

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLUVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1999-3598**
(22) Přihlášeno: **15.04.1998**
(30) Právo přednosti: **16.04.1997 US 08/842842**
23.06.1997 US 08/880855
30.03.1998 US 09/052521
(40) Zveřejněno: **16.02.2000**
(Věstník č. 2/2000)
(47) Uděleno: **08.12.2010**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **19.01.2011**
(Věstník č. 3/2011)
(86) PCT číslo: **PCT/US1998/007584**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1998/046751**

(11) Číslo dokumentu:

302 262

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/12	(2006.01)
C12N 15/11	(2006.01)
C12N 1/21	(2006.01)
C12N 5/10	(2006.01)
C07K 14/705	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
G01N 33/50	(2006.01)
G01N 33/577	(2006.01)
G01N 33/68	(2006.01)
A61K 31/70	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61P 19/08	(2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 98/28426; WO 98/25958.

Jimi E. et al.: „Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact“, Endocrinology. Vol. 137(8), 2187-2190, 1996.

(73) Majitel patentu:

AMGEN INC., Thousand Oaks, CA, US

(72) Původce:

Boyle William J., Moorpark, CA, US

(74) Zástupce:

Dr. Karel Čermák, Národní třída 32, Praha 1, 11000

(54) Název vynálezu:

**Izolovaná nukleová kyselina, polypeptid
kódovaný touto nukleovou kyselinou, expresní
vektor obsahující tuto nukleovou kyselinu,
hostitelská buňka transfekovaná tímto
expresním vektorem, izolovaný protein vázající
osteoprotegerin, protilátka vázající protein
vázající osteoprotegerin, způsob detekce
přítomnosti proteinu vázajícího
osteoprotegerin, způsob vyhodnocení
schopnosti testované sloučeniny a použití této
sloučeniny jako modulátoru**

(57) Anotace:

Nový polypeptid, protein vázající osteoprotegerin, který se podílí na zrání osteoklastů, byl identifikován na základě jeho afinity k osteoprotegerinu. Popisují se také sekvence nukleových kyselin kódující polypeptid, nebo jeho fragment, analog či derivát, vektory a hostitelské buňky a způsoby pro přípravu proteinu vázajícího osteoprotegerin, a také vazebné testy. Dále se poskytují přípravky k léčení nemocí kostí jako je osteoporóza, ztráty kostní hmoty v důsledku artritidy nebo metastáz, hyperkalcémie nebo Pagetova nemoc. Popisují se také receptory proteinů vázajících osteoprotegerin. Receptory a jejich agonisté či antagonisté se mohou také užít k léčení nemocí kostí.

CZ 302262 B6

Izolovaná nukleová kyselina, polypeptid kódovaný touto nukleovou kyselinou, expresní vektor obsahující tuto nukleovou kyselinu, hostitelská buňka transfekovaná tímto expresním vektorem, izolovaný protein vázající osteoprotegerin, protilátka vázající protein vázající osteoprotegerin, způsob detekce přítomnosti proteinu vázajícího osteoprotegerin, způsob vyhodnocení schopnosti testované sloučeniny a použití této sloučeniny jako modulátoru

Oblast techniky

Vynález se týká izolované nukleové kyseliny, polypeptidu kódovaného touto nukleovou kyselinou, expresního vektoru obsahujícího tuto nukleovou kyselinu, hostitelské buňky transfekované tímto expresním vektorem, izolovaného proteinu vázajícího osteoprotegerin, protilátky vázající protein vázající osteoprotegerin, způsobu detekce přítomnosti proteinu vázajícího osteoprotegerin, způsobu vyhodnocení schopnosti testované sloučeniny a použití této sloučeniny jako modulátoru.

Dosavadní stav techniky

Živá kostní tkáň projevuje dynamickou rovnováhu mezi depozicí a resorpcí kosti. Tyto procesy jsou zprostředkovávány dvěma typy buněk: osteoblasty, které vylučují molekuly vytvářející organickou hmotu kosti, a osteoklasty, které podporují rozpouštění kostní hmoty a solubilizaci kostních solí. U mladých jedinců s rostoucími kostmi rychlost kostní depozice je vyšší než rychlost resorpce kosti, zatímco u starších jedinců je rychlost resorpce vyšší než rychlost depozice. V tomto druhém případě zvýšený rozklad kostí vede ke snížení hmotnosti kosti a jejich pevnosti, zvyšuje riziko fraktur a v případě fraktury zpomaluje nebo znemožňuje obnovu kosti.

Osteoklasty jsou velké fygocytující mnohobuněčné buňky, které se tvoří z prekurzorů hematopoietické řady v kostní dřeni. Ačkoliv růst a tvorba zralých funkčních osteoklastů nejsou dosud dostatečně prozkoumány, má se za to, že osteoklasty dozrávají společně s buněčnou řadou monocytů/makrofágů pod vlivem řady faktorů podporujících růst. Věří se, že časný vývoj prekurzorových buněk kostní dřene na proosteoklasty je zprostředkován rozpustnými faktory jako jsou nádorový nekrotický faktor α (TNF- α), nádorový nekrotický faktor β (TNF- β), interleukin 1 (IL-1), interleukin 4 (IL-4), interleukin 6 (IL-6) a leukemický inhibiční faktor (LIF). V buněčné kultuře se proosteoklasty vytvářejí v přítomnosti přidaného faktoru stimulujícího kolonie makrofágů (M-CSF). Tyto faktory jsou primárně účinné v raných fázích vývoje osteoklastů. V odborné literatuře není mnoho údajů o polypeptidových faktorech v terminálních stádiích vývoje osteoklastů. Bylo však publikováno, že parathormon stimuluje tvorbu a aktivitu osteoklastů a že kalcitonin má protichůdný účinek, avšak v menším rozsahu.

Nedávno byl popsán nový polypeptidový faktor nazvaný osteoprotegerin (OPG), který negativně reguluje tvorbu osteoklastů *in vitro* a *in vivo* (viz patentová přihláška US 08/577 788 podaná 22. prosince 1995, US 08/706 945 podaná 3. září 1996 a US 08/771 777 podaná 20. prosince 1996, dosud v řízení, a publikace PCT přihlášky WO96/26271). OPG dramaticky zvyšuje hustotu kosti u transgenických myší exprimujících polypeptid OPG a snižuje ztráty kostní hmoty, pokud se podává krysám po ovariektomii. Analýza aktivity OPG při tvorbě osteoklastů *in vitro* ukázala, že OPG nijak nepůsobí na růst a diferenciaci prekurzorů monocytů/makrofágů, ale spíše blokuje diferenciaci osteoklastů z prekurzorů monocytů/makrofágů. Takže OPG zřejmě specificky reguluje rozsah tvorby osteoklastů.

OPG obsahuje dvě polypeptidové domény, které mají odlišné strukturní a funkční vlastnosti. Aminokoncová doména obsahující přibližně aminokyselinové zbytky 22 až 194 z celkového polypeptidu (N-koncový methionin je označen 1) vykazuje homologii s jinými členy rodiny receptorů nádorového nekrotického faktoru (TNFR), zejména TNFR-2, zejména v konzervativní

vlastnosti domén bohatých na cystein, což je charakteristické pro členy rodiny TNFR. Doména karboxylového konce zaujímající aminokyselinové zbytky 194 až 401 neprojevuje významnou homologii s žádnou známou sekvencí. Narozdíl od mnoha dalších členů rodiny TNFR se zdá, že OPG je výlučně secernovaný protein a není zřejmě syntetizován ve formě asociované s membránou.

Na základě jeho aktivity jako negativního regulátoru tvorby osteoklastů se předpokládá, že OPG váže polypeptidový faktor účastnící se diferenciaci osteoklastů, a tím blokuje jeden nebo několik terminálních kroků, které vedou k tvorbě zralých osteoklastů.

Bylo proto cílem předkládaného vynálezu identifikovat polypeptidy, které interagují s OPG. Uvedené polypeptidy mohou hrát významnou roli při zrání osteoklastů a mohou být užitečné při léčení nemocí kostí.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je izolovaná nukleová kyselina zvolená ze souboru zahrnujícího:

a) nukleovou kyselinu obsahující nukleotidovou sekvenci polypeptid-kódující oblasti podle obr. 1 (sekvence i.č. 1) nebo obr. 4 (sekvence i.č. 3);

b) nukleovou kyselinu kódující protein vázající osteoprotegerin podle obr. 1 (sekvence i.č. 2) nebo obr. 4 (sekvence i.č. 4); a

c) nukleovou kyselinu kódující fragment proteinu vázajícího osteoprotegerin podle obr. 1 (sekvence i.č. 2) nebo obr. 4 (sekvence i.č. 4), který váže osteoprotegerin.

Výhodně je nukleovou kyselinou cDNA, genomová DNA, syntetická DNA nebo RNA.

Předmětem vynálezu je rovněž polypeptid, který je kódován uvedenou nukleovou kyselinou.

Výhodně nukleová kyselina zahrnuje jeden nebo více kodonů výhodných pro expresi v *Escherichia coli*.

Výhodně má nukleová kyselina na sebe navázanou detekovatelnou značku.

Výhodně nukleová kyselina kóduje polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci zbytků 1–316 nebo zbytků 70–316 podle obr. 1 (sekvence i.č. 2).

Výhodně nukleová kyselina kóduje polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci zbytků 1–317 nebo zbytků 69–317 podle obr. 4 (sekvence i.č. 4).

Výhodná je nukleová kyselina, ve které fragment obsahuje rozpustnou nebo zkrácenou formu proteinu vázajícího osteoprotegerin.

Výhodně nukleová kyselina kóduje polypeptid obsahující zbytky 69–317 podle obr. 4 (sekvence i.č. 4) a jeho zkrácené verze, které vážou osteoprotegerin.

Předmětem vynálezu je rovněž expresní vektor obsahující uvedenou nukleovou kyselinu.

Výhodný je expresní vektor, ve kterém nukleová kyselina obsahuje oblast kódující polypeptid podle obr. 1 (sekvence i.č. 2) nebo obr. 4 (sekvence i.č. 4).

Předmětem vynálezu je rovněž hostitelská buňka transfekovaná uvedeným expresním vektorem.

Výhodně je hostitelskou buňkou eukaryotická nebo prokaryotická buňka.

Výhodně je hostitelskou buňkou *Escherichia coli*.

5

Předmětem vynálezu je rovněž způsob výroby proteinu vázajícího osteoprotegerin, jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje:

10

kultivaci za vhodných nutričních podmínek hostitelských buněk transformovaných nebo transformovaných uvedenou nukleovou kyselinou; a izolaci polypeptidového produktu exprese nukleové kyseliny.

15

Předmětem vynálezu je rovněž izolovaný protein vázající osteoprotegerin obsahující aminokyselinovou sekvenci podle obr. 1 (sekvence i.č. 2) nebo obr. 4 (sekvence i.č. 4) nebo jeho fragment, který váže osteoprotegerin.

Výhodně protein obsahuje aminokyselinovou sekvenci podle obr. 4 (sekvence i.č. 4).

20

Výhodně je proteinem rozpustný protein vázající osteoprotegerin.

Výhodně je protein kovalentně modifikován polymerem rozpustným ve vodě.

Výhodně je polymerem polyethylenglykol.

25

Výhodně protein obsahuje aminokyselinovou sekvenci ze zbytků 70–316 včetně podle obr. 1 (sekvence i.č. 2) nebo její fragment, který váže osteoprotegerin.

30

Výhodně protein obsahuje aminokyselinovou sekvenci ze zbytků 69–317 včetně podle obr. 4 (sekvence i.č. 4) nebo její fragment, která váže osteoprotegerin.

Předmětem vynálezu je rovněž protilátka nebo její fragment, která specificky váže protein vázající uvedený osteoprotegerin.

35

Výhodně je protilátkou monoklonální protilátka.

Výhodně je protilátkou rekombinantní protilátka.

Výhodně je protilátkou chimerická nebo CDR–roubovaná protilátka.

40

Výhodně je protilátkou lidská protilátka.

Výhodně je protilátkou antagonistu proteinu vázajícího osteoprotegerin, který snižuje tvorbu osteoklastů.

45

Výhodně se protilátka váže k extracelulární doméně proteinu vázajícího osteoprotegerin sekvence i.č. 4 nebo k fragmentu extracelulární domény proteinu vázajícího osteoprotegerin sekvence i.č. 4.

50

Předmětem vynálezu je způsob detekce přítomnosti proteinu vázajícího osteoprotegerin v biologickém vzorku, jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje:

– inkubaci vzorku s uvedenou protilátkou in vitro za podmínek, které umožňují vázání protilátky k proteinu vázajícího osteoprotegerin; a

55

– detekci vázané protilátky.

Předmětem vynálezu je rovněž způsob detekce přítomnosti osteoprotegerinu v biologickém vzorku, jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje:

- 5 – inkubaci vzorku s proteinem vázajícím osteoprotegerin obsahujícím aminokyselinovou sekvenci podle obr. 1 (sekvence i.č. 2) nebo obr. 4 (sekvence i.č. 4) nebo její fragment vázající osteoprotegerin in vitro za podmínek, které umožňují vázání proteinu k osteoprotegerinu; a
- měření vazby proteinu vázajícího osteoprotegerin.

10 Předmětem vynálezu je rovněž způsob vyhodnocení schopnosti testované sloučeniny vázat se na protein vázající osteoprotegerin, jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje:

- 15 – inkubaci proteinu vázajícího osteoprotegerin obsahujícího aminokyselinovou sekvenci podle obr. 1 (sekvence i.č. 2) nebo obr. 4 (sekvence i.č. 4) nebo její fragment, který váže osteoprotegerin, s testovanou sloučeninou in vitro za podmínek, které umožňují uvedenou vazbu; a
- měření vázané sloučeniny.

20 Výhodně je sloučeninou agonista nebo antagonistu proteinu vázajícího osteoprotegerin.

Předmětem vynálezu je rovněž použití nukleové kyseliny komplementární k nukleové kyselině podle obr. 1 (sekvence i.č. 1) nebo obr. 4 (sekvence i.č. 3) pro přípravu léčiva pro regulaci exprese proteinu vázajícího osteoprotegerin.

25 Výhodně protein obsahuje aminokyselinovou sekvenci ze zbytků 158–317 podle obr. 4 (sekvence i.č. 4).

30 Výhodně uvedený protein obsahuje aminokyselinovou sekvenci ze zbytků 140–317 podle obr. 4 (sekvence i.č. 4).

Předmětem vynálezu je rovněž způsob vyhodnocení schopnosti testované sloučeniny zvyšovat nebo snižovat míru vazby proteinu vázajícího osteoprotegerin k osteoklastovému diferenciačnímu a aktivačnímu receptoru, jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje:

- 35 – inkubaci proteinu vázajícího osteoprotegerin obsahujícího aminokyselinovou sekvenci podle obr. 1 (sekvence i.č. 2) nebo obr. 4 (sekvence i.č. 4) nebo její fragment, analog nebo derivát, osteoklastového diferenciačního a aktivačního receptoru obsahujícího aminokyselinovou sekvenci podle obr. 10 (sekvence i.č. 43) nebo její lidský homolog nebo fragment, analog nebo derivát
- 40 a případně testované sloučeniny za podmínek umožňujících vazbu proteinu vázajícího osteoprotegerin k osteoklastovému diferenciačnímu a aktivačnímu receptoru; a
- měření vazby proteinu vázajícího osteoprotegerin k osteoklastovému diferenciačnímu a aktivačnímu receptoru v nepřítomnosti nebo přítomnosti testované sloučeniny.

45 Předmětem vynálezu je rovněž použití sloučeniny jako modulátoru proteinu vázajícího osteoprotegerin pro přípravu léčiva pro prevenci nebo léčení nemoci kostí, při kterém je sloučeninou protilátka nebo její fragment, který váže OPGbp podle obr. 4 (sekvence i.č. 4) a je antagonistou OPGbp.

50 Výhodně je protilátkou monoklonální protilátka nebo její fragment.

Výhodně je protilátkou rekombinantní protilátka nebo její fragment.

55 Výhodně je protilátkou chimerická protilátka nebo CDR–roubovaná protilátka.

Výhodně je protilátkou lidská protilátka nebo její fragment.

5 Výhodně se protilátka nebo její fragment váže k extracelulární doméně OPGbp nebo se váže k fragmentu extracelulární domény OPGbp.

Výhodně se protilátka nebo její fragment váže na s membránou sdruženou formu OPGbp.

10 Výhodně se protilátka nebo její fragment váže k rozpustné formě OPGbp.

Výhodně je uvedená sloučenina použita v kombinaci s farmaceuticky přijatelným ředidlem, nosičem, solubilizačním činidlem, emulgačním činidlem, konzervačním činidlem a/nebo adjuvantem.

15 Výhodně použití dále zahrnuje podání jednoho nebo více kostního morfogenního faktoru, zvoleného ze souboru zahrnujícího BMP-1 až BMP-12, transformačního růstového faktoru beta, členu skupiny transformačního růstového faktoru beta, fibroblastového růstového faktoru zvoleného ze souboru zahrnujícího FGF-1 až FGF-10, inhibitoru interleukinu-1, inhibitoru TNF alfa, parathyroidálního hormonu, prostaglandinu řady E, bifosfonátu nebo minerálu zlepšujícího stav kostí.

20 Výhodně je nemoc kostí zvolena ze souboru zahrnujícího osteoporózu, osteomyelitidu, hyperkalcemii, osteopenii sdruženou s chirurgickým zákrokem, Pagetovu nemoc, osteonekrózu, úbytek kostní hmoty v důsledku revmatoidní artritidy, periodontální úbytek kostní hmoty, protetické uvolňování a osteolytickou metastázu.

25 Byl identifikován nový člen z rodiny nádorového nekrotického faktoru, a sice z cDNA knihovny exprimované v buňkách COS screeningem s rekombinantním fúzním proteinem OPG-Fc jakožto afinitní sondou. Nový protein je transmembránový protein vázající OPG, který je dle predikce dlouhý 316 aminokyselin a má aminokoncovou cytoplazmatickou doménu, transmembránovou doménu a extracelulární doménu na karboxylovém konci. Protein vázající OPG podle vynálezu je
30 buďto protein asociovaný s membránou, nebo rozpustný protein.

35 Předkládaný vynález poskytuje nukleovou kyselinu, která kóduje protein vázající OPG, vektory a hostitelské buňky exprimující polypeptid, a také způsob přípravy rekombinantního proteinu vázajícího OPG. Také poskytuje protilátky nebo jejich fragmenty, které se specificky váží na protein vázající OPG.

40 Protein vázající OPG lze užít v testech ke kvantifikaci hladiny OPG v biologických vzorcích, k identifikaci buněk a tkání, které mají protein vázající OPG, a také k identifikaci nových členů rodiny proteinů OPG a proteinů vázajících OPG. Vynález také poskytuje způsoby identifikace sloučenin, které interagují s proteinem vázajícím OPG. K takovým sloučeninám patří nukleové kyseliny, peptidy, proteiny, sacharidy, lipidy nebo organické molekuly s malou molekulovou hmotností, které mohou působit buďto jako agonisté, nebo antagonisté aktivity proteinů vázajících OPG.

45 Proteiny vázající OPG se účastní diferenciace osteoklastů a míra aktivity osteoklastů zase moduluje resorpci kosti. Agonisté a antagonisté proteinu vázajícího OPG tedy modulují tvorbu osteoklastů a resorpci kosti a mohou se tedy užít k léčení nemocí kostí se změnami resorpce kosti jako je např. osteoporóza, hyperkalcémie, ztráta kosti díky artritickým metastázám, imobilizace nebo nemoci periostu, Pagetova nemoc, osteopetróza, ztráty způsobené protézou a pod. Farmaceutické
50 přípravky obsahující proteiny vázající OPG a agonisty a antagonisty proteinů vázajících OPG jsou také předmětem vynálezu.

Receptory pro proteiny vázající OPG byly také identifikovány z myši cDNA knihovny zkonstruované z buněk kostní dřene, které se vážaly na fluorescenčně označené proteiny vázající OPG.

Receptory se mohou užít k identifikaci agonistů a antagonistů interakce proteinů vázajících OPG s jejich receptory, což může být využito k léčení nemocí kostí.

5 Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1. Struktura a sekvence inzertu 32D–F3 kódujícího protein vázající OPG. Podtrženy jsou predikovaná transmembránová doména a místa pro sacharidové řetězce vázané na asparagin.

10 Obr. 2 Exprese proteinu vázajícího OPG v buňkách COS–7 transfekovaných pcDNA/32D–F3. Buňky byly transfekovány pcDNA/32D–F3 za pomoci lipofektinu a pak podrobeny testu na vazbu s kozí antihumánní IgG1 konjugovanou s alkalickou fosfatázou (sekundární samotná), humánní OPG (22–201)–Fc a sekundární (OPG–Fc) nebo chimérickým fúzním proteinem extracelulární doména ATAR–Fc (sATAR–Fc). ATAR je nový člen superrodiny TNFR a fúzní protein sATAR–Fc sloužil jako kontrola jak pro vazbu humánní domény IgG1–Fc, tak pro vazbu generického proteinu příbuzného TNFR k molekule buněčného povrchu 32D.

Obr. 3. Exprese proteinu vázajícího OPG v lidských tkáních. Analýza mRNA lidských tkání (Clontech) northernovým přenosem pomocí radioaktivně značené hybridizační sondy 32D–F3. 20 Relativní molekulová hmotnost je uvedena vlevo v tisících párů bází (kb). Šipka na pravé straně ukazuje migraci transkriptu o velikosti asi 2,5 kb detekovaného v mRNA z lymfatických uzlin. Také ve fetálních játrech byl detekován velmi slabý pás stejné velikosti.

Obr. 4: Struktura a sekvence inzertu pcDNA/huOPGbp 1.1 kódujícího humánní protein vázající OPG. Podtrženy jsou predikovaná transmembránová doména a místa pro sacharidové řetězce vázané na asparagin

Obr. 5 Stimulace vývoje osteoklastů *in vitro* ze společných kultur makrofágů kostní dřeně a buněk ST2 ošetřených rekombinantním myším proteinem vázajícím OPG (158–3176). Kultury 30 byly ošetřeny rekombinantním myším proteinem vázajícím OPG v různých koncentracích od 1,6 do 5600 ng/l. Po 8 až 10 dnech byly kultury lyzovány a byla měřena aktivita TRAP. Kromě toho byly některé kultury simultánně ošetřeny 1, 10, 100, 500 a 1000 ng/l rekombinantního proteinu myší OPG (22–401)–Fc. Myší protein vázající OPG indukoval stimulaci tvorby osteoklastů závislou na dávce, zatímco OPG (22–401)–Fc inhiboval tvorbu osteoklastů.

Obr. 6. Stimulace *in vitro* vývoje osteoklastů z prekursorů v kostní dřeni v přítomnosti M–CSF a myšího proteinu vázajícího OPG (158–316). Kostní dřeň myší byla odebrána a kultivována v přítomnosti 250, 500, 1000 a 2000 U/ml M–CSF. Ke stejným kulturám byl přidán protein vázající OPG v různých koncentracích, od 1,6 do 500 ng/ml. Vývoj osteoklastů byl měřen pomocí testu TRAP.

Obr. 7. Osteoklasty odvozené z buněk kostní dřeně v přítomnosti jak M–CSF tak proteinu vázajícího OPG(158–316) resorbují kost *in vitro*. Buňky kostní dřeně ošetřené buďto M–CSF, nebo proteinem vázajícím OPG nebo oběma faktory současně, byly vysety na plátky kosti v jamkách 45 kultivačních destiček a byly ponechány, aby se vyvinuly ve zralé osteoklasty. Výsledné kultury byly obarveny toluidinovou modří (levý sloupec) nebo histochemickým barvením pro detekci enzymové aktivity TRAP (pravý sloupec). V kultuře ošetřené oběma faktory se tvořily zralé osteoklasty, které byly schopny erodovat kost, jak lze soudit podle modře zbarvených jamek na povrchu kosti. To korelovalo s přítomností značného počtu velkých mnohojaderných buněk pozitivních na TRAP.

Obr. 8. Graf ukazuje hladinu ionizovaného kalcia (iCa) v krvi u myší injikovaných proteinem vázajícím OPG, a sice 51 hodin po první injekci, a myší, kterým se také podával konkurenční OPG. Protein vázající OPG významně zvýšil hladinu iCa způsobem závislým na dávce. OPG 55 (1 mg/kg/den) zcela blokoval zvýšení iCa v dávce proteinu vázajícího OPG 5 µg/den, a částečně

blokoval zvýšení v dávce OPG 25 µg/den (*) rozdíl ve srovnání s kontrolou léčenou jen vehikulem ($p < 0,05$), (#) hladina iCA po podávání OPG se průkazně liší od hladiny u myši, které dostávaly jen samotnou dávku proteinu vázajícího OPG ($p < 0,05$).

5 Obr. 9. Radiografie levého femuru a tibie myši, kterým byl podáván protein vázající OPG v dávkách 0, 5, 25 nebo 100 µg/den po 3,5 dne. Je patrné snížení hustoty kosti závislé na dávce, viditelné nejzřetelněji v proximální metafýze tibie a zcela pronikavé při dávce 100 µg/den.

10 Obr. 10. Sekvence ODAR cDNA myši a příslušná proteinová sekvence. Je zde ukázána sekvence cDNA klonu velikosti asi 2,1 kb a translace otevřeného čtecího rámce 625 aminokyselinových zbytků. Hydrofobní signální peptid je podtržen a hydrofobní transmembránová sekvence (zbytky 214 až 234) jsou uvedeny tučně. Cysteinové zbytky obsažené v opakovaných motivech bohatých na cystein v extracelulární doméně jsou také tučně.

15 Obr. 11. Imunofluorescenční značení vazby ODAR-Fc na buňky transfekované proteinem vázajícím OPG. Buňky COS-7 transfekované expresním plazmidem proteinu vázajícího OPG byly inkubovány s lidským IgG Fc (horní panel), ODAR-Fc (střední panel) nebo OPG-Fc (spodní panel). Jako sekundární protilátka byla užita kozí anti-humánní IgG Fc značená FITC. Pozitivně navázané buňky byly vyšetřeny konfokálním mikroskopem.

20 Obr. 12. Účinek ODAR-Fc na tvorbu osteoklastů v kostní dřeni myši *in vitro*. Kultury z myši kostní dřeni byly založeny jak bylo popsáno v příkladu 8 a exponovány proteinu vázajícímu OPG (5 mg/ng/ml) a CSF-1 (30 ng/ml). Byly přidány různé koncentrace ODAR-Fc od 1500 do 65 ng/ml. Tvorba osteoklastů byla vyhodnocena cytochemickým stanovením TRAP a testem TRAP po 5 dnech v kultuře.

30 Obr. 13. Denzita kostního minerálu u myši po 4 denním podávání ODAR-Fc v různých dávkách. Myši dostávaly ODAR-Fc denně v subkutánní injekci ve vehikulu s fosfátem pufrovaným fyziologickým roztokem. Minerální denzita byla stanovena z kostí fixovaných v 70% ethanolu v úrovni proximální tibiální metafýzy pomocí kvantitativní počítačové tomografie (pQCT) zařízením XCT-960M (Norland Medical Systems, F. Atkinson, WI). Dva 0,5 mm příčné řezy kosti, 1,5 a 2,0 mm od proximálního konce tibie byly analyzovány (XMICE 5,2, Stratec, Germany) ke stanovení celkové denzity kostního minerálu v metafýze. Pro definici hranice metafýzy kosti byl 35 užít práh separace měkké tkáně 1500. ODAR-Fc vedl k významnému zvýšení denzity kostního minerálu v proximální tibiální metafýze způsobem závislým na dávce. Skupina obsahovala 4 objekty ($n=4$).

40 Detailní popis vynálezu

Vynález poskytuje polypeptid označovaný jako protein vázající OPG, který specificky váže OPG a účastní se diferenciace osteoklastů. Klon cDNA kódující myši formu polypeptidu byl identifikován v knihovně připravené z linie myších myelomonocytů 32-D a byl transfekován do buněk COS. Buňky po transfekci (transfektanty) byly podrobeny screeningu na schopnost vázat fúzní 45 polypeptid OPG (22-201)-Fc (Příklad 1). Sekvence nukleové kyseliny odhalila, že protein vázající OPG je nový člen rodiny TNF a je nejbližší příbuzný AGP-1, což je polypeptid popsáný v patentové přihlášce US 08/660 562 podané 7. června 1995, která je v řízení (Polypeptid identický s AGP-1 byl také popsán jako TRAIL ve Wiley et al., Immunity 3: 673-682, 1995). Předpokládá se, že protein vázající OPG je transmembránový protein typu II, který má cyto- 50 plazmatickou doménu na svém aminokonci, transmembránovou doménu a extracelulární doménu na karboxylovém konci (Obr. 1). Aminokoncová cytoplazmatická doména obsahuje aminokyselinové zbytky 1-48, transmembránová doména zbytky 49-69 a extracelulární doména zbytky 70-316 jak je ukázáno na obr. 1 (sekvence identifikačního čísla 1). Protein asociovaný s membránou specificky váže OPG (obr. 2). Takže OPG a protein vázající OPG mají mnoho typických

vlastnosti páru receptor–ligand, ačkoliv je možné, že existují i jiné přirozeně se vyskytující receptory pro protein vázající OPG.

5 Klon kódující lidský protein vázající OPG byl izolován z cDNA knihovny lymfatických uzlin. Lidská sekvence (Obr. 4) je homologní k myší sekvenci. Purifikovaný myší protein vázající OPG stimuloval tvorbu osteoklastů *in vitro* a indukoval hyperkalcemii a resorpci kosti *in vivo*.

Protein vázající OPG označuje polypeptid, který má aminokyselinovou sekvenci savčího proteinu vázajícího OPG, nebo jeho fragment nebo jeho analog nebo derivát, mající alespoň vazebnou aktivitu k OPG. Ve výhodném provedení vynálezu je protein vázající OPG myší nebo lidský protein. V jiném provedení vynálezu je protein vázající OPG rozpustný protein mající v jedné formě izolovanou extracelulární doménu oddělenou od cytoplazmatické a transmembránové domény. Protein vázající OPG se účastní diferenciaci osteoklastů a ovlivňuje rychlost a rozsah resorpce kosti, a bylo také zjištěno, že stimuluje tvorbu osteoklastů a resorpci kosti.

15

Nukleové kyseliny

Předkládaný vynález poskytuje izolované nukleové kyseliny kódující proteiny vázající OPG. Termín „nukleové kyseliny“ v textu přihlášky zahrnuje cDNA, genomovou DNA, plně nebo
20 částečně syntetickou DNA a také RNA. Nukleové kyseliny podle předkládaného vynálezu jsou vybrány ze skupiny obsahující:

- a) nukleovou kyselinu uvedenou na obr. 1 (sekvence i. č. 1) a na obr. 4 (sekvence i. č. 2),
- 25 b) nukleovou kyselinu, která hybridizuje s polypeptid kódujícím úsekem nukleových kyselin uvedených na obr. 1 (sekvence i. č. 1) a na obr. 4 (sekvence i. č. 2), a zůstává hybridizována k nukleovým kyselinám i ve vysoce stringentních (přísných) podmínkách, a
- c) nukleové kyseliny degenerované vzhledem k nukleovým kyselinám v a) nebo b).

30

Hybridizace nukleových kyselin typicky zahrnuje mnohakrokový proces, který obsahuje první hybridizační krok, kdy se vytvoří duplex nukleové kyseliny z jednoduchých řetězců, a poté následuje druhý hybridizační krok, prováděný za přísnějších (více stringentních) podmínek, aby se selektivně udržely jen ty duplexy DNA, které mají požadovanou homologii. Podmínky prvního hybridizačního kroku obecně nejsou rozhodující, za předpokladu, že se první hybridizace neprovádí v přísnějších podmínkách než druhý hybridizace. Obecně se druhá hybridizace provádí v přísnějších podmínkách, tj. s vysokou stringencí, přičemž termín „vysoká stringence“ znamená takové podmínky teploty a koncentrace solí, které jsou asi 12 až 20 °C pod teplotou tání (T_m) perfektního hybridu částí nebo celého komplementárního řetězce odpovídajícího sekvenci na
40 obr. 1 (sekvence i. č. 1) a na obr. 4 (sekvence i. č. 2). V jednom provedení „vysoká stringence“ znamená podmínky teploty 65 °C a ne vyšší koncentraci než 1M Na⁺. Odborníkovi je zřejmé, že koncentrace solí, teplota a/nebo délka inkubace se mohou měnit v první nebo druhé hybridizaci tak, aby se získaly hybridizující nukleové kyseliny podle vynálezu. Podmínky hybridizaci a výpočet. T_m jsou popsány v Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989).

45

Nukleové kyseliny podle vynálezu hybridizují s celým nebo částí kódujícího úseku sekvence proteinu vázajícího OPG uvedeného na obr. 1 (sekvence i. č. 1) a na obr. 4 (sekvence i. č. 2), a tudíž mohou existovat zkrácené verze nebo naopak prodloužené verze uvedených sekvencí nukleových
50 kyselin. Zkrácené nebo naopak prodloužené nukleové kyseliny jsou také předmětem předkládaného vynálezu, za předpokladu, že si uchovávají alespoň vlastnost vázat OPG. V jednom provedení vynálezu nukleová kyselina kóduje polypeptid obsahující alespoň 10 aminokyselin. V jiném provedení vynálezu nukleová kyselina kóduje polypeptid obsahující alespoň 20 aminokyselin. V ještě dalším provedení vynálezu nukleová kyselina kóduje polypeptid obsahující alespoň
55 50 aminokyselin. Hybridizující sekvence nukleové kyseliny může také obsahovat nekódující

sekvence lokalizované na 3'- a/nebo 5'-konci úseku kódujícího protein vázající OPG. Nekódující sekvence obsahují regulační úseky účastnící se exprese proteinu vázajícího OPG, jako jsou promotory, zesilovací úseky (enhancery), místa počátku translace, místa terminace translace a pod.

5

Ve výhodném provedení vynálezu nukleové kyseliny kódují myší nebo lidský protein vázající OPG. Nukleové kyseliny kódují buďto formu proteinu vázajícího OPG vázanou na membránu, nebo rozpustnou formu, která postrádá funkční transmembránovou oblast. Predikovaný transmembránový úsek myšího proteinu vázajícího OPG zahrnuje aminokyselinové zbytky 49–69 včetně, jak je ukázáno na obr. 1 (sekvence i. č. 1). Predikovaný transmembránový úsek lidského proteinu vázajícího OPG zahrnuje aminokyselinové zbytky 49–69 včetně, jak je ukázáno na obr. 4 (sekvence i. č. 2). Lze předpokládat, že substituce, které vedou k náhradě hydrofobního aminokyselinového zbytku v tomto úseku neutrálním nebo hydrofobním aminokyselinovým zbytkem, zruší asociaci s membránou a povedou ke vzniku rozpustného proteinu vázajícího OPG. Kromě toho lze také předpokládat, že delece části nebo celého transmembránového úseku povedou také ke vzniku aminokyselinové zbytky 70–316 podle obr. 1 (sekvence i. č. 1), nebo jejich fragmenty či analogy, představují rozpustné proteiny vázající OPG.

20

Nukleové kyseliny kódující zkrácené formy lidského rozpustného proteinu vázajícího OPG jsou také předmětem vynálezu. Rozpustné formy obsahují aminokyselinové zbytky 69 – 317 sekvence uvedené na obr. 4 (sekvence i. č. 2) a její zkrácené formy. V jednom provedení zkrácení na N-konci vede ke vzniku polypeptidů obsahujících aminokyselinové zbytky 70 – 317, 71 – 317, 72 – 317 atd. V jiném provedení vynálezu nukleové kyseliny kódují rozpustný protein vázající OPG obsahující aminokyselinové zbytky 69 – 317 a jeho verzi zkrácenou na N-konci obsahující aminokyselinové zbytky 158 – 317 nebo alternativně 166 – 317.

25

Plazmid phuOPGbp 1.1. kódující lidský protein vázající OPG v *E.coli* kmene DH10 byl uložen v Americké sbírce mikroorganismů (American Type Culture Collection, Rockville, MD) dne 13 června 1997.

30

Nukleové kyseliny podle vynálezu se mohou užít k detekci sekvencí kódujících protein vázající OPG v biologických vzorcích. Zvláště se sekvence mohou užít k vyhledávání sekvencí příbuzných proteinu vázajícímu OPG v knihovnách cDNA a genomové DNA, zejména z jiných biologických druhů. Nukleové kyseliny podle vynálezu jsou také vhodné k modulování hladiny proteinu vázajícího OPG pomocí tzv. „antisense“ technologie nebo genové exprese *in vivo*. Vývoj transgenních zvířat exprimujících protein vázající OPG je užitečný pro přípravu polypeptidu a také pro zkoumání biologické aktivity tohoto polypeptidu *in vivo*.

35

Vektory a hostitelské buňky

40

Nukleové kyseliny podle vynálezu jsou spojeny s jinými sekvencemi DNA tak, aby exprimovaly biologicky aktivní protein vázající OPG. Sekvence potřebné pro expresi jsou v oboru známy a patří k nim promotory a enhancery pro iniciaci syntézy RNA, místa terminace translace, vazebná místa ribosomů pro iniciaci translace a tzv. vedoucí sekvence, které umožňují sekreci. Sekvence řídící expresi a sekreci proteinu vázajícího OPG mohou být homologní, tj. sekvence identické nebo podobné sekvencím v genomu vedoucím k expresi a sekreci proteinu vázajícího OPG, nebo jsou to sekvence heterologní. Pro expresi proteinu vázajícího OPG je k dispozici celá řada plazmidových vektorů (viz např. *Methods in Enzymology*, vol. 185, Goeddel, D. V. (ed.), Academic Press, 1990). Pro expresi v savčí hostitelské buňce je výhodné provedení plazmid pDSRα popsáný v přihlášce PCT 90/14363. Výhodné provedení pro expresi v bakteriální hostitelské buňce obsahuje plazmidy nesoucí promotor lux (viz patentová přihláška US 08/577 778, podaná 22. prosince 1995, nyní v řízení).

50

Vynález také poskytuje prokaryotické nebo eukaryotické hostitelské buňky, které exprimují protein vázající OPG. K hostitelským buňkám patří bakteriální, kvasinkové, rostlinné, hmyzí nebo

55

savčí buňky. Protein vázající OPG může být také produkovan v transgenních zvířatech jako jsou myši nebo kozy. Plazmidy a vektory obsahující nukleové kyseliny podle vynálezu se vloží do vhodných hostitelských buněk pomocí transfekce nebo transformace způsobem, který je odborníkovi znám. Hostitelské buňky obsahují sekvence DNA kódující protein vázající OPG podle obr. 1 nebo jeho část, jako je např. extracelulární doména nebo cytoplazmatická doména. Nukleové kyseliny podle vynálezu se mohou modifikovat záměnou kodonů, které umožní optimální expresi v daném hostiteli. Alespoň nějaký z těchto kodonů je tzv. preferenční kodon, který nemění aminokyselinovou sekvenci a nalézá se často v genech, které jsou silně exprimovány. Avšak je zřejmé, že tyto alterace kodonů pro optimalizaci exprese nejsou omezeny na vložení preferenčních kodonů. K příkladům výhodných savčích hostitelských buněk pro expresi proteinu vázajícího OPG patří buňky COS, CHO–, 293 a 3T3, přičemž tento výčet není omezující. Výhodné bakteriální hostitelské buňky jsou *E. coli*.

Polypeptidy

Předkládaný vynález poskytuje protein vázající OPG jako produkt prokaryotické nebo eukaryotické exprese exogenní sekvence DNA, tzn. protein vázající OPG je rekombinantní protein vázající OPG. K exogenním sekvencím patří sekvence cDNA, genomové DNA a syntetické DNA. Protein vázající OPG může být produkt exprese v bakteriální, kvasinkové, rostlinné, hmyzí nebo savčí buňce nebo se může produkovat v bezbuněčných translačních systémech. Protein vázající OPG produkovaný v bakteriích má N–koncový methioninový zbytek.

Vynález dále poskytuje způsob přípravy proteinu vázajícího OPG, který obsahuje kroky, kdy se kultivují prokaryotické nebo eukaryotické hostitelské buňky transformované nebo transfekované nukleovými kyselinami kódujícími protein vázající OPG a izoluje se polypeptidový expresní produkt těchto nukleových kyselin.

Polypeptidy, které jsou savčími proteiny vázajícími OPG nebo jejich fragmenty, analogy nebo deriváty jsou také předmětem předkládaného vynálezu. Ve výhodném provedení je protein vázající OPG lidský protein vázající OPG. Fragment proteinu vázajícího OPG znamená polypeptid, který má delecí jedné nebo několika aminokyselin takové, že výsledný polypeptid má alespoň vlastnost, že váže OPG. Uvedené fragmenty mají delecí začínající z aminokonce, z karboxylového konce nebo jsou deletovány vnitřními úseky polypeptidu. Fragmenty proteinu vázajícího OPG jsou dlouhé přinejmenším 10 aminokyselin, výhodně přinejmenším 20 aminokyselin a ještě výhodněji přinejmenším 50 aminokyselin. Ve výhodném provedení vynálezu protein vázající OPG má delecí jedné nebo několika aminokyselin z transmembránového úseku (aminokyselinové zbytky 49 – 69 podle obr. 1), nebo alternativně jednu nebo několik aminokyselin z aminokoncového úseku až po transmembránový úsek a/nebo včetně tohoto transmembránového úseku (aminokyselinové zbytky 1 – 49 podle obr. 1). V jiném provedení vynálezu je protein vázající OPG rozpustný protein obsahující např. aminokyselinové zbytky 69 – 316 nebo 70 – 316 nebo N–koncové nebo C–koncové zkrácené formy, které si uchovávají vazebnou aktivitu pro OPG. Protein vázající OPG je také lidský rozpustný protein uvedený na obr. 4 obsahující aminokyselinové zbytky 69 – 317, a jeho N–koncové zkrácené formy např. 70 – 517, 71 – 517, 71 – 517, 72 – 517 atd. Ve výhodném provedení rozpustný lidský protein vázající OPG obsahuje aminokyselinové zbytky 69 – 317 a N–koncovou zkrácenou formu proteinu vázajícího OPG (158 – 317) nebo alternativně (166–317).

Analog proteinu vázajícího OPG znamená polypeptid, který má substituci nebo adici jedné nebo několika aminokyselin takové, že výsledný polypeptid má alespoň tu vlastnost, že váže OPG. Uvedené analogy mají adici nebo substituci v libovolném místě polypeptidu. K výhodným analogům patří ty, které představují rozpustné proteiny vázající OPG. Fragmenty nebo analogy mohou být přirozeně se vyskytující, jako jsou např. polypeptidové produkty alelických variant, nebo mohou být zkonstruovány pomocí technik pro manipulace a syntézu nukleových kyselin, které jsou odborníkovi známy. Polypeptidy mohou, ale nemusejí, mít aminokoncový methioninový zbytek.

Vynález také zahrnuje deriváty proteinů vázajících OPG, které jsou polypeptidy, které prošly posttranslačními modifikacemi (např. adice N-vázaného nebo O-vázaného řetězce cukru, opracování N-konce nebo C-konce), připojení chemických zbytků k aminokyselinové kostře, chemické modifikace N-vázaného nebo O-vázaného řetězce cukru a adice N-koncového methioninového zbytku jakožto výsledek exprese v prokaryotické hostitelské buňce. Zvláště lze uvažovat o takových chemicky modifikovaných derivátech proteinů vázajících OPG, které poskytují další výhodnou vlastnost, jako je zvýšená stabilita, delší doba cirkulace, nebo snížená imunogeničnost. Zvláště užitečné jsou modifikace s vodou rozpustnými polymery jako je polyetylén-glykol a jeho deriváty (viz např. Patent US 4 179 337). Chemické skupiny pro derivatizaci se mohou vybrat z ve vodě rozpustných polymerů jako je polyetylén-glykol, kopolymery etylén-glykol/propylén-glykol, karboxymetylcelulóza, dextran, polyvinylalkohol a pod. Polypeptidy se mohou modifikovat v náhodných pozicích uvnitř molekuly nebo na předem určených místech molekuly a mohou obsahovat jednu, dvě nebo více připojených chemických zbytků. Polypeptidy se mohou také modifikovat na předem určeném místě polypeptidu jako je např. aminokonec, nebo na vybraném argininovém nebo lysinovém zbytku polypeptidu. K jiným chemickým modifikacím patří dále detekovatelné značky, jako jsou enzymatické, fluorescenční, izotopové nebo afinitní značky, které slouží k detekci nebo izolaci proteinu.

Vynález také zahrnuje chimérické proteiny vázající OPG, které obsahují část nebo celou aminokyselinovou sekvenci proteinu vázajícího OPG fúзованou s heterologní aminokyselinovou sekvencí. Heterologní sekvence je jakákoliv sekvence, která dovoluje, aby si výsledný protein uchovával alespoň vazebnou aktivitu pro OPG. Ve výhodném provedení vynálezu extracelulární doména karboxylového konce proteinu vázajícího OPG je fúzována s heterologní sekvencí. Takové sekvence zahrnují heterologní cytoplazmatické domény, které dovolují alternativní intracelulární signální událost, sekvence, které podporují oligomerizaci jako úsek Fc z IgG, enzymové sekvence, které poskytují značku polypeptidu, a sekvence, které poskytují afinitní sodu, jako je např. specifická vazba antigen–protilátka.

Polypeptidy podle předkládaného vynálezu se izolují a purifikují z tkání a buněčných linií, které exprimují protein vázající OPG, buďto extrakcí z lyzátů, nebo upravených kultivačních médií a nebo z transformovaných hostitelských buněk exprimujících protein vázající OPG. Protein vázající OPG se může získat z myší myelomonocytové linie 32-D (ATCC č. CRL-11346). Lidský protein vázající OPG nebo nukleová kyselina kódující tento protein mohou být izolovány z lidských lymfatických uzlin nebo z tkáně fetálních jater. Izolovaný protein vázající OPG není asociován s jinými lidskými proteiny ani jinými složkami buňky.

Předmětem vynálezu je také způsob purifikace proteinu vázajícího OPG z přirozených zdrojů (např. tkání a buněčných linií, které normálně exprimují protein vázající OPG) a z transfekovaných hostitelských buněk. Pro získání purifikovaného proteinu je možné využít jeden nebo několik standardních kroků purifikace v odpovídajícím pořadí. K chromatografickým krokům patří iontová výměna, gelová filtrace, hydrofobní interakce, chromatografie s reverzní fází, chromatofokusin, afinitní chromatografie užívající protilátku typu anti-protein vázající OPG nebo afinitní komplex streptavidin–biotin a pod.

Protilátky

Předkládaný vynález zahrnuje také protilátky vázající specificky polypeptidy podle vynálezu. Protilátky lze získat imunizací celým proteinem vázajícím OPG, nebo rozpustnou formou proteinu vázajícího OPG nebo jejich fragmentem. Protilátky podle vynálezu jsou polyklonální nebo monoklonální protilátky, nebo jsou to rekombinantní protilátky, jako jsou např. chimérické protilátky, kde myší konstantní úseky těžkých a lehkých řetězců jsou nahrazeny lidskými sekvencemi, nebo tzv. CDR–roubované protilátky, kde pouze komplementaritu určující úseky jsou myšího původu. Protilátky podle vynálezu mohou být také lidské protilátky připravené např. imunizací transgenních zvířat schopných produkovat lidské protilátky (viz např. patentová přihláška PCT

WO93/12227). Protilátky jsou užitečné pro detekci proteinu vázajícího OPG v biologických vzorcích, což umožňuje identifikaci buněk nebo tkání, které produkují tento protein. Navíc protilátky, které se váží na protein vázající OPG a blokuji tak interakci s jinými vazebnými sloučeninami mohou mít terapeutické využití v modulaci diferenciace osteoklastů a resorpce kosti.

Protilátky proti proteinu vázajícímu OPG jsou užitečné k léčení nemocí kostí jako je osteoporóza nebo Pagetova nemoc. Protilátky se mohou testovat na vazbu k proteinu vázajícímu OPG v přítomnosti nebo nepřítomnosti OPG a tak se může vyšetřovat jejich schopnost inhibovat ligandem (tj. proteinem vázajícím OPG) zprostředkovanou tvorbu osteoklastů a/nebo resorpci kosti. Lze také čekat, že peptidy mohou působit jako antagonisté interakce ligand:receptor a inhibovat ligandem zprostředkovanou tvorbu osteoklastů, a pro tentýž účel lze užít i proteiny vázající OPG.

Přípravky

Předkládaný vynález poskytuje také farmaceutické přípravky, které obsahují terapeuticky účinné množství proteinu vázajícího OPG podle vynálezu společně s farmaceuticky přijatelným ředidlem, povrchově aktivní látku, nosičem, emulgátorem, konzervantem a/nebo adjuvans. Vynález také poskytuje farmaceutický přípravek, který obsahuje terapeuticky účinné množství agonisty nebo antagonisty proteinu vázajícího OPG. Termín „terapeuticky účinné množství“ znamená množství, které vede k terapeutickému účinku za specifických podmínek a způsobu podávání. Přípravek podle vynálezu může být ve formě kapalné nebo lyofilizované a obsahuje rozpouštědla (Tris, acetátový nebo fosfátový pufr) mající různé hodnoty pH a iontové síly, smáčedla, jako je Tween nebo Polysorbate, nosiče, jako je lidský sérový albumin nebo želatina, konzervanty, jako je thimerosal nebo benzylalkohol, a antioxidanty, jako je kyselina askorbová nebo disířičitan sodný. Výběr konkrétního složení závisí na řadě faktorů jako je stav, který se má léčit, způsob podávání a požadované farmakokinetické parametry. Podrobnější přehled vhodných složek pro farmaceutické přípravky lze nalézt v příručce Remington's Pharmaceutical Sciences (18 th ed., A. R. Genaro, ed., Mack, Easton, PA 1980).

Výhodné provedení vynálezu poskytuje přípravky, které obsahují rozpustné proteiny vázající OPG. Vynález zahrnuje také přípravky, které obsahují rozpustné proteiny vázající OPG modifikované vodou rozpustnými polymery pro zvýšení rozpustnosti, plazmatického poločasu a biologické dostupnosti. Přípravky mohou také obsahovat rozpustné proteiny vázající OPG vložené do liposomů, mikroemulzí, micel nebo vesikul pro řízené podávání s dlouhodobým účinkem. Rozpustné proteiny vázající OPG mohou být také formulovány do mikročástic vhodných k pulmonárnímu podávání.

Přípravek podle vynálezu se může podávat injekcí, a sice subkutánní, intravenózní nebo intramuskulární, nebo cestou perorální, nasální, pulmonární nebo rektální. Vybraný způsob podávání nakonec závisí na řadě faktorů a odborník ho snadno určí.

Předkládaný vynález dále poskytuje farmaceutický přípravek, který obsahuje terapeuticky účinné množství nukleových kyselin podle vynálezu společně s farmaceuticky přijatelným adjuvans. Přípravky nukleových kyselin jsou vhodné k podávání buďto části, nebo celé kódující oblasti proteinu vázajícího OPG a/nebo přilehlých úseků do buněk a tkání jakožto součást „antisense“ léčebného režimu.

Způsoby použití

Protein vázající OPG se může použít v řadě různých testů pro detekci OPG a charakterizaci interakcí s OPG. Obecně testy spočívají v tom, že se inkubuje protein vázající OPG s biologickým vzorkem obsahujícím OPG v podmínkách, které dovolují navázání OPG na protein vázající OPG, a pak se měří rozsah vazby. OPG může být buď v purifikované formě, nebo přítomen ve směsi jako je tomu v tělních tekutinách nebo v kultivačním médiu. Testy mohou být buďto kvalitativní,

nebo kvantitativní, přičemž kvantitativní testy jsou užitečné pro stanovení parametrů (afinitní konstanta a kinetika) vazby OPG a proteinu vázajícího OPG a pro kvantifikaci hladiny biologicky aktivního OPG ve směsi. Testy se také mohou užít k hodnocení vazby OPG k fragmentům, analogům a derivátům proteinu vázajícího OPG a k identifikaci nových členů rodiny OPG a proteinů vázajících OPG.

Navázání OPG na protein vázající OPG lze provádět v různých formách testů, např. jako buněčný vazebný test, membránový vazebný test, test v roztoku nebo imunotest. Obecně shrnuto, stopové množství značeného OPG se inkubuje se vzorky proteinu vázajícího OPG po určitou dobu, a pak se měří množství navázaného OPG pomocí filtrace, elektrochemiluminiscence (ECL, systém ORIGEN firmy IGEN), buněčným testem nebo imunotestem. Lze také užít homogenní radioaktivní test (SPA, Amersham) nebo časově rozlišenou fluorescenci (HTRF, Packard). Vazba je detekována pomocí značení OPG nebo protilátky anti-OPG radioaktivním izotopem (^{125}I , ^{35}S , ^3H), fluorescenčním barvivem (fluorescein), cheláty lathanidu (Eu^{3+}) nebo kryptáty, komplexy orbipyridylrutenia (Ru^{2+}). Je jasné, že výběr druhu značení je závislý na použitém detekčním systému. Alternativně může být OPG modifikován epitopovou značkou (např. biotin, peptidy, His_6 , myc) a navázán na protein jako je např. streptavidin, antiptidová nebo antiproteinová protilátka, který nese značku, jak byly popsány výše.

V alternativním způsobu může být protein vázající OPG testován přímo v imunotestech použitím polyklonálních nebo monoklonálních protilátek k proteinům vázajícím OPG. Další formy proteinů vázajících OPG obsahující epitopové značky, které byly zmíněny výše, se mohou užít v testech v roztoku a imunotestech.

Způsoby k identifikaci sloučenin, které interagují s proteiny vázajícími OPG, jsou také předmětem vynálezu. Způsob podle vynálezu obsahuje inkubaci proteinu vázajícího OPG se sloučeninou v podmínkách, které dovolují navázání sloučeniny na protein vázající OPG, a pak měření rozsah vazby. Sloučenina může být buď v purifikované formě, nebo přítomna v surové směsi. Vázající se sloučeniny mohou být nukleové kyseliny, proteiny, peptidy, cukry, lipidy nebo organické sloučeniny s malou molekulovou hmotností. Sloučeniny lze dále charakterizovat podle jejich schopnosti zvyšovat nebo snižovat aktivitu proteinu vázajícího OPG, aby bylo možné stanovit, zda působí jako agonisté nebo antagonisté.

Proteiny vázající OPG jsou dále užitečné k identifikaci intracelulárních proteinů, které interagují s cytoplazmatickou doménou, a sice v testu s kvasinkovým dvojíým hybridem. Např. hybridní konstrukty obsahující DNA kódující 50 aminokyselin N-konec proteinu vázajícího OPG fúzované s DNA-vazebnou doménou genu GAL4 kvasinky se mohou užít jako dvouhybridový plazmid. Pozitivní klony získané takovým screeningem se dále charakterizují, aby se identifikoval interagující protein. Takové informace jsou pak užitečné k určení intracelulárního signálního mechanismu spojeného s proteinem vázajícím OPG a poskytují intracelulární cíle pro nová léčiva, která modulují resorpci kosti.

Proteiny vázající OPG se mohou užít k léčení nemocí, které jsou charakterizovány nadměrnou hustotou kosti. Nejobvyklejší takovou nemocí je osteoporóza, což je nemoc, při které genetická porucha vede ke zvýšené hustotě kostí, která je obvykle fatální v několika prvních letech života. Osteoporózu je možné výhodně léčit podáváním rozpustné formy proteinu vázajícího OPG.

Předkládaný vynález také poskytuje modulátory (agonisty a antagonisty) proteinu vázajícího OPG a způsoby jejich přípravy. Modulátor proteinu vázajícího OPG buďto zvyšuje, nebo snižuje alespoň jednu aktivitu spojenou s proteinem vázajícím OPG, např. schopnost vázat OPG nebo jinou interagující molekulu nebo regulovat zrání osteoklastů. Typicky agonistou nebo antagonistou může být kofaktor, jako je např. protein, peptid, cukr, lipid nebo organická sloučenina s malou molekulovou hmotností, který interaguje s proteinem vázajícím OPG, a tím reguluje jeho aktivitu. K potenciálním polypeptidovým antagonistům patří protilátky, které reagují buďto s rozpustnou, nebo na membránu vázanou formu proteinu vázajícího OPG a rozpustné formy proteinu

vážíciho OPG, které obsahují celou nebo aspoň část extracelulární domény proteinu vážíciho OPG. K molekulám, které regulují expresi proteinu vážíciho OPG typicky patří nukleové kyseliny, které jsou komplementární k nukleovým kyselinám kódujícím protein vážíci OPG a které působí jako „anti-sense“ regulátory exprese.

5

Protein vážíci OPG se podílí na řízení tvorby zralých osteoklastů, primárního buněčného typu podílejícího se na resorpci kosti. Zvýšení rychlosti resorpce (nad rychlost tvorby kosti) může vést k různým poruchám a nemocem kostí, které jsou souhrnně nazývány osteopenie a patří k nim osteoporóza, osteomyelitida, hyperkalcémie, osteopenie způsobená chirurgickým zákrokem nebo
10 podáváním steroidů, Pagetova nemoc, osteonekróza, ztráta kostní hmoty v důsledku revmatoidní artritidy, periodontální ztráta kosti, imobilizace, ztráty způsobené protézami a osteolytické metastázy. Naopak, snížení rychlosti resorpce kosti může vést k osteopetróze, což je stavu vyznačující se zvýšenou entitou kosti. Agonisté a antagonisté proteinu vážíciho OPG modulují tvorbu osteoklastů a mohou se podávat pacientům trpícím nemocemi kostí. Agonisté a antagonisté pro-
15 teinu vážíciho OPG pro použití k léčení osteopenií se mohou podávat samostatně nebo v kombinaci s terapeuticky účinným množstvím činidla podporujícího růst kostí, např. včetně morfogenických faktorů kostí zvaných BMP-1 až BMP-12, transformujícího růstového faktoru β a dalších členů rodiny TGF β , fibroblastového růstového faktoru FGF-1 a FGF-10, inhibitorů interleukinu-1, inhibitorů TNF α , parathyroidálního hormonu, prostaglandinů řady E, bisfosfonátů a minerálů podporujících kosti jako jsou fluorid a kalcium. Antagonisté proteinu vážíciho OPG jsou
20 zvláště vhodní k léčení osteopenie.

Receptory pro proteiny vážíci osteoprotegerin

Předkládaný vynález dále poskytuje receptory, které reagují s proteiny vážíci OPG. Vynález zvláště poskytuje osteoklastový diferenciační a aktivační receptor, ODAR. ODAR je transmembránový polypeptid, který vykazuje nejvyšší míru homologie s CD40, členem rodiny receptorů TNF. Sekvence nukleové kyseliny myšího ODAR a kódovaný polypeptid jsou uvedeny na
25 obr. 10. Lidský homolog k myšímu ODAR lze snadno izolovat hybridizačním screeningem lidské cDNA knihovny nebo genomové knihovny pomocí sekvence nukleové kyseliny uvedené na obr. 10. Postup pro klonování lidského ODAR je v podstatě shodný s postupem popsáním v příkladu 5 pro klonování lidského proteinu vážíciho OPG. Lidský homolog polypeptid ukázaného na obr. 10 byl publikován v Anderson et al. (Nature 390: 175-179, 1997) a byl nazván RANK. RANK byl charakterizován jako transmembránový protein typu I, který má homologii se členy
30 rodiny receptorů TNFa podílí se na funkci dendritických buněk.

Důkazy potvrzující interakci mezi ODAR a proteinem vážíci OPG jsou uvedeny v příkladu 13. Rozpustná forma ODAR (fúzní protein ODAR-Fc) zabraňuje dozrávání osteoklastů *in vitro* (obr. 12) a zvyšuje denzitu kosti u normálních myší po podání subkutánní injekcí (Obr. 13).
40 Výsledky jsou ve shodě s tím, že protein vážíci OPG reaguje s ODAR a aktivuje ho, čímž podporuje dozrávání osteoklastů.

Vývoj osteoklastů a rychlost a rozsah resorpce kosti jsou regulovány interakcí mezi proteinem vážíci OPG a ODAR. Sloučeniny, které snižují nebo blokují interakci proteinu vážíciho OPG a ODAR jsou potenciálními antagonisty aktivity proteinu vážíciho OPG a mohou narušit vývoj
45 osteoklastů vedoucí ke snížení resorpci kosti. Alternativně sloučeniny, které zvyšují interakci proteinu vážíciho OPG a ODAR jsou potenciálními agonisty aktivity proteinu vážíciho OPG a podporují vývoj osteoklastů a zvyšují resorpci kosti.

K měření interakce proteinu vážíciho OPG s ODAR lze užít celou řadu testů *in vitro* s využitím purifikovaných proteinů. Tyto testy se mohou použít ke screeningu sloučenin na jejich schopnost zvyšovat nebo snižovat rychlost nebo rozsah vazby ODAR k proteinu vážíciho OPG. V jednom
50 typu takových testů se protein ODAR imobilizuje navázáním na dno jamek mikrotitrační destičky. Protein vážíci OPG radioaktivně označený (např. radioaktivním jodem) a testovaná sloučeniny se přidávají postupně (v jakémkoliv pořadí) a nebo současně do jamek. Po inkubaci se
55

jamky opláchnou a pomocí scintilačního počítáče se stanoví radioaktivita, podle níž se určí míra vazby ODAR a proteinu vážícího OPG v přítomnosti testované sloučeniny. Typicky se sloučenina testuje v celém rozsahu koncentrací a pro vyhodnocení přesnosti naměřených výsledků se použije série kontrolních jamek, kde chybí vždy jeden nebo několik prvků z testované reakce.

5 K alternativní metodě patří obrácené pozice proteinů, tzn. na mikrodestičku se imobilizuje protein vážící OPG, inkubuje se s testovanou sloučeninou a radioaktivně značeným ODAR a pak se obdobně stanoví rozsah navázání (viz např. kapitola 18 v Current Protocols in Molecular Biology, Asubel et al., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, 1995).

10 Jako alternativu k radioaktivnímu značení lze užít postup, kdy se protein vážící OPG nebo ODAR konjuguje s biotinem a přítomnost biotinylovaného proteinu se pak detekuje pomocí streptavidinu navázaného na enzym, jako je např. křenná peroxidáza (HRP) nebo alkalická fosfatáza (AP), který lze detekovat kolorimetricky nebo fluorescenčním označením streptavidinu. Také lze využít protilátky proti proteinu vážícímu OPG nebo ODAR konjugované s biotinem,

15 který lze detekovat po inkubaci se streptavidinem navázaným na enzym jako AP nebo HRP.

Protein vážící OPG nebo ODAR mohou být také imobilizovány navázáním na agarózové perličky, akrylátové perličky nebo i jiné, užitě jako neutrální substrát. Tento substrát–proteinový komplex se pak přenesse do roztoku obsahujícího komplementární protein a testovanou sloučeninu. Po inkubaci se perličky precipitují centrifugací a vazba mezi proteinem vážícím OPG a ODAR se kvantifikuje způsobem popsaným výše. Alternativně se substrát–proteinový komplex imobilizuje v koloně a testované molekuly a komplementární protein procházejí kolonou. Vytváření komplexů mezi proteinem vážícím OPG a ODAR lze pak vyhodnotit jedním ze způsobů, které byly popsány výše, např. radioaktivním značením, navázáním protilátky apod.

25 Jiným typem testu *in vitro*, který je užitečný k identifikaci sloučenin, které zvyšují nebo snižují tvorbu komplexů mezi ODAR a proteinem vážícím OPG je detektorový systém pro povrchovou plazmonovou rezonanci jako je např. měřicí systém Biacore formy Pharmacia (Pharmacia, Piscataway, NJ). Systém Biacore lze užít podle návodu výrobce. Test v podstatě spočívá v tom, že se kovalentně naváže buďto protein vážící OPG, nebo ODAR na senzorový čip potažený dextranem, který je umístěn v detektoru. Testovaná sloučenina a další komplementární protein se pak injikují do komory obsahující senzorový čip buďto simultánně, nebo postupně a množství komplementárního proteinu, který se naváže, se určí na základě změn molekulové hmotnosti, která je fyzikálně asociována s dextranem pokrytou stranou senzorového čipu, změna molekulové hmotnosti je měřena detektorovým systémem.

30

35

V některých případech může být žádoucí vyhodnotit dvě nebo více testovaných sloučenin společně, zda jsou užitečné ke zvyšování nebo snižování vazby komplexů ODAR/protein vážící OPG. V takovém případě testy popsané výše mohou být snadno modifikovány tím, že se přidají další testované sloučeniny buďto simultánně, nebo postupně po první sloučenině. Zbývající kroky testů jsou opět stejné, jak byly popsány výše.

40

Testy *in vitro* popsané výše se mohou užít výhodně k rychlému screeningu velkého počtu sloučenin na to, zda ovlivňují tvorbu komplexů ODAR s proteinem vážícím OPG. Testy mohou být automatizovány pro screening sloučenin vytvářených rekombinantně připravených metodou „phage display“, syntetických peptidů a chemických syntetických knihoven.

45

Sloučeniny, které zvyšují nebo snižují tvorbu komplexů ODAR s proteinem vážícím OPG mohou být také testovány v buněčných kulturách pomocí buněk nebo buněčných linií nesoucích ODAR. Buňky a buněčné linie lze získat z jakéhokoliv savce, výhodně člověka nebo jiného primáta, psa nebo hlodavce. Buňky obsahující ODAR jako např. osteoklasty mohou být odděleny od ostatních buněk afinitní chromatografií postupem, který je odborníkovi znám. Navázání proteinu vážícího OPG na buňky nesoucí ODAR se hodnotí v přítomnosti nebo nepřítomnosti testovaných sloučenin a lze ho kvantifikovat např. průtokovou cytometrií pomocí biotinylované protilátky k proteinu vážícímu OPG. Alternativně kultura myších nebo lidských osteoklastů může být založena jak

50

55

bylo popsáno v příkladu 8 a testované sloučeniny se pak testují podle schopnosti blokovat zrání osteoklastů stimulované přidávkem CSF-1 a proteinu vázícího OPG. Testy na buněčných kulturách lze užít výhodně k dalšímu hodnocení sloučenin, které prošly s pozitivním výsledkem vazebným testem popsaným výše.

5

Sloučeniny, které zvyšují nebo snižují interakci proteinu vázícího OPG s ODAR lze také hodnotit z hlediska *in vivo* aktivity tím, že se sloučenina podává myším a pak se měří denzita kostí pomocí skenovací denzitometrie nebo radiografie. Postupy měření denzity kostí byly popsány v PCT přihlášce WO97/23614 a také v příkladu 13.

10

Vynález poskytuje sloučeniny, které snižují nebo blokují interakci proteinu vázícího OPG s ODAR a jsou antagonisty tvorby osteoklastů. Takové sloučeniny obecně spadají do dvou skupin. K jedné skupině patří takové sloučeniny, které jsou odvozeny z proteinu vázícího OPG nebo které interagují s proteinem vázícím OPG. Takové sloučeniny byly popsány v předchozím textu.

15

Druhá skupina obsahuje takové sloučeniny, které jsou odvozeny z ODAR nebo které interagují s ODAR. K příkladům sloučenin, které jsou antagonisty ODAR, patří nukleové kyseliny, proteiny, peptidy, sacharidy, lipidy nebo organické sloučeniny s malou molekulovou hmotností.

Antagonisté ODAR jsou sloučeniny, které se váží přímo a nebo v sousedství jednoho nebo několika vazebných míst pro protein vázící OPG v extracelulární doméně ODAR a snižují tak nebo úplně blokují vytváření komplexů. Ty úseky ODAR, které se podílejí na tvorbě komplexů s proteinem vázícím OPG, je možné identifikovat na základě analogie se strukturou homologního komplexu TNF β /TNF-R55, který popsali Banner et al. (Cell 73: 431 až 445, 1993). Např. struktura komplexu TNF β /TNF-R55 může být využita k identifikaci úseků proteinu vázícího OPG a ODAR, které se účastní vytváření komplexu. Pak je možné navrhnout sloučeniny, které se přednostně váží na úseky účastnící se tvorby komplexu, a působí jako antagonisté. Jeden z takových přístupů je uveden v příkladu 11, kdy byly navrženy a peptidové antigeny pro použití k přípravě protilátek proti proteinu vázícímu OPG, které působí jako antagonisté. Očekává se, že tyto protilátky se budou vázat na protein vázící OPG a tím blokovat vytvoření komplexu s ODAR. Podobným způsobem lze použít peptidové antigeny založené na struktuře ODAR k přípravě protilátek anti-ODAR, které působí jako antagonisté.

Antagonisté ODAR se mohou vázat na ODAR také v místech odlišných od vazebných míst pro protein vázící OPG a indukovat konformační změny v polypeptidu ODAR, které vedou buďto ke snížení tvorby komplexů, nebo k tvorbě neproduktivních komplexů s proteinem vázícím OPG.

V jednom provedení vynálezu je antagonistou rozpustná forma ODAR postrádající funkční transmembránovou doménu. Rozpustné formy ODAR mají delecí jedné nebo několika aminokyselin v transmembránové doméně (aminokyselin 214 až 234, jak je uvedeno na obr. 10). Rozpustné polypeptidy ODAR mohou mít buďto celou, nebo část extracelulární domény a jsou schopny vázat se na protein vázící OPG. Případně rozpustný ODAR může být částí chimérického proteinu, kde část nebo celá extracelulární doména ODAR je fúzována s heterologní aminokyselinovou sekvencí. V jednom provedení vynálezu je heterologní aminokyselinovou sekvencí úsek Fc z lidského IgG.

45

Modulátory (agonisté a antagonisté) ODAR se mohou užít k prevenci nebo léčení osteopenie, včetně nemocí jako je osteoporóza osteomyelitida, hyperkalcémie při malignitě, osteopenie vyvolaná chirurgickým výkonem nebo podáváním steroidů, Pagetova nemoc, osteonekróza, úbytek kosti při revmatoidní artritidě, periodontální úbytek kosti, imobilizace, úbytek při protézách a osteolytických metastázách. Agonisté a antagonisté ODAR použitelné pro léčbu osteopenií mohou být podávány samotné nebo v kombinaci s terapeuticky účinným množstvím agens podporujícího růst kostí včetně morfogenních faktorů označených BMP-1 až BMP-12, transformujícího růstového faktoru- β a členů rodiny TGF- β , fibroblastových růstových faktorů FGF-1 až FGF-10, inhibitorů interleukinu-1, inhibitorů TNF α , parathormonu, prostaglandinů řady E,

50

bisfosfonátů, estrogenů, SERM a minerálů podporujících kost, jako je fluorid a kalcium. Antagonisté ODAR jsou zejména užiteční v léčbě osteopenie.

Následující příklady jsou nabízeny pro ucelnější ilustraci vynálezu, ale nemají být chápány jako limitující jeho rozsah.

Příklady provedení vynálezu

10

Příklad 1

Identifikace zdrojové buněčné linie pro protein vázající OPG

15

Osteoprotegerin (OPG) negativně reguluje osteoklastogenezi *in vitro* a *in vivo*. Protože OPG je protein mající vztah k TNFR, pravděpodobně při zprostředkování svého účinku interaguje s členem rodiny příbuzné k TNF. S jednou výjimkou jsou všichni známí členové rodiny TNF transmembránové proteiny typu II exprimované na buněčném povrchu. Aby se rozpoznal zdroj proteinu vázající OPG, byly použity rekombinantní fúzní proteiny OPG-Fc jako imunologické sondy pro testování na proteiny vázající OPG lokalizované na povrchu různých buněčných linií a primárních hemopoetických buněk.

20

25

30

35

Buněčné line, které rostly jako adherentní kultury *in vitro* byly ošetřeny za použití následujících metod: buňky byly vysety na 24 jamkové destičky pro tkáňové kultury (Falcon), a poté se ponechaly růst dokud nebyly přibližně z 80 % konfluentní. Kultivační média se pak odstranila a adherentní kultury se promyly fyziologickým roztokem pufrovaným fosforečnanem (PBS) (Gibco) obsahujícím 1% fetální telecí sérum (FCS). Rekombinantní fúzní proteiny myši OPG [22-194]-Fc a lidský OPG [22-201]-Fc (viz US patentová přihláška pořadové č. 08/706 945, podaná 3. září 1996) byly jednotlivě naředěny na 5 µg/ml v PBS obsahujícím 1% FCS, pak přidány ke kulturám a ponechány inkubovat 45 minut v 0 °C. Roztok fúzního proteinu OPG-Fc se odstranil a buňky se promyly v roztoku PBS-FCS, jak je popsáno výše. Kultury se poté vystavily působení sekundární protilátky – kozímu F(ab') proti-lidskému IgG s konjugovaným fykoerytri- nem (Southern Biotechnology Associates č. 2043-09), ředěné PBS-FCS. Po 30 až 45 minutách inkubace v 0 °C se roztok odstranil a kultury se promyly, jak je popsáno výše. Buňky se pak analyzovaly imuno fluorescenčním mikroskopem a detekovaly se buněčné linie, které exprimovaly protein vázající OPG na buněčném povrchu.

40

45

Suspenní buněčné kultury se analyzovaly podobným způsobem s následujícími modifikacemi: ředidlo a promývací pufr sestávaly z fyziologického roztoku pufrovaného fosforečnanem obsahujícího 1% FCS bez kalcia a magnézia. Buňky se sklídily z exponenciálně se množících kultur v růstovém médiu, stočením se vytvořily pelety a pak se resuspendovalo 1 x 10⁷ buněk/ml na 96jamkové mikrotitrační destičce pro tkáňové kultury (Falcon). Buňky pak byly vystaveny rekombinantním fúzním proteinům OPG-Fc, pak sekundární protilátce, jak je popsáno výše, a byly promyty a stočeny mezi každým krokem. Pak se buňky analyzovaly pomocí fluorescenčního třídění buněk (FACS) za použití přístroje Becton Dickinson FACscan.

50

Použitím tohoto postupu bylo zjištěno, že myši myelomonocytární buněčná linie 32D (ATCC č. CRL-11346) exprimuje povrchovou molekulu, která byla detekována oběma fúzními proteiny, myším OPG[22-194]-Fc a také lidským OPG[22-201]-Fc. Samotná sekundární protilátka se navázala na povrch buněk 32D, ani nepurifikovala lidský IgG1 Fc, což naznačuje, že vazba fúzních proteinů OPG-Fc je způsobená skupinou OPG. Tato vazba může být v kompetici způsobem závislým na dávce při přidání rekombinantního myšního nebo lidského OPG[22-401] proteinu. Úsek OPG nezbytný pro biologickou aktivitu OPG je tedy schopný specifické vazby na povrchovou molekulu odvozenou z 32D.

55

Příklad 2

Expresní klonování myšního proteinu vázajícího OPG

Z 32D mRNA byla připravena knihovna cDNA a ligována do savčího expresního vektoru pcDNA3.1(+) (Invitrogen, San Diego, CA). Sklidily se exponenciálně rostoucí buňky 32D udržované za přítomnosti rekombinantního interleukinu-3 a celková buněčná RNA byla purifikována kyselou guanidiniumthiokyanát-fenol-chloroformovou extrakcí (Chromczynski a Sacchi, *Annal. Biochem.*, 162, 156–159, 1987). Poly(A+) mRNA frakce se z preparátu celkové RNA získala adsorpcí na perličky s navázaným oligo(dT)25 (Dynabeads, Dynal Corp) a následnou elucí za použití postupu doporučeného výrobcem. Směrová, pomocí primerů oligo-dT syntetizovaná cDNA knihovna byla připravena za použití Superscript Plasmid System (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) dle postupu doporučeného výrobcem. Výsledná cDNA byla plně naštěpena restrikcemi endonukleázami Sall a NotI, a poté rozdělena do frakcí podle velikosti rozdělovací gelovou chromatografií. Byly vybrány frakce s největší molekulovou hmotností a ligovány do polylinkeru (mnohočetného klonovacího místa) plazmidového vektoru pcDNA3.1(+) (Invitrogen, San Diego, CA). Tento vektor obsahuje promotor CMV v protisměru od mnohočetného klonovacího místa a řídí expresi vysokého stupně v eukaryotických buňkách. Knihovna byla poté vnesena elektroporací do kompetentních buněk *E. coli* (ElectroMAX DH10B, Gibco, NY) a vyseta na LB agar obsahující 100 µg/ml ampicilinu. Knihovna pak byla uspořádána do izolovaných skupin obsahujících přibližně 1000 klonů na skupinu a 1,0 ml kultury z každé skupiny se pěstoval 16 až 20 hodin ve 37 °C. Plazmidová DNA z každé kultury se izolovala za použití soupravy Qiagen Qiawell 96 Ultra Plasmid Kit (katalogové č. 16191) podle postupu doporučeného výrobcem.

Uspořádané skupiny 32D cDNA expresní knihovny byly jednotlivě vneseny pomocí lipofektinu do kultur buněk COS-7 a pak testovány na to, zda nebyly buněčný povrchový protein vázající OPG. Aby se tak stalo, byly buňky COS-7 vysety v hustotě 1×10^6 na ml na 6jamkové destičky pro tkáňové kultur (Costar) a pak pěstovány přes noc v DMEM (Gibco) obsahujícím 10% FCS. Přibližně 2 µg plazmidové DNA z každé skupiny byly ředěny do 0,5 ml DMEM bez séra, a pak sterilizovány stočením přes kolonu 0,2 µm Spin-X (Costar). Současně bylo přidáno 10 µl Lipofektaminu (Life Technologies katalog. č. 18324-012) do samostatné zkumavky obsahující 0,5 ml DMEM bez séra. Roztoky DNA a Lipofektaminu se smísily a ponechaly inkubovat 30 minut při teplotě místnosti. Buněčné kultury COS-7 byly pak promyty s DMEM bez séra a komplexy DNA-lipofektamin byly vystaveny kulturám po dobu 2 až 5 hodin v 37 °C. Po tomto období byla média odstraněna a nahrazena DMEM obsahujícím 10% FCS. Buňky pak byly pěstovány 48 hodin ve 37 °C.

Aby se detekovaly kultury, které exprimují protein vázající OPG, byla růstová média odstraněna a buňky byly promyty v roztoku PBS-FCS. Do každé jamky se přidal 1,0 ml PBS-FCS obsahující 5 µg/ml fúzního proteinu lidského OPG[22–201]-Fc a inkuboval se 1 hodinu při teplotě místnosti. Buňky byly třikrát promyty roztokem PBS-FCS a pak 5 minut fixovány v PBS obsahujícím 2% paraformaldehyd a 0,2% glutaraldehyd při teplotě místnosti. Kultury se jednou promyty PBS-FCS a pak inkubovaly 1 hodinu v 65 °C ponořeny do roztoku PBS-FCS. Ponechaly se zchladnout a roztok PBS-FCS se odsál. Pak se kultury inkubovaly s kozí proti-lidskou IgG (Fc specifickou) protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou (SIGMA produkt č. A-9544) 30 minut při teplotě místnosti, třikrát se promyly s 20 mM Tris-Cl (pH 7,6) a 137 mM NaCl. Imunkomplexy, které se vytvořily během těchto kroků, byly detekovány testováním aktivity alkalické fosfatázy s použitím soupravy Fast Red TR/AS-MX Substrate Kit (Pierce, katalog. č. 34034) podle postupu doporučeného výrobcem.

Použitím tohoto přístupu bylo testováno celkem přibližně 300 000 nezávislých 32D cDNA klonů představovaných 300 transfekovanými skupinami s 1000 klony. Byla identifikována jedna jamka obsahující buňky, které specificky získaly fúzní protein OPG-Fc. Tato skupina byla dále dělena postupným opakováním koly příbuzenské selekce a výsledkem byl samostatný plazmidový klon

32D-F3 (obrázek 1). DNA plazmidu 32D-F3 pak byla transfekována do buněk COS-7, které byly imunologicky značeny buď samotnou sekundární protilátkou kozím proti-lidským IgG konjugovaným s FITC, fúzním proteinem lidským OPG[22-201]-Fc a sekundární protilátkou, nebo fúzním proteinem ATAR-Fc (ATAR je také znám jako HVEM, Montgomery et al., Cell, 87, 427-436, 1996) (obrázek 2). Samotná sekundární protilátka ani fúzní protein ATAR-Fc se nevázaly k buňkám COS-7/32D-F3. K buňkám COS-7/32D-F3 se vázal pouze fúzní protein OPG-Fc, což je důkazem, že na povrchu exprimujících buněk se projevil protein vázající OPG kódovaný 32D-F3.

Příklad 3

Sekvence proteinu vázajícího OPG

Klon 32D-F3, jehož izolace byla popsána výše, obsahoval inzert o velikosti přibližně 2,3 kb cDNA (obrázek 1), který byl sekvencován v obou směrech na přístroji pro automatizované sekvencování DNA 373A od firmy Applied Biosystems metodou terminace reakcí řízených primery s použitím Taq polymerázy a fluorescenční značky („primer-driven Taq dye-terminator reactions“, Applied Biosystems) podle postupu doporučeného výrobcem. Výsledná získaná nukleotidová sekvence byla srovnána s databází sekvencí DNA s použitím programu FASTA (GCG, University of Wisconsin) a analyzována na přítomnost dlouhých otevřených čtecích rámců (LORF) při použití aplikace „Six-way open reading frame“ (Framws) (GCG, University of Wisconsin). Byl detekován příslušně orientovaný LORF z 316 aminokyselinových (aa) zbytků začínající methioninem, kterému předcházela 5' netranslatovaná oblast velikosti přibližně 150 bp. 5' netranslatovaná oblast obsahovala v rámci stop-kodonu v protisměru od předpověděného start-kodonu. To ukazuje, že struktura plazmidu 32D-F3 odpovídá jeho schopnosti využívat oblast promotoru CMV k řízení exprese genového produktu velikosti 316 aa v savcích buňkách.

Předpověděná sekvence proteinu vázajícího OPG pak byla srovnána s existující databází známých proteinových sekvencí za použití modifikované verze programu FASTA (Pearson, Meth. Enzymol., 183, 63-98, 1990). Aminokyselinová sekvence se také analyzovala na přítomnost specifických motivů, které jsou zachovány u všech známých členů rodiny tumorového nekrotického faktoru (TNF) s použitím metody sekvenčního profilu (Gribskov et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4355 až 4359, 1987) modifikováno dle Lüthy et al. (Protein Sci., 3, 139 až 146, 1994). V celém proteinu vázajícím OPG vyšla najevo významná homologie s několika členy rodiny TNF. Nejblíže příbuzný myším a lidským homologům ligandů TRAIL a CD40 se ukazuje myší protein vázající OPG. Další analýza sekvence proteinu vázajícího OPG ukázala silnou shodu s rodinou TNF, s vysoce významným Z skórem rovnajícím se 19,46.

Aminokyselinová sekvence proteinu vázajícího OPG obsahuje pravděpodobnou hydrofobní transmembránovou doménu, která začíná v M49 a prostírá se do L69. Na této konfiguraci vztažené k methioninovému start-kodonu je založen předpoklad, že protein vázající OPG je transmembránový protein typu II s krátkou N-koncovou intracelulární doménou a delší C-koncovou extracelulární doménou (obrázek 4). To by bylo podobné všem známým členům rodiny TNF, s výjimkou lymfotoxinu alfa (Nagata a Golstein, Science, 267, 1449 až 1456, 1995).

Příklad 4

Expresce mRNA lidského proteinu vázajícího OPG

Membrány s hromadným přenosem RNA (northern-bloty) z lidské tkáně (Clontech, Palo Alto, CA) byly analyzovány a testovány restričním fragmentem 32D-F3 značeným ³²P-dCTP, aby se zjistila velikost lidského transkriptu a určil vzorec exprese. Northern-bloty byly prehybridizovány v 5x SSPE, 50% formamidu, 5x Denhardtově roztoku, 0,5% SDS a 100 µg/ml denaturované

DNA lososího spermatu po dobu 2 až 4 hodin ve 42 °C. Bloty se pak hybridizovaly v 5x SSPE, 50% formamidu, 2x Denhardtově roztoku, 0,1% SDS a 100 µg/ml denaturované DNA lososího spermatu a 5 ng/ml značené sondy po dobu 18 až 24 hodin ve 42 °C, pak se bloty odmyly v 2x SSC 10 minut při teplotě místnosti, 1x SSC 10 minut v 50 °C a v 0,5xSSC 10 až 15 minut.

Za použití sondy pocházející z myši cDNA a hybridizace za stringentních podmínek byl v lymfatických uzlinách objeven převládající druh mRNA s relativní molekulovou hmotností přibližně 2,5 kb (obrátek 3). Slabý signál o stejné relativní molekulové hmotnosti byl také detekován u mRNA z fetálních jater. V dalších vyšetřovaných tkáních nebyl zjištěn žádný transkript proteinu vázajícího OPG. Data nasvědčují, že exprese mRNA proteinu vázajícího OPG je v lidských tkáních velice omezená. Data také ukazují, že izolovaný cDNA klon má velmi blízko k velikosti přírodního transkriptu, což svědčí pro to, že 32D-F3 je klon plné délky.

Příklad 5

Molekulární klonování lidského proteinu vázajícího OPG

Lidský homolog proteinu vázajícího OPG je exprimován jako mRNA o velikosti přibližně 2,5 kb v lidských periferních lymfatických uzlinách a je detekován hybridizací se sondou z myši cDNA za stringentních hybridizačních podmínek. DNA kódující lidský protein vázající OPG byla získána testováním cDNA knihovny lidských lymfatických uzlin hybridizačními metodami s použitím buď rekombinantních bakteriofágových plaků, nebo transformovaných bakteriálních kolonií (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, New York, 1989). Fágová nebo plazmidová cDNA knihovna se testovala za použití radioaktivně značených sond pocházejících z klonu 32D-F3 myšního proteinu vázajícího OPG. Sondy byly použity k testování nitrocelulóзовých membrán, na které byla přenesena knihovna otiskem misky. Tyto membrány jsou prehybridizovány a pak hybridizovány za použití podmínek specifikovaných v příkladu 4, což nakonec poskytlo purifikované klony lidské cDNA proteinu vázajícího OPG. Inzerty získané z každého klonu lidského proteinu vázajícího OPG byly sekvencovány a analyzovány, jak je popsáno v příkladu 3.

Poly A+ RNA z lidské lymfatické uzliny (Clontech, Inc., Palo Alto, CA) se analyzovala na přítomnost transkriptů OPG-bp jak bylo již dříve popsáno v patentové přihlášce US 08/577 788, podané 22. prosince 1995. Northern-blot tohoto vzorku RNA zkoumaný za stringentních podmínek sondou myšního OPG-bp značeného ³²P ukázal přítomnost transkriptů lidského OPG-bp. Z mRNA lymfatické uzliny pak byla syntetizována cDNA knihovna pomocí primerů olig(dT) s použitím soupravy SuperScript kit (Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD), jak je popsáno v příkladu 2. Výsledná cDNA byla rozdělena podle velikosti a frakce o vysoké molekulové hmotnosti byly ligovány do plazmidového vektoru pcDNA3.1(+)(Invitrogen, San Diego, CA). Transformovaly se elektrokompetentní *E. coli* DH10 (Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD) a 1 x 10⁶ transformant rezistentních na ampicilin se testovalo hybridizací kolonií s myším proteinem vázajícím OPG značeným ³²P jako sondou.

Byl izolován plazmidový klon s předpokládanou cDNA lidského proteinu vázajícího OPG, phu-OPGbp-1.1, obsahující inzerť o velikosti 2,3 kb. Výsledná nukleotidová sekvence inzertu phu-OPGbp-1.1 byla přibližně z 80 až 85 % homologní se sekvencí cDNA myšního proteinu vázajícího OPG. Translace vložené sekvence DNA ukazovala na přítomnost dlouhého otevřeného čtecího rámce, o kterém se předpokládalo, že kóduje 317 aa polypeptid (obrázek 4). Srovnání myšního a lidského OPG-bp polypeptidu ukazuje, že jsou identické z ~87 %, což naznačuje, že tento protein je během evoluce velmi konzervativní. Sekvence DNA lidského proteinu vázajícího OPG a jeho proteinová sekvence nebyly nalezeny v databázi Genbank, a nebyly zde ani žádné homologní EST sekvence. Lidský protein vázající OPG vykazuje stejně jako myší homolog výraznou podobnost sekvencí se všemi členy rodiny cytokinů TNFα.

Příklad 6

Klonování a bakteriální exprese proteinu vázajícího OPG

Pro tvoření různých forem myších proteinů vázajících OPG je použita amplifikace pomocí metody PCR (polymerázová řetězová reakce) používající páry primerů a templáty popsané níže. Jeden primer z každého páru vnáší TAA stop-kodon a jedinečné místo XhoI nebo SacII, které následuje po karboxylovém konci genu. Další primer z každého páru vnáší jedinečné místo NdeI, N-koncový methionin a optimalizuje s použitím standardní metody rekombinantní DNA. PCR produkty se purifikují, naštěpí restrikčními enzymy a vloží do jedinečných míst NdeI a XhoI nebo SacII vektoru pAMG21 (ATCC č. 98113) a transformuje do prototrofních *E. coli* 393 nebo 2596. Další obecně používané expresní vektory *E. coli* a hostitelské buňky jsou také vhodné pro expresi. Po transformaci se selektují klony, izoluje se plazmidová DNA a potvrzuje se sekvence inzertu proteinu vázajícího OPG.

pAMG21–myší protein vázající OPG [75–316]

Tento konstrukt byl navržen tak, aby byl dlouhý 242 aminokyselin a přitom měl následující N-koncové a C-koncové zbytky, NH₂–Met(75)–Asp–Pro–Asn–Arg–Gln–Asp–Ile–Asp(316)–COOH. Templát pro použití v PCR byl pcDNA/32D–F3 a pár primerů pro PCR a klonování tohoto genového konstruktů byly oligonukleotidy č. 1581–72 a č. 1581–76.

1581-72:

5' - GTTCTCCTCATATGGATCCAAACCGTATTTCTGAAGACAGCACTCACTGCTT - 3'

1581-76:

5' - TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA - 3'

pAMG21–myší protein vázající OPG [95–316]

Tento konstrukt byl navržen tak, aby byl dlouhý 223 aminokyselin a měl následující N-koncové a C-koncové zbytky, NH₂–Met(95)–Glu–Asn–Ala–Gly–Gln–Asp–Ile–Asp(316)–COOH. Templát použitý pro PCR byl pcDNA/32D–F3 a pár primerů pro PCR a klonování tohoto genového konstruktů byly oligonukleotidy č. 1591–90 a č. 1591–95.

1591-90:

5' - ATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGCATGAAAACGCAGGTCTGCAG - 3'

1591-95:

5' - TATCCGCGGATCCTCGAGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGAA - 3'

pAMG21–myší protein vázající OPG [107–316]

Tento konstrukt byl navržen tak, aby byl dlouhý 211 aminokyselin a měl následující N-koncové a C-koncové zbytky, NH₂–Met(107)–Glu–Asp–Thr–Leu–Gln–Asp–Ile–Asp(316)–COOH. Templát pro použití v PCR byl pcDNA/32D–F3 a pár primerů pro PCR a klonování tohoto genového konstruktů byly oligonukleotidy č. 1591–93 a č. 1591–95.

1591-93:

5' - ATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGTCTGAAGACACTCTGCCGGA CTCC - 3'

1591-95:

5' - TATCCGCGGATCCTCGAGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGAA - 3'

pAMG21–myší protein vázající OPG [118–316]

- 5 Tento konstrukt byl navržen tak, aby byl dlouhý 199 aminokyselin a měl následující N–koncové a C–koncové zbytky, NH₂–Met(118)–Lys–Gln–Ala–Phe–Gln–Gln–Asp–Ile–Asp(316)–COOH. Templát pro použití v PCR byl pcDNA/32D–F3 a pár primerů pro PCR a klonování tohoto genového konstruktů byly oligonukleotidy č. 1591–94 a č. 1591–95.

1591–94:

5'–ATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGAAACAAGCTTTTCAGGGG–3'

1591–95:

5'–TATCCGCGGATCCTCGAGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGAA–3'

pAMG21–myší protein vázající OPG [128–316]

- 10 Tento konstrukt byl navržen tak, aby byl dlouhý 190 aminokyselin a měl následující N–koncové a C–koncové zbytky, NH₂–Met(128)–Glu–Leu–Gln–His–Gln–Asp–Ile–Asp(316)–COOH. Templát pro použití v PCR byl pcDNA/32D–F3 a pár primerů pro PCR a klonování tohoto genového konstruktů byly oligonukleotidy č. 1591–91 a č. 1591–95.

1591–91:

5'–ATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGAAAGAACTGCAGCACATTGTG–3'

1591–95:

5'–TATCCGCGGATCCTCGAGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGAA–3'

- 15 pAMG21–myší protein vázající OPG [137–316]

- 20 Tento konstrukt byl navržen tak, aby byl dlouhý 181 aminokyselin a měl následující N–koncové a C–koncové zbytky, NH₂–Met–Gln(137)–Arg–Phe–Ser–Gly–Gln–Asp–Ile–Asp(316)–COOH. Templát pro použití v PCR byl pcDNA/32D–F3 a pár primerů pro PCR a klonování tohoto genového konstruktů byly oligonukleotidy č. 1591–92 a č. 1591–95.

1591–92:

5'–ATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGCAGCGTTTCTCTGGTGCTCCA–3'

1591–95:

5'–TATCCGCGGATCCTCGAGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGAA–3'

pAMG21–myší protein vázající OPG [146–316]

- 25 Tento konstrukt byl navržen tak, aby byl dlouhý 171 aminokyselin a měl následující N–koncové a C–koncové zbytky, NH₂–Met(146)–Glu–Gly–Ser–Trp–Gln–Asp–Ile–Asp(316)–COOH. Templát pro použití v PCR byl pAMG21–myší protein vázající OPG [75–316] popsany výše a pár primerů pro PCR a klonování tohoto genového konstruktů byly oligonukleotidy č. 1600–98 a č. 1581–76.

1600–98:

5'–GTTCTCCTCATATGGAAGGTTCTTGGTTGGATGTGGCCCA–3'

1581–76:

5'–TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA–3'

pAMG21–myší protein vázající OPG [156–316]

- 5 Tento konstrukt byl navržen tak, aby byl dlouhý 162 aminokyselin a měl následující N–koncové a C–koncové zbytky, NH₂–Met–Arg(156)–Gly–Lys–Pro–Gln–Asp–Ile–Asp(316)–COOH. Templát pro použití v PCR byl pAMG21–myší protein vázající OPG [158–316] níže a pár primerů pro PCR a klonování tohoto genového konstruktu byly oligonukleotidy č. 1619–86 a č. 1581–76.

1619–86:

5' - GTTCTCCTCATATGCGTGGTAAACCTGAAGCTCAACCATTTGCA - 3'

1581–76:

5' - TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA - 3'

pAMG21–myší protein vázající OPG [158–316]

- 10 Tento konstrukt byl navržen tak, aby byl dlouhý 160 aminokyselin a měl následující N–koncové a C–koncové zbytky, NH₂–Met–Lys(158)–Pro–Glu–Ala–Gln–Asp–Ile–Asp(316)–COOH. Templát pro použití v PCR byl pcDNA/32D–F3 a pár primerů pro PCR a klonování tohoto genového konstruktu byly oligonukleotidy č. 1581–73 a č. 1581–76.

1581–73:

5' - GTTCTCCTCATATGAAACCTGAAGCTCAACCATTTGCACACCTCACCATCAAT - 3'

1581–76:

5' - TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA - 3'

15

pAMG21–myší protein vázající OPG [166–316]

- 20 Tento konstrukt byl navržen tak, aby byl dlouhý 152 aminokyselin a měl následující N–koncové a C–koncové zbytky, NH₂–Met–His(166)–Leu–Thr–Ile–Gln–Asp–Ile–Asp(316)–COOH. Templát pro použití v PCR byl pcDNA/32D–F3 a pár primerů pro PCR a klonování tohoto genového konstruktu byly oligonukleotidy č. 1581–75 a č. 1581–76.

1581–75:

5' - GTTCTCCTCATATGCATTAACTATTAACGCTGCATCTATCCCAT
CGGGTCCCATAAAGTCACT - 3'

1581–76:

5' - TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA - 3'

pAMG21–myší protein vázající OPG [168–316]

- 25 Tento konstrukt byl navržen tak, aby byl dlouhý 150 aminokyselin a měl následující N–koncové a C–koncové zbytky, NH₂–Met–Thr(168)–Ile–Asn–Ala–Gln–Asp–Ile–Asp(316)–COOH. Templát pro použití v PCR byl pcDNA/32D–F3 a pár primerů pro PCR a klonování tohoto genového konstruktu byly oligonukleotidy č. 1581–74 a č. 1581–76.

1581–74:

5' - GTTCTCCTCATATGACTATTAACGCTGCATCTATCCCATCGGGTCCCATAAAGTCACT - 3'

1581–76:

5' - TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA - 3'

30

Rozumí se, že výše uvedené konstrukty jsou pouze příklady a odborník může snadno získat další formy proteinu vázajícího OPG použitím obecně známých metod zde citovaných.

Rekombinantní bakteriální konstrukty pAMG21–myšního proteinu vázající OPG [75–316], [95–316], [107–316], [118–316], [128–316], [137–316] a [158–316] byly klonovány, byla ověřena sekvence DNA a byly prozkoumány hladiny exprese rekombinantního genového produktu po indukcí. Rekombinantní genový produkt se ve všech konstruktech tvořil v takovém množství, že byl snadno viditelný po elektroforéze hrubých lyzátů v SDS–polyakrylamidovém gelu a po obarvení Coomassieho modří. Pěstování transformovaných *E. coli* 393 nebo 2596, indukce exprese proteinu vázajícího OPG a izolace inkluzních tělísek obsahujících protein vázající OPG se prováděla podle postupů popsanych v PCT WO97/23614. Purifikace proteinů vázajících OPG z inkluzních tělísek vyžaduje solubilizaci a renaturaci proteinu vázajícího OPG za použití postupů odborníkovi dostupných. Zjistilo se, že rekombinantní myší protein vázající OPG [158–316] je produkován většinou v nerozpustné formě, ale přibližně 40 % bylo nalezeno v rozpustné frakci. Rekombinantní protein byl purifikován z rozpustné frakce jak je popsáno níže a byla prozkoumána jeho biologická aktivita.

Příklad 7

Purifikace rekombinantního myšního proteinu vázajícího OPG [158–316]

Zmrazené bakteriální buňky obsahující exprimovaný myší protein vázající OPG [158–316] byly rozmrazeny a resuspendovány ve 20 mM Tris–HCl pH 7,0. 10 mM EDTA. Buněčná suspenze (20% hmotnost/objem) pak byla homogenizována třemi průchody skrze mikrofluidizér. Suspenze lyzovaných buněk se centrifugovala v rotoru JA14 při 10 000 rpm po dobu 45 minut. Analýza SDS–PAGE ukázala pás přibližné molekulové hmotnosti přítomný jak v inkluzních tělískách, tak v supernatantu. Rozpustná frakce pak byla nanesena na kolonu Pharmacia SP Sepharose 4FF ekvilibrovanou 10 mM MES pH 6,0. Protein vázající OPG se eluoval v gradientu 0–0,4 M NaCl v MES pH 6,0 objemem 20x větším než objem kolony. Frakce obsahující protein vázající OPG pak byly naneseny na kolonu ABX Bakerbond ekvilibrovanou 20 mM MES pH 6,0. Protein vázající OPG se eluoval v gradientu 0–0,5 M NaCl v MES pH 6,0 objemem 15x větším než objem kolony (15CV). Konečný produkt byl při SDS–PAGE shledán homogenním z více než 95 %. N–koncové peptidové sekvencování poskytlo následující sekvenci. Met–Lys–Pro–Glu–Ala–Gln–Pro–Phe–Ala–His, která byl ztotožněna s předikovanou sekvencí pro polypeptid začínající aminokyselinovým zbytkem 158 (s iniciačním methioninem). Relativní molekulová hmotnost proteinu stanovená pomocí SDS–PAGE se při redukujících podmínkách nezměnila.

Příklad 8

Biologická aktivita rekombinantního rozpustného proteinu vázajícího OPG *in vitro*

Dříve bylo prokázáno, že rekombinantní protein OPG blokuje tvorbu osteoklastů závislou na vitamínu D3 z kostní dřeně a prekursorů sleziny v testu tvorby osteoklastů, jak bylo popsáno v patentové přihlášce US č. 08/577 788. Protože se protein vázající OPG váže na OPG a je novým členem rodiny TNF ligandů, je to potenciální cíl biologické aktivity OPG. Rekombinantní rozpustný protein vázající OPG [158–316], představující minimální doménu podobnou jádru TNF α , se testoval na svou schopnost modulovat diferenciaci osteoklastů z prekursorů osteoklastů. Buňky kostní dřeně se izolovaly z femurů dospělých myší a ošetřily se M–CSF. Neadherentní frakce se pěstovala společně s buňkami ST2 v přítomnosti či chybění vitamínu D3 a dexametazonu. Jak bylo ukázáno dříve, osteoklasty se vyvíjejí pouze ve společných kulturách obsahujících buňky stromatu (ST2), vitamín D3 a dexametazon. Přidával se rekombinantní rozpustný protein vázající OPG v různých koncentracích kolísajících od 0,16 do 500 ng/ml a zrání osteoklastů se určovalo testem s roztokem TRAP a vizuálním hodnocením. Protein vázající OPG výrazně stimuloval diferenciaci a zrání osteoklastů v závislosti na dávce, poloviny maximálního účinku bylo dosaženo v rozmezí 1 až 2 ng/ml, což svědčí pro to, že se protein chová jako silný

induktor osteoklastogeneze *in vitro* (obrázek 5). Účinek proteinu vázajícího OPG je blokován rekombinantním OPG (obrázek 6).

Aby se otestovalo, zda protein vázající OPG může nahradit vliv stromatu a přidavek steroidů, založily se tkáňové kultury s použitím různých koncentrací M-CSF pro podporu růstu osteoklastických prekurzorů a přidávala se také různá množství proteinu vázajícího OPG. Jak je ukázáno na obrázku 6, protein vázající OPG stimuloval v závislosti na dávce aktivitu TRAP, a rozsah stimulace závisel na stupni přidaného M-CSF, což svědčí pro to, že pro vývoj osteoklastů jsou klíčové tyto dva faktory dohromady. Aby se potvrdila biologická relevance tohoto posledního pozorování, založily se tkáňové kultury na kortikálních řezech z hovězí kosti a testoval se účinek M-CSF a proteinu vázajícího OPG buď samotných, nebo dohromady. Jak je ukázáno na obrázku 7, protein vázající OPG stimuloval v přítomnosti M-CSF tvorbu velkých osteoklastů TRAP pozitivních, které erodovaly povrch kosti, což mělo za následek vznik dírek. Protein vázající OPG tedy účinkuje jako osteoklastogenezi stimulující faktor (diferenční faktor). To naznačuje, že OPG blokuje vývoj osteoklastů tím, že maskuje protein vázající OPG.

Příklad 9

Aktivita rekombinantního rozpustného proteinu vázajícího OPG *in vivo*

Na základě studií *in vitro* lze soudit, že rekombinantní myší protein vázající OPG [158–316] tvořený v *E. coli* je silný induktor vývoje osteoklastů z myeloidních prekurzorů. Aby se určil jeho účinek *in vivo*, dostávali samci myši BDF1 ve věku 4 až 5 týdnů (Charles River Laboratories) subkutánní injekce proteinu vázajícího OPG [158–316] dvakrát denně tři dny a ráno čtvrtého dne (dny 0, 1, 2, a 3). Pět skupin myši ($n=4$) dostalo samotný nosič, nebo 1, 5, 25 nebo 100 μg proteinu vázajícího OPG [158–316] denně. Další 5 skupin myši ($n=4$) dostalo výše uvedené dávky nosiče nebo proteinu vázajícího OPG [158–316] a navíc dostalo lidský Fc-OPG [22–194] v dávce 1 mg/kg/den (přibližně 20 μg /den) jednou subkutánní injekcí denně. Před ošetřením se určilo ionizované kalcium plné krve v den 0 a 3 až 4 hodiny po první denní injekci proteinu vázajícího OPG [158–316] v den 1, 2 a 3. Čtyři hodiny po poslední injekci v den 3 byly myši usmrceny a odebraly se vzorky pro radiogramy.

Rekombinantní protein vázající OPG [158–316] vyvolal po dvou dnech léčení v dávce 5 μg /den a vyšší významné zvýšení ionizovaného kalcia v krvi (obrázek 8). Závažnost hyperkalcémie ukazuje silnou indukci osteoklastické aktivity, což má za následek zvýšenou resorpci kostí. Současné podávání OPG omezilo hyperkalcémii při dávce proteinu vázajícího OPG [158–316] 5 a 25 μg /den, ale ne při dávce 100 μg /den. U stejných zvířat se analyzovaly radiogramy, aby se určilo, zda protein měl vliv na hustotu minerálů kosti viditelný na rentgenovém snímku (obrázek 9). Rekombinantní protein vázající OPG [158–316] podávaný v injekcích tři dny snižoval hustotu ostí v proximální tibii myši v závislosti na dávce. Redukce hustoty kosti byla zejména zřetelná z myši dostávajících 100 μg /den, což potvrdilo, že těžká hyperkalcémie u těchto zvířat byla vyvolána zvýšenou kostní resorpcí a následného uvolnění kalcia ze skeletu. Tato data jasně svědčí pro to, že protein vázající OPG [158–316] podporuje resorpci kosti *in vivo*, což vede k systémové hyperkalcémii, a rekombinantní OPG tento vliv ruší.

Příklad 10

Klonování a exprese rozpustného proteinu vázajícího OPG v savčích buňkách

Kompletní klon myšího a lidského proteinu vázajícího OPG může být exprimován v savčích buňkách jak bylo dříve popsáno v příkladu 2. Alternativně mohou být cDNA klony modifikované tak, aby kódovaly secernované formy proteinu při jeho expresi v savčích buňkách. Aby se tak stalo, může být přirozený 5' konec cDNA kódující iniciační kodon a zahrnující přibližně prvních

69 aminokyselin proteinu, včetně transmembránové oblasti, nahrazen vedoucí sekvencí signálního peptidu. Například sekvence DNA kódující iniciační kodon a signální peptid známého genu mohou být připojeny k cDNA sekvenci proteinu vázajícího OPG se začátkem kdekoli po oblasti kódující aminokyselinový zbytek 68. O výsledných rekombinantních klonech lze předpokládat, že budou tvořit secernované formy proteinu vázajícího OPG v savčích buňkách, a mohou podstoupit posttranslační modifikace, které se normálně vyskytují v C-koncové extracelulární doméně proteinu vázajícího OPG, jako je glykosylace. S použitím této strategie byla vytvořena secernovaná forma proteinu vázajícího OPG, která má na svém 5' konci signální peptid myšního OPG, a na svém 3' konci Fc doménu lidského IgG1. Plazmidový vektor pCEP4/muOPG [22–401]–Fc, jak je popsán v patentové přihlášce US č. 08/577 788, podané 22. prosince 1995, byl štěpen NotI, aby se naštěpil mezi 3' koncem OPG a genem Fc. Linearizovaná DNA pak byla částečně štěpena s XmnI, aby se naštěpila jenom mezi zbytky 23 a 24 OPG se slepým koncem. Restrikční fragmenty pak byly defosforylovány s CIP a vektorová část tohoto fragmentu (včetně zbytků 1–23 OPG a Fc) pak byla purifikována na gelu.

Oblast cDNA myšního proteinu vázajícího OPG kódující aminokyselinové zbytky 69–316 byla amplifikována pomocí PCR při použití polymerázy Pfu (Stratagene, San Diego, CA) z plazmidového templátu s použitím následujících oligonukleotidů jako primerů:

1602-61: CCT CTA GGC CTG TAC TTT CGA GCG CAG ATG

1602-59: CCT CTG CGG CCG CGT CTA TGT CCT GAA CTT TG

Oligonukleotid 1602–61 amplifikuje 5' konec genu a obsahuje arteficiální místo StuI. Primer 1602–59 amplifikuje 3' konec genu a obsahuje arteficiální místo NotI. Výsledný získaný produkt PCR byl štěpen s NotI a StuI, a pak purifikován na gelu. Purifikovaný produkt PCR byl ligován s vektorem a pak použit k transformaci elektrokompetentních buněk *E. coli* DH10B. Výsledný klon byl sekvencován pro potvrzení integrity amplifikované sekvence a spojení restrikčních míst. Tento plazmid pak byl použit k transfekci lidských fibroblastů 293 a fúzní protein vázající OPG–Fc se pak odebíral z kultivačních médií jak bylo dříve popsáno v patentové přihlášce US č. 08/577 788, podané 22. prosince 1995.

S použitím podobné strategie byl navržen expresní vektor, který je schopný exprese na N-konci zkrácené formy fúzované s Fc doménou lidského IgG1. Tento konstrukt se skládá ze signálního peptidu myšního OPG (aa zbytky 1–21), fúzovaného v rámci ke zbytkům 158–316 myšního proteinu vázajícího OPG, následováno fúzí v rámci k Fc doméně lidského IgG1. Kvůli tomu byl plazmidový vektor pCEP4/myší OPG [22–401] (viz US 08/577 788 ze 22. prosince 1995) štěpen s HindIII a NotI, aby se odstranil celý OPG čtecí rámec. Zbytky myšního proteinu vázajícího OPG 158–316 byly amplifikovány pomocí PCR s použitím templátu z plazmidu cDNA/32D–F3 a následujících primerů:

1616-44: CCT CTC TCG AGT GGA CAA CCC AGA AGC CTG AGG CCC
AGC CAT TTG C

1602-59: CCT CTG CGG CCG CGT CTA TGT CCT GAA CTT TG

1616–44 amplifikuje protein vázající OPG začínající zbytkem 158, a také obsahující zbytky 16–21 signálního peptidu muOPG s arteficiálním místem XhoI. 1602–59 amplifikuje 3' konec genu a přidává místo NotI do rámce. Produkt PCR byl štěpen s NotI a XhoI a pak purifikován na gelu.

Následující komplementární primery byly připojeny k sobě navzájem, čímž vznikl adaptér kódující signální peptid myšního OPG a Kozakovu sekvenci obklopující iniciační místo translace:

1616-41: AGC TTC CAC CAT GAA CAA GTG GCT GTG CTG CGC ACT CCT
GGT GCT CCT GGA CAT CA

1616-42: TCG ATG ATG TCC AGG AGC ACC AGG AGT GCG CAG CAC
AGC CAC TTG TTC ATG GTG GA

5 Tyto primery byly připojeny za vzniku 5' přesahujících konců kompatibilních s HindIII na 5' konci a XhoI na 3' konci. Naštěpený vektor získaný výše, připojené oligonukleotidy a naštěpený PCR fragment byly ligovány dohromady a vneseny elektroporací do buněk DH10B. Výsledný klon byl sekvencován pro potvrzení autentické rekonstrukce spojení mezi signálním peptidem, fragmentem proteinu vázajícího OPG kódujícího zbytky 158–316 a Fc doménou IgG1. Rekombinantní plazmid byl purifikován, transfekován do lidských fibroblastů 293 a produkt byl exprimován v médiu, jak bylo popsáno výše.

10 Kompletní myší a lidská cDNA byly klonovány v expresním vektoru pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA), a pak transfekovány do kultur lidských fibroblastů 293, jak je popsáno v příkladu 1. Selekcce buněčných kultur se prováděla hygromycinem, jak je popsáno výše, a byla připravena upravená média bez séra. Upravená média byla nanášena na kolonu s imobilizovaným rekombinantním OPG a oddělené formy myšího a lidského rekombinantního proteinu vázajícího OPG se
15 afinitně purifikovaly. Sekvenční analýza N–konce purifikovaných rozpustných proteinů vázajících OPG ukazuje, že myší protein se přednostně štěpí před fenylalaninem 139 a lidský protein se přednostně štěpí před homologním zbytkem izoleucinem 140. Kromě toho se lidský protein také přednostně štěpí před glycinem 145. To svědčí pro to, že přirozeně se vyskytující rozpustné formy lidského proteinu vázajícího OPG mají aminokoncové zbytky buď izoleucin v pozici 140,
20 nebo glycin v pozici 145.

Příklad 11

25 Peptidy proteinu vázajícího OPG a příprava polyklonálních a monoklonálních protilátek k proteinu

30 Protilátky ke specifickým oblastem proteinu vázajícího OPG mohou být získány imunizací peptidy z proteinu vázajícího OPG. Tyto peptidy mohou být použity samotné nebo mohou být pro imunizaci použity konjugované formy peptidu.

35 Krystalická struktura maturovaného TNF α byla popsána v práci E. Y. Jones, D.I. Stuart a N.P.C. Walker (J. Cell Sci. Suppl. 13, 11 až 18, 1990) a monomer tvoří sendvičovou strukturu antiparalelních β –skládaného listu s topologií „svinuté palačinky“. V této krystalické struktuře se vyskytuje deset antiparalelních β –pásů a tvoří β –sendvič s jedním β –listem, který se skládá z pásů B'BIDG, a druhým listem z pásů C'CHEF (viz E. Y. Jones et al., výše). Ze studia mutagenese se odvozuje, že dvě smyčky maturovaného TNF α tvoří kontakty s receptorem, a že to jsou smyčky tvořené mezi beta pásem B a B' a smyčka mezi beta pásy E a F (C. R. Goh, C–S. Loh a A. G. Porter, Protein Engineering, 4, 785 až 791, 1991). Byla rozřešena krystalická
40 struktura komplexu tvořeného mezi TNF β a extracelulární doménou 55 kD receptoru TNF (TNF–R55) a byly popsány kontakty receptor–ligand (D. W. Banner, A. D'Arcy, W. Janes, R. Gentz, H. J. Schoenfeld, C. Broger, H. Loetscher a W. Lesslauer, Cell. 73, 431 až 445, 1993). V souladu se studiemi mutagenese popsanými výše (C. R. Goh et al., výše) se shledalo, že odpovídající smyčky BB' a EF ligandu TNF β tvoří většinu kontaktů s receptorem v odhalené
45 krystalické struktuře komplexu TNF β :TNF–R55. Aminokyselinová sekvence myšího proteinu vázajícího OPG byla srovnána s aminokyselinovou sekvencí TNF α a TNF β . Na základě tohoto

srovnání byly předpověděny oblasti myšího proteinu vázajícího OPG odpovídající smyčkám BB' a EF a byly navrženy peptidy, které jsou popsány níže.

Antigen(y):

Rekombinantní myší protein vázající OPG [158–316] byl použit jako antigen (ag) pro imunizaci zvířat, jak je popsáno níže, a bylo vyšetřeno sérum s použitím přístupů popsaných níže. Byly syntetizovány peptidy k předpokládaným smyčkám BB' a EF myšího proteinu vázajícího OPG a byly použity pro imunizaci, tyto peptidy jsou:

Peptid BB' smyčky: NH₂--NAASIPSGSHKVTLSSWYHDRGWAKIS--COOH

Cys-peptid BB' smyčky: NH₂--NAASIPSGSHKVTLSSWYHDRGWAKISC--
--COOH

Peptid EF smyčky: NH₂--VYVVKTSIKIPSSHNLM--COOH

Cys-peptid EF smyčky: NH₂--VYVVKTSIKIPSSHNLMC--COOH

Peptidy s cysteinovým zbytkem na karboxylovém konci byly použity pro konjugaci s použitím metod popsaných v části B níže a byly použity pro imunizaci.

B. Konjugace s hemocyaninem z přílipky *Fissurella* sp. nebo s albuminem bovinního séra:

Vybrané peptidy nebo proteinové fragmenty mohou být konjugovány s hemocyaninem z přílipky *Fissurella* sp. (KLH, keyhole limpet hemocyanin), aby se zvýšila jejich schopnost imunizovat zvířata. V protokolu EIA mohou být použity také peptidy nebo proteinové fragmenty konjugované s albuminem bovinního séra (BSA). Maleimidem aktivovaný KLH nebo BSA (Pierce Chemical Company, Rockford, IL) se rekonstituuje v dH₂O na konečnou koncentraci 10 mg/ml. Peptid nebo proteinové fragmenty se rozpustí ve fosforečnanovém pufru a pak se smísí s ekvivalentní hmotností (g/g) KLH nebo BSA. Konjugační směs se ponechá reagovat 2 hodiny při teplotě místnosti za jemného míchání. Roztok se pak nechá projít odsolovací kolonou nebo se dialyzuje proti PBS přes noc. Peptidový konjugát se uloží v -20 °C dokud se nepoužije pro imunizaci nebo v EIA.

Imunizace:

Myším Balb/c (Charles River Laboratories, Wilmington, MA), krysám Lou nebo králíkům (Novozélandský bílý) byl subkutánně injekčně (SQI) podán ag (50, 150 a 100 µg, v uvedeném pořadí), emulgován v kompletním Freundově adjuvans (CFA, 50% objem/objem, Difco Laboratories, Detroit, MI). Králíci pak dostávali dvakrát nebo třikrát ve dvoutýdenních intervalech zesilovací antigenu připraveného podobným způsobem v nekompletním Freundově adjuvans (ICFA, Difco Laboratories, Detroit, MI). Myši a krysy dostávaly zesilovací dávku přibližně každé 4 týdny. Sedm dnů po druhé injekci se odebíraly zkušební vzorky krve a určovaly se titry protilátek v séru. Když se objevily titry u králíků, odebíralo se 6 následujících týdnů 50 ml krve týdně. Myši a krysy se vybíraly na základě sérové hladiny titru pro tvorbu hybridomu, byla použita zvířata s polovičním maximálním titrem větším než 5000. Odborník může provést úpravy imunizačního protokolu, například nyní jsou dostupné různé typy imunomodulátorů, které mohou být do tohoto protokolu zahrnuty.

D. Test s enzymem vázaným na imunosorbent (EIA, Enzyme-linked immunosorbent assay):

EIA se může provádět pro určení titrů sérových protilátek (ab) u jednotlivých zvířat a později pro screening potenciálních hybridomů. 96 jamkové mikrotitrační EIA/RIA destičky s plochým dnem a vysokou schopností (Costar Corporation, Cambridge, MA) byly povlečeny purifikovaným rekombinantním nebo proteinovými fragmenty (antigen, ag) v množství 5 µg per ml v uhličitano-hydrogenuhlíčanovém pufru, pH 9,2 (0,015 M Na₂CO₃, 0,035 M NaHCO₃). Proteinové fragmenty mohou být konjugovány s albuminem bovinního séra (BSA), je-li to nutné. 50 µl ag se přidalo do každé jamky. Destičky pak byly pokryty acetátovým filmem (ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA) a inkubovaly se při teplotě místnosti na kývacím stolečku 2 hodiny nebo přes noc ve 4 °C. Destičky se blokovaly 30 minut při teplotě místnosti (rt) 250 µl) na jamku 5% roztoku BSA připraveného smísením 1 části ředidla BSA/koncentrátu blokovacího roztoku (Kirkegaard a Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) s 1 částí deionizované vody (dH₂O). Blokovací roztok byl odstraněn, do každé jamky se přidalo 50 µl dvojkového ředění séra (1:100 až 1:12 800) nebo supernatantu tkáňové kultury hybridomu. Sérum je ředěno 1% BSA (10% BSA ředidlo/koncentrát blokovacího roztoku ředěno 1:10 Dulbeccovým fyziologickým roztokem pufovaným fosforečnanem, D-PBS, Gibco BRL, Grand Island, NY), zatímco supernatanty hybridomu se testovaly neředěné. V případě screeningu hybridomů je jedna jamka udržována jako kontrola konjugátu a druhá jamka jako pozitivní ab kontrola. Destičky se opět inkubují při teplotě místnosti, kývají 1 hodinu a pak se 4 x promyjí 1x ředěním 20x koncentrovaného promývacího roztoku (Kirkegaard a Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) v dH₂O. Sekundární ab konjugovaná s křenovou peroxidázou (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) ředěná v 1% BSA se pak v každé jamce inkubuje 30 minut. Destičky se promyjí jako předtím, odsají do sucha, a přidá se jednosložkový substrát ABTS peroxidáza (Kirkegaard a Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD). Pro každou jamku se odečte absorbance ve 405 nm za použití odečítacího přístroje Microplate EL310 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT). Poloviční maximální titr sérové protilátky se vypočte vnesením log₁₀ sérového ředění proti optické denzitě při 405 nm, a pak extrapolací 50% bodu maximální optické denzity získané pro toto sérum. Hybridomy se vybíraly jako pozitivní, jestliže hodnota optické denzity je větší než pětinašobek pozadí. Mohou se provést úpravy tohoto protokolu, například může být vybrána konjugovaná sekundární protilátka pro svou specifickou nebo proto, že neprojevuje zkříženou reaktivitu.

Fúze buněk:

Zvířeti vybranému pro vytvoření hybridomu se intravenózně injikuje 50 až 100 µg ag v PBS. Čtyři dny později se zvíře usmrtí oxidem uhličitým a za sterilních podmínek se mu odebere slezina do 35 ml Dulbeccova modifikovaného Eagleho média obsahujícího 200 U/ml penicilinu G, 200 µg/ml streptomycinsulfátu a 4 mM glutamin (2x P/S/G DMEM). Slezina je očištěna od přebytečné tukové tkáně, a pak propláchnuta ve čtyřech miskách s čistým 2x P/S/G DMEM. Poté je přenesena do sterilního vaku Stomacher (Tekmar, Cincinnati, OH) obsahujícího 10 ml 2x P/S/G DMEM a rozrušena na suspenzi jednotlivých buněk pomocí zařízení Stomacher Lab Blender 80 (Seward Laboratory, UAC House, London, England). Když jsou buňky uvolněny z pouzdra sleziny do média, odstraní se z vaku a přenesou do sterilní 50 ml kónické centrifugační zkumavky (Becton Dickinson and Company, Lincoln Park, NJ). Do vaku se přidá čerstvé médium a v postupu se pokračuje, dokud není uvolněn veškerý buněčný obsah sleziny. Splenocyty se 3x promyjí pomocí centrifugace v 225 x g 10 minut. Současně se podobným způsobem promyjí kultury myelomových buněk v log fázi, Sp2/0-Ag14 nebo Y3-Ag1.2.3 pro myši nebo krysí splenocytové fúze (American Type Culture Collection, Rockville, MD) pěstované v kompletním médiu (DMEM, 10% inaktivované fetální bovinní sérum, 2 mM glutamin, 0,1 mM neesenciální aminokyseliny, 1 mM pyruvát sodný a 10 mM hepes pufr, Gibco Laboratories, Grand Island, NY). Splenocyty se spojí s myelomovými buňkami a znovu se peletují. Z buněčného peletu se odsálo médium a buňky se jemně smísily během 1 minuty se 2 ml polyethylenglykolu 1500 (PEG 1500, Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN). Pak se pomalu přidal stejný objem 2x P/S/G DMEM. Buňky se ponechaly fúzovat 2 minuty při 37 °C, a pak se

přidalo dalších 6 ml 2x P/S/G DMEM. Buňky se opět nechaly ve 37 °C 3 minuty. Nakonec se k buněčné suspenzi přidalo 35 ml 2x P/S/G DMEM a buňky se peletovaly stočením. Z peletu se odsálo médium a buňky se jemně resuspendovaly v kompletním médiu. Buňky se rozptýlily na 96 jamkové destičky pro tkáňové kultury s plochým dnem (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) jednou kapkou z 5ml pipety. Destičky se inkubovaly přes noc ve zvlhčovaném vzduchu s 5% CO₂ při 37 °C. Příští den se do každé jamky přidal stejný objem selekčního média. Selekční médium sestávalo z 0,1 mM hypoxanthinu, 4 x 10⁻⁴ mM aminopterinu a 1,6 x 10⁻² mM thymidinu v kompletním médiu. Fúzní destičky se inkubovaly 7 dnů, pak během dalších tří dnů se dvakrát vyměnilo médium, po každé výměně se použilo HAT selekční médium. Supernatanty tkáňových kultur se odebíraly 3 až 4 dny po poslední výměně tekutin z každé jamky obsahující hybrid a testovaly se pomocí EIA na specifickou protilátkovou reaktivitu. Tento protokol byl modifikován podle protokolu v práci Hudsona a Haye (Practical Immunology, druhé vydání, Blackwell Scientific Publications).

Příklad 12

Klonování receptoru proteinu vázajícího OPG exprimovaného v hemopoetických prekursorových buňkách

Biologicky aktivní rekombinantní myší protein vázající OPG [158–316] se konjugoval s fluorescein–izothiokyanátem (FITC) za vzniku fluorescenční sondy. Fluorescenční značení se provádělo inkubací rekombinantního myšího proteinu vázajícího OPG [158–316] se sukcinylmylesterem 6–fluorescein–5–(a 6)karboxyamidohexanové kyseliny (Molecular Probes, Eugene, OR) v molárním poměru 1:6 12 hodin ve 4 °C. Protein vázající OPG [158–316] značený FITC se dále purifikoval gelovou filtrační chromatografií. Buňky kostní dřeně myši se izolovaly a inkubovaly v kultuře za přítomnosti CSF–1 a proteinu vázajícího OPG [158–316], jak je popsáno v příkladu 10. Buňky kostní dřeně myši se pěstovaly přes noc v CSF–1 (30 ng/ml) a proteinu vázajícího OPG [158–316] (20 ng/ml). Nejdříve se odstranily neadherující buňky a uložily na ledu a zbývající adherentní buňky se odstranily inkubací s pufrem pro disociaci buněk (Sigma Chemicals, St. Louis, MO), spojily se neadherující populací a označily s FITC–proteinem vázajícím OPG, jak je popsáno výše. Po promytí a resuspendování v PBS s 0,5% BSA se buňky vystavily FITC–proteinu vázajícímu OPG, promyly a třídily pomocí FACS. Populace buněk, které byly pozitivní na značení FITC–proteinem vázajícím OPG se soustředila a izolovala se mRNA, jak je popsáno v příkladu 2. Tento preparát mRNA se použil pro přípravu cDNA knihovny následující postupy popsané v příkladu 2.

cDNA knihovna tvořená z tohoto zdroje byla použita pro náhodnou EST sekvenační analýzu, jak bylo dříve popsáno v PCT přihlášce č. WO97/23614 a v práci Simoneta et al. (Cell, 89, 309–319, 1997). S použitím této metody byla objevena cDNA o velikosti ~2,1 kb, která kóduje nový protein příbuzný TNFR. Dlouhý otevřený čtecí rámec cDNA myšího ODAR kóduje protein o 625 aminokyselinových zbytcích a obsahuje charakteristické znaky proteinů příbuzných s TNFR: hydrofobní signální peptid na N–konci, čtyři sekvence tandemové repetice bohaté na cystein, hydrofobní transmembránovou doménu a cytoplazmatickou signální doménu. Homologie tohoto proteinu s jinými členy rodiny receptoru TNF a jeho exprese v buňkách kostní dřeně, které vážou protein vázající OPG značený FITC, svědčí pro to, že je to potenciální receptor pro protein vázající OPG, který je příbuzný s TNF. Tento protein je označen ODAR neboli osteoklastový diferenciací a aktivační receptor. Sekvence nukleové kyseliny a predikovaná aminokyselinová sekvence myšího ODAR je ukázána na obrázku 10.

Nedávná analýza sekvencí z veřejně dostupných databází naznačuje, že tento protein je myší homolog lidského proteinu příbuzného s TNFR známého jako RANK (Anderson et al., Nature, 390, 175–179, 1997).

Příklad 13

Příprava rekombinantního proteinu ODAR v savčích buňkách

- 5 Rozpustná extracelulární doména ODAR fúzovaná k oblasti Fc lidského IgG1 se připravila s použitím postupů pro konstrukci a expresi Fc fúzních proteinů, jak bylo dříve popsáno v dokumentu WO97/23614 a v práci Simoneta et al., výše. Aby se v savčích buňkách tvořil rozpustný protein ODAR, byla pomocí PCR amplifikována cDNA kódující extracelulární doménu myšího ODAR (aminokyseliny 27–211) s následující sadou oligonukleotidových primerů:

5'-TCT CCA AGC TTG TGA CTC TCC AGG TCA CTC C-3'

10 5'-TCT CCG CGG CCG CGT AAG CCT GGG CCT CAT TGG GTG-3'

- Reakce PCR se prováděly v objemu 50 μ l s 1 jednotkou DNA polymerázy Vent (New England Biolabs) ve 20 mM Tris-HCl, pH 8,8, 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% Triton-X100, 10 μ M každého dNTP, 1 μ M každého primeru a 10 ng cDNA templátu ODAR. Reakce se prováděly v 94 °C 30 s, 55 °C 30 s a 72 °C 1 minutu, celkem 16 cyklů. Fragment PCR se izoloval elektroforézou. Fragment PCR tvořil restrikční místo HindIII na 5' konci a restrikční místo NotI na 3' konci. PCR fragment štěpený HindIII a NotI byl pak subklonován do rámce do modifikovaného vektoru pCEP4-Fc před sekvencí těžkého řetězce lidského IgG- γ 1, jak bylo dříve popsáno ve WO97/23614 a v práci Simoneta et al., výše. Byla vnesena spojka, která kóduje dvě irelevantní aminokyseliny vytvářející spojení mezi extracelulární doménou ODAR a Fc oblastí IgG.

- 20 Konstrukt pak byl štěpen s NheI a HindIII do rámce byl vložen následující spojený oligonukleotidový pár kódující signální peptid OPG (aminokyseliny 1–21):

5'-CTA GCA CCA TGA ACA AGT GGC TGT GCT GCG CAC TCC TGG TGC
TCC TGG ACA TCA TTG AAT GGA CAA CCC AGA-3'

5'-AGC TTC TGG GTT GTC CAT TCA ATG ATG TCC AGG AGC ACC AGG
AGT GCG CAG CAC AGC CAC TTG TTC ATG GTG-3'

- 25 Spojka, která kóduje dvě irelevantní aminokyseliny byla vnesena mezi sekvence signálního peptidu OPG a ODAR. Konečný sestrojený konstrukt (ODAR-Fc/pCEP4) kóduje fúzní protein, který obsahuje od aminokonce ke karboxylovému konci: signální peptid OPG (aminokyseliny 1–21)–spojka (lysLeu)–ODAR (aminokyseliny 27–211)–spojka (AlaAla)–lidský IgG Fc.

- 30 Konstrukt byl transfekován do buněk 293-EBNA-1 kalciumfosforečnanovou metodou, jak je popsána (Ausubel et al., Curr. Prot. Mol. Biol. 1, 9.1.1–9.1.3, 1994). Transfekované buňky pak byly selektovány v 200 μ g/ml hygromycinu (Gibco BRL) a výsledné kultury rezistentní na lék byly spojeny a pěstovány až dosáhly konfluency. Buňky byly promyty jednou v PBS a pak pěstovány v médiu bez séra 72 hodin. Upravená média se odebrala. Fúzní protein ODAR-Fc v médiu se detekoval analýzou westernova přenosu a proti-lidskou protilátkou IgG Fc.

- 35 Fúzní protein Fc se purifikoval pomocí chromatografie na koloně s proteinem-A (Pierce) s použitím postupu doporučeného výrobcem. 50 pmol purifikovaného proteinu pak podstoupilo analýzu N-koncové sekvence automatizovanou Edmanovou degradací, jak byla původně popsána autorem Matsudaira et al. (J. Biol. Chem., 262, 10–35, 1987). Po 10 cyklech byla odečtena následující aminokyselinová sekvence:
- 40



Vazebná aktivita ODAR-Fc s proteinem vázajícím OPG se vyšetřovala imunofluorescenčním značením kultur transfekovaných buněk COS-7, jak je popsáno v příkladu 2. Do buněk COS-7 byl pomocí lipofektinu vnesen 1 µg expresního vektoru obsahujícího DNA kódující myší protein vázající OPG. Po 48 hodinách inkubace se pak buňky inkubovaly 1 hodinu při 4 °C v roztoku PBS-FBS obsahujícím 10 µg/ml lidského proteinu IgG Fc, ODAR-Fc nebo OPG-Fc. Pak byly buňky dvakrát promyty PBS a inkubovaly se další hodinu v roztoku PBS-FBS obsahujícím 20 µg/ml koziho proti-lidského IgG značeného FITC (Southern Biotech Associates). Po promytí PBS se buňky vyšetřovaly konfokálním mikroskopem (ACAS, Ultima, Insight Biomedical Imaging, Inc., Okemos, MI). Oba, ODAR-Fc a OPG-Fc se vážou na OPGL transfekované buňky COS-7 (obrázek 11).

Příklad 14

Biologická aktivita rekombinantního rozpustného ODAR *in vitro*

Schopnost ODAR inhibovat stimulaci tvorby osteoklastů prostřednictvím proteinu vázajícího OPG se určovala v kultuře kostní dřeně myší za přítomnosti CSF-1 (30 ng/ml) a proteinu vázajícího OPG (5 ng/ml). Postupy, jak použít kultury kostní dřeně myší pro studium maturace osteoklastů, jsou popsány v dokumentu WO 97/23614 a v příkladu 8. Fúzní protein ODAR-Fc, vytvořený jak je popsáno v příkladu 12, se přidával v koncentracích od 65 do 1500 ng/ml. Tvorba osteoklastů se určovala cytochemickým postupem s alkalickou fosfatázou rezistentní na tartrát (TRAP) a testem roztoku TRAP po 5 dnech kultury.

Jak při cytochemickém postupu, tak při stanovení aktivity TRAP se pozorovala inhibice tvorby osteoklastů fúzí ODAR-Fc závislá na dávce (obrázek 12). Fúzní protein ODAR-Fc inhiboval tvorbu osteoklastů s ED₅₀ přibližně 10 až 50 ng/ml.

Příklad 15

Biologická aktivita rekombinantního rozpustného ODAR *in vivo*

Mladí rychle rostoucí samci myší BDF1 staří 3 až 4 týdny dostávali různé dávky fúzního proteinu ODAR-Fc v nosiči (PBS/0,1% BSA) 4 dny jednou denní subkutánní injekcí. Myši se v den 5 rentgenovaly. Použité dávky fúzního proteinu ODAR-Fc byly 0,5, 1,5 a 5 mg/kg/den. Pro každé ošetření byly myši též skupiny a kontrolní skupiny, které dostaly PBS/0,1% BSA, rentgenovány na jeden film. Mezi páry kontrolních a ošetřených tibií se porovnávala metafyzální oblast proximální tibie a ohodnocovala se jako „+“, jestli měla ošetřená tibie vyšší densitu při vizuálním hodnocení než kontrola dávající 8 bodů ukázaných níže. Pro „pozitivní“ výsledek se vyžadovalo arbitrární skóre 5/8. (Dávka je v mg/kg/den). (n=4).

Po usmrcení zvířat byla každému zvířeti odstraněna pravá tibie a měřila se hustota kosti v proximální tibiální metafýze periferní kvantitativní počítačovou tomografií (pQCT) (Stratec, Německo). Dva příčné řezy kostí o velikosti 0,5, 1,5 a 2,0 mm z proximálního konce tibie se analyzovaly (XMICE 5.2, Stratec, Německo), aby se určila celková hustota minerálů kosti v metafýze. Pro určení hranice metafyzální kosti od měkké tkáně byl použit separační práh 1500.

Podávání ODAR-Fc inhibovalo u mladých rostoucích myší resorpci kosti v růstové destičce proximální tibie za tvorby oblasti zvýšené hustoty kosti, která byla okem viditelná na radiografu. Radiografické změny byly patrné při dávce 1,5 mg/kg/den a výše ve dvou pokusech (tabulka 1). Měření hustoty kosti pomocí pQCT u vzorků z druhého pokusu v podobné oblasti tibie potvrdilo u těchto myší zvýšení hustoty kosti závislé na dávce (obrázek 13).

Tabulka 1: Inhibice resorpce kosti fúzním proteinem ODAR-Fc

Pokus č. 1

Faktor	Dávka	1	2	3	4	5	6	7	8	Výsledek
ODAR-Fc	5,0	+	+	+	+	+	+	+	+	Pozitivní 8/8
ODAR-Fc	1,5	-	+	+	-	+	+	+	+	Pozitivní 6/8
ODAR-Fc	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	Negativní 0/8
ODAR-Fc	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	Negativní 0/8

Pokus č. 2

Faktor	Dávka	1	2	3	4	5	6	7	8	Výsledek
ODAR-Fc	5,0	+	+	+	+	+	+	+	+	Pozitivní 8/8
ODAR-Fc	1,5	+	+	+	+	+	+	+	+	Pozitivní 8/8
ODAR-Fc	0,5	-	-	-	+	-	-	-	-	Negativní 1/8

Zatímco byl předkládán vynález popsán pomocí výhodných provedení, rozumí se, že odborníci jsou zjevné variace a modifikace. Předkládaný vynález, definovaný připojenými patentovými nároky, tudíž pokrývá všechny takové variace, které spadají do rozsahu vynálezu, jak je popsán v patentové přihlášce.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Izolovaná nukleová kyselina zvolená ze souboru zahrnujícího:

a) nukleovou kyselinu obsahující nukleotidovou sekvenci polypeptid-kódující oblasti podle obr. 1 (sekvence i.č. 1) nebo obr. 4 (sekvence i.č. 3);

b) nukleovou kyselinu kódující protein vázající osteoprotegerin podle obr. 1 (sekvence i.č. 2) nebo obr. 4 (sekvence i.č. 4); a

c) nukleovou kyselinu kódující fragment proteinu vázajícího osteoprotegerin podle obr. 1 (sekvence i.č. 2) nebo obr. 4 (sekvence i.č. 4), který váže osteoprotegerin.

2. Nukleová kyselina podle nároku 1, kterou je cDNA, genomová DNA, syntetická DNA nebo RNA.

3. Polypeptid, který je kódován nukleovou kyselinou podle nároku 1.

4. Nukleová kyselina podle nároku 1 zahrnující jeden nebo více kodonů výhodných pro expresi v *Escherichia coli*.

5. Nukleová kyselina podle nároku 1, která má na sebe navázanou detekovatelnou značku.

6. Nukleová kyselina kódující polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci zbytků 1–316 nebo zbytků 70–316 podle obr. 1 (sekvence i.č. 2).
- 5 7. Nukleová kyselina kódující polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci zbytků 1–317 nebo zbytků 69–317 podle obr. 4 (sekvence i.č. 4).
8. Nukleová kyselina podle nároku 1, ve které fragment obsahuje rozpustnou nebo zkrácenou formu proteinu vázajícího osteoprotegerin.
- 10 9. Nukleová kyselina podle nároku 8 kódující polypeptid obsahující zbytky 69–317 podle obr. 4 (sekvence i.č. 4) a jeho zkrácené verze, které vážou osteoprotegerin.
- 15 10. Expresní vektor obsahující nukleovou kyselinu podle nároku 1.
11. Expresní vektor podle nároku 10, ve kterém nukleová kyselina obsahuje oblast kódující polypeptid podle obr. 1 (sekvence i.č. 2) nebo obr. 4 (sekvence i.č. 4).
- 20 12. Hostitelská buňka transfekovaná expresním vektorem podle nároku 10.
13. Hostitelská buňka podle nároku 12, kterou je eukaryotická nebo prokaryotická buňka.
14. Hostitelská buňka podle nároku 13, kterou je *Escherichia coli*.
- 25 15. Způsob výroby proteinu vázajícího osteoprotegerin, **v y z n a ě n ý t í m**, že zahrnuje:
 kultivaci za vhodných nutričních podmínek hostitelských buněk transformovaných nebo trans-
 fekovaných nukleovou kyselinou podle nároku 1; a izolaci polypeptidového produktu exprese
 nukleové kyseliny.
- 30 16. Izolovaný protein vázající osteoprotegerin obsahující aminokyselinovou sekvenci podle obr. 1 (sekvence i.č. 2) nebo obr. 4 (sekvence i.č. 4) nebo jeho fragment, který váže osteoprotege-
 rin.
- 35 17. Protein podle nároku 16 obsahující aminokyselinovou sekvenci podle obr. 4 (sekvence i.č. 4).
18. Protein podle nároku 16, kterým je rozpustný protein vázající osteoprotegerin.
- 40 19. Protein podle nároku 16, který je kovalentně modifikován polymerem rozpustným ve vodě.
20. Protein podle nároku 19, kde polymerem je polyethylenglykol.
21. Protein podle nároku 16, obsahující aminokyselinovou sekvenci ze zbytků 70–316 včetně
 45 podle obr. 1 (sekvence i.č. 2) nebo její fragment, který váže osteoprotegerin.
22. Protein podle nároku 16 obsahující aminokyselinovou sekvenci ze zbytků 69–317 včetně
 podle obr. 4 (sekvence i.č. 4) nebo její fragment, který váže osteoprotegerin.
- 50 23. Protilátka nebo její fragment, která specificky váže protein vázající osteoprotegerin podle
 nároku 16.
24. Protilátka podle nároku 23, kterou je monoklonální protilátka.
- 55 25. Protilátka podle nároku 23, kterou je rekombinantní protilátka.

26. Protilátka podle nároku 23, kterou je chimerická nebo CDR–roubovaná protilátka.

27. Protilátka podle nároku 23, kterou je lidská protilátka.

28. Protilátka podle nároku 23, kde protilátkou je antagonist proteinu vázajícího osteoprotegerin, který snižuje tvorbu osteoklastů.

29. Protilátka podle nároku 23, kde se protilátka váže k extracelulární doméně proteinu vázajícího osteoprotegerin sekvence i.č. 4 nebo k fragmentu extracelulární domény proteinu vázajícího osteoprotegerin sekvence i.č. 4.

30. Způsob detekce přítomnosti proteinu vázajícího osteoprotegerin v biologickém vzorku, **v y z n a ě n ý t í m**, že zahrnuje:

- inkubaci vzorku s protilátkou podle nároku 23 in vitro za podmínek, které umožňují vázání protilátky k proteinu vázajícího osteoprotegerin; a
- detekci vázané protilátky.

31. Způsob detekce přítomnosti osteoprotegerinu v biologickém vzorku, **v y z n a ě n ý t í m**, že zahrnuje:

- inkubaci vzorku s proteinem vázajícím osteoprotegerin obsahujícím aminokyselinovou sekvenci podle obr. 1 (sekvence i.č. 2) nebo obr. 4 (sekvence i.č. 4) nebo její fragment vázající osteoprotegerin in vitro za podmínek, které umožňují vázání proteinu k osteoprotegerinu; a
- měření vazby proteinu vázajícího osteoprotegerin.

32. Způsob vyhodnocení schopnosti testované sloučeniny vázat se na protein vázající osteoprotegerin, **v y z n a ě n ý t í m**, že zahrnuje:

- inkubaci proteinu vázajícího osteoprotegerin a obsahujícího aminokyselinovou sekvenci podle obr. 1 (sekvence i.č. 2) nebo obr. 4 (sekvence i.č. 4) nebo její fragment, který váže osteoprotegerin, s testovanou sloučeninou in vitro za podmínek, které umožňují uvedenou vazbu; a
- měření vázané sloučeniny.

33. Způsob podle nároku 32, **v y z n a ě n ý t í m**, že sloučeninou je agonista nebo antagonist proteinu vázajícího osteoprotegerin.

34. Použití nukleové kyseliny komplementární k nukleové kyselině podle obr. 1 (sekvence i.č. 1) nebo obr. 4 (sekvence i.č. 3) pro přípravu léčiva pro regulaci exprese proteinu vázajícího osteoprotegerin.

35. Protein podle nároku 16 obsahující aminokyselinovou sekvenci ze zbytků 158–317 podle obr. 4 (sekvence i.č. 4).

36. Protein podle nároku 16 obsahujícího aminokyselinovou sekvenci ze zbytků 140–317 podle obr. 4 (sekvence i.č. 4).

37. Způsob vyhodnocení schopnosti testované sloučeniny zvyšovat nebo snižovat míru vazby proteinu vázajícího osteoprotegerin k osteoklastovému diferenciačnímu a aktivačnímu receptoru, **v y z n a ě n ý t í m**, že zahrnuje:

- inkubaci proteinu vázajícího osteoprotegerin obsahujícího aminokyselinovou sekvenci podle obr. 1 (sekvence i.č. 2) nebo obr. 4 (sekvence i.č. 4) nebo její fragment, analog nebo derivát, osteoklastového diferenciačního a aktivního receptoru obsahujícího aminokyselinovou sekvenci podle obr. 10 (sekvence i.č. 43) nebo její lidský homolog nebo fragment, analog nebo derivát a případně testované sloučeniny za podmínek umožňujících vazbu proteinu vázajícího osteoprotegerin k osteoklastovému diferenciačnímu a aktivnímu receptoru; a
 - měření vazby proteinu vázajícího osteoprotegerin k osteoklastovému diferenciačnímu a aktivnímu receptoru v nepřítomnosti nebo přítomnosti testované sloučeniny.
- 38.** Použití sloučeniny jako modulátoru proteinu vázajícího osteoprotegerin pro přípravu léčiva pro prevenci nebo léčení nemoci kostí, při kterém je sloučeninou protilátka nebo její fragment, který váže OPGbp podle obr. 4 (sekvence i.č. 4) a je antagonistou OPGbp.
- 39.** Použití podle nároku 38, při kterém protilátkou je monoklonální protilátka nebo její fragment.
- 40.** Použití podle nároku 38, při kterém protilátkou je rekombinantní protilátka nebo její fragment.
- 41.** Použití podle nároku 38, při kterém protilátkou je chimerická protilátka nebo CDR–robovaná protilátka.
- 42.** Použití podle nároku 38, při kterém protilátkou je lidská protilátka nebo její fragment.
- 43.** Použití podle nároku 38, při kterém se protilátka nebo její fragment váže k extracelulární doméně OPGbp nebo se váže k fragmentu extracelulární domény OPGbp.
- 44.** Použití podle nároku 38, při kterém se protilátka nebo její fragment váže na s membránou sdruženou formu OPGbp.
- 45.** Použití podle nároku 38, při kterém se protilátka nebo její fragment váže k rozpustné formě OPGbp.
- 46.** Použití podle nároku 38, při kterém je sloučenina použita v kombinaci s farmaceuticky přijatelným ředidlem, nosičem, solubilizačním činidlem, emulgačním činidlem, konzervačním činidlem a/nebo adjuvantem.
- 47.** Použití podle nároku 38, při kterém je dále zahrnuto podání jednoho nebo více kostního morfogenního faktoru, zvoleného ze souboru zahrnujícího BMP–1 až BMP–12, transformačního růstového faktoru beta, členu skupiny transformačního růstového faktoru beta, fibroblastového růstového faktoru zvoleného ze souboru zahrnujícího FGF–1 až FGF–10, inhibitoru interleukinu–1, inhibitoru TNF alfa, parathyroidálního hormonu, prostaglandinu řady E, bifosfonátu nebo minerálu zlepšujícího stav kostí.
- 48.** Použití podle nároku 38, při kterém je nemoc kostí zvolena ze souboru zahrnujícího osteoporózu, osteomyelitidu, hyperkalcemii, osteopenii sdruženou s chirurgickým zákrokem, Pagetovu nemoc, osteonekrózu, úbytek kostní hmoty v důsledku revmatoidní artritidy, periodontální úbytek kostní hmoty, protetické uvolňování a osteolytickou metastázu.

13 sekvencí

+

30 výkresů

Seznam sekvenci

<210> 1
 <211> 2295
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (158)..(1105)

<400> 1
 gagctcggat ccactactcg acccaccggt ccggccagga cctctgtgaa ccggtcgggg
 60

cgggggccgc ctggccggga gtctgctcgg cggtgggtgg ccgaggaagg gagagaacga
 120

tcgaggagca gggcgcccga actccgggcg ccgcgcc atg cgc cgg gcc agc cga
 175

Met Arg Arg Ala Ser Arg
 1 5

gac tac ggc aag tac ctg cgc agc tcg gag gag atg ggc agc ggc ccc
 223

Asp Tyr Gly Lys Tyr Leu Arg Ser Ser Glu Glu Met Gly Ser Gly Pro
 10 15 20

ggc gtc cca cac gag ggt ccg ctg cac ccc gcg cct tct gca ccg gct
 271

Gly Val Pro His Glu Gly Pro Leu His Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala
 25 30 35

ccg gcg ccg cca ccc gcc gcc tcc cgc tcc atg ttc ctg gcc ctc ctg
 319

Pro Ala Pro Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met Phe Leu Ala Leu Leu
 40 45 50

ggg ctg gga ctg ggc cag gtg gtc tgc agc atc gct ctg ttc ctg tac
 367

Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Ile Ala Leu Phe Leu Tyr
 55 60 65 70

ttt cga gcg cag atg gat cct aac aga ata tca gaa gac agc act cac
 415

Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser Glu Asp Ser Thr His
 75 80 85

tgc ttt tat aga atc ctg aga ctc cat gaa aac gca ggt ttg cag gac
 463

Cys Phe Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn Ala Gly Leu Gln Asp
 90 95 100

tcg act ctg gag agt gaa gac aca cta cct gac tcc tgc agg agg atg
 511

Ser Thr Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro Asp Ser Cys Arg Arg Met
 105 110 115

aaa caa gcc ttt cag ggg gcc gtg cag aag gaa ctg caa cac att gtg
 559

Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val
 120 125 130

ggg cca cag cgc ttc tca gga gct cca gct atg atg gaa ggc tca tgg
 607
 Gly Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala Met Met Glu Gly Ser Trp
 135 140 145 150

ttg gat gtg gcc cag cga ggc aag cct gag gcc cag cca ttt gca cac
 655
 Leu Asp Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu Ala Gln Pro Phe Ala His
 155 160 165

ctc acc atc aat gct gcc agc atc cca tcg ggt tcc cat aaa gtc act
 703
 Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Thr
 170 175 180

ctg tcc tct tgg tac cac gat cga ggc tgg gcc aag atc tct aac atg
 751
 Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met
 185 190 195

acg tta agc aac gga aaa cta agg gtt aac caa gat ggc ttc tat tac
 799
 Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr
 200 205 210

ctg tac gcc aac att tgc ttt cgg cat cat gaa aca tcg gga agc gta
 847
 Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr Ser Gly Ser Val
 215 220 225 230

cct aca gac tat ctt cag ctg atg gtg tat gtc gtt aaa acc agc atc
 895
 Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile
 235 240 245

aaa atc cca agt tct cat aac ctg atg aaa gga ggg agc acg aaa aac
 943
 Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn
 250 255 260

tgg tcg ggc aat tct gaa ttc cac ttt tat tcc ata aat gtt ggg gga
 991

Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly
 265 270 275

ttt ttc aag ctc cga gct ggt gaa gaa att agc att cag gtg tcc aac
 1039
 Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn
 280 285 290

cct tcc ctg ctg gat ccg gat caa gat gcg acg tac ttt ggg gct ttc
 1087
 Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe
 295 300 305 310

aaa gtt cag gac ata gac tgagactcat ttcgtggaac attagcatgg
 1135
 Lys Val Gln Asp Ile Asp
 315

atgtectaga tgtttgaaa cttcttaaaa aatggatgat gtctatacat gtgtaagact
 1195

actaagagac atggcccacg gtgtatgaaa ctcacagccc tctctcttga gcctgtacag
1255

gttgtgtata tgtaaagtcc ataggtgatg ttagattcat ggtgattaca caacggtttt
1315

acaattttgt aatgatttcc tagaattgaa ccagattggg agaggtattc cgatgcttat
1375

gaaaaactta cacgtgagct atggaagggg gtcacagtct ctgggtctaa cccctggaca
1435

tgtgccactg agaaccttga aattaagagg atgccatgtc attgcaaaga aatgatagtg
1495

tgaagggtta agttcttttg aattgttaca ttgcgctggg acctgcaaatt aagttctttt
1555

tttctaataa ggagagaaaa atatatgtat ttttatataa tgtctaaagt tatatttcag
1615

gtgtaatgtt ttctgtgcaa agttttgtaa attatatttg tgctatagta tttgattcaa
1675

aatattttaa aatgtctcac tgttgacata ttaaatgttt taaatgtaca gatgtattta
1735

actggtgcac tttgtaattc ccctgaaggc actcgtagct aagggggcag aatactgttt
1795

ctgggtgacca catgtagttt atttctttat tctttttaac ttaatagagt cttcagactt
1855

gtcaaaaacta tgcaagcaaa ataaataaat aaaaataaaa tgaatacctt gaataataag
1915

taggatgttg gtcaccaggt gcctttcaaa tttagaagct aattgacttt aggagctgac
1975

atagccaaaa aggatacata ataggctact gaaatctgtc aggagtattt atgcaattat
2035

tgaacaggtg tcttttttta caagagctac aaattgtaaa ttttgtttct ttttttccc
2095

atagaaaaatg tactatagtt tatcagccaa aaaacaatcc actttttaat ttagtgaaag
2155

ttattttatt atactgtaca ataaaagcat tgtctctgaa tgttaatttt ttggtacaaa
2215

aaataaattt gtacgaaaac ctgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaagg gcggccgctc
2275

tagagggccc tattctatag
2295

<210> 2
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 2

Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Gly Lys Tyr Leu Arg Ser Ser Glu
 1 5 10 15

Glu Met Gly Ser Gly Pro Gly Val Pro His Glu Gly Pro Leu His Pro
 20 25 30

Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro Ala Pro Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser
 35 40 45

Met Phe Leu Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser
 50 55 60

Ile Ala Leu Phe Leu Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Ser Thr His Cys Phe Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu
 85 90 95

Asn Ala Gly Leu Gln Asp Ser Thr Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro
 100 105 110

Asp Ser Cys Arg Arg Met Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys
 115 120 125

Glu Leu Gln His Ile Val Gly Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala
 130 135 140

Met Met Glu Gly Ser Trp Leu Asp Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu
 145 150 155 160

Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser
 165 170 175

Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp
 180 185 190

Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn
 195 200 205

Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His
 210 215 220

Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr
 225 230 235 240

Val	Val	Lys	Thr	Ser	Ile	Lys	Ile	Pro	Ser	Ser	His	Asn	Leu	Met	Lys
				245					250					255	

Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr
260 265 270

Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile
275 280 285

Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala
290 295 300

Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp
305 310 315

<210> 3
 <211> 2271
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (185)..(1135)

<400> 3
 aagcttggtta ccgagctcgg atccactact cgacccacgc gtccgcgcgc ccaggagacc
 60

aaagccgggc tccaagtcgg cgccccacgt cgaggctccg ccgcagcctc cggagttggc
 120

cgcagacaag aaggggaggg agcgggagag ggaggagagc tccgaagcga gagggccgag
 180

cgcc atg cgc cgc gcc agc aga gac tac acc aag tac ctg cgt ggc tgc
 229

Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Thr Lys Tyr Leu Arg Gly Ser
 1 5 10 15

gag gag atg ggc ggc ggc ccc gga gcc ccg cac gag ggc ccc ctg cac

277

Glu Glu Met Gly Gly Gly Pro Gly Ala Pro His Glu Gly Pro Leu His
 20 25 30

gcc ccg ccg ccg cct gcg ccg cac cag ccc ccc gcc gcc tcc cgc tcc
 325

Ala Pro Pro Pro Pro Ala Pro His Gln Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser
 35 40 45

atg ttc gtg gcc ctc ctg ggg ctg ggg ctg ggc cag gtt gtc tgc agc
 373

Met Phe Val Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser
 50 55 60

gtc gcc ctg ttc ttc tat ttc aga gcg cag atg gat cct aat aga ata
 421

Val Ala Leu Phe Phe Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile
 65 70 75

tca gaa gat ggc act cac tgc att tat aga att ttg aga ctc cat gaa
 469

Ser Glu Asp Gly Thr His Cys Ile Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu
 80 85 90 95

aat gca gat ttt caa gac aca act ctg gag agt caa gat aca aaa tta
 517

Asn Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys Leu
 100 105 110

ata cct gat tca tgt agg aga att aaa cag gcc ttt caa gga gct gtg
 565

Ile Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val
 115 120 125

caa aag gaa tta caa cat atc gtt gga tca cag cac atc aga gca gag
 613

Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu
 130 135 140

aaa gcg atg gtg gat ggc tca tgg tta gat ctg gcc aag agg agc aag
 661
 Lys Ala Met Val Asp Gly Ser Trp Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser Lys
 145 150 155

ctt gaa gct cag cct ttt gct cat ctc act att aat gcc acc gac atc
 709
 Leu Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile
 160 165 170 175

cca tct ggt tcc cat aaa gtg agt ctg tcc tct tgg tac cat gat cgg
 757
 Pro Ser Gly Ser His Lys Val Ser Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg
 180 185 190

ggt tgg gcc aag atc tcc aac atg act ttt agc aat gga aaa cta ata
 805
 Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu Ile
 195 200 205

gtt aat cag gat ggc ttt tat tac ctg tat gcc aac att tgc ttt cga
 853
 Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg
 210 215 220

cat cat gaa act tca gga gac cta gct aca gag tat ctt caa cta atg
 901
 His His Glu Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met
 225 230 235

gtg tac gtc act aaa acc agc atc aaa atc cca agt tct cat acc ctg
 949
 Val Tyr Val Thr Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Thr Leu
 240 245 250 255

atg aaa gga gga agc acc aag tat tgg tca ggg aat tct gaa ttc cat
 997
 Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His
 260 265 270

ttt tat tcc ata aac gtt ggt gga ttt ttt aag tta cgg tct gga gag
 1045
 Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ser Gly Glu
 275 280 285

gaa atc agc atc gag gtc tcc aac ccc tcc tta ctg gat ccg gat cag
 1093
 Glu Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln
 290 295 300

gat gca aca tac ttt ggg gct ttt aaa gtt cga gat ata gat
 1135
 Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Arg Asp Ile Asp
 305 310 315

tgagccccag tttttggagt gttatgtatt tccatggatgt ttggaaacat tttttaaaac
 1195

aagccaagaa agatgtatat aggtgtgtga gactactaag aggcattggcc ccaacggtag
 1255

acgactcagt atccatgctc ttgaccttgt agagaacacg cgtattttaca gccagtggga
 1315

gatgttagac tcatgggtgtg ttacacaatg gtttttaaat tttgtaatga attcctagaa
 1375

ttaaaccaga ttggagcaat tacgggttga ccttatgaga aactgcatgt gggctatggg
1435

aggggttggg ccttggtcat gtgccccttc gcagctgaag tggagagggg gtcattatgc
1495

gcaattgaag gatcatctga aggggcaaatt tcttttgaat tgttacatca tgctggaacc
1555

tgcaaaaaat actttttcta atgaggagag aaaatatatg tttttttata taatatctaa
1615

agttatatatt cagatgtaat gttttctttg caaagtattg taaattatat ttgtgctata
1675

gtatttgatt caaaatattt aaaaatgtct tgctgttgac atatttaattg ttttaaattg
1735

acagacatat ttaactgggtg cactttgtaa attccttggg gaaaacttgc agctaaggag
1795

gggaaaaaaaa tgttgtttcc taatatcaaa tgcagtatat ttcttcgttc tttttaagtt
1855

aatagatttt ttcagacttg tcaagcctgt gcaaaaaaat taaaatggat gccttgaata
1915

ataagcagga tgttggccac caggtgcctt tcaaatttag aaactaattg actttagaaa
1975

gtgacattg ccaaaaagga tacataatgg gccactgaaa tctgtcaaga gtagttatat
2035

aattgttgaa caggtgtttt tccacaagtg ccgcaaattg tacctttttt tttttttcaa
2095

aatagaaaag ttattagtgg tttatcagca aaaaagtcca attttaattt agtaaatgtt
2155

atcttatact gtacaataaa aacattgcct ttgaatgtta attttttggg acaaaaataa
2215

atttatatga aaaaaaaaaa aaaagggcgg ccgctctaga gggcctatt ctatag
2271

<210> 4
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Thr Lys Tyr Leu Arg Gly Ser Glu
 1 5 10 15

Glu Met Gly Gly Gly Pro Gly Ala Pro His Glu Gly Pro Leu His Ala
 20 25 30

Pro Pro Pro Pro Ala Pro His Gln Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met
 35 40 45

Phe Val Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Val
 50 55 60

Ala Leu Phe Phe Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Gly Thr His Cys Ile Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn
 85 90 95

Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys Leu Ile
 100 105 110

Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln
 115 120 125

Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu Lys
 130 135 140

Ala Met Val Asp Gly Ser Trp Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser Lys Leu
 145 150 155 160

Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro
 165 170 175

Ser Gly Ser His Lys Val Ser Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly
 180 185 190

Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu Ile Val
 195 200 205

Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His
 210 215 220

His Glu Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val
 225 230 235 240

Tyr Val Thr Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Thr Leu Met
 245 250 255

Lys Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe
 260 265 270

Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ser Gly Glu Glu
 275 280 285

Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp
 290 295 300

Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Arg Asp Ile Asp
 305 310 315

<210> 43
 <211> 625
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 43

Met Asp Pro Arg Ala Arg Arg Arg Arg Gln Leu Pro Ala Pro Leu Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Cys Val Leu Leu Val Pro Leu Gln Val Thr Leu Gln Val Thr
 20 25 30

Pro Pro Cys Thr Gln Glu Arg His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys
 35 40 45

Ser Arg Cys Glu Pro Gly Lys Tyr Leu Ser Ser Lys Cys Thr Pro Thr
 50 55 60

Ser Asp Ser Val Cys Leu Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Thr
 65 70 75 80

Trp Asn Glu Glu Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Ala Gly
 85 90 95

Lys Ala Leu Val Ala Val Asp Pro Gly Asn His Thr Ala Pro Arg Arg
 100 105 110

Cys Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Asn Ser Asp Cys Glu Cys Cys
 115 120 125

Arg Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Phe Gly Ala Gln His Pro Leu
 130 135 140

Gln Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Thr Pro Cys Leu Leu Gly Phe Phe
 145 150 155 160

Ser Asp Val Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys
 165 170 175

Thr Leu Leu Gly Lys Leu Glu Ala His Gln Gly Thr Thr Glu Ser Asp
 180 185 190

Val Val Cys Ser Ser Ser Met Thr Leu Arg Arg Pro Pro Lys Glu Ala
 195 200 205

Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Leu Ile Val Leu Leu Leu Phe Ile Ser Val
210 215 220

Val Val Val Ala Ala Ile Ile Phe Gly Val Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly
225 230 235 240

Lys Ala Leu Thr Ala Asn Leu Trp Asn Trp Val Asn Asp Ala Cys Ser
245 250 255

Ser Leu Ser Gly Asn Lys Glu Ser Ser Gly Asp Arg Cys Ala Gly Ser
260 265 270

His Ser Ala Thr Ser Ser Gln Gln Glu Val Cys Glu Gly Ile Leu Leu
275 280 285

Met Thr Arg Glu Glu Lys Met Val Pro Glu Asp Gly Ala Gly Val Cys
290 295 300

Gly Pro Val Cys Ala Ala Gly Gly Pro Trp Ala Glu Val Arg Asp Ser
305 310 315 320

Arg Thr Phe Thr Leu Val Ser Glu Val Glu Thr Gln Gly Asp Leu Ser
325 330 335

Arg Lys Ile Pro Thr Glu Asp Glu Tyr Thr Asp Arg Pro Ser Gln Pro
340 345 350

Ser Thr Gly Ser Leu Leu Leu Ile Gln Gln Gly Ser Lys Ser Ile Pro
355 360 365

Pro Phe Gln Glu Pro Leu Glu Val Gly Glu Asn Asp Ser Leu Ser Gln
370 375 380

Cys Phe Thr Gly Thr Glu Ser Thr Val Asp Ser Glu Gly Cys Asp Phe
385 390 395 400

Thr Glu Pro Pro Ser Arg Thr Asp Ser Met Pro Val Ser Pro Glu Lys
405 410 415

His Leu Thr Lys Glu Ile Glu Gly Asp Ser Cys Leu Pro Trp Val Val
420 425 430

Ser Ser Asn Ser Thr Asp Gly Tyr Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Gly
435 440 445

Glu Asp His Glu Pro Phe Pro Gly Ser Leu Lys Cys Gly Pro Leu Pro
450 455 460

Gln Cys Ala Tyr Ser Met Gly Phe Pro Ser Glu Ala Ala Ala Ser Met
465 470 475 480

Ala Glu Ala Gly Val Arg Pro Gln Asp Arg Ala Asp Glu Arg Gly Ala
485 490 495

Ser Gly Ser Gly Ser Ser Pro Ser Asp Gln Pro Pro Ala Ser Gly Asn
500 505 510

Val Thr Gly Asn Ser Asn Ser Thr Phe Ile Ser Ser Gly Gln Val Met
515 520 525

Asn Phe Lys Gly Asp Ile Ile Val Val Tyr Val Ser Gln Thr Ser Gln
530 535 540

Glu Gly Pro Gly Ser Ala Glu Pro Glu Ser Glu Pro Val Gly Arg Pro
545 550 555 560

Val Gln Glu Glu Thr Leu Ala His Arg Asp Ser Phe Ala Gly Thr Ala
565 570 575

Pro Arg Phe Pro Asp Val Cys Ala Thr Gly Ala Gly Leu Gln Glu Gln
580 585 590

Gly Ala Pro Arg Gln Lys Asp Gly Thr Ser Arg Pro Val Gln Glu Gln
595 600 605

Gly Gly Ala Gln Thr Ser Leu His Thr Gln Gly Ser Gly Gln Cys Ala
610 615 620

Glu
625

GAGCTCGGAT CCACTACTCG ACCACGCGT CCGGCCAGGA CCTCTGTGAA CCGGTCGGGG 60

CGGGGGCCGC CTGGCCGGGA GTCTGCTCGG CGGTGGGTGG CCGAGGAAGG GAGAGAACGA 120

TCGCGGAGCA GGGCGCCCGA ACTCCGGGCG CCGCGCC ATG CGC CGG GCC AGC CGA 175

Met Arg Arg Ala Ser Arg

1 5

GAC TAC GGC AAG TAC CTG CGC AGC TCG GAG GAG ATG GGC AGC GGC CCC 223

ASP TYR GLY LYS TYR Leu Arg Ser Ser Glu Glu Met Gly Ser Gly Pro

10

15

20

GGC GTC CCA CAC GAG GGT CCG CTG CAC CCC GCG CCT TCT GCA CCG GCT 271

Gly Val Pro His Glu Gly Pro Leu His Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala

25

30

35

CCG GCG CCG CCA CCC GCC GCC TCC CGC TCC ATG TTC CTG GCC CTC CTG 319

Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met Phe Leu Ala Leu Leu

40

45

50

Obr. 1A

GGG CTG GGA CTG GGC CAG GTG GTC TGC AGC ATC GCT CTG TTC CTG TAC 367
 Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Ile Ala Leu Phe Leu Tyr
 55 60 65 70

TTT CGA GCG CAG ATG GAT CCT AAC AGA ATA TCA GAA GAC AGC ACT CAC 415
 Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser Glu Asp Ser Thr His
 75 80 85

TGC TTT TAT AGA ATC CTG AGA CTC CAT GAA AAC GCA GGT TTG CAG GAC 463
 Cys Phe Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn Ala Gly Leu Gln Asp
 90 95 100

TCG ACT CTG GAG AGT GAA GAC ACA CTA CCT GAC TCC TGC AGG AGG ATG 511
 Ser Thr Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro Asp Ser Cys Arg Arg Met
 105 110 115

AAA CAA GCC TTT CAG GGG GCC GTG CAG AAG GAA CTG CAA CAC ATT GTG 559
 Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val
 120 125 130

Obr. 1B

GGG CCA CAG CGC TTC TCA GGA GCT CCA GCT ATG ATG GAA GGC TCA TGG	607
Gly Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala Met Met Glu Gly Ser Trp	
135 140 145 150	
TTG GAT GTG GCC CAG CGA GGC AAG CCT GAG GCC CAG CCA TTT GCA CAC	655
Leu Asp Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu Ala Gln Pro Phe Ala His	
155 160 165	
CTC ACC ATC AAT GCT GCC AGC ATC CCA TCG GGT TCC CAT AAA GTC ACT	703
Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Thr	
170 175 180	
CTG TCC TCT TGG TAC CAC GAT CGA GGC TGG GCC AAG ATC TCT AAC ATG	751
Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met	
185 190 195	

Obr. 1C

ACG TTA AGC AAC GGA AAA CTA AGG GTT AAC CAA GAT GGC TTC TAT TAC 799
 Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr
 200 205 210

CTG TAC GCC AAC ATT TGC TTT CGG CAT CAT GAA ACA TCG GGA AGC GTA 847
 Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr Ser Gly Ser Val
 215 220 225 230

CCT ACA GAC TAT CTT CAG CTG ATG GTG TAT GTC GTT AAA ACC AGC ATC 895
 Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile
 235 240 245

AAA ATC CCA AGT TCT CAT AAC CTG ATG AAA GGA GGG AGC ACG AAA AAC 943
 Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn
 250 255 260

TGG TCG GGC AAT TCT GAA TTC CAC TTT TAT TCC ATA AAT GTT GGG GGA 991
 Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly
 265 270 275

Obr. 1D

TTT	TTC	AAG	CTC	CGA	GCT	GGT	GAA	GAA	ATT	AGC	ATT	CAG	GTG	TCC	AAC	1039
Phe	Phe	Lys	Leu	Arg	Ala	Gly	Glu	Glu	Ile	Ser	Ile	Gln	Val	Ser	<u>Asn</u>	
		280				285					290					
CCT	TCC	CTG	CTG	GAT	CCG	GAT	CAA	GAT	GCG	ACG	TAC	TTT	GGG	GCT	TTC	1087
Pro	Ser	Leu	Leu	Asp	Pro	Asp	Gln	Asp	Ala	Thr	Tyr	Phe	Gly	Ala	Phe	
		295				300					305				310	
AAA	GTT	CAG	GAC	ATA	GAC	T	GAGACTCATT	TCGTGGAACA	TTAGCATGGA							1136
Lys	Val	Gln	Asp	Ile	Asp											
						315										
TGTCCTAGAT	GTTTGGAAAC	TTCTTAAAAA	ATGGATGATG	TCTATACATG	TGTAAGACTA											1196
CTAAGAGACA	TGGCCACCGG	TGTATGAAAC	TCACAGCCCT	CTCTCTTGAG	CCGTACAGG											1256
TTGTGTATAT	GTAAGTCCA	TAGGTGATGT	TAGATTTCATG	GTGATTACAC	AACGGTTTTA											1316

Obr. 1E

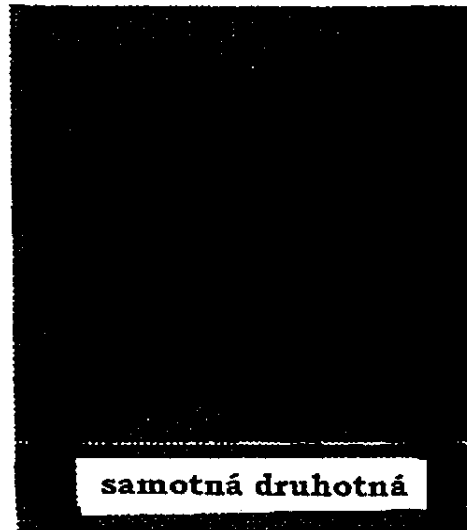
CAATTTTGTA ATGATTTCCT AGAATTGAAC CAGATTGGGA GAGGTATTC GATGCTTATG	1376
AAAAACTTAC ACGTGAGCTA TGGAAGGGGG TCACAGTCTC TGGGTCTAAC CCCTGGACAT	1436
GTGCCACTGA GAACCTTGAA ATTAAGAGGA TGCCATGTCA TTGCAAAGAA ATGATAGTGT	1496
GAAGGGTTAA GTTCCTTTGA ATTGTTACAT TCGCGTGGGA CCTGCAATA AGTTCCTTTT	1556
TTCTAATGAG GAGAGAAAAA TATATGTATT TTTATATAAT GTCTAAAGTT ATATTTCAGG	1616
TGTAATGTTT TCTGTGCAA GTTTGTAAA TTATATTGT GCTATAGTAT TTGATTCAAA	1676
ATATTTAAA ATGTCTCACT GTTGACATAT TTAATGTTTT AAATGTACAG ATGTATTTAA	1736
CTGGTGCCACT TTGTAATTC CCTGAAGGTA CTCGTAGCTA AGGGGGCAGA ATACTGTTC	1796
TGGTGACCAC ATGTAGTTA TTTCCTTTAT TTTTAACT TAATAGAGTC TTCAGACTTG	1856

Obr. 1F

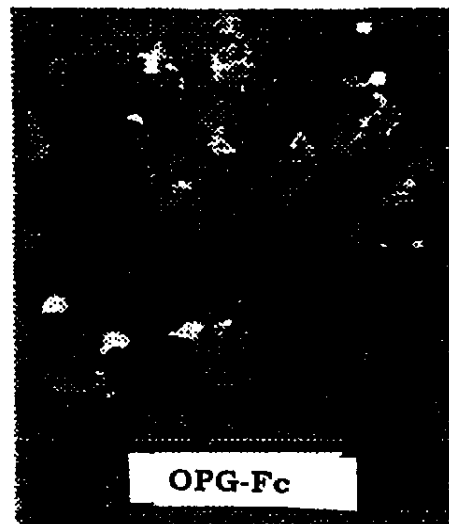
TCAAAACTAT GCAAGCAAAA TAAATAAATA AAAATAAAAT GAATACCTTG AATAATAAGT 1916
AGGATGTTGG TCACCAGGTG CCTTTCAAAT TTAGAAGCTA ATTGACTTTA GGAGCTGACA 1976
TAGCCAAAAA GGATACATAA TAGGCTACTG AAATCTGTCA GGAGTATTTA TGCAATTATT 2036
GAACAGGTGT CTTTTTTTAC AAGAGCTACA AATTGTAAAT TTTGTTTCTT TTTTTCCTCA 2096
TAGAAAATGT ACTATAGTTT ATCAGCCAAA AAACAATCCA CTTTTTAATT TAGTGAAAGT 2156
TATTTTATTA TACTGTACAA TAAAGCATT GTCTCTGAAT GTTAAATTTT TGGTACAAAA 2216
AATAAATTG TACGAAACC TGAAAAAAA AAAAAAAGG CGGCCGCTCT 2276
AGAGGGCCCT ATTCTATAG 2295

Obr.1G

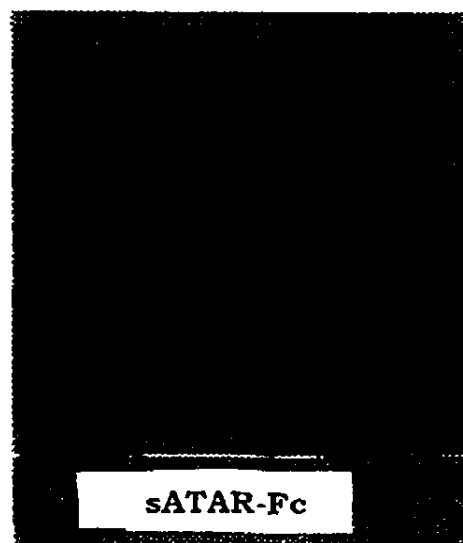
Obr. 2A



Obr. 2B



Obr. 2C



9.5 kg --	thymus	
7.5 kg --	prostata	
	varle	
	vaječník	
	tenké střevo	
	tlusté střevo	
	slezina	
	lymfatická uzlina	
	thymus	
	PBL	
	kostní dřev	
	fetální játra	
4.4 kg --		
2.4 kg --		
1.4 kg --		

Obr. 3

10	30	50
AAGCTGGTACCGAGCTCGGATCCACTACTCGACCCACGCGTCCGGCGCCCGAGAGCC		
70	90	110
AAAGCCGGCTCCAAGTCGGCGCCCGCCACGTCGAGGCTCCGCCCGCAGCCTCCGGAGTTGGC		
130	150	170
CGCAGACAAGAAGGGAGGGAGCGGGAGAGGGAGAGAGCTCCGAAGCAGAGAGGCCGAG		
190	210	230
CGCCATGCGCCGCGCAGCAGAGACTACACCAAGTACCTGCGTGGCTCGGAGGAGATGGG		
M R R A S R D Y T K Y L R G S E M G		
250	270	290
CGGCGGCCCCGGAGCCCCGACGAGGGCCCCCTGCACGCCCGCCGCGCTGCGCCGCA		
G G P G A P H E G P L H A P P P A P H		
310	330	350
CCAGCCCCCGCGCTCCCGCTCCCATGTTCGTGGCCCTCCTGGGCTGGGCTGGGCCA		
Q P P A A S R S M F V A L L G L G L G Q		
370	390	410
GGTTGTCTGCAGCGTCGCCCTGTTCTTCTATTTCAGAGCGCAGATGGATCCTAATAGAAT		
V V C S V A L F F Y F R A Q M D P N R I		

Obr. 4A

430	450	470
ATCAGAAGATGGCACTCACTGCATTTATAGAAATTTGAGACTCCATAAATGCAGATTT		
S E D G T H C I Y R I L R L H E N A D F		
490	510	530
TCAAGACACAACCTCTGGAGAGTCAAGATACAAAATTAACTCTGATTCATGTAGGAGAAT		
Q D T T L E S Q D T K L I P D S C R R I		
550	570	590
TAAACAGGCCCTTTCAAGGAGCTGTGCAAAAGGAATTACAACATATCGTTGGATCACAGCA		
K Q A F Q G A V Q K E L Q H I V G S Q H		
610	630	650
CATCAGAGCAGAGAAAGCGATGGTGGATGGCTCATGTTAGATCTGGCCCAAGAGGAGCAA		
I R A E K A M V D G S W L D L A K R S K		
670	690	710
GCTTGAAGCTCAGCCCTTTTGCTCATCTCACTATTAAATGCCACCGACATCCCATCTGGTTC		
L E A Q P F A H L T I N A T D I P S G S		
730	750	770
CCATAAGTGAGTCTGTCTCTTGTGTAACCATGATCGGGGTGGGCCCAAGATCTCCAACAT		
H K V S L S S W Y H D R G W A K I S N M		

Obr. 4B

790 810 830
GACTTTTAGCAATGGAAACTAATAGTTAATCAGGATGGCTTTTATTACCTGTATGCCAA
T F S N G K L I V N Q D G F Y Y L Y A N

850 870 890
CATTTGCTTTCGACATCATGAACCTTCAGGAGACCTAGCTACAGAGTATCTTCAACTAAT
I C F R H E T S G D L A T E Y L Q L M

910 930 950
GGTGACGTCACTAAACCAGCATCAAAATCCCAAGTTCTCATACCTGATGAAAGGAGG
V Y V T K T S I K I P S S H T L M K G G

970 990 1010
AAGCACCAAGTATGGTCAGGGAATCTGAATTCATTTTATTCATATAACGTTGGTGG
S T K Y W S G N S E F H F Y S I N V G G

1030 1050 1070
ATTTTTAAGTTACGGTCTGGAGAGGAAATCAGCATCGAGGTCTCCAACCCCTCCTACT
F F K L R S G E E I S I E V S N P S L L

1090 1110 1130
GGATCCGGATCAGGATGCAACATACTTTTGGGGCTTTTAAAGTTCGAGATATAGATTGAGC
D P D Q D A T Y F G A F K V R D I D

Obr. 4C

1150	1170	1190
CCCAGTTT	TGGAGT	GTATG
TTTCC	TGGAT	GTGGA
AAACAT	TTTT	TAAACA
AGCC		
1210	1230	1250
AAGAA	GATG	TATAG
GTGTA	CTACT	AGAGG
CACTA	CGCAT	GGCCCA
ACGGT	ACACG	GAC
1270	1290	1310
TCAGT	ATCC	CTTG
ACCTG	TAGAG	AAAC
ACCG	TATT	ACAGC
CGATG	T	GGGAG
TGT		
1330	1350	1370
TAGAC	TCA	TGTT
TAACA	TTT	TAAAT
TGTA	TTT	CTAG
AA		
1390	1410	1430
CCAG	ATT	ACGG
TTAC	GTG	ACCT
ATAT	GAG	AACT
GATG	TGG	CTAT
GGG		

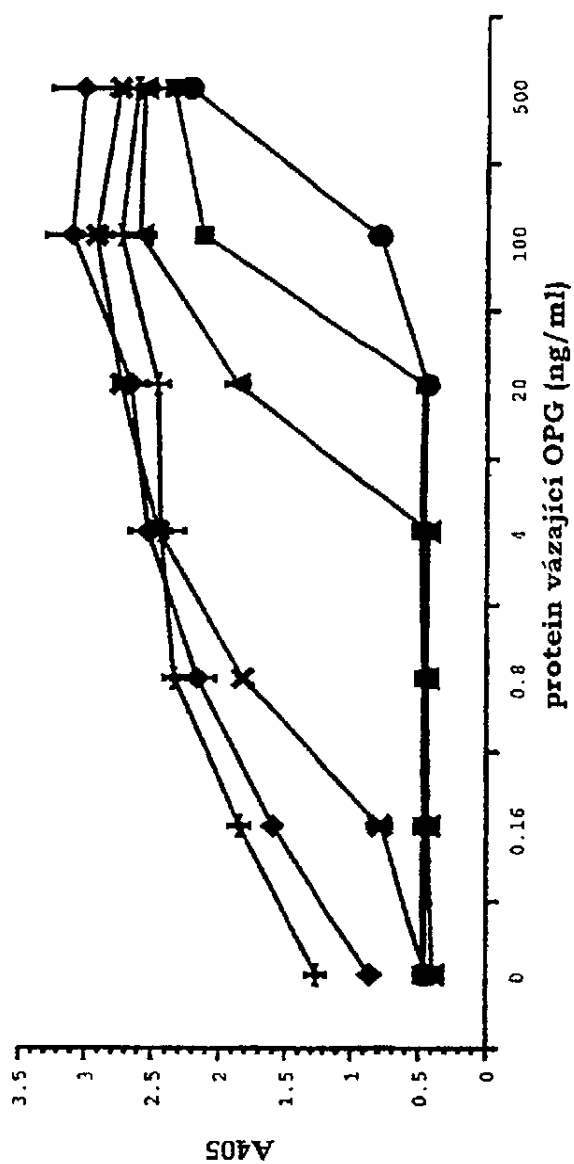
Obr. 4D

1450	1470	1490
TTGGTCCCTGGTCATGTGCCCCCTTCGCAGCTGAAGTGGAGAGGGTGTCATCTAGCGCAAT		
1510	1530	1550
TGAAGGATCATCTGAAGGGCAAATCTTTTGAATTGTTACATCATGCTGGAACCTGCAA		
1570	1590	1610
AAAAATACTTTTCTAATGAGGAGAGAAATATATGTATTTTATATAATCTAAAGTTA		
1630	1650	1670
TATTTCAGATGTAATGTTTCTTTTGCAAGTATGTAAATTATATTGTGCTATAGTATT		
1690	1710	1730
TGATTCAAAATATTTTAAAAATGCTCTTGCTGTGACATATTTAATGTTTAAATGTACAGA		
1750	1770	1790
CATATTTAACTGGTGCACTTTGTAAATTCCCTGGGAAACTTGCAGCTAAGGAGGGAA		
1810	1830	1850
AAAAATGTTGTTTCCCTAATATCAAAATGCAGTATATTCTCTCGTTCTTTTAAAGTTAATAG		

Obr. 4E

1870	1890	1910
ATTTTTCAGACTGTGTCAGCCTGTGCAAAAATAAATGGATGCCCTTGAATAATAAG		
1930	1950	1970
CAGGATGTTGGCCACCAGGTGCCCTTTCAAAATTAGAACTAATTGACTTTAGAAAGCTGA		
1990	2010	2030
CATTGCCAAAAGGATACATAATGGGCCCACTGAAATCTGTCAAGAGTAGTTATATAATTG		
2050	2070	2090
TTGAACAGGTGTTTTTCCACAAGTGCCGCAAAATTGTACCTTTTTTTTTTTCAAAATAG		
2110	2130	2150
AAAAGTTATTAGTGGTTATCAGCAAAAAGTCCAAATTTAATTAGTAATGTATCTT		
2170	2190	2210
ATACTGTACAATAAAAACATTGCCCTTTGAATGTTAATTTTTTGGTACAAAATAAATTA		
2230	2250	2270
TATGAAAAAAAAGGGGGCGCTCTAGAGGGCCCTATTCATAG		

Obr. 4F



—+— protein vázající OPG samotný

—●— protein vázající OPG + myši OPG[22-401]-Fc (1000 ng/ml)

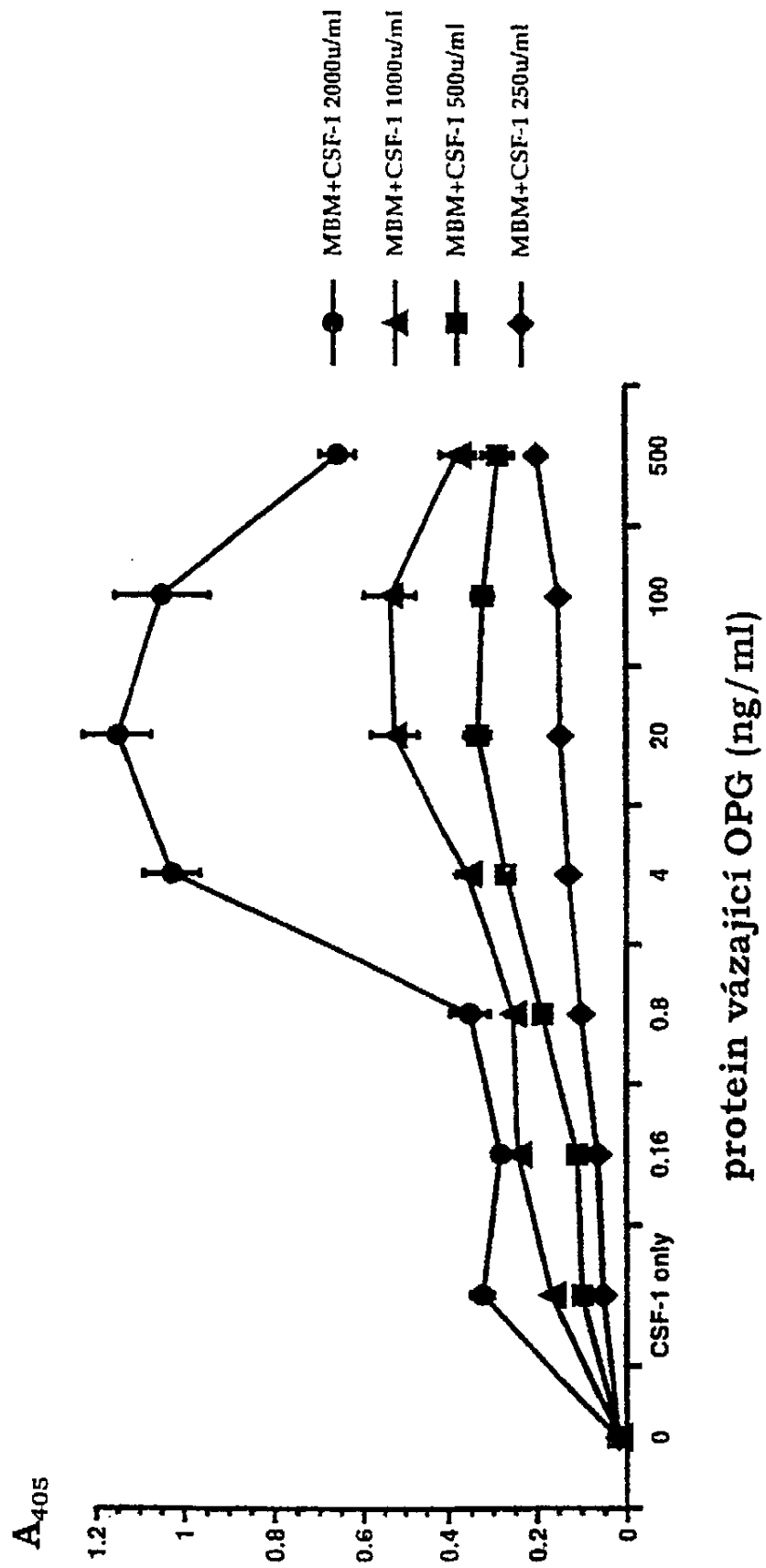
—■— protein vázající OPG + myši OPG[22-401]-Fc (500 ng/ml)

—▲— protein vázající OPG + myši OPG[22-401]-Fc (100 ng/ml)

—✕— protein vázající OPG + myši OPG[22-401]-Fc (10 ng/ml)

—◆— protein vázající OPG + myši OPG[22-401]-Fc (1 ng/ml)

Obr. 5



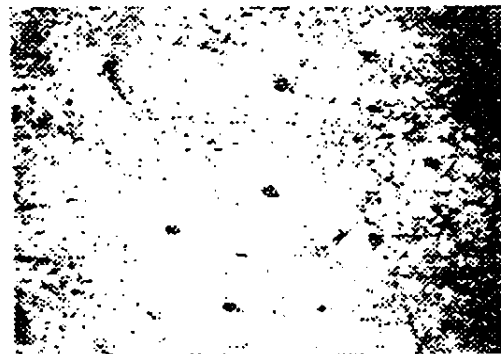
Obr. 6

Obr. 7A

barvení toluidin. modří



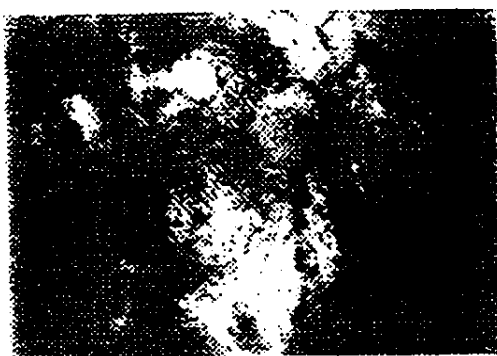
barvení TRAP



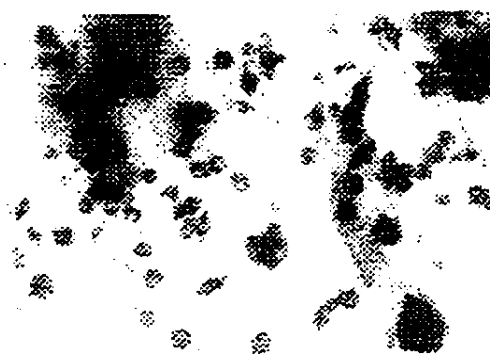
Buňky kostní dřeně + M-CSF-1

Obr. 7B

barvení toluidin. modří



barvení TRAP



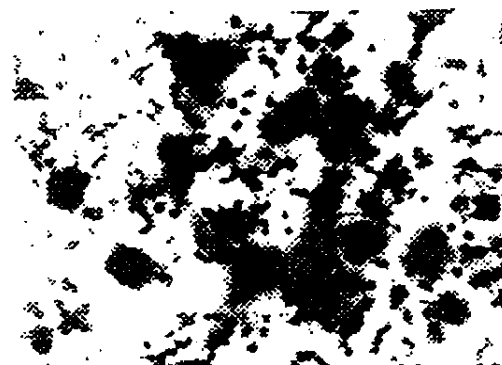
Buňky kostní dřeně + protein vázající OPG

Obr. 7C

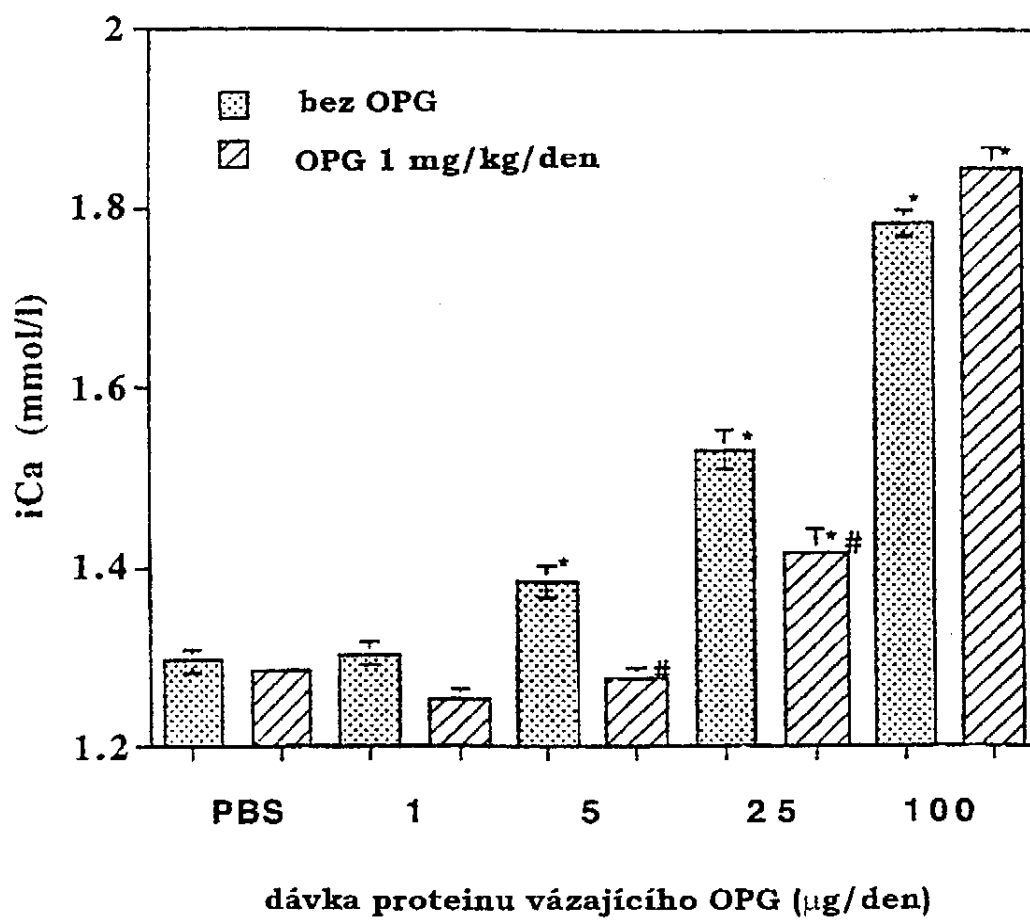
barvení toluidin. modří



barvení TRAP

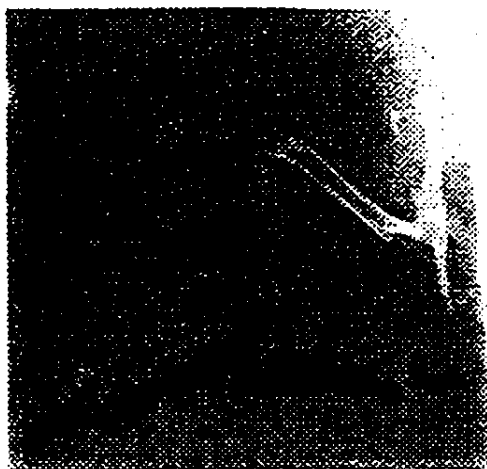


Buňky kostní dřeně + M-CSF-1 + protein vázající OPG



Obr. 8

PBS



Obr. 9A

protein vázající OPG
5 μ g/den



Obr. 9B

protein vázající OPG
25 μ g/den



Obr. 9C

protein vázající OPG
100 μ g/den



Obr. 9D

10	30	50
ACTCGACCCACGGTCCGCCCGCCGCCACCGCGCCATGGACCCGCGCGCGCGCGGCC		
	M D P R A R R R	
70	90	110
GCCAGCTGCCCGCGCGCTGCTGGCGCTCTGCGTCTGCTGCTTCCACTGCAGGTGACTC		
<u>Q L P A P L L A L C V L L V P L Q V T L</u>		
130	150	170
TCCAGGTCACCTCCTCCATGCACCCAGGAGGCAATTATGAGCATCTCGGACGGTGTGCA		
Q V T P P C T Q E R H Y E H L G R C C S		
190	210	230
GCAGATGCCGAACCAGGAAAGTACCTGTCTCTAAGTGCACCTCCTACCTCCGACAGTGTGT		
R C E P G K Y L S S K C T P T S D S V C		
250	270	290
GTC TGCCCTGTGGCCCCGATGAGTACTTGGACACCTGGAATGAAGAAGATAAATGCTTGC		
L P C G P D E Y L D T W N E E D K C L L		
310	330	350
TGCATAAAGTCTGTGATGCAGGCAAGGCCCTGGTGGCGGTGGATCCTGGCAACCACACGG		
H K V C D A G K A L V A V D P G N H T A		

Obr. 10A

370	390	410
CCCCGCTGCTGTGCTTGCACGGCTGGCTACCACTGGA	CTCAGACTGCGAGTGTGCCC	
P R R C A C T A G Y H W N S D C E C C R		
430	450	470
GCAGGAACACGGAGTGTGCACCTGGCTTCGGAGCTCAGCATCCCTTGCAGCTCAACAAGG		
R N T E C A P G F G A Q H P L Q L N K D		
490	510	530
ATACGGTGTGCACACCCCTGCCCTCGGCTTCTTCAGATGTCTTTTCGTCCACAGACA		
T V C T P C L L G F F S D V E S S T D K		
550	570	590
AATGCAACCTTGGACCAACTGCACCCCTCCTTGGAAAGCTAGAAGCACACCGGACAA		
C K P W T N C T L L G K L E A H Q G T T		
610	630	650
CGGAATCAGATGTGGTCTGCAGCTCTTCCATGACACTGAGGACACCAAGGAGGCC		
E S D V V C S S S M T L R R P P K E A Q		

Obr. 10B

670 710
 AGGCTTACCTGCCAGTCTCATCGTTCTGTGCTCCTCTCATCTCTGTGGTAGTAGGCTG
 A Y L P S L I V L L L F I S V V V A A
 730 770
 CCATCATCTTCGGCGTTTACTACAGGAAGGAGGAAAGCGCTGACAGCTAATTGTGGA
 I I F G V Y Y R K G G K A L T A N L W N
 790 830
 ATTGGGTCAAATGATGCTTGCAGTAGTCTAAGTGGAATAAGGAGTCCTCAGGGACCGTT
 W V N D A C S S L S G N K E S S G D R C
 850 890
 GTGCTGGTTCCCACCTCGGCAACCTCCAGTCAGCAAGAAGTGTGTGAAGGTATCTTACTAA
 A G S H S A T S S Q Q E V C E G I L L M
 910 950
 TGA CTCGGAGGAGAAGATGGTTCCAGAAAGACGGTGCTGGAGTCTGTGGCCCTGTGTGTG
 T R E E K M V P E D G A G V C G P V C A
 970 1010
 CGGCAGGTGGGCCCTGGCAGAAAGTCAGAGATTCTAGGACGTTACACTGGTCAGCGAGG
 A G G P W A E V R D S R T F T L V S E V

Obr. 10C

1030	1050	1070
TTGAGACGCAAGGAGACCTCTCGAGGAAGATTCCACAGAGGATGAGTACACGGACCGGC		
E T Q G D L S R K I P T E D E Y T D R P		
1090	1110	1130
CCTCGAGCCTTCGACTGGTTCACTGCTCCTAATCCAGCAGGGAAGCAATCTATACCCC		
S Q P S T G S L L L I Q Q G S K S I P P		
1150	1170	1190
CATTCCAGGAGCCCCGTGGAAGTGGGGGAGAACGACAGTTTAAGCCAGTGTTCACCGGGA		
F Q E P L E V G E N D S L S Q C F T G T		
1210	1230	1250
CTGAAAGCACGGTGGATTCTGAGGGCTGTGACTTCACTGAGCCTCCGAGCAGAACTGACT		
E S T V D S E G C D F T E P P S R T D S		
1270	1290	1310
CTATGCCCGTGTCCCCTGAAAAGCACCTGACAAAAGAAATAGAAGGTGACAGTTGCCTCC		
M P V S P E K H L T K E I E G D S C L P		
1330	1350	1370
CCTGGGTGCTCAGCTCCAACTCAACAGATGGCTACACAGGCAGTGGGAACACTCCTGGGG		
W V V S S N S T D G Y T G S G N T P G E		

Obr. 10D

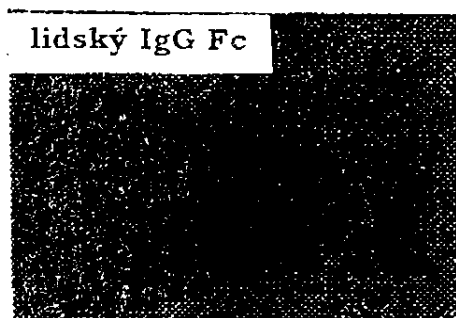
1390	1410	1430
AGGACCATGAACCCCTTCCAGGTCCTGAATGTGGACCATGCCCCAGTGTGCCTACA		
D H E P F P G S L K C G P L P Q C A Y S		
1450	1470	1490
GCATGGGCTTCCCAAGTGAAGCAGCAGCCAGCATGGCAGAGCGGGAGTACGGCCCCAGG		
M G F P S E A A A S M A E A G V R P Q D		
1510	1530	1550
ACAGGGCTGATGAGAGGGAGCCTCAGGGTCCGGAGCTCCCCAGTGACCAACCTG		
R A D E R G A S G S G S P S D Q P A		
1570	1590	1610
CCTCTGGGAACGTGACTGGAACAGTAACCTCCAGTTCTCTAGCGGGCAGGTGATGA		
S G N V T G N S N S T F I S S G Q V M N		
1630	1650	1670
ACTTCAAGGGTGACATCATCGTGGTGTAATGTCAGCCAGACCTCGCAGGAGGCCCCGGTT		
F K G D I I V V Y V S Q T S Q E G P G S		
1690	1710	1730
CCGCAGAGCCCAGTCGGAGCCCGTGGGCCCGCCCTGTGCAGGAGGAGACGCTGGCACACA		
A E P E S E P V G R P V Q E E T L A H R		

Obr. 10E

1750	1770	1790
GAGACTCCTTTGCGGGCACCGCGCGCGCTTCCCGACGCTGTGCCACCGGGCTGGGC		
D S F A G T A P R F P D V C A T G A G L		
1810	1830	1850
TGCAGGAGCGGGCACCGCGCAGAAAGGACGGGACATCGCGCGCGGTGCAGGACGAGG		
Q E Q G A P R Q K D G T S R P V Q E Q G		
1870	1890	1910
GTGGGGCGCAGACTTCACTCCATACCCAGGGGTCCGGACAATGTGCAGAAATGACCTCACC		
G A Q T S L H T Q G S G Q C A E		
1930	1950	1970
TTCTCTGTCTGCCCTGGGTGCAGGGCACCCAGTGCCTTTCCAAAAACATGGTGTAGCTAGC		
1990	2010	2030
CACGTGTGCACCTCCTCACTGGTGCAGGCTGCTGGCATGGTGATGGAGCCACCTCTCACT		
2050	2070	
TCCCTCCAGTGCCCCCTCTCCTCTGCCTCCTAC		

Obr. 10F

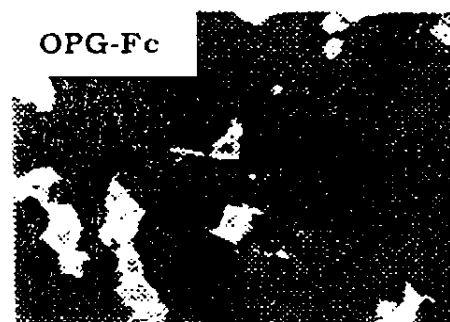
Obr. 11A

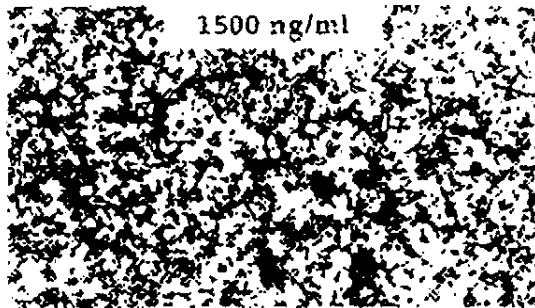


Obr. 11B

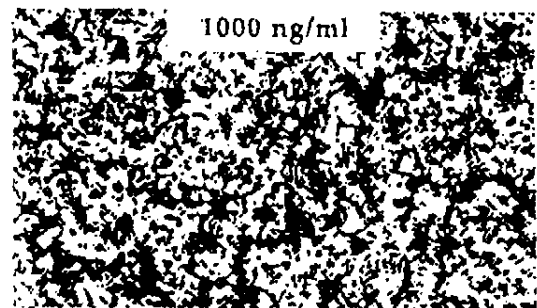


Obr. 11C

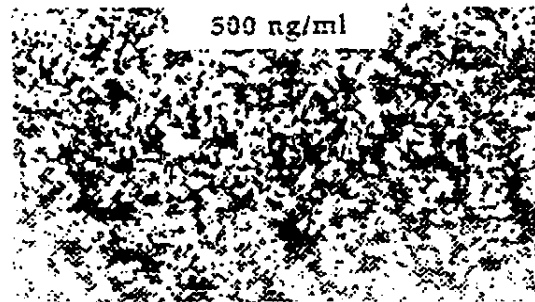




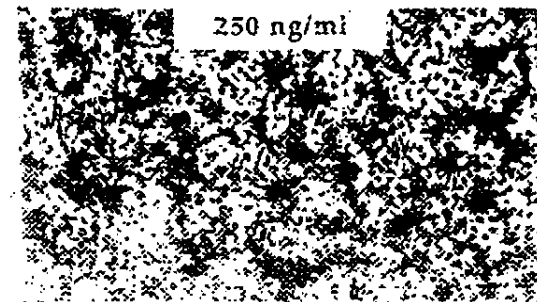
Obr. 12A



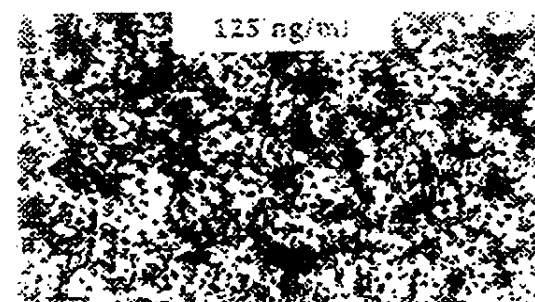
Obr. 12B



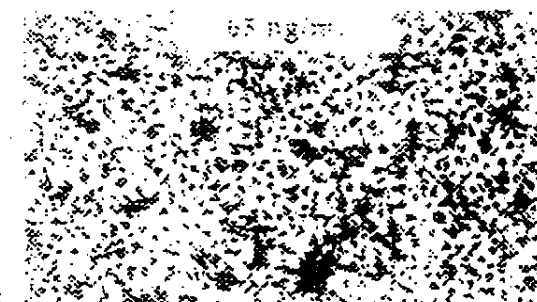
Obr. 12C



Obr. 12D



Obr. 12E

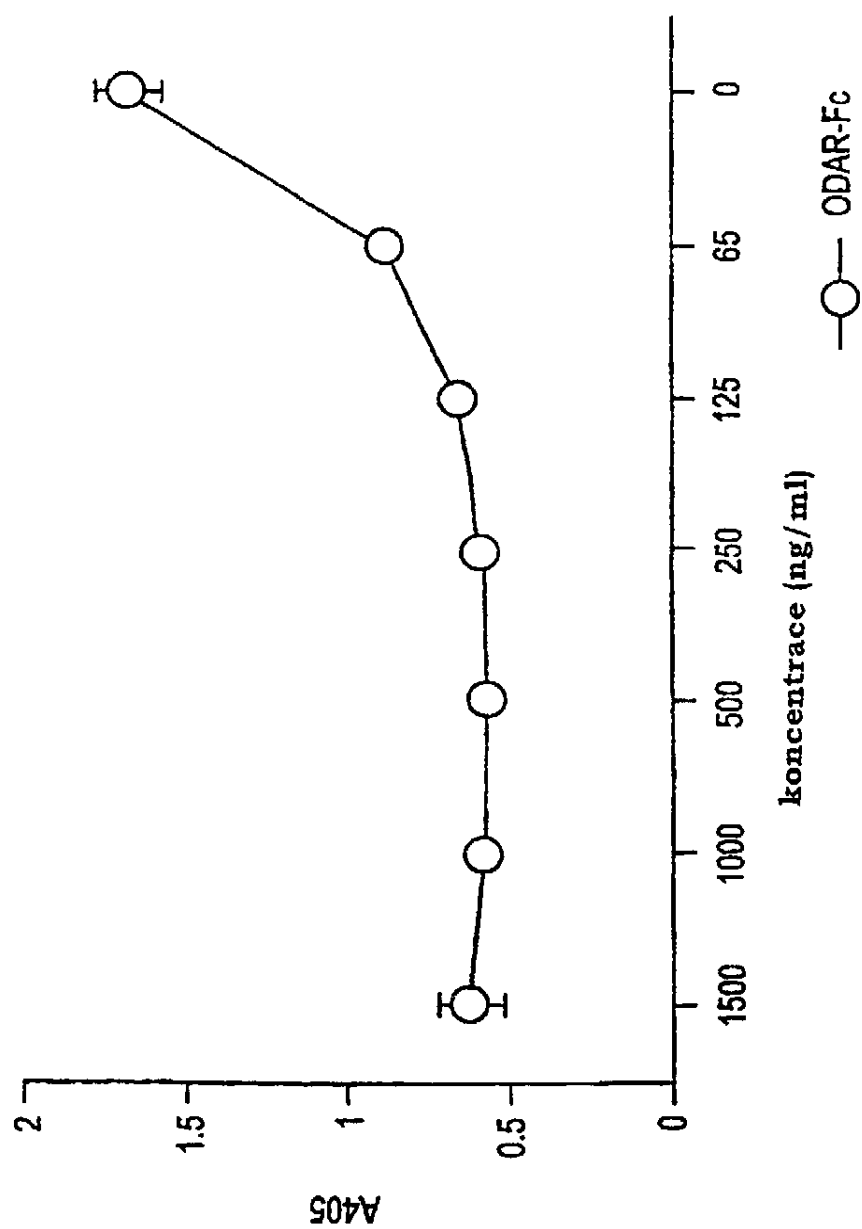


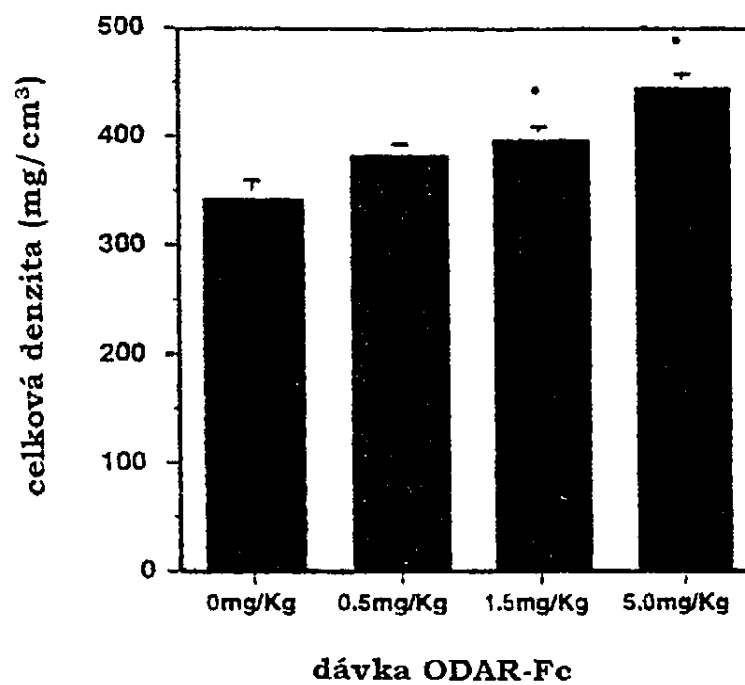
Obr. 12F



Obr. 12G

Obr. 12H





*liší se od kontroly léčené samotným vehikulem $p < 0,05$

Obr. 13

Konec dokumentu
