF- α (Quinn et al., Journal of Bone and Mineral Research. 16, 1787-1794, 2001), pelo que foi adicionado TGF- β durante os primeiros 3 dias de cultura a fim de aumentar a quantidade de osteoclastos (FIG. 14). A sFRP-1 inibiu a formação de osteoclastos dependente de TNF- α quando presente durante os primeiros três dias de cultura, embora não tivesse sido observado qualquer efeito de OPG que sugerisse que a sFRP-1 actuou independentemente de RANKL, através da ligação ao TNF- α ou através da sinalização de WNT.

O efeito do CRD de expressão bacteriana foi avaliado em três modelos de culturas celulares distintos da formação de osteoclastos. Nomeadamente: (1) células da medula óssea + RANKL + M-CSF, (2) linha de células macrofágicas/monocíticas RAW264.7 + RANKL e (3) RAW264.7 + TNF- α + TGF- β (Horwood et al., Journal of Immunology 166:4915-4921, 2001; Quinn et al., Journal of Bone and Mineral Research. 16, 1787-1794, 2001). Em ambos os sistemas, o modelo dependente de RANKL (culturas 1 e 2) e o modelo independente de RANKL (cultura 3, formação de osteoclastos dependente de TNF- α), o CRD de expressão bacteriana mimetizou a acção da sFRP-1 completa e com potência semelhante (FIG. 15).

Conforme acima demonstrado, os testes ELISA com mutantes de deleção de sFRP 1 indicaram que o derivado Δ (Uren et al

J. Biol. Chem., 275:4374-4382, 2000), essencialmente composto por Fz CRD, manifestou uma boa ligação ao RANKL (FIG. 12). Além disso, a ligação do RANKL a uma preparação de CRD de expressão bacteriana foi forte.

A análise de Scatchard dos dados obtidos por ELISA indica que existem dois pontos de ligação diferentes: um ponto de elevada afinidade e um ponto de baixa afinidade, com 5-10 nM e 80-120 nM, respectivamente (FIG. 13) (consulte Meshul et al, J. Neurochem 67:1965, 1996).

Ensaios destinados a medir o efeito da sFRP-1 na osteoclastogénesis demonstraram que a sFRP-1 possui uma actividade inibidora dependente da dosagem na formação de osteoclastos (FIG. 6A). Estes resultados foram observados em co-culturas de osteoblastos primários e em células da medula óssea tratadas com vitamina D₃ (10^{-8} M) e PGE2 (10^{-7} M). A sFRP-1 reduziu o número de células TRAP+ multinucleadas em 50% quando usada numa concentração de 300 ng/ml, enquanto uma dose de 1.6 µg/ml diminuiu o número de células em 95% (FIG. 6A). Foi observado um padrão de reacção à dose semelhante quando células esplénicas do rato adulto foram tratadas com RANKL e M-CSF (FIG. 6B). Tais resultados indicam que a interacção directa entre a sFRP-1 e o RANKL bloqueou a diferenciação dos osteoclastos.

A significância dos dados obtidos com a sFRP-1 recombinante foi reforçada pelos resultados de experiências realizadas com anticorpos policlonais de coelho purificados com proteína G contra a sFRP-1 recombinante. Esta preparação de anticorpos provocou um aumento sete a dez vezes maior das células TRAP+ mono- e multinucleadas em co-culturas de osteoblastos primários e células esplénicas adultas que tinham sido tratadas com doses submáximas de D₃ (10^{-10} M) e Dex (10^{-9} M) (FIG. 7A). Um duplo ou triplo aumento destas células foi observado em co-culturas que receberam doses ideais de D₃ (10^{-8}

M) e PGE2 (10^{-7} M) (FIG. 1). Estes resultados demonstraram que a sFRP-1 de ocorrência natural esteve presente nas culturas e inibiu a formação de osteoclastos. Ao neutralizar esta actividade endógena, os anticorpos da sFRP-1 despoletaram o número de células TRAP+ produzidas nas co-culturas.

O CRD de expressão bacteriana bloqueou a formação de osteoclastos em três modelos de culturas celulares distintos, mimetizando a acção da sFRP-1 completa e com potência semelhante (FIG. 14).

Os três modelos utilizados nestes ensaios foram: (1) células da medula óssea + RANKL + M-CSF, (2) RAW264.7 + RANKL e (3) RAW264.7 + TNF- α + TGF- β . Sem estarem teoricamente ligados, de acordo com a actividade observada no grupo (3) (na ausência do RANKL), é possível que o CRD se ligue ao TNF- α , que se encontra estruturalmente relacionado com o RANKL.

Exemplo

7

O Peptídeo Sintético A-C2 Promove a Formação de Osteoclastos

Dado que o polipeptídeo A-C2 (SEQ ID NO: 14) possui uma homologia sequencial ao RANKL e o A-C2 (SEQ ID NO: 14) se liga à sFRP-1, foram realizados ensaios para determinar se o A-C2 (SEQ ID NO: 24) bloquearia a ligação de sFRP-1 ao RANKL, aumentando a osteoclastogénese. Em conformidade com esta hipótese, o tratamento de co-culturas de osteoblastos e células esplénicas adultas com A-C2 (SEQ ID NO: 14) resultou num aumento dez vezes maior de células TRAP+ multinucleadas (FIG. 8). O A-C2 (SEQ ID NO: 14) apenas produziu um efeito na formação de osteoclastos entre os dias 0 e 3 da experiência de co-cultura. A presença de RANKL é igualmente necessária para a osteoclastogénese durante os dias 0 a 3 (Suda et al Endocrine Reviews 20:345-357, 1999). Por conseguinte, estes resultados são consistentes com a noção de que o A-C2 (SEQ ID NO: 14) muito provavelmente influencia a actividade do RANKL.

Além disso, o efeito positivo do A-C2 (SEQ ID NO: 14) nos ensaios de co-cultura apresentou correlação com a presença de células T. Quando estas foram removidas das preparações de células esplénicas adultas com esferas magnéticas conjugadas com anticorpos, a formação de osteoclastos aumentou e não houve uma resposta acrescida ao A-C2 (SEQ ID NO: 14; FIG. 10). De igual modo, foi observada a estimulação dependente da dosagem de A-C2 (SEQ ID NO: 14) na diferenciação de células TRAP+ multinucleadas em culturas de RAW264.7 apenas quando as células T foram adicionadas às culturas (FIG. 11). Tais resultados indicam que as células T exprimem um factor inibitório (à semelhança da sFRP-1) bloqueado por A-C2 (SEQ ID NO: 14).

Exemplo

8

A Análise Estrutural Demonstra que a Ligação sFRP-1/RANKL se Estende para além do Motivo de Peptídeos

A análise da função estrutural da interacção sFRP-1/RANKL foi realizada testando a capacidade de ligação do RANKL a um conjunto de mutantes de deleção da sFRP-1 (FIG. 12). A ligação mais forte foi observada com um derivado contendo CRD e uma forte ligação foi posteriormente detectada com uma variante semelhante composta pelo CRD expresso nas bactérias. É de notar que foi também observada a ligação da sFRP-1 a um derivado de RANKL sem a sequência correspondente ao motivo de A-C2 (esta variante de RANKL apresentou uma sequência de terminal amino iniciada no resíduo 158). Tal implica que a ligação de RANKL e de sFRP-1 não se baseia inteiramente na presença da sequência de A-C2. Além disso, conclui-se que outras proteínas estruturalmente relacionadas com RANKL mas que não possuem uma sequência semelhante a A-C2 podem também ligar a sFRP-1. Esta hipótese foi testada e está agora comprovado que o TNF- α pode igualmente ligar-se à sFRP-1 num formato ELISA, sob condições comparáveis àquelas acima

descritas em relação aos estudos de ligação do RANKL. Aliás, experiências idênticas realizadas com a sFRP-2 indicam que esta se pode ligar ao RANKL e a um outro membro da família de TNF- α , o ligante indutor de apoptose relacionada com o TNF (TRAIL). Neste sentido, consideramos que interacções adicionais ocorrem entre membros das famílias sFRP e TNF, além daquela que envolve a sFRP-1 e o RANKL.

Exemplo

9

Identificação de um Motivo de Peptídeos Biologicamente Relevante

O motivo de peptídeos, L/V-V-D-G-R W-L/V (SEQ ID NO: 9), não foi anteriormente identificado como sendo capaz de se ligar à sFRP-1. Esta actividade de ligação foi caracterizada através de uma série de testes ELISA utilizando proteínas de fusão peptídeo/fosfatase alcalina, mutagénese de varredura de alanina e peptídeos sintéticos. Estas experiências também demonstraram que substituições em resíduos próximos podem aumentar ou reduzir a ligação motivo de peptídeos/sFRP-1, implicando que as substituições sistemáticas em resíduos adjacentes e alterações conservadoras no motivo de peptídeos são capazes de reforçar a interacção com a sFRP-1.

As alterações conservadoras substituem um aminoácido por outro aminoácido semelhante em tamanho, hidrofobicidade, etc. Estas alterações são geralmente conservadoras quando se pretende modular com precisão as características da proteína. Os exemplos de aminoácidos que podem ser substituídos por um aminoácido original numa proteína e que são considerados como substituições conservadoras incluem: Ser por Ala; Lys por Arg; Gln ou His por Asn; Glu por Asp; Ser por Cys; Asn por Gln; Asp por Glu; Pro por Gly; Asn ou Gln por His; Leu ou Val por Ile; Ile ou Val por Leu; Arg ou Gln por Lys; Leu ou Ile por Met;

Met, Leu ou Tyr por Phe; Thr por Ser; Ser por Thr; Tyr por Trp; Trp ou Phe por Tyr; e Ile ou Leu por Val. O efeito de ligação dos peptídeos, nos quais foram feitas as referidas substituições, pode ser prontamente confirmado pelo ensaio de ligação do motivo de peptídeos divulgado nesta invenção.

Alterações mais substanciais da função ou de outras características podem ser obtidas seleccionando substituições menos conservadoras do que aquelas acima descritas, ou seja, seleccionando resíduos que diferem de forma mais significativa no respectivo efeito de manutenção (a) da estrutura do polipeptídeo na área de substituição, por exemplo, como uma conformação em folha ou espiral; (b) da carga ou hidrofobicidade da molécula no ponto alvo; ou (c) do volume da cadeia lateral. As substituições que por norma se julgam produzir as maiores alterações nas propriedades da proteína são aquelas em que (a) um resíduo hidrofílico, por exemplo, seril ou treonil, é substituído por um resíduo hidrofóbico como leucil, isoleucil, fenilalanil, valil ou alanil; (b) uma cisteína ou prolina é substituída por qualquer outro resíduo; (c) um resíduo possuindo uma cadeia lateral electropositiva, por exemplo, lisil, arginil ou histadil, é substituído por um resíduo electronegativo como glutamil ou aspartil; ou (d) um resíduo possuindo uma cadeia lateral volumosa, por exemplo, fenilalanina, é substituído por um resíduo que não tenha uma cadeia lateral como glicina. Os efeitos destas substituições, deleções ou adições de aminoácidos podem ser avaliados através dos ensaios de ligação ELISA aqui referidos.

Adicionalmente, um especialista na matéria valorizará que as sequências de ácidos nucleicos codificantes do motivo de peptídeos possam ser modeladas através da sintetização sintética da sequência de ácidos nucleicos apropriada ou da utilização de PCR para amplificar a sequência correcta. Uma vez obtida, a sequência de ácidos nucleicos pode ser colocada

num vector de expressão adequado e transformada num organismo como aquele que produz o peptídeo.

A significância do motivo de peptídeos (SEQ ID NO: 9) ficou demonstrada em experiências que revelaram um dramático efeito estimulante de um peptídeo sintético portador do motivo de peptídeos em bioensaios de osteoclastogénese. A capacidade do peptídeo A-C2 (SEQ ID NO: 14) de promover a formação de osteoclastos é consistente com a ideia de que o peptídeo aumenta a actividade de RANKL, ao bloquear o efeito inibitório da sFRP-1 endógena (FIG. 17).

O requisito das células T para o peptídeo A-C2 (SEQ ID NO: 14) estimular a formação de osteoclastos implica que as células T esplénicas exprimam um inibidor de osteoclastogénese sensível ao A-C2 (SEQ ID NO: 14). Acredita-se que este inibidor seja a sFRP-1, uma vez que a sFRP-1 é expressa no baço (Finch et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:6770-6775, 1997). Daí julgar-se que os reagentes que possuem um motivo de ligação de sFRP-1 sejam úteis na regulação da sinalização de RANKL envolvida na comunicação dendrítica das células T modulada pela sFRP-1 endógena. Essa regulação pode ser explorada a fim de optimizar terapias de inoculação numa variedade de cenários onde a interacção das células dendríticas com as células T desempenha um importante papel na resposta imunológica.

As células dendríticas demonstraram promover uma resposta à vacina, que pode ser determinada através da medição de títulos de抗énios conhecidos desenvolvidos em animais inoculados (M. Di Nicola et al, Cytokines Cell Mol Ther. 4: 265-273, 1998; C. Reis e Sousa et al, Curr. Opin. Immunol. 11: 392-399, 1999; K. Tarte and B. Klein, Leukemia 13: 653-663, 1999). Estão a ser realizados esforços para optimizar a expansão de células dendríticas de resposta imunológica com vista a melhorar a eficácia das terapias de inoculação (R.

Hajek and A.W. Butch, Med. Oncol. 17: 2-15, 2000). Utilizando métodos citados nas referências supra, os reagentes que correspondem ao motivo de ligação da sFRP-1 e à própria sFRP-1 podem ser úteis para incrementar a resposta imunológica às terapias de inoculação.

A associação da sFRP-1 e de células T indica que a primeira pode ser útil na modulação da clivagem proteolítica endógena de RANKL. Uma grande fracção de RANKL, expressa por células T, é proteoliticamente processada para libertar uma forma solúvel, biologicamente activa. Este processo, passível de ser mediado pela enzima de conversão de TNF- α (TACE), envolve a clivagem em um ou dois pontos da sequência de RANKL exactamente acima do motivo de ligação de peptídeos putativo (SEQ ID NO: 9). Por conseguinte, considera-se que a sFRP-1 regula o processamento proteolítico de RANKL num modo que possa ser revertido por reagentes contendo o motivo de peptídeos (SEQ ID NO: 9).

A capacidade da sFRP-1 de regular o processamento de RANKL é testada através de culturas de células T com expressão de RANKL e do tratamento das culturas com várias concentrações de sFRP-1. As proteínas de RANKL solúvel dai resultantes são então identificadas por marcação ("western") específica de RANKL. O grau de processamento de RANKL é depois correlacionado com a concentração de sFRP presente na amostra.

Para além do impacto dos motivos de peptídeos (SEQ ID NO: 9) na ligação sFRP-1/RANKL, os reagentes que contornam o motivo de peptídeos (SEQ ID NO: 9) também são de utilidade na interrupção da interacção da sFRP-1 com outras proteínas. Conforme acima mencionado, outras proteínas conhecidas, como o receptor de netrina, UNC5H3 e o receptor A de ANP, apresentam sequências idênticas às do motivo de ligação, para as quais podem ser rotineiramente seleccionadas sequências de genes recentemente identificadas. As proteínas com este motivo são

potenciais parceiros de ligação adicionais para a sFRP-1 e alvos para os reagentes que contêm o motivo de ligação da sFRP-1. Por exemplo, a ligação da sFRP-1 ao receptor A de ANP pode regular a libertação de sódio e fluido nos rins e nos olhos. Por outro lado, foi demonstrado que os componentes relevantes do sistema peptídico natriurético são funcionalmente expressos no olho humano, onde podem actuar como moduladores da pressão intra-ocular (J. Ortego and M. Coca-Prados, Biochem. Biophys. Res. Commun. 258: 21-28, 1999). No olho, a sFRP-1 ou o seu peptídeo de ligação pode ter um impacto importante na libertação do fluido no olho, provocando alterações na pressão intra-ocular. Estes efeitos são testados usando modelos de olhos perfusados em cultura de órgãos, como a originalmente descrita por D.H. Johnson and R.C. Tschumper, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 28: 945-953, 1987. A regulação da pressão intra-ocular apresenta benefícios terapêuticos no tratamento do glaucoma.

Exemplo

10

A sFRP-1 Bloqueia a Formação de Osteoclastos

Conforme aqui demonstrado, a sFRP-1 possui um efeito inibitório na osteoclastogénesis, provavelmente devido à sua interacção com RANKL. A expressão elevada da transcrição de sFRP-1 especificamente nas linhas de osteoblastos capaz de estimular a formação de osteoclastos sugeriu, no início, que a sFRP-1 promove a osteoclastogénesis. Contudo, o aumento na transcrição de sFRP-1, observado em co-culturas de osteoblastos e progenitores hematopoiéticos à medida que prosseguia a formação de osteoclastos, implicou que a sFRP-1 afinal fazia parte de um mecanismo tónico destinado a limitar a amplitude da formação de osteoclastos (FIG. 17). Acredita-se que tal seja relevante para a homeostase garantir a manutenção de um equilíbrio adequado nas populações de osteoblastos e

osteoclastos, simultaneamente com uma reserva de progenitores de osteoclastos que deveria estar disponível sempre que necessário de futuro. Além disso, é possível que baixas concentrações de sFRP-1 possam ter um efeito permissivo na formação de osteoclastos.

Tendo em vista a capacidade da sFRP-1 de inibir a osteoclastogénese, a sFRP-1 pode ser de utilidade clínica em condições onde a actividade excessiva de osteoclastos tenha consequências patológicas. A osteoporose e a osteopénia hipercalcémica são exemplos de tais condições; a artrite reumatóide é outro, que pode constituir um alvo particularmente aconselhável para uma terapia com sFRP-1, porque o RANKL solúvel das células T é considerado ter um papel significativo na perda óssea inerente a essas doenças.

Exemplo

11

Outras Interacções Entre Membros das Famílias de sFRP e TNF- α

Os resultados anteriormente descritos (Exemplo 8) indicam que os pontos de contacto adicionais no RANKL, para além do motivo de ligação de peptídeos recentemente identificado, estão envolvidos na interacção da sFRP-1 (SEQ ID NO: 3) e do RANKL. Estes resultados indicam ainda que os membros da família da sFRP interagem com os membros da família do ligante de TNF.

Os membros da família do ligante de TNF são conhecidos por se encontrarem entre a maior parte das citoquinas pleiotrópicas, induzindo um vasto número de reacções celulares, incluindo citotoxicidade, actividade antiviral, actividades imunoreguladoras e regulação transcripcional de vários genes. As reacções celulares aos ligantes da família de TNF abrangem não apenas reacções fisiológicas normais, mas também doenças associadas à apoptose aumentada ou à inibição

de apoptose. A morte de células programada por apoptose constitui um mecanismo fisiológico envolvido na deleção de linfócitos T periféricos do sistema imunitário e a sua desregulação pode levar a vários processos patogénicos diferentes. As doenças associadas à sobrevivência aumentada de células ou à inibição de apoptose, incluem cancros, distúrbios auto-imunes, infecções virais, inflamações, enxerto versus doenças do hospedeiro, rejeição aguda do enxerto e rejeição crónica do enxerto. As doenças associadas à apoptose aumentada incluem SIDA, lesões neurodegenerativas, síndromes mielodisplásicos, lesões isquémicas, doença hepática induzida por toxinas, choque séptico, caquexia e anorexia.

Assim, a presente invenção proporciona outros métodos destinados a modular as interacções entre ligante de TNF/receptor de TNF. Tais métodos envolvem o contacto da sFRP, seu fragmento ou variante, ou do motivo de peptídeos (SEQ ID NO: 9) com um membro da família de ligantes de TNF de proteínas e a detecção de uma alteração na actividade biológica do ligante de TNF.

O facto da sFRP, seu fragmento ou variante, ou do motivo de peptídeos actuar como "agonista ou antagonista" pode ser prontamente determinado através de qualquer um dos conhecidos ensaios de reacção celular ao ligante/receptor da família de TNF, tal como os descritos nas referências citadas: D Wallach et al., Annu. Rev Immunol 17:331-367, 1999; S J Baker and E.P. Reddy, Oncogene 17: 3261-3270, 1998.

Logo, a invenção oferece métodos de selecção destinados a determinar se um candidato agonista ou antagonista é capaz de aumentar ou de inibir a resposta celular a um ligante da família de TNF.

Exemplo

12

Ligaçāo de sFRP-1/peptídeo

Os testes ELISA foram realizados conforme acima mencionado, com uma série de mutantes de deleção de sFRP-1 (Uren et al, J. Biol. Chem., 275: 4374-4382, 2000) a fim de determinar que regiões da proteína foram necessárias para ligar a quimera A-C2/fosfatase alcalina. A ligação ideal foi observada com o derivado $\Delta 3$, que contém o Fz CRD integral e uma porção da região C-terminal. Foi detectada uma menor ligação com os derivados que continham apenas o CRD ou a região C-terminal.

Logo, foi necessária uma combinação dos elementos do CRD e do domínio C-terminal para a ligação de A-C2. Como os derivados de fraca ligação à quimera A-C2 ligaram outros reagentes e, em alguns casos, apresentaram actividade biológica, é pouco provável a sua desnaturação.

Tendo ilustrado e descrito os princípios da invenção através de configurações e exemplos múltiplos, deve ser evidente para os especialistas na matéria que a presente invenção pode ser modificada em termos de disposição e pormenor, desde que aqueles princípios não sejam alterados. Todas as modificações serão por nós defendidas no âmbito das reivindicações que se seguem.

LISTAGEM DE SEQUÉNCIAS

<110> Jeffery Rubin et al.

<120> SFRP E MOTIVOS DE PEPTÍDEOS QUE INTERAGEM COM SFRP E MÉTODOS DO RESPECTIVO USO

<130> 4239-61994

<140>

<141>

<150> US 60/260,908

<151> 10-01-2001

<160> 40

<170> PatentIn vers. 2.1

<210> 1

<211> 2075

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 1

eggttccat gagccccgggg catgatctga tcccccacagc atgtgggggg ggaggacttgtg 1982
 ctgtcccttg ttttcggasas agggaaacccac atgtgggggttgg agggaggacccgg cgtattttcgg 2048
 yctggagaagg cagttatgtttt caaaaaacccat atgtta 2075

<210> 2

<211> 942

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 2

<210> 3

<211> 313

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 3

Ser Lys Pro Gln Gly Thr Thr Val Cys Pro Pro Cys Asp Asn Glu Leu
 180 185 190
 Lys Ser Glu Ala Ile Ile Glu His Leu Cys Ala Ser Glu Phe Ala Leu
 195 200 205
 Arg Met Lys Ile Lys Glu Val Lys Lys Glu Asn Gly Asp Lys Lys Ile
 210 215 220
 Val Pro Lys Lys Lys Pro Leu Lys Leu Gly Pro Ile Lys Lys Lys
 225 230 235 240
 Asp Leu Lys Leu Val Leu Tyr Leu Lys Asn Gly Ala Asp Cys Pro
 245 250 255
 Cys His Gln Leu Asp Asn Leu Ser His His Phe Leu Ile Met Gly Arg
 260 265 270
 Lys Val Lys Ser Gln Tyr Leu Leu Thr Ala Ile His Lys Trp Asp Lys
 275 280 285
 Lys Asn Lys Glu Phe Lys Asn Phe Met Lys Lys Met Lys Asn His Glu
 290 295 300
 Cys Pro Thr Phe Gln Ser Val Phe Lys
 305 310

<210> 4

<211> 338

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 4

Met	Gly	Ile	Gly	Arg	Thr	Glu	Gly	Gly	Arg	Arg	Gly	Ala	Ala	Leu	Gly
1		2		3		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Val	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Gly	Ala	Ser	Gly	Arg	Gly	Leu	Gly	Ser	Glu
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Tyr	Asp	Tyr	Val	Ser	Phe	Gln	Ser	Asp	Ile	Gly	Phe	Tyr	Gln	Ser	Gly
30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45

Arg	Phe	Tyr	Thr	Lys	Pro	Pro	Gln	Cys	Val	Asp	Ile	Pro	Ala	Asp	Ieu
59				56					60						
Arg	Leu	Cys	His	Asn	Val	Gly	Tyr	Lys	Met	Val	Ieu	Pro	Asn	Leu	
65				70				73			60				
Leu	Glu	His	Glu	Thr	Met	Ala	Glu	Val	Lys	Gln	Gln	Ala	Ser	Ser	Trp
	85						86		90				93		
Val	Pro	Leu	Ieu	Asn	Lys	Asn	Cys	Ris	Ala	Gly	Thr	Gln	Val	Phe	Ieu
100					103				108			110			
Cys	Ser	Ieu	Phe	Ala	Pro	Val	Cys	Ieu	Asp	Arg	Pro	Ils	Tyr	Pro	Cys
115					120				125			125			
Arg	Trp	Ieu	Cys	Glu	Ala	Val	Arg	Asp	Ser	Cys	Glu	Pro	Val	Met	Gln
130				135				140							
Phe	Phe	Gly	Phe	Tyr	Trp	Pro	Glu	Met	Ieu	Lys	Cys	Asp	Lys	Phe	Pro
145					150				155			160			
Glu	Gly	Asp	Val	Cys	Ile	Ala	Met	Thr	Pro	Pro	Asn	Ala	Thr	Glu	Ala
165					170				175						
Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Cys	Pro	Pro	Cys	Asp	Asn	Glu	Ieu
180				185				190							
Lys	Ser	Gln	Ala	Ile	Ils	Glu	His	Ieu	Cys	Ala	Ser	Gln	Phe	Ala	Ieu
195				200				205							
Arg	Met	Lys	Ile	Lys	Glu	Val	Lys	Gln	Asn	Gly	Asp	Lys	Lys	Ile	
210				215				220							
Val	Pro	Lys	Lys	Lys	Pro	Ieu	Lys	Ieu	Gly	Pro	Ile	Lys	Lys	Lys	
225				230				235				240			
Asp	Ieu	Lys	Lys	Leu	Val	Ieu	Tyr	Ieu	Lys	Asn	Gly	Ala	Asp	Cys	Pro
245				250				255				260			
Cys	His	Gln	Ieu	Asp	Asn	Ieu	Ser	Ris	Phe	Ieu	Ile	Met	Gly	Arg	
265				270				275				275			
Lys	Val	Lys	Ser	Gln	Tyr	Ieu	Ieu	Thr	Ala	Ile	Ris	Lys	Trp	Asp	Lys
280				285				290							
Lys	Asn	Lys	Glu	Phe	Lys	Asn	Phe	Met	Lys	Met	Lys	Asn	Ris	Gln	
295				295				300				300			
Cys	Pro	Thr	Phe	Gln	Ser	Val	Phe	Lys	Gln	Ala	Tyr	Val	Glu	Gln	Lys
305				310				315				320			
Ieu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Ieu	Asn	Ser	Ala	Val	Asp	Ris	Ris	His	
325				330				335				335			
Ris	Ris														

<210> 5

<211> 195

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 5

Met Gly Ile Gly Arg Thr Glu Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly
1 5 10 15

Val Leu Leu Ala Leu Gly Gly Ala Ser Gly Arg Gly Leu Gly Ser Glu
20 25 30

Tyr Asp Tyr Val Ser Phe Gln Ser Asp Ile Gly Pro Tyr Gln Ser Gly
35 40 45

Arg Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Cys Val Asp Ile Pro Ala Asp Leu
50 55 60

Arg Leu Cys His Asn Val Gly Tyr Lys Met Val Leu Pro Asn Leu
65 70 75 80

Leu Glu His Glu Thr Met Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser Trp
85 90 95

Val Pro Leu Ile Asn Lys Asn Cys His Ala Gly Thr Gln Val Phe Leu
100 105 110

Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro Cys
115 120 125

Arg Trp Leu Cys Glu Ala Val Arg Asp Ser Cys Glu Pro Val Met Gln
130 135 140

Phe Phe Gly Phe Tyr Trp Pro Glu Met Leu Lys Cys Asp Lys Phe Pro
145 150 155 160

Glu Gly Asp Val Cys Ile Ala Met Thr Pro Gln Ala Tyr Val Glu Gln
165 170 175

Lys Leu Ile Ser Gln Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His
180 185 190

His His His
195

<210> 6

<211> 246

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 6

Met Gly Ile Gly Arg Thr Glu Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gi
1 5 10 15

Val	Leu	Ieu	Ala	Ieu	Gly	Ala	Ser	Gly	Arg	Gly	Ieu	Gly	Ser	Glu	
20														30	
Tyr	Asp	Tyr	Val	Ser	Phe	Gln	Ser	Asp	Ile	Gly	Pro	Tyr	Gln	Ser	Gly
35														45	
Arg	Phe	Tyr	Thr	Lys	Pro	Pro	Gln	Cys	Val	Asp	Ile	Pro	Ala	Asp	Ieu
50														60	
Arg	Ieu	Cys	His	Asn	Val	Gly	Tyr	Lys	Met	Val	Ieu	Phe	Asn	Leu	
65														75	
Ieu	Glu	His	Glu	Thr	Met	Ala	Glu	Val	Lys	Gln	Gln	Ala	Ser	Ser	Trp
80														90	
Val	Phe	Ieu	Ieu	Asn	Lys	Asn	Cys	His	Ala	Gly	Thr	Gln	Val	Phe	Ieu
100														110	
Cys	Ser	Ieu	Phe	Ala	Pro	Val	Cys	Ieu	Asp	Arg	Pro	Ile	Tyr	Pro	Cys
115														125	
Arg	Trp	Ieu	Cys	Gln	Ala	Val	Arg	Asp	Ser	Cys	Glu	Pro	Val	Met	Gln
130														140	
Phe	Phe	Gly	Phe	Tyr	Trp	Pro	Glu	Met	Ieu	Lys	Cys	Asp	Lys	Phe	Pro
145														155	
Glu	Gly	Asp	Val	Cys	Ile	Ala	Met	Thr	Pro	Pro	Asn	Ala	Thr	Glu	Ala
165														175	
Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Cys	Pro	Pro	Cys	Asp	Asn	Glu	Ieu
180														190	
Lys	Ser	Glu	Ala	Ile	Ile	Glu	His	Ieu	Cys	Ala	Ser	Glu	Phe	Ala	Ieu
195														205	
Arg	Met	Lys	Ile	Ile	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Asn	Gly	Asp	Gln	Ala	Tyr
210														220	
Val	Glu	Gln	Lys	Ieu	Ile	Ser	Gln	Glu	Asp	Ieu	Asn	Ser	Ala	Val	Asp
225														235	
His	His	His	His	His	His										
245															

<210> 7

<211> 267

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 7

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

<210> 8

<211> 229

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 8

Met	Gly	Ile	Gly	Arg	Thr	Glu	Gly	Gly	Arg	Gly	Ala	Ala	Ieu	Gly	
1		2				10			19						
Val Ieu Leu Ala Leu Gly Ala Ser Gly Arg Gly Leu Gly Ser Glu															
				20	25	30									
Tyr Asp Tyr Val Ser Phe Gln Ser Asp Ile Gly Pro Tyr Gln Ser Gly															
35 40 45															
Arg Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Ile Ala Met Thr Pro Pro Asn Ala															
50 55 60															
Thr Glu Ala Ser Lys Pro Gln Gly Thr Thr Val Cys Pro Pro Cys Asp															
65 70 75 80															
Asn Glu Leu Lys Ser Glu Ala Ile Ile Glu His Leu Cys Ala Ser Glu															
85 90 95															
Phe Ala Ieu Arg Met Lys Ile Lys Glu Val Lys Lys Glu Asn Gly Asp															
100 105 110															
Lys Lys Ile Val Pro Lys Lys Lys Pro Leu Lys Leu Gly Pro Ile															
115 120 125															
Lys Lys Lys Asp Ieu Lys Lys Leu Val Leu Tyr Leu Lys Asn Gly Ala															
130 135 140															
Asp Cys Pro Cys His Gln Leu Asp Asn Ieu Ser His His Phe Leu Ile															
145 150 155 160															
Met Gly Arg Lys Val Lys Ser Gln Tyr Leu Leu Thr Ala Ile His Lys															
165 170 175															
Trp Asp Lys Lys Asn Lys Glu Phe Lys Asn Phe Met Lys Lys Met Lys															
180 185 190															
Asn His Glu Cys Pro Thr Phe Gln Ser Val Phe Lys Gln Ala Asp Tyr Val															
195 200 205															
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His															
210 215 220															
His His His His His															
225															

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de iniciadores e sondas

<220>

<221> caract. divers

<222> (1) .. (1)

<223> Xaa = Val o Leu

<220>

<221> caract. divers

<222> (7) .. (7)

<223> Xaa = Val ou Leu

<400> 9

Xaa Val Asp Gly Arg Trp Xaa
 1 5

<400> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Val Val Asp Gly Arg Phe Val Leu Lys Ile Thr Asp
 1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 11

Val Val Asp Gly Arg Trp Val Gln Gly Ieu Glu Asp
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 12

Asn Gln Gly Arg Asp Val Pro Glu Arg Trp Ser Tyr
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

<210> 13

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Cys	Ile	Ala	Met	Thr	Pro	Pro	Asn	Ala	Thr	Gln	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln
1				5					10				15		
Gly	Thr	Thr	Val	Cys	Pro	Pro	Cys	Asp	Asn	Glu	Leu	Lys	Ser	Gln	Ala
					20				25				30		
Ile	Ile	Glu	His	Leu	Cys	Ala	Ser	Glu	Phe	Ala	Leu	Arg	Met	Lys	Ile
					35			40				45			
Lys	Glu	Val	Lys	Lys	Glu	Asn	Gly	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Lys	Iys
					50			55				60			
Lys	Lys	Pro	Leu	Lys	Leu	Gly	Pro	Ile	Lys	Lys	Lys	Asp	Leu	Lys	Lys
					65			70			75				80
Leu	Val	Leu	Tyr	Leu	Lys	Asn	Gly	Ala	Asp	Cys	Pro	Cys	His	Gln	Leu
					85				90				95		
Asp	Asn	Leu	Ser	His	His	Phe	Leu	Ile	Met	Gly	Arg	Lys	Val	Lys	Ser
					100			105				110			
Gln	Tyr	Leu	Leu	Thr	Ala	Ile	His	Lys	Trp	Asp	Lys	Lys	Asn	Lys	Glu
					115			120			125				
Phe	Lys	Asn	Phe	Met	Iys	Lys	Met	Iys	Asn	His	Glu	Cys			
					130			135			140				

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 14

Gln Gly Thr Leu Val Asp Gly Arg Trp Leu Gln Leu
 1 8 16

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 15

Ala Gly Thr Leu Val Asp Gly Arg Trp Leu Gln Leu
1 8 10

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 16

Gln Ala Thr Leu Val Asp Gly Arg Trp Leu Gln Leu
1 5 10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 17

Gln Gly Ala Leu Val Asp Gly Arg Trp Leu Gln Leu
1 5 10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 18

Gln Gly Thr Ala Val Asp Gly Arg Trp Leu Gln Leu
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 19

Gln Gly Thr Ieu Ala Asp Gly Arg Trp Leu Gln Leu
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 20

Gln Gly Thr Leu Val Ala Gly Arg Trp Leu Gln Leu
1 5 10

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 21

Gln Gly Thr Leu Val Asp Ala Arg Trp Leu Gln Leu
1 5 10

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 22

Gln Gly Thr Leu Val Asp Gly Ala Trp Leu Gln Leu
1 5 10

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 23

Gln Gly Thr Leu Val Asp Gly Arg Ala Leu Gln Leu
1 5 10

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 24

Gln Gly Thr Leu Val Asp Gly Arg Trp Ala Gln Leu
1 8 10

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 25

Gln Gly Thr Leu Val Asp Gly Arg Trp Leu Ala Leu
1 8 10

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 26

Gln Gly Thr Leu Val Asp Gly Arg Trp Leu Gln Ala |
1 5 10 .

<210> 27

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 27

Leu Val Asp Gly Arg Trp Leu Tyr Asn Pro His His |
1 5 10 .

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 28

Met Val Asp Gly Ser Trp Leu Asp Leu
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 29

Thr Leu Cys Pro Val Asp Gly Arg Trp
1 5

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 30

aaaaatggatccgtcaacgcgg 20 |

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 31

tttgtggatttttgttgcac 31

<210> 32

<211> 14

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de iniciadores e sondas

<220>

<221> caract. divers

<222> (13)..(13)

<223> n = qualquer resíduo

<400> 32

.....
..... itnas

32

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 33

.....
..... ccacccctgttt

33

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 34

category got category

30

<210> 35

<211> 19

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 35

~~tgtggaaa~~ ~~tgtggatc~~

20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 36

gttgtgggca aggttcatccc 20

<210> 37

<211> 10

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 37

cttggatttgc 13

<210> 38

<211> 22

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 38

ctaaaaatgc tgcgtgcgtg ag

22

<210> 39

<211> 22

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 39

tccggaaactac aggacacaccc gg

22

<210> 40

<211> 12

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição de sequência artificial: Sequência de iniciadores e sondas

<400> 40

Trp Glu Cys Ala Met Tyr Asp Gly Arg Cys Leu Thr
3 5 10

Lisboa, 18 de Junho de 2012.

REIVINDICAÇÕES

1. Um polipeptídeo composto por (i) uma sequência de aminoácidos conforme apresentada na SEQ ID NO: 3, (ii) uma sequência de aminoácidos conforme apresentada na SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 7 ou (iii) uma variante de (i) ou (ii) tendo pelo menos 80% de identidade sequencial com uma dessas sequências, em que o polipeptídeo possui a capacidade de se ligar ao RANKL e inibe a diferenciação de células progenitoras de osteoclastos, para uso no tratamento de indivíduos com distúrbios ósseos caracterizados por ressorção óssea indesejável, artrite reumatóide, metástases líticas dos ossos ou mieloma múltiplo, por administração do polipeptídeo sem a sequência de SARP-2 humana, com alanina na posição 174, Uniprot ID NO Q8N474.
2. O polipeptídeo constante da reivindicação 1, em que o polipeptídeo foi seleccionado a partir do grupo composto pelos elementos apresentados na SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 7, para uso no tratamento de indivíduos com distúrbios ósseos caracterizados por ressorção óssea indesejável, artrite reumatóide, metástases líticas dos ossos ou mieloma múltiplo, por administração do polipeptídeo.
3. Um método de inibição da formação de osteoclastos *in vitro* por contacto das células progenitoras de osteoclastos com um polipeptídeo composto por (i) uma sequência de aminoácidos conforme apresentada na SEQ ID NO: 3, (ii) uma sequência de aminoácidos conforme apresentada na SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 ou SEQ ID NO: 7, ou (iii) uma variante de (i) ou (ii) tendo pelo menos 80% de identidade sequencial com uma dessas sequências, em que o polipeptídeo possui a capacidade de se ligar ao RANKL e

não possui a sequência de SARP-2 humana, com alanina na posição 174, Uniprot ID NO Q8N474.

Lisboa, 18 de Junho de 2012.

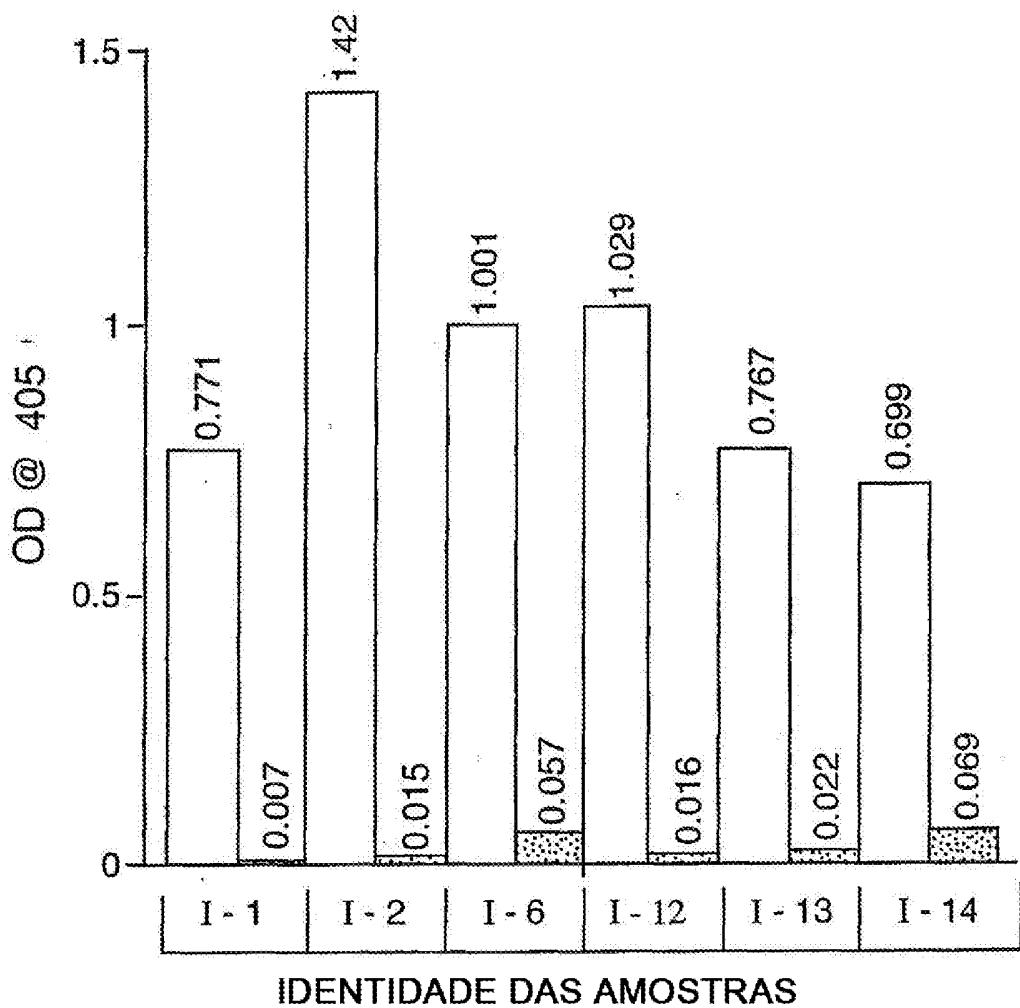


FIG. 1

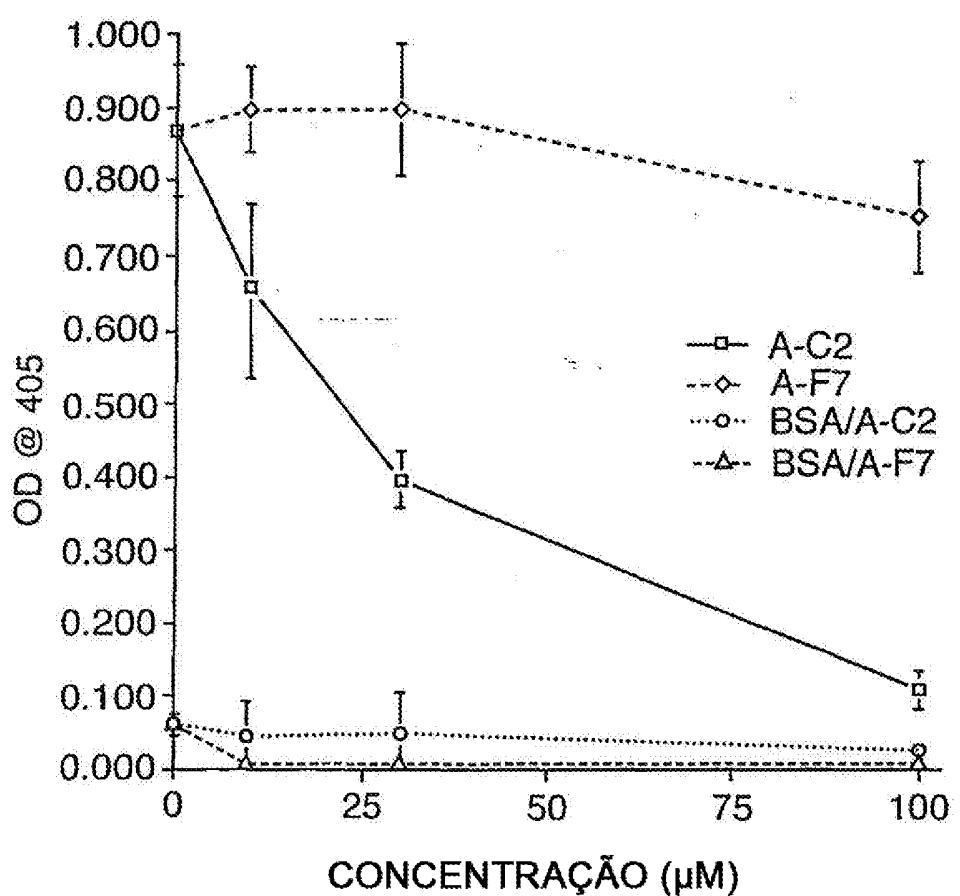


FIG. 2

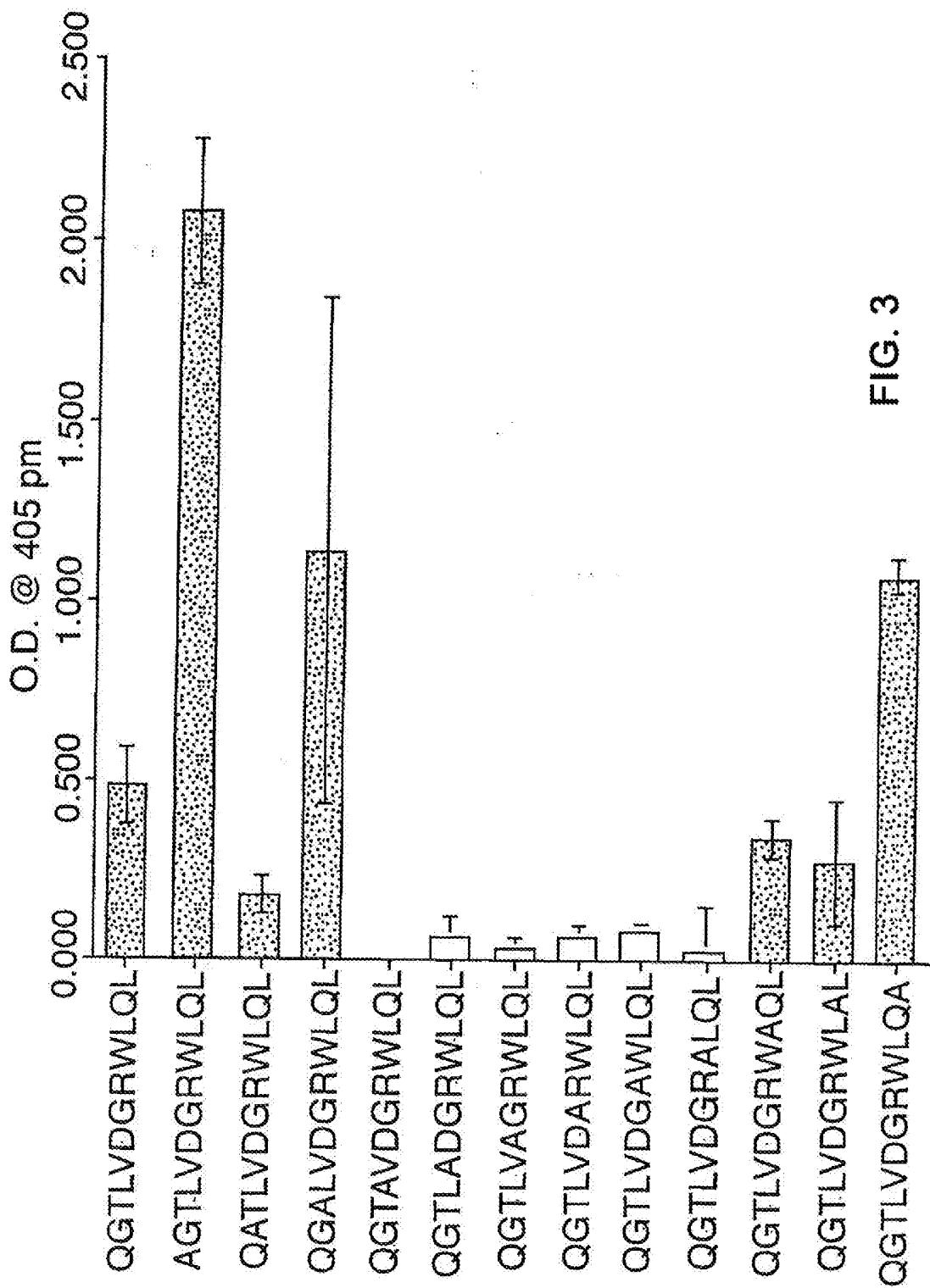


FIG. 3

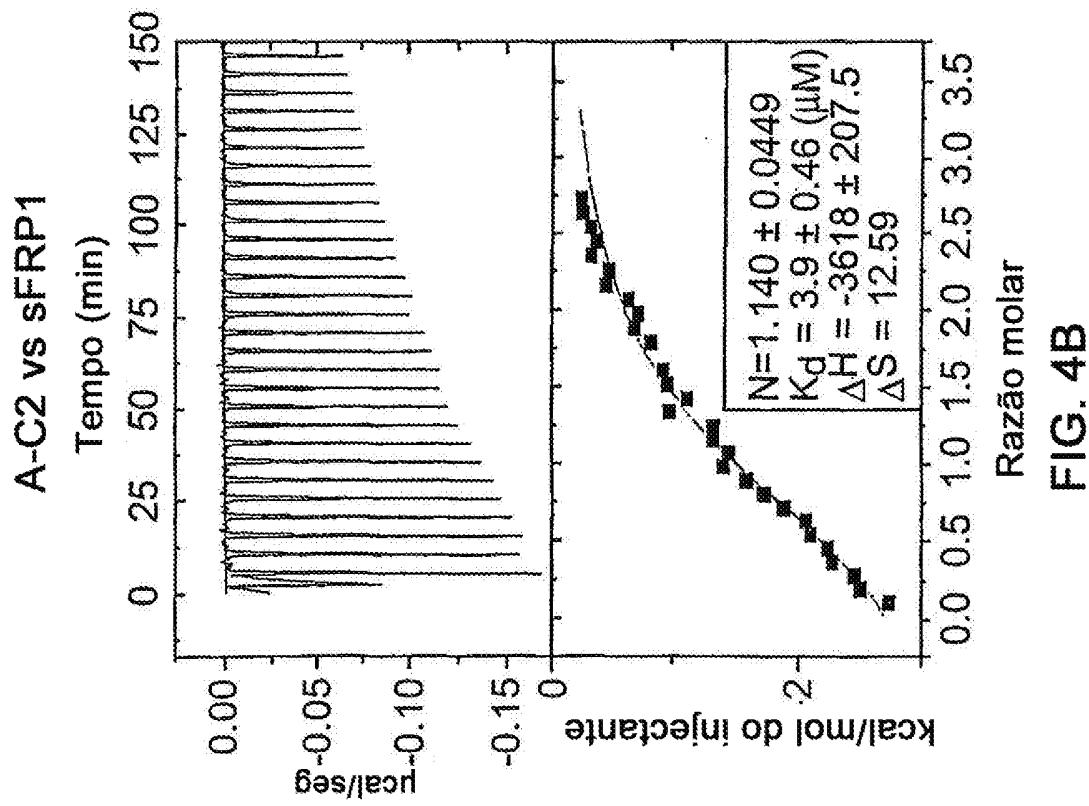
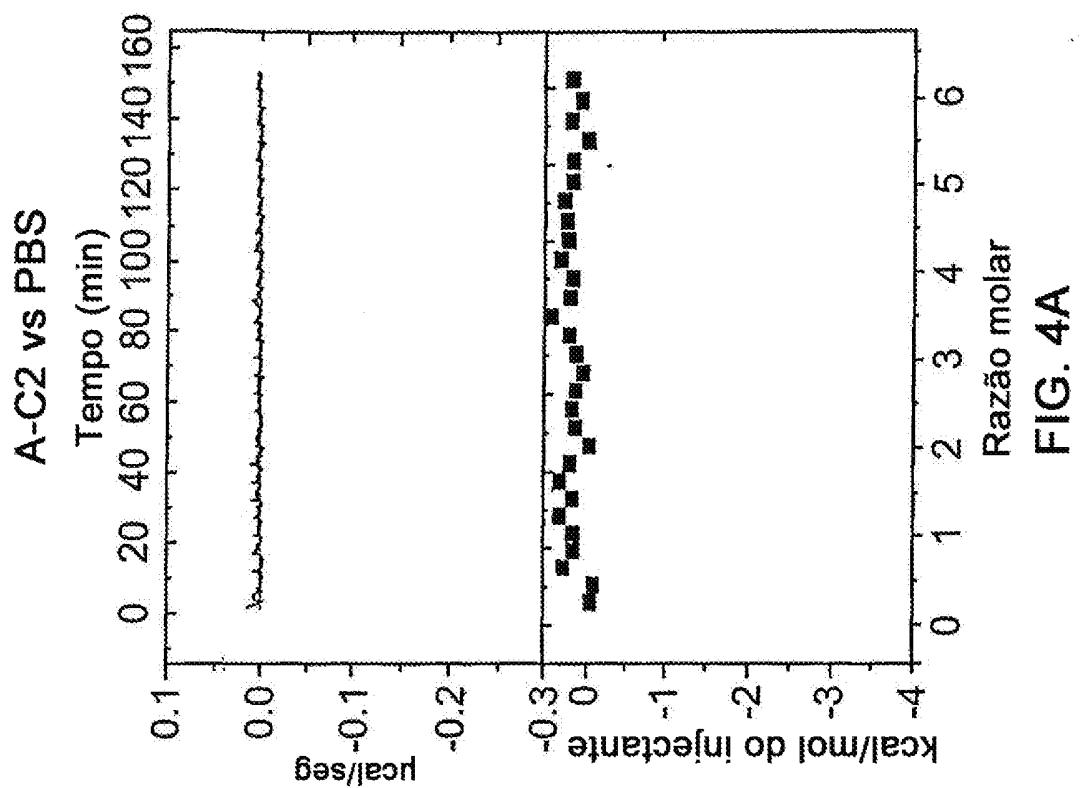


FIG. 4A

FIG. 4B

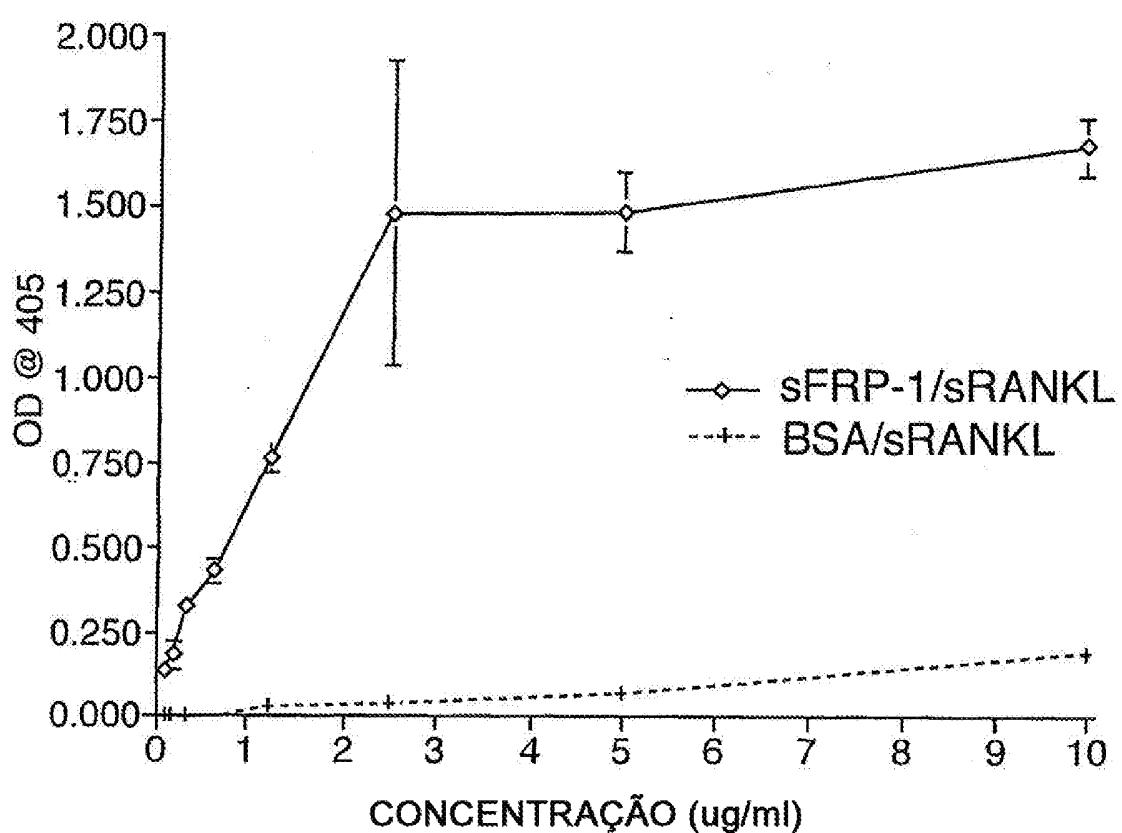


FIG. 5

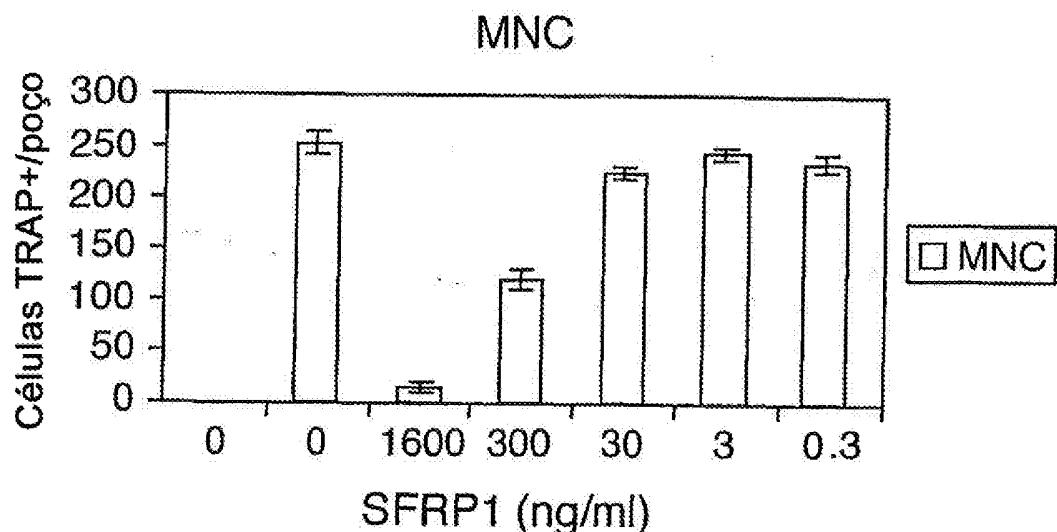


FIG. 6A

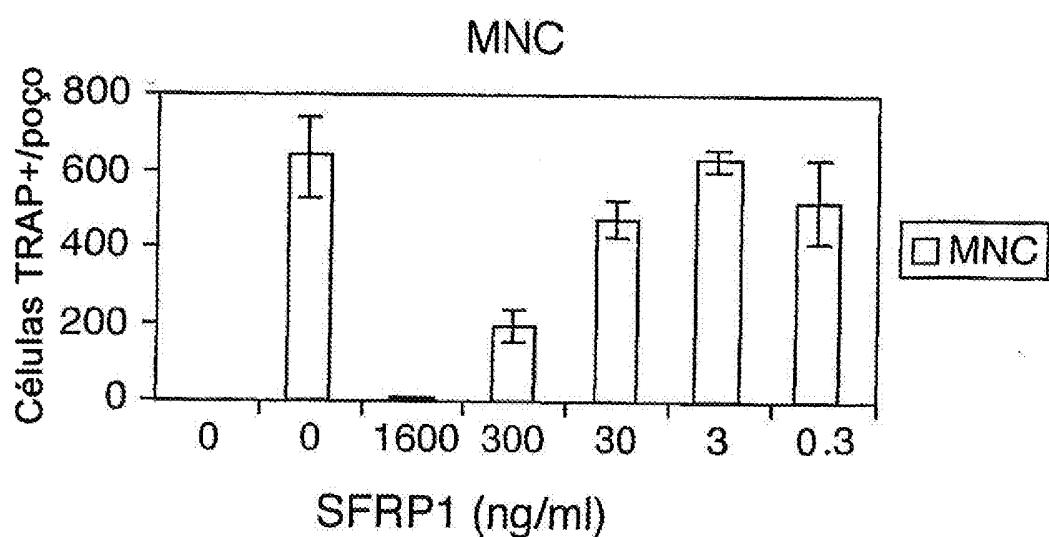
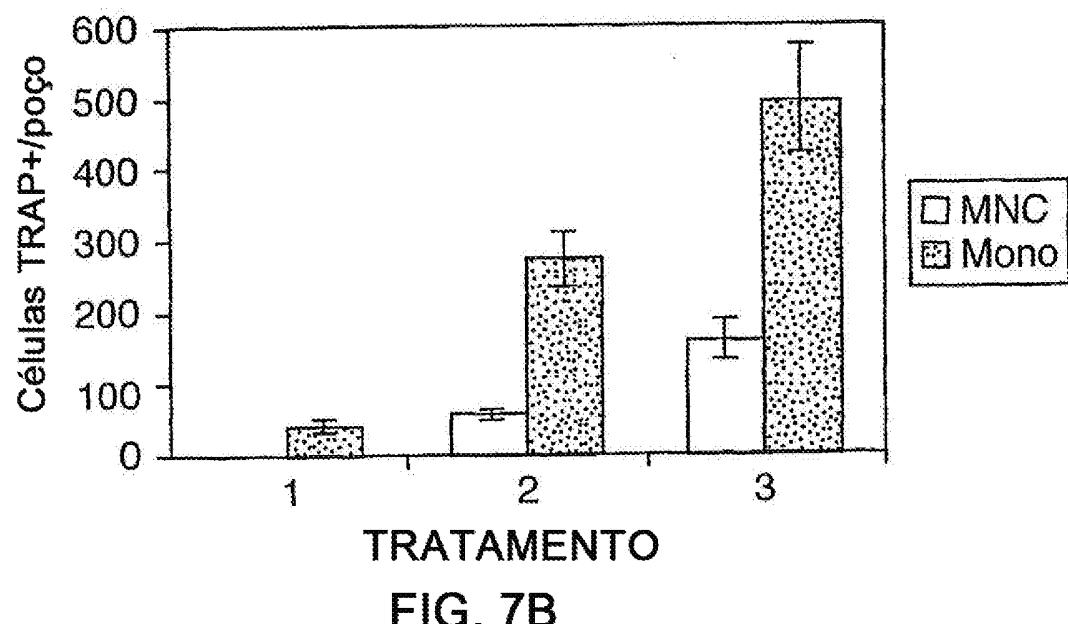
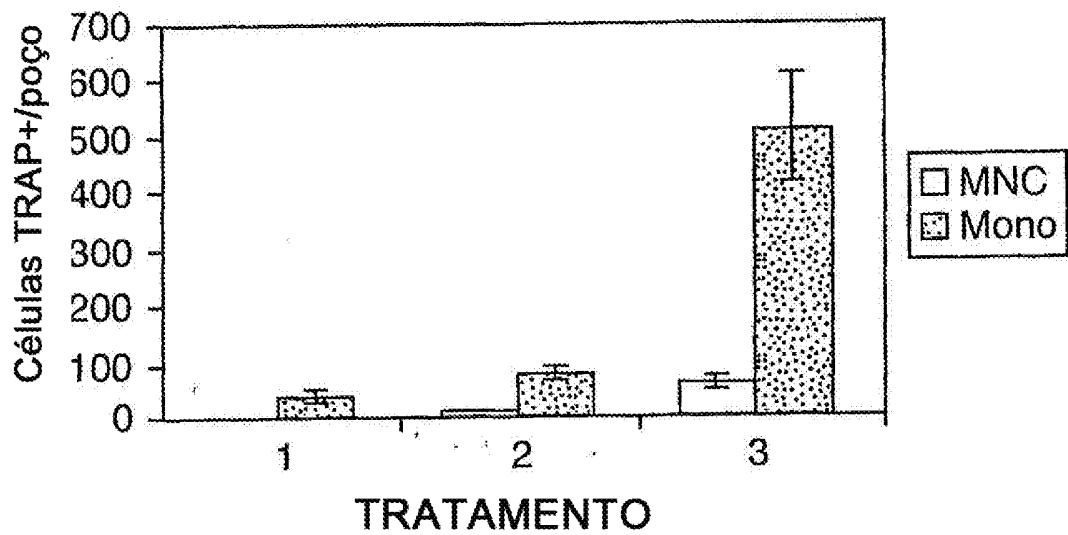


FIG. 6B



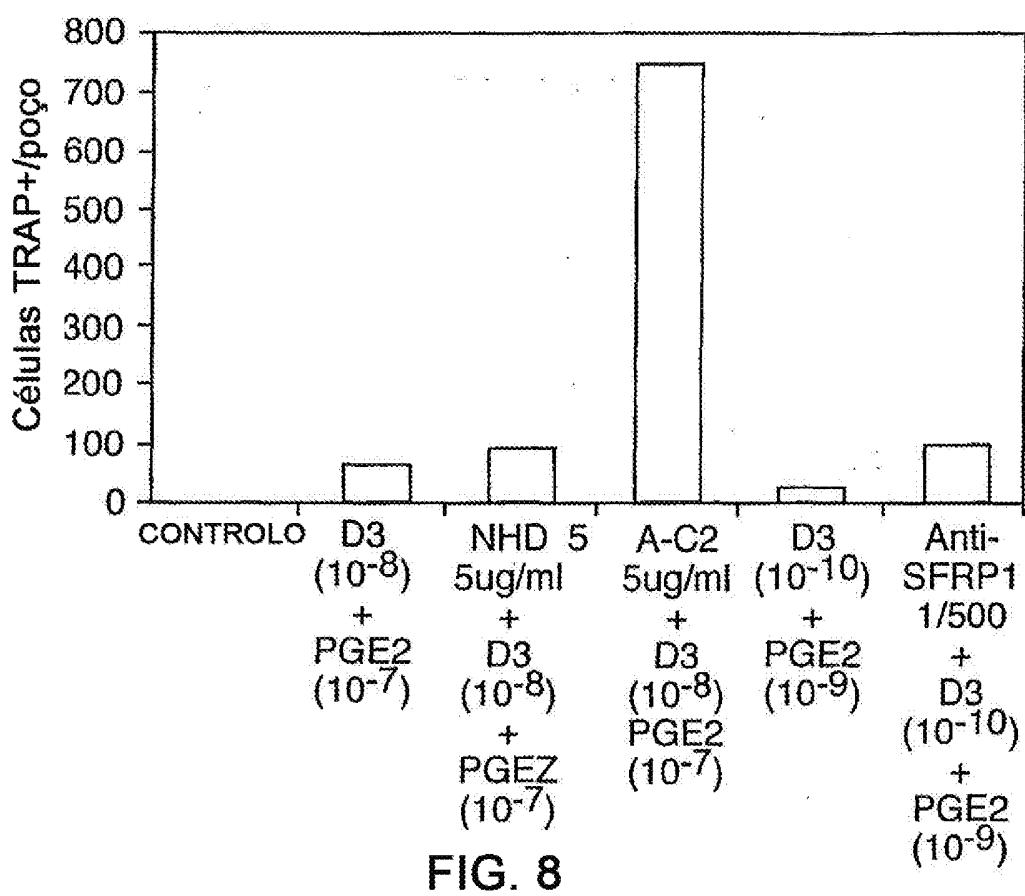


FIG. 8

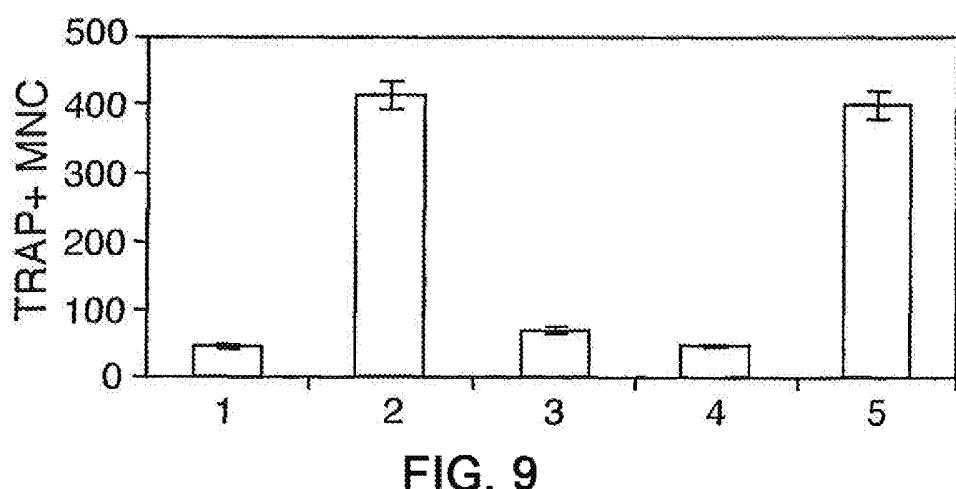


FIG. 9

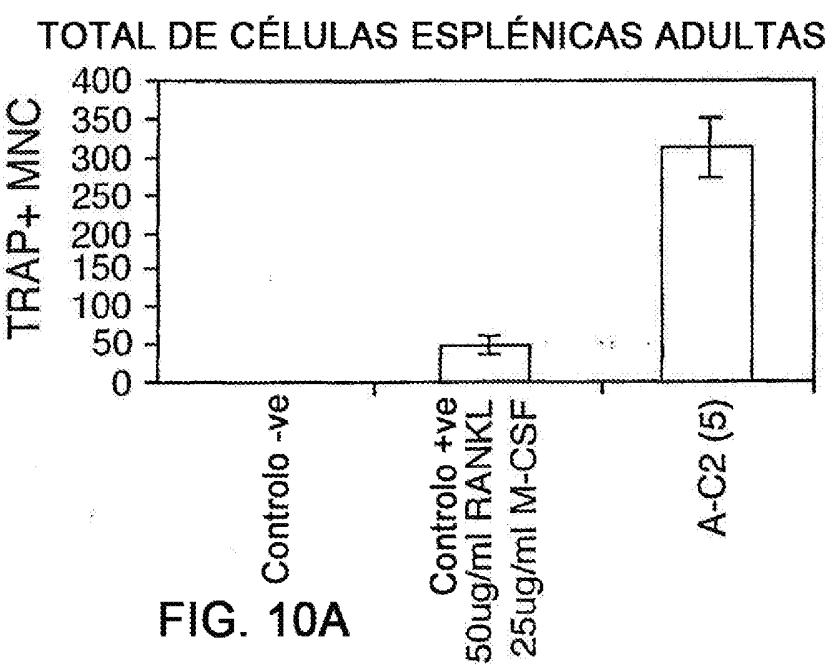


FIG. 10A

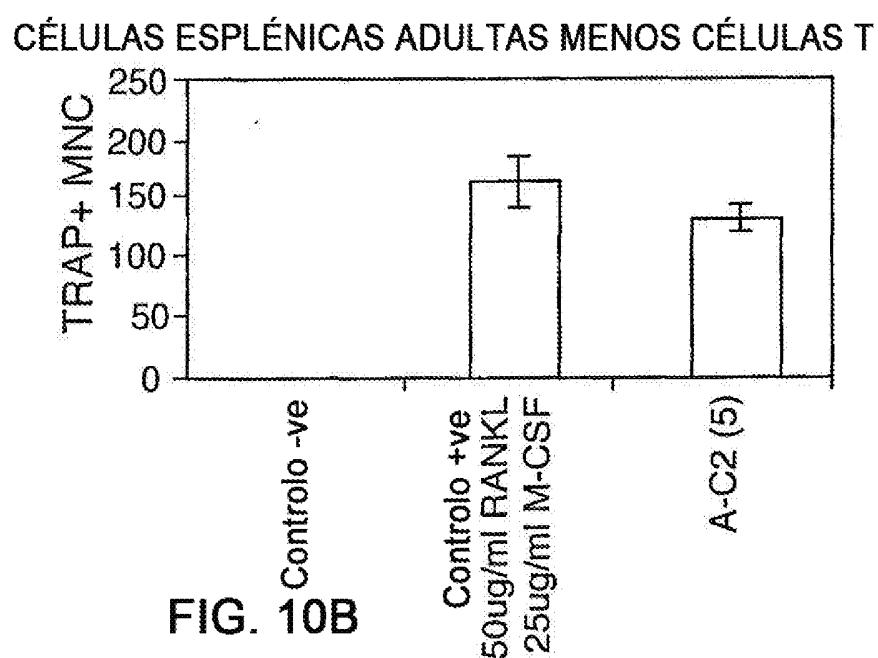


FIG. 10B

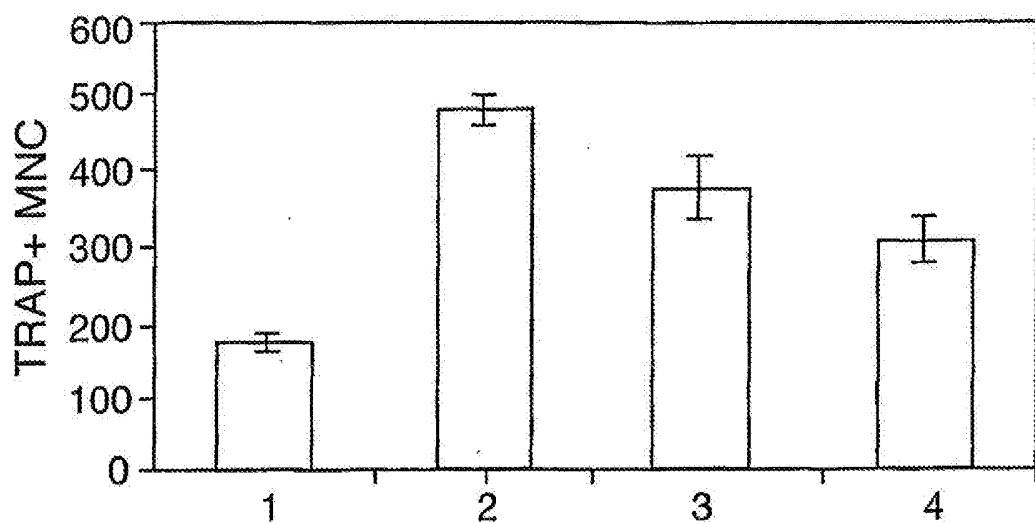


FIG. 11B

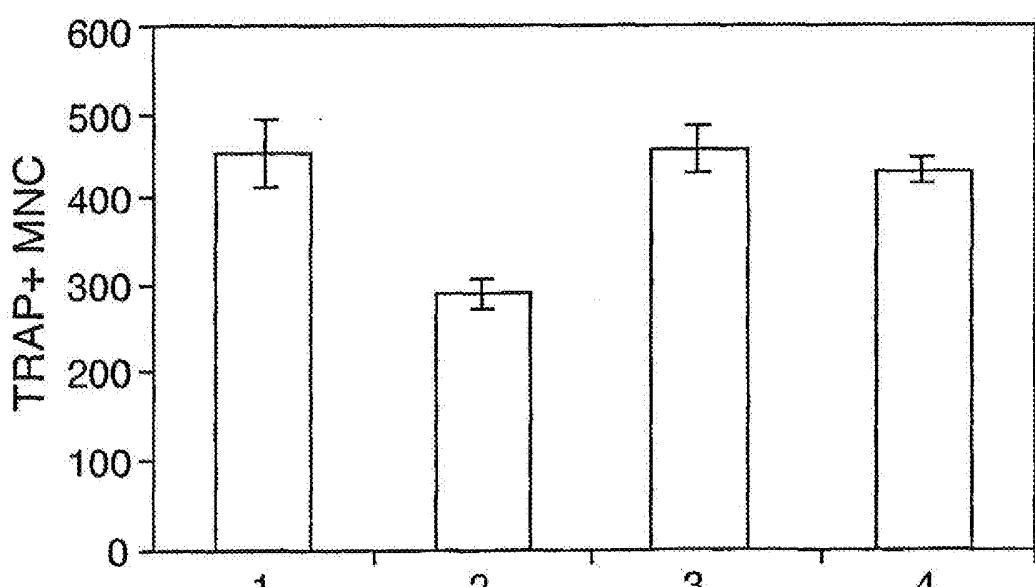
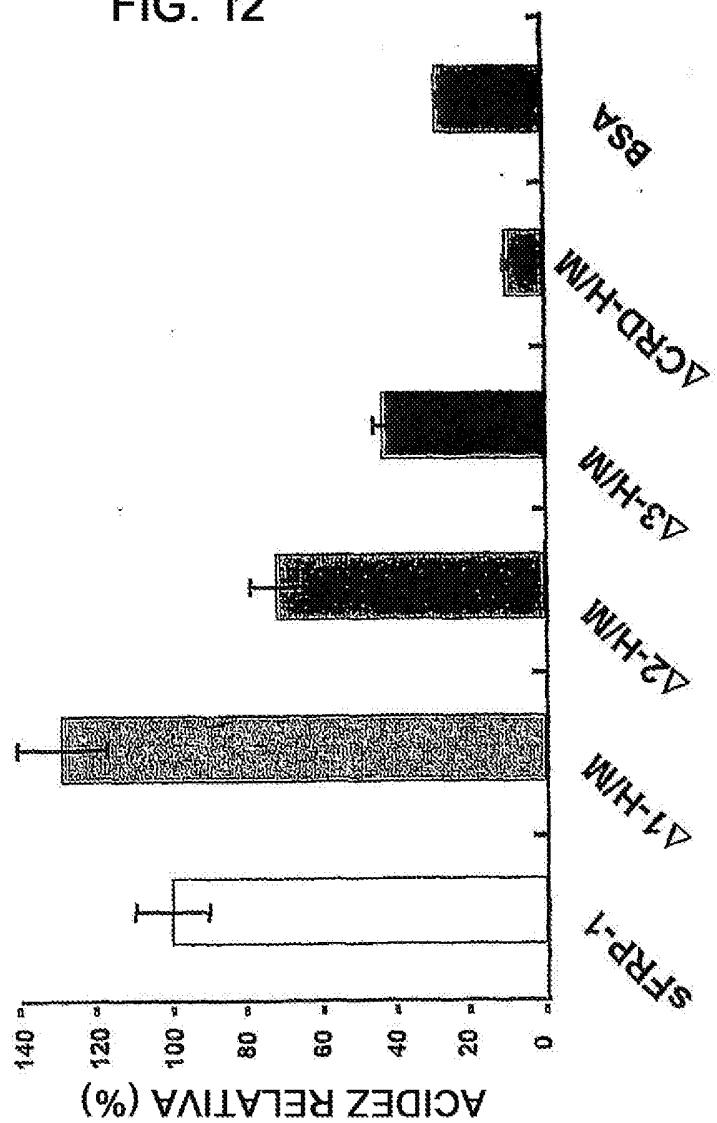


FIG. 11B

LIGAÇÃO DO RANKL AOS DERIVADOS DA sFRP-1

FIG. 12



LIGAÇÃO DO RANKL AO CRD BACTERIANO E ANÁLISE DA EQUAÇÃO DE SCATCHARD

RANKL vs CRD bacteriano

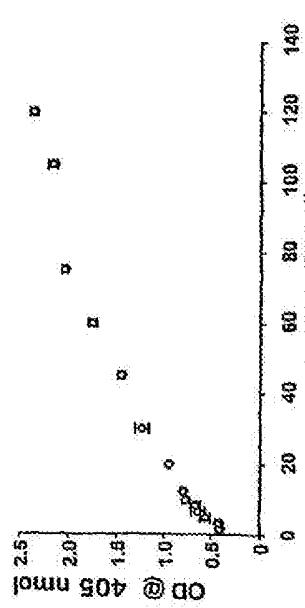


FIG. 13A

Equação de Scatchard

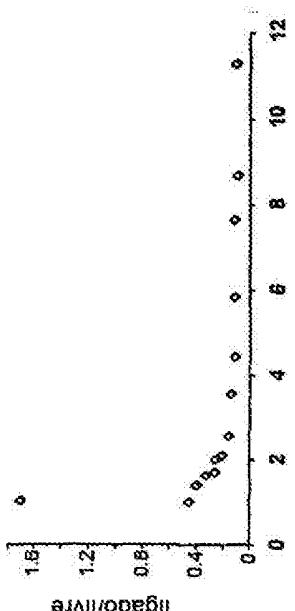


FIG. 13B

Ponto de baixa afinidade

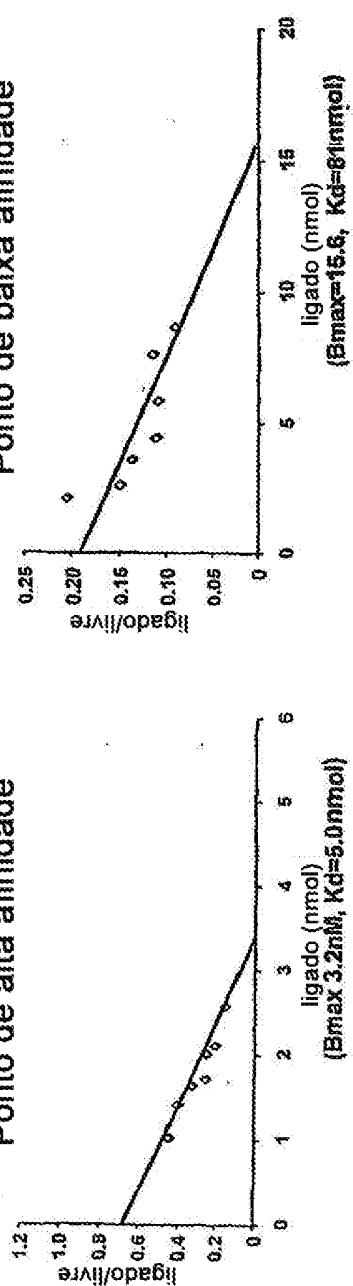


FIG. 13C

FIG. 13D

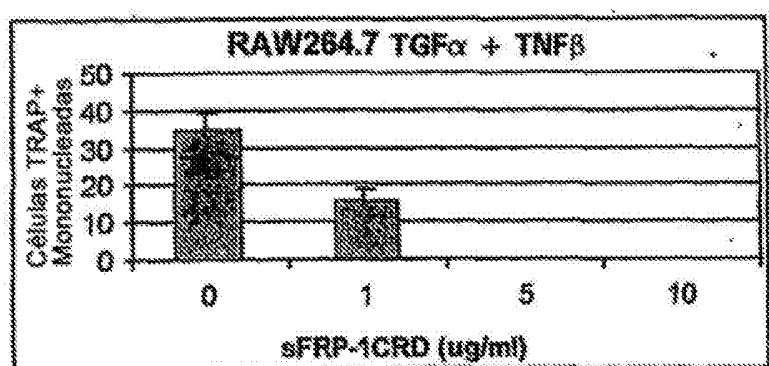


FIG.14A

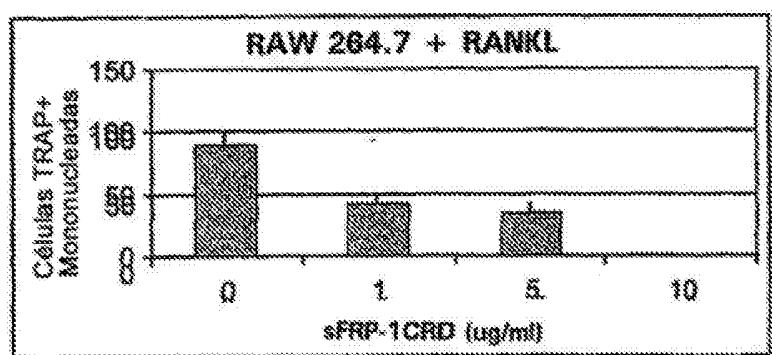


FIG. 14B

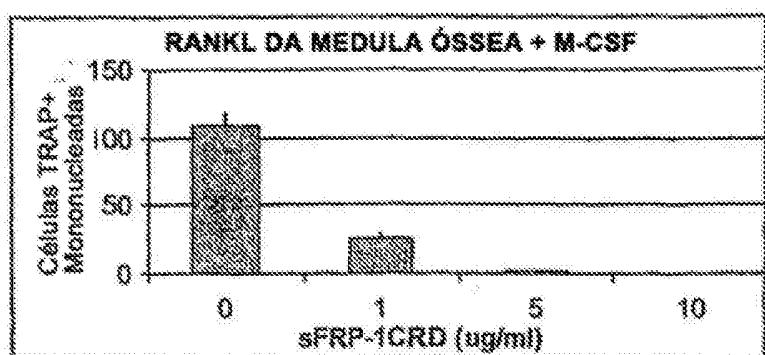


FIG. 14B

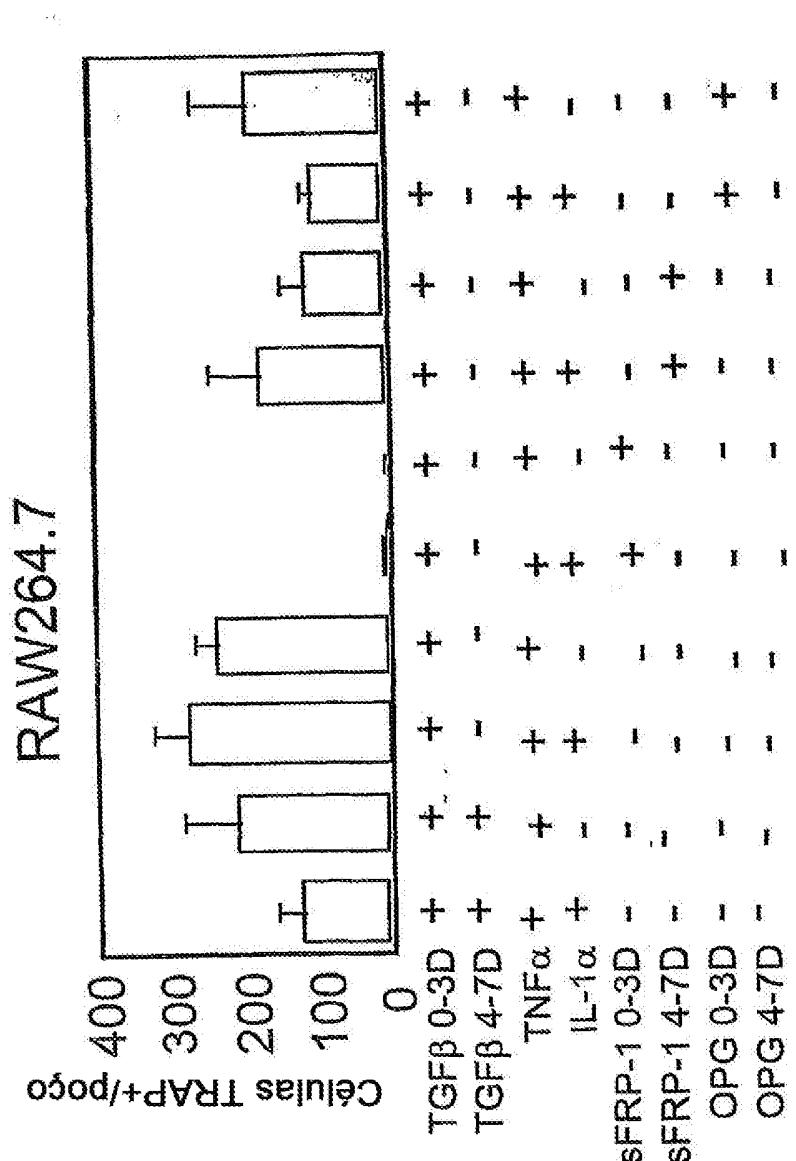


FIG. 15

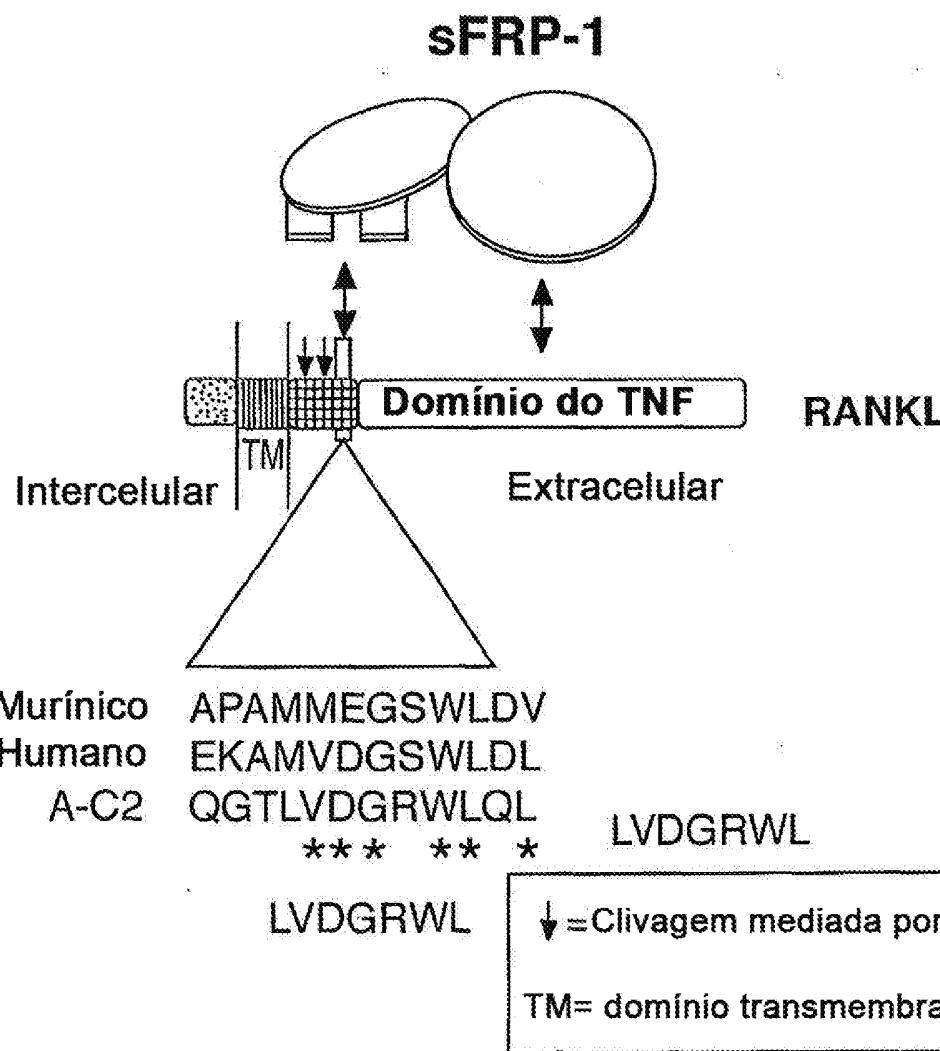


FIG. 16

FIG. 17

