

peroksidasemerket kanin-anti-OCIF-polyklonalt antistoff (beskrevet i WO 96/26217), som var fortynnet 2000 ganger med BA-PBS. Etter henstand i 2 timer ved romtemperatur ble hver brønn vasket seks ganger med PBS-T og tilsatt 100 µl TMB-løsning (TMB-løselig reagens, høy sensitivitet, ScyTek Co.). Etter henstand i ca. 10 minutter ved romtemperatur ble hver brønn tilsatt 100 µl termineringsløsning (stoppereagens, ScyTek Co.). Absorbans i hver brønn ved 450 nm ble målt ved hjelp av en mikroplateleser. Resultatene er vist i figur 15.

Det var ingen forskjell i absorbans mellom prøven som var tilsatt den oppløselige proteinfraksjon som stammet fra GI724/pTrxFus og prøven uten tilsetning av denne oppløselige proteinfraksjon. På den annen side økte absorbansen i prøvene som var tilsatt den oppløselige proteinfraksjon som stammet fra GI724/pTrxOBM25 proporsjonalt med konsentrasjonen av den oppløselige proteinfraksjon. Resultatene fra det andre eksperimentet hvori fortynningsgraden av den oppløselige proteinfraksjon ble holdt konstant (1 %) under tilsetning av OCIF, fortynnet med BA-PBS i forskjellige konsentrasjoner (0-100 ng/ml), er vist i figur 16. Det fremgår at absorbansen forble lav ved alle konsentrasjoner av OCIF i prøver ved anvendelse av en oppløselig proteinfraksjon som stammet fra GI724/pTrxFus, mens absorbansen økte proporsjonalt med OCIF-konsentrasjonen i prøvene som var tilsatt den oppløselige proteinfraksjon som stammet fra GI724/pTrxOBM25. Basert på disse resultater ble det bekreftet at Trx-OBM, som produseres fra GI724/pTrxOBM25, har bindingsevne til OCIF.

(4) Dyrkning i stor skala av *Escherichia coli* som produserer Trx-OBM

GI724/pTrxOBM25-celler ble utspreddt på RMG-Amp-agar (0,6 % Na₂PO₄, 0,3 % KH₂PO₄, 0,05 % NaCl, 0,1 % NH₄Cl, 2 % kasaminyre, 1 % glyserol, 1 mM MgCl₂, 100 µg/ml ampicillin, 1,5 % agar, pH 7,4) ved anvendelse av en overføringsløkke av platina. Cellene ble dyrket over natten ved 30 °C. De dyrkede celler ble suspendert i 10 ml induksjonsmedium. 5 ml av suspensjonen ble tilsatt til hver av to 2-liters Erlenmeyer-kolber inneholdende 500 ml induksjonsmedium, og dyrket ved 30 °C under omrøring. Når OD_{600nm} nådde ca. 0,5,

ble L-tryptofan tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 0,1 mg/ml. Dyrkning under omrøring ble fortsatt i 6 timer ved 30 °C. Kulturløsningen ble sentrifugert i 20 minutter ved 3000 x g for å oppsamle cellene, som ble suspendert i 160 ml PBS. Suspensjonen ble behandlet i en ultralydgenerator (Ultrasonics Co.) for å nedbryte cellene. Supernatantvæsken ble sentrifugert i 30 minutter ved 7000 x g for å oppnå en oppløselig proteinfraksjon.

- 10 (5) Fremstilling av OCIF-immobilisert affinitetskolon
2 g TSKgel AF-Tolesyl Toyopal 650 (Tosoh Corp.) og 40 ml 1,0 M kaliumfosfatbuffer (pH 7,5) inneholdende 35,0 mg rekombinant OCIF, som var fremstilt i overensstemmelse med metoden beskrevet i WO 96/26217, ble blandet. Blandingen ble
15 forsiktig omrørt over natten ved 4 °C for å bevirke en koplingsreaksjon. Reaksjonsblandingen ble sentrifugert for å fjerne supernatanten. For å inaktivere overskudd av aktive rester ble 40 ml 0,1 M Tris-HCl-buffer (pH 7,5) tilsatt til den utfelte bærer, og blandingen ble forsiktig omrørt ved
20 romtemperatur i 1 time. Bæreren i en kolonne ble vasket med 0,1 M glysin-HCl-buffer (pH 3,3) inneholdende 0,01 % Polysorbat 80 og 0,2 M NaCl og 0,1 M natriumsitratbuffer (pH 2,0) inneholdende 0,01 % Polysorbat 80 og 0,2 M NaCl. Bæreren i kolonnen ble ekvilibrert ved to gangers tilsetning av 10 mM
25 natriumfosfatbuffer (pH 7,4) inneholdende 0,01 % Polysorbat 80.

(6) Rensing av Trx-OBM ved anvendelse av OCIF-immobilisert affinitetskolon

- 30 Dersom ikke annet er angitt, ble rensing av Trx-OBM utført ved 4 °C. Den ovennevnte OCIF-immobiliserte affinitetsbærer (10 ml) og den oppløselige proteinfraksjon (120 ml) fremstilt i eksempel 15(4) ble blandet. Blandingen ble forsiktig omrørt over natten ved 4 °C i fire 50 ml sentrifugerør
35 ved anvendelse av en rotor. En "Econo"-kolonne (indre diameter: 1,5 cm, lengde: 15 cm, produsert av BioRad Co.) ble fylt med bæreren i blandingen. Kolonnen ble tilsatt 300 ml PBS inneholdende 0,01 % Polysorbat 80, 100 ml 10 mM natriumfosfatbuffer (pH 7,0) inneholdende 0,01 % Polysorbat 80 og

2 M NaCl, og 100 ml 0,1 M glysin-HCl-buffer (pH 3,3) inneholdende 0,01 % Polysorbat 80 og 0,2 M NaCl, i denne rekkefølge. Proteiner adsorbert i kolonnen ble deretter eluert med 0,1 M natriumsitratbuffer (pH 2,0) inneholdende 0,01 % Polysorbat 80 og 0,2 M NaCl. Eluatet ble oppsamlet i 5 ml porsjoner. Hver av de således oppsamlede fraksjoner ble umiddelbart nøytralisert ved tilsetning av 10 vol% 2 M Tris-buffer (pH 8,0). Tilstedeværelse eller fravær av Trx-OBM i de eluerte fraksjoner ble bestemt i overensstemmelse med den tidligere beskrevne metode i eksempel 15(3) (bindingsevne til OCIF). Fraksjonene inneholdende Trx-OBM ble oppsamlet og rensset ytterligere.

(7) Rensing av Trx-OBM ved gelfiltrering

Ca. 25 ml Trx-OBM-fraksjoner fra eksempel 15(6) ble konsentrert til ca. 0,5 ml ved sentrifugering under anvendelse av Centriplus 10 og Centricon 10 (Amicon Co.). Denne prøven ble applisert på en Superose 12 HR10/30-kolonne (1,0 x 30 cm, Pharmacia Co.), på forhånd ekvilibrert med PBS inneholdende 0,01 % Polysorbat 80. For separasjonen ble PBS inneholdende 0,01 % Polysorbat 80 anvendt som en mobil fase ved en strømningshastighet på 0,25 ml/minutt. Eluatet fra kolonnen ble oppsamlet i 0,25 ml porsjoner. Trx-OBM i de således oppsamlede fraksjoner ble påvist ved hjelp av den samme metode som tidligere beskrevet i eksempel 15(3), og ved SDS-polyakrylamidgelelektroforese (10-15 % polyakrylamidgel, Pharmacia Co.) ved anvendelse av fast system (Pharmacia Co.) og sølvfarging. Fraksjoner (fraksjoner 20-23) inneholdende rensset Trx-OBM ble oppsamlet, og proteinkonsentrasjonen av Trx-OBM ble bestemt. Måling av proteinkonsentrasjonen ble utført ved anvendelse av bovint serumalbumin som en standard under anvendelse av DC-proteinanalysesettet (BioRad Co.).

Eksempel 16

35 Aktivitet av OBM ved induksjon av osteoklastdannelse

pOBM291 og pcDL-SR α 296 ble begge transfektert i COS-7-celler ved anvendelse av lipofectamin (Gibco Co.). Cellene ble dyrket i DMEM inneholdende 10 % FCS i én dag, behandlet med trypsin, utspredd på dekkglass (15 mm, rund

form, produsert av Matsunami Co.) i 24-brønners plater ved 5×10^4 celler pr. brønn og dyrket i 2 dager. Den dyrkede platen ble vasket én gang med PBS. Cellene ble fiksert med PBS inneholdende 1 % paraformaldehyd ved romtemperatur i 8 minutter. Platen som de fikserte celler var festet til, ble vasket seks ganger med PBS, deretter ble 700 µl musemiltceller suspendert ved 1×10^6 /ml i α -MEM inneholdende 10^{-8} M aktiv form-vitamin D₃, 10^{-7} M dexametason og 10 % bovint fosterserum tilsatt til hver brønn. Millicell PCF (Millipore Co.) ble innsatt i hver brønn, og en suspensjon av ST2-celler i det ovennevnte kulturmedium (4×10^4 /ml) ble tilsatt, 700 µl pr. brønn, til Millicell PCF, etterfulgt av inkubasjon ved 37 °C i 6 dager. Etter dyrkningen ble Millicell PCF fjernet, platen ble vasket én gang med PBS, og cellene ble fiksert med aceton-etanollosning (50:50) i 1 minutt. Cellene som oppviste vinsyreresistent, sur fosfataseaktivitet (TRAP), som er en spesifikk markør for osteoklaster, ble deretter selektivt farget ved anvendelse av "LEUKOCYTE ACID PHOSPHATASE kit" (Sigma Co.). Som et resultat av mikroskopisk observasjon ble TRAP-positive celler ikke påvist i brønnene hvori COS-7-celler transfektert med pcDL-SR α 296 var fiksert. I motsetning til dette ble 45 ± 18 (gjennomsnitt $\pm$ standardavvik, n = 3) TRAP-positive celler observert i brønnene hvori COS-7-celler transfektert med pOBM291 var fiksert. Det ble dessuten også bekreftet at kalsitonin ble bundet til disse TRAP-positive celler. Basert på disse funn er det bevist at OBM har en aktivitet som induserer osteoklastdannelse.

Eksempel 17

30 Aktivitet av Trx-OBM og utskilt form-OBM ved induksjon av osteoklastdannelse

Musemiltceller ble suspendert i α -MEM inneholdende 10^{-8} M aktiv form-vitamin D₃, 10^{-7} M dexametason og 10 % bovint fosterserum, ved en konsentrasjon på 2×10^6 /ml. Suspensjonen ble tilsatt til en 24-brønners plate i en mengde på 350 µl pr. brønn. Hver brønn ble deretter tilsatt 350 µl av en løsning preparert ved fortykning av rensset Trx-OBM med det ovennevnte kulturmedium (40 ng/ml), 350 µl løsning preparert ved 10 gangers fortykning av kondisjonert medium som var

produsert ved dyrkning av 293-EBNA-celler, på hvilke pCEP-sOBM eller pCEP4 var transfektert, i IMDM-10 % FCS, med det ovennevnte kulturmedium, eller kun 350 µl av det ovennevnte kulturmedium. Millicell PCF (Millipore Co.) ble plassert i hver brønn, som ble tilsatt 600 µl ST2-celler som var suspendert i det ovennevnte kulturmedium (4×10^4 /ml). Etter dyrkning i 6 dager ble Millicell PCF fjernet. Platen ble vasket én gang med PBS, og cellene ble fiksert med aceton-etanol-løsning (50:50) i 1 minutt. Cellene som oppviste vinsyreresistent, sur fosfataseaktivitet (TRAP-aktivitet), ble deretter selektivt farget ved anvendelse av "LEUKOCYTE ACID PHOSPHATASE kit" (Sigma Co.). Resultatet fra mikroskopisk observasjon avslørte at ingen celler som oppviste TRAP-aktivitet ble påvist i brønnene som ikke var tilsatt Trx-OBM, mens 126 ± 21 (gjennomsnitt $\pm$ standardavvik, $n = 3$) TRAP-positive celler ble observert i brønnene som var tilsatt Trx-OBM. Selv om ingen celler som oppviste TRAP-aktivitet ble påvist i brønnene som var blitt tilsatt kondisjonert medium av 293-EBNA, transfektert med pCEP4, ble likeledes 120 ± 31 (gjennomsnitt $\pm$ standardavvik, $n = 3$) TRAP-positive celler observert i brønnene som var blitt tilsatt kondisjonert medium av 293-EBNA, transfektert med pCEPOBM. Det ble dessuten også bekreftet at kalsitonin bindes til disse TRAP-positive celler. Disse resultater har vist at Trx-OBM og utskilt form-OBM oppviser en aktivitet som induserer osteoklastdannelse.

Eksempel 18

Identitet av proteinet OBM uttrykt av cDNA ifølge foreliggende oppfinnelse, og det naturlig type-OCIF-bindingsprotein ifølge oppfinnelsen

(1) Fremstilling av kanin-anti-OBM-polyklonalt anti-stoff

Tre hvite japanske hannkaniner (vekt: 2,5-3,0 kg, fra Kitayama Labes Co.) ble immunisert med det rensede OBM (tiorredoksin-OBM-fusjonsprotein), produsert i overensstemmelse med metoden i eksemplene 14(6) og 14(7), ved subkutan injeksjon av 1 ml/dose av emulsjonen preparert ved blanding

av 200 µg/ml av det rensede OBM med et like stort volum
 Freunds komplette adjuvans (DIFCO Co.) seks ganger, én gang
 pr. uke. 10 dager etter den siste immunisering ble blodet
 tappet fra kaninene. Antistoff ble rensset fra serum som
 5 følger. Ammoniumsulfat ble tilsatt til antiserum, som ble
 fortynnet to ganger med PBS til en sluttkonsentrasjon på 40 %
 (vekt/volum). Etter henstand i 1 time ved 4 °C ble blandingen
 sentrifugert i 20 minutter ved 8000 g for å oppnå et bunn-
 fall. Bunnfallet ble oppløst i en liten mengde PBS, dialysert
 10 mot PBS ved 4 °C og applisert på en protein G-Sepharose-
 kolonne (produsert av Pharmacia Co.). Etter vasking med PBS
 ble det adsorberte immunglobulin G eluert med 0,1 M glysin-
 HCl-bufferløsning (pH 3,0). Eluatet ble umiddelbart nøytrali-
 sert med 1,5 M Tris-HCl-buffer (pH 8,7). Etter dialysering av
 15 de eluerte proteinfraksjoner mot PBS ble absorbansen ved
 280 nm målt for å bestemme proteinkonsentrasjonen ($E^{1\%}$
 13,5). Anti-OBM-antistoff merket med pepperrotperoksidase ble
 fremstilt ved anvendelse av et maleimidaktivert peroksidase-
 sett (Pierce Co.) som følger. 80 µg N-suksinimid-S-acetyl-
 20 tioeddiksyre ble tilsatt til 1 mg av det rensede antistoff og
 reagert ved romtemperatur i 30 minutter. 5 mg hydroksylamin
 ble tilsatt til den resulterende blanding for å deacetylere
 antistoffet. Det modifiserte antistoff ble fraksjonert ved
 anvendelse av en polyakrylamidavsaltingskolonne. Protein-
 25 fraksjonene ble blandet med 1 mg maleimidaktivert peroksidase
 og omsatt i 1 time ved romtemperatur for å oppnå enzymmerket
 antistoff.

(2) Evne hos kanin-anti-OBM-polyklonalt antistoff til å
 30 inhibere spesifikk binding av proteinet (OBM)
uttrykt av cDNA ifølge foreliggende oppfinnelse,
eller den naturlige proteintype ifølge foreliggende
oppfinnelse, med OCIF

Renset OBM (tiorredoksin-OBM-fusjonert protein),
 35 fremstilt etter metoden beskrevet i eksemplene 15(6) og
 15(7), og den naturlige rensede OCIF-bindingsproteintype
 ifølge eksempel 2(4) ble oppløst i 0,1 M natriumkarbonat-
 buffer til en konsentrasjon på 2 µg/ml. En aliquot av hver
 løsning ble tilsatt, henholdsvis 100 µl pr. brønn, til en 96-

brønners immunoplate (produsert av Nunc Co.). Platen ble hensatt over natten ved 4 °C. 200 µl 50 % "Block Ace" ble tilsatt til hver brønn, og platen ble hensatt i 1 time ved romtemperatur. Etter vask av hver brønn tre ganger med PBS inne-

5 holdende 0,1 % Polysorbat 20 (P20-PBS) ble 100 µl kanin-anti-OBM-antistoffløsning, som var oppløst i 25 % "Block Ace" preparert med P20-PBS til en konsentrasjon på 200 µg/ml, eller 100 µl 25 % "Block Ace" (uten innhold av antistoff) tilsatt til hver brønn, etterfulgt av inkubasjon ved 37 °C i

10 1 time. Hver brønn ble vasket tre ganger med P20-PBS og tilsatt 100 µl/brønn av en bindingstestløsning (P20-PBS inneholdende 0,2 % kalveserumalbumin, 20 mM Hepes og 0,1 mg/ml heparin) som var tilsatt 20 ng/ml ^{125}I -merket OCIF, beskrevet i eksempel 8(3). Alternativt ble hver brønn tilsatt

15 100 µl/brønn av en annen bindingstestløsning inneholdende 8 µg/ml umerket OCIF i tillegg til 20 ng/ml ^{125}I -merket OCIF. Etter inkubasjon av disse immunoplater ved 37 °C i 1 time ble brønnene vasket med P20-PBS seks ganger. Mengden av ^{125}I i hver brønn ble målt ved hjelp av en gammateller.

20 Resultatene er vist i figur 17. Som vist i figuren, blir verken det rensede OBM, uttrykt ved anvendelse av cDNA ifølge foreliggende oppfinnelse, eller proteinet som spesifikt binder den naturlige, OCIF-spesifikt bindende proteintype ifølge foreliggende oppfinnelse ikke bundet til den ^{125}I -

25 merkede OCIF i det hele tatt når de var behandlet med kanin-anti-OBM-polyklonalt antistoff, mens begge proteiner ble bundet til ^{125}I -merket OCIF når de ikke var behandlet med antistoffet. Bindingen av begge proteiner til ^{125}I -merket OCIF ble bekreftet å være klart spesifikk fordi disse

30 bindinger blir vesentlig inhibert ved tilsetning av en 400 gangers konsentrasjon av umerket OCIF (8 µg/ml). Basert på resultatene beskrevet ovenfor gjenkjenner kanin-anti-OBM-polyklonalt antistoff både OBM, som er proteinet uttrykt ved anvendelse av cDNA ifølge foreliggende oppfinnelse, og den

35 naturlige OCIF-bindende proteintype ifølge foreliggende oppfinnelse, og det inhiberer den spesifikke binding av disse proteiner til OCIF.

Eksempel 19Kloning av humant OBM-cDNA(1) Preparering av muse-OBM-primer

Muse-OBM-primerne preparert i overensstemmelse med metoden ifølge eksemplene (OBM nr. 3 og OBM nr. 8) beskrevet ovenfor ble anvendt for screening av humant OBM-cDNA. Sekvensene er vist i sekvenstabellen, henholdsvis sekvens-ID nr. 9 og nr. 6.

(2) Isolering av humant OBM-cDNA-fragment ved hjelp av PCR

Humane OBM-cDNA-fragmenter ble oppnådd ved hjelp av PCR ved anvendelse av muse-OBM-cDNA-primerne preparert i (1) ovenfor og Human Lymph Node Marathon ready cDNA (Clontech Co.) som templat. Betingelsene for PCR var som følger:

10 x EX Taq-buffer (Takara Shuzo Co.)	2 µl
2,5 mM dNTP	1,6 µl
cDNA-løsning	1 µl
EX Taq (Takara Shuzo Co.)	0,2 µl
Destillert vann	14,8 µl
40 µM primer OBM nr. 3	0,2 µl
40 µM primer OBM nr. 8	0,2 µl

Disse løsninger ble blandet i et mikrosentrifugerør og preinkubert ved 95 °C i 2 minutter, etterfulgt av 40 syk- luser med en tretrinns reaksjon bestående av reaksjoner ved 95 °C i 30 sekunder, ved 57 °C i 30 sekunder og ved 72 °C i 2,5 minutter. Etter reaksjonen ble løsningen inkubert i 5 minutter ved 72 °C, og en porsjon av løsningen ble under- kastet elektroforese på en agarosegel. Det ble påvist et DNA- fragment (ca. 690 bp) amplifisert med muse-OBM-cDNA-primerne beskrevet ovenfor.

(3) Rensing av det humane OBM-cDNA-fragment amplifisert ved hjelp av PCR, og bestemmelse av nukleotid-sekvensen

Det humane OBM-cDNA-fragment oppnådd i eksempel 19(2) ble separert ved elektroforese på en agarosegel og ytterligere renset ved anvendelse av et QIAEX-gelekstraksjonssett (Qiagen Co.). PCR ble på nytt utført ved anvendelse

av det rensede humane OBM-cDNA-fragment som et templat og muse-OBM-cDNA-primerne beskrevet ovenfor for å produsere en stor mengde av det humane OBM-cDNA-fragment. DNA-fragmentet ble rensset ved hjelp av et QIAEX-gelekstraksjonssett på samme
 5 måte som beskrevet ovenfor. Nukleotidsekvensen av det rensede humane OBM-cDNA-fragment ble bestemt ved anvendelse av "Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing FS kit" (Perkin Elmer Co.) ved anvendelse av OBM nr. 3 eller OBM nr. 8 (henholdsvis sekvens-ID nr. 9 og nr. 6) som en primer. Sammenlignet med
 10 sekvensen av tilsvarende område av muse-OBM-cDNA viste nukleotidsekvensen av det humane OBM-cDNA-fragment 80,7 % homologi med sekvensen av muse-OBM-cDNA.

(4) Screening av komplett humant OBM-cDNA ved hybridisering ved anvendelse av det humane OBM-cDNA-fragment (ca. 690 bp) som en probe

Et komplett humant OBM-cDNA ble screenet ved anvendelse av det humane OBM-cDNA-fragment (ca. 690 bp) som ble rensset i eksempel 19(3), og merket med [α - 32 P]dCTP ved
 20 anvendelse av et Megaprime DNA-merkingssett (Amersham Co.). Human lymfeknute 5'-STRETCH PLUS-cDNA-bibliotek (Clontech Co., USA) ble screenet ved anvendelse av DNA-proben. I overensstemmelse med fabrikantens protokoll ble *Escherichia coli* C600 Hfl infisert med den rekombinante fag i 15 minutter ved
 25 37 °C. Den infiserte *Escherichia coli* ble tilsatt til en LB-agar (1 % trypton, 0,5 % gjærekstrakt, 1 % NaCl, 0,7 % agar) som ble oppvarmet ved 45 °C. LB-agaren ble helt ut på en LB-agarplate inneholdende 1,5 % agar. Etter inkubasjon over natten ved 37 °C ble "HyBond-N" (Amersham Co.) plassert på
 30 platen som plakker ble produsert på og lagret i ca. 3 minutter. I overensstemmelse med en konvensjonell metode ble filteret behandlet med alkalisk løsning, nøytralisert og dyppet i 2 x SSC-løsning. DNA ble deretter immobilisert på filteret ved anvendelse av UV-CROSSLINKER (Stratagene Co.).
 35 Det resulterende filter ble dyppet i Rapid-hyb-buffer (Amersham Co.). Etter forhåndsbehandling i 15 minutter ved 65 °C ble filteret plassert i Rapid-hyb-buffer inneholdende det varmedenaturerte humane OBM-cDNA-fragment (ca. 690 bp, 5×10^5 cpm/ml) beskrevet ovenfor. Etter hybridisering over

natten ved 65 °C ble filteret vasket med 2 x SSC, 1 x SSC og 0,1 x SSC, alle inneholdende 0,1 % SDS, i denne rekkefølge i 15 minutter ved 65 °C. Flere oppnådde positive kloner ble ytterligere rensset ved å gjenta screeningen to ganger. En klon med en innføyelse (ca. 2,2 kb) ble utvalgt fra de rensede kloner og anvendt i de følgende eksperimenter. Denne rensede fag ble betegnet λ hOBM. Cirka 10 μ g DNA ble oppnådd fra den rensede λ hOBM ved anvendelse av et QIAGEN Lambda-sett (Qiagen Co.) i overensstemmelse med fabrikantens protokoll. DNA ble spaltet med restriksjonsenzym SalI og underkastet elektroforese på en agarosegel for å separere det hOBM-innføyde cDNA (ca. 2,2 kb). Dette cDNA, rensset ved anvendelse av QIAEX-gelekstraksjonssettet (Qiagen Co.) ble spaltet med restriksjonsenzym SalI og innføyd i plasmid pUC19 (MBI Co.), som tidligere var spaltet med restriksjonsenzym SalI og defosforylert ved anvendelse av et DNA-ligeringssett, ver. 2 (Takara Shuzo Co.). *Escherichia coli* DH5 α (Gibco BRL Co.) ble transformert med pUC19 inneholdende det resulterende DNA-fragment. Den resulterende transformant ble betegnet pUC19-hOBM. Transformanten ble dyrket, og pUC19hOBM som det humane OBM-cDNA (ca. 2,2 kb) var innføyd i, ble rensset ved hjelp av en konvensjonell metode.

(5) Bestemmelse av nukleotidsekvensen av cDNA som koder for hele aminosyresekvensen av humant OBM

Nukleotidsekvensen av det resulterende humane OBM-cDNA oppnådd i eksempel 19(4) ble bestemt ved anvendelse av "Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing FS kit" (Perkin Elmer Co.). Nærmere bestemt ble nukleotidsekvensen av det innføyde fragment bestemt ved anvendelse av pUC19hOBM som templat. Som primere ble det benyttet primere for bestemmelse av nukleotidsekvensen av det innføyde fragment-DNA i pUC19-hOBM, M13-primer-M3 og M13-primer RV (produsert av Takara Shuzo Co.), og en syntetisk primer, humant OBM nr. 8, utformet basert på nukleotidsekvensen av det humane OBM-cDNA-fragment (ca. 690 bp).

Nukleotidsekvensen av de benyttede primere, M13-primer M3 og M13-primer RV er henholdsvis vist som sekvens-ID nr. 4 og nr. 5. Aminosyresekvensen av humant OBM utledet fra

nukleotidsekvensen av humant OBM-cDNA er vist i sekvens-tabellen som sekvens-ID nr. 11. Nukleotidsekvensen av humant OBM-cDNA er vist som sekvens-ID nr. 12.

Escherichia coli som ble transformert med pUC19-hOBM, som er plasmidet som inneholder det resulterende humane OBM-cDNA, ble deponert hos National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology den 13. august 1997 som deponeringsnummer FERM BP-6058.

Eksempel 20

Radiojodering av OCIF med ^{125}I og kvantitativ analyse av ^{125}I -merket OCIF ved hjelp av ELISA

OCIF ble merket med ^{125}I ved anvendelse av jodogenmetoden. 20 μl 2,5 mg/ml jodogen-kloroformløsning ble overført til et 1,5 ml Eppendorf-rør, og kloroform ble avdampet ved 40 °C, hvilket derved ga et rør belagt med jodogen. Røret ble vasket tre ganger med 400 μl 0,5 M natriumfosfatbufferløsning (Na-Pi, pH 7,0), etterfulgt av tilsetning av 5 μl 0,5 M Na-Pi (pH 7,0). Til dette røret ble det tilsatt 1,3 μl (18,5 MBq) Na- ^{125}I -løsning (Amersham Co., NEZ-033H), umiddelbart etterfulgt av tilsetning av 10 μl 1 mg/ml OCIF-løsning (monomertype eller dimertype). Blandingen ble blandet i en voltex-mikser og hensatt ved romtemperatur i 30 sekunder. Denne løsningen ble overført til et rør som tidligere var tilsatt 80 μl 0,5 M Na-Pi-løsning (pH 7,0) inneholdende 10 mg/ml kaliumjodid og 5 μl av en fosfatbufret saltløsning inneholdende 5 % bovint serumalbumin (BSA-PBS). Løsningen ble blandet, applisert på en spinnskolonne (1 ml, G-25 Sephadex, fin, produsert av Pharmacia Co.) som på forhånd var ekvibrert med BSA-PBS, og sentrifugert i 5 minutter ved 2000 rpm. 400 μl BSA-PBS ble tilsatt til fraksjonene eluert fra kolonnen. Etter blanding ble 2 μl av løsningen anvendt for å måle radioaktiviteten med en gammateller. Den radiokjemiske renhet av den ^{125}I -merkede OCIF-løsning oppnådd ovenfor ble målt ved å telle radioaktiviteten i fraksjoner utfelt med 10 % trikloreddiksyre (TCA).

Den biologiske aktivitet av den ^{125}I -merkede OCIF ble målt i overensstemmelse med metoden beskrevet i WO

96/26217. Konsentrasjonen av den ^{125}I -merkede OCIF ble målt med ELISA-metoden som følger. Nærmere bestemt ble 50 mM NaHCO_3 (pH 9,6), hvori kanin-anti-OCIF-polyklonalt kanin-antistoff beskrevet i WO 96/26217 var oppløst til en konsentrasjon på 2 $\mu\text{g/ml}$, tilsatt til hver brønn på en 96-brønners immunoplate ("MaxiSorp", produsert av Nunc Co.) i en mengde på 100 μl pr. brønn. Etter at brønnene var hensatt over natten ved 4 °C ble løsningen fjernet. Brønnene ble deretter tilsatt en blandet vandig løsning av "Block Ace" (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), og en fosfatbufret saltløsning (25:75) (B-PBS) i en mengde på 200 μl /brønn. Platen ble deretter hensatt i 2 timer ved romtemperatur. Etter at løsningen var fjernet ble brønnene vasket tre ganger med en fosfatbufret saltløsning inneholdende 0,01 % Polysolvat 80 (P-PBS).

15 B-PBS inneholdende ^{125}I -merket OCIF-prøve eller standard OCIF ble deretter tilsatt i en mengde på 100 μl /brønn. Platen ble deretter hensatt i 2 timer ved romtemperatur. Etter at løsningen var fjernet ble hver brønn vasket seks ganger med 200 μl P-PBS. En løsning preparert ved fortynning av peroksidamerket kanin-anti-OCIF-polyklonalt antistoff med B-PBS

20 ble tilsatt i en mengde på 100 μl /brønn. Platen ble hensatt i 2 timer ved romtemperatur. Etter at av løsningen var fjernet ble brønnene vasket seks ganger med 200 μl P-PBS. En TMB-løsning (TMB-løselig reagens, høy sensitivitet, ScyTek Co.)

25 ble deretter tilsatt i en mengde på 100 μl /brønn. Etter henstand ved romtemperatur i 2-3 minutter ble 100 μl av en termineringsløsning (stoppereagens, ScyTek Co.) tilsatt til hver brønn. Absorbansen i hver brønn ble målt ved 450 nm ved anvendelse av en mikroplateleser. Konsentrasjonen av ^{125}I -

30 merket OCIF ble bestemt ved hjelp av en kalibreringskurve preparert ved anvendelse av standard-OCIF.

Eksempel 21Ekspresjon av proteinet som kodes for av cDNA ifølge foreliggende oppfinnelse5 (1) Konstruksjon av hOBM-ekspresjonsvektor for dyreceller

pUChOBM ble spaltet med restriksjonsenzymet SallI, og et DNA-fragment (ca. 2,2 kb) ble renset ved elektroforese på en 1 % agarosegel. Endene av DNA-fragmentene ble avstumpet ved anvendelse av et DNA-avstumpingssett (Takara Shuzo Co.) (avstumpet hOBMcDNA-fragment). Ekspresjonsplasmid pcDL-SR α 296 (Molecular and Cellular Biology, vol. 8, s. 466-472, (1988)) ble spaltet med restriksjonsenzymet EcoRI, avstumpet med avstumpingssett og ligert med det avstumpede hOBM-cDNA-fragment ved anvendelse av DNA-ligeringssett, ver. 2. *Escherichia coli* DH α ble transformert ved hjelp av ligeringsreaksjonen. Et plasmid i den resulterende ampicillin-resistente transformant ble spaltet med restriksjonsenzym for å analysere DNA-restriksjonskartet og bestemme DNA-sekvensen. Som resultat ble det utvalgt en stamme med et plasmid hvori hOBM-cDNA er innføyd i den samme transkripsjonsretning som retningen av en SR α -promotor. Mikroorganismestammen ble betegnet DH5 α /phOBM.

25 (2) Ekspresjon av humant OBM i COS-7-celler

Escherichia coli DH5 α /phOBM ble dyrket, og plasmid phOBM ble renset ved anvendelse av QIA-filterplasmidmidisett (Qiagen Co.). phOBM ble transfektert med lipofectamin i COS-7-celler i brønnene på en 6-brønners plate og dyrket i 2 dager i DMEM inneholdende 10 % bovint fosterserum. Kulturmediet ble erstattet med cystein-metioninfritt DMEM (produsert av Dainippon Seiyaku Co., Ltd.) som var tilsatt 5 % dialysert bovint fosterserum (88 μ l/brønn). Cellene ble inkubert i 15 minutter, etterfulgt av tilsetning av 14 μ l Express Protein Labeling Mix (NEN Co., 10 mCi/ml). Etter 4 timers inkubasjon ble 200 μ l DMEM inneholdende 10 % bovint fosterserum tilsatt til hver brønn. Cellene ble dyrket i 1 time og vasket to ganger med PBS. 0,5 ml av en TSA-buffer (10 mM Tris-HCl inneholdende 0,14 M NaCl og 0,025 NaN₃, pH 8,0)

inneholdende 1 % Triton X-100, 1 % bovint hemoglobin, 10 µg/ml leupeptin, 0,2 TIU/ml aprotinin og 1 mM PMSF ble deretter tilsatt til hver brønn, og blandingsene ble hensatt i 1 time på is. Cellene ble blandet ved pipettering og sentrifugert ved 3000 x g i 10 minutter ved 4 °C for å oppnå supernatanter. 200 µl av en fortynningsbuffer (TSA-buffer inneholdende 0,1 % Triton X-100, 0,1 % bovint hemoglobin, 10 µg/ml leupeptin, 0,2 TIU/ml aprotinin og 1 mM PMSF) ble tilsatt til 100 µl av supernatanten fra hver brønn. De resulterende blandinger ble omrørt ved 4 °C i 1 time sammen med protein A-Sepharose (50 µl) og sentrifugert ved 1500 x g i 1 minutt ved 4 °C for å oppnå supernatanter, og derved fjerne proteinet som uspesifikt adsorberte protein A-Sepharose. OCIF (1 µg) ble tilsatt til supernatantene, og blandingsene ble omrørt i 1 time ved 4 °C for å binde humant OBM og OCIF. Kanin-anti-OCIF-polyklonalt antistoff (50 µg) ble deretter tilsatt, etterfulgt av omrøring ved 4 °C i 1 time. Protein A-Sepharose (10 µl) ble tilsatt til den resulterende løsning, etterfulgt av omrøring ved 4 °C i ytterligere 1 time. De således oppnådde blandinger ble sentrifugert i 1 minutt ved 1500 x g ved 4 °C for å oppsamle bunnfall. Bunnfallene ble vasket to ganger med en fortynningsbuffer, to ganger med bovin, hemoglobinfri fortynningsbuffer, én gang med TSA-buffer og én gang med 50 mM Tris-HCl (pH 6,5). Etter tilsetning av SDS-buffer inneholdende 10 % β-merkaptoetanol (0,125 M Tris-HCl, 4 % natriumdodecylsulfat, 20 % glyserol, 0,002 % bromfenolblått, pH 6,8) ble blandingen oppvarmet i 5 minutter ved 100 °C og underkastet SDS-PAGE (12,5 % polyakrylamidgel, Daiichi Pure Chemical Co.). Gelen ble fiksert og tørket i overensstemmelse med en konvensjonell metode. Etter at isotopsignaler var forsterket ved anvendelse av "Amplify" (Amersham Co.), ble den tørkede gel underkastet autoradiografi ved -80 °C ved anvendelse av Bio Max MR-film (Kodak Co.) ved. Resultatene er vist i figur 18 og viser at molekylvekten til proteinet som kodes for av cDNA ifølge foreliggende oppfinnelse er ca. 40 000.

Eksempel 22Binding av proteinet som kodes for av cDNA ifølge foreliggende oppfinnelse og OCIF

phOBM, som var renset på samme måte som i eksempel 21(2), ble transfektert i COS-7-celler i hver brønn på en 24-brønners plate ved anvendelse av lipofectamin. Etter dyrkning i 2-3 dager ble cellene vasket med serumfritt DMEM. 200 µl av et kulturmedium for en bindingstest (serumfritt DMEM som var tilsatt 0,2 % bovint serumalbumin, 20 mM Hepes-bufferløsning, 0,1 mg/ml heparin og 0,2 % NaN₃) inneholdende 20 ng/ml ¹²⁵I-merket OCIF ble tilsatt til brønnene. Til de andre brønnene ble det tilsatt 200 µl kulturmedium for bindingstestmediet inneholdende 8 µg/ml umerket OCIF, i tillegg til 20 ng/ml ¹²⁵I-merket OCIF. Etter inkubasjon i 1 time ved 37 °C i en CO₂-inkubator (5 % CO₂) ble cellene vasket to ganger med 500 µl av en fosfatbufret saltløsning inneholdende 0,1 mg/ml heparin. 500 µl 0,1 N NaOH-løsning ble deretter tilsatt til hver brønn, og platen ble hensatt i 10 minutter ved romtemperatur for å oppløse cellene. Radioaktiviteten av ¹²⁵I i brønnene ble målt med en gammateller. Som et resultat, som vist i figur 19, ble det bekreftet at den ¹²⁵I-merkede OCIF kun bindes til cellene som er transfektert med phOBM. Bindingen ble dessuten betydelig inhibert ved tilsetning av et 400 gangers overskudd av umerket OCIF (8 µg/ml). Basert på resultatene beskrevet ovenfor ble proteinet, humant OBM kodet for av cDNA i phOBM bekreftet til spesifikt å bindes til OCIF på overflaten av COS-7-celler.

Eksempel 23

30 Kryssbinding av ¹²⁵I-merket OCIF og proteinet kodet for av cDNA ifølge foreliggende oppfinnelse

Kryssbinding av ¹²⁵I-merket monomertype-OCIF og proteinet kodet for av cDNA ifølge foreliggende oppfinnelse ble utført for ytterligere å undersøke egenskapene til proteinet som kodes for av cDNA ifølge oppfinnelsen. Etter konstruksjon av ekspresjonsvektor phOBM og transfeksjon i COS-7-celler, i overensstemmelse med metoden anvendt i eksempler 21(1) og 21(2), ble 200 µl bindingstestmedium inneholdende ¹²⁵I-merket OCIF (25 ng/ml), beskrevet ovenfor,

tilsatt. Bindingstestmediet, som var tilsatt umerket OCIF i en 400 gangers konsentrasjon i tillegg til ^{125}I -merket OCIF, ble anvendt for de andre brønnene. Etter dyrkning i 1 time ved 37 °C i en CO₂-inkubator (5 % CO₂) ble cellene vasket to ganger med 500 µl fosfatbufret saltløsning inneholdende 0,1 mg/ml heparin. 500 µl fosfatbufret saltløsning hvori 100 µg/ml av et kryssbindingsmiddel (DSS: disuksinimidyl-suberat, produsert av Pierce Co.) var oppløst, ble tilsatt til cellene, etterfulgt av inkubasjon i 10 minutter ved 0 °C. Cellene i disse brønner ble vasket to ganger med 1 ml iskald, fosfatbufret saltløsning. Etter tilsetning av 100 µl 20 mM Hepes-bufferløsning inneholdende 1 % Triton X-100 (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.), 2 mM PMSF (fenylmetylsulfonylfluorid, Sigma Co.), 10 µM pepstatin (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.), 10 µM leupeptin (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.), 10 µM anti-pain (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.) og 2 mM EDTA (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.) ble brønnene hensatt i 30 minutter ved romtemperatur for å oppløse cellene. Disse prøver (15 µl aliquoter) ble behandlet med SDS under reduserende betingelser i overensstemmelse med en konvensjonell metode og underkastet SDS-elektroforese ved anvendelse av 4-20 % polyakrylamidgradientgel (Daiichi Pure Chemical Co., Ltd.). Etter elektroforese ble gelen tørket og underkastet autoradiografi i 24 timer ved -80 °C ved anvendelse av Bio Max MS-film (Kodak Co.) og BioMax MS-sensibiliseringsskjerm (Kodak Co.). Etter autoradiografien ble filmen fremkalt i overensstemmelse med en konvensjonell metode. Som resultat ble det påvist et bånd med en molekylvekt i området 90 000-110 000, vist i figur 20, ved kryssbinding av ^{125}I -merket monomertype-OCIF og proteinet kodet for av cDNA ifølge foreliggende oppfinnelse.

Eksempel 24

Ekspresjon av utskilt form-humant OBM

35

(1) Konstruksjon av utskilt form-humant OBM-ekspressionsplasmid

En PCR ble utført ved anvendelse av humant OBM-SF (sekvenstabell, sekvens-ID nr. 13) og muse-OBM nr. 8

(sekvenstabell, sekvens-ID nr. 6) som primere og pUC19hOBM som templat. Etter rensing ved elektroforese på agarosegel ble produktet spaltet med restriksjonsenzymmer S_{ph}I og HindIII og ytterligere rensset ved elektroforese på agarosegel for å
5 oppnå et rensset fragment (0,27 kb). Humant OBM-cDNA ble partielt spaltet med restriksjonsenzym DraI, og DNA-fragmenter spaltet med DraI ved ett sete ble rensset ved elektroforese på agarosegel. Det rensede fragment ble ytterligere spaltet med restriksjonsenzym HindIII. 0,53 kb DraI/HindIII-
10 fragmentet ble rensset ved elektroforese på agarosegel. Det rensede fragment ble ligert med 0,27 kb S_{ph}I/HindIII-fragmentet fra PCR beskrevet ovenfor ved anvendelse av ligeringssett, ver. 2 (Takara Shuzo Co.) sammen med HindIII/EcoRI-fragment (5,2 kb) av pSec TagA (Invitrogen Co.). *Escherichia*
15 *coli* DH5 α ble transformert ved anvendelse av reaksjonsproduktet. Plasmider ble rensset ved alkali-SDS-metoden fra de resulterende ampicillinresistente transformanter og spaltet med restriksjonsenzymmer for å utvelge et plasmid inneholdende 0,27 kb- og 0,53 kb-fragmenter som innføyer i pSec TagA.
20 Dette plasmid ble bekreftet å ha en sekvens som koder for det utskilte humane OBM ved sekvensering ved anvendelse av "Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing FS kit" (Perkin Elmer Co.). Plasmidet ble spaltet med restriksjonsenzymene NheI og XhoI for å fremstille et fragment (0,8 kb), som tilsvarer det
25 utskilte humane OBM-cDNA, ved elektroforese på en agarosegel. Dette fragment ble innføyd i NheI- og XhoI-fragmentet (10,4 kb) av en ekspresjonsvektor pCEP4 (Invitrogen Co.) ved anvendelse av et ligeringssett, og *Escherichia coli* DH5 α ble transformert ved anvendelse av reaksjonsproduktet. Plasmider
30 ble rensset ved alkali-SDS-metoden fra de resulterende ampicillinresistente transformanter og spaltet med restriksjonsenzymmer for å utvelge en *Escherichia coli* med ekspresjonsplasmidet for utskilt form-humant OBM (pCEPshOBM). *Escherichia coli* inneholdende pCEPshOBM ble dyrket, og pCEPshOBM ble
35 rensset ved anvendelse av Qiafilterplasmidmidisett (Qiagen Co.).

(2) Ekspresjon av utskilt form-OBM

293-EBNA-celler ble suspendert i IMDM inneholdende 10 % FCS (IMDM-10 % FCS), tilsatt til en 24-brønners plate belagt med kollagen (produsert av Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) med en celletetthet på $2 \times 10^5/2$ ml/brønn og dyrket over natten. Cellene ble transfektert med 1 µg pCEP-shOBM eller pCEP4 ved anvendelse av 4 µl lipofectamin (Gibco Co.). Etter dyrkning i 2 dager i 0,5 ml av et serumfritt IMDM eller IMDM-10 % FCS ble kultursupernatantene oppsamlet. Ekspresjon av det oppsamlede humane OBM i kultursupernatanten ble påvist som følger. Natriumbikarbonat ble tilsatt til kultursupernatantene til en sluttkonsentrasjon på 0,1 M, og blandingen ble tilsatt til en 96-brønners plate. Platen ble hensatt over natten ved 4 °C for derved å immobilisere humant OBM i kultursupernatantene på 96-brønners-platen. Platen ble blokkert med "Block Ace"-løsning (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), fortynnet fire ganger med PBS (B-PBS), og hensatt i 2 timer ved romtemperatur. Etter tilsetning av 3-100 ng/ml OCIF, fortynnet med B-PBS, til hver brønn ble platen hensatt i 2 timer ved 37 °C, etterfulgt av vask med PBS inneholdende 0,05 % Polysolvat 20 (P-PBS). 100 µl av et peroksidasemerket kanin-anti-OCIF-polyklonalt antistoff, beskrevet i WO 96/26217, som var fortynnet med B-PBS, ble deretter tilsatt til hver brønn. Etter henstand i 2 timer ved 37 °C ble brønnene vasket seks ganger med P-PBS. TMB-løsning (TMB-løselig reagens, høy sensitivitet, ScyTek Co.) ble deretter tilsatt i en mengde på 100 µl pr. brønn, og blandingen ble hensatt ved romtemperatur i ca. 10 minutter. Reaksjonen ble stanset ved tilsetning av 100 µl termineringsløsning (stoppe-reagens, ScyTek Co.) til hver brønn. Absorbans ved 450 nm i hver brønn ble målt med en mikroplateleser. Resultatene er vist i figur 21, som indikerer at absorbansen ved 450 nm økte i overensstemmelse med konsentrasjonen av den tilsatte OCIF på platen der det kondisjonerte cellemedium transfektert med pCEP-shOBM var immobilisert i. På den annen side ble det ikke observert noen økning i absorbans i brønnene der det kondisjonerte cellemedium transfektert med vektor pCEP var immobilisert. Figur 22 viser resultatene fra et eksperiment der andelen av det kondisjonerte medium anvendt for immobili-

sering ble endret innen et område på 5-90 % i nærvær av en konstant konsentrasjon av OCIF (50 ng/ml). Absorbansen ved 450 nm økte proporsjonalt med økningen i andelen av det kondisjonerte medium på platen der det kondisjonerte celle-
 5 medium transfektert med pCEP-shOBM var immobilisert, mens ingen slik økning i absorbans ble observert på platen der det kondisjonerte cellemedium transfektert med vektor pCEP var immobilisert. Fra disse resultater ble det bekreftet at utskilt form-humant OBM produseres i det kondisjonerte celle-
 10 medium transfektert med pCEP-shOBM.

Eksempel 25

Ekspresjon av tioredoksin-humant OBM-fusjonsprotein (Trx-hOBM)

15

(1) Konstruksjon av en tioredoksin-human-OBM-fusjonsprotein(Trx-hOBM)-ekspresjonsvektor

10 µl 10 x ExTaq-buffer (Takara Shuzo Co.), 8 µl 10 mM dNTP (Takara Shuzo Co.), 77,5 µl sterilisert, destillert vann, 2 µl av en vandig løsning av pUC19hOBM (10 ng/µl),
 20 1 µl primer, muse-OBM nr. 3 (100 pmol/µl, sekvenstabell, sekvens-ID nr. 9), 1 µl primer, hOBMSalR2 (100 pmol/µl, sekvenstabell, sekvens-ID nr. 14) og 0,5 µl ExTaq (5 u/µl) (Takara Shuzo Co.) ble blandet og omsatt (PCR)) i et mikrosentrifugerør. Etter reaksjon ved 95 °C i 5 minutter, ved
 25 50 °C i 1 sekund, ved 55 °C i 1 minutt, ved 74 °C i 1 sekund og ved 72 °C i 5 minutter ble en reaksjonssyklus bestående av en reaksjon ved 96 °C i 1 minutt, ved 50 °C i 1 sekund, ved 55 °C i 1 minutt, ved 74 °C i 1 sekund og ved 72 °C i 3 minutter gjentatt 25 ganger. Fra den totale reaksjonsblanding ble
 30 DNA-fragment (750 bp) renset. Hele mengden av renset DNA-fragment ble spaltet med restriksjonsenzymene SalI (Takara Shuzo Co.) og BspHI (New England Biolabs Co.), og underkastet elektroforese på en 1 % agarosegel for å oppnå renset DNA-
 35 fragment (fragment 1, ca. 320 bp). Fragmentet ble oppløst i 20 µl sterilisert, destillert vann. På samme måte ble DNA-fragmentet (fragment 2, ca. 450 bp) oppnådd ved spalting av 4 µg pUC19hOBM med restriksjonsenzymene BamHI og BspHI (Takara Shuzo Co.), og DNA-fragmentet (fragment 3, ca.

3,6 kb) oppnådd ved spalting av 2 µg pTrxFus (Invitrogen Co.) med restriksjonsenzymene BamHI og SalI (Takara Shuzo Co.), rensset og oppløst i 20 µl sterilisert, destillert vann. QIAEX II-gelekstraksjonssettet ble anvendt for rensing av DNA-fragmentene. Fragmenter 1-3 ble ligert ved inkubasjon ved 16 °C i 2,5 timer ved anvendelse av DNA-ligeringssett, ver. 2 (Takara Shuzo Co.). Ved anvendelse av ligeringsreaksjon ble *Escherichia coli* GI724 (Invitrogen Co.) transformert i overensstemmelse med metoden beskrevet i instruksjonsmanualen for tiofusjonsekspresjonssystemet (Invitrogen Co.). En mikroorganismestamme med plasmid, hvori hOBM-cDNA-fragmentet er fusjonert innen rammen til tioredoksingenet, ble utvalgt fra de resulterende ampicillinresistente transformanter ved analyse av et DNA-restriksjonskart oppnådd ved spalting med restriksjonsenzymmer og ved bestemmelse av DNA-sekvens. Den således oppnådde mikroorganismestamme ble betegnet GI724/pTrxhOBM.

(2) Ekspresjon av Trx-hOBM i *Escherichia coli*

GI724/pTrxhOBM og GI724 inneholdende pTrxFus (GI724/pTrxFus) ble dyrket i 6 timer under omrøring ved 30 °C i 2 ml RMG-Amp-kulturmedium (0,6 % Na₂HPO₄, 0,3 % KH₂PO₄, 0,05 % NaCl, 0,1 % NH₄Cl, 2 % kasaminosyre, 1 % glyserol, 1 mM MgCl₂, 100 µg/ml ampicillin, pH 7,4). Næringsløsningen (0,5 ml) ble tilsatt til 50 ml induksjonsmedium (0,6 % Na₂HPO₄, 0,3 % KH₂PO₄, 0,05 % NaCl, 0,1 % NH₄Cl, 0,2 % kasaminosyre, 0,5 % glukose, 1 mM MgCl₂, 100 µg/ml ampicillin, pH 7,4) og dyrket under omrøring ved 30 °C. Når OD_{600nm} nådde ca. 0,5, ble L-tryptofan tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 0,1 mg/ml, etterfulgt av dyrkning under omrøring ved 30 °C i ytterligere 6 timer. Kulturløsningen ble sentrifugert ved 3000 x g for å oppsamle cellene, som deretter ble suspendert i 12,5 ml PBS. Suspensjonen ble behandlet i en ultralyd-generator (Ultrasonics Co.) for å nedbryte cellene. De nedbrutte celler ble sentrifugert ved 7000 x g i 30 minutter for å oppnå en supernatantvæske som en oppløselig proteinfraksjon. 10 µl av denne oppløselige proteinfraksjon ble underkastet SDS-polyakrylamid(10 %)elektroforese under reduserende betingelser. Som et resultat, som vist i figur 23, ble det

funnet et bånd med en molekylvekt på 40 000, som ikke ble påvist i den oppløselige proteinfraksjon fra GI724/pTrxFus, i den oppløselige proteinfraksjon fra GI724/pTrxhOBM. Det ble således bekreftet at et fusjonsprotein (Trx-hOBM) av tio-
 5 redoksin og humant OBM ble uttrykt i *Escherichia coli*.

(3) Bindingsevne av Trx-hOBM til OCIF

Binding av det uttrykte Trx-hOBM til OCIF ble bekreftet i overensstemmelse med det følgende eksperiment.

10 Antitioeredoksin-antistoff (Invitrogen Co.), som var fortynnet 5000 ganger med 10 mM natriumhydrogenkarbonatløsning, ble tilsatt til en 96-brønners immunoplate (Nunc Co.) i en mengde på 100 µl pr. brønn. Etter henstand over natten ved 4 °C ble væsken i brønnene kastet. 200 µl av en løsning preparert ved
 15 fortynning av "Block Ace" (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) to ganger med PBS (BA-PBS) ble tilsatt til hver brønn. Etter henstand i 1 time ved romtemperatur ble brønnene vasket tre ganger med P-PBS. De løselige proteinfraksjoner fra det ovenfor beskrevne GI724/pTrxhOBM eller GI724/pTrxFus, begge
 20 fortynnet med BA-PBS i forskjellige konsentrasjoner, ble tilsatt til hver brønn i en mengde på 100 µl. Etter henstand i 2 timer ved romtemperatur ble hver brønn vasket tre ganger med P-PBS og tilsatt 100 µl OCIF (100 ng/ml) som var fortynnet med BA-PBS. Etter henstand i 2 timer ved romtemperatur
 25 ble hver brønn vasket tre ganger med P-PBS og tilsatt 100 µl peroksidasemerket anti-OCIF-antistoff (beskrevet i WO 96/26217), som var fortynnet 2000 ganger med BA-PBS. Etter henstand i 2 timer ved romtemperatur ble hver brønn vasket seks ganger med P-PBS og tilsatt 100 µl TMB-løsning. Etter
 30 henstand i ca. 10 minutter ved romtemperatur ble hver brønn tilsatt 100 µl termineringsløsning (stoppereagens). Absorbans i hver brønn ved 450 nm ble målt med en mikroplateleser. Resultatene er vist i figur 24. Det var ingen forskjell i absorbans mellom prøven tilsatt den oppløselige protein-
 35 fraksjon fra GI724/pTrxFus og prøven uten tilsetning av denne oppløselige proteinfraksjon. På den annen side økte absorban- sen i prøvene tilsatt den oppløselige proteinfraksjon fra GI724/pTrxhOBM proporsjonalt med konsentrasjonen av den oppløselige proteinfraksjon. Resultatene fra det andre eksperi-

mentet der fortynningsgraden av den oppløselige proteinfraksjon ble holdt konstant (1 %) under tilsetning av OCIF, fortynnet med BA-PBS i forskjellige konsentrasjoner (0-100 ng/ml), er vist i figur 25. Det fremgår at absorbanse

5 forble lav ved alle konsentrasjoner av OCIF i prøver ved anvendelse av en oppløselig proteinfraksjon fra GI724/pTrx-Fus, mens absorbanse økte proporsjonalt med OCIF-konsentrasjonen i prøvene som var tilsatt den oppløselige proteinfraksjon fra GI724/pTrxhOBM. Basert på disse resultater ble

10 det bekreftet at Trx-hOBM, som produseres fra GI724/pTrxhOBM, har bindingsevne til OCIF.

(4) Dyrkning i stor skala av *Escherichia coli* som produserer Trx-hOBM

15 GI724/pTrxhOBM-celler ble utspreidt på RMG-Amp-agar (0,6 % Na₂HPO₄, 0,3 % KH₂PO₄, 0,05 % NaCl, 0,1 % NH₄Cl, 2 % kasaminyre, 1,5 % agar, pH 7,4) ved anvendelse av en platinatransportør 100p. Cellene ble dyrket over natten ved 30 °C. De dyrkede celler ble suspendert i 10 ml induksjons-

20 medium. Suspensjonen ble tilsatt (5 ml porsjoner) til to 2-liters Erlenmeyer-kolber inneholdende 500 ml induksjonsmedium, og dyrket ved 30 °C under omrøring. Når OD_{600nm} nådde ca. 0,5, ble L-tryptofan tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 0,1 mg/ml. Dyrkning under omrøring ble fortsatt i

25 6 timer ved 30 °C. Kulturløsningen ble sentrifugert i 20 minutter ved 3000 x g for å oppsamle cellene, som ble suspendert i 160 ml PBS. Suspensjonen ble behandlet i en ultralydgenerator (Ultrasonics Co.) for å nedbryte cellene. Supernatantvæsken ble sentrifugert i 30 minutter ved 7000 x g

30 for å oppnå en oppløselig proteinfraksjon.

(5) Fremstilling av OCIF-immobilisert affinitetskonne

2 g TSKgel AF-Tolesyl Toyopal 650 (Tosoh Corp.) og 40 ml 1,0 M kaliumfosfatbuffer (pH 7,5) inneholdende 35,0 mg

35 rekombinant OCIF, som var fremstilt i overensstemmelse med metoden beskrevet i WO 96/26217, ble blandet. Blandingen ble forsiktig omrørt over natten ved 4 °C for å bevirke en koplingsreaksjon. Reaksjonsblandingen ble sentrifugert for å fjerne supernatanten. For å inaktivere overskudd av aktive

rester ble 40 ml 0,1 M Tris-HCl-buffer (pH 7,5) tilsatt til den utfelte bærer, og blandingen ble forsiktig omrørt ved romtemperatur i 1 time. Bæreren i en kolonne ble vasket med 0,1 M glysin-HCl-buffer (pH 3,3) inneholdende 0,01 % Polysorbat 80 og 0,2 M NaCl og 0,1 M natriumsitratbuffer (pH 2,0) inneholdende 0,01 % Polysorbat 80 og 0,2 M NaCl. Bæreren i kolonnen ble ekvilibrert tilsetning av 10 mM natriumfosfatbuffer (pH 7,4) inneholdende 0,01 % Polysorbat 80 to ganger.

10 (6) Rensing av Trx-hOBM ved anvendelse av OCIF-immobilisert affinitetskolonne

Dersom ikke annet er angitt, ble rensing av Trx-hOBM utført ved 4 °C. Den ovennevnte OCIF-immobiliserte affinitetsbærer (10 ml) og den oppløselige proteinfraksjon (120 ml) fremstilt i eksempel 25(4) ble blandet. Blandingene ble forsiktig omrørt over natten ved 4 °C i fire 50 ml sentrifugerør ved anvendelse av en rotor. En "Econo"-kolonne (indre diameter: 1,5 cm, lengde: 15 cm, produsert av BioRad Co.) ble fylt med bæreren i blandingen. Kolonnen ble tilsatt 300 ml PBS inneholdende 0,01 % Polysorbat 80, 100 ml 10 mM natriumfosfatbuffer (pH 7,0) inneholdende 0,01 % Polysorbat 80 og 2,0 M NaCl, og 100 ml 0,1 M glysin-HCl-buffer (pH 3,3) inneholdende 0,01 % Polysorbat 80 og 0,2 M NaCl, i denne rekkefølge. Proteiner adsorbert i kolonnen ble deretter eluert med 0,1 M natriumsitratbuffer (pH 2,0) inneholdende 0,01 % Polysorbat 80 og 0,2 M NaCl. Eluatet ble oppsamlet i 5 ml porsjoner. Hver av de således oppsamlede fraksjoner ble umiddelbart nøytralisert ved tilsetning av 10 vol% 2 M Tris-bufferløsning (pH 8,0). Tilstedeværelse eller fravær av Trx-hOBM i de eluerte fraksjoner ble bestemt i overensstemmelse med den tidligere beskrevne metode i eksempel 25(3) (bindingsevne til OCIF). Fraksjonene inneholdende Trx-hOBM ble oppsamlet og renset ytterligere.

35 (7) Rensing av Trx-hOBM ved gelfiltrering

Ca. 25 ml Trx-hOBM-fraksjoner fremstilt i eksempel 25(6) ble konsentrert til ca. 0,5 ml ved sentrifugering under anvendelse av Centriplus 10 og Centricon 10 (Amicon Co.). Denne prøven ble applisert på en Superose 12 HR10/30-kolonne

(1,0 x 30 cm, Pharmacia Co.), som tidligere var ekvilibrert med PBS inneholdende 0,01 % Polysorbat 80. For separasjonen ble PBS inneholdende 0,01 % Polysorbat 80 anvendt som en mobil fase ved en strømningshastighet på 0,25 ml/minutt.

- 5 Eluatet fra kolonnen ble oppsamlet i 0,25 ml porsjoner. Trx-hOBM i de således oppsamlede fraksjoner ble påvist ved den samme metode som tidligere beskrevet i eksempel 25(3), og ved SDS-PAGE. Fraksjoner inneholdende rensset Trx-hOBM ble oppsamlet, og proteinkonsentrasjonen av Trx-hOBM ble bestemt.
- 10 Målingen av proteinkonsentrasjonen ble utført ved anvendelse av bovint serumalbumin som et standardmateriale under anvendelse av DC-proteinanalysesettet (BioRad Co.).

Eksempel 26

15 Aktivitet av hOBM ved induksjon av osteoklastdannelse

- phOBM og pcDL-SR α 296 ble begge transfektert i COS-7-celler ved anvendelse av lipofectamin (Gibco Co.). Cellene ble dyrket i én dag i DMEM inneholdende 10 % FCS, behandlet med trypsin, utspredd på dekkglass (15 mm, rund form, produsert av Matsunami Co.) i 24-brønners plater ved 5×10^4 celler pr. brønn og dyrket i 2 dager. Kulturplaten ble vasket én gang med PBS. Cellene ble fiksert med PBS inneholdende 1 % paraformaldehyd ved romtemperatur i 8 minutter. Platen som de fikserte celler var bundet til, ble vasket seks
- 20 ganger med PBS, og deretter ble 700 μ l musemiltceller suspendert i en mengde på 1×10^6 /ml i α -MEM inneholdende 10^{-8} M aktiv form-vitamin D₃, 10^{-7} M dexametason og 10 % bovint fosterserum tilsatt til hver brønn. Millicell PCF (Millipore Co.) ble plassert i hver brønn, og en suspensjon av ST2-
 - 25 celler i det ovennevnte kulturmedium (4×10^4 /ml) ble tilsatt, 700 μ l pr. brønn, til Millicell PCF, etterfulgt av inkubasjon ved 37 °C i 6 dager. Etter dyrkningen ble Millicell PCF fjernet, platen ble vasket én gang med PBS, og cellene ble fiksert med aceton-etanollosning (50:50) i
 - 30 1 minutt. Cellene som oppviste vinsyreresistent, sur fosfataseaktivitet (TRAP), som er en spesifikk markør for osteoklaster, ble deretter selektivt farget ved anvendelse av "LEUKOCYTE ACID PHOSPHATASE kit" (Sigma Co.). Som et resultat av mikroskopisk observasjon ble TRAP-positive celler ikke

påvist i brønnene hvori COS-7-celler transfektert med pcDL-SR α 296 var fiksert. I motsetning til dette ble 65 ± 18 (gjennomsnitt $\pm$ standardavvik, $n = 3$) TRAP-positive celler observert i brønnene hvori COS-7-celler transfektert med phOBM var fiksert. Ekspresjon av kalsitoninreseptor ble dessuten bekreftet ved det faktum at ^{125}I -merket laksekalsitonin (Amersham Co.) spesifikt ble bundet til disse TRAP-positive celler. Basert på disse funn er det vist at humant OBM, som er proteinet kodet for av DNA ifølge foreliggende oppfinnelse, har en aktivitet som induserer osteoklastdannelse.

Eksempel 27

Aktivitet av Trx-hOBM og utskilt form-humant OBM ved induksjon av osteoklastdannelse

Musemiltceller ble suspendert i α -MEM inneholdende 10^{-8} M aktiv form-vitamin D_3 , 10^{-7} M dexametason og 10 % bovint fosterserum, ved en konsentrasjon på $2 \times 10^6/\text{ml}$. Suspensjonen ble tilsatt til en 24-brønners plate i en mengde på 350 μl pr. brønn. Hver brønn ble deretter tilsatt 350 μl av en løsning preparert ved fortynning av renset Trx-hOBM med det ovennevnte kulturmedium (40 ng/ml), 350 μl løsning preparert ved 10 gangers fortynning av et kondisjonert medium som var produsert ved dyrkning av 293-EBNA-celler, på hvilke pCEP-shOBM eller pCEP4 var transfektert, i kulturmediet IMDM-10 % FCS, med det ovennevnte kulturmedium, eller kun 350 μl av det ovennevnte kulturmedium. Millicell PCF (Millipore Co.) ble plassert i hver brønn, som ble tilsatt 600 μl ST2-celler som var suspendert i det ovennevnte kulturmedium ($4 \times 10^4/\text{ml}$). Etter dyrkning i 6 dager ble Millicell PCF fjernet. Platen ble vasket én gang med PBS, og cellene ble fiksert med aceton-etanollosning (50:50) i 1 minutt. Cellene som oppviste vinsyreresistent, sur fosfataseaktivitet (TRAP-aktivitet), ble deretter selektivt farget ved anvendelse av "LEUKOCYTE ACID PHOSPHATASE kit" (Sigma Co.). Resultatene fra mikroskopisk observasjon avslørte at ingen celler med TRAP-aktivitet ble påvist i brønnene som ikke var tilsatt noe Trx-hOBM, mens 115 ± 19 (gjennomsnitt $\pm$ standardavvik, $n = 3$) TRAP-positive celler ble observert i brønner som var tilsatt Trx-hOBM. Selv om ingen celler med TRAP-aktivitet ble påvist i

brønnene som var tilsatt kondisjonert medium av 293-EBNA-celler, transfektert med pCEP4, ble likeledes 125 ± 23 (gjennomsnitt $\pm$ standardavvik, $n = 3$) TRAP-positive celler observert i brønnene som var tilsatt kondisjonert medium av 293-EBNA-celler, transfektert med pCEPshOBM. Ekspresjon av kalsitoninreseptor ble dessuten bekreftet ved det faktum at ^{125}I -merket laksekalsitonin (Amersham Co.) spesifikt bindes til disse TRAP-positive celler. Disse resultater har vist at Trx-hOBM og utskilt form-OBM oppviser aktivitet som induserer osteoklastdannelse.

Eksempel 28

Fremstilling av polyklonalt antistoff

Muse-sOBM eller humant sOBM anvendt som et immuno-
gen ble fremstilt i overensstemmelse med metoden beskrevet ovenfor. Muse-sOBM-cDNA (cDNA (sekvens-ID nr. 18) som koder for muse-sOBM (sekvens-ID nr. 16) som ikke inneholder membranbindingsområdet av muse-OBM på grunn av fravær av aminosyrene fra N-terminalen ned til den 72. aminosyre), eller humant sOBM-cDNA (cDNA (sekvens-ID nr. 19) som koder for humant sOBM (sekvens-ID nr. 17) som ikke inneholder membranbindingsområdet av humant OBM på grunn av fravær av aminosyrene fra N-terminalen ned til den 71. aminosyre) ble nærmere bestemt ligert med et HindIII/EcoRV-fragment (5,2 kb) av ekspresjonsvektoren pSec TagA (Invitrogen Co.) inkludert nukleotidsekvensen som koder for et signalpeptid av κ -kjeden av immunglobulin, sammen med et EcoRI/PmaCI-fragment (0,32 kb) av OBM-cDNA, ved anvendelse av et ligeringssett, ver. 2 (Takara Shuzo Co.). *Escherichia coli* DH5 α ble transformert med reaksjonsproduktet. Plasmidene oppnådd fra de resulterende ampicillinresistente stammer ble rensset ved hjelp av alkali-SDS og spaltet med et restriksjonsenzym for å utvelge et plasmid med 0,6 kb- og 0,32 kb-fragmenter innføyd i pSec TagA. Sekvensen av dette plasmid ble identifisert ved anvendelse av "Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing FS kit" (produkt fra Perkin Elmer Co.). Som et resultat ble det bekreftet at dette plasmid har en sekvens som koder for muse- eller humant sOBM. Etter at plasmidet var spaltet med restriksjonsenzymene NheI/XhoI, ble et fragment (1,0 kb),

tilsvarende sekresjonsformen av OBM-cDNA, gjenvunnet ved agarosegelelektroforese. Dette fragmentet ble innføyd i et NheI/XhoI-fragment (10,4 kb) av ekspresjonsvektoren pCEP4 (Invitrogen Co.) ved anvendelse av et ligeringssett.

- 5 *Escherichia coli* DH5 α ble transformert ved anvendelse av reaksjonsproduktet. Plasmidene ble rensset ved hjelp av alkali-SDS metoden fra de resulterende ampicillinresistente stammer. Ved analysering av disse plasmider ved spalting med et restriksjonsenzym ble det utvalgt *Escherichia coli* inne-
- 10 holdende et sekresjonstype-OBM-ekspresjonsplasmid (pCEP-sOBM) med målstrukturen. *Escherichia coli*-stammen inneholdende pCEP-sOBM ble dyrket, og pCEP-sOBM ble rensset ved anvendelse av et QIA-filterplasmidmidisett (Qiagen Co.). 293-EBNA-celler ble deretter suspendert i IMDM (IMDM-10 % FCS) inneholdende
- 15 10 % FCS og utspredd på 24-brønners plate belagt med kollagen (produkt fra Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) med en celletetthet på 2×10^5 celler/2 ml/brønn. Etter dyrkning over natten ble cellene transformert med 1 μ g pCEP-sOBM eller pCEP4 ved anvendelse av 4 μ l lipofectamin (Gibco Co.) og dyrket i
- 20 ytterligere 2 dager i 0,5 ml serumfritt IMDM eller IMDM-10 % FCS. Kultursupernatanten ble gjenvunnet. En cellelinje med høy produktivitet av rekombinant muse-oppløselig OBM (msOBM) eller humant oppløselig OBM (hsOBM) ble screenet som følger. Natriumbikarbonat ble tilsatt til kultursupernatanten, som
- 25 ble antatt å inneholde msOBM eller hsOBM, til en sluttkonsentrasjon på 0,1 M. 100 μ l av kultursupernatanten ble tilsatt til hver brønn i 96-brønners immunoplater (Nunc Co.) og hensatt over natten ved 4 $^{\circ}$ C, hvilket derved medførte at msOBM eller hsOBM i kultursupernatanten ble immobilisert på hver
- 30 brønn. Til hver brønn ble det tilsatt 200 μ l "Block Ace"-løsning (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), fortynnet fire ganger med PBS (B-PBS), og platene ble hensatt i 2 timer ved romtemperatur. Etter vask av hver brønn på platene tre ganger med PBS (P-PBS) inneholdende 0,1 % Polysorbat 20 ble 100 μ l
- 35 av hver rekombinant OCIF(rOCIF)-løsning (3-100 ng/ml), seriefortynnet med B-PBS, tilsatt til hver brønn på platene. Platene ble hensatt i 2 timer ved 37 $^{\circ}$ C Etter vask av platene tre ganger med PBS ble 100 μ l av et peroksidasemerket anti-OCIF-polyklonalt antistoff (WO 96/26217), fortynnet med B-

PBS, tilsatt til hver brønn. Etter henstand i 2 timer ved 37 °C ble brønnene vasket seks ganger med P-PBS. 100 µl TMB-løsning (TMB-løselig reagens, høy sensitivitet, ScyTek Co.) ble deretter tilsatt til hver brønn på platene, og platene
5 ble hensatt ved romtemperatur i ca. 10 minutter, og reaksjonen ble deretter stanset ved tilsetning av 100 µl av en stoppeløsning (stoppereagens, ScyTek Co.) til hver brønn. Absorbans ved 450 nm i hver brønn ble målt ved anvendelse av en mikroplateleser. Det ble bekreftet at absorbansen økte
10 bemerkelsesverdig i forhold til konsentrasjonen av tilsatt OCIF til platene der msOBM eller hsOBM i kultursupernatanten fra cellelinjen som produserer msOBM eller hsOBM var immobi-

lisert.

Cellelinjen som oppviste høy økning av absorbans,
15 ble utvalgt som en stamme med høy produktivitet. 293-EBNA-celler med høy produktivitet av msOBM eller hsOBM ble således dyrket i stor skala i et IMDM-medium inneholdende 5 % FCS ved anvendelse av 25T-flasker (T-225). Etter at cellene nådde konfluens, ble et friskt kulturmedium tilsatt til hver T-225-
20 flaske i en mengde på 100 µl pr. flaske, og cellene ble dyrket i 3-4 dager for å oppsamle kultursupernatanten. Disse prosedyrer ble gjentatt fire ganger for å oppnå 10 l av kultursupernatanten inneholdende msOBM eller hsOBM. Renset msOBM (10 mg) eller hsOBM (12 mg), som oppviste homogene bånd
25 (molekylvekt: 32 kDa) på SDS-polyakrylamidgelelektroforese, ble oppnådd fra kultursupernatanten ved hjelp av affinitets-kromatografi på en OCIF-immobilisert kolonne og gelfiltreringskromatografi i overensstemmelse med metoden beskrevet i eksempler 25(6) og 25(7). Hvert således oppnådde rensede
30 preparat ble anvendt som et antigen for immunisering. Hvert av de rensede proteinantigener ble oppløst i fosfatbufret saltløsning (PBS) til en konsentrasjon på 200 µg/ml og emulgert med et ekvivalent volum Freundts komplette adjuvans. 1 ml av emulsjonen ble injisert subkutan i tre japanske hvite
35 kaniner ca. én gang pr. uke. En forsterkningsinjeksjon ble gitt når antistofftiteren nådde en topp. Helt blod ble oppsamlet 10 dager etter. Serum ble fortynnet to ganger med en bindingsbuffer for protein A-Sepharose-kromatografi (BioRad Co.) og applisert på en protein A-kolonne ekvilibrert med den

samme buffer. Etter grundig vask av kolonnen med den samme
 buffer ble anti-sOBM-antistoffet adsorbert til kolonnen
 eluert med en elueringsbuffer (BioRad Co.) eller 0,1 M
 glysin-HCl-buffer, pH 3,0. For umiddelbart å nøytralisere
 5 eluatet ble eluatet fraksjonert ved anvendelse av testrør
 inneholdende en liten mengde 1,0 M Tris-HCl (pH 8,0). Eluatet
 ble dialysert mot PBS over natten ved 4 °C. Antistoffinnhol-
 det i antistoffløsningen ble målt ved hjelp av Lowry-metoden
 ved anvendelse av bovint IgG som et standardprotein. Cirka
 10 10 mg rensset immunglobulin (IgG) inneholdende det polyklonale
 antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse pr. 1 ml kanin-
 antiserum ble således oppnådd.

Eksempel 29

15 Måling av OBM og sOBM ved hjelp av ELISA ved anvendelse av polyklonale antistoffer

En sandwich-ELISA ble konstruert ved anvendelse av
 det kanin-antihuman-sOBM-polyklonale antistoff fra eksempel
 28 som fastfaseantistoff og enzymmerket antistoff. Peroksi-
 20 dase(POD)merket antistoff ble preparert i overensstemmelse
 med metoden ifølge Ishikawa (Ishikawa et al., J. Immunoassay,
 vol. 4, 209-327, 1983).

Det antihumane sOBM-polyklonale antistoff fra
 eksempel 28 ble oppløst i 0,1 M NaHCO₃ til en konsentrasjon
 25 på 2 µg/ml. 100 µl av den resulterende løsning ble tilsatt
 til hver brønn på 96-brønners immunoplater (Nunc Co.), som
 deretter ble hensatt ved romtemperatur over natten. Deretter
 ble 200 µl 50 % "Block Ace" (Snow Brand Milk Co., Ltd.) til-
 satt til hver brønn, og platene ble hensatt i 1 time ved rom-
 30 temperatur. Brønnene ble vasket tre ganger med PBS inne-
 holdende 0,1 % Polysorbat 20 (vaskebuffer).

Humant OBM ble uttrykt i overensstemmelse med
 metoden ifølge eksempel 26 og rensset i overensstemmelse med
 metoden ifølge eksempel 2. Det rensede humane OBM og det
 35 rensede humane sOBM preparert i eksempel 28 ble seriefortyn-
 net med den første reaksjonsbuffer (0,2 M Tris-HCl-buffer,
 pH 7,2, inneholdende 40 % "Block Ace" og 0,1 % Polysorbat
 20), og 100 µl av den fortynnede løsning ble tilsatt til hver
 brønn på platene. Platene ble hensatt ved romtemperatur i

2 timer og vasket tre ganger med den ovennevnte vaskebuffer. 100 µl POD-merket, antihumant sOBM-polyklonalt antistoff, fortynnet 1000 ganger med den andre reaksjonsbufferen (0,1 M Tris-HCl-buffer, pH 7,2, inneholdende 25 % "Block Ace" og 0,1 % Polysorbat 20), ble deretter tilsatt til hver brønn på platene. Etter at platene var hensatt ved romtemperatur i 2 timer, ble hver brønn vasket tre ganger med vaskebufferen. 100 µl enzymsubstratløsning (TMB, ScyTek Co.) ble deretter tilsatt til hver brønn på platene, og platene ble hensatt i 10 minutter, etterfulgt av tilsetning av 100 µl av en reaksjonstermineringsløsning (stoppereagens, ScyTek Co.) for å stanse enzymreaksjonen. Absorbansen ved 450 nm i hver brønn ble målt ved anvendelse av en mikroplateleser. Resultatene er vist i figur 26. Sandwich-ELISA ved anvendelse av et kanin-antihuman-sOBM-polyklonalt antistoff gjenkjente i nesten like stor grad humant sOBM (molekylvekt ca. 32 kDa) og humant OBM (molekylvekt ca. 40 kDa) med en målingssensitivitet på ca. $12,5 \times 10^{-3}$ pmol/ml (humant OBM: ca. 500 pg/ml, humant sOBM: ca. 400 pg/ml). Målingen av muse-sOBM og muse-OBM ved hjelp av ELISA under anvendelse av det kanin-antimuse-sOBM-polyklonale antistoff fra eksempel 28 kunne utføres på samme måte. Det ble bekreftet at en ekstremt liten mengde muse-sOBM eller muse-OBM kan måles med nesten den samme sensitivitet som beskrevet ovenfor.

Som nevnt ovenfor, kan det antihuman-sOBM-polyklonale antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse, fremstilt i eksempel 28, i like stor grad gjenkjenne både de humane sOBM- og humane OBM-antigener. Antistoffet ble derfor betegnet antihumant OBM/sOBM-polyklonalt antistoff. Det anti-muse-sOBM-polyklonale antistoff fremstilt i eksempel 28 kan likeledes i samme grad gjenkjenne både muse-sOBM- og muse-OBM-antigenene. Dette antistoff ble derfor betegnet anti-muse-OBM/sOBM-polyklonalt antistoff.

Eksempel 30

Fremstilling av monoklonalt antistoff

Det rensede humane sOBM fremstilt i eksempel 28 ble anvendt som antigen for immunisering. Det rensede humane sOBM ble oppløst i fysiologisk saltløsning til en konsentrasjon på

10 µg/ml og emulgert ved blanding med like stort volum
 Freunds komplette adjuvans. Emulsjonen ble administrert
 intraperitonealt til BALB/c-mus i en dose på 200 µl, tre
 ganger, én gang pr. uke, for å immunisere musene. Det samme
 5 volum av Freunds komplette adjuvans ble deretter tilsatt til
 en fysiologisk saltløsning inneholdende 5 µg/ml humant sOBM,
 og blandingen ble emulgert tilstrekkelig. Denne emulsjonen
 ble injisert intraperitonealt i BALB/c-mus i en dose på
 200 µl, én gang pr. uke i 4 uker, for immunisering. Én uke
 10 etter den fjerde immunisering ble 100 µl av en fysiologisk
 saltløsning inneholdende 10 µg/ml humant sOBM administrert
 intravenøst til BALB/c-musene som en forsterkningsinjeksjon.
 Etter 3 dager ble milten fjernet, og miltceller ble separert.
 Miltcellene ble fusjonert med musemyelomceller, P3x63-
 15 Ag8.653, i overensstemmelse med en konvensjonell metode
 (Koehler, G. og Milstein, C., Nature, 256, 495 (1975)). De
 suspenderte fusjonerte celler ble dyrket i 10 dager i et HAT-
 medium inneholdende hypoksantin, aminopterin og tymidin.
 Etter at myelomcellene var døde og hybridomer kom til syne,
 20 ble HAT-mediet erstattet med et aminopterinfritt HAT-medium,
 og cellekulturen ble fortsatt.

Eksempel 31

Seleksjon av hybridomer og kloning

25 Tilsynekomst av hybridomer ble påvist 10 dager
 etter cellefusjonen ifølge eksempel 30. Monoklonale anti-
 stoffer som gjenkjenner det humane sOBM med høy affinitet og
 hybridomer som produserer disse antistoffer, ble utvalgt i
 overensstemmelse med den følgende prosedyre ved anvendelse av
 30 den forbedrede fastfase-ELISA som er beskrevet nedenfor. For
 å utvelge det anti-OBM-monoklonale antistoff som gjenkjenner
 både humant sOBM og muse-sOBM, ble dessuten muse-sOBM, frem-
 stilt i eksempel 27, anvendt i tillegg til humant sOBM som
 antigen for fastfase-ELISA. Det humane sOBM og muse-sOBM ble
 35 oppløst i en 0,1 M natriumbikarbonatløsning i en konsentra-
 sjon på 5 µg/ml. 50 ml av hver antigenløsning ble tilsatt til
 hver brønn på 96-brønners immunoplater (Nunc Co.). Platene
 ble hensatt ved 4 °C over natten for å immobilisere anti-
 genene. Antigenløsningen i hver brønn ble kastet. Hver brønn

ble deretter fylt med 200 µl 50 % "Block Ace" (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) og hensatt ved romtemperatur i 1 time. Etter at hver brønn var vasket tre ganger med fosfatbufret saltløsning (PBS-P) inneholdende 0,1 % Polysorbat 20 ble 40 µl kalveserum (Hiclone Inc.) tilsatt til hver brønn. 10 µl av hver hybridomkultursupernatant ble deretter tilsatt til hver brønn, og hver brønn ble inkubert ved romtemperatur i 2 timer i nærvær av 80 % kalveserum. Formålet med fastfase-ELISA i nærvær av 80 % kalveserum er å utvelge en hybridom som produserer et antistoff som kan påvise en meget liten mengde humant sOBM eller muse-sOBM, selv i en løsning som inneholder en høy proteinkonsentrasjon og i nærvær av et immunreaksjonsforstyrrende stoff avledet fra serum, det vil si en hybridom som kan produsere et antistoff med høy affinitet for humant sOBM eller muse-sOBM. Etter reaksjon ved romtemperatur i 2 timer ble platene vasket med PBS-P, og deretter ble 50 µl peroksidasemerket anti-muse-IgG (KPL Co.), fortynnet 5000 ganger med fysiologisk saltløsning inneholdende 25 % "Block Ace" tilsatt til hver brønn. Etter reaksjon ved romtemperatur i 2 timer ble platen vasket tre ganger med PBS-P. Etter tilsetning av 50 µl av en enzymsubstratløsning (TMB, ScyTek Co.) til hver brønn ble reaksjonen fortsatt ved romtemperatur i 5 minutter. Den enzymatiske reaksjon ble stanset ved tilsetning av 50 µl av en termineringsløsning (stoppereagens, ScyTek Co.). Hybridomer som produserer antistoffer som gjenkjenner humant sOBM eller muse-sOBM, ble utvalgt ved å måle absorbansen ved 450 nm i hver brønn ved anvendelse av en mikroplateleser ("Immune Reader NJ2000", Nippon InterMed Co.). Hybridomer som produserer antistoffer med spesielt høy absorbans (OD_{450nm}) ble utvalgt. Kloning av disse hybridomer ved hjelp av begrensende fortynning ble gjentatt 3-5 ganger for å etablere stabile hybridomer. Hybridomer med spesielt høy antistoffproduktivitet ble utvalgt blant de etablerte antistoffproduserende hybridomkloner.

35

Eksempel 32

Produksjon og rensing av monoklonalt antistoff

De antistoffproduserende hybridomer fra eksempel 31, det vil si høyaffinitetsantistoffproduserende hybridomer

som gjenkjenner humant sOBM og hybridomer som produserer et antistoff med kryssreaktivitet til muse-sOBM, ble dyrket. Hver hybridom ble implantert intraperitonealt i BALB/c-mus (1×10^6 celler pr. mus), til hvilke pristan (Aldrich Co.) tidligere var administrert én gang pr. uke. Etter ca. 2-3 uker ble akkumulert ascites oppsamlet. Det monoklonale antistoff som gjenkjenner humant sOBM ifølge foreliggende oppfinnelse, eller både det humane sOBM og muse-sOBM, i ascites ble renset i overensstemmelse med rensemetoden for anti-OBM/sOBM-polyklonale antistoffer ved anvendelse av en protein A-kolonne beskrevet i eksempel 28. Det rensede monoklonale antistoff ble således oppnådd fra ascites ved hjelp av protein A-kolonnekromatografi (Pharmacia Co.).

15 Eksempel 33

Antigenspesifisitet av monoklonalt antistoff

Antigenspesifisiteten av et monoklonalt antistoff som spesifikt gjenkjenner humant sOBM og det monoklonale antistoff som oppviser kryssreaktivitet med både det humane sOBM og muse-sOBM, ble undersøkt ved anvendelse av humant sOBM, humant intakt OBM med et membranbindingsområde, muse-sOBM og museintakt sOBM med et membranbindingsområde. Det ble oppnådd mer enn 30 typer monoklonalt antistoff. Resultatene for flere representative antistoffer er vist i tabell 1. Som et resultat ble det funnet at de fleste antihuman-sOBM-monoklonale antistoffer som spesifikt gjenkjenner humant sOBM, også gjenkjenner det humane intakte OBM med et membranbindingsområde, men ikke muse-OBM og muse-intakt OBM med et membranbindingsområde. På den annen side ble det funnet at kun noen få monoklonale antistoffer som gjenkjenner både det humane sOBM og muse-sOBM, ble oppnådd, og at disse antistoffer oppviser kryssreaktivitet med både det humane OBM og muse-OBM. Disse resultater viser at det er et felles antigen-gjenkjennelsessete, nemlig en felles epitop, i både det humane OBM og muse-OBM. Basert på det faktum at det antihuman-sOBM-monoklonale antistoff fremstilt ved anvendelse av det humane sOBM som et immuntantigen også likeledes gjenkjenner humant OBM med et membranbindingsområde, ble antihuman-

sOBM-monoklonalt antistoff betegnet antihuman-OBM/sOBM-monoklonalt antistoff.

Tabell 1

5

Antistoff	Antigen			
	hsOBM	hOBM	msOBM	mOBM
H-OBM 1	+	+	-	-
H-OBM 2	+	+	-	-
H-OBM 3	+	+	-	-
H-OBM 4	+	+	-	-
H-OBM 5	+	+	-	-
H-OBM 6	+	+	-	-
H-OBM 7	+	+	-	-
H-OBM 8	+	+	-	-
H-OBM 9	+	+	+	+
H-OBM 10	+	+	-	-
H-OBM 11	+	+	-	-
H-OBM 12	+	+	-	-
H-OBM 13	+	+	+	+
H-OBM 14	+	+	-	-

hsOBM: humant løselig OBM

hOBM: humant membranbindingstype-OBM

msOBM: museoppløselig OBM

10 mOBM: musemembranbindingstype-OBM

Eksempel 34

Bestemmelse av klasse og underklasse for monoklonalt antistoff

15 Klassen og underklassen for det monoklonale antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse ble bestemt ved hjelp av immunglobulinklasse- og -underklasseanalysesettet (Amersham Co.) i overensstemmelse med den angitte protokoll. Resultatene for representative monoklonale antistoffer er

20 vist i tabell 2. Som vist i tabell 2, var hovedmengden av antihuman-OBM/sOBM-monoklonale antistoffer IgG₁, de andre var IgG_{2a} og IgG_{2b}. Lette kjeder for alle antistoffer var κ-kjeder.

Tabell 2

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

5 Eksempel 35Måling av dissosiasjonskonstanten (K_d -verdi) for monoklonalt antistoff

Dissosiasjonskonstanten for det monoklonale antistoff ble målt i overensstemmelse med en kjent metode (Betrand Friguet et al.: Journal of Immunological Methods, 77, 305-319, 1986). Det vil si at det rensede antistoff fra eksempel 32 ble fortynnet med 0,4 M Tris-HCl-buffer (en primær buffer, pH 7,4) inneholdende 40 % "Block Ace" og 0,1 % Polysorbat 20, for å gi en konsentrasjon på 5 ng/ml.

Løsningen ble blandet med et ekvivalent volum av en fortynnet løsning av rensed, humant, løselig OBM (hsOBM) fra eksempel 28 i den primære buffer, med et konsentrasjonsområde fra 6,25 til 10 µg/ml. Blandingen ble hensatt i 15 timer ved 4 °C for å binde hsOBM til det monoklonale antistoff. Etter 15 timer ble antistoffet som ikke var bundet til hsOBM (10 µg/ml, 100 µl/brønn), målt ved anvendelse av en immobilisert fast-fase-ELISA for å beregne dissosiasjonskonstanten for det monoklonale antistoff mot hsOBM. Affiniteten til msOBM av et antistoff, som er et monoklonalt antistoff for hsOBM og også oppviser kryssreaktivitet med museløselig OBM (msOBM), ble målt i overensstemmelse med den samme metode, med unntak av at msOBM ble anvendt istedenfor hsOBM. Dissosiasjonskonstantene for antistoffer som oppviser høy affinitet for hvert antigen, og som er anvendelige for enzymatisk immunanalyse og bindingsanalyse, er vist i tabell 3.

Tabell 3

Antistoff	Underklasse	Antigen	Dissosiasjonskonstant Kd (M)
H-OBM 1	IgG ₁ (κ)	hsOBM	$1 \times 10^{-11} < k_d < 1 \times 10^{-10}$
H-OBM 4	IgG ₁ (κ)	hsOBM	$1 \times 10^{-11} < k_d < 1 \times 10^{-10}$
H-OBM 9	IgG ₁ (κ)	hsOBM	$1 \times 10^{-9} < k_d < 1 \times 10^{-8}$
H-OBM 9	IgG ₁ (κ)	msOBM	$1 \times 10^{-8} < k_d < 1 \times 10^{-7}$

5 Som et resultat var dissosiasjonskonstantene (Kd) for H-OBM 1 og H-OBM 4, som er antistoffene spesifikke for humant løselig OBM (hsOBM), i størrelsesordenen 10^{-11} M, hvilket indikerer den høye affinitet til hsOBM. På den annen side var Kd-verdien for antistoffet H-OBM 9, som gjenkjenner

10 både hsOBM og museløselig OBM (msOBM), i størrelsesordenen 10^{-8} M til msOBM og i størrelsesordenen 10^{-9} M til hsOBM. Dissosiasjonskonstanten for det andre antistoffet, som gjenkjenner begge antigener i tabell 1, det vil si dissosiasjonskonstanten for H-OBM 13 for hvert antigen, var dessuten den

15 samme som for H-OBM 9, og disse to antistoffer tilhører de samme underklasser. Disse funn antyder muligheten for at de er de identiske antistoffer som gjenkjenner den samme epitop på hvert antigen.

20 Eksempel 36

Målingsmetode for humant OBM og sOBM ved hjelp av sandwich-ELISA ved anvendelse av antihuman-OBM/sOBM-monoklonale antistoffer

25 En sandwich-ELISA ble konstruert ved anvendelse av de to høyaffinitetsmonoklonale antistoffer fra eksempel 35, henholdsvis H-OBM 1 og H-OBM 4, som et fastfaseantistoff og et enzymmerket antistoff. Merking av antistoffet ble utført ved anvendelse av et maleimidaktivert peroksidasesett (Piers Co.). Antistoffet, H-OBM 1, ble oppløst i en 0,1 M natriumbikarbonatløsning til en konsentrasjon på 10 µg/ml, og 100 µl

30 av løsningen ble tilsatt til hver brønn på 96-brønners immunoplater (Nunc Company). Etter henstand over natten ved 4 °C for å immobilisere antistoffet ble løsningen kastet, og 300 µl 50 % "Block Ace"-løsning ble tilsatt til hver brønn på

platene. Hver brønn på platene ble blokkert ved henstand ved romtemperatur i 2 timer. Etter blokkering ble platene vasket med fosfatbufret saltløsning inneholdende 0,1 % Polysorbat 20 (PBS-P). Humant OBM (hOBM) og humant løselig OBM (hsOBM) ble

5 fortynnet med 0,4 M Tris-HCl-buffer, pH 7,4, inneholdende 40 % "Block Ace" (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) og 0,1 % Polysorbat 20 (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.) (den første reaksjonsbufferen), for å preparere testprøver med forskjellige konsentrasjoner. Disse testprøver med forskjellige konsentrasjoner ble tilsatt til hver brønn i en mengde

10 på 100 µl pr. brønn og reagert med antistoffet H-OBM 1 immobilisert i hver brønn, ved inkubasjon ved romtemperatur i 2 timer. Etter 2 timer ble platene vasket med PBS-P. 100 µl av en løsning av POD-merket H-OBM 4-antistoff i 0,2 M Tris-HCl-buffer, pH 7,4, inneholdende 25 % "Block Ace" og 0,1 %

15 Polysorbat 20 (den andre reaksjonsbufferen), ble deretter tilsatt til hver brønn, etterfulgt av ytterligere inkubasjon ved romtemperatur i 2 timer. Platene ble deretter vasket med PBS-P, og 100 µl av en enzymsubstratløsning (TMB, ScyTek Co.) ble tilsatt til hver brønn for å starte enzymreaksjonen.

20 Enzymreaksjonen ble terminert ved tilsetning av 100 µl av en reaksjonstermineringsløsning (stoppereagens, ScyTek Co.) til hver brønn. Absorbansen i hver brønn ved 450 nm ble målt ved anvendelse av en mikroplateleser. Resultatene er vist i figur

25 27.

Som et resultat ble det bekreftet at sandwich-ELISA konstruert ved anvendelse av de to antihuman-OBM/sOBM-monoklonale antistoffer, H-OBM 1 og H-OBM 4, med høy affinitet for humant OBM/sOBM fremstilt i eksempel 35, i samme grad

30 gjenkjenner humant OBM og humant sOBM og er i stand til å måle en meget liten mengde humant OBM eller humant sOBM ved en kvantitativ grense på ca. $1,25 \times 10^{-3}$ til $2,5 \times 10^{-3}$ pmol/ml (ca. 50-100 pg/ml for humant OBM med en molekylvekt på 40 kDa, ca. 40-80 pg/ml for humant sOBM med en

35 molekylvekt på 32 kDa). Hybridomene som produserer disse to antihuman-OBM/sOBM-monoklonale antistoffer, H-OBM 1 og H-OBM 4, ble henholdsvis betegnet H-OBM 1 og H-OBM 4. Hybridomen som produserer antihuman-OBM/sOBM-monoklonalt antistoff (H-OBM 9) som gjenkjenner muse-OBM og muse-sOBM, og også har en

aktivitet som inhiberer osteoklastdannelse, ble betegnet H-OBM 9. Disse hybridomer ble deponert hos the National Institute of Bioscience and Human Technology, the Agency of Industrial Science and Technology, 5. november 1993, med
 5 deponeringsnumrene FERM BP-6264 (H-OBM 1), FERM BP-6265 (H-OBM 4) og FERM BP-6266 (H-OBM 9).

Eksempel 37

Måling av muse-OBM og muse-sOBM ved anvendelse av antihuman-OBM/sOBM-monoklonalt antistoff som gjenkjenner muse-OBM og muse-sOBM
 10

En sandwich-ELISA ble konstruert ved anvendelse av det antihuman-OBM/sOBM-monoklonale antistoff, H-OBM 9, som gjenkjenner muse-OBM og muse-sOBM oppnådd som et fastfase-
 15 antistoff i eksemplene 33 og 35, og det antimus-OBM/sOBM-polyklonale antistoff som et enzymmerket antistoff oppnådd i eksempel 28. Muse-OBM og muse-sOBM ble fortynnet med den første reaksjonsbufferen for å gi forskjellige konsentra-
 sjoner, på samme måte som i eksempel 35, og sOBM ble deretter
 20 målt i overensstemmelse med metoden beskrevet i eksempel 36. Resultatene er vist i figur 28. Som et resultat ble det funnet at muse-OBM og muse-sOBM likeledes kan måles ved anvendelse av H-OBM 9, som er det antihuman-OBM/sOBM-monoklonale antistoff som gjenkjenner muse-OBM og muse-sOBM
 25 ifølge foreliggende oppfinnelse. Som vist ved resultatene fra eksempel 35, har dette antihuman-OBM/sOBM-monoklonale antistoff, H-OBM 9, en høy dissosiasjonskonstant i forhold til muse-sOBM, nemlig en forholdsvis lav affinitet for muse-sOBM. Sensitiviteten for målingen av muse-OBM (molekylvekt ca.
 30 40 kDa) og muse-sOBM (molekylvekt ca. 32 kDa) med denne ELISA-analyse var ca. 25×10^{-3} pmol/ml (ca. 1 ng/ml for muse-OBM og ca. 0,8 ng/ml for muse-sOBM).

Eksempel 38

Osteoklastogeneseinhibitorisk aktivitet av anti-OBM/sOBM-antistoff
 35

Det er kjent at osteoklastlignende celler (OCL) induseres ved samkultur av musemiltceller og ST2-celler (musebenmargavledede stromaceller; Endocrinology, 125, 1805-

1813 (1989)). Evnen hos anti-OBM/sOBM-antistoffet til å inhibere OCL-dannelsen når det tilsettes til samkultur-systemet, ble undersøkt. Fordi muse-OBM uttrykkes i dette samkultursystem, ble et kanin-antimus-OBM/sOBM-polyklonalt antistoff som gjenkjenner muse-OBM, og et antihuman-OBM/sOBM-monoklonalt antistoff (H-OBM 9) som gjenkjenner både humane OBM- og muse-OBM-antigener, anvendt som antistoffer i dette eksemplet. 700 µl pr. brønn av hvert anti-OBM-antistoff, seriefortynnet med α -DMEM inneholdende 10 % FCS, og 350 µl/brønn hannmus-splenocytter (2×10^6 /ml) suspendert i det samme medium som beskrevet ovenfor, ble tilsatt til hver brønn på en 24-brønners plate (Nunc). ST2-celler som var behandlet med trypsin og suspendert i det ovennevnte kultur-medium inneholdende 4×10^{-8} M vitamin D₃ og 4×10^{-7} M dexametason (8×10^4 celler/ml), ble deretter tilsatt til hver brønn i en mengde på 350 µl/brønn, etterfulgt av dyrking i 6 dager ved 37 °C. Etter at platene var vasket én gang med PBS ble cellene i hver brønn fiksert med en blanding av etanol og aceton (50:50) i 1 time ved romtemperatur. Platene ble tørket i luft, og 500 µl substratløsning ble tilsatt til hver brønn i overensstemmelse med protokollen ifølge "LEUKOCYTE ACID PHOSPHATASE kit" (Sigma Co.), etterfulgt av inkubasjon i 55 minutter ved 37 °C. Kun de celler som oppviser vinsyreresistent, sur fosfataseaktivitet (TRAP-aktivitet), som er en spesifikk markør for osteoklaster, ble farget i denne reaksjonen. Platene ble vasket én gang med destillert vann og tørket i luft, og antall TRAP-positive celler ble tellet. Resultatene er vist i tabell 4. Som vist i tabell 4, inhiberte både det kanin-antimus-OBM/sOBM-polyklonale antistoff og det antihuman-OBM/sOBM-monoklonale antistoff, H-OBM 9, som gjenkjenner muse-OBM, OCL-dannelse på en doseavhengig måte. Disse antistoffer ble funnet å besitte osteoklastogeneseinhiberende aktivitet, på samme måte som osteoklastogeneseinhibitorisk faktor, OCIF/OPG, og er således lovende som terapeutiske midler for behandling av symptomer på benmetabolismeabnormalitet.

Tabell 4

Mengde antistoff (µg/ml)	Antall TRAP-positive multinukleater	
	Kanin-antimus- OBM/sOBM-polyklonalt antistoff	Mus-antihuman- OBM/sOBM-monoklonalt antistoff (H-OBM 9)
0	1155 ± 53	1050 ± 45
10	510 ± 24	650 ± 25
100	10 ± 3	15 ± 4

(Gj.snitt ± standardavvik, n = 3)

5

Eksempel 39

Aktivitet som induserer human osteoklastdannelse for Trx-OBM

Mononukleære celler ble preparert fra helt blod innsamlet fra venen til en frisk, voksen person ved hjelp av densitetsgradientsentrifugering ved anvendelse av Histopaque (Sigma Co.) i overensstemmelse med den vedlagte protokoll. De mononukleære celler ble suspendert ved en celletetthet på $1,3 \times 10^6$ /ml i α -MEM inneholdende 10^{-7} M dexametason, 200 ng/ml makrofagkolonistimulerende faktor (The Green Cross Corp.), 10 % bovint fosterserum og renset Trx-OBM (0-100 ng/ml), fremstilt i eksempel 15. Cellesuspensjonen ble tilsatt til hver brønn på 48-brønners plater i en mengde på 300 µl pr. brønn, og cellene ble dyrket ved 37 °C i 3 dager. Etter at kulturløsningen var erstattet med det ovennevnte kulturmedium, ble cellene dyrket ved 37 °C i 4 dager. De dyrkede celler med vinsyreresistent, sur fosfataseaktivitet (TRAP-aktivitet) ble selektivt farget i overensstemmelse med metoden beskrevet i eksempel 5. Antallet fargede multinukleater ble målt ved mikroskopisk observasjon. Resultatene er vist i figur 29. Det ble bekreftet at TRAP-positive multinukleater ble indusert på en doseavhengig måte ved tilsetning av Trx-OBM, mens ingen TRAP-positive celler ble påvist i brønnene som ikke var tilsatt Trx-OBM. Disse TRAP-positive multinukleater ble dessuten funnet å være positive overfor vitronektinreseptor, som er en markør for osteoklaster. Når en lignende celledyrkning ble utført på elfenbensskiver

plassert i hver brønn på en 48-brønners plate, ble det dessuten kun observert dannelse av hull på elfenbensskivene i nærvær av Trx-OBM. Basert på disse funn ble Trx-OBM antatt å ha en aktivitet som induserer dannelse av humane osteo-
 5 klaster.

Eksempel 40

Inhibering av benresorpsjonsaktivitet med anti-OBM/sOBM-antistoff

10 [^{45}Ca]- CaCl_2 -løsning (Amersham Co.) ble injisert subkutant i ddY-mus (Japan SLC Co.) på graviditetsdag 15, i en dose på 25 μCi pr. mus, for å merke fosterets ben med ^{45}Ca . Fosterets forben ble fjernet, og hud og muskulatur ble fjernet for å isolere de lange knokler. Brusken ble fjernet
 15 for å isolere benpipene. Benpipene ble en etter en lagt ned i 0,5 ml kulturmedium (BGJb-medium (GIBCO BRL Company) inneholdende 0,2 % bovint serumalbumin (Sigma Co.)) i hver brønn på 24-brønners plater og dyrket i 24 timer ved 37 °C i 5 % CO_2 . Etter forhåndsdyrkningen ble benene overført til forskjellige friske kulturmedier (0,5 ml), som hver inneholdt én av forskjellige benresorpsjonsfaktorer (vitamin D_3 , prostaglandin E_2 , paratyreoïdhormon, interleukin 1α) og normalt kanin-IgG (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; som en kontroll), eller det kanin-anti-OBM/sOBM-polyklonale antistoff fremstilt i eksempel 28,
 25 etterfulgt av ytterligere dyrkning i 72 timer. Etter dyrkningen ble benpipene plassert i 0,5 ml av en vandig løsning av 5 % trikloreddiksyre (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.) og hensatt ved romtemperatur i mer enn 3 timer for avkalking. 5 ml av en scintillator (AQUASOL-2, PACKARD Co.)
 30 ble tilsatt til kulturløsningen og ekstraktet av trikloreddiksyreløsningen (begge 0,5 ml) for å måle radioaktiviteten fra ^{45}Ca , hvorved mengdeandelen av ^{45}Ca som ble frigjort i kulturløsningen på grunn av benresorpsjon ble beregnet. Resultatene er vist i figurene 30-33. Som et resultat ble
 35 vitamin D_3 (10^{-8} M) funnet å øke benresorpsjonsaktiviteten, men det kanin-anti-OBM/sOBM-polyklonale antistoff undertrykte benresorpsjonen stimulert av vitamin D_3 på en konsentrasjonsavhengig måte og inhiberte fullstendig den økte benresorpsjon ved en konsentrasjon på 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (figur 30).

Prostaglandin E₂ (10⁻⁶ M) og paratyreoidhormon (100 ng/ml) økte også benresorpsjonsaktiviteten. 100 µg/ml av det kanin-anti-OBM/sOBM-polyklonale antistoff inhiberte imidlertid nesten fullstendig benresorpsjonen stimulert av prostaglandin E₂ og paratyreoidhormon (figurene 31 og 32). På den annen side ga normalt kanin-IgG (100 µl/ml), som ble anvendt som en positiv kontroll, ingen påvirkning av benresorpsjonsaktiviteten induisert av prostaglandin E₂ og paratyreoidhormon. Benresorpsjon ble også økt av interleukin 1α (10 ng/ml), men ble inhibert signifikant ved tilsetning av kanin-anti-OBM/sOBM-polyklonalt antistoff (100 µg/ml) (figur 23). Basert på disse resultater er det klart at antistoffet ifølge foreliggende oppfinnelse er en utmerket benresorpsjonsinhibitor. Resultatene oppnådd med et lignende eksperiment ved anvendelse av H-OBM 9, som er et mus-antihuman-OBM/sOBM-antistoff, bekreftet at dette antistoff viser en nesten ekvivalent benresorpsjonsinhiberende effekt som det kanin-anti-OBM/sOBM-polyklonale antistoff.

20 Industriell anvendelighet

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et nytt protein som spesifikt bindes til osteoklastogeneseinhibitorisk faktor (OCIF), en fremgangsmåte for fremstilling av proteinet, en screeningsmetode for et stoff som kontrollerer ekspresjon av dette protein ved anvendelse av dette protein, en screeningsmetode for et stoff som inhiberer eller modulerer aktiviteten av dette protein, en screeningsmetode for reseptoren som overfører aktiviteten av dette protein ved å bindes til dette, et farmasøytisk preparat som inneholder stoffet oppnådd ved disse screeningsmetoder, et antistoff for proteinet og et middel for behandling av unormal benmetabolisme ved anvendelse av antistoffet.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer dessuten et DNA som koder for et nytt protein (OCIF-bindingsmolekyl) som bindes til osteoklastogeneseinhibitorisk faktor (OCIF), et protein med en aminosyresekvens kodet for av DNA, en metode for fremstilling av proteinet som spesifikt bindes til OCIF ved anvendelse av dette DNA ved hjelp av en genteknologisk teknikk, og et middel som omfatter proteinet for behandling

av unormal benmetabolisme. Oppfinnelsen tilveiebringer dessuten en screeningsmetode for et stoff som kontrollerer ekspresjon av OCIF-bindingsmolekylet, en screeningsmetode for et stoff som inhiberer eller modulerer aktiviteten av OCIF-bindingsmolekylet ved å bindes til dette, en screeningsmetode for reseptoren som overfører aktiviteten av OCIF-bindingsmolekylet ved å bindes til dette, og et farmasøytisk preparat som inneholder stoffet fremstilt ved disse screeningsmetoder.

Oppfinnelsen tilveiebringer dessuten et DNA som koder for et nytt humant protein som er i stand til å bindes til osteoklastogeneseinhibitorisk faktor, OCIF (humant OCIF-bindingsmolekyl, humant OBM), et protein som inneholder en aminosyresekvens kodet for av dette DNA, en fremgangsmåte for fremstilling av et protein med karakteristika for spesifikk binding til OCIF, og som oppviser en biologisk aktivitet som understøtter og fremmer differensieringen og modningen av osteoklaster ved hjelp av genteknologi, og et middel for behandling av unormal benmetabolisme ved anvendelse av proteinet. Oppfinnelsen tilveiebringer dessuten en screeningsmetode for et stoff som kontrollerer ekspresjon av OCIF-bindingsmolekylet, en screeningsmetode for et stoff som inhiberer eller modulerer aktiviteten av OCIF-bindingsmolekylet ved å bindes til dette, en screeningsmetode for reseptoren som overfører den biologiske aktivitet av OCIF-bindingsmolekylet ved å bindes til dette, et farmasøytisk preparat som inneholder stoffet fremstilt ved disse screeningsmetoder, et antistoff mot humant OCIF-bindingsprotein, og et middel for forebyggelse og/eller behandling av symptomer på unormal benmetabolisme ved anvendelse av antistoffet.

Oppfinnelsen tilveiebringer dessuten antistoffer som gjenkjenner begge antigener (anti-OBM/sOBM-antistoffer), der det ene er et membranbundet protein som spesifikt bindes til OCIF (OCIF-bindingsmolekyl; OBM) og det andre er et oppløselig OBM (sOBM) som ikke inneholder et membranbindingsområde, en fremgangsmåte for fremstilling av antigenet, en fremgangsmåte for måling av OBM og sOBM ved anvendelse av disse antistoffer, og et middel for forebyggelse og/eller

behandling av symptomer på unormal benmetabolisme ved anvendelse av antistoffet som en effektiv komponent.

Proteinet og antistoffet fremstilt ved fremgangsmåtene ifølge foreliggende oppfinnelse er anvendelige som medisiner og/eller reagenser for forsknings- og testformål.

Beskrivelse av deponerte mikroorganismer

(1) Navn og adresse for deponeringsinstitusjonen som mikro-organismen ble deponert hos:

Agency of Industrial Science and Technology
1-3, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan
(postkode 305)

Dato for deponering hos deponeringsinstitusjonen:

23. mai 1997

Deponeringsnummer:

FERM BP-5953

(2) Navn og adresse for deponeringsinstitusjonen som mikro-organismen ble deponert hos:

Agency of Industrial Science and Technology
1-3, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan
(postkode 305)

Dato for deponering hos deponeringsinstitusjonen:

13. august 1997

Deponeringsnummer:

FERM BP-6058

(3) Navn og adresse for deponeringsinstitusjonen som mikro-organismen ble deponert hos:

Agency of Industrial Science and Technology
1-3, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan
(postkode 305)

Dato for deponering hos deponeringsinstitusjonen:

5. november 1997 (opprinnelig deponeringsdato)

Deponeringsnummer:

FERM BP-6264

(4) Navn og adresse for deponeringsinstitusjonen som mikro-organismen ble deponert hos:

Agency of Industrial Science and Technology

1-3, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan

5 (postkode 305)

Dato for deponering hos deponeringsinstitusjonen:

5. november 1997 (opprinnelig deponeringsdato)

Deponeringsnummer:

FERM BP-6265

10

(5) Navn og adresse for deponeringsinstitusjonen som mikro-organismen ble deponert hos:

Agency of Industrial Science and Technology

1-3, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan

15 (postkode 305)

Dato for deponering hos deponeringsinstitusjonen:

5. november 1997 (opprinnelig deponeringsdato)

Deponeringsnummer:

FERM BP-6266

Sequence ID No. 1

Sequence Length: 316

Sequence Type: amino acid

Strandedness: 1

Topology: linear

Molecule Type: protein

Sequence:

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

Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro Asp Ser Cys Arg Arg Met Lys Gln		
110	115	120
Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly		
125	130	135
Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala Met Met Glu Gly Ser Trp		
140	145	150
Leu Asp Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu Ala Gln Pro Phe Ala		
155	160	165
His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser His Lys		
170	175	180
Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile		
185	190	195
Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp		
200	205	210
Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu		
215	220	225
Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr		
230	235	240
Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met		
245	250	255
Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His		
260	265	270
Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly		
275	280	285

Glu Glu Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro

290

295

300

Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile

305

310

315

Asp

316

Sequence ID No. 2

Sequence Length: 1538

Sequence Type: nucleic acid

Strandedness: 1

Topology: linear

Molecule Type: cDNA to mRNA

Sequence:

```

GCCAGGACCT CTGTGAACCG GTCGGGGCGG GGGCCGCCTG GCCGGGAGTC TGCTCGGCGG 60
TGGGTGGCCG AGGAAGGGAG AGAACGATCG CGGAGCAGGG CGCCCGAACT CCGGGCGCCG 120
CGCCATGCGC CGGGCCAGCC GAGACTACGG CAAGTACCTG CGCAGCTCGG AGGAGATGGG 180
CAGCGGCCCC GCGGTCCCAC ACGAGGGTCC GCTGCACCCC GCGCCTTCTG CACCGGCTCC 240
GGCGCCGCCA CCGCCCGCCT CCGGCTCCAT GTTCCTGGCC CTCCTGGGGC TGGGACTGGG 300
CCAGGTGGTC TGCAGCATCG CTCTGTTCCCT GTACTTTCCA GCGCAGATGG ATCCTAACAG 360
AATATCAGAA GACAGCACTC ACTGCTTTTA TAGAATCCTG AGACTCCATG AAAACGCAGG 420
TTTGCAGGAC TCGACTCTGG AGAGTGAAGA CACACTACCT GACTCCTGCA GGAGGATGAA 480
ACAAGCCTTT CAGGGGGCCG TGCAGAAGGA ACTGCAACAC ATTGTGGGGC CACAGCGCTT 540
CTCAGGAGCT CCAGCTATGA TGGAAGGCTC ATGGTTGGAT GTGGCCACGC GAGGCAAGCC 600

```

TGAGGCCAG CCATTTGCAC ACCTCACCAT CAATGCTGCC AGCATCCCAT CGGGTTCCCA 660
TAAAGTCACT CTGTCCTCTT GGTACCACGA TCGAGGCTGG GCCAAGATCT CTAACATGAC 720
GTTAAGCAAC GGAAACTAA GGGTTAACCA AGATGGCTTC TATTACCTGT ACGCCAACAT 780
TTGCTTTCGG CATCATGAAA CATCGGAAG CGTACCTACA GACTATCTTC AGCTGATGGT 840
GTATGTCGTT AAAACCAGCA TCAAAATCCC AAGTTCTCAT AACCTGATGA AAGGAGGGAG 900
CACGAAAAAC TGGTCGGGCA ATTCTGAATT CCACTTTTAT TCCATAAATG TTGGGGGATT 960
TTTCAAGCTC CGAGCTGGTG AAGAAATTAG CATTGAGGTG TCCAACCCTT CCCTGCTGGA 1020
TCCGGATCAA GATGCGACGT ACTTTGGGGC TTTCAAAGTT CAGGACATAG ACTGAGACTC 1080
ATTTGCTGGA ACATTAGCAT GGATGTCCTA GATGTTTGA AACTTCTTAA AAAATGGATG 1140
ATGTCTATAC ATGTGTAAGA CTACTAAGAG ACATGGCCCA CGGTGTATGA AACTCACAGC 1200
CCTCTCTCTT GAGCCTGTAC AGGTGTGTA TATGTAAAGT CCATAGGTGA TGTTAGATTG 1260
ATGGTGATTA CACAACGGTT TTACAATTTT GTAATGATT CCTAGAATTG AACCAGATTG 1320
GGAGAGGTAT TCCGATGCTT ATGAAAACT TACACGTGAG CTATGGAAGG GGGTCACAGT 1380
CTCTGGGTCT AACCCTGGA CATGTGCCAC TGAGAACCTT GAAATTAAGA GGATGCCATG 1440
TCATTGCAAA GAAATGATAG TGTGAAGGGT TAAGTTCTTT TGAATTGTTA CATTGCGCTG 1500
GGACCTGCAA ATAAGTTCTT TTTTCTAAT GAGGAGAG 1538

Sequence ID No. 3

Sequence Length: 21

Sequence Type: nucleic acid

Strandedness: 1

Topology: linear

Molecule Type: other nucleic acid (synthetic DNA)

Sequence:

AAACGCAAAA AACCAGAAAG G

21

Sequence ID No. 4

Sequence Length: 17

Sequence Type: nucleic acid

Strandedness: 1

Topology: linear

Molecule Type: other nucleic acid (synthetic DNA)

Sequence:

GTAAAACGAC GGCCAGT

17

Sequence ID No. 5

Sequence Length: 17

Sequence Type: nucleic acid

Strandedness: 1

Topology: linear

Molecule Type: other nucleic acid (synthetic DNA)

Sequence:

CAGGAAACAG CTATGAC

17

Sequence ID No. 6

Sequence Length: 22

Sequence Type: nucleic acid

Strandedness: 1

Topology: linear

Molecule Type: other nucleic acid (synthetic DNA)

Sequence:

AAGCCCCAAA GTACGTCGCA TC

22

Sequence ID No. 7

Sequence Length: 26

Sequence Type: nucleic acid

Strandedness: 1

Topology: linear

Molecule Type: other nucleic acid (synthetic DNA)

Sequence:

CGAAGCTTTC GAGCGCAGAT GGATCC

26

Sequence ID No. 8

Sequence Length: 27

Sequence Type: nucleic acid

Strandedness: 1

Topology: linear

Molecule Type: other nucleic acid (synthetic DNA)

Sequence:

CCTCTAGAGT CTATGTCCTG AAGTTTG

27

Sequence ID No. 9

Sequence Length: 20

Sequence Type: nucleic acid

Strandedness: 1

Topology: linear

Molecule Type: other nucleic acid (synthetic DNA)

Sequence:

ATCAGAAGAC AGCACTCACT

20

Sequence ID No. 10

Sequence Length: 33

Sequence Type: nucleic acid

Strandedness: 1

Topology: linear

Molecule Type: other nucleic acid (synthetic DNA)

Sequence:

GGGGTCGACC TAGGACATCC ATGCTAATGT TCC 33

Sequence ID No. 11

Sequence Length: 317

Sequence Type: amino acid

Strandedness: 1

Topology: linear

Molecule Type: protein

Sequence:

Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Thr Lys Tyr Leu Arg Gly Ser Glu
 5 10 15
 Glu Met Gly Gly Gly Pro Gly Ala Pro His Glu Gly Pro Leu His Ala
 20 25 30
 Pro Pro Pro Pro Ala Pro His Gln Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met
 35 40 45
 Phe Val Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Val
 50 55 60
 Ala Leu Phe Phe Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Gly Thr His Cys Ile Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn
 85 90 95
 Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys Leu Ile
 100 105 110
 Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln
 115 120 125
 Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu Lys
 130 135 140
 Ala Met Val Asp Gly Ser Trp Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser Lys Leu
 145 150 155 160
 Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro
 165 170 175
 Ser Gly Ser His Lys Val Ser Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly
 180 185 190

Trp	Ala	Lys	Ile	Ser	Asn	Met	Thr	Phe	Ser	Asn	Gly	Lys	Leu	Ile	Val
	195						200						205		
Asn	Gln	Asp	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Asn	Ile	Cys	Phe	Arg	His
	210						215						220		
His	Glu	Thr	Ser	Gly	Asp	Leu	Ala	Thr	Glu	Tyr	Leu	Gln	Leu	Met	Val
225						230					235			240	
Tyr	Val	Thr	Lys	Thr	Ser	Ile	Lys	Ile	Pro	Ser	Ser	His	Thr	Leu	Met
						245					250			255	
Lys	Gly	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Trp	Ser	Gly	Asn	Ser	Glu	Phe	His	Phe
						260								270	
Tyr	Ser	Ile	Asn	Val	Gly	Gly	Phe	Phe	Lys	Leu	Arg	Ser	Gly	Glu	Glu
		275								280				285	
Ile	Ser	Ile	Glu	Val	Ser	Asn	Pro	Ser	Leu	Leu	Asp	Pro	Asp	Gln	Asp
		290								295				300	
Ala	Thr	Tyr	Phe	Gly	Ala	Phe	Lys	Val	Arg	Asp	Ile	Asp			
305								310						315	

Sequence ID No. 12

Sequence Length: 954

Sequence Type: nucleic acid

Strandedness: 1

Topology: linear

Molecule Type: cDNA to mRNA

Sequence:

```

ATGCGCCGCG CCAGCAGAGA CTACACCAAG TACCTGCGTG GCTCGGAGGA GATGGGCGGC 60
GGCCCCGGAG CCCCGCACGA GGGCCCCCTG CACGCCCCGC CGCCGCCTGC GCCGCACCAG 120
CCCCCTGCCG CCTCCCGCTC CATGTTCCGTG GCCCTCCTGG GGCTGGGGCT GGGCCAGGTT 180
GTCTGCAGCG TCGCCCTGTT CTTCTATTTC AGAGCGCAGA TGGATCCTAA TAGAATATCA 240
GAAGATGGCA CTCACTGCAT TTATAGAATT TTGAGACTCC ATGAAAATGC AGATTTTCAA 300
GACACAATC TGGAGAGTCA AGATACAAAA TTAATACCTG ATTCATGTAG GAGAATTAAA 360
CAGGCCTTTC AAGGAGCTGT GCAAAAGGAA TTACAACATA TCGTTGGATC ACAGCACATC 420
AGAGCAGAGA AAGCGATGGT GGATGGCTCA TGGTTAGATC TGGCCAAGAG GAGCAAGCTT 480
GAAGCTCAGC CTTTGTCTCA TCTCACTATT AATGCCACCG ACATCCCATC TGGTTCCCAT 540
AAAGTGAGTC TGTCCTCTTG GTACCATGAT CGGGGTGGG CCAAGATCTC CAACATGACT 600
TTTAGCAATG GAAACTAAT AGTTAATCAG GATGGCTTTT ATTACCTGTA TGCCAACATT 660
TGCTTTCGAC ATCATGAAAC TTCAGGAGAC CTAGCTACAG AGTATCTTCA ACTAATGGTG 720
TACGTCAC TA AAACCAGCAT CAAAATCCCA AGTTCTCATA CCCTGATGAA AGGAGGAAGC 780
ACCAAGTATT GGTCAGGGAA TTCTGAATTC CATTTTATT CCATAAACGT TGCTGGATTT 840
TTTAAGTTAC GGTCTGGAGA GGAAATCAGC ATCGAGGTCT CCAACCCCTC CTTACTGGAT 900
CCGGATCAGG ATGCAACATA CTTTGGGGCT TTAAAGTTC GAGATATAGA TTGA 954

```

Sequence ID No. 13

Sequence Length: 27

Sequence Type: nucleic acid

Strandedness: 1

Topology: linear

Molecule Type: other nucleic acid (synthetic DNA)

Sequence:

GGCGTACGCA GAGCGCAGAT GGATCCT**27**

Sequence ID No. 14

Sequence Length: 34

Sequence Type: nucleic acid

Strandedness: 1

Topology: linear

Molecule Type: other nucleic acid (synthetic DNA)

Sequence:

GGGGTCGACC ATCCAGGAAA TATCATAACA CTCC 34

Sequence ID No. 15

Sequence Length: 951

Sequence Type: nucleic acid

Strandedness: 1

Topology: linear

Molecule Type: cDNA to mRNA

Sequence:

```
ATGCGCCGGG CCAGCCGAGA CTACGGCAAG TACCTGCGCA GCTCGGAGGA GATGGGCAGC 60
GGCCCCGGCG TCCACACGA GGGTCCGCTG CACCCCGCGC CTTCTGCACC GGCTCCGGCG 120
CGGCCACCGG CCGCCTCCCG CTCCATGTTT CTGGCCCTCC TGGGGCTGGG ACTGGGCCAG 180
GTGGTCTGCA GCATCGCTCT GTTCCTGTAC TTTCGAGCGC AGATGGATCC TAACAGAATA 240
TCAGAAGACA GCACTCACTG CTTTTATAGA ATCCTGAGAC TCCATGAAAA CGCAGGTTTG 300
CAGGACTCGA CTCTGGAGAG TGAAGACACA CTACCTGACT CCTGCAGGAG GATGAAACAA 360
GCCTTTCAGG GGGCCCTGCA GAAGGAACTG CAACACATTG TGGGGCCACA GCGCTTCTCA 420
```

```

GGAGCTCCAG CTATGATGGA AGGCTCATGG TTGGATGTGG CCCAGCGAGG CAAGCCTGAG 480
GCCCAGCCAT TTGCACACCT CACCATCAAT GCTGCCAGCA TCCCATCGGG TTCCCATAAA 540
GTCACCTCTGT CCTCTTGGA CCACGATCGA GGCTGGGCCA AGATCTCTAA CATGACGTTA 600
AGCAACGGAA AACTAAGGGT TAACCAAGAT GGCTTCTATT ACCTGTACGC CAACATTTGC 660
TTTCGGCATC ATGAAACATC GGGAAGCGTA CCTACAGACT ATCTTCAGCT GATGGTGTAT 720
GTCGTAAAA CCAGCATCAA AATCCCAAGT TCTCATAACC TGATGAAAGG AGGGAGCAGG 780
AAAACTGGT CGGGCAATTC TGAATTCCAC TTTTATTCCA TAAATGTTGG GGGATTTTTC 840
AAGCTCCGAG CTGGTGAAGA AATTAGCATT CAGGTGTCCA ACCCTTCCCT GCTGGATCCG 900
GATCAAGATG CGACGTACTT TGGGGCTTTC AAAGTTCAGG ACATAGACTG A 951

```

Sequence ID No. 16

Sequence Length: 244

Sequence Type: amino acid

Strandedness: 1

Topology: linear

Molecule Type: protein

Sequence:

Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser Glu Asp Ser Thr His Cys Phe

1 5 10 15

Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn Ala Gly Leu Gln Asp Ser Thr

20 25 30

Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro Asp Ser Cys Arg Arg Met Lys Gln

35 40 45

Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Pro
 50 55 60
 Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala Met Met Glu Gly Ser Trp Leu Asp
 65 70 75 80
 Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr
 85 90 95
 Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser
 100 105 110
 Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu
 115 120 125
 Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr
 130 135 140
 Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr
 145 150 155 160
 Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile
 165 170 175
 Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser
 180 185 190
 Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe
 195 200 205
 Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser
 210 215 220
 Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val
 225 230 235 240

Gln Asp Ile Asp

Sequence ID No. 17

Sequence Length: 246

Sequence Type: amino acid

Strandedness: 1

Topology: linear

Molecule Type: protein

Sequence:

Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser Glu Asp Gly Thr His Cys Ile

1 5 10 15

Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr

20 25 30

Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys Leu Ile Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile

35 40 45

Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val

50 55 60

Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu Lys Ala Met Val Asp Gly Ser Trp

65 70 75 80

Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser Lys Leu Glu Ala Gln Pro Phe Ala His

85 90 95

Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Ser

100 105 110

Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met

115	120	125
Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu Ile Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr		
130	135	140
Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr Ser Gly Asp Leu		
145	150	155
Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Thr Lys Thr Ser Ile		
165	170	175
Lys Ile Pro Ser Ser His Thr Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys Tyr		
180	185	190
Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly		
195	200	205
Phe Phe Lys Leu Arg Ser Gly Glu Glu Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn		
210	215	220
Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe		
225	230	235
Lys Val Arg Asp Ile Asp		240
245		

Sequence ID No. 18

Sequence Length: 735

Sequence Type: nucleic acid

Strandedness: 1

Topology: linear

Molecule Type: cDNA to mRNA

Sequence:

GCGCAGATGG ATCCTAACAG AATATCAGAA GACAGCACTC ACTGCTTTTA TAGAATCCTG 60
AGACTCCATG AAAACGCAGG TTTGCAGGAC TCGACTCTGG AGAGTGAAGA CACACTACCT 120
GACTCCTGCA GGAGGATGAA ACAAGCCTTT CAGGGGGCCG TGCAGAAGGA ACTGCAACAC 180
ATTGTGGGGC CACAGCGCTT CTCAGGAGCT CCAGCTATGA TGAAGGCTC ATGGTTGGAT 240
GTGGCCCAGC GAGGCAAGCC TGAGGCCAG CCATTTGCAC ACCTCACCAT CAATGCTGCC 300
AGCATCCCAT CGGGTTCCCA TAAAGTCACT CTGTCCTCTT GGTACCACGA TCGAGGCTGG 360
GCCAAGATCT CTAACATGAC GTTAAGCAAC GGAAACTAA GGGTTAACCA AGATGGCTTC 420
TATTACCTGT ACGCCAACAT TTGCTTTCGG CATCATGAAA CATCGGAAG CGTACCTACA 480
GACTATCTTC AGCTGATGGT GTATGTCGTT AAAACCAGCA TCAAAATCCC AAGTTCTCAT 540
AACCTGATGA AAGGAGGGAG CACGAAAAAC TGGTCGGCA ATTCTGAATT CCACTTTTAT 600
TCCATAAATG TTGGGGGATT TTTCAAGCTC CGAGCTGGTG AAGAAATTAG CATTGAGGTG 660
TCCAACCCTT CCCTGCTGGA TCCGGATCAA GATGCCACGT ACTTTGGGGC TTTCAAAGTT 720
CAGGACATAG ACTGA 735

Sequence ID No. 19

Sequence Length: 741

Sequence Type: nucleic acid

Strandedness: 1

Topology: linear

Molecule Type: cDNA to mRNA

Sequence:

GCGCAGATGG ATCCTAATAG AATATCAGAA GATGGCACTC ACTGCATTTA TAGAATTTTG 60
AGACTCCATG AAAATGCAGA TTTTCAAGAC ACAACTCTGG AGAGTCAAGA TACAAAATTA 120

ATACCTGATT CATGTAGGAG AATTAAACAG GCCTTTCAAG GAGCTGTGCA AAAGGAATTA 180
CAACATATCG TTGGATCACA GCACATCAGA GCAGAGAAAG CGATGGTGGG TGGCTCATGG 240
TTAGATCTGG CCAAGAGGAG CAAGCTTGAA GCTCAGCCTT TTGCTCATCT CACTATTAAT 300
GCCACCGACA TCCCATCTGG TTCCCATAAA GTGAGTCTGT CCTCTTGGTA CCATGATCGG 360
GGTTGGGCCA AGATCTCCAA CATGACTTTT AGCAATGGAA AACTAATAGT TAATCAGGAT 420
GGCTTTTATT ACCTGTATGC CAACATTTGC TTTCGACATC ATGAAACTTC AGGAGACCTA 480
GCTACAGAGT ATCTTCAACT AATGGTGTAC GTCATAAAA CCAGCATCAA AATCCCAAGT 540
TCTCATACCC TGATGAAAGG AGGAAGCACC AAGTATTGGT CAGGGAATTC TGAATTCCAT 600
TTTTATTCCA TAAACGTTGG TGGATTTTTT AAGTTACGGT CTGGAGAGGA AATCAGCATC 660
GAGGTCTCCA ACCCCTCCTT ACTGGATCCG GATCAGGATG CAACATACTT TGGGGCTTTT 720
AAAGTTCGAG ATATAGATTG A 741

P a t e n t k r a v

1. Anvendelse av et antistoff for fremstilling av et medikament til behandlingen av benmetabolismeunormalhet, der antistoffet er rettet mot et protein som en aktiv komponent, der proteinet har de følgende fysiokjemiske karakteristika og biologiske aktivitet:

(a) (affinitet: binder spesifikt til osteoklastogenese-inhibitorisk faktor (OCIF) og oppviser høy affinitet for OCIF med en dissosiasjonskonstant på cellemembran: $K_d = 10^{-9}$ M eller mindre,

(b) molekylvekt: har en molekylvekt på 30 000 - 40 000 når denne blir målt ved å benytte SDS-polyakrylamidgelelektroforese ved ikke-reduserende betingelser og en tilsynelatende molekylvekt på 90 000 - 110 000 når det er kryssbundet til en monomer type OCIF og

c) biologisk aktivitet: oppviser aktivitet som understøtter eller fremmer osteoklastdifferensiering og -modning i et samkultursystem med osteoblastiske stromaceller og miltceller i nærvær av slike stimulerende faktorer for benresorpsjon som aktiv-form vitamin D_3 og paratyroidhormon (PTH).

2. Anvendelse av et antistoff ifølge krav 1, der benmetabolismeunormalheten er en sykdom som er valgt fra gruppen som består av osteoporose, hyperkalsemi, Pagets sykdom, nyreosteodystrofi, reumatoid artritt og osteoartritt.

1 / 17

FIG.1

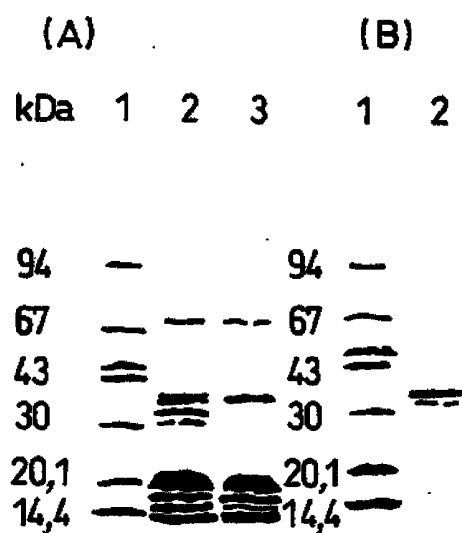
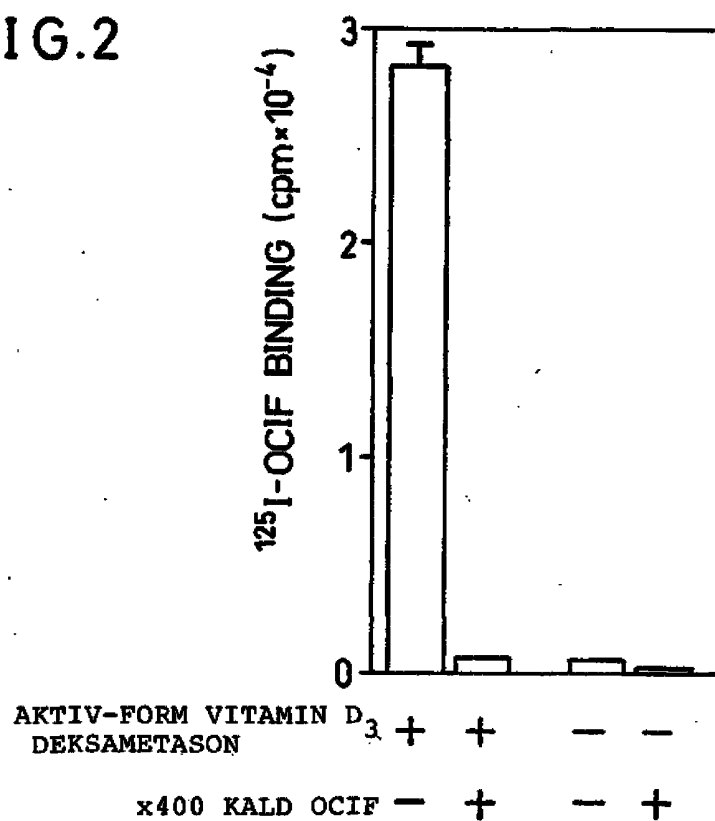


FIG.2



2/17

FIG.3

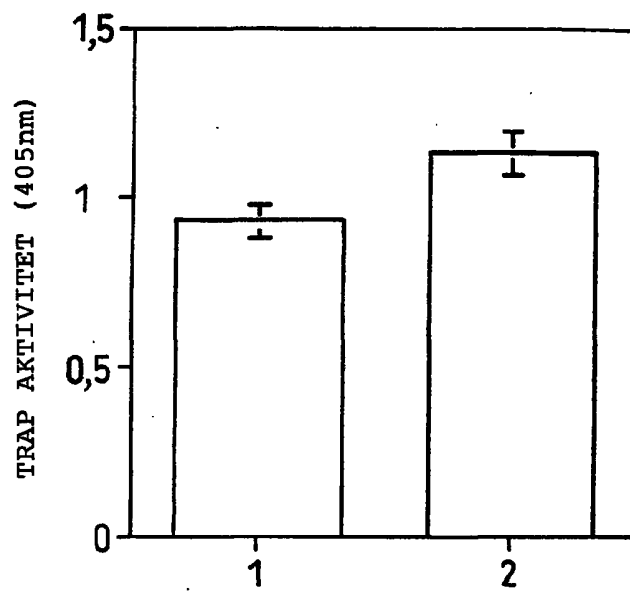
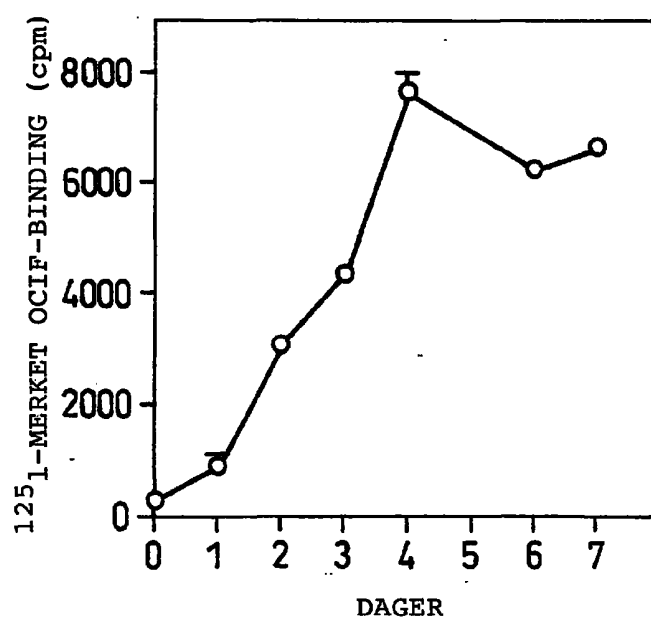


FIG.4



3 / 17

FIG.5

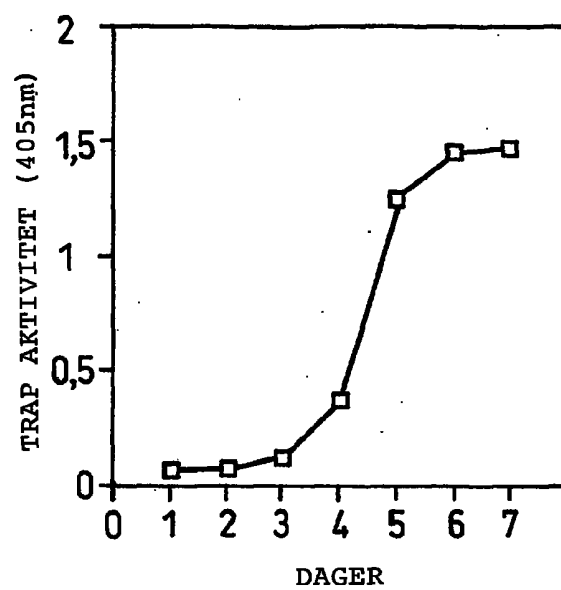
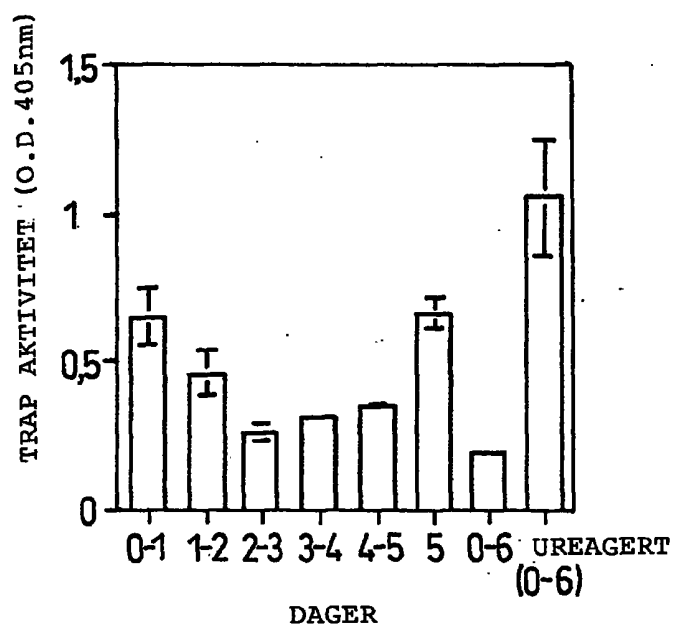


FIG.6



4 / 17

FIG.7

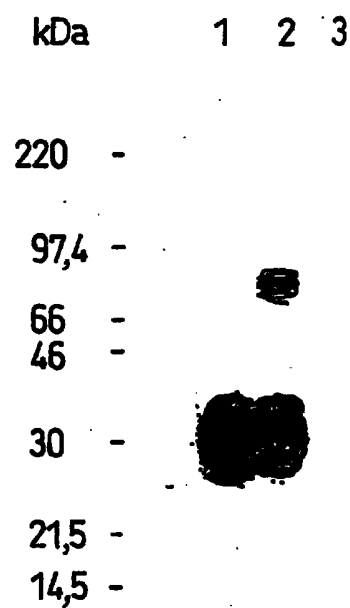
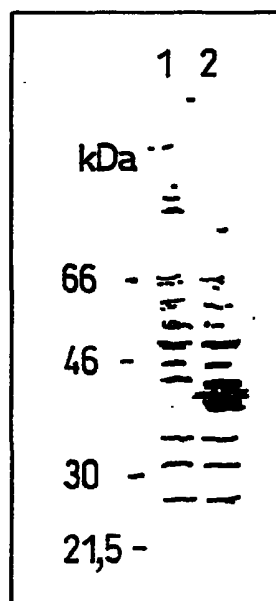


FIG.8



5/17

FIG.9

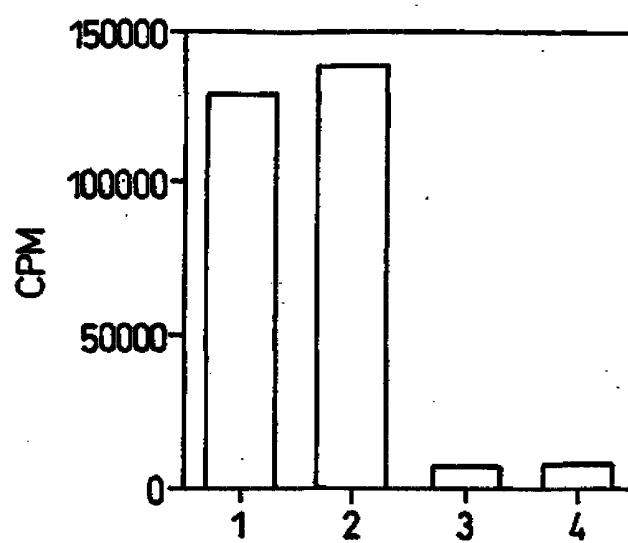


FIG.10

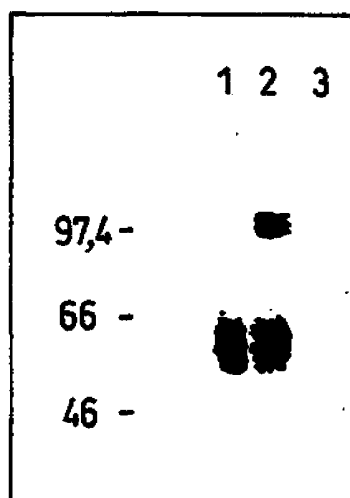


FIG.11



FIG.12

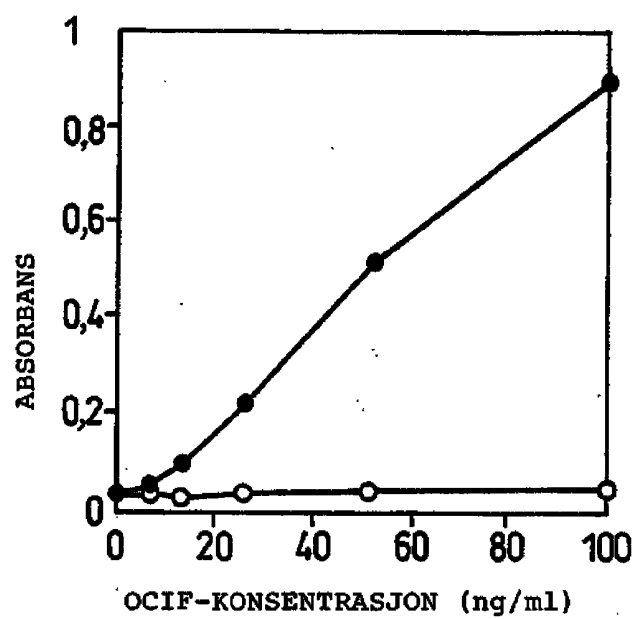


FIG.13

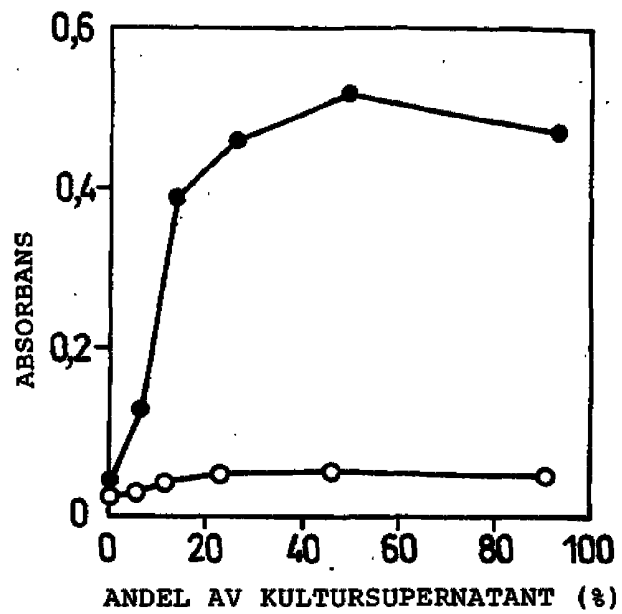


FIG.14

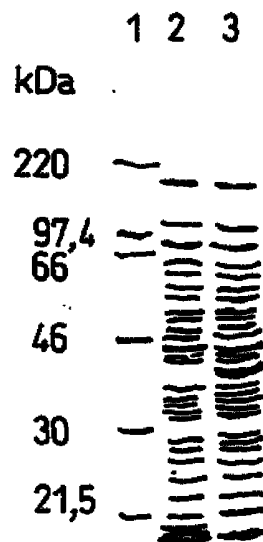


FIG.15

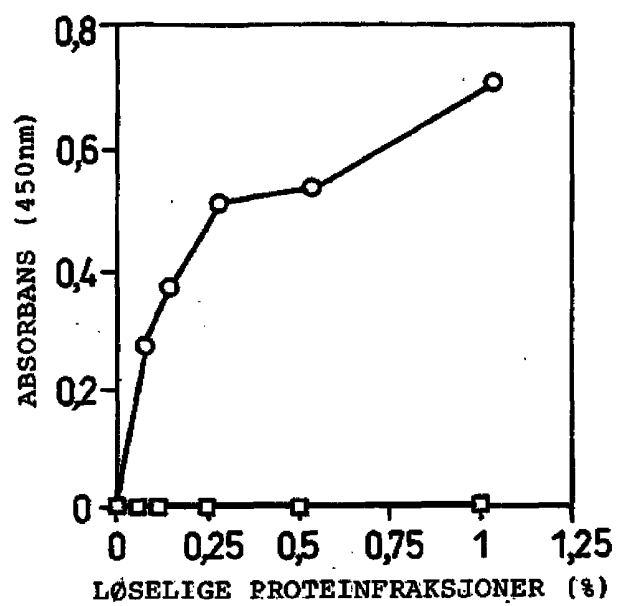


FIG.16

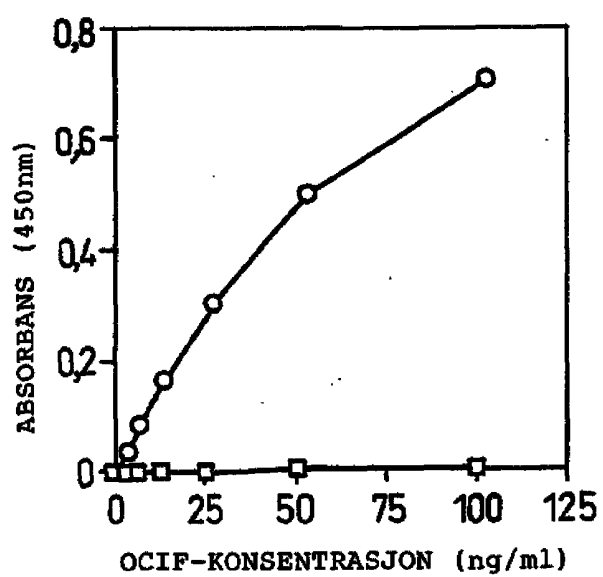


FIG. 17

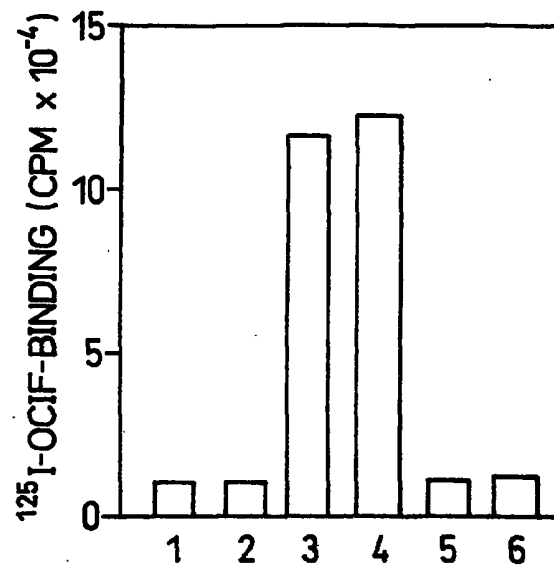


FIG. 18

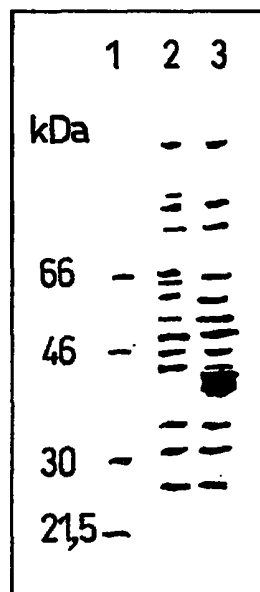


FIG.19

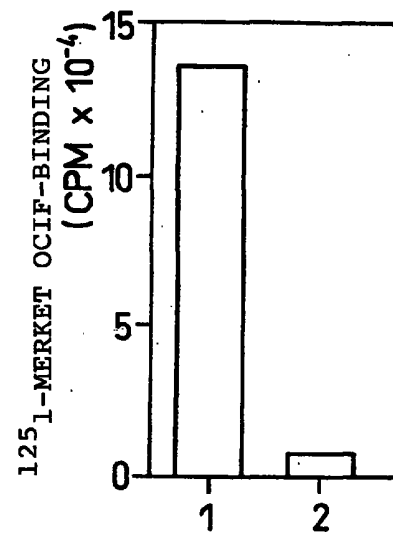


FIG.20

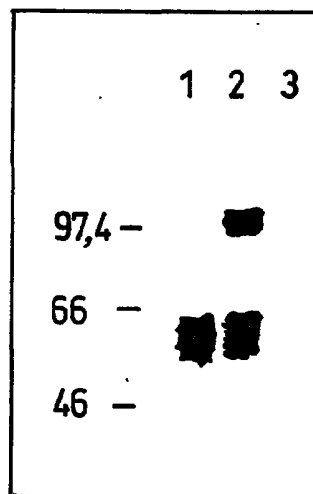


FIG.21

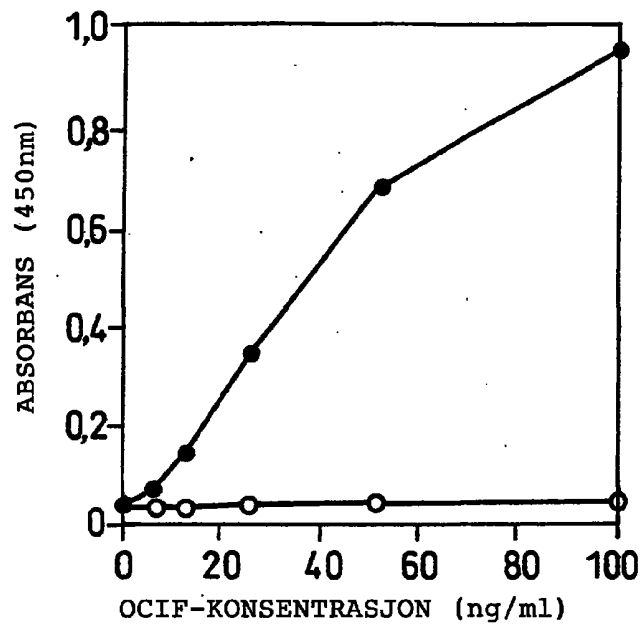
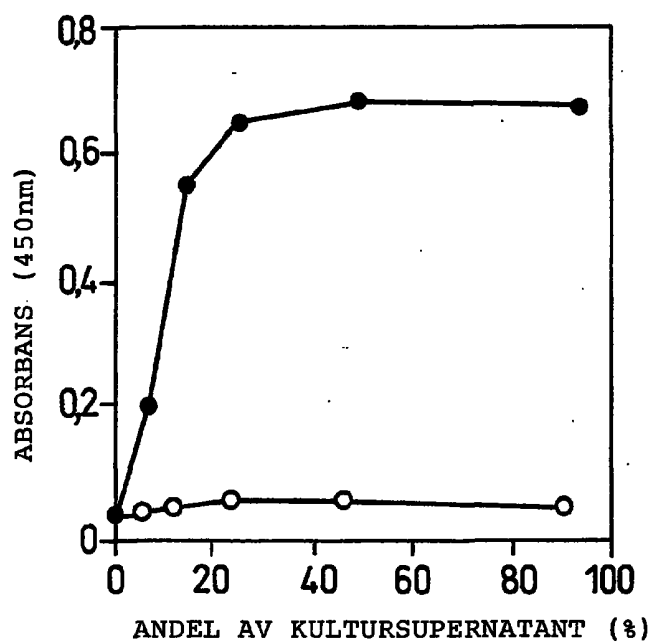


FIG.22



12 / 17

FIG. 23

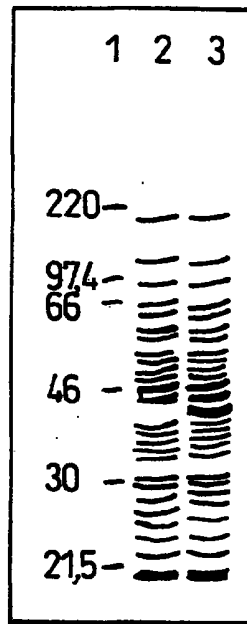


FIG. 24

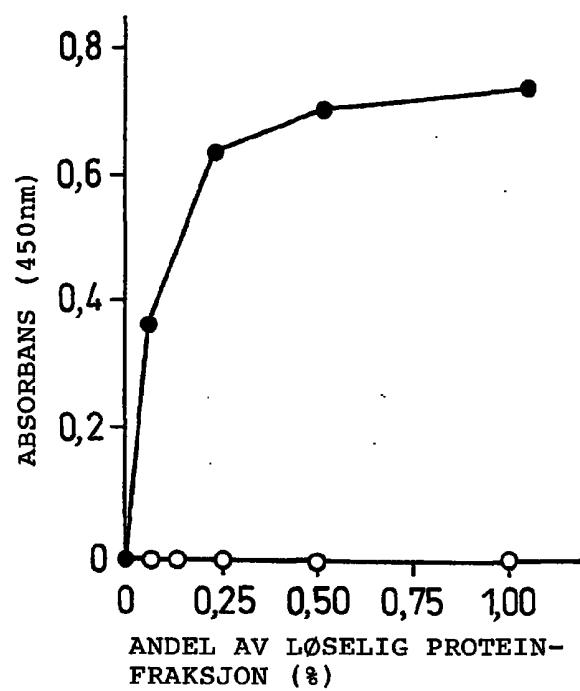


FIG. 25

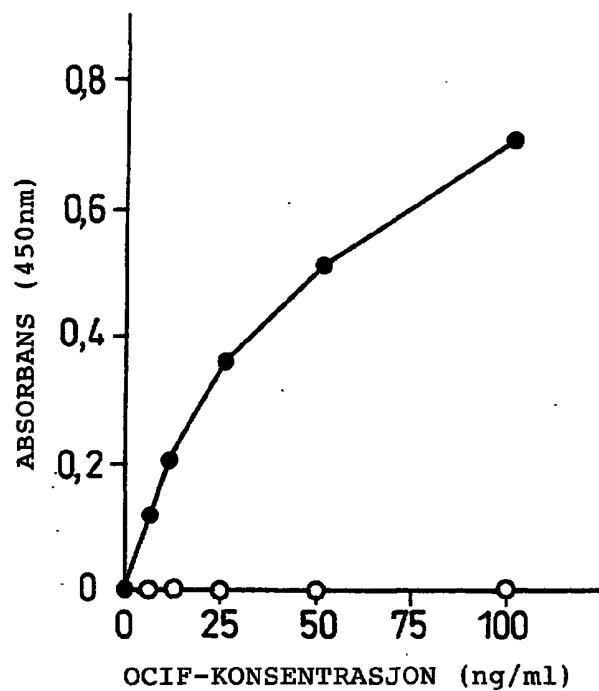


FIG. 26

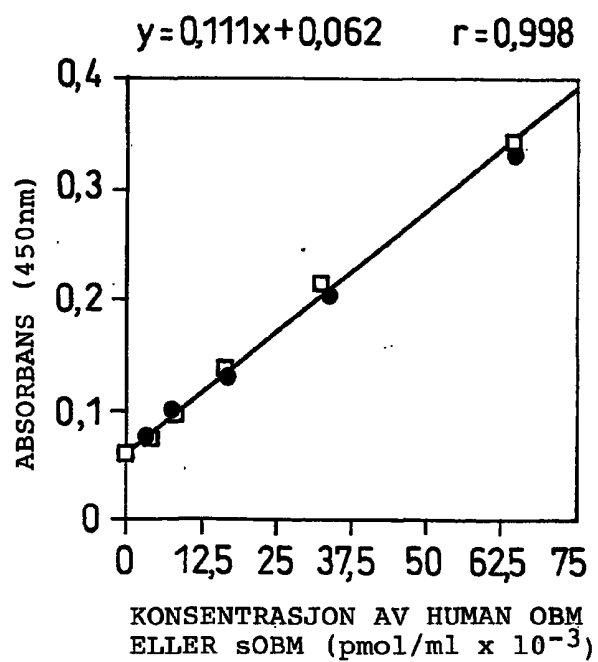


FIG. 27

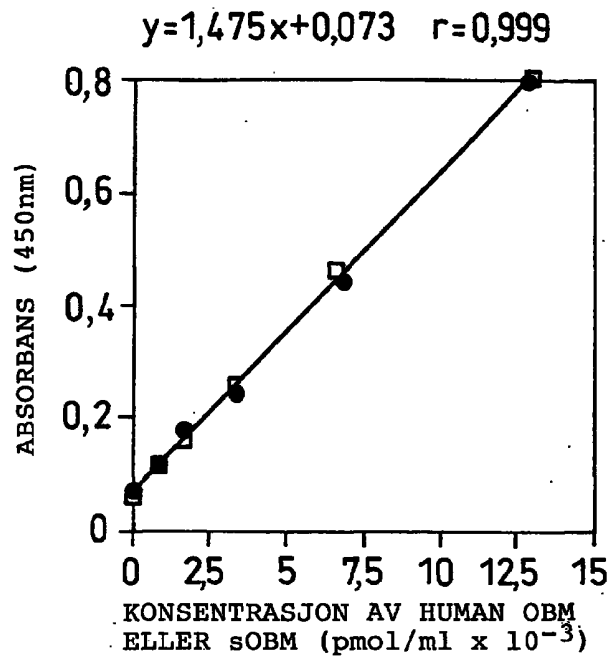


FIG. 28

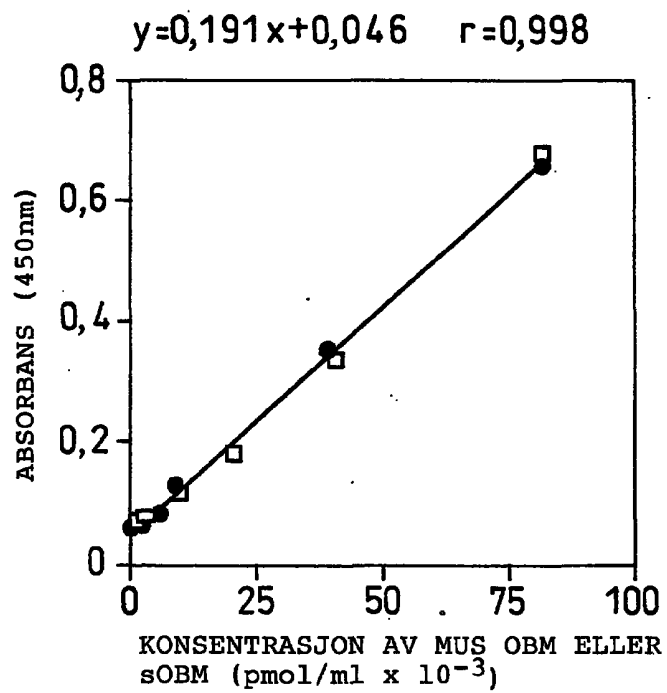


FIG. 29

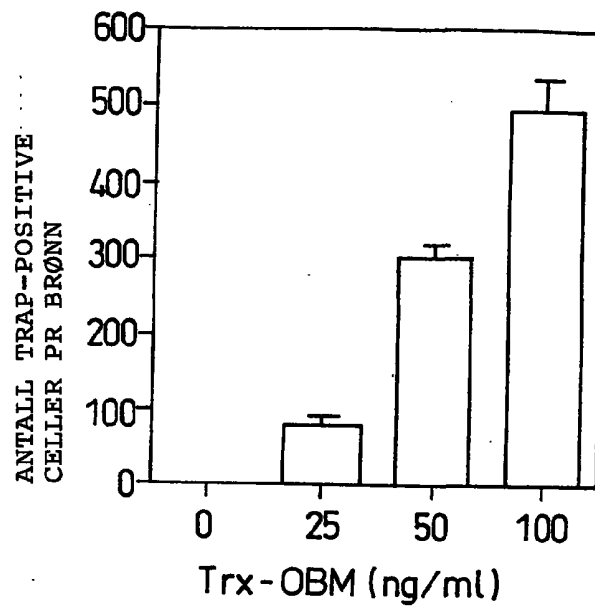


FIG. 30

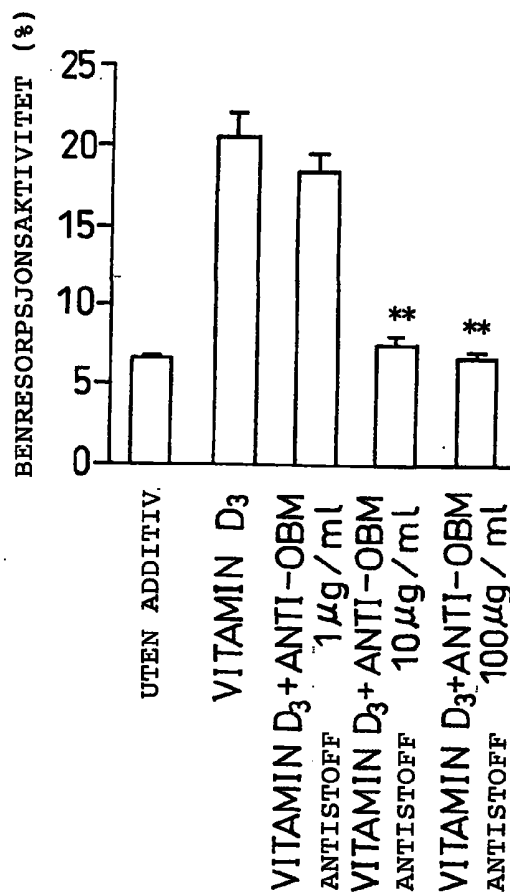


FIG.31

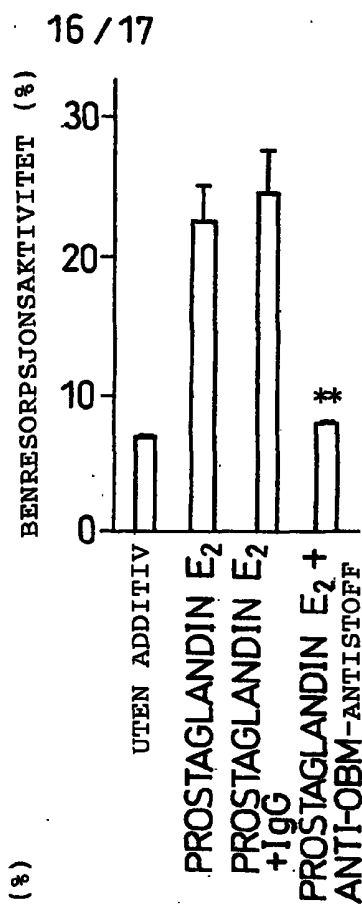


FIG.32

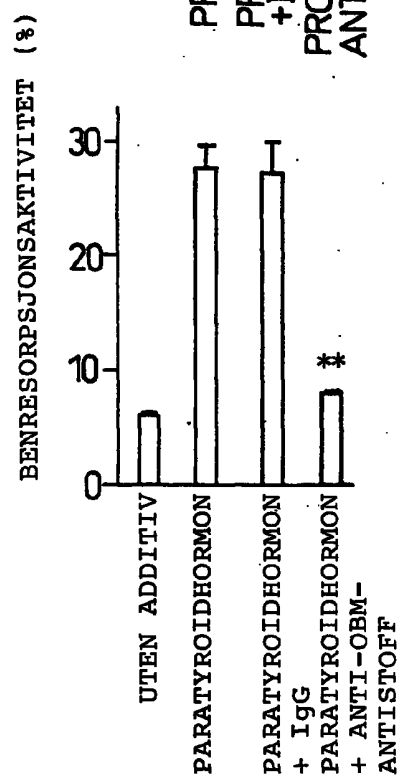


FIG. 33

