



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

(21) **PI0618469-3 A2**

(22) Data de Depósito: 13/11/2006
(43) Data da Publicação: 30/08/2011
(RPI 2121)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 38/48

(54) Título: **HORMÔNIO PARATIRÓIDE DE URSO PRETO E MÉTODOS DE USO DE HORMÔNIO PARATIRÓIDE DE URSO PRETO**

(30) Prioridade Unionista: 10/11/2005 US 60/736.145

(73) Titular(es): Board Of Control Of Michigan Technological University

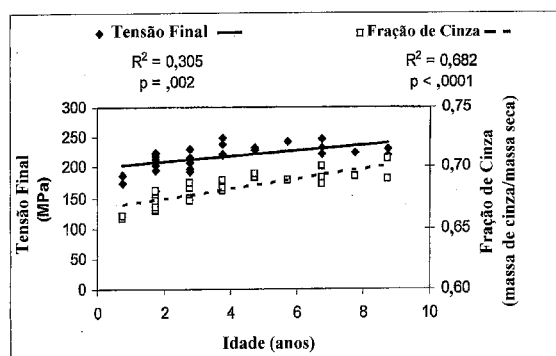
(72) Inventor(es): Seth W. Donahue

(74) Procurador(es): NELLIE ANNE DANIEL SHORES

(86) Pedido Internacional: PCT US2006060844 de 13/11/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/059470 de 24/05/2007

(57) Resumo: HORMÔNIO PARATIRÓIDE DE URSO PRETO E MÉTODOS DE USO DE HORMÔNIO PARATIRÓIDE DE URSO PRETO. O hormônio paratiróide de urso preto (PTH) e fragmentos funcionais são fornecidos aqui. Também fornecidos são métodos de usar PTH de urso preto e fragmentos funcionais para aumentar cAMP em uma célula de formação de osso; reduzir apoptose em uma célula de formação de osso; diminuir a relação de níveis de expressão de proteína Bax para proteína Bcl-2 em uma célula de formação de osso; aumentar o nível de expressão de uma ou mais de uma proteína de matriz de osso, um ativador transcricional, ou um regulador transcricional em uma célula de formação de osso; realçar a densidade mineral do osso, aumentar a massa óssea, diminuir a perda óssea, ou reduzir a incidência de fraturas de osso, ou qualquer combinação destes, em um indivíduo; também fornecidos são anticorpos voltados contra hormônio de paratiróide (PTH) preto urso e fragmentos funcionais destes.



PI - 0618469-3
Pet - 080080092654
Data - 02/04/08

"HORMÔNIO PARATIREÓIDE DE URSO PRETO E MÉTODOS DE
USO DE HORMÔNIO PARATIREÓIDE DE URSO PRETO"

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica o benefício do Pedido Pro-
5 visório U.S. No. 60/736.145, depositado em 10 de novembro de
2005, o qual está aqui incorporado por referência em sua to-
talidade.

DECLARAÇÃO COM RESPEITO À PESQUISA FEDERALMENTE
PATROCINADA

10 Esta invenção foi feita com apoio do governo dos
Estados Unidos concedido pelos Institutos Nacionais de Saúde
(NIAMS AR050420 e NIA R21 AA 14399-01 A2) e pela Fundação de
Ciência Nacional (IBN-0343515). O governo dos Estados Uni-
dos tem certos direitos nesta invenção.

15 ANTECEDENTES

As doenças de perda óssea atualmente são uma amea-
ça à saúde para aproximadamente 44 milhões de americanos,
incluindo 10 milhões com osteoporose e 34 milhões com baixa
massa óssea e em risco para desenvolver osteoporose. O nú-
20 mero de americanos com osteoporose é esperado subir em 2020.
Por conseguinte, um número maior de indivíduos está a risco
para fratura de osso devido à baixa massa óssea. Aproxima-
damente 40% de mulheres brancas e 13% de homens brancos aci-
ma de 50 anos estão em risco para fratura do quadril, espi-
25 nha, ou antebraço em toda sua vida. Os custos associados
com as fraturas relacionadas com osteoporose foram aproxima-
damente \$18 bilhões de dólares em 2002, e é esperado que
continue subindo. Além de osteoporose primária (relacionada

com a idade), a osteoporose de desuso é um problema clínico importante, especialmente para pacientes cronicamente imobilizados devido a acidente vascular cerebral ou dano da espinha dorsal. As taxas de fratura dobram comparadas aos controles saudáveis no primeiro ano seguinte à lesão da espinha dorsal e também são elevadas comparadas aos controles saudáveis após o início de acidente vascular cerebral. O desuso aumenta as taxas de fratura principalmente porque o carregamento do esqueleto reduzido causa remodelagem óssea desequilibrada que leva a perda óssea.

SUMÁRIO

Em uma modalidade, a invenção fornece um polipeptídeo isolado que compreende pelo menos 10 resíduos de aminoácido consecutivos da SEQ ID NO: 2 em que o polipeptídeo compreende pelo menos um dos resíduos de aminoácido 41 e 52 da SEQ ID NO: 2. A presente invenção também fornece um polinucleotídeo isolado que compreenda SEQ ID NO: 1.

Em outra modalidade, a invenção fornece um método de níveis de cAMP crescentes em uma célula de formação óssea compreendendo contatar a célula de formação óssea com uma quantidade efetiva de um polipeptídeo que compreende resíduos de aminoácido 1-34 da SEQ ID NO: 2, em que contatando a célula de formação óssea com o polipeptídeo aumenta os níveis de cAMP na célula de formação óssea.

Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um método para reduzir apoptose em uma célula de formação óssea compreendendo contatar a célula de formação óssea com uma quantidade efetiva de um polipeptídeo que compreende resí-

duos de aminoácido 1-34 da SEQ ID NO: 2, em que contatando a célula de formação óssea com o polipeptídeo reduz apoptose na célula de formação óssea.

Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um método para diminuir a relação de níveis de expressão de proteína Bax a proteína Bcl-2 em uma célula de formação óssea compreendendo contatar a célula de formação óssea com uma quantidade efetiva de um polipeptídeo que compreende resíduos de aminoácido 1-34 da SEQ ID NO: 2, em que contatando a célula de formação óssea com o polipeptídeo diminui a relação de níveis de expressão de proteína Bax para proteína Bcl-2 na célula de formação óssea.

Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um método para aumentar o nível de expressão de uma proteína de matriz óssea, um ativador transcricional, ou um regulador transcricional em uma célula de formação óssea compreendendo contatar a célula de formação óssea com uma quantidade efetiva de um polipeptídeo que compreende resíduos de aminoácidos 1-34 da SEQ ID NO: 2, em que contatando a célula de formação óssea com o polipeptídeo aumenta o nível de expressão da proteína de matriz óssea, do ativador transcricional, ou do regulador transcricional na célula de formação óssea.

Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um método para realçar a densidade de mineral de osso, aumentar a massa óssea, diminuir a perda óssea, ou reduzir a incidência de fraturas de osso em um indivíduo, compreendendo contatar uma célula de formação óssea no indivíduo com uma quantidade efetiva de um polipeptídeo que compreende resí-

duos de aminoácidos 1-34 da SEQ ID NO: 2, em que contatando a célula de formação óssea com o polipeptídeo realça a densidade de mineral do osso, aumentar a massa óssea, diminuir a perda óssea, ou reduz a incidência de fraturas de osso no indivíduo.

Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um método para realçar a densidade de mineral do osso, aumentar a massa óssea do osso, diminuir a perda óssea, ou reduzir a incidência de fraturas de osso, ou qualquer combinação destes, em um indivíduo, compreendendo contatar uma célula de formação óssea no indivíduo com uma quantidade efetiva de um polipeptídeo que compreende hormônio paratireóide de urso ou um fragmento funcional deste, em que contatando a célula de formação óssea com o polipeptídeo realça a densidade de mineral do osso, aumenta a massa óssea, diminui a perda óssea, ou reduz a incidência de fraturas de osso no indivíduo.

Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um polipeptídeo isolado consistindo essencialmente em resíduos de aminoácidos 1-34 da SEQ ID NO: 2.

Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um polipeptídeo isolado que consiste essencialmente em resíduos de aminoácidos 1-36 da SEQ ID NO: 2.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1 mostra a última tensão, uma medição da força óssea, e fração de cinzas, uma medição do teor de mineral do osso, os quais igualmente aumentam com idade em ursos pretos.

Figura 2 mostra que os níveis de osteocalcina de

soro são positivamente correlacionados com os níveis de hormônio paratireóideo de soro (PTH) ($p=0,0007$, $n = 27$) em urso pretos para amostras pré-hibernação, hibernação, e pós-hibernação agrupadas.

5 Figura 3 mostra a reabsorção normalizada do soro (ICTP) e formação (PICP e osteocalcina) de concentrações de marcador durante o período de desuso de 3 meses.

 Figura 4 mostra que a quantidade de PGE_2 liberada por células osteoblásticas foi maior quando as células foram
10 tratadas com soro coletado no período de pós-hibernação.

 Figura 5 mostra a seqüência da proteína de PTH de urso preto maduro comparada a outras seqüências de PTH conhecidas.

 Figura 6 mostra que PTH 1-34 tanto de urso preto
15 quanto de humano super-regula a osteocalcina ($n=2$).

 Figura 7 mostra os efeitos de PTH 1-34 de humano e de urso preto em expressão de gene relacionada com apoptose ($n=4$).

DESCRIÇÃO DETALHADA

20 Em humanos e na maioria dos outros mamíferos, fatores tal como envelhecimento e períodos prolongados de desuso podem levar a osteoporose e um risco aumentado de fratura. O desuso devido à lesão da espinha dorsal significan-
 temente diminui a densidade de mineral do osso, particular-
25 mente na tíbia e fêmur, e significativamente reduz o momento transversal de inércia da diáfise femoral. Deste modo, força a dobra do osso é reduzida por lesão da espinha dorsal e o risco de fratura é aumentado. O desuso devido ao acidente

vascular cerebral também aumenta o risco de fratura. Além disso, a descarga mecânica do osso pode causar perda óssea rápida devido aos aumentos imediatos na reabsorção óssea além de diminuições contínuas na formação óssea. As mudanças induzidas pelo desuso na remodelagem do osso aumentam a porosidade intracortical, e reduzem as propriedades transversais e mecânicas de diáfise de osso longa. O descarregamento também consideravelmente reduz a massa óssea trabecular e microarquitetura.

Os efeitos danosos de desuso no osso podem continuar no período de remobilização. Alguns ossos podem ser recuperados durante a remobilização, porém a recuperação é lenta e freqüentemente incompleta. Por exemplo, a taxa de perda óssea durante repouso na cama mais do que três vezes maior do que a taxa de ganho ósseo durante a remobilização, e a recuperação de osso perdida em exploração espacial pode ser incompleta mesmo após 5 anos. Quando as mudanças induzidas por desuso no osso podem ser completamente revertidas por atividade retomada, o período de remobilização é freqüentemente 2 a 3 vezes mais longo do que o período de imobilização. A formação óssea diminui e/ou a reabsorção óssea aumenta em muitas situações que reduzem as cargas mecânicas no osso. Porém, tanto a reabsorção quanto a formação aumentam durante a imobilização do membro dianteiro canino, contudo há perda óssea significativa neste caso. Igualmente, a renovação óssea da coxa ocorre em pacientes com lesão de espinha dorsal, que leva a perda óssea e incidência de fratura aumentada.

Em contraste com isto, os ursos pretos não sofrem perda óssea significativa devido ao envelhecimento (Figura 1) ou, mais importantemente, aos períodos prolongados de desuso durante que ocorrem durante a hibernação. Os ursos pretos em hibernação têm períodos de imobilização e ativos que podem ser aproximadamente iguais em duração em regiões do norte. Os dados em marcadores de soro de metabolismo ósseo (veja abaixo) sugerem que a reabsorção e aumento de formação óssea durante desuso em ursos, com um tempo de atraso normal (isto é, período reverso) entre a reabsorção e formação, e que o aumento na formação permaneçam juntos e equilibrados com o aumento na reabsorção. Os dados histológicos da biópsia da crista ilíaca do urso preto também mostram reabsorção e formação aumentadas durante a inatividade. Porém, os ursos são únicos pelo fato de que o volume ósseo trabecular, densidade de mineral do osso, e teor de mineral do osso não diminuem durante a hibernação. Além disso, a força óssea cortical e fração de cinza aumentam com a idade, e a porosidade não muda com a idade em ursos pretos, apesar de períodos anuais de desuso. A porosidade do osso cortical é significativamente mais baixa em ursos pardos em hibernação do que em ursos pardos ativos, e a força e geometria cruz-seccional femoral não são afetadas pela hibernação.

Os ursos evoluíram muitos mecanismos biológicos únicos para sobreviver períodos longos de imobilização sem comida. Estes mecanismos parecem incluir a reciclagem de cálcio e outros produtos de catabolismo de osso, uma vez que os ursos aumentam a renovação óssea, porém não excretam des-

perdício durante hibernação. Em humanos, a osteoporose de desuso induzida por repouso na cama é causada principalmente através de reabsorção aumentada sem um aumento correspondente na formação. Isto resulta em hipercalcemia e um equilíbrio de cálcio negativo provocado por cálcio urinário e fecal aumentado. Uma vez que os ursos não urinam ou defecam durante a hibernação, é provável que a maioria do cálcio liberado do osso por reabsorção seja reciclado de volta para o osso através da formação óssea osteoblástica. O cálcio ionizado é considerado aumentar em cerca de 23% durante hibernação, possivelmente por causa do tempo de atraso entre reabsorção e formação. Paradoxalmente, os níveis de PTH de urso preto são mais elevados quando os níveis de cálcio ionizado são mais elevados (Tabela 1). Consideradas juntamente, estas descobertas sugerem que os ursos têm mecanismos biológicos evoluídos para evitar osteoporose.

Os mecanismos que desacoplam a formação óssea de reabsorção durante desuso na maioria dos animais são desconhecidos, porém provavelmente envolve tanto fatores mecânicos quanto bioquímicos. A falta de esforço mecânico pode levar a reabsorção aumentada iniciando-se apoptose de osteócito e concomitantemente reduzindo a atividade osteoblástica. Os hormônios tal como PTH humano podem sensibilizar as células ósseas a excitação mecânica e sinergicamente, com carregamento mecânico, aumentar a formação óssea. PTH humano dado uma vez diariamente a humanos aumenta a massa óssea e diminui a incidência de fraturas. Deste modo, em ursos pretos, PTH circulante pode sensibilizar as células ósseas a

níveis baixos de excitação mecânica (possivelmente devido ao tremor ou reposicionamento no hibernáculo) para ajudar a manter a formação óssea durante desuso. PTH também pode ajudar a manter a formação óssea em ursos pretos estimulando-se diferenciação de osteoblasto e inibindo-se a apoptose de osteoblasto.

O PTH é o regulador primário de níveis de cálcio do sangue, e deste modo desempenha um papel mantendo os níveis de cálcio do soro homeostático em ursos pretos durante desuso. Os níveis de PTH do soro estão correlacionados positivamente com a osteocalcina do marcador de formação óssea ursos pretos ativos e em hibernação (Figura 2), e tanto osteocalcina quanto PTH aumentam durante hibernação. Além disso, a concentração de PTH de urso preto é mais alta quando a concentração de cálcio ionizado é mais alta. Uma vez que a reabsorção óssea aumenta durante a hibernação, porém o cálcio do soro total (tCa) permanece inalterado, os níveis aumentados de PTH provavelmente causam reabsorção renal aumentada de cálcio, facilitando a reciclagem do mineral de volta para o osso com um aumento equilibrado na formação óssea. Isto leva à preservação observada de propriedades ósseas trabeculares e corticais como densidade de mineral do osso ("BMD") e porosidade cortical. A reabsorção óssea aumenta durante a hibernação, porém a concentração de cálcio no sangue permanece constante apesar do fato dos ursos não excretarem resíduos durante hibernação. O cálcio liberado por reabsorção óssea durante hibernação pode ser reciclado e pode ser repostado no osso mantendo-se o acoplamento equili-

brado da formação óssea com reabsorção óssea. Isto apóia a idéia que PTH tem efeitos anabólicos em ursos pretos em hibernação e fornece uma explicação para a capacidade distintiva dos ursos de manter a remodelagem do osso equilibrada durante a hibernação. O efeito anabólico de PTH também pode ser realçado em ursos pretos quando atividade física é retomada seguinte o despertar da hibernação. O carregando mecânico e PTH humano foram mostrados previamente agir sinergicamente para aumentar a formação óssea *in vivo* em ratos e sinalização bioquímica *in vitro*. Durante a remobilização na primavera, a formação óssea no urso preto, como indicado por osteocalcina do soro, permanece mais alta do que em níveis de pré-hibernação.

A seqüência para o polinucleotídeo que codifica hormônio paratireóide de urso preto (*Ursus americanus*) (PTH) (SEQ ID NO: 1) foi descoberto como também a seqüência de polipeptídeo para a proteína de PTH de aminoácido 84 maduro (SEQ ID NO: 2). Além disso, o cDNA (SEQ ID NO: 3) que codifica a proteína de PTH de tamanho natural (SEQ ID NO: 4), incluindo um peptídeo sinal de aminoácido 25 (resíduos de aminoácidos 1-25 da SEQ ID NO: 4) e um 6 propeptídeo de aminoácido (resíduos de aminoácidos 26-31 da SEQ ID NO: 4), foi sequenciada. A proteína de PTH de urso preto madura difere de outras proteínas de PTH conhecidas (Figura 5). Comparada com PTH de humano, PTH de urso preto tem 11 resíduos de aminoácido diferentes fora um total dos 84 resíduos de aminoácido do polipeptídeo de PTH de tamanho natural, maduro. Também descritos aqui são vários métodos de uso para PTH de

urso preto e fragmentos funcionais deste. É especificamente previsto que os sub-fragmentos de polipeptídeo que compreendem pelo menos 10 resíduos de aminoácido consecutivos da SEQ ID NO: 2 e incluindo pelo menos um dos resíduos de aminoácido 41 ou 52, podem ser usados para desenvolver anticorpos específicos para PTH de urso preto. Estes anticorpos podem ser usados para quantificar PTH de urso preto, por exemplo, em um ensaio de ELISA.

Os receptores de PTH na superfície de células de formação óssea são acoplados às vias de sinalização de segundo mensageiro dependente de (cAMP) de monofosfato de adenosina dentro das células. Estas vias de sinalização, sucessivamente, levam a expressão aumentada de genes envolvidos na formação óssea tal como aqueles que codificam colágeno tipo 1, osteonectina, e osteopontina. Uma vez que a via de cinase A de cAMP/proteína é responsável pela maioria dos aumentos induzidos por PTH em índices de soro e histológicos de formação óssea, segue que uma resposta de cAMP aumentada pode levar a maior formação óssea. Um número relativamente pequeno de substituições de aminoácido na sequência de uma determinada proteína de PTH pode estimular maior produção de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) comparado à forma nativa. Por exemplo, ratos ovariectomizados demonstraram uma resposta de formação óssea maior do que 25% às injeções de 25 µg diárias de PTH bovino 1-34 do que para PTH de rato 1-34, onde PTH de rato 1-34 tem 5 diferenças de sequência de aminoácido comparado a PTH bovino 1-34. A injeção de PTH bovino 1-34 resulta em um aumento 37% maior em fração de vo-

lume de osso durante o tratamento.

Deste modo, é provável que as substituições de aminoácido em PTH de urso preto causem a indução de maior produção de cAMP em células de formação óssea do que PTH humano. PTH, em geral, extrai uma maior resposta de formação óssea através de mecanismos tal como apoptose de osteoblasto decrescente, diferenciação de osteoblasto crescente por Runx2, sub-regulação de regeneração negativa com base em SOST em osteócitos, e produção aumentada de mRNA para proteínas de matriz óssea, tudo através de vias mediadas por cAMP. Embora não seja necessário entender o mecanismo de uma invenção, acredita-se que PTH de urso preto seja provavelmente mais osteogênico do que outras formas de PTH, o que explica por que ursos pretos são unicamente capazes de manter a remodelagem do osso equilibrada durante desuso. Em outra modalidade da presente invenção, ao contatar uma célula de formação óssea com PTH de urso preto ou um fragmento funcional deste aumenta os níveis de cAMP na célula de formação óssea. Em outra modalidade da presente invenção, a célula de formação óssea é contatada com um polipeptídeo que compreende resíduos de aminoácido 1-34 ou 1-36 da SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade da presente invenção, a célula de formação óssea é contatada com um polipeptídeo que compreenda a SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade, a célula de formação óssea é contatada com um polipeptídeo que compreende resíduos de aminoácidos 11-84 ou 7-84 da SEQ ID NO: 2.

Como usado aqui, "contatar uma célula" com um polipeptídeo de PTH inclui adicionar o polipeptídeo à solução

de cultura, no caso de experiências *in vitro*, ou administrando o polipeptídeo a um indivíduo usando procedimentos de administração apropriados para agentes terapêuticos de polipeptídeo. "Contatar uma célula" também inclui introduzir em
5 um indivíduo um polinucleotídeo exógeno que codifica o polipeptídeo desejado em um sistema de expressão para sintetizar e liberar o polipeptídeo no indivíduo. Como usado aqui, "células de formação óssea" inclui, porém não está limitado a, osteoblastos, osteócitos, células de revestimento do osso, condroblastos, e condrócitos. Adequadamente, a célula
10 de formação óssea pode estar em um indivíduo.

As células de formação óssea regularmente de renovam, com a maioria da morte das células sendo devido à morte de célula programada, ou apoptose. Determinada esta taxa
15 regular de renovação, qualquer mecanismo que diminua apoptose de células de formar de osso levará a um número aumentado de células de formação óssea que presumivelmente promoverá o crescimento de osso. Deste modo, em outra modalidade da presente invenção, o contato de uma célula de formação óssea
20 com PTH de urso preto ou um fragmento funcional deste, reduz apoptose na célula de formação óssea. Em outra modalidade da presente invenção, a célula de formação óssea é contatada com um polipeptídeo que compreende resíduos de aminoácido 1-34 ou 1-36 da SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade da presente
25 invenção, a célula de formação óssea é contatada com um polipeptídeo que compreenda SEQ ID NO: 2.

Além disso, é possível que vários dos fragmentos de terminal C maiores de PTH de urso preto endógeno desempe-

nhem um papel nos processos de remodelagem de osso sazonais através da ligação aos CPTHs (receptores de PTH de terminal C). Especificamente, os fragmentos de terminal C de PTH de urso podem antagonizar os efeitos calcêmicos de PTH 1-84 e 1-34 prevenindo osteoclastogênese e possivelmente afetando atividade de osteoclasto maduro que normalmente ocorreria em resposta aos estímulos de reabsorção tal como desuso (Divieti, P., e outros, 2002, *Endocrinology* 143(1): 171-6). Isto pode ajudar os ursos a manter os níveis de cálcio homeostático durante toda a hibernação. Deste modo, em outra modalidade da presente invenção, os osteócitos e osteoblastos podem ser contatados com um polipeptídeo que compreende resíduos de aminoácido 11-84 ou 7-84 da SEQ ID NO: 2.

A proteína Bax promove apoptose enquanto a proteína Bcl-2 protege as células de apoptose, e uma diminuição na relação de expressão de Bax para Bcl-2 é indicativa de uma diminuição em apoptose na população de célula particular. Deste modo, em outra modalidade da presente invenção, contatar uma célula de formação óssea com PTH de urso preto ou um fragmento funcional deste diminui a relação de níveis de expressão de proteína Bax relativo aos níveis de expressão de proteína Bcl-2 na célula de formação óssea. Em outra modalidade da presente invenção, a célula de formação óssea é contatada com um polipeptídeo que compreende resíduos de aminoácido 1-34 ou 1-36 da SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade da presente invenção, a célula de formação óssea é contatada com um polipeptídeo que compreenda SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade da presente invenção, a célula de formação óssea

é contatada com um polipeptídeo que compreende resíduos de aminoácido 11-84 ou 7-84 da SEQ ID NO: 2.

O Exemplo 11 mostra que PTH de urso preto 1-34 diminui a relação de expressão de Bax/Bcl-2 em células cultivadas considerando que o PTH humano 1-34 aumenta a relação de expressão de Bax/Bcl-2 (Figura 7). Deste modo, PTH de urso preto 1-34 parece ser mais efetivo para prevenir apoptose do que PTH humano 1-34. Sem ficar preso à teoria, esta diferença pode ser o resultado das duas diferenças de aminoácido entre o PTH humano e de urso preto 1-34. Estes dados sugerem que PTH de urso é mais anabólico do que PTH humano, uma vez que a apoptose de osteoblasto diminuído pode contribuir com a resposta de formação óssea induzida por tratamento de PTH.

O contato de uma célula de formação óssea com PTH de urso preto ou um fragmento funcional deste, aumenta o nível de expressão da proteína de matriz óssea, um ativador transcricional, ou um regulador transcricional na célula de formação óssea. Em outra modalidade da presente invenção, o ativador transcricional é Runx2. Em outra modalidade da presente invenção, o regulador transcricional é c-fos. As proteínas de matriz óssea podem adequadamente incluir osteocalcina, osteopontina, e colágeno tipo I. Em outra modalidade da presente invenção, a célula de formação óssea é contatada com um polipeptídeo que compreende resíduos de aminoácido 1-34 ou 1-36 da SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade da presente invenção, a célula de formação óssea é contatada com um polipeptídeo que compreenda SEQ ID NO: 2. Em outra

modalidade da presente invenção, a célula de formação óssea é contatada com um polipeptídeo que compreende resíduos de aminoácido 11-84 ou 7-84 da SEQ ID NO: 2.

O PTH humano exógeno é usado para tratar osteoporose pós-menopausa e relacionado com a idade em humanos, porém não é um terapêutico ideal. O PTH humano 1-34 recombinante somente (LY333334, Eli Lilly, Indianapolis EM) é atualmente aprovado para uso clínico, e somente uma forma de PTH humano 1-84 recombinante está em exame para aprovação pela Administração de Comida e Droga dos Estados Unidos (ALX1-11, NPS Pharmaceuticals, Parsippany, o NJ). Embora LY333334 e ALX1-11 possam estimular aproximadamente a mesma magnitude de formação óssea *in vivo*, suas ações biológicas não são idênticas. Por exemplo, PTH 1-34 sub-regula a produção de mRNA de procolágeno-1, considerando que PTH 1-84 não faz (Nasu e outros, 1998, Endocr J, 45, 229-34). Além disso, também foi determinado que a porção de terminal C de PTH humano, quando clivada do hormônio maduro, tem funções biológicas importantes tal como a inibição de reabsorção óssea.

O uso a longo prazo de LY333334 ou ALX1-11 gera osteossarcoma em ratos, porém resultados preliminares indicam que PTH humano 1-84 tem uma taxa mais baixa de carcinogenicidade do que PTH humano 1-34, possivelmente porque os fragmentos de terminal C de PTH humano 1-84 exógeno (surging do de processamento proteolítico periférico) podem se ligar aos receptores de PTH de terminal C (CPTHs) e aumentam a apoptose de osteócito. Deste modo, embora igualmente anabólico, o PTH humano 1-84 pode ser uma terapia de osteoporose

superior comparada a PTH humano 1-34. Porém, PTH 1-84 humano não pode completamente restaurar o osso perdido; foi sugerido que homens e mulheres possam perder entre 20-30% de osso cortical e esponjoso devido à osteoporose relacionada com a idade, porém somente 8% é recuperado usando ALX1-1 durante seu regime de tratamento sugerido. Então, existe uma necessidade clínica para tratamentos de osteoporose com maiores capacidades osteogênicas.

Em uma modalidade adicional da presente invenção, o contato de uma célula de formação óssea em um indivíduo com PTH de urso preto ou um fragmento funcional deste aumenta a densidade de mineral do osso, aumenta a massa óssea, diminui a perda óssea ou reduz a incidência de fratura de osso no indivíduo. Em outra modalidade da presente invenção, a célula de formação óssea é contatada com um polipeptídeo que compreende resíduos de aminoácido 1-34 ou 1-36 da SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade da presente invenção, a célula de formação óssea é contatada com um polipeptídeo que compreenda SEQ ID NO: 2. Em outra modalidade da presente invenção, a célula de formação óssea é contatada com um polipeptídeo que compreende resíduos de aminoácido 11-84 ou 7-84 da SEQ ID NO: 2.

Adequadamente, o contato de uma célula de formação óssea em um indivíduo com PTH de urso preto ou um fragmento funcional deste, aumenta a densidade de mineral do osso, aumenta a massa óssea, diminui a perda óssea ou reduz a incidência de fratura de osso em pelo menos cerca de 5% ou pelo menos cerca de 10%. O aumento na densidade de mineral do

osso, aumento na massa óssea, diminuição na perda óssea ou redução na incidência de fratura de osso pode ser pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 75% ou pelo menos cerca de 90%. O aumento na densidade de mineral do osso, aumento na massa óssea, diminuição na perda óssea ou redução na incidência de fratura de osso, é determinado medindo-se a característica desejada no mesmo paciente antes e após o tratamento por uma técnica conhecida por alguém de experiência ordinária na técnica. Por exemplo, densidade de mineral do osso pode ser determinada por métodos que envolvem tomar raios X de energia dual (DEXA) ou varredura CT de ossos na coluna vertebral, pulso, braço ou perna.

O indivíduo pode adequadamente ser um mamífero, enquanto incluindo sem limitação, humano, cavalo, cachorro, gato, rato, urso, bovino, porco, ou cervo. O indivíduo pode ter osteoporose, ou pode estar a risco desenvolver osteoporose. Os fatores de risco para desenvolver osteoporose incluem: história pessoal de fratura depois de 50 anos de idade; baixa massa óssea atual; história de fratura em um primeiro grau relativo; ser feminino; ser magro e/ou ter uma estrutura pequena; idade avançada; uma história familiar de osteoporose; deficiência de estrogênio como resultado de menopausa, especialmente precocemente ou cirurgicamente induzido; ausência anormal de períodos menstruais (amenorréia); anorexia nervosa; baixo influxo de cálcio durante a vida; deficiência de vitamina D; uso de certos medicamentos (corticosteróides, quimioterapia, anticonvulsantes e outros);

presença de certas condições médicas crônicas, tal como aquelas que diminuem a absorção de cálcio no intestino tal como a doença de Crohn; baixos níveis de testosterona em homens; um estilo de vida inativo; atuais fumantes de cigarro; uso excessivo de álcool; e ser Caucasiano ou asiático; embora os americanos africanos e os americanos hispânicos estejam também em risco significativo. Além disso, mulheres podem perder até 20 por cento da sua massa óssea nos cinco a sete anos, seguintes a menopausa, a tornando mais suscetível a osteoporose.

O PTH de urso preto ou fragmentos funcionais deste são também úteis como uma medida preventiva (no lugar de um reconstituente), ou profilática para combater osteoporose de desuso ou prevenir osteoporose em um indivíduo em risco de desenvolver osteoporose. Uma vez que os ursos parecem ser os únicos animais que mantêm a remodelagem de osso equilibrada durante o desuso, o PTH de urso preto ou fragmentos funcionais deste, são também úteis para prevenir perda óssea durante descarga de esqueleto reduzida que ocorre, por exemplo, em astronautas durante exploração espacial e em pacientes de lesão da espinha dorsal após a lesão.

O PTH de urso preto ou fragmentos funcionais deste que pode ser administrado em combinação com vitamina cálcio e/ou D. O cálcio e/ou vitamina D podem ser administrados simultaneamente com PTH de urso preto ou fragmento funcional deste, ou podem ser administrados antes ou após o PTH de urso preto ou fragmentos funcionais deste. Adequadamente, "Vitamina D" se refere à classe de vitamina D inteira de

compostos.

A administração de PTH de urso preto ou fragmentos funcionais deste ou composições de urso preto compreendendo PTH ou fragmentos funcionais deste, pode ser realizada por
5 qualquer técnica adequada. O PTH de urso preto ou fragmento funcional deste pode ser administrado por qualquer rotina adequada incluindo, por exemplo, rotina oral, nasal, retal, e parenteral de administração. Como usado aqui, o termo parenteral inclui, porém não está limitado a administração
10 subcutânea, intradérmica, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, e intratecal, tal como através de injeção. Como é descrito acima, a administração de um polipeptídeo inclui administração de um polinucleotídeo exógeno operavelmente conectado a um promotor tal que o polinucleotídeo expresse o
15 polipeptídeo no indivíduo. A administração do polipeptídeo também inclui administração de um vetor virótico que compreende um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo. Adequadamente, o vetor virótico é um vetor adenoviral.

O PTH de urso preto ou fragmentos funcionais deste, ou composições que compreendem PTH de urso preto ou
20 fragmentos funcionais deste, pode ser administrado continuamente ou em intervalos de tempo discretos uma vez que pode ser facilmente determinado por uma pessoa versada na técnica. Um clínico normalmente versado pode determinar uma
25 quantidade adequada de PTH de urso preto ou um fragmento funcional deste, para ser administrado a um indivíduo.

A dose efetiva específica para qualquer indivíduo particular dependerá de uma variedade de fatores, incluindo

o distúrbio sendo tratado e a severidade do distúrbio; atividade do composto específico empregado; a composição específica empregada; a idade, peso corporal, saúde geral, sexo e dieta do indivíduo; rotina de administração; a taxa de ex-
5 creção ou inativação de PTH de urso preto ou fragmentos funcionais deste empregada; a duração do tratamento; outros farmacêuticos usados em combinação ou coincidentes com PTH de urso preto ou fragmentos funcionais deste e outros fatores bem conhecidos nas técnicas médicas. Por exemplo, está
10 bem dentro do nível de capacidade ordinária na técnica começar as doses em níveis mais baixos do que aqueles exigidos para alcançar o efeito desejado e aumentar a dosagem gradualmente até que o efeito desejado seja alcançado.

Adequadamente, a dosagem de PTH de urso preto ou
15 fragmentos funcionais deste em uma modalidade está em uma faixa de 0,10 µg/kg por dia a 40µg/kg por dia. Em outra modalidade, a dosagem está em uma faixa de 5µg/kg por dia a 20µg/kg por dia. Em ainda outra modalidade, a dosagem é 10 µg/kg por dia. Em outra modalidade, a dosagem está em uma
20 faixa de 10µg/dia a 400µg/dia por indivíduo. Em ainda outra modalidade, a dosagem está em uma faixa de 20µg/dia a 40µg/dia por indivíduo. Em ainda outra modalidade, a dosagem é 30 µg/dia por indivíduo. Em uma modalidade o indivíduo é um humano. Adequadamente, as dosagens diárias em uma
25 modalidade são determinadas durante uma semana, em outra modalidade durante um mês, em ainda outra modalidade durante três meses, em ainda outra modalidade durante seis meses, em ainda outra modalidade durante um ano, em ainda outra moda-

lidade durante um ano e meio, em ainda outra modalidade durante dois anos, e em ainda outra modalidade durante três anos.

Se desejado, a dose diária efetiva pode ser dividida em doses múltiplas para propósitos de administração. Por conseguinte, as composições de dose única podem conter tais quantidades ou submúltiplos destas para compor a dose diária. Se desejado, um dispositivo de liberação adequado é carregado com a dose diária efetiva para mais de um dia, por exemplo, para sete dias, quatorze dias, vinte e um dias, vinte e oito dias ou outros, e o dispositivo de liberação é usado para repetidamente administrar a dose única diária ou dose múltipla diária para desejada para o número total desejado de dias. Como notado, aqueles de experiência ordinária na técnica facilmente aperfeiçoarão as doses efetivas e regimes de co-administração como determinado por prática médica boa e pela condição clínica do indivíduo individual.

As composições que contêm PTH de urso preto ou fragmentos funcionais deste, úteis nos métodos da presente invenção, podem ser formuladas de acordo com métodos conhecidos para preparar composições farmacêuticamente úteis. As formulações são descritas em detalhes em várias fontes sendo bem conhecidas e facilmente disponíveis para aqueles versados na técnica. Por exemplo, Remington's Pharmaceutical Science, de E., W. Martin, descreve formulações que podem ser usadas nos métodos descritos. Em geral, as composições serão formuladas tal que uma quantidade efetiva do polipeptídeo seja combinada com um portador adequado para facilitar

administração efetiva da composição.

As composições usadas nos presentes métodos também podem estar em uma variedade de formas. Estes incluem, por exemplo, formas de dosagem sólida, semi-sólida, e líquida, tal como comprimidos, pílulas, pós, soluções líquidas ou suspensão, supositórios, injetáveis e soluções infusíveis, e pulverizantes. A forma dependerá do modo planejado de administração e aplicação terapêutica. As composições também adequadamente incluem excipientes farmacêuticamente aceitáveis convencionais sendo conhecidos por aqueles versados na técnica. Os exemplos de excipientes incluem água para injeção, etanol, sulfóxido de dimetila, glicerol, alumínio, amido, ácido acético glacial, acetato de sódio, manitol, meta-cresol, ácido clorídrico e/ou hidróxido de sódio para ajustar o pH de uma composição para um valor adequado, e equivalente ou caso de outro modo veículos e diluentes adequados. Para fornecer a administração de tais dosagens para a aplicação desejada, as composições farmacêuticas compreenderão entre cerca de 0,1% e 99%, e adequadamente entre cerca de 1 e 15% em peso do total de um ou mais dos polipeptídeos da presente invenção com base no peso da composição total incluindo o veículo ou diluente.

Como usado aqui, uma molécula de ácido nucléico, polinucleotídeo, polipeptídeo "isolado", ou outros, como pode ser o caso, se refere a um componente sendo pelo menos purificado parcialmente de contaminantes (por exemplo, outras espécies de polinucleotídeos, polipeptídeos, ou outros) isso seja encontrado de preferência em seu estado natural.

Um ácido nucléico, polinucleotídeo, ou polipeptídeo isolado podem conter menos do que cerca de 50%, adequadamente menos do que cerca de 75%, e adequadamente menos do que cerca de 90%, dos componentes celulares com os quais ele foi originalmente associado. Um polinucleotídeo ampliado usando PCR de forma que seja suficientemente e facilmente distinguível (em um gel, por exemplo) do resto dos componentes celulares é considerado "isolado". As moléculas de ácido nucléico, polinucleotídeos, e polipeptídeos da invenção podem ser "substancialmente puras", isto é, tendo o grau mais elevado de pureza que pode ser alcançada usando técnicas de purificação conhecidas na técnica.

Como usado aqui, um "fragmento funcional" se refere a qualquer região ou porção de um polipeptídeo ou polinucleotídeo que seja uma região ou porção de um polipeptídeo ou polinucleotídeo maior, a região ou porção tendo uma atividade ou função atribuível ao polipeptídeo ou polinucleotídeo maior. Por exemplo, um fragmento funcional de PTH humano é a região 1-34 de PTH humano.

Como usado nesta especificação e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma", "a" e "o" incluem referentes plurais a menos que o teor dite claramente o contrário. Também deveria ser notado que o termo "ou" geralmente é empregado em seu sentido incluindo "e/ou" a menos que o teor dite claramente o contrário. Todas as publicações, patentes e pedidos de patentes estão aqui expressamente incorporados por referência em sua totalidade para todos os propósitos na mesma extensão como se cada publicação ou

pedido de patente individual especificamente e individualmente fossem incorporados por referência. No caso de conflito entre a presente descrição e as patentes incorporadas, as publicações e referências, deveriam controlar a presente
5 descrição.

Também é especificamente compreendido que qualquer faixa numérica recitada aqui inclua todos os valores do valor mais baixo ao valor superior, isto é, todas as possíveis combinações de valores numéricos entre o valor mais baixo e
10 o valor mais alto enumerado devem ser consideradas serem expressamente declaradas neste pedido. Por exemplo, se uma faixa de concentração é declarada como 1% a 50%, é pretendido que os valores tal como 2% a 40%, 10% a 30%, ou 1% a 3%, etc., sejam enumerados expressamente nesta especificação.
15 Se uma faixa de concentração é "pelo menos 5%", é pretendido que todos os valores percentuais até e incluindo 100% também sejam expressamente enumerados. Estes são somente exemplos do sendo especificamente pretendido.

Os seguintes exemplos são fornecidos para ajudar
20 em um entendendo adicional da invenção. Os materiais, métodos e condições particulares empregados são pretendidos serem ilustrativos da invenção e não são limitantes no escopo da invenção.

Exemplo 1 - Sequenciamento de PTH de urso preto 1-

25 84

Extração de DNA Genômico

O sangue foi coletado de um urso preto feminino em cativeiro e armazenado a 4°C. O DNA genômico foi extraído

das amostras de sangue total em 2 semanas, usando o *Kit* de Isolamento de DNA de Sangue GenomicPrep (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) de acordo com as instruções do fabricante.

5 Clonagem de PCR e Sequenciamento

O DNA genômico de urso preto foi usado para amplificação de PCR de PTH, usando iniciadores de consensos designados com base em um alinhamento de oito seqüências de PTH de mamífero de tamanho natural disponibilizadas por
 10 GenBank incluindo bovino (*Bos taurus*, AAA30749), gato (*Felis catus*, Q9GL67), cachorro (*Canis familiaris*, P52212), humano (*Homo sapiens*, NP_000306), macaco (*Macaca fascicularis*, Q9XT35), camundongo (*Mus musculus*, NP_065648), porco (*Sus scrofa*, NP_999566), e rato (*Rattus norvegicus*, NP_058740).
 15 A amplificação de PCR foi realizada usando 10-15 ng de DNA genômico, 100 µM de dNTPs, 0,2 µM de cada iniciador, e 1 unidade de REDTaq (Sigma, St., Louis, MO) em 20µL de volume de reação. Os produtos PCR foram purificados por gel usando o *Kit* UltraClean GelSpin (MoBio Carlsbad, CA) e clonados no
 20 vetor de pCRII usando *kit* de clonagem TA (Invitrogen, Carlsbad, CA). O sequenciamento de DNA foi realizado usando *kit* DTCS Quick Start e o Sistema de Análise Genética CEQ8000 (Beckman Coulter, Fullerton, CA), seguindo as instruções do fabricante.

25 Análise da Seqüência

As seqüências de nucleotídeo foram pesquisadas contra o banco de dados de proteína GenBank usando BlastX (Altschul e outros, 1997; *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-402)

para confirmar sua identidade putativa como PTH. O alinhamento de sequência múltiplo foi realizado por ClustalW versão 1.82 (Chenna e outros, 2003; Nucleic Acids Res., 31, 3497-500). A análise filogenética foi realizada usando o método de união de vizinho (NJ) implementado no pacote de Análise de Genéticas Evolutivas Moleculares (MEGA) versão 3.0 (Kumar e outros, 2004; Brief Bioinform., 5, 150 - 63), com a opção de deleção em par para manipular os espaços de alinhamento, e com o modelo de correção Poisson para computação de distância.

Clonagem de PTH e Análise da Sequência

Várias combinações de iniciadores foram usadas para clonagem com base em PCR de PTH de DNA genômico de urso preto. Com base nos resultados do sequenciamento de clones preliminares, um iniciador de sentido específico de gene que corresponde ao códon de partida foi designado e usado junto com um iniciador de anti-sentido degenerado contendo o códon de interrupção para ampliar a região de codificação inteira de PTH. Um segundo iniciador de anti-sentido cobrindo o códon de interrupção foi designado para gerar um clone para confirmação da sequência.

As montagens de sequência revelaram uma proteína de PTH precursora de 115 aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de aminoácido 25 e um propeptídeo de aminoácido 6. A proteína madura deduzida é 84 aminoácidos, com um peso molecular calculado de 9,471 Daltons e um pi de 8,1. PTH de urso preto compartilha 84-95% de similaridade de sequência com outros PTHs de mamífero, e é muito semelhante ao PTH de ca-

chorro (91% de identidade, 95% de similaridade) (Figura 5). De forma interessante, dois resíduos de aminoácido, 41 e 52 do hormônio maduro, são exclusivos para PTH de urso preto.

Exemplo 2 - Níveis de Reabsorção óssea e Marcadores de Formação durante Hibernação

Amostras de soro

As amostras de sangue foram coletadas de cinco ursos pretos (*Ursus americanus*) mantidos em uma instalação de pesquisa de urso de cativeiro. O Instituto Politécnico de Virgínia e Comitê de Cuidado com Animal de Universidade do Estado aprovaram todos os protocolos de manipulação do urso (No.98-069-F&WS). Os ursos foram anestesiados com uma mistura 2:1 de cetamina (100 mg/ml): xilazina (100 mg/ml); a dosagem foi 1 cc da mistura por 45,5 kg de peso corporal. As temperaturas do corpo foram 4° a 6°C mais fria durante a coleta de inverno, confirmando que os ursos estavam em um estado de hibernação. Nenhuma urina ou fezes esteve presente nas tocas de hibernação. Não foi observado comportamento estressante durante quaisquer dos procedimentos de manipulação. As amostras de sangue foram tiradas da veia femoral enquanto os ursos estavam anestesiados, e as amostras foram transportadas para o laboratório em um refrigerador entulhado de gelo. Imediatamente em retorno ao laboratório, o sangue foi centrifugado para isolar o soro, que estava congelado a -29°C (-20°F). As amostras de sangue foram coletadas de cada urso a cada 10 dias a partir do primeiro de outubro até o fim de maio. A hibernação começou no começo de janeiro e terminou no começo de abril. Deste modo, as datas de

coleta abrangeram um período de pré-hibernação ativo, um período de hibernação de desuso, e um período de remobilização de pós-hibernação ativo.

Purificação de osteocalcina de urso preto e proce-
5 dimentos de RIA

O osso cortical do urso preto foi quebrado em fragmentos pequenos, desengordurado com uma mistura de 3 partes de hexano e 2 partes de isopropanol, e liofilizados. O osso secado foi moído a um pó fino sob nitrogênio líquido,
10 e a osteocalcina foi solubilizada como descrito por Hauschka e outros (1989, *Physiol. Rev.*, 69, 990-1047). A osteocalcina foi purificada do extrato de EDTA resultante por uma modificação do método de Colombo e outros (1993, *J., Bone Miner. Res.*, 8, 733-43). Brevemente, a solução de EDTA bruta
15 foi diluída 2 vezes e passada sobre uma coluna de volume que contém 10 g de partículas Sephalyte C18 (Analytichem International, Cidade de Porto, CA) previamente ativada com metanol e equilibrada com 0,1% de ácido trifluoroacético em água (0,1% de TFA). Uma lavagem extensa com 0,1% de TFA foi se-
20 guida por 30% de metanol/0,1% de TFA até que absorbância UV reduzisse para o valor de referência. Osteocalcina foi eluída com 80% de metanol/0,1% de TFA. O metanol foi evaporado sob uma corrente de ar e a solução restante foi liofilizada. A proteína seca resultante foi suspensa em 0,05 M de tampão
25 Tris, pH 8,0 e aplicada a uma coluna Biorad Econo-Q de 5 ml previamente equilibrada com o mesmo tampão. A coluna foi desenvolvida com um gradiente de 0,1 a 0,6 M de NaCl em 0,5 M de Tris, pH 8,0. A osteocalcina eluiu em um pico simétri-

co, o último para eluir da coluna. A identidade deste pico como osteocalcina foi qualitativamente verificada reagindo-se as alíquotas de fração com ácido sulfônico de diazobense-
no produzindo uma cor rosa nestas frações que contêm osteo-
5 calcina, com intensidade que corresponde à altura do pico. Tanto a coluna C18 quanto Econo-Q foram eram novas e nunca expostas à proteína de outras espécies. Experiências ante-
riores com outras espécies sugerem que o pico de osteocalci-
na final seja mais do que 99% puro. A concentração de osteo-
10 calcina de urso preto no eluído final foi determinada com reagentes BCA de Pierce Chemical (Rockford, IL).

Ensaaios Bioquímicos

O soro foi analisado quanto à PTH, 25-OH D, lepti-
na, IGF-I, e osteocalcina (um marcador de formação óssea)
15 usando RIA e ELISA.

O soro de urso preto e osteocalcina de urso preto altamente purificado foram analisados através de radioimuno-
ensaio. O anticorpo foi osteocalcina anti-rato de porco da Índia e o investigador foi osteocalcina de rato rotulada por
20 ^{125}I . As diluições de dose tanto do padrão de osteocalcina de rato (Biomedical Technologies, Inc, Stoughton, MA) quanto da osteocalcina de urso preto purificada foram incluídas no ensaio. As alíquotas de 10 μl de soro de urso preto por tubo de ensaio foram analisadas em duplicata, e todas as amostras
25 foram analisadas ao mesmo tempo. As duplicatas variaram em menos do que 5%.

Para observar as mudanças na formação óssea e mar-
cadores de reabsorção durante desuso, os valores médios de

osteocalcina para os 5 ursos pretos foram calculados para cada ponto de tempo durante o período de hibernação. Estes valores foram normalizados pelo valor de osteocalcina máximo durante o período de hibernação. Cálculos semelhantes foram
 5 feitos para medições de PICP (marcador de formação óssea) e ICTP (marcador de reabsorção óssea). Os valores normalizados dos marcadores de reabsorção e formação foram plotados no mesmo gráfico para avaliar a mudanças de magnitude temporal e relativa em formação e reabsorção óssea durante desu-
 10 so.

Usando as amostras de soro de ursos em hibernação obtidos como descrito acima, a concentração de cálcio ionizado foi medida com um eletrodo seletivo de íon (Bayer Rapi-
 dlab 865, Leverkusen, Alemanha).

15 Usando as amostras de soro obtidas como descrito acima, PTH foi analisado com um *kit* ELISA de Immutopics Internacional (San Clemente, CA); o coeficiente de intra-ensaio de variação foi 4,7%. 25-OH D foi analisado com um *kit* ELISA de ALPCO Diagnostics (Windham, NH); o coeficiente
 20 de intra-ensaio de variação foi 5%. A leptina foi medida por RIA (Linco, St., Charles, MO); o coeficiente de intra-ensaio de variação foi 3,4%. IGF-I foi medido através de RIA de extração de etanol ácido (Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA); o coeficiente de intra-
 25 ensaio de variação foi 4,3%. A osteocalcina de soro foi medida por RIA como descrito acima. Para todos os metabólitos de soro, os valores médios (para todos os ursos e todos os pontos de tempo dentro de uma determinada estação) foram

calculados para cada estação (pré-hibernação, hibernação, e pós-hibernação) e comparados com ANOVA. ANOVAs foram seguidos com testes de PLSD de Fisher para comparações de médias múltiplas. As transformações de log natural foram usadas para corrigir a não constância de variância para osteocalcina, PTH, 25-OH D1 e IGF-I para validar ANOVAs. As regressões lineares foram usadas para avaliar as correlações entre osteocalcina e os hormônios. O volume de algumas amostras de soro foram insuficientes para realizar todos os ensaios; os tamanhos de amostra para cada ensaio são indicados com os resultados.

Resultados

O marcador de reabsorção óssea (ICTP) começou a aumentar imediatamente após o começo da hibernação (Figura 3). Cada ponto de dados é o valor médio de 5 ursos. Após 10-20 dias, os marcadores de formação óssea (osteocalcina e PICP) também aumentaram e pareceram permanecer acoplados à reabsorção aumentada durante a duração da hibernação. Isto é de acordo com o período de "reversão" histológico de 1-2 semanas entre reabsorção e formação. Estes marcadores de remodelagem mostraram tendências de reabsorção e formação aumentadas em todo o período de hibernação, e a formação pareceu permanecer acoplada e equilibrada com a reabsorção. Os níveis de osteocalcina médios fora mais altos ($p < 0,0001$) durante e após a hibernação, comparados com a pré-hibernação (Tabela 1).

Os níveis de cálcio ionizados da hibernação foram significativamente ($p=0,0062$) mais altos do que os níveis de

pré-hibernação (Tabela 1). Durante a remobilização seguinte o despertar da hibernação, os níveis de cálcio ionizado não aumentaram significativamente ($p=0,37$) relativos aos níveis de hibernação, porém eles permaneceram mais altos ($p=0,015$) do que os níveis de pré-hibernação.

A osteocalcina positivamente foi correlacionada com PTH (Figura 2), porém não com 25-OH D, leptina, ou IGF-I. PTH foi significativamente mais alto na estação de pós-hibernação do que nas estações de pré-hibernação ($p=0,006$) e hibernação ($p=0,014$). O aumento em PTH durante a hibernação relativa à pré-hibernação não foi significante ($p=0,35$). A vitamina D 25-OH não mostrou variações sazonais ($p=0,64$).

A leptina de soro não mudou durante a hibernação relativa a pré-hibernação, porém foi significativamente ($p < 0,004$) mais baixa durante a remobilização de pós-hibernação (Tabela 1). IGF-1 significativamente ($p < 0,0001$) diminuiu durante a hibernação relativa à pré-hibernação e alcançou seu valor mais alto durante a remobilização (Tabela 1).

Tabela 1 - Concentrações de Metabólito de Soro Médias

	Pré-hibernação	Hibernação	Pós-hibernação
Osteocalcina (ng/ml)	10,9 ^a (7,4) [15]	70,4 ^b (43,1) [22]	49,3 ^b (26,8) [19]
Cálcio Ionizado (mmol/L)	0,709 ^a (0,150) [12]	0,871 ^b (0,093) [10]	0,960 ^b (0,014) [2]
PTH (pg/ml)	14,6 ^a (4,5) [6]	25,3 ^a (27,3) [14]	41,4 ^b (20,2) [9]
255-OH D (nmol/ml)	16,6(16,3) [9]	11,2 (6,2) [9]	16,0 (13,4) [9]

Leptina (ng/ml)	4,0 ^a (0,7) [15]	3,8 ^a (0,7) [22]	3,1 ^b (0,7) [19]
IGF-I (ng/ml)	387 ^a (88) [15]	209 ^b (52) [22]	594 ^c (207) [19]

Os valores médios são determinados em negrito, desvios padrões parênteses, e tamanhos de amostra em colchetes. Para um determinado metabólito, os valores com o mesmo sobrescrito não são significativamente ($p < 0,05$) diferentes.

5 25-OH D não mostrou diferenças sazonais significantes.

Exemplo 3 - Liberação PGE₂ por Osteoblastos de MC-3T3 é afetado por Variações Sazonais em Soro de Urso

Para avaliar os efeitos das variações sazonais em soro de urso em metabolismo de osteoblasto, as células MC-3T3 foram tratadas com soro de urso e a liberação de prostaglandina E2 (PGE₂) foi quantificada. As células MC-3T3 foram crescidas em meios essenciais alfa-mínimos (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementados com 10% de soro bovino fetal (Hyclone, Logan, UT) e 1% de solução de penicilina-estreptomicina a 37°C entre 5% de CO₂ durante 24 horas. Os meios foram aspirados e substituídos com 10 ml de meios frescos contendo 10% de soro de urso coletado antes da hibernação, durante hibernação, ou após a hibernação. As células foram permitidas crescer durante um adicional de 24 horas, e então os meios foram coletados e congelados a -20°C para análise de PGE₂. As células foram removidas dos pratos de cultura usando 0,25% de tripsina em EDTA, pelotizadas através de centrifugação, e quantificadas com um azul triptano e hemocitômetro.

25 Os níveis de PGE₂ foram determinados usando o imunoensaio de enzima competitivo PGE₂ Biotrak™ (Amersham Bios-

ciences, Piscataway, NJ). O ensaio foi realizado em duplicata usando 50µl de amostras de todas as amostras de meios experimentais. A reação foi parada antes da determinação do ponto final usando 1M de ácido sulfúrico e lida a 450nm usando um leitor de microplaca (VERSAmax, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA). Os valores de densidade óptica duplicados foram corrigidos para ligação não específica e foram calculados a média, e comparados com uma curva padrão para determinar a quantidade de PGE₂ em cada cavidade. Estes valores foram corrigidos para volume médio total e normalizados pelo número de células na amostra. ANOVA foi usado para comparar o PGE₂ normalizado entre os três grupos de soro.

A quantidade de PGE₂, liberada por células osteoblásticas tratadas com soro de urso *in vitro*, foi mais alta para tratamento com soro de pós-hibernação comparado ao soro de pré-hibernação (p=0,058) e soro de hibernação (p=0,014) (Figura 4). A liberação de PGE₂ pelas células tratadas com o soro de hibernação não foi significativamente diferente (p=0,48) comparado com o soro de pré-hibernação. As mudanças sazonais em liberação de PGE₂ mostraram tendências semelhantes às mudanças sazonais em soro IGF-I. Os P-valores são para comparações com o valor de pós-hibernação. Os valores de pré-hibernação e hibernação não foram diferentes um do outro (p=0,48).

Exemplo 4 - Cultura em soro de urso diminui a relação de expressão de gene de Bax para Bcl-2 durante a hibernação

As amostras de soro de sangue foram removidas de 4 ursos pretos fêmeas entre 2004-2005 como descrito acima. As datas de amostra abrangeram um período de pré-hibernação ativo, um período de desuso de hibernação, e um período de remobilização pós-hibernação. As células osteoblásticas MC-3T3 foram cultivada durante 24 horas em meios contendo 10% de soro de urso, após o que o RNA total foi isolado usando um Kit de isolamento de RNA BioRad AquaPure (No.732-6370, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Para gerar cDNA, a transcrição reversa foi realizada usando transcriptase reversa de Sobrescrito II (Invitrogen, Carlsbad, CA), e 0,5 µg de iniciador Oligo(dT)12-18 a 42°C durante 20 minutos, 50°C durante 10 minutos e 42°C durante 1 hora em um termociclador gradiente (gradiente Mastercycler, Eppendorf, Westbury, NY). Os iniciadores para a proteína Bax pró-apoptótica e proteína Bcl-2 anti-apoptótica foram designados usando software PrimerQuest (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) e as seqüências do banco de gene NCBI. PCR semi-quantitativo foi realizado usando RedTaq e um protocolo consistindo em 94°C durante 2 minutos, ciclos de 94°C durante 30 segundos, 69,5°C durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto, e uma extensão final a 72°C durante 5 minutos. A intensidade da faixa foi quantificada usando o pacote de software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD) e normalizou para a expressão de três genes de manutenção (Gapdh, β -actina, ciclofilina).

ANOVA com teste pós-hoc de Diferença Significante Mínima Protegida (PLSD) foi usado para comparar a relação de

Bax para Bcl-2 durante as três estações (pré-hibernação, hibernação, pós-hibernação). Embora não alcançada a significância estatística ($p=0,300$), a relação de Bax/Bcl-2 diminuiu em aproximadamente 42% durante a hibernação relativa à pré-hibernação. A falta de significância estatística foi provavelmente relacionada ao tamanho de amostra pequeno ($n=2$ para cada estação). Estes dados sugerem que o soro de ursos em hibernação contém uma molécula biológica que diminui a apoptose de osteoblasto. Uma vez que a osteocina de marcador de formação óssea e o PTH endógeno ambos aumentam durante a hibernação (Donahue e outros, 2006; J. Exp. Biol., 209, 1630-8), é possível que PTH de urso endógeno cause uma diminuição em apoptose de osteoblasto durante a hibernação que sucessivamente aumenta a formação óssea.

Exemplo 5 - Comparação de Efeitos de PTH de Urso Preto vs. humano 1-84 ou Subfragmentos destes em cAMP em Linhagens de Célula Óssea

O PTH de urso preto recombinante de tamanho natural (resíduos 1-84) é produzido e seus efeitos em níveis de concentração de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) em linhagens de célula óssea (células osteoblásticas MC-3T3 e células osteocíticas MLO-Y4) são investigados e comparados com resultados obtidos usando PTH humano 1-84 recombinante. As experiências equivalentes são administradas usando subfragmentos de PTH de urso preto e humano, o subfragmentos incluindo resíduos de aminoácidos 1-34, 1-36, 7-84, 11-84, e 41-52 da proteína madura (1-84) de tamanho natural. Para algumas experiências, os polipeptídeos de PTH de urso preto

e humano são sintetizados com métodos de fase sólida.

Para determinar o efeito de várias formas de polipeptídeos de PTH de urso preto e humano recombinantes em níveis de cAMP em células de formação óssea, as células ósseas
5 cultivadas (MC-3T3 e MLO-Y4) são contatadas durante 10 ou 30 minutos com polipeptídeo de tamanho natural de PTH de urso preto ou humano (isto é resíduos de aminoácidos 1-84) ou um dos subfragmentos listados acima. Após a célula ser contatada com o polipeptídeo de PTH, a concentração de cAMP na
10 célula é medida usando um ensaio de ligação competitivo como descrito também abaixo.

Para todas as experiências usando polipeptídeos recombinantes, os peptídeos liofilizados são reconstituídos a 100 uM de concentrações de matéria-prima em 1 mM de ácido
15 acético, e diluídos para 10 uM de concentrações de matéria-prima de trabalho antes de uso.

Cultura de Célula

As células de subclone 14 MC-3T3 (ATCC, CRL-2594) e células MLO-Y4 (obtidas de L.F. Bonewald, University de
20 Missouri, Cidade de Kansas, MO) são mantidas em meios essenciais alfa-mínimos, 1% de penicilina/estreptomicina, e 10% de soro (MC-3T3: 10% de soro bovino fetal (FBS), MLO-Y4: 5% de FBS e 5% de soro de bezerro bovino), a 37°C entre 5% de CO₂. Todos os procedimentos descritos aqui são repetidos
25 com culturas de célula independentes tal que n= 6 para todas as combinações de tratamento em cada ensaio.

Efeitos de tratamento de PTH em atividade de cAMP intracelular.

As células de MC-3T3 e MLO-Y4 são semeadas a densidades apropriadas (MC-3T3: 50.000 células/cm², MLO-Y4 15.000 células/cm²) em placas de 6 cavidades. As células são cultivadas durante a noite para alcançar ótima confluência. O meio de cultura é então aspirado e substituído com meio que contém ou 10% de soro + veículo (1 mM de ácido acético) ou 10% de soro + 100nM de PTH (humano ou urso 1-84, ou um subfragmento deste). As células são cultivadas sob estas condições durante 10 ou 30 minutos (Carter, P., H. e outros, 1999, J Biol. Chem. 274(45), 31955-60; Chen, X., e outros, 2002, Am. J. Physiol. Cell Physiol. 283(5), C1432-40; Schiller, P., C. e outros, 1999, J., Bone Miner. Res. 14(9), 1504-12). Seguinte a cultura, as células são tripsinadas, centrifugadas, e resuspensas em tampão de lise. A suspensão é incubada durante 10 minutos e centrifugada para separar os resíduos celulares. O sobrenadante do lisado de célula (seguinte uma diluição de 2 vezes) é analisado quanto à concentração de cAMP usando um ensaio de ligação competitivo (Ensaio AMP Cíclico No.KGE002, R&D Systems, Mineápolis, MN).

Com cada um dos polipeptídeos testados, há um aumento nos níveis de cAMP celulares em resposta ao polipeptídeo com base em PTH de urso preto.

Exemplo 6 – Comparação de Efeitos de PTH de Urso Preto vs. humano 1-84 ou Subfragmentos destes em Apoptose em Linhagens de Célula Óssea.

O PTH de urso preto recombinante de tamanho natural (resíduos 1-84) é produzido e seus efeitos em apoptose em linhagem de célula óssea (células osteoblásticas MC-3T3 e

células osteocíticas MLO-Y4) são investigados e são comparados aos resultados obtidos usando PTH humano recombinante 1-84. Experiências equivalentes são conduzidas usando subfragmentos de PTH de urso preto e humano, os subfragmentos incluindo os resíduos de aminoácidos 1-34, 1-36, 7-84, 11-84, e 41-52 da proteína madura de tamanho natural (1-84). Para algumas experiências, os polipeptídeos de PTH de urso preto e humano são sintetizados com métodos de fase sólida.

Para determinar a capacidade relativa de PTH de urso preto e humano prevenir apoptose de osteoblasto e osteócito (sob condições pró-apoptóticas), as células são incubadas com PTH de humano ou de urso preto 1-84, ou um dos subfragmentos listados acima, durante uma hora. Posteriormente, as células são tratadas durante 6 horas com dexametasona para induzir apoptose. Apoptose é quantificado com uma ELISA, como descrito também abaixo.

Para todas as experiências usando polipeptídeos recombinantes, os peptídeos liofilizados são reconstituídos para 100uM de concentrações de matéria-prima em 1mM de ácido acético e diluídos para 10uM de concentrações de matéria-prima de trabalho antes de uso.

Experiências adicionais são realizadas com células MC-3T3 usando ou 0,1% ou 10% de FBS. As experiências adicionais com menos (0,1%) do que a quantidade normal (10%) de FBS são realizadas e os resultados são analisados para determinar se há uma resposta significativamente diferente entre as experiências sendo feitas com níveis normais ou mais baixos de soro. Nas experiências informadas neste Exemplo,

os resultados não são afetados pela quantidade de FBS sendo usada. Os estudos de proteção de apoptose mostram que cada um dos polipeptídeos testados reduz ou previne apoptose em células MC-3T3.

5 Cultura de Célula

O subclone de células MC-3T3 14 (ATCC1 CRL-2594) e células MLO-Y4 (obtidas de LF. Bonewald, University of Missouri, Cidade de Kansas, MO) são mantidos em meios essenciais alfa-mínimos, 1% de penicilina/estreptomicina, e 10% de soro (MC-3T3: 10% de soro bovino fetal (FBS), MLO-Y4: 5% de FBS e 5% de soro de bezerro bovino), a 37°C entre 5% de CO₂. Todos os procedimentos descritos aqui são repetidos com culturas de célula independentes tal que n = 6 para todas as combinações de tratamento em cada ensaio.

15 Efeitos de tratamento de PTH em apoptose

As células MC-3T3 são semeadas a 50.000 células/cm², e as células MLO-Y4 são semeadas a 15.000 células/cm² em placas de 6 cavidades e cultivadas para alcançar confluência ideal durante a noite. Os meios de cultura são aspirados e substituídos com meios contendo ou 10% de soro + veículo (1 mM de ácido acético) ou 10% de soro + 100NM de PTH (humano ou urso 1-84, ou um subfragmento destes). Após uma incubação de uma hora (Jilka e outros, 1999; J. Clin. Invest., 104, 439-46), 10 µM de dexametasona ou seu veículo (DMSO) são adicionados a cada cavidade e as células são incubadas durante 6 horas (Bellido, T., e outros, 2003, J., Biol. Chem. 278(50), 50259-72.; Jilka e outros, 1999, J., Clin. Invest., 104, 439-46). O polipeptídeo de PTH ou veí-

culo é deixado *in situ* durante indução de apoptose porque a supressão de apoptose por PTH é auto-limitante (Bellido e outros, 2003). Após 6 horas, as células são tripsinadas, centrifugadas, re-suspensas, e contadas usando um hemocitô-
5 metro. 50.000 Células são removidas da suspensão e colocadas no tampão de lise. Os sobrenadante de lisado (seguinte à centrifugação) são removidos para análise e armazenados a -20°C.

Apoptose é quantificado do sobrenadante lisado com
10 uma ELISA (Cell Death Detection ELISA, No.1544675, Roche Applied Science, Indianapolis, EM). Este ensaio detecta mono- e oligonucleossomas de DNA celular fragmentado na fração citoplásmica de lisados de célula, e então fornece uma boa medida boa dos estágios do começo e do meio de apoptose. Resumidamente, as amostras são diluídas em solução de tampão e
15 adicionadas às cavidades de microplaca cobertas com um anticorpo monoclonal de camundongo anti-histona (clone H11-4). O sobrenadante de lisado das células tratadas com veículo serve como um controle negativo. As densidades ópticas são
20 medidas a 405nm seguinte a adição de um anticorpo monoclonal de camundongo anti-DNA conjugado por peroxidase (clone MCA-33), e a quantidade de apoptose em cada amostra é determinada relativo ao seu controle negativo correspondente. Todas as amostras são analisadas em duplicata.

25 Cada um dos polipeptídeos testados diminuiu apoptose das células (sob condições pro-apoptóticas).

Exemplo 7 - Comparação de Efeitos de PTH de Urso Preto vs. Humano 1-84 ou Subfragmentos destes em Expressão

de Gene em Linhagens de Célula de Osso.

PTH de urso preto recombinante de tamanho natural (resíduos 1-84) é produzido e seus efeitos em níveis de expressão de gene em linhagens de célula óssea (células osteoblásticas MC-3T3 e células osteocíticas MLO-Y4) são investigados e são comparados com resultados obtidos usando PTH humano recombinante 1-84. Experiências equivalentes são conduzidas usando subfragmentos de PTH de urso preto e humano, os subfragmentos incluindo resíduos de aminoácidos 1-34, 1-36, 7-84, 11-84, e 41-52 da proteína madura de tamanho natural (1-84). Para algumas experiências, os polipeptídeos de PTH de urso preto e humano são sintetizados com métodos de fase sólida.

Para determinar o efeito de PTH de urso preto e humano na regulação de matriz óssea, genes anti-apoptose (Bcl-2) reguladores transcricionais, e as células Bax de gene pró-apoptose, são cultivadas durante 1 ou 3 horas com PTH de urso ou humano 1-84 ou um subfragmento. A expressão de gene é quantificada com PCR em tempo real.

Para todas as experiências usando polipeptídeos recombinantes, os peptídeos liofilizados são reconstituídos para 100uM de concentrações de matéria-prima em 1 mM de ácido acético e diluídos para 10uM de concentrações de matéria-prima de trabalho antes do uso.

As experiências adicionais são realizadas com células MC-3T3 usando ou 0,1% ou 10% de FBS. As experiências adicionais com menos (0,1%) do que a quantidade normal (10%) de FBS são realizadas e os resultados são analisados para

determinar se há uma resposta significativamente diferente entre as experiências sendo feitas com níveis normais ou mais baixos de soro. Nas experiências informadas neste Exemplo, os resultados não são afetados pela quantidade de FBS sendo usada. PCR em tempo real é usado para avaliar os níveis de expressão de gene em pontos de tempo de 1- e 3- horas seguinte a adição do polipeptídeo, mostrando em particular que PTH de urso preto 1-34 super-regula a expressão de gene em células MC-3T3.

10 Cultura de Célula

As células de subclone 14 MC-3T3 (ATCC, CRL-2594) e células MLO-Y4 (obtidas de L. F. Bonewald, University of Missouri, Cidade de Kansas, MO) são mantidas nos meios essenciais alfa-mínimos, 1% de penicilina/estreptomicina, e 10% de soro (MC-3T3: 10% de soro bovino fetal (FBS) 1 ML de O-Y4: 5% de FBS e 5% de soro de bezerro bovino), a 37°C entre 5% de CO₂. Todos os procedimentos descritos aqui são repetidos com culturas de célula independentes tal que n= 6 para todas as combinações de tratamento em cada ensaio.

20 Efeitos de tratamento de PTH em expressão de gene

As células MC-3T3 são semeadas a uma densidade de 50.000 células/cm², e células MLO-Y4 são semeadas a uma densidade de 15.000 células/cm² em placas de 6 cavidades e cultivadas para alcançar confluência ideal durante a noite. Os meios de cultura são aspirados e substituídos com meios que contêm ou um 10% de soro + veículo (1 mM de ácido acético) ou 10% de soro + 100NM de PTH (humano ou urso 1-84, ou um subfragmento como listado acima). As células são cultivadas

sob estas condições durante 1 ou 3 horas; estes pontos de tempo correspondem com super-regulação induzida por PTH de c-fos e osteocalcina (Jiang e outros, 2004, J., Biol. Chem., 279, 5329-37; Chen e outros, 2002). RNA total é isolado usando o Sistema de Isolamento de RNA Total SV (Promega, Madison, WI).

A transcrição reversa para gerar cDNA é realizada usando transcriptase reversa de Sobrescrito II (Invitrogen, Carlsbad, CA), e 0,5 µg de iniciador de Oligo(dT)12-18 a 42°C durante 20 minutos, 50°C durante 10 minutos e 42°C durante 1 hora em um termociclador gradiente (gradiente Mastercycler, Eppendorf, Westbury, NY). Os iniciadores para todos os genes de interesse (osteocalcina, osteopontina, colágeno tipo I, c-fos, Runx2, Bax, Bcl-2, SOST) e genes de manutenção (Gapdh, β-actina, ciclofilina) são designados usando software PrimerQuest (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) e as seqüências do banco de gene NCBI, e as condições de PCR são otimizadas usando RNA de células MC-3T3 e MLO-Y4. PCR em tempo real é realizado usando o sistema PCR em tempo real Mx3000P (Stratagene, La Jolla, CA). O protocolo envolve um começo quente a 95°C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 30 segundos (denaturação), 69°C durante 1 minuto (recozimento) e 72°C durante 1 minuto (extensão). A exceção para este protocolo é para c-fos, que tem uma temperatura recozimento de 66°C. Cada 25µl de reação contém 1x de mistura verde Absolute™ qPCR SYBR® (ABgene, Rochester, NY), 0,1µM de iniciador dianteiro e reverso, e 2,5 ng de modelo de cDNA equivalente de

RNA total. A expressão de gene é determinada usando o método de curva padrão relativo normalizado para a média geométrica dos três genes de manutenção. Todas as amostras são medidas em duplicata, e qualquer amostra com um coeficiente de variação (CV) maior do que 10% é re-analisada.

Os polipeptídeos causam uma super-regulação de matriz óssea, regulador transcricional, e genes ativadores transcricionais, e uma diminuição na relação de expressão de Bax/Bcl-2.

10 Exemplo 8 - Comparação dos Efeitos de Soro de Urso Preto de Estações Diferentes em Apoptose de Célula Óssea e Expressão de Gene, e Correlação com Níveis de Soro de PTH e Osteocalcina

As amostras de sangue são coletadas de pelo menos 15 3 ursos pretos fêmeas diferentes (*Ursus americanus pallas*) mantidos no Virginia Tech Center para Pesquisa de Urso entre 2004 e 2005. O soro de ursos pretos adicionais é coletado em anos subseqüentes. O Instituto Politécnico de Virgínia e Comitê de Cuidado com Animal da Universidade do Estado aprovaram todos os protocolos de manipulação de urso (No.98-069-F&WS). Os ursos são anestesiados com uma 2:1 mistura de cetamina (100-mg/ml):xilazina (100-mg/ml); a dosagem é 1 cc da mistura por 45,5 kg de massa corpórea. As amostras de sangue são tiradas da veia femoral enquanto os ursos estão anestesiados, e as amostras são transportadas para o laboratório em um refrigerador entulhado gelo. Imediatamente em retorno para o laboratório, o sangue é centrifugado para isolar o soro que está então congelado a -20°C. As amostras

20

25

de sangue são coletadas de cada urso a cada 10 dias desde o princípio de outubro até o final de maio. A hibernação começa no início de janeiro e termina no começo de abril. Deste modo, as datas de coleta abrangem um período de pré-
5 hibernação ativo, um período de hibernação de desuso, e um período de remobilização pós-hibernação ativo.

As alíquotas de 10µl de soro de urso são analisadas em duplicata para concentração de osteocalcina através de radioimunoensaio (Patterson-Allen e outros, 1982; anal.
10 Biochem., 120, 1-7). Este ensaio foi previamente validado para ursos (Donahue e outros, 2006; J. Exp. Biol., 209, 1630-8). O anticorpo é osteocalcina anti-rato de porco da Índia e o investigador é osteocalcina de rato rotulada por ¹²⁵I. As alíquotas de 100µl são analisadas do soro de urso
15 em duplicata para concentração de PTH (Donahue e outros, 2006; J. Exp. Biol., 209, 1630-8) com um ELISA (Kit ELISA de PTH Intacto Porcina, No.60-3305, Immutopics, Inc., San Clemente, CA). Este ensaio liga a região de PTH 39-84, e requer que a região de PTH 13-34 colorimetricamente informe a
20 concentração de PTH. Deste modo, isto fornece uma boa medida de concentração de PTH intacta (1-84) como também subfragmentos de terminal C 7-84 e 11-84. Este ELISA foi mostrado inter-reagir com PTH de urso (Donahue e outros, 2006; J. Exp. Biol., 209, 1630-8), e tem 100% inter-reatividade com
25 PTH humano. Para validar este ensaio para ursos pretos, amostras de meio de cultura que contêm 10nM de PTH de urso preto ou humano 1-84 recombinante são analisadas em duplicata. A concentração conhecida das amostras de PTH é compara-

da à concentração medida determinada da curva padrão do ensaio. Qualquer diferença potencial em inter-reatividade determinada destas amostras é usada como uma correção para concentração de PTH de urso preto endógeno nas amostras de
5 soro de urso preto.

Os procedimentos descritos acima para apoptose de PTH de urso preto recombinante e experimentos de cultura de célula de expressão de gene com células tipo ósseas cultivadas, são repetidos, substituindo os meios contendo 100nM de
10 PTH recombinante com meios de cultura que contêm 10% de soro de urso preto (de períodos de pré-hibernação, hibernação, ou pós-hibernação). Os volumes de soro são calculados seguindo o ELISA de PTH descrito.

O soro das estações de hibernação e pós-hibernação
15 causa uma maior prevenção de apoptose comparado ao soro de pré-hibernação, porque PTH é mais alto durante a hibernação e pós-hibernação do que no soro de pré-hibernação. As concentrações de PTH de soro endógeno são inversamente relacionadas com os níveis de apoptose, pelo fato de que os níveis
20 de PTH de soro mais elevados correspondem às taxas mais baixas de apoptose, isto é, as concentrações de PTH de soro estão correlacionadas negativamente com os níveis de apoptose.

Exemplo 9 - Teste *In Vivo* de PTH de Urso Preto

O PTH de urso preto, ou de tamanho natural (1-84)
25 ou um dos vários subfragmentos funcionais destes (1-34; 1-36; 7-84; 11-84; 41-52), é testado *in vivo* quanto à estimulação anabólica de células ósseas comparadas a um PTH humano equivalente ou subfragmento. Cada um dos polipeptídeos de

PTH é sintetizado e suspenso em um veículo farmacêutica-
mente apropriado para injeção subcutânea. O PTH de tamanho na-
tural ou um fragmento funcional deste, de urso preto ou hu-
mano, é administrado a camundongos a uma dose de 40 µg/kg de
5 peso corporal diariamente durante 7 semanas. O PTH de urso
preto ou fragmentos funcionais deste, causa maiores aumentos
na força de osso, massa, e teor de mineral do que o polipep-
tídeo de PTH humano equivalente.

Exemplo 10 - Uso de PTH de Urso como Agente Profi-
10 lático para Reduzir ou Prevenir Perda Óssea

Osteoporose é induzida em camundongos através de
suspensão da pata traseira (um modelo de desuso de osteopo-
rose) e através de ovariectomia (um modelo pós-menopausal de
osteoporose). Após começar a suspensão da pata traseira ou
15 o ovariectomia ser completada, ao camundongo são dadas doses
regulares de PTH de urso preto ou um fragmento funcional
deste. Os camundongos tratados com PTH de urso preto ou
fragmentos funcionais deste mostram menos perda óssea do que
os ratos não tratados.

20 Exemplo 11 - PTH de urso e humano 1-34 ambos su-
per-regulam a expressão de gene de osteocalcina, porém so-
mente PTH de urso 1-34 diminui a relação de expressão de
Bax/Bcl-2

As células MC-3T3 foram incubadas em veículo ou
25 100nM de PTH de urso ou humano 1-34 sintético durante 3 ou 6
horas (n= 2 ou 4). RNA total foi isolado, e cDNA foi gerado
com transcrição reversa. Os iniciadores para o colágeno ti-
po I de proteínas de matriz óssea e osteocalcina, a proteína

Bax pró-apoptótica, a proteína Bcl-2 anti-apoptótica, e os genes de manutenção Gapdh, β -actina, e ciclofilina foram designados usando software PrimerQuest (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). PCR em tempo real foi realizado
5 usando sistema de PCR em tempo real Mx3000P (Stratagene, La-JoIIa, CA). Todas as amostras foram medidas em duplicata. A expressão de gene foi determinada usar era o método de curva padrão relativo normalizado para a média geométrico dos três genes de manutenção (Gapdh, β -actina, e ciclofili-
10 na). Os genes relacionados com apoptose foram analisados como a relação de expressão de Bax/Bcl-2, uma vez que uma diminuição nesta relação está associada com a apoptose diminuída *in vitro*.

A cultura em PTH de urso ou humano 1-34 durante 6
15 horas não afetou a expressão de colágeno tipo I, porém substancialmente super-regulou a expressão de osteocalcina comparada ao controle de veículo (Figura 6). Não houve nenhuma diferença significativa entre PTH de urso e humano ($p > 0,09$).

20 A cultura em PTH de urso 1-34 durante 3 horas diminuiu a relação de expressão de Bax/Bcl-2, sugerindo apoptose diminuída, porém a cultura em PTH humano 1-34 durante 3 horas aumentou a relação, sugerindo apoptose aumentada (Figura 7). A diferença entre PTH de urso e humano foi esta-
25 tisticamente significativa ($p=0,047$).

Listagem de Sequência

<110> Quadro de controle de Michigan Technological University
 <120> Hormônio Paratiróideo de Urso Preto e Métodos de Uso de Hormônio Paratireóideo de Urso Preto
 <130> 066040-9774-W000
 <140> Novo Pedido Internacional
 <141> 2006-11-13
 <150> US 60/736,145
 <151> 2005-11-10
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 255
 <212> DNA
 <213> Ursus americanus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(252)
 <223> cDNA codificando o polipeptídeo de PTH maduro

<400> 1
 tct gtg agc gag ata cag ttt atg cat aac ctg ggc aaa cat ctg agc 48
 Ser Val Ser Glu Ile Gln Phe Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Ser
 1 5 10 15
 tcc atg gag agg gtg gaa tgg ctg cgg aag aag ctg cag gac gtg cac 96
 Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His
 20 25 30
 aac ttt gtt gcc ctt gga gct cca aca gcg cac aga gat ggt ggt tcc 144
 Asn Phe Val Ala Leu Gly Ala Pro Thr Ala His Arg Asp Gly Gly Ser
 35 40 45
 cag agg ccc cag aaa aag gaa gac aat gtg ctg gtt gag aac cat caa 192
 Gln Arg Pro Gln Lys Lys Glu Asp Asn Val Leu Val Glu Asn His Gln
 50 55 60
 aaa agt ctc gga gaa gca gac aaa gct gat gtg gat gta tta acc aaa 240
 Lys Ser Leu Gly Glu Ala Asp Lys Ala Asp Val Asp Val Leu Thr Lys
 65 70 75 80
 tct aaa ccc caa tga 255
 Ser Lys Pro Gln

<210> 2
 <211> 84
 <212> PRT
 <213> Ursus americanus

<400> 2
 Ser Val Ser Glu Ile Gln Phe Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Ser
 1 5 10 15
 Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His

20 25 30
 Asn Phe Val Ala Leu Gly Ala Pro Thr Ala His Arg Asp Gly Gly Ser
 35 40 45
 Gln Arg Pro Gln Lys Lys Glu Asp Asn Val Leu Val Glu Asn His Gln
 50 55 60
 Lys Ser Leu Gly Glu Ala Asp Lys Ala Asp Val Asp Val Leu Thr Lys
 65 70 75 80
 Ser Lys Pro Gln

<210> 3
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Ursus americanus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) (345)
 <223> cDNA codificando polipeptídeo de PTH de tamanho natural

<400> 3
 atg atg tct gcg aaa aac gtg gtt aaa gta atg att gtc atg ttt gca 48
 Met Met Ser Ala Lys Asn Val Val Lys Val Met Ile Val Met Phe Ala
 1 5 10 15
 att tgt ttt ctt gca aaa tcg gat ggg aaa cct gtt aag aag aga tct 96
 Ile Cys Phe Leu Ala Lys Ser Asp Gly Lys Pro Val Lys Lys Arg Ser
 20 25 30
 gtg agc gag ata cag ttt atg cat aac ctg ggc aaa cat ctg agc tcc 144
 Val Ser Glu Ile Gln Phe Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Ser Ser
 35 40 45
 atg gag agg gtg gaa tgg ctg cgg aag aag ctg cag gac gtg cac aac 192
 Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn
 50 55 60
 ttt gtt gcc ctt gga gct cca aca gcg cac aga gat ggt ggt tcc cag 240
 Phe Val Ala Leu Gly Ala Pro Thr Ala His Arg Asp Gly Gly Ser Gln
 65 70 75 80
 agg ccc cag aaa aag gaa gac aat gtg ctg gtt gag aac cat caa aaa 288
 Arg Pro Gln Lys Lys Glu Asp Asn Val Leu Val Glu Asn His Gln Lys
 85 90 95
 agt ctc gga gaa gca gac aaa gct gat gtg gat gta tta acc aaa tct 336
 Ser Leu Gly Glu Ala Asp Lys Ala Asp Val Asp Val Leu Thr Lys Ser
 100 105 110
 aaa ccc caa tga 348
 Lys Pro Gln
 115

<210> 4
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Ursus americanus

<400> 4

Met Met Ser Ala Lys Asn Val Val Lys Val Met Ile Val Met Phe Ala
 1 5 10 15

Ile Cys Phe Leu Ala Lys Ser Asp Gly Lys Pro Val Lys Lys Arg Ser
 20 25 30

Val Ser Glu Ile Gln Phe Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Ser Ser
 35 40 45

Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His Asn
 50 55 60

Phe Val Ala Leu Gly Ala Pro Thr Ala His Arg Asp Gly Gly Ser Gln
 65 70 75 80

Arg Pro Gln Lys Lys Glu Asp Asn Val Leu Val Glu Asn His Gln Lys
 85 90 95

Ser Leu Gly Glu Ala Asp Lys Ala Asp Val Asp Val Leu Thr Lys Ser
 100 105 110

Lys Pro Gln
 115



PI0618469-3

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo isolado, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende pelo menos 10 resíduos de aminoácido consecutivos da SEQ ID NO: 2 em que o polipeptídeo compreende
5 pelo menos um dos resíduos de aminoácido 41 e 52 da SEQ ID NO: 2.
2. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo compreende 11-84 resíduos de aminoácido da SEQ ID NO: 2.
- 10 3. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo compreende 7-84 resíduos de aminoácido da SEQ ID NO: 2.
4. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo compreende SEQ
15 ID NO: 2.
5. Polinucleotídeo isolado, **CARACTERIZADO** pelo fato de que codifica o polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1.
6. Polinucleotídeo isolado, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo
20 compreende 11-84 resíduos de aminoácido da SEQ ID NO: 2.
7. Polinucleotídeo isolado, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo compreende 7-84 resíduos de aminoácido de SEQ ID NO: 2.
- 25 8. Polinucleotídeo isolado, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo compreende SEQ ID NO: 2.
9. Polinucleotídeo isolado, de acordo com a rei-

vindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polinucleotídeo compreende SEQ ID NO: 1.

10. Método para aumentar os níveis de cAMP em uma célula de formação de osso compreendendo contatar a célula de formação de osso com uma quantidade efetiva de um polipeptídeo compreende 1-34 resíduos de aminoácido da SEQ ID NO: 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o contato da célula de formação de osso com o polipeptídeo aumenta os níveis de cAMP na célula de formação de osso.

10 11. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo compreende 1-36 resíduos de aminoácido de SEQ ID NO: 2.

12. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo compreende SEQ ID NO: 2.

13. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a célula de formação de osso está em um indivíduo.

14. Método para reduzir apoptose em uma célula compreendendo contatar a célula de formação de osso com uma quantidade efetiva de um polipeptídeo que compreende 1-34 resíduos de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o contato da célula de formação de osso com o polipeptídeo reduz o apoptose na célula de formação de osso.

15 15. Método, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo compreende 1-36 resíduos de aminoácido de SEQ ID NO: 2.

16. Método, de acordo com a reivindicação 14,

CARACTERIZADO pelo fato de que o polipeptídeo compreende SEQ ID NO: 2.

17. Método, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a célula de formação de osso está em um indivíduo.

18. Método para diminuir a relação de níveis de expressão de proteína Bax para proteína Bcl-2 em uma célula de formação de osso compreendendo contatar a célula de formação de osso com uma quantidade efetiva de um polipeptídeo que compreende 1-34resíduos de aminoácido de SEQ ID NO: 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o contato da célula de formação de osso com o polipeptídeo diminui a relação de níveis de expressão de proteína Bax para proteína Bcl-2 na célula de formação de osso.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo compreende 1-36 resíduos de aminoácido de SEQ ID NO: 2.

20. Método, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo compreende SEQ ID NO: 2.

21. Método, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a célula de formação de osso está em um indivíduo.

22. Método para aumentar o nível de expressão de uma ou mais de uma proteína matriz óssea, um ativador transcricional, ou um regulador transcricional em uma célula de formação de osso que compreende contatar a célula de formação de osso com uma quantidade efetiva de um polipeptídeo

que compreende 1-34resíduos de aminoácido de SEQ ID NO: 2,
CARACTERIZADO pelo fato de que o contato da célula de forma-
 ção de osso com o polipeptídeo aumenta o nível de expressão
 da proteína matriz óssea, do ativador transcricional, ou do
 5 regulador transcricional na célula de formação de osso.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22,
CARACTERIZADO pelo fato de que o polipeptídeo compreende 1-
 36resíduos de aminoácido de SEQ ID NO: 2.

24. Método, de acordo com a reivindicação 22,
 10 **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo compreende SEQ
 ID NO: 2.

25. Método, de acordo com a reivindicação 22,
CARACTERIZADO pelo fato de que a célula de formação de osso
 está em um indivíduo.

15 26. Método para realçar a densidade de mineral do
 osso, aumentar a massa óssea, diminuir a perda óssea, ou re-
 duzir a incidência de fraturas do osso, ou qualquer combina-
 ção destes, em um indivíduo, compreendendo contatar uma cé-
 lula de formação de osso no indivíduo com uma quantidade e-
 20 fetiva de um polipeptídeo que compreende 1-34 resíduos de
 aminoácido de SEQ ID NO: 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o
 contato da célula de formação de osso com o polipeptídeo re-
 alça a densidade de mineral do osso, aumenta a massa óssea,
 diminui a perda óssea, ou reduz a incidência de fraturas de
 25 osso no indivíduo.

27. Método, de acordo com a reivindicação 26,
CARACTERIZADO pelo fato de que o indivíduo é um humano femi-
 nino pós-menopausal afligido com osteoporose.

28. Método, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que, adicionalmente compreende administrar vitamina D e cálcio ao indivíduo.

29. Método, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo compreende 1-36 resíduos de aminoácido de SEQ ID NO: 2.

30. Método, de acordo com a reivindicação 26, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polipeptídeo compreende SEQ ID NO: 2.

31. Método para realçar a densidade de mineral do osso, aumentar a massa óssea, diminuir a perda óssea, ou reduzir a incidência de fraturas do osso, ou qualquer combinação destes, em um indivíduo, compreendendo contatar uma célula de formação de osso no indivíduo com uma quantidade efetiva de um polipeptídeo que compreende hormônio paratiróide de urso ou um fragmento funcional deste, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o contato da célula de formação de osso com o polipeptídeo realça a densidade de mineral do osso, aumenta a massa óssea, diminui a perda óssea, ou reduz a incidência de fraturas de osso no indivíduo.

32. Anticorpo, **CARACTERIZADO** pelo fato de estar voltado contra polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1.

33. Polipeptídeo isolado, **CARACTERIZADO** pelo fato de que consiste essencialmente em 1-34resíduos de aminoácido de SEQ ID NO: 2.

34. Polipeptídeo isolado, **CARACTERIZADO** pelo fato de que consiste essencialmente em 1-36 resíduos de aminoáci-

do de SEQ ID NO: 2.

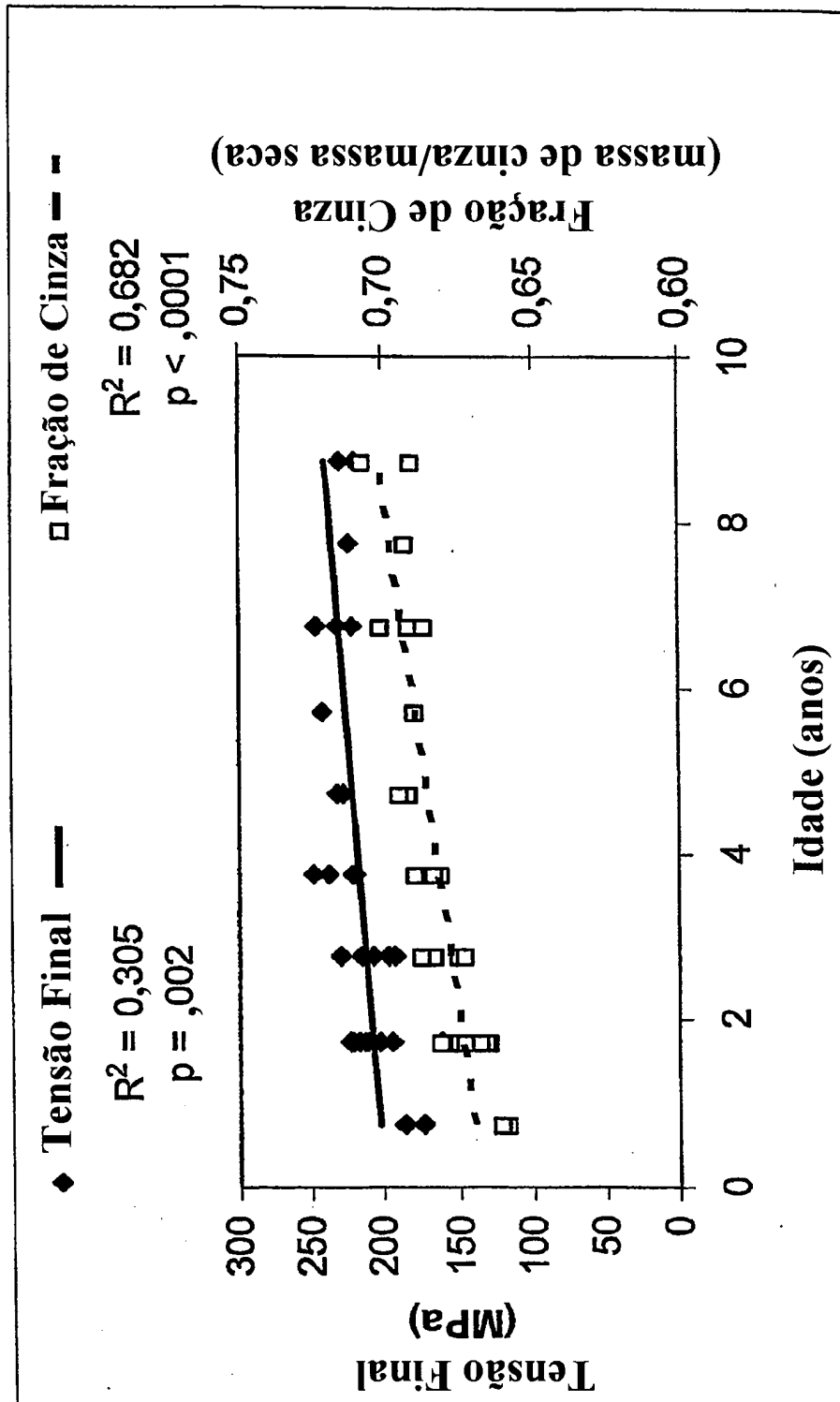


FIG. 1

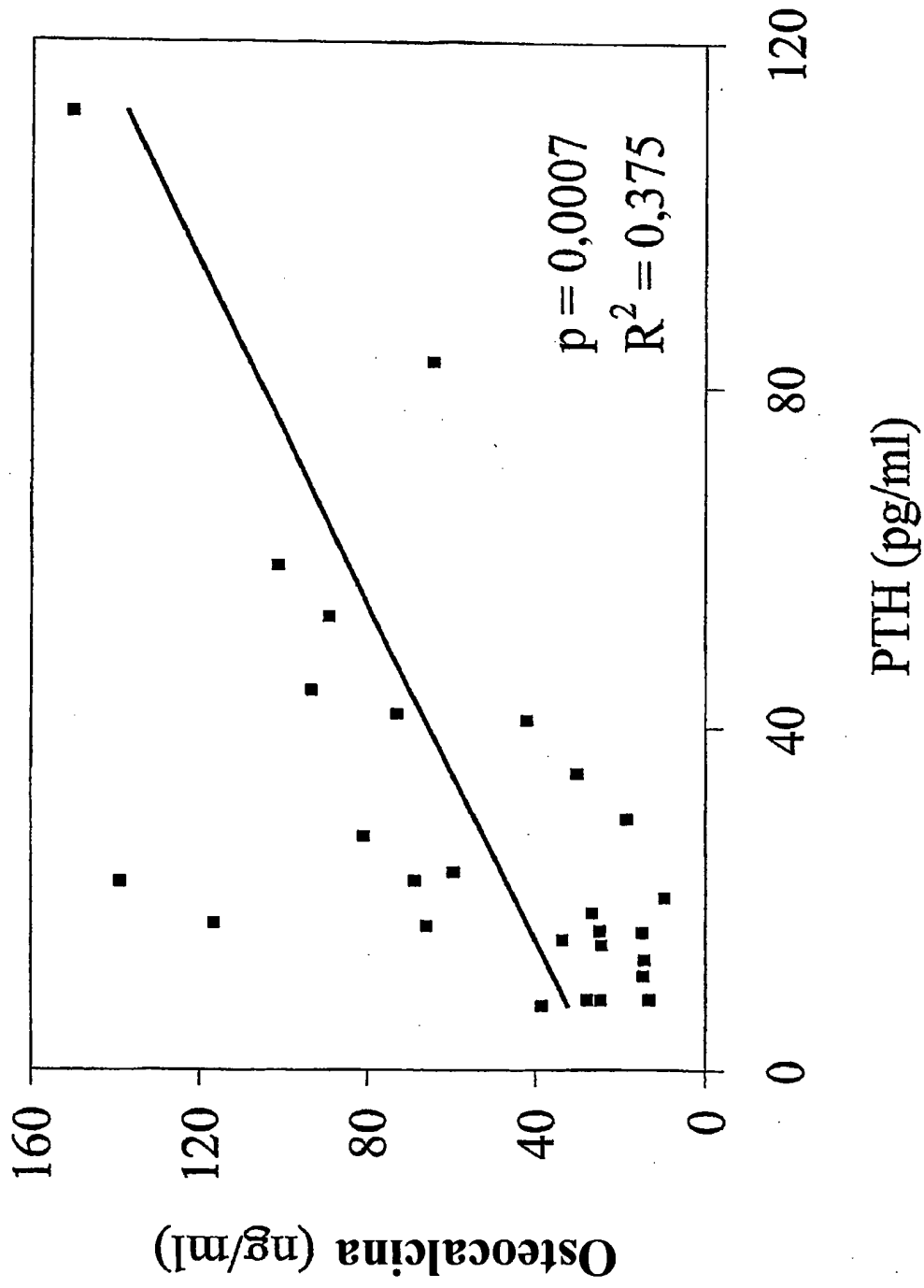
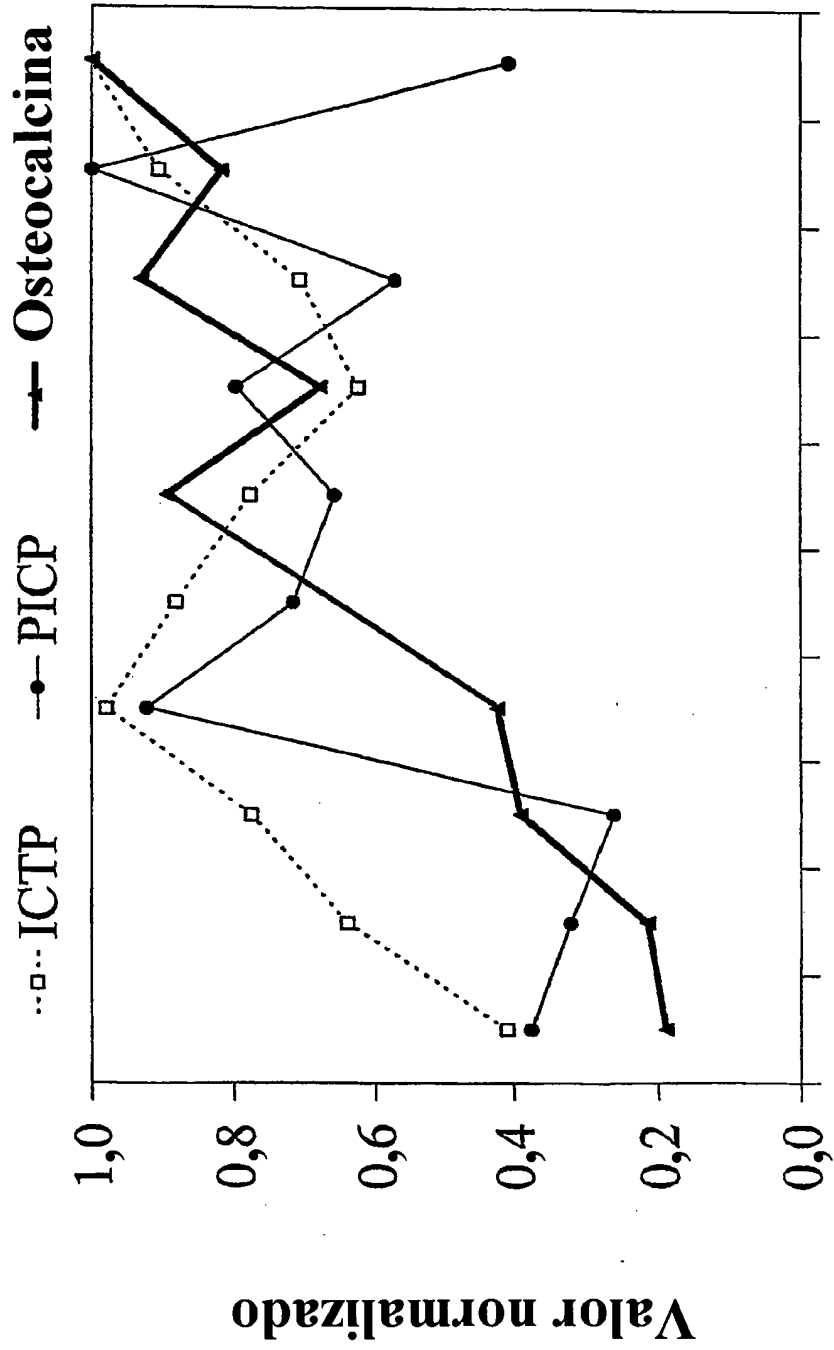


FIG. 2



Período de Hibernação de 3 Meses

FIG. 3

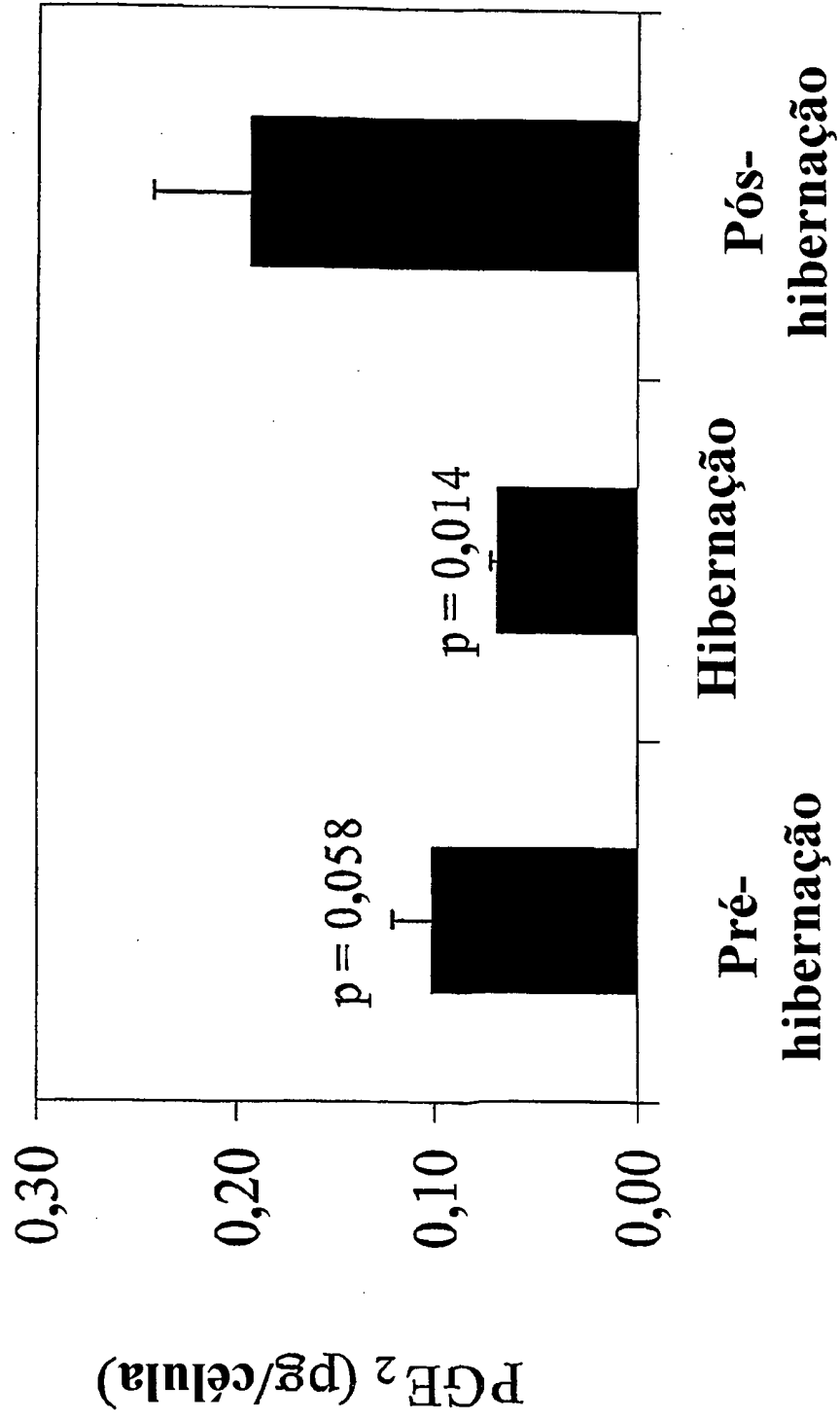


FIG. 4

	1	2	3	4
macaco	1	0	0	0
humano	SVSEIQ	LMHN	LKGHL	NSMER
cavalo	SVSEIQ	LMHN	LKGHL	NSMER
gato	SVSEIQ	LMHN	LKGHL	NSMER
cachorro	SVSEIQ	LMHN	LKGHL	NSMER
urso	SVSEIQ	LMHN	LKGHL	NSMER
bovino	AVSEIQ	FMHN	LKGHL	SSMER
porco	SVSEIQ	LMHN	LKGHL	SSMER
rato	AVSEIQ	LMHN	LKGHL	SSMER
camundongo	AVSEIQ	LMHN	LKGHL	SSMER

	4	5	6	7	8
macaco	1	0	0	0	4
humano	LAPRD	AGSQ	PRKK	EDN	ILV
cavalo	LAPRD	AGSQ	PRKK	EDN	ILV
gato	IFHRD	GGSQ	PRKK	EDN	ILV
cachorro	IAHRD	GGSQ	PRKK	EDN	ILV
urso	IAHRD	GGSQ	PRKK	EDN	ILV
bovino	TAHRD	GGSQ	PRKK	EDN	ILV
porco	IAYRD	GGSQ	PRKK	EDN	ILV
rato	IVHRD	GGSQ	PRKK	EDN	ILV
camundongo	MAAREG	SYQR	PTKKE	ENV	LDG

FIG. 5

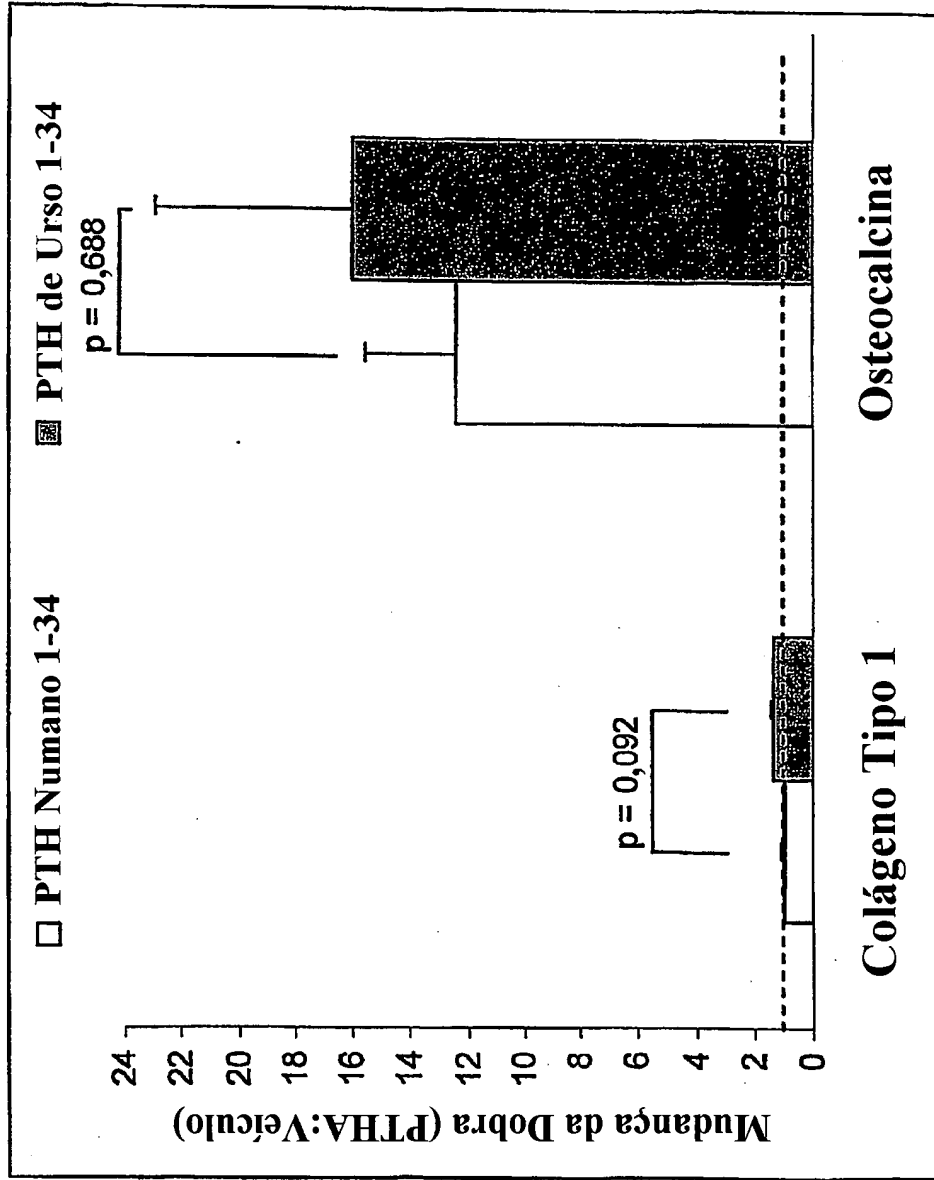


FIG. 6

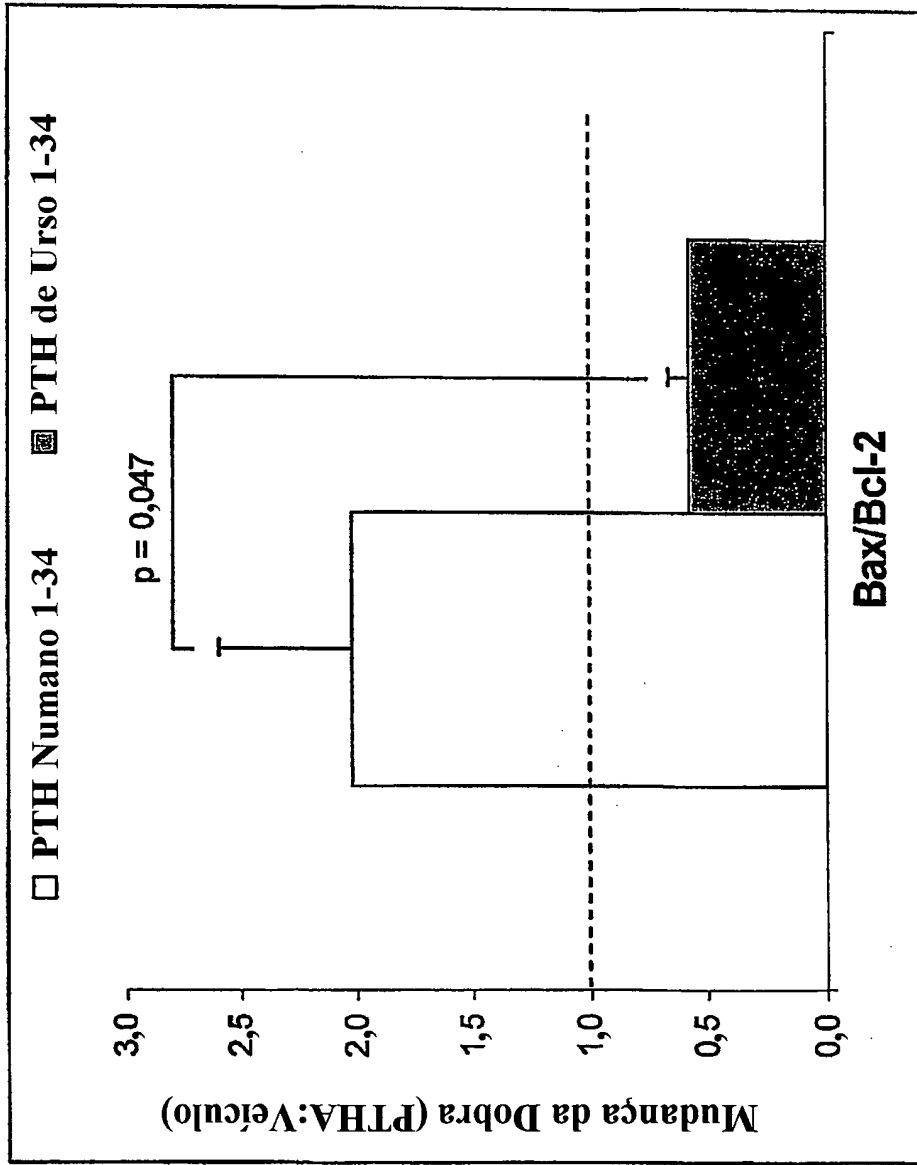


FIG. 7

RESUMO

"HORMÔNIO PARATIRÓIDE DE URSO PRETO E MÉTODOS DE USO DE HORMÔNIO PARATIRÓIDE DE URSO PRETO"

O hormônio paratiróide de urso preto (PTH) e fragmentos funcionais são fornecidos aqui. Também fornecidos são métodos de usar PTH de urso preto e fragmentos funcionais para aumentar cAMP em uma célula de formação de osso; reduzir apoptose em uma célula de formação de osso; diminuir a relação de níveis de expressão de proteína Bax para proteína Bcl-2 em uma célula de formação de osso; aumentar o nível de expressão de uma ou mais de uma proteína de matriz de osso, um ativador transcricional, ou um regulador transcricional em uma célula de formação de osso; realçar a densidade mineral do osso, aumentar a massa óssea, diminuir a perda óssea, ou reduzir a incidência de fraturas de osso, ou qualquer combinação destes, em um indivíduo; também fornecidos são anticorpos voltados contra hormônio de paratiróide (PTH) preto urso e fragmentos funcionais destes.