

RO 122495 B1

1 Prezenta invenție se referă la utilizarea unui anticorp sau fragment al acestuia, în
tratamentul sau prevenirea unei boli a oaselor. De asemenea, se referă la polipeptide care
3 sunt implicate în diferențierea osteoclastelor. Mai special, invenția se referă la proteine de
legare osteoprotectoare, acizi nucleici care codifică proteinele, vectori de expresie și celule
5 pentru producerea proteinelor și teste de legare. De asemenea, se descriu compoziții și
metode pentru tratamentul bolilor osului, cum ar fi osteoporoza, pierdere de os de la artrite,
7 boala lui Paget și hipercalcemia. Invenția se referă, de asemenea, la receptori pentru pro-
teine de legare a osteoprotectoarei și metode și compoziții pentru tratamentul bolilor osului
9 folosind receptori.

Este cunoscut faptul că, țesutul osos viu prezintă un echilibru dinamic între depu-
11 nerea și resorpția osului. Aceste procese sunt mediate primar prin două tipuri de celule:
osteoblaste, care secretă molecule care conțin matricea organică a osului; și osteoclaste,
13 care promovează dizolvarea matricei osului și solubilizarea sărurilor osului. La indivizii tineri
cu creșterea osului, viteza de depozitare a osului depășește viteza de resorbție a osului, în
15 timp ce la indivizii mai în vârstă raportul resorbției poate depăși depozitarea. În ultima
situație, descompunerea crescută a osului conduce la o masă și o rezistență redusă a osului,
17 risc crescut al fracturilor și vindecarea încetă sau incompletă a oaselor rupte.

Osteoclastele sunt celule multinucleate fagocitare mari care formează celule
19 precursorare hematopoietice în măduva osului. Cu toate că creșterea și formarea osteo-
clastelor funcționale mature nu sunt bine înțelese, se crede că osteoclastele se maturizează
21 de-a lungul liniei monocit/celulă macrofag în răspunsul expunerii la diferiți factori creștere-
promovare. Dezvoltarea timpurie a celulelor precursorare din măduva osului până la
23 preosteoclaste se crede că este mediată de către factori solubili cum ar fi factorul- α de
necroză a tumorii (TNF- α) factorul- β de necroză a tumorii (TNF- β), interleukina-1 (IL-1),
25 interleukina-4 (IL-4), interleukina-6 (IL-6) și factorul de inhibare a leucemiei (LIF). În cultură,
preosteoclastele se formează în prezența factorului de stimulare a coloniei macrofage (M-
27 CSF). Acești factori acționează inițial în etapele timpurii ale dezvoltării osteoclastice.
Implicarea factorilor polipeptidici în etapele finale ale formării osteoclastice nu s-a expus pe
29 larg. Totuși, s-a raportat că hormonul paratiroid stimulează formarea și activitatea osteroc-
clastelor și că, calcitocina are efect opus, deși la o extindere mai mică.

31 Recent, a fost descris un nou factor polipeptidic, denumit osteoprotecterină (OPG)
care reglează negativ formarea osteoclastelor *in vitro* și *in vivo* (vezi cererile **US 08/577788**
33 **deus în 22 decembrie 1995, 08/706945** **deus în 3 septembrie 1996 și 08/771777**, **deus**
în 20 decembrie 1996, încorporate aici prin referire; și cererea PCT WO 96/26271). OPG
35 crește brusc densitatea osului la șoareci transgenici care exprimă polipeptidă OPG și reduce
extinderea pierderii de os când se administrează la șobolani ovariectomizați. O analiză a
37 activității OPG în formarea osteoclastelor *in vitro* arată că OPG nu interfera cu creșterea și
diferențierea precursorilor monocit/macrofag, dar mai probabil împiedică diferențierea osteo-
39 clastelor de la precursori monocit/macrofag. Astfel, OPG pare a avea specificitate în reglarea
extinderii formării osteoclastului.

41 OPG cuprinde două domenii polipeptidice având proprietăți structurale și funcționale
diferite. Domeniul amino-terminal cuprinzând aproximativ resturile 22-194 ale polipeptidei de
43 lungime întreagă (metionina N-terminală este denumită rest 1) prezintă omologie față de alți
membri ai familiei receptorului factorului necrozei tumorale (TNFR), mai ales TNFR-2, prin
45 conservarea domeniilor bogate în cisteină caracteristice membrilor familiei TNFR. Domeniul
carboxi terminal cuprinzând resturile 194-401 au omologie nesemnificativă față de oricare
47 din secvențele cunoscute. Spre deosebire de un număr de alți membri ai familiei TNFR, OPG
pare a fi în mod exclusiv o proteină și nu pare a fi sintetizată ca o formă asociată membranei.

RO 122495 B1

Pe baza activității sale ca reglator negativ al formării osteoclastului, se postulează că OPG se poate lega la un factor polipeptidă implicat în diferențierea osteoclastului și drept urmare împiedică una sau mai multe etape terminale ale formării unui osteoclast matur.	1 3
Problema pe care o rezolvă invenția constă în utilizarea unui anticorp sau fragment al acestuia pentru prepararea unui medicament pentru prevenirea sau tratamentul unei boli a oaselor în care anticorpul se leagă la o proteină de legare a osteoprotegerinei (OPGbp) din SECV. ID. NR.: 4 și este un antagonist al OPGbp.	5 7
Înainte de asta există un obiect al invenției pentru identificarea polipeptidelor care interacționează cu OPG. Numitele polipeptide pot juca un rol în maturizarea osteoclastului și pot fi utile în tratamentul bolilor osului.	9
Un nou membru al familiei factorului necrozei tumorale a fost identificat de la o bancă de ADNc murin exprimat în celule COS cercetate, folosind o proteină recombinantă de fuziune OPG-Fc ca o sondă de afinitate. Polipeptida nouă este o proteină de legare OPG transmembranar care, se anticipează, a avea 316 aminoacizi în lungime și are un domeniu citoplasmic amino terminal, un domeniu transmembranar și un domeniu extracelular carboxi terminal. Proteinele de legare OPG ale invenției pot fi asociate membranei sau pot fi în formă solubilă.	11 13 15 17
Invenția prezintă acizii nucleici care codifică o proteină de legare OPG, vectori și celule gazdă care exprimă polipeptida și metoda pentru producerea proteinei de legare a OPG recombinant. Se asigură, de asemenea, anticorpi sau fragmentele acestora care leagă specific proteina de legare OPG.	19 21
Proteine de legare OPG se pot folosi în teste pentru nivelurile cantitative OPG în probe biologice, identificarea celulelor și țesuturilor care prezintă proteină de legare OPG și identificarea de noi OPG și membri ai familiei proteinei de legare OPG. Se asigură, de asemenea, metode de identificare a compușilor care interacționează cu proteina de legare OPG. Astfel de compuși includ acizi nucleici, peptide, proteine, hidrați, lipide sau molecule organice cu greutate moleculară mică și pot acționa fie ca agoniști, fie ca antagoniști ai activității proteinei de legare OPG.	23 25 27
Proteinele de legare OPG sunt implicate în diferențierea osteoclastului și nivelul activității osteoclastului modulează în schimb resorbția osului. Agoniștii și antagoniștii proteinei de legare OPG modulează formarea osteoclastului și resorbția osului și se pot folosi pentru a trata bolile osului caracterizate prin schimbări în resorbția osului, cum ar fi osteoporoza, hipercalemia, pierderea osului datorită metastazei artritice, imobilizarea sau boala periodontală, boala lui Paget, osteopetroza, slăbirea protezei și altele asemenea. Compoziții farmaceutice care cuprind proteine de legare OPG și agoniști și antagoniști ai proteinei de legare OPG sunt cuprinse, de asemenea, în invenție.	29 31 33 35
Au fost identificați, de asemenea, receptorii pentru proteine de legare OPG de la o bancă ADNc murin construită din celule de măduvă osoasă care se leagă la o proteină de legare OPG marcată fluorescent. Receptorii se pot folosi pentru a identifica agoniști și antagoniști ai interacțiunilor proteinei de legare OPG cu receptorul său care poate fi folosit pentru tratarea bolii osului.	37 39 41
Invenția prezintă o polipeptidă denumită ca o proteină de legare OPG, care leagă specific OPG și este implicată în diferențierea osteoclastului. O clonă ADNc care codifică forma murină a polipeptidei s-a identificat de la o bancă preparată de la o linie 32-D de celule mielomonocitice de șoarece și transfectate în celule COS. Transfectanții se studiază pentru capacitatea lor de a se lega la o polipeptidă de fuziune OPG[22-201] (Exemplul 1). Secvența de acid nucleic arată că proteina de legare OPG este un membru nou al familiei TNF și este mult mai înrudită cu AGP-1, o polipeptidă descrisă anterior în cererea U.S. seria nr. 08/660.652 , depusă în 7 iunie 1996. (O polipeptidă identică AGP-1 și denumită TRAIL a fost	43 45 47 49

RO 122495 B1

1 descrisă de Wiley și colab., Immunity 3, 673-682 (1995)). Proteina de legare OPG se antici-
pează a fi o proteină transmembranară de tip II având un domeniu citoplasmic la capătul
3 amino terminal, un domeniu transmembranar și un domeniu extracelular carboxi terminal (fig.
1). Domeniul citoplasmic amino terminal cuprinde aproximativ 1-48 resturi, domeniul trans-
5 membranar conține aproximativ 49-69 resturi și domeniul extracelular cuprinde aproximativ
70-316 resturi așa cum se arată în fig. 1. (SECV. ID NR.: 2). Proteina asociată membranei
7 leagă specific OPG (fig. 2). Proteina de legare OPG și OPG prezintă multe caracteristici ale
unei perechi receptor-ligand cu toate că este posibil să existe alți receptori întâlniți natural
9 pentru proteina de legare OPG.

O clonă ADN care codifică proteina de legare OPG umană s-a izolat de la o bancă
11 ADNc a nodulului limfatic. Secvența umană (fig. 4) este omologă la secvența murină.
Proteina de legare OPG murină solubilă purificată a stimulat formarea osteoclastului *in vitro*
13 și a indus hipercalemia și resorbția osului *in vivo*.

Proteina de legare OPG se referă la o polipeptidă având o secvență aminoacidă a
15 proteinei de legare OPG mamifere, sau un fragment analog, sau derivat al acestuia și având
cel puțin activitatea OPG de legare. În realizări preferate, proteina de legare OPG este de
17 origine murină sau umană. În altă realizare, proteina de legare OPG este o proteină solubilă
având, într-o formă, un domeniu extracelular izolat separat din domeniile citoplasmic și
19 transmembranar. Proteina de legare OPG este implicată în diferențierea osteoclastului și în
ritmul și extinderea resorbției osului și s-a găsit că stimulează formarea osteoclastului și
21 stimulează resorbția măduvei.

Acizi nucleici

23 Invenția asigură acizi nucleici izolați care codifică proteine de legare OPG. Așa cum
s-a folosit aici, termenul acid nucleic cuprinde ADNc, ADN genomic, ADN total sau parțial
25 sintetic și ARN. Acizii nucleici ai invenției se aleg din grupul care constă din:

a) acizii nucleici așa cum se arată în fig. 1 (SECV. ID NR: 1) și fig. 4 (SECV. ID
27 NR: 3);

b) acizi nucleici care hibridizează la regiunile de codificare ale polipeptidei acizilor
29 nucleici arătate în fig. 1 (SECV. ID NR: 1) și fig. 4 (SECV. ID NR: 3); și rămân hibridizați la
acizii nucleici în condiții de stringență ridicată; și

31 c) acizi nucleici care degenerază până la acizii nucleici ai (a) sau (b).

Hibridizările de acid nucleic implică tipic un procedeu multi-etapă care cuprinde o
33 primă etapă de hibridizare pentru a forma duplexuri de acid nucleic de la tulpini simple,
urmată de o a doua etapă de hibridizare realizată în condiții mai stringente pentru a reține
35 selectiv duplexurile de acid nucleic care au omologia dorită. Condițiile primei etape de hibri-
dizare în general nu sunt critice, cu condiția că ele să nu fie de stringență mai mare decât
37 a doua etapă de hibridizare. În general, a doua hibridizare se realizează în condiții de tempe-
ratură și sare care sunt cu aproximativ 12...20°C sub temperatura de topire (T_m) a unui hibrid
39 perfect a unei părți sau a tuturor tulpinilor complementare care corespund fig. 1 (SECV. ID
NR: 2) și fig. 4 (SECV. ID NR: 4). Într-o realizare, condiții de "stringență ridicată" se referă
41 la condiții de aproximativ 65°C și nu mai mult decât aproximativ 1M Na⁺. Se înțelege că,
concentrația de sare, temperatura și/sau lungimea incubării pot varia fie în prima, fie în a
43 doua etapă de hibridizare astfel încât să se obțină moleculele de acid nucleic care hibri-
dizează conform invenției. Condițiile de hibridizare ale acizilor nucleici și calculările T_m pentru
45 hibridii de acid nucleic sunt descrise în Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory
Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989).

RO 122495 B1

Acizii nucleici ai invenției pot hibridiza la o parte sau la întreaga polipeptidă care 1
codifică regiuni ale proteinei de legare OPG așa cum se arată în fig. 1 (SECV. ID NR: 2) și 3
fig. 4 (SECV. ID NR: 4); și în consecință pot fi trunchieri sau extensii ale secvențelor de acizi 3
nucleici arătate aici. Acizi nucleici trunchiați sau extinși sunt cuprinși de invenție cu condiția 5
că ei păstrează cel puțin proprietatea OPG de legare. Într-o realizare, acidul nucleic va 5
codifica o polipeptidă de cel puțin aproximativ 10 aminoacizi. În altă realizare, acidul nucleic 7
va codifica o polipeptidă de cel puțin aproximativ 20 aminoacizi. Într-o altă realizare, acidul 7
nucleic va codifica o polipeptidă de cel puțin aproximativ 50 aminoacizi. Acizii nucleici care 9
hibridizează pot include de asemenea secvențe care nu codifică localizate 5' și/sau 3' la 9
regiunile care codifică proteina de legare OPG. Secvențele care nu codifică includ regiuni 11
de reglare implicate în expresia proteinei de legare OPG, cum ar fi promotori, regiuni de 11
intensificare, situri de inițiere translațională, situri de terminare a transcripției și altele de felul 13
acesta. 13

În realizări preferate, acizii nucleici ai invenției codifică proteina de legare OPG de 15
șoarece sau umană. Acizii nucleici pot codifica o formă de legare membrană a proteinei de 15
legare OPG sau forme solubile cărora le lipsește o regiune transmembranară funcțională. 17
Regiunea transmembranară anticipată pentru proteina de legare OPG murină include 49-69 17
inclusiv resturi aminoacide așa cum se arată în fig. 1 (SECV. ID NR: 1). Regiunea trans- 19
membranară anticipată pentru proteina de legare OPG umană include 49-69 resturi amino- 19
acide așa cum se arată în fig. 4 (SECV. ID NR: 3). Substituțiile care înlocuiesc resturile 21
aminoacide hidrofobe în această regiune cu resturi aminoacide hidrofile sunt de așteptat să 21
distrugă asocierea membranară și au drept rezultat proteina de legare OPG. Suplimentar, 23
delețiile unei părți sau a întregii regiuni transmembranare de asemenea, sunt de așteptat să 23
producă forme solubile ale proteinei de legare OPG. Acizii nucleici care codifică resturile 25
aminoacide 70-316 așa cum se arată în fig. 1 (SECV. ID NR: 1), sau fragmente sau analogi 25
ai acestora, cuprind proteine de legare OPG solubile. 25

De asemenea, sunt incluși acizi nucleici care codifică forme trunchiate ale proteinelor 27
de legare OPG umane solubile. Formele solubile includ 69-317 resturi așa cum se arată în 27
fig. 4 (SECV. ID NR: 3) și trunchierile acestora. Într-o realizare, trunchierile N-terminale 29
generază polipeptide din resturi, 70-317, 71-317, 72-317 și așa mai departe. În altă realizare, 31
acizii nucleici codifică OPGbp solubil care cuprind resturile 69-317 și trunchierile N-terminale 31
ale acestora până la OPGbp [158-317], sau alternativ, până la OPGbp [166-317]. 31

Plasmidul phuOPGbp 1.1 în tulpina DH10 *E. coli* care codifică proteina de legare OPG 33
umană s-a depozitat în Colecția Americană de Tipuri de Culturi, Rockville, MD pe 13 35
iunie 1997. 35

Secvențele de acid nucleic ale invenției se pot folosi pentru detectarea secvențelor 37
care codifică proteina de legare OPG în probe biologice. În special, secvențele se pot folosi 37
pentru a studia băncile de cADN și genomice pentru secvențe de proteină de legare OPG 39
înrudite, în special a celor de la alte specii. Acizii nucleici sunt utili de asemenea, pentru 39
modelarea nivelurilor proteinei de legare OPG prin tehnologie anti-sens sau expresia genei 41
in vivo. Dezvoltarea animalelor transgenice care exprimă proteina de legare OPG este utilă 41
pentru producerea polipeptidei și pentru studiul activității biologice *in vivo*. 41

Vectori și celule gazdă 43

Acizii nucleici conform invenției se vor lega cu secvențe ADN astfel încât să exprime 45
proteina de legare OPG biologic activă. Secvențe necesare pentru expresie sunt cunoscute 45
specialiștilor în domeniu și includ promotori și secvențe de intensificare pentru inițierea 47
sintezei ARN, situri de terminare a transcripției, situri de legare ribozom pentru inițierea 47

RO 122495 B1

1 sintezei proteinei și secvențe lider pentru secreție. Secvențe care orientează expresia și
2 secreția proteinei de legare OPG pot fi omoloage, adică, secvențele sunt identice sau simi-
3 lare acelor secvențe în genomul implicat în expresia și secreția proteinei de legare OPG, sau
4 pot fi heteroloage. O diversitate de vectori plasmizi sunt disponibili pentru proteina de legare
5 OPG care exprimă în celule gazdă (vezi, de exemplu, *Methods in Enzymology* v. 185,
6 Goeddel, D.V. ed., Academic Press (1990)). Pentru expresia în celule gazdă mamifere, o
7 realizare preferată este plasmidul pDSRa descris în cererea **PCT 90/14363**. Pentru expresia
8 în celule gazdă bacteriene, realizările preferate includ plasmizi care conțin promotorul lux
9 (vezi cererea **US seria 08/577778**, depusă la 22 decembrie 1995). Suplimentar, vectorii sunt
10 disponibili pentru expresia specific țesut a proteinei de legare OPG la animale transgenice.
11 De asemenea, se pot folosi vectori de transfer genă retrovirală sau pe bază de adenovirus
12 pentru expresia proteinei de legare OPG în celule umane pentru terapia *in vivo* (vezi cererea
13 **PCT 86/00922**).

14 Celule gazdă procariote și eucariote care exprimă proteina de legare OPG sunt
15 asigurate de asemenea de invenție. Celule gazdă includ celule de bacterii, drojdii, plante,
16 insecte sau mamifere. De asemenea, proteina de legare OPG poate fi produsă în animale
17 transgenice cum ar fi șoareci sau capre. Plasmizi și vectori care conțin acizi nucleici conform
18 invenției s-au introdus în celule gazde corespunzătoare folosind tehnici de transfecție sau
19 de transformare cunoscute specialiștilor în domeniu. Celule gazdă pot conține secvențe ADN
20 care codifică proteina de legare OPG așa cum se arată în fig. 1 sau o parte a acestora, cum
21 ar fi domeniul extracelular sau domeniul citoplasmic. Acizi nucleici care codifică proteine de
22 legare OPG pot fi modificați prin substituirea codonilor care țin seama de expresia optimă
23 într-o gazdă dată. Cel puțin unii codoni pot fi astfel numiți codoni preferați care nu modifică
24 secvența aminoacidă și se găsesc frecvent în gene care sunt exprimate favorabil. Totuși, se
25 înțelege că modificările codonului pentru expresie optimă nu sunt restrictive pentru intro-
26 ducerea codonilor erați. Exemple de celule gazdă mamifere preferate pentru expresia pro-
27 teinei de legare OPG includ, dar nu se limitează la, celule COS, CHOd-, 293 și 3T3. O celulă
28 gazdă de bacterie preferată este *Escherichia coli*.

29 Polipeptide

30 Invenția asigură de asemenea proteina de legare OPG ca produsul expresiei proca-
31 riotice sau eucariotice într-o secvență ADN exogenă, adică, proteina de legare OPG este
32 proteina de legare OPG recombinant. Secvențe ADN exogene includ secvențe cADN, ADN
33 genomic și ADN sintetic. Proteina de legare OPG poate fi produsul expresiei celulelor de
34 bacterii, drojdii, plantă, insectă sau mamifer, sau de la sisteme de translație fără celulă. Pro-
35 teina de legare OPG produsă în celule de bacterii va avea un rest metionină N-terminal.
36 Invenția asigură de asemenea, un procedeu de producere a proteinei de legare OPG care
37 cuprinde celule gazdă de creștere procariote sau eucariote care codifică proteina de legare
38 OPG și care izolează produse de expresie a polipeptidei ale acizilor nucleici.

39 Polipeptidele care sunt proteine de legare OPG sau sunt fragmente, analogi sau
40 derivați ai acestora sunt cuprinse de invenție. Într-o realizare preferată, proteina de legare
41 OPG este o proteină de legare OPG umană. Un fragment de proteină de legare OPG se
42 referă la o polipeptidă care are o deleție a unuia sau mai multor aminoacizi astfel încât
43 polipeptidă care rezultă are cel puțin proprietatea OPG de legare. Numitele fragmente vor
44 avea deleții care provin de la capătul amino terminal, capătul carboxi terminal și regiunile
45 interne ale polipeptidei. Fragmente ale proteinei de legare OPG sunt de cel puțin aproximativ
46 zece aminoacizi, de cel puțin aproximativ 20 aminoacizi, sau cel puțin aproximativ 50 amino-
47 acizi în lungime. În realizări preferate, proteina de legare OPG va avea o deleție a unuia sau
48 mai multor aminoacizi de la regiunea transmembranară (resturi 49-69 aminoacide așa cum

RO 122495 B1

se arată în fig. 1), sau, alternativ, a unuia sau mai multor aminoacizi de la amino-terminal până la și/sau care includ regiunea transmembranară (resturi 1-49 aminoacide așa cum se arată în fig. 1). În altă realizare, proteina de legare OPG este o proteină solubilă care cuprinde, de exemplu, resturi 69-316 aminoacizi, sau 70-316, sau forme N-terminal sau C-terminal trunchiate ale acestora, care păstrează activitatea OPG de legare. Proteina de legare OPG este de asemenea, o proteină solubilă umană cum se arată în fig. 4 cuprinzând 69-317 resturi cum se arată în fig. 4 și forme N-terminal trunchiate ale acestora, de exemplu, 70-517, 71-517, 71-317, 72-317 și așa mai departe. Într-o realizare preferată, proteina de legare OPG umană solubilă cuprinde 69-317 resturi și trunchierea N-terminală a acestora până la OPGbp[158-317], sau alternativ, până la OPG [166-317].

Un analog al unei proteine de legare OPG se referă la o polipeptidă care are o substituție sau o adiție a unuia sau mai multor aminoacizi astfel încât polipeptidă care rezultă va avea substituții sau adiții în orice loc de-a lungul polipeptidei. Analogi preferați includ pe cei ai proteinelor de legare OPG solubile. Fragmente sau analogi se pot întâlni natural, cum ar fi un produs polipeptidic al unei variante alelice sau o variantă mRNA îmbinată, sau ei pot fi construiți folosind tehnici disponibile specialistului în domeniu pentru manipularea și sinteza acizilor nucleici. Polipeptidele pot sau nu pot avea un rest metionină amino terminal.

De asemenea, incluși în invenție sunt derivații proteinei de legare OPG care sunt polipeptide care suferă modificări post-tranlaționale (de exemplu, adiția catenelor de carbohidrat N-legate sau O-legate, prelucrarea capetelor N-terminale sau C-terminale), atașarea părților chimice la scheletul aminoacid, modificări chimice ale catenelor de carbohidrat N-legate sau O-legate și adiția unui rest metionină N-terminal ca rezultat al expresiei celei gazdă procariotice. Sunt cuprinși, în special, derivații modificați chimic ai proteinei de legare OPG care asigură avantaje adiționale cum ar fi stabilitate crescută, timp de circulație mai lung, sau imunogenicitate scăzută. Folosire specială este modificarea cu polimeri solubili în apă, cum ar fi oolietilen glicol și derivații acestora (vezi, de exemplu, **brevet US 4179337**). Părțile chimice pentru derivare se pot alege de la polimeri solubili în apă cum ar fi polietilen glicol, copolimeri etilen glicol/propilen glicol, carboximetilceluloză, dextran, alcool polivinilic și altele asemenea. Polipeptidele se pot modifica la poziții aleatoare în moleculă sau la poziții predeterminate în moleculă și pot include una, două, trei sau mai multe părți chimice atașate. Polipeptide se pot modifica la poziții predeterminate în polipeptidă, cum ar fi la terminusul amino, sau la un rest selectat lizină sau arginină în polipeptidă. Alte modificări chimice asigurate includ o marcare detectabilă, cum ar fi o marcare enzimatică, fluorescentă, izotopică sau de afinitate, pentru a permite detectarea și izolarea proteinei.

De asemenea, sunt incluse himere ale proteinei de legare OPG care cuprind parțial sau total dintr-o secvență aminoacidică a proteinei de legare OPG fuzionată la o secvență aminoacidică heteroloagă. Secvența heteroloagă poate fi oricare secvență care permite proteinei de fuziune rezultată să păstreze cel puțin activitatea OPG de legare. Într-o realizare preferată, domeniul extracelular carboxi terminal al proteinei de legare OPG este fuzionat la o secvență heteroloagă. Astfel de secvențe includ domenii citoplasmice heteroloage care permit evenimente de semnalare intracelulară alternativă, secvențe care susțin oligomerizarea cum ar fi regiunea Fc a IgG, secvențe enzimatică care asigură o marcare pentru polipeptidă și secvențe care asigură sonde de afinitate, cum ar fi o identificare antigen-anticorp.

Polipeptidele invenției se izolează și se purifică din țesuturi și linii celulare care exprimă proteina de legare OPG, se extrag atât din lizate, din mediu de creștere condiționat cât și din celule gazdă transformate care exprimă proteina de legare OPG. Proteina de legare OPG se poate obține din linia 32-D de celule mielomonocitice murine (număr de acces ATCC

1 CRL-11346). Proteina de legare OPG umană sau acizii nucleici care codifică identic se pot
2 izola de la nodul limf uman sau țesut fetal de ficat. Proteina de legare OPG izolată este liberă
3 de la asociere cu proteine umane și alți constituenți celulari.

4 O metodă pentru purificarea proteinei de legare OPG de la surse naturale (de
5 exemplu, țesuturi și linii celulare care exprimă normal proteina de legare OPG) și de la celule
6 gazdă transfectate este de asemenea cuprinsă de către invenție. Procedul de purificare
7 poate folosi una sau mai multe etape de purificare standard a proteinei într-o ordine cores-
8 punzătoare pentru a obține proteina purificată. Etapele de cromatografie pot include schim-
9 bător de ion, filtrare pe gel, interacție hidrofobă, fază inversă, cromatofocalizare, cromato-
10 grafie de afinitate folosind un anticorp proteină de legare anti-OPG sau complex de afinitate
11 biotin-streptavidină și altele asemenea.

12 **Anticorpi**

13 Anticorpi care leagă specific polipeptidele invenției sunt cuprinși de asemenea în
14 invenție. Anticorpii se pot produce prin imunizare cu proteina de legare OPG de lungime
15 întreagă, forme solubile ale proteinei de legare OPG, sau un fragment al acestora. Anticorpii
16 invenției pot fi anticorpi policlonali sau monoclonali, sau pot fi anticorpi recombinanți, cum
17 ar fi anticorpi himerici în care regiunile constante murine pe catene ușoare sau grele sunt
18 înlocuite de către secvențe umane, sau anticorpi CDR-greși în care numai regiunile de
19 determinare complementare sunt de origine murină. Anticorpii invenției pot fi de asemenea
20 anticorpi umani preparați, de exemplu, prin imunizarea animalelor transgenice capabile să
21 producă anticorpi umani (vezi, de exemplu, cererea **PCT WO 93/12227**). Anticorpii sunt utili
22 pentru detectarea proteinei de legare OPG în probele biologice, permițând astfel identificarea
23 celulelor sau țesuturilor care produc proteina. În plus, anticorpii care se leagă la proteina de
24 legare OPG și împiedică interacția cu alți compuși de legare pot avea utilizare terapeutică
25 în diferențierea osteoclastului care modulează și resorbția osului.

26 Anticorpii proteinei de legare OPG pot fi utili în tratamentul bolilor osului cum ar fi
27 osteoporoza și boala lui Paget. Anticorpii pot fi testați pentru legarea la proteina de legare
28 OPG în absența sau prezența OPG și examinați pentru capacitatea lor de a inhiba osteo-
29 clostogeneza mediată ligand (proteina de legare OPG) și/sau resorbția osului. S-a anticipat
30 de asemenea că peptidele inele pot acționa ca un antagonist al interacției ligand:receptor
31 și inhibă osteoclastogeneza mediată-ligand și peptide ale proteinei de legare OPG se vor
32 studia de asemenea pentru acest scop.

33 **Compoziții**

34 Invenția asigură de asemenea compoziții farmaceutice care cuprind o cantitate
35 eficientă terapeutic a proteinei de legare OPG conform invenției împreună cu un diluant,
36 purtător, agent de solubizare, agent de emulsifiere, agent de conservare și/sau adjuvat
37 acceptabili farmaceutic. Invenția asigură de asemenea compoziții farmaceutice care cuprind
38 o cantitate eficientă terapeutic dintr-un agonist sau antagonist al proteinei de legare OPG.
39 Termenul "cantitate eficientă terapeutic" are semnificația unei cantități care asigură un efect
40 terapeutic pentru o condiție specifică sau cale de administrare. Compoziția poate fi într-o
41 formă lichidă sau liofilizată și cuprinde un diluant (tampon Tris, acetat sau fosfat) având
42 diferite valori de pH și puteri ionice, agent de solubilizare cum ar fi Tween sau Polysorbate,
43 purtători cum ar fi albumină serică umană sau gelatină, agenți de conservare cum ar fi
44 timerosal sau alcool benzilic și antioxidanți cum ar fi acid ascorbic sau metabisulfid de sodiu.
45 Alegerea unei compoziții speciale va depinde de numărul de factori, incluzând condiția de
46 tratat, calea de administrare și parametrii farmacocinetici doriți. O studiere mai extinsă a
47 componentului corespunzător pentru compoziții farmaceutice se găsește în *Remington's
48 Pharmaceutical Sciences*, ed. 18, A.R.Gennaro, ed. Mack, Easton, PA (1980).

RO 122495 B1

Într-o realizare preferată, se asigură de asemenea, compoziții care cuprind proteine de legare OPG solubile. De asemenea sunt cuprinse compoziții care conțin proteina de legare OPG modificată cu polimeri solubili în apă pentru a crește solubilitatea, stabilitatea, timpul de înjumătățire în plasmă și biodisponibilitatea. Compozițiile pot cuprinde de asemenea încorporarea proteinei de legare OPG în lipozomi, microemulsii, miceli sau vezicule pentru eliberarea controlată pe parcursul unei perioade extinse de timp. Proteina de legare OPG solubilă poate fi formulată în microparticule corespunzătoare pentru administrare pulmonară.

Compozițiile conform invenției pot fi administrate fie prin injecție subcutană, intravenos sau intramuscular, fie prin administrare orală, nazală, pulmonară sau rectală. Calea de administrare aleasă va depinde eventual de un număr de factori și va fi stabilită de către un specialist în domeniu.

Invenția asigură de asemenea compoziții farmaceutice care cuprind o cantitate eficientă terapeutică a acizilor nucleici conform invenției împreună cu un adjuvant acceptabil farmaceutic. Compoziții de acid nucleic vor fi corespunzătoare pentru eliberarea în parte sau total a regiunii de codificare a proteinei de legare OPG și/sau regiunilor de flancare a celulelor sau țesuturilor ca parte a regimului de terapie anti-sens.

Metode de folosire

Proteine de legare OPG se pot folosi într-o diversitate de teste pentru detectarea OPG și caracterizarea interacțiilor cu OPG. În general, testul cuprinde incubarea proteinei de legare OPG cu o probă biologică care conține OPG, în condiții care permit legarea la OPG la proteina de legare OPG și măsurarea extinderii legăturii. OPG poate fi purificat sau poate fi prezent în amestecuri, cum ar fi în fluide ale corpului sau mediu de cultură. Testele care se pot dezvolta sunt calitative sau cantitative, ultimele fiind utile pentru determinarea parametrilor de legare (constante de legare și cinetici) ale OPG la proteina de legare OPG și pentru niveluri cantitative ale OPG activ biologic în amestecuri. Probele se pot folosi pentru a evalua legarea OPG-ului la fragmente, analogi și derivați ai proteinei de legare OPG și pentru a identifica OPG nou și membri ai familiei proteinei de legare OPG.

Legarea OPG la proteina de legare OPG se poate realiza în mai multe formate, incluzând teste de legare bazate pe celulă, teste de legare la membrană, teste în fază de soluție și imunoteste. În general, nivelurile trasate ale OPG marcat se incubează cu probe de proteină de legare OPG pentru o perioadă de timp specificată urmată de măsurarea OPG-ului legat prin filtrare, electrochemiluminescență (ECL, sistem ORIGEN prin IGEN), pe bază de celulă sau imunoteste. De asemenea, se pot aplica tehnologii de testare omogenă pentru radioactivitate (SPA; Amersham) și fluorescență descompusă în timp (HTRF, Packard). Legarea se detectează prin marcarea OPG sau un anticorp anti-OPG cu izotopi radioactivi (^{125}I , ^{35}S , ^3H), culori fluorescente (fluoresceină), chelați sau criptați de lantanidă (Eu^{2+}), complexe orbipiridil-ruteniu (Ru^{2+}). Este de înțeles că alegerea unei probe marcate va depinde de sistemul de detectare folosit. Alternativ, OPG poate fi modificat cu un semn epitop nemarcat (de exemplu, biotină, peptide, His_6 , myc) și se leagă la proteine cum ar fi streptavidină, anticorpi anti-peptidă sau anti-proteină care au o marcarea detectabilă cum s-a descris mai sus.

Într-o metodă alternativă, proteina de legare OPG poate fi testată direct folosind anticorpi policlonali sau monoclonali la proteine de legare OPG într-un imunotest. Forme adiționale ale proteinelor de legare OPG care conțin semne epitop așa cum s-a descris mai sus se pot folosi în soluție și imunoteste.

RO 122495 B1

1 Metode pentru identificarea compușilor care interacționează cu proteina de legare
OPG sunt cuprinse de asemenea de către invenție. Metoda cuprinde incubarea proteinei de
3 legare OPG cu un compus în condiții care permit legarea compusului la proteina de legare
OPG și măsurarea extinderii legăturii. Compusul poate fi purificat substanțial sau poate fi
5 prezent într-un amestec brut. Compușii de legare pot fi acizi nucleici, proteine, peptide, car-
bohidrați, lipide sau compuși organici cu greutate moleculară mică. Compușii pot fi carac-
7 terizați suplimentar prin capacitatea lor de a crește sau a descrește activitatea proteinei de
legare OPG cu scopul de a determina dacă ei acționează ca un agonist sau un antagonist.

9 Proteine de legare OPG, de asemenea, sunt utile pentru identificarea proteinelor
intracelulare care interacționează cu domeniul citoplasmic printr-un procedeu de cercetare
11 dublu hibrid de drojdie. Așa cum este un exemplu, constructe hibrid cuprinzând ADN care
codifică 50 aminoacizi N-terminali ai unei proteine de legare OPG fuzionată la un domeniu
13 de legare GAL4-ADN de drojdie, pot fi folosite ca un plasmid hrană dublu hibrid. Clone
pozitive care apar de la cercetare pot fi caracterizate suplimentar pentru a identifica proteine
15 de interacțiune. Această informație poate ajuta elucidarea unui mecanism de semnalizare
intracelulară asociat cu proteina de legare OPG și asigură ținte intracelulare pentru medi-
17 camente noi care modulează resorbția osului.

19 Proteina de legare OPG poate fi folosită pentru a trata condițiile caracterizate prin
densitatea excesivă a osului. Condiția cea mai obișnuită este osteoporoza în care un defect
genetic rezultă în masa ridicată a osului și de obicei este fatal în primii câțiva ani de viață.
21 Osteoporoza se tratează de preferință prin administrarea proteinei de legare OPG solubile.

23 De asemenea, invenția cuprinde modulatori (agoniști sau antagoniști) ai proteinei de
legare OPG și metode pentru obținerea lor. Un modulator al proteinei de legare OPG fie
poate crește, fie descrește cel puțin o activitate asociată cu proteina de legare OPG, astfel
25 încât capacitatea de a lega OPG sau alte astfel de molecule care interacționează sau pentru
a regla maturizarea osteoclastului. În mod tipic, un agonist sau antagonist poate fi un
27 cofactor, cum ar fi o proteină, peptidă, carbohidrat, lipid sau moleculă cu greutate moleculară
mică, care interacționează cu proteina de legare OPG pentru a regla activitatea sa. Anta-
29 goniști polipeptidici potențiali includ anticorpi care reacționează fie cu forme solubile, fie cu
forme asociate membranei proteinei de legare OPG și forme solubile ale proteinei de legare
31 OPG care cuprind parțial sau total domeniul extracelular al proteinei de legare OPG.
Moleculele care reglează expresia tipică a proteinei de legare OPG includ acizi nucleici care
33 sunt complementari la acizi nucleici care codifică proteina de legare OPG și care acționează
ca reglatori antisens ai expresiei.

35 Proteina de legare OPG este implicată în formarea controlată a osteoclastelor
mature, tipul primar de celule fiind implicat în resorbția osului. O creștere în rata resorbției
37 osului (superioară celei a formării osului) poate duce la tulburări diferite ale osului colectiv
sus-menționat ca osteopenii și includ osteoporoze, osteomielite, hipercalcemii, osteopenii
39 produse prin chirurgie sau administrarea de steroid, boala lui Paget, osteonecroze, pierderea
osului datorită artritei reumatoide, pierderea osului periodontal, imobilizare, pierdere
41 prostetică și metastaze osteolitice. Dimpotrivă, o creștere în rata resorbției osului poate duce
la osteopetroză, o condiție produsă de densitatea excesivă a osului. Agoniști și antagoniști
43 ai proteinei de legare OPG modulează formarea osteoclastului și pot fi administrați la pacienți
care suferă de tulburări ale osului. Agoniști și antagoniști ai proteinei de legare OPG folosiți
45 pentru tratamentul osteopeniilor se pot administra singuri sau în combinație cu o cantitate
eficientă terapeutică a unui agent care susține creșterea osului incluzând factori morfogenici
47 ai osului desemnați BMP-1 până la BMP-12, care transformă membrii familiei factorului-β de

RO 122495 B1

creștere și TGF- β , factori de creștere a fibroblastului FGF-1 până la FGF-10, inhibitori interleukină-1, inhibitori TNF α , hormon paratiroid, prostaglandine seria E, bifosfonați și minerale care sporesc osul cum ar fi fluor și calciu. Antagoniști ai proteinei de legare OPG pot fi utili în special în tratamentul osteopeniei.

Receptori pentru proteine de legare osteoprotegerină

Invenția asigură de asemenea receptori care interacționează cu proteine de legare OPG. Mai special, invenția asigură un receptor de activare și diferențiere a osteoclastului (ODAR). ODAR este o polipeptidă transmembranară care arată cel mai înalt grad de omologie la CD40, un membru al familiei receptorului TNF. Secvența de acizi nucleici a ODAR murină și polipeptida codificată este arătată în fig. 10. Omologul uman al ODAR murină se poate izola ușor prin cercetarea hibridizării unei bănci cADN uman sau genomic cu secvența de acid nucleic din fig. 10. Procedurile pentru donarea ODAR uman sunt similare celor descrise în Exemplul 5 pentru donarea proteinelor de legare OPG umane. Omologul uman al polipeptidei arătat în fig. 10 a apărut în Anderson et al (Nature 190., 175-179 (1997)) și este menționată ca RANK. RANK este caracterizată ca o proteină transmembranară de tip I având omologie la membri familiei receptorului TNF și este implicată în funcționarea dendritică a celulei.

Evidența pentru interacțiunea ODAR și proteina de legare OPG este arătată în Exemplul 13. O formă solubilă a ODAR (proteină de fuziune ODAR-Fc) previne maturizarea osteoclastului *in vitro* (fig. 12) și crește densitatea osului la șoareci normali sub injecția subcutanoasă (fig. 13). Rezultatele sunt compatibile cu proteina de legare OPG care interacționează cu și activează ODAR pentru a susține maturizarea osteoclastului.

Dezvoltarea osteoclastului și viteza și extinderea resorbției osului sunt reglate de interacțiunea proteinei de legare OPG cu ODAR. Compuși care descresc sau împiedică interacțiunea proteinei de legare OPG cu ODAR sunt antagoniști potențiali ai activității proteinei de legare OPG și pot distruge dezvoltarea osteoclastului ducând la descreșterea resorbției osului. Alternativ, compușii care cresc interacțiunea proteinei de legare OPG cu ODAR sunt agoniști potențiali care sprijină dezvoltarea osteoclastului și sporesc resorbția osului.

Se pot folosi o diversitate de analize pentru a măsura interacțiunea proteinei de legare OPG cu ODAR *in vitro* folosind proteine purificate. Aceste teste se pot folosi pentru a cerceta compuși pentru capacitatea lor de a crește sau a descrește viteza sau extinderea legării la ODAR prin proteina de legare OPG. Într-un tip al testului, proteina ODAR poate fi immobilizată prin atașarea la partea de jos a godeurilor unei plăci de microtitrare. Proteina de legare OPG radiomarcată (de exemplu, proteina de legare OPG iodată) și compusul (și) test pot fi adăugați apoi la godeuri, fie câte unul la un timp (în oricare ordine), fie simultan. După incubare, godeurile pot fi spălate și măsurate folosind un măsurător de scintilație pentru radioactivitate pentru a determina extinderea legării la ODAR prin proteina de legare OPG în prezența compusului test. În mod tipic, compusul se va testa într-un interval de concentrații și, o serie a godeurilor de control cărora le lipsește unul sau mai multe elemente ale analizelor test, pot fi folosite pentru exactitate în evaluarea rezultatelor. O alternativă a acestei metode implică inversarea "pozițiilor" proteinei, adică, immobilizarea proteinei de legare OPG la godeurile plăcii de microtitrare, incubarea cu compusul test și ODAR radiomarcate și determinarea extinderii legăturii ODAR (vezi, de exemplu, capitolul 18 din *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, New York, NY, [1995]).

RO 122495 B1

1 Ca o alternativă la radiomarcare, proteina de legare OPG sau ODAR pot fi conjugate
la biotină și prezența proteinei biotinilate poate fi detectată apoi folosind streptavidina legată
3 la o enzimă, cum ar fi peroxidază de hrean [HRP] sau fosfatază alcalină [AP], care poate fi
detectată colorimetric, sau prin atașarea fluorescentă a streptavidinei. De asemenea se
5 poate folosi un anticorp orientat la proteina de legare OPG sau ODAR care este conjugată
la biotină cu streptavidina legată cu enzimă legată la AP sau HRP.

7 Proteina de legare OPG și ODAR pot fi immobilizate prin atașarea la perle de agaroză,
perle acrilice sau alte tipuri al unor astfel de substraturi inerte. Complexul substrat-proteină
9 se poate plasa într-o soluție care conține proteina complementară și compusul test; după
incubare, perlele pot fi precipitate prin centrifugare și cantitatea din legătura dintre proteina
11 de legare OPG și ODAR se poate evalua apoi folosind oricare din tehnicile specificate mai
sus, adică, radiomarcare, legare de anticorp, sau altele asemenea.

13 Alt tip de analiză *in vitro* care se folosește pentru identificarea unui compus care
crește sau scade formarea unui complex ODAR/proteina de legare OPG este un sistem
15 detector cu rezonanță pentru plasmon de suprafață cum ar fi sistemul de analiză Biacore
(Pharmacia, Piscataway, NJ). Sistemul Biacore se poate realiza folosind protocolul produ-
17 cătorului. Această analiză implică în mod esențial legarea covalentă fie a proteinei de legare
OPG fie a ODAR la un fragment de senzor acoperit cu dextran care este localizat într-un
19 detector. Compusul test și altă proteină complementară poate fi injectat apoi în compa-
timentul care conține fragmentul de senzor, fie simultan fie secvențial și cantitatea proteinei
21 complementare care se leagă poate fi evaluată pe baza schimbării în masa moleculară care
se asociază fizic cu partea acoperită cu dextran a fragmentului de senzor; schimbarea în
23 masa moleculară se poate măsura prin sistemul detector.

În câteva cazuri poate fi de dorit evaluarea împreună a doi sau mai mulți compuși
25 pentru folosire în creșterea sau scăderea formării complexului ODAR/proteina de legare
OPG. În aceste cazuri, analizele specificate mai sus se pot modifica ușor prin adăugarea de
27 astfel de compuși test suplimentari fie simultan cu, fie secvențial la primul compus test.
Etapele rămase în analiză sunt precum s-a specificat mai sus.

29 Analizele *in vitro* cum ar fi cele descrise mai sus se pot folosi în mod avantajos pentru
a cerceta rapid mulți compuși pentru efectele asupra formării complexului de către ODAR
31 și proteina de legare OPG. Analizele pot fi automatizate pentru a cerceta compuși generați
în bănci de fag prezentat, peptida sintetică și sinteza chimică.

33 Compușii care cresc sau scad formarea complexului proteinei de legare OPG și
ODAR se pot cerceta de asemenea în cultura celulară folosind celule purtătoare-ODAR și
35 linii celulare. Celule și linii celulare se pot obține de la orice mamifer, dar de preferință, vor
fi de la om sau orice surse de primat, canine sau rozătoare. Celule care conțin ODAR cum
37 ar fi osteoclaste pot fi îmbogățite de la alte tipuri de celule prin cromatografie de afinitate
folosind proceduri disponibile publicului. Atașarea proteinei de legare OPG la celule purtă-
39 toare-ODAR se evaluează în prezența sau absența compușilor test și extinderea legăturii se
poate determina prin, de exemplu, citometrie de flux folosind un anticorp biotinilat la proteina
41 de legare OPG. În mod alternativ, o cultură de osteoclast de șoarece sau umană poate fi
stabilită cum s-a descris în Exemplul 8 și compușii test pot fi evaluați pentru capacitatea lor
43 de a împiedica maturarea osteoclastului stimulată prin adăugarea CFS-1 și a proteinei de
legare OPG. Analiza culturii celulare se poate folosi în mod avantajos pentru a evalua supli-
45 mentar compuși care înregistrează rezultat pozitiv în analiza de legare a proteinei descrisă
mai sus.

RO 122495 B1

Compuși care cresc sau scad interacțiunea proteinei de legare OPG cu ODAR se pot evalua de asemenea pentru activitatea <i>in vivo</i> prin administrarea compușilor la șoareci urmat de măsurarea densității osului folosind densitometria de baleaj sau radiografia osului. Procedeurile pentru măsurarea densității osului sunt descrise în publicația PCT WO 97/23614 și în Exemplul 13.	1 3 5
Invenția asigură compuși care scad sau împiedică interacția proteinei de legare OPG cu ODAR și sunt antagoniști ai formării osteoclastului. În general acești compuși se împart în două grupe. O grupă include acei compuși care derivă de la proteina de legare OPG sau care interacționează cu proteina de legare OPG. Aceștia s-au descris mai sus. A doua grupă include acei compuși care derivă de la ODAR sau care interacționează cu ODAR. Exemple de compuși care sunt antagoniști ai ODAR includ acizi nucleici, proteine, peptide, carbohidrați, lipide sau compuși organici cu greutate moleculară mică.	7 9 11
Antagoniști ai ODAR pot fi compuși care se leagă la sau lângă unul sau mai multe situri pentru OPG bp în domeniul extracelular ODAR și scad sau împiedică total formarea complexului. Aceste regiuni pe ODAR care sunt implicate în formarea complexului cu proteina de legare OPG pot fi identificate prin analogie cu structura complexului TNFβ/TNF-R55 omolog care s-a descris în Banner et al. (Cell 23., 431-445 (1993)). De exemplu, structura complexului TNFβ/TNF-R55 se poate folosi pentru a identifica regiuni ale proteinei de legare OPG și ODAR care sunt implicate în formarea complexului. Apoi compușii pot fi desemnați, care se leagă de preferință la regiuni implicate în formarea complexului și acționează ca antagoniști. Într-o abordare specificată în Exemplul 11, antigenii peptidei se desemnează pentru utilizare în sporirea anticorpilor la proteina de legare OPG care acționează ca antagoniști. Acești anticorpi sunt de așteptat să se lege la proteina de legare OPG și să împiedice formarea complexului cu ODAR. Într-un mod similar, antigenii peptidei bazați pe structura ODAR se pot folosi pentru a spori anticorpi anti-ODAR care acționează ca antagoniști.	13 15 17 19 21 23 25
Antagoniștii ODAR se pot lega la ODAR de asemenea la localizări distincte de la sit(uri) de legare pentru OPG bp și induc schimbări conformaționale în polipeptida ODAR care are drept rezultat scăderea sau formarea complexului neproductiv cu proteine de legare OPG.	27 29
Într-o realizare, un antagonist este o formă solubilă a ODAR care pierde un domeniu transmembranar funcțional. Forme solubile ale ODAR pot avea o deleție a unuia sau mai multor aminoacizi în domeniul transmembranar (aminoacizii 214-234 cum se arată în fig. 10). Polipeptidele ODAR solubile pot avea parțial sau total din domeniul extracelular și sunt apte de legarea proteinei de legare OPG. Opțional, ODAR solubil poate fi parte a unei proteine himerice, în care parțial sau total din domeniul extracelular al ODAR este fuzionat la o secvență aminoacidă heteroloagă. Într-o realizare, secvența aminoacidă heteroloagă este o regiune Fc de la IgG uman.	31 33 35 37
Modulatori (agoniști sau antagoniști) ai ODAR se pot folosi pentru a preveni sau trata osteopenia, care include osteoporoză, osteomielită, hiperglicemie cu caracter malign, osteopenie provocată pe sau prin chirurgie sau administrare de steroid, boala lui Paget, osteonecroză, pierderea osului datorată artritei reumatoide, pierderea osului periodontal, imobilizare, pierderea prostetică și metastaza osteolitică. Agoniști și antagoniști ai ODAR folosiți pentru tratamentul osteopeniei se pot administra singuri sau în combinație cu o cantitate eficientă terapeutică dintr-un agent de sprijinire a creșterii osului incluzând factori morfogenici ai osului desemnați BMP-1 până la BMP-12, factorul-β de creșterea transformării și membri familiei TGF-β, factori de creștere a fibroblastului FGF-1 până la FGF-10, inhibitori interleukină-1, inhibitori TNFα, hormon paratiroid, prostaglandine serie E, bifosfonați, estrogeni, SERM-uri și minerale care sporesc osul, cum ar fi fluorul și calciul. Antagoniști ai ODAR sunt utili în special în tratamentul osteopeniei.	39 41 43 45 47 49

RO 122495 B1

1 În continuare se prezintă 15 exemple de realizare a invenției în legătură cu figurile care reprezintă:

3 Fig. 1. Structura și secvența insertului 32D-F3 care codifică proteina de legare OPG. Domeniul transmembrantar anticipat și situsurile pentru catenele carbohidat legate la asparagină, sunt subliniate.

5 Fig. 2. Expresia proteinei de legare OPG în celulele COS-7 transfectate cu pcADN/32D-F3. Celulele s-au lipofectat cu ADN pcADN/32D-F3, se analizează pentru legare fie la conjugatul fosfatază alcalină IgG1 capră anti-uman (numai secundar), OPG[22-201]-Fc uman plus secundar (OPD-Fc), sau o proteină de fuziune himeră, domeniu extracelular ATAR-Fc (sATAR-Fc). ATAR este un nou membru a superfamiliei TNFR și proteina de fuziune sATAR-Fc servește ca marot atât pentru legarea domeniului IgG1 Fc uman, cât și proteina înrudită TNFR generic, care se leagă la moleculele de suprafață ale celulei 32D.

13 Fig. 3. Expresia proteinei de legare OPG în țesuturi umane. Analiza blot Northern ale ARNm din țesut uman (Clontech) folosind o sondă de hidridizare derivată 32D-F3 radiomarcată. Masa moleculară relativă este indicată la stânga în perechi kilobază (kb). Semnul < în partea dreaptă arată că este detectată migrarea unui transcript de aproximativ 2,5 kb în ARNm-ul nodulului limfatic. Se detectează, de asemenea, o bandă foarte neclară a aceleiași mase în ficatul fetal.

19 Fig. 4. Structura și secvența insertului pcADN/hu OPGbp care codifică proteina de legare OPG umană. Domeniul transmembrantar anticipat și situsul pentru catene carbohidat legate la asparagină, sunt subliniate.

23 Fig. 5. Stimularea dezvoltării osteoclastului *in vitro* de la co-culturi din macrofag din măduva osului și celulă ST2 tratate cu proteină [158-316] de legare OPG murin recombinant. Culturile se tratează cu diferite concentrații din proteină de legare OPG murin în intervalul de la 1,6 până la 500 ng/ml. După 8-10 zile, culturile se lizează și activitatea TRAP se măsoară prin testarea soluției. Suplimentar, unele culturi se tratează simultan cu 1, 10, 100, 500 și 1000 ng/ml proteină OPG [22-401]-Fc murin recombinant. Proteina de legare OPG murină induce o stimulare dependentă de doză în formarea osteoclastului, în care OPG [22-401]-Fc inhibă formarea osteoclastului.

31 Fig. 6. Stimularea *in vitro* a dezvoltării osteoclastului de la precursori din măduvă osoasă în prezența M-CSF și a proteinei [158-316] de legare OPG murin. Se recoltează măduvă osoasă de șoarece și se cultivă în prezența a 250, 500, 1000 și 2000 U/ml M-CSF. La aceste culturi se adaugă diferite concentrații din proteină [158-316] de legare OPG, în intervalul de la 1,6 până la 500 ng/ml. Dezvoltarea osteoclastului se măsoară prin testarea soluției TRAP.

37 Fig. 7. Osteoclastele derivate de la celulele din măduvă osoasă atât în prezența M-CSF cât și a proteinei [158-316] de legare OPG. Celule din măduvă osoasă tratate fie cu M-CSF, fie cu proteină de legare OPG, fie cu ambii factori combinați și se lasă să se dezvolte în osteoclaste mature. Culturile rezultate se colorează apoi cu albastru de toluidin (coloana din stânga), sau histochimic pentru a detecta activitatea enzimatică TRAP (coloana din dreapta). În culturile care primesc ambii factori, osteoclastele mature se formează astfel încât sunt capabile să erodeze măduva așa cum se evaluează prin prezența petelor colorate în albastru de pe suprafața măduvei. Aceasta se corelează în prezența celulelor TRAP pozitive, multinucleate, alcătuite din multe părți mari.

45 Fig. 8. Grafic care arată niveluri (iCa) de calciu ionizat din sângele total de la șoareci injectați cu proteina de legare OPG, la 51 ore după prima injecție și la șoareci cărora li se administrează simultan, de asemenea, OPG. Proteina de legare OPG semnificativ și niveluri iCa crescute dependente de doză. OPG (1 mg/kg/zi) împiedică complet creșterea în iCa la

RO 122495 B1

o doză a proteinei de legare OPG de 5 $\mu\text{g}/\text{zi}$ și împiedică, parțial, creșterea la o doză a
proteinei de legare a OPG de 25 $\mu\text{g}/\text{zi}$. (*), diferit la control tratat cu purtător ($p < 0,05$). (#),
nivel iCa tratat cu OPG diferit semnificativ în nivel la șoareci care primesc numai aceiași
doză din proteină de legare OPG ($p < 0,05$).

Fig. 9. Radiografiile ale femurului și tibiei din stânga la șoarecii tratați cu 0, 5, 25 sau
100 $\mu\text{g}/\text{zi}$ din proteină de legare OPG timp de 3,5 zile. Aceasta este o doză descrescătoare,
dependentă de densitatea osului evident mai clar la metafiza tibială proximală a acestor
șoareci și este profundă la o doză de 100 $\mu\text{g}/\text{zi}$.

Fig. 10. Secvența ADNc de ODAR murină și secvența de proteină. Se arată secvența
de aminoacizi a clonei ADNc de ~2,1 kb și transcrierea cadrului de citire deschis de 625
resturi mari prezentat mai sus. Peptida semnal hidrofobă este subliniată și secvența trans-
membranară hidrofobă (resturi 214-234) este îngroșată. Resturile de cisteină care cuprind
motivele repetate bogate în cisteină în domeniul extracelular, sunt îngroșate.

Fig. 11. Colorația imunofluorescentă a ODAR-Fc care se leagă la celule transfectate
cu proteină de legare OPG. Celule COS-7 transfectate cu proteină de legare OPG care
exprimă plasmida, se incubează cu IgG Fc uman (planul de sus), ODAR-Fc (planul din
mijloc) sau OPG-Fc (planul de jos). Un anticorp IgG Fc capră anti-uman marcat FITC se folo-
sește ca un anticorp secundar. Celulele de legare pozitive se examinează prin microscopie
confocală.

Fig. 12. Efectele ODAR-Fc asupra obținerii *in vitro* a osteoclastelor de la măduvă
osoasă de șoarece. Culturi de măduvă osoasă murină se stabilesc ca în Exemplul 8 și se
expun la proteina de legare OPG (5 ng/ml) și CSF-1 (30 ng/ml). Se adaugă concentrații
diferite de ODAR-Fc în intervalul de la 1500 ng/ml până la 65 ng/ml. Formarea osteoclastului
se testează prin citochimie TRAP și testarea soluției TRAP se face în cultură după 5 minute.

Fig. 13. Densitatea minerală a osului la șoareci după patru zile de tratament cu
ODAR-Fc la diferite doze. Șoarecii au primit ODAR-Fc prin injectare subcutanată zilnic într-
un purtător salin tamponat cu fosfat. Densitatea minerală s-a determinat în oase fixate în
EtOH 70% la șoareci cu metafiza tibială proximală prin tomografia computerizată cantitativă
periferică (pQCT) (XCT-960M, Norland Medical Systems, Ft Atkinson, WI). S-au analizat
două secțiuni transversale din os de 0,5 mm, 1,5 mm și 2,0 mm pentru capătul proximal al
tibiei (XMICE 5,2, Stratec, Germania) pentru a determina densitatea minerală osoasă totală
în metafiză. S-a folosit o limită de separare a țesutului moale de 1500 pentru a defini
marginea osului metafizeal. ODAR-Fc a produs o creștere semnificativă în densitatea mine-
rală osoasă în metafiza tibială proximală într-un mod dependent de doză. Grup n = 4.

Exemplul 1. Identificarea sursei liniei celulare pentru proteina de legare OPG

Osteoprotegerina (OPG) reglează negativ osteoclastogeneza *in vitro* și *in vivo*,
întrucât OPG este o proteină înrudită TNFR, este probabil să interacționeze cu un membru
al familiei înrudite TNF în timp ce își mediază efectele. Cu o excepție, toți membri cunoscuți
ai superfamiliei TNF sunt proteine transmembranare de tip II exprimate pe suprafața celulei.
Pentru a identifica o sursă a proteinei de legare OPG, proteine de fuziune OPG-Fc recom-
binante s-au folosit ca imunosonde pentru a cerceta proteinele de legare OPG pe suprafața
a diferite linii celulare și celule hematopoietice primare.

Linii celulare care au crescut precum culturi aderente *in vitro* s-au tratat folosind
metodele următoare: celulele se plasează în plăci pentru cultura țesutului cu 24 godeuri
(Falcon), apoi se lasă să crească până la aproximativ 80% confluență. Apoi, mediul de creș-
tere se îndepărtează și culturile aderente se spală cu soluție salină tamponată cu fosfat
(PBS) (Gibco) conținând 1% ser fetal de vițel (FCS). Proteine recombinante de fuziune OPG
[22-194]-Fc de șoarece și OPG [22-201]-Fc uman (vezi cererea **US 08/706.945** depusă în

RO 122495 B1

1 3 septembrie 1996) s-au diluat individual până la 5 µg/ml în PBS care conține 1% FCS, apoi
se adaugă la culturi și se lasă la incubat timp de 45 min la 0°C. Se îndepărtează soluția
3 proteinei de fuziune OPG-Fc și celulele se spală în soluție PBS-FCS cum s-a descris mai
sus. Apoi culturile se expun la anticorp secundar IgG anti-uman F(ab') de capră ficoeritri-
5 conguat (Southern Biotechnology Associates Cat. #2043-09) diluat în PBS-FCS. După o
incubare de 30-45 min la 0°C, soluția s-a îndepărtat și culturile s-au spălat așa cum s-a des-
7 cris mai sus. Celulele s-au analizat apoi prin microscopie imunofluorescentă pentru a detecta
linii celulare care exprimă o proteină de legare OPG la suprafața celulei.

9 Suspensia culturilor celulare s-au analizat într-un mod similar cu modificările
următoare: diluantul și tamponul de spălare constă din calciu și soluție fosfat fără magneziu
11 tamponată conținând 1% FCS. Celulele s-au recoltat din culturile cu replicare exponențială
în mediu de creștere, peletate prin centrifugare, apoi s-au resuspendat la 1×10^7 celule/ml
13 într-o placă de microtitrare cu 96 godeuri pentru cultură de țesut (Falcon). Celulele se expun
secvențial la proteine de fuziune OPG-Fc recombinante, apoi la anticorpul secundar așa cum
15 se descrie mai sus și celulele se spală prin centrifugare între fiecare etapă. Apoi celulele se
analizează prin sortarea celulei activată prin fluorescență (FACS) folosind un Becton
17 Dickinson FACscan.

Folosind acest mod de abordare, linia celulară 32D mielomonocitică murină (număr
19 de acces ATCC nr. CRL-11346) s-a găsit că exprimă o moleculă de suprafață care ar putea
fi detectată atât cu proteine de fuziune OPG [22-194]-Fc de șoarece cât și cu proteine de
21 fuziune OPG [22-201]-Fc umane. Anticorpul secundar singur nu se leagă la suprafața
celulelor 32D, nici nu purifică IgG Fc umană, indicând că legarea proteinelor de fuziune
23 OPG-Fc se datorează părții OPG. Această legătură ar putea fi concurată într-un mod depen-
dent de doză prin adiția proteinei recombinante OPG [22-401] murină sau umană. Astfel
25 regiunea OPG necesară pentru activitatea sa biologică este capabilă de legare specifică la
o moleculă cu suprafața derivată-32D.

27 **Exemplul 2. Expresia clonării unei proteine de legare OPG murină**

O bancă ADN c se prepară din la ARNm 32D și se leagă în vectorul de expresie
29 mamifer pcDNA3.1(+) (Invitrogen, San Diego, CA). S-au recoltat celulele 32D crescute
exponențial menținute în prezența interleukinei-3 recombinante și ARN-ul celular total se
31 purifică prin extracție cu acid guanidin tiocianat-fenol-cloroform (Chomczynski și Sacchi.
Anal. Biochem. 162, 156-159, (1987)). Frația poli(A+) ARNm se obține din prepararea ARN
33 total prin adsorpția și eluția din Dynabeads Oligo (dT)25 (DynaL Corp) folosind procedurile
recomandate de fabricant. Se prepară o bancă direcțională ADNc primar oligo-dT folosind
35 Superscript Plasmid System (Gibco BRL, Gaithersburg, Md) folosind procedurile reco-
mandate de fabricant. Se digeră ADNc rezultat pentru a completa cu endonuclează de res-
37 tricție Sall și NotI, apoi fracționat prin cromatografie pe gel cu excludere după mărime. S-au
selectat fracțiile cu greutatea moleculară cea mai ridicată și apoi s-au ligat în regiunea
39 polilinker a vectorului plasmidic pcDNA3.1.(+) (Invitrogen, San Diego, CA). Acest vector
conține promotorul CMV în amonte de sitului de clonare multiplu și se orientează expresia la
41 nivel ridicat în celule eucariote. Apoi banca s-a electroporat în *E. coli* competent (ElectroMAX
DH10B, Gibco, NY) și s-a titrat pe agar LB care conține 10 µg/ml ampicilină. Banca s-a
43 distribuit apoi în zone separate conținând aproximativ 1000 clone/zonă și 1,0 ml culturi din
fiecare zonă s-au crescut timp de 16...20 ore la 37°C. S-a preparat ADN plasmidic de la
45 fiecare cultură folosind trusa Qiagen Qiawell 96 Ultra Plasmid Kit (catalog # 16191) urmând
procedurile recomandate de fabricant.

47 Zonele distribuite ale băncii de expresie 32D ADNc s-au lipofectat individual în culturi
COS-7, apoi s-au analizat pentru dobândirea proteinei de legare OPG pe suprafața celulei.

RO 122495 B1

Pentru a face aceasta, celulele COS-7 s-au plasat la o densitate de 1×10^6 per ml în plăci de cultură de țesuturi cu șase godeuri (Costar), apoi s-au cultivat peste noapte în DMEM (Gibco) conținând 10% FCS. S-au diluat aproximativ 2 μ g ADN plasmidic de la fiecare zonă în 0,5 ml DMEM fără ser, apoi s-a sterilizat prin centrifugare printr-o coloană 0,2 μ m Spin-X (Costar). Simultan, s-au adăugat 10 μ l Lipofectamine (Life Technologies Cat # 18324-012) la un tub separat care conține 0,5 ml DMEM fără ser. ADN-ul și soluțiile cu Lipofectamine s-au amestecat și s-au lăsat la incubat la temperatura camerei timp de 30 min. Culturile de celule COS-7 s-au spălat apoi cu DMEM fără ser și complexe ADN-lipofectamină s-au expus la culturi 2...5 ore la 37°C. După această perioadă, mediul s-a îndepărtat cu DMEM care conține 10% FCS. Apoi celulele s-au cultivat timp de 48 ore la 37°C.

Pentru a detecta culturile care exprimă o proteină de legare OPG, se îndepărtează mediul de creștere și celulele s-au spălat cu soluție PBS-FCS. Un volum de 1,0 ml PBS-FCS conținând 5 μ g/ml proteină de fuziune OPG[22-201]-Fc se adaugă la fiecare godeu și se incubează la temperatura camerei timp de 1 oră. Celulele s-au spălat de trei ori cu soluție PBS-FCS și apoi s-au fixat în PBS care conține 2% paraformaldehidă și 0,2% glutaraldehidă în PBS la temperatura camerei timp de 5 minute. Culturile s-au spălat o dată cu PBS-FCS, apoi s-au incubat timp de 1 oră la 65°C în timp ce s-au imersat în soluție PBS-FCS. Culturile s-au lăsat să se răcească și soluția PBS-FCS s-a aspirat. Apoi culturile s-au incubat cu un anticorp (Fc specific) IgG anti-uman de capră conjugat cu fosfatază alcalină (SIGMA Product # A-9544) la temperatura camerei timp de 30 minute, apoi s-a spălat de trei ori cu 20 mM Tris-Cl (pH 7,6) și 137 mM NaCl. Complexele imune care se formează în timpul acestor etape s-au detectat prin analizarea pentru activitate fosfatazei alcaline folosind trusa Fast Red TR/AS-MX Substrat Kit (Pierce, Cat. # 34034) urmând procedurile recomandate de fabricant.

Folosind acest mod de abordare, s-au cercetat un total de aproximativ 300.000 clone ADNc 32D independente, reprezentate de 300 zone transfectate cu 100 clone fiecare. S-a identificat un singur godeu care a conținut celule care au dobândit capacitatea de a fi ornamentat de proteina de fuziune OPG-Fc. Această zonă s-a subdivizat prin runde secvențiale de selecționare sib, rezultând o singură clonă plasmidică 32D-F3 (fig. 1). ADN-ul plasmidic 32D-F3 s-a transfectat apoi în celule COS-7 care s-au imunocolorat fie cu anticorp singur IgG secundar capră FITC-conjugat anti-uman, proteină plus secundară de fuziune OPG[22-201]-Fc umană, sau cu protenă de fuziune ATAR-Fc (ATAR cunoscută, de asemenea, ca HVEM; Montgomery și colab., Cell 82, 427-436 (1996)) (Fig. 2). Anticorpul secundar singur nu s-a legat la celule COS-7/32D-F3, nici nu a făcut proteina de fuziune ATAR-Fc. Numai proteina de fuziune OPG Fc se leagă la celulele COS-7/32D-F3, arătând că 32D-F3 a codificat o proteină de legare OPG prezentată pe suprafața celulelor de expresie.

Exemplul 3. Secvența proteinei de legare OPG

Clona 32D-F3 izolată mai sus a conținut un insert cADN de aproximativ 2,3 kb (fig. 1) care s-a secvențat în ambele direcții pe un secvențer ADN automat Applied Biosystems 373A folosind reacții primer-Taq condus colorant-terminator (Applied Biosystems) urmând procedurile recomandate de fabricant. Secvența de nucleotide rezultantă obținută s-a comparat cu baza de date a secvenței ADN folosind programul FASTA (GCG, Universitatea Wisconsin) și s-a analizat prezența cadrelor de citire larg deschise (LORF-uri) folosind aplicația "Six-way open reading frame" (Frames) (GCG, Universitatea Wisconsin). Un LORF de 316 resturi de aminoacizi (aa) începând la metionină s-a detectat într-o orientare corespunzătoare și a fost precedată de o regiune netranscrisă 5' la aproximativ 150 bp.

RO 122495 B1

1 Regiunea netranscrisă 5' a conținut un codon stop în cadrul din amonte codonului start
anticipat. Aceasta arată că structura plasmidei 32D-F3 este compatibilă cu capacitatea sa
3 de a utiliza regiunea promotor CMV pentru a exprima direct un produs al genei 316 aa în
celulele mamifere.

5 Secvența proteinei de legare OPG anticipată s-a comparat apoi cu baza de date
existentă a secvențelor de proteină cunoscute folosind o versiune modificată a programului
7 FASTA (Pearson, Meth. Enzymol. 183, 63-98 (1990)). S-a analizat, de asemenea secvența
de aminoacizi pentru a observa prezența motivelor specifice conservate la toți membri
9 cunoscuți ai superfamiliei factorului de necroză a tumorii (TNF) folosind metoda profilului sec-
venței (Gribskov et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4355-4359 (1987)) așa cum s-a
11 modificat de Liethy și colab., Protein Sci. 3., 139-146 (1994)). Aceasta pare a fi o omologie
semnificativă în întregime cu proteina de legare OPG la unii membri ai superfamiliei TNF.
13 Proteina de legare OPG șoarece pare a fi mai strâns legată la omologi șoarece și uman atât
ligand TRAIL cât și ligand CD40. Analiza suplimentară a secvenței proteinei de legare OPG
15 a arătat o puternică potrivire la superfamilia TNF, cu un scor Z extrem de important de 19,46.

17 Secvența de aminoacizi a proteinei de legare OPG conține un probabil domeniu
transmembrantar hidrofobic care începe la M4 9 și se întinde până la L69. Pe baza acestei
19 configurații față de codonul de start metionină, proteina de legare OPG s-a anticipat a fi o
proteină transmembrantară de tip II cu un domeniu extracelular C-terminal mai mare (fig. 4).
Aceste va fi similar tuturor membrilor familiei TNF cunoscuți, cu excepția alfa limfotoxinei
21 (Nagata și Golstein, Science 267, 1449-1456 (1995)).

Exemplul 4. Expresia mARN-ului proteinei de legare OPG umană

23 S-au testat numeroase blot-uri Northern din țesut uman (Clontech, Palo Alto, CA) cu
fragment de restricție 32D-F3 marcat 32P-dCTP pentru a detecta mărimea transcriptului
25 uman și pentru a determina modelele expresiei. S-au prehibridizat blot-urile Northern în 5X
SSPE, 50% formamidă, 5X soluție Denhardt, 0,5% SDS și 100 μg/ml ADN denaturat din
27 spermă de somon timp de 2...4 ore la 42°C. Blot-uri s-au hibridizat apoi în 5X SSPE, 50%
formamidă, 5X soluție Denhardt, 0,5% SDS și 100 μg/ml ADN denaturat din spermă de
29 somon timp de 18-24 ore la 42°C. Apoi blot-urile s-au spălat în 2X SSC timp de 10 min la
temperatura camerei, 1X SSC timp de 10 min la 50°C, apoi în 0,5X SSC timp de 10...15 min.

31 Folosind o sondă derivată de la cADN de șoarece și hibridizare în condiții de strin-
gență, s-a detectat o specie de mARN predominant cu o masă moleculară relativă de aproxi-
33 mativ 2,5 kb în nodulii limfatici (fig. 3). Un semnal slab s-a detectat, de asemenea, la aceeași
masă moleculară relativă în ARNm din ficat fetal. În alte țesuturi examinate nu s-au detectat
35 transcrieri de proteină de legare OPG. Datele sugerează că expresia ARNm a proteinei de
legare OPG a fost extrem de limitată în țesuturi umane. De asemenea, datele arată că clona
37 ADNc izolată este foarte apropiată de mărimea transcriptului nativ, sugerând că 32D-F3 este
o clonă de lungime întregă.

Exemplul 5. Clonarea moleculară a proteinei de legare OPG umană

39 Omologul uman al proteinei de legare OPG s-a exprimat ca un ARNm de aproximativ
41 2,5 kb în noduli limfatici periferici și s-a detectat prin hibridizare cu o sondă ADNc de șoarece
în condiții stringente de hibridizare. Proteina de legare OPG care codifică ADN s-a obținut
43 prin cercetarea unei bănci ADNc de noduli de limfă umană fie prin metode de hibridizare
placă bacteriofag recombinant, fie prin metode de hibridizare colonie bacteriană transformată
45 (Sambrook și colab., Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press,
New York (1989)). Această bancă ADNc fag sau plasmidă, s-au cercetat folosind sonde d

RO 122495 B1

marcare radioactivă derivate de la clona 32D-F3 a proteinei de legare OPG. Sondele s-au 1
folosit pentru a cerceta filtrul de nitroceluloză ridicat dintr-o bancă plasată pe placă. Aceste 2
filtre s-au prehibridizat și apoi s-au hibridizat în condițiile specificate în Exemplul 4, în cele 3
din urmă obținând creșterea clonelor purificate ale cADN-ului proteinei de legare OPG 4
umană. Inserțiile obținute de la oricare din clonele proteinei de legare OPG umană se vor 5
secvența și se vor analiza așa cum s-a descris în Exemplul 3.

S-a analizat un nodul limfatic poli A+ ARN uman (Clontech, Inc., Palo Alto, CA) în 7
ceea ce privește prezența transcriptelor OPG-bp așa ca în cererea **US anterioară seria** 8
08/577788, depusă la 22 decembrie 1995. Un blot northern al acestei probe ARN testat în 9
condiții stringente cu o sondă OPG-bp de șoarece marcată-32P a arătat prezența transcrip- 10
telor OPG-bp umane. Apoi s-a sintetizat o bancă ADNc oligo dT-primar din nodul limfatic 11
ARNm folosind trusa SuperScript (GIBCO life Technologies, Gaithersberg, MD) s-a cum s-a 12
descriș în Exemplul 2. ADNc-ul rezultat s-a selecționat după mărime și fracția moleculară 13
mare ligată la vectorul plasmid pcDNA3.1(+) (Invitrogen, San Diego, CA). S-au transformat 14
electroconcurrent *E. coli* DH10 (GIBCO life Technologies, Gaithersberg, MD) și s-au cercetat 15
1 X 10⁶ transformanți rezistenți la ampicilină prin hibridizarea coloniei folosind o sondă de 16
proteină de legare OPG de șoarece marcată-32P. 17

S-a izolat o clonă plasmidică a ADNc-ului proteinei de legare OPG umană presupus, 18
phuOPGbp-1.1 și a conținut un insert de 2,3 kp. Secvența de nucleotidă rezultată a insertului 19
phuOPGbp-1.1 a avut 80...85% omologie la secvența ADNc-ului proteinei de legare OPG 20
șoarece. Transcrierea secvenței insertului ADN a arătat prezența unui cadru de citire larg 21
deschis anticipat pentru a codifica o polipeptidă de 317 aa (fig. 4). Compararea polipeptidelor 22
OPG-bp de șoarece și umană arată că ele sunt ~87% identice, arătând faptul că această 23
proteină este puternic conservată în timpul evoluției.

ADN-ul proteinei de legare OPG umană și secvențele proteinei nu au fost prezente 24
în Genbank și nu au existat secvențe EST omoloage. Deoarece cu omologul murin, proteina 25
de legare OPG umană arată o similaritate puternică a secvenței la toți membrii superfamiliei 26
TNFa ai citokinelor. 27

Exemplul 6. Clonarea și expresia bacteriană a proteinei de legare OPG 29

Amplificarea PCR folosind perechi de primer și matrice descrise mai jos este utilă 30
pentru a genera diferite forme de proteine de legare OPG murină. Un primer al fiecărei 31
perechi introduce un codon stop TAA și un situs unic XhoI sau SacII urmând capătul terminal 32
al genei. Celălalt primer al fiecărei perechi introduce un situs unic NdeI, o metionină N- 33
terminală și codoni optimizați pentru partea amino terminală a genei. PCR și termociclarea 34
se realizează folosind metodologia ADN recombinant standard. Produsele PCR sunt puri- 35
ficate, sunt digerate restrictiv și sunt inserate în situsurile unice NdeI și XhoI sau SacII ale 36
vectorului pAMG21 (număr de acces ARCC 98113) și sunt transformate în *E. coli* prototrofic 37
393 sau 2596. Alți vectori de expresie *E. coli* folosiți de obicei și celule gazdă sunt, de ase- 38
menea, corespunzători pentru expresie. După transformare, clonele se selecționează, se 39
izolează ADN plasmidic și se confirmă secvența insertului proteinei de legare OPG.

pAMG21-proteina de legare OPG murină [75-316] 41

Acest construct s-a programat a fi 242 aminoacizi în lungime și are următoarele res- 42
turi N-terminal și C-terminal, NH₂-Met (75)-Asp-Pro-Asn-Arg-----Gln-Asp-Ile-Asp(316)- 43
COOH. Matrița folosită pentru PCR a fost pcDNA/32D-F3 și oligonucleotidele #1581-72 și 44
#1581-76 au fost perechea de primeri folosită pentru PCR și clonarea acestui construct de 45
genă.

RO 122495 B1

- 1 1581-72:
5'-GTTCTCCTCATATGGATCCAAACCGTATTTCTGAAGACAGCACTCACTGGCTT-3'
- 3 (SECV. ID NR: 5)
- 1581-76
- 5 5'-TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA-3'
(SECV. ID NR: 6)
- 7 *pAMG21-proteina de legare OPG murină [95-316]*
Acest construct s-a programat a fi de 223 aminoacizi în lungime și are următoarele
- 9 resturi N-terminal și C-terminal, NH₂-Met-His(95)-Glu-Asn-Ala-Gly-----Gln-Asp-Ile-Asp(316)-
COOH. Matrița folosită pentru PCR a fost pcDNA/32D-F3 și oligonucleotidele #1591-90 și
- 11 #1591-95 au fost perechea de primeri folosită pentru PCR și donarea acestui construct de
genă.
- 13 1591-90:
5'-ATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGCATGAAAACGCAGGTCTGCAG-3'
- 15 (SECV. ID NR: 7)
- 1591-95:
3'-TATCCGCGGATCCTCGAGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGAA-3'
- 17 (SECV. ID NR: 8)
- 19 *pAMG21-proteina de legare OPG murină [107-316]*
Acest construct s-a programat a fi de 211 aminoacizi în lungime și are următoarele
- 21 resturi N-terminal și C-terminal, NH₂-Met-Ser(107)-Glu-Asp-Thr-Leu-----Gln-Asp-Ile-
Asp(316)-COOH. Matrița folosită pentru PCR a fost pcDNA/32D-F3 și oligonucleotidele
- 23 #1591-93 și #1591-95 au fost perechea de primeri folosită pentru PCR și donarea acestui
construct de genă.
- 25 1591-93:
5'-ATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGTCTGAAGACACTCTGCCGGACTCC-3'
- 27 (SECV. ID NR: 9)
- 1591-95:
3'-TATCCGCGGATCCTCGAGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGAA-3'
- 29 (SECV. ID NR: 10)
- 31 *pAMG21-proteina de legare OPG murină [118-316]*
Acest construct s-a programat a fi de 199 aminoacizi în lungime și are următoarele
- 33 resturi N-terminal și C-terminal, NH₂-Met(118)-Lys-Gln-Ala-Phe-Gln-----Gln-Asp-Ile-
Asp(316)-COOH.
- 35 Matrița folosită pentru PCR a fost pcDNA/32D-F3 și oligonucleotidele #1591-94 și
#1591-95 au fost perechea de primeri folosită pentru PCR și donarea acestui construct de
- 37 genă.
- 1591-94:
5'-ATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGAAACAAGCTTTTCAGGGG-3'
- 39 (SECV. ID NR: 11)
- 1591-95:
3'-TATCCGCGGATCCTCGAGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGAA-3'
- 41 (SECV. ID NR: 12)
- 43 *pAMG21-proteina de legare OPG murină [128-316]*
Acest construct s-a programat a fi de 180 aminoacizi în lungime și are următoarele
- 45 resturi N-terminal și C-terminal, NH₂-Met-Lys(128)-Glu-Leu-Gln-His-----Gln-Asp-Ile-
Asp(316)-COOH. Matrița folosită pentru PCR a fost pcDNA/32D-F3 și oligonucleotidele
- 47 #1591-91 și #1591-95 au fost perechea de primeri folosită pentru PCR și donarea acestui
construct de genă.
- 49

RO 122495 B1

1591-91:	1
5'-ATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGAAAGAACTGCAGCACATTGTG-3'	
(SECV. ID NR: 13)	3
1591-95:	
3'-TATCCGCGGATCCTCGAGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGAA-3'	5
(SECV. ID NR: 14)	
<i>pAMG21-proteina de legare OPG murină [137-316]</i>	7
Acest construct s-a programat a fi de 181 aminoacizi în lungime și are următoarele	
resturi N-terminal și C-terminal, NH ₂ -Met-Gln(137)-Arg-Phe-Ser-Gly-----Gln-Asp-Ile-	9
Asp(316)-COOH. Matrița folosită pentru PCR a fost pcDNA/32D-F3 și oligonucleotidele	
#1591-92 și #1591-95 au fost perechea de primeri folosită pentru B.CR și donarea acestui	11
construct de genă.	
1591-92:	13
5'-ATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGCAGTTTCTCTGGTGCTCCA-3'	
(SECV. ID NR: 15)	15
1591-95:	
3'-TATCCGCGGATCCTCGAGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGAA-3'	17
(SECV. ID NR: 16)	
<i>pAMG21-proteina de legare OPG murină [146-316]</i>	19
Acest construct s-a programat a fi de 171 aminoacizi în lungime și are următoarele	
resturi N-terminale și C-terminale, NH ₂ -Met(146)-Glu-Gly-Ser-Trp-----Gln-Asp-Ile-Asp(316)-	21
COOH. Matrița folosită pentru PCR a fost pAMG21-proteina de legare OPG murină [75-316]	
descrisă mai sus și oligonucleotidele #1600-98 și #1581-76 vor fi perechea de primeri folosită	23
pentru PCR și donarea acestui construct de genă.	
1600-98:	25
5'-GTTCTCCTCATATGGAAGGTTCTTGGTTGGATGTGGCCCA-3'	
(SECV. ID NR: 17)	27
1581-76:	
5'-TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA-3'	29
(SECV. ID NR: 18)	
<i>pAMG21-proteina de legare OPG murină [156-316]</i>	31
Acest construct s-a programat a fi de 162 aminoacizi în lungime și are următoarele	
resturi N-terminal și C-terminal, NH ₂ -Met-Arg(156)-Gly-Lys-Pro-----Gln-Asp-Ile-Asp(316)-	33
COOH. Matrița folosită pentru PCR a fost pAMG21-proteina de legare OPG murină [158-316]	
de mai jos și oligonucleotidele #1619-89 și #1581-76 va fi perechea de primeri folosită pentru	35
PCR și donarea acestui construct de genă.	
1619-86:	37
5'-GTTCTCCTCATATGCGTAAACCTGAAGCTCAACCATTTGCA-3'	
(SECV. ID NR: 19)	39
1581-76:	
5'-TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA-3' (SECV. ID NR: 20)	41
<i>pAMG21-proteina de legare OPG murină [158-316]</i>	
Acest construct s-a programat a fi de 160 aminoacizi în lungime și are următoarele	43
resturi N-terminal și C-terminal, NH ₂ -Met-Lys(158)-Pro-Glu-Ala-----Gln-Asp-Ile-Asp(316)-	
COOH. Matrița folosită pentru PCR a fost pcDNA/32D-F3 și oligonucleotidele #1581-73 și	45
#1581-76 va fi perechea de primeri folosită pentru PCR și donarea acestui construct de	
genă.	47

RO 122495 B1

1 1581-73:

5'-GTTCTCCTCATATGAAACCTGAAGCTCAACCATTTGCACACCTCACCATCAAT-3'

3 (SECV. ID NR: 21)

1581-76:

5 5'-TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA-3'

(SECV. ID NR: 22)

7 *pAMG21-proteina de legare OPG murină [166-316]*

Acest construct s-a programat a fi de 152 aminoacizi în lungime și are următoarele resturi N-terminal și C-terminal, NH₂-Met-His(166)-Leu-Thr-Ile-----Gln-Asp-Ile-Asp(316)-COOH. Matrița folosită pentru PCR a fost pcDNA-F3 și oligonucleotidele #1581-75 și #1581-76 va fi perechea de primeri folosită pentru PCR și donarea acestui construct de genă.

11 1581-75:

13 5'-GTTCTCCTCATATGCATTTAACTATTAACGCTGCATCTATCCCATCGGGTTCCCAT
AAAGTCACT-3'

15 (SECV. ID NR: 23)

1581-76:

17 5'-TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA-3'

(SECV. ID NR: 24)

19 *pAMG21-proteina de legare OPG murină [168-316]*

Acest construct s-a programat a fi de 150 aminoacizi în lungime și are următoarele resturi N-terminal și C-terminal, NH₂-Met-Thr(168)-Ile-Asn-Ala-----Gln-Asp-Ile-Asp(316)-COOH. Matrița folosită pentru PCR a fost pcDNA-F3 și oligonucleotidele #1581-74 și #1581-76 va fi perechea de primeri folosită pentru PCR și clonare.

23 1581-74:

25 5'-GTTCTCCTCATATGACTATTAACGCTGCATCTATCCCATCGGGTTCCCAT
AAGTCACT-3'

27 (SECV. ID NR: 25)

1581-76:

29 5'-TACGCACTCCGCGGTTAGTCTATGTCCTGAACTTTGA-3'

(SECV. ID NR: 26)

31 S-a înțeles că, constructele de mai sus sunt exemplificatoare și un specialist în domeniu poate obține ușor alte forme de proteină de legare OPG folosind metodologia generală prezentată aici.

33 Au fost clonate constructele bacteriene recombinante pAMG21-proteină de legare OPG murină [75-316], [95-316], [107-316], [118-316], [128-316], [137-316] și [158-316], secvența ADN s-a confirmat și au fost examinate nivelurile expresiei produsului genei recombinant după inducție. Toate constructele au produs niveluri ale produsului genei recombinant care au fost ușor vizibile urmând electroforeza în gel de poliacrilamidă SDS și colorare coomasie a Uzatelor brute. Creșterea *E.coli* 393 sau 2596 transformate, induce expresia proteinei de legare OPG și izolarea corpiilor de incluziune conținând proteina de legare OPG sunt date conform procedurilor descrise în **PCT W097/23614**. Purificarea proteinelor de legare OPG de la corpiii de incluziune necesită solubilizarea și renaturarea proteinei de legare OPG folosind proceduri accesibile unui specialist în domeniu. Proteina de legare OPG murină recombinantă [158-316] s-a găsit a fi produsă în general insolubilă, dar aproximativ 40% s-a găsit în fracția solubilă. Proteina recombinantă s-a purificat de la fracția solubilă așa cum s-a descris mai jos și s-a examinat bioactivitatea sa.

RO 122495 B1

Exemplul 7. Purificarea proteinei de legare OPG murină recombinantă [158-316]	1
Celule bacteriene congelate conținând proteina de legare OPG murină [158-316]	
exprimată s-au dezghețat și s-au resuspendat în 20 mM tris-HCl pH 7,0, 10 mM EDTA.	3
Suspensia celulară (20% g/v) s-a omogenizat apoi prin trei treceri printr-un microfluidificator.	
Suspensia de celule lizate s-a centrifugat într-un rotor JA14 la 10.000 rpm timp de 45 minute.	5
Analiza SDS-PAGE a arătat o bandă cu o greutate moleculară de aproximativ 18 kd prezentă	
atât în corpii de incluziune, cât și în supernatant. Frația solubilă s-a aplicat apoi la o coloană	7
Pharmacia SP Sepharose 4FF cu 10 mM MES pH 6,0. Proteina de legare OPG s-a eluat cu	
un gradient din 20 volume de coloană din 0...0,4M NaCl în MES pH 6,0. Frațiile care conțin	9
proteina de legare OPG s-au aplicat apoi la o coloană ABX Bakerbond echilibrată cu 20 mM	
MES pH 6,0. Proteina de legare OPG s-a eluat cu un gradient 15CV 0...0,5M NaCl în MES	11
pH 6,0. Produsul final a fost peste 95% omogenitate prin SDS-PAGE. Secvențarea N-	
terminală a dat arătat următoarea secvență: Met-Lys-Pro-Glu-Ala-Gln-Pro-Phe-Ala-His care	13
s-a identificat cu cea anticipată pentru o polipeptidă plecând de la restul 158 (cu un inițiator	
metionină). Greutatea moleculară relativă a proteinei în timpul SDS-PAGE nu s-a schimbat	15
la reducere.	
Exemplul 8. Bioactivitatea in vitro a proteinei de legare OPG solubilă recombinantă	17
Proteina OPG recombinantă a arătat că împiedică formarea osteoclastului dependent	
de vitamina D3 din măduva osului și precursorii splinei într-un test de formare a	19
osteoclastului așa cum s-a descris în cererea US 08/577788 . Deoarece proteina de legare	
OPG se leagă la OPG și este un nou membru al familiei TNF de liganzi este o țintă potențială	21
a bioactivității OPG. Proteina de legare OPG solubilă recombinantă (158-316) reprezentând	
domeniul minim miez asemenea-TNF α s-a testat pentru capacitatea sa de a modula	23
diferențierea osteoclastului de la precursorii osteoclastului. S-au izolat celule din măduva	
osului de la femur de șoareci adulți și s-au tratat cu M-CSF. Frația neaderentă s-a co-	25
cultivat cu celule ST2 în prezența sau absența atât de vitamină D3, cât și de dexametazonă.	
Așa cum s-a arătat anterior, osteoclastele se dezvoltă numai din co-culturi conținând celule	27
stromale (ST2), vitamina D3 și dexametazonă. Proteina de legare OPG solubilă recombi-	
nantă s-a adăugat la diferite concentrații variind de la 0,16 până la 500 ng/ml și maturarea	29
osteoclastului s-a determinat prin analiza soluție TRAP și prin observare vizuală. Proteina	
de legare OPG a stimulat puternic diferențierea și maturizarea osteoclastul într-un mod	31
dependent de doză, cu efecte pe jumătate din maxim într-un interval de 1...2 ng/ml sugerând	
că acționează ca un inducător potențial al osteoclastogenezei <i>in vitro</i> (fig. 5). Efectul	33
proteinei de legare OPG este împiedicat de OPG recombinant (fig. 6).	
Pentru a testa dacă proteina de legare OPG ar înlocui stroma și steroizi adăugați,	35
culturile s-au stabilizat folosind M-CSF la diferite concentrații pentru a sprijini creșterea	
precursorilor osteoclastului și s-au adăugat, de asemenea, diferite cantități de proteina de	37
legare OPG. Așa cum se arată în fig. 6, activitatea TRAP stimulată în funcție de doza de	
proteina de legare OPG și magnitudinea stimulării, a fost dependentă de nivelul M-CSF	39
adăugat sugerând că acești doi factori împreună sunt esențiali pentru dezvoltarea	
osteoclastului. Pentru a confirma importanța biologică a acestei ultime observații, culturile	41
s-au stabilizat pe bucăți de os cortical bovin și s-au testat efectele M-CSF și proteinei de	
legare OPG atât singure, cât și împreună. Așa cum se arată în fig. 7, proteina de legare OPG	43
în prezența M-CSF a stimulat formarea osteoclastelor larg pozitive TRAP care erodează	
suprafața osului care rezultă în cavități. Astfel, proteina de legare OPG acționează ca un	45
factor de stimulare (diferențiere) a osteoclastogenezei. Aceasta sugerează că osteoclastul	
împiedică dezvoltarea prin izolare a proteinei de legare OPG.	47

RO 122495 B1

1 **Exemplul 9. Activitatea *in vivo* a proteinei de legare OPG solubilă recombinantă**

Pe baza studiilor *in vitro*, proteina de legare OPG murină recombinantă [158-316]
3 produsă în *E.coli* este un inducător potențial al dezvoltării de la precursori mieloizi. Pentru
a determina efectele ei *in vivo*, șoareci masculi BDF1 în vârstă de 4..5 săptămâni
5 (Laboratoarele Charles River) au primit injecții subcutanate de proteină de legare OPG [158-
316] de două ori pe zi timp de trei zile și în dimineața celei de patra zile (zile 0, 1, 2 și 3).
7 Cinci grupuri de șoareci (n=4) au primit purtător singur sau 1, 5, 25 sau 100 μg/proteina de
legare OPG [158-316] per zi. Un suplimentar de 5 grupuri de șoareci (n=4) au primit dozele
9 de mai sus de purtător sau proteină de legare OPG [158-316] și suplimentar a primit Fc-OPG
uman [22-194] la 1 mg/kg/zi (aproximativ 20 μg/zi) prin injecție unitară subcutanată zilnică.
11 S-a determinat calciu total ionizat din sânge înainte de tratamentul din ziua 0 și 3..4 ore
după prima injecție zilnică a proteinei de legare OPG [158-316] în zilele 1, 2 și 3. La patru
13 zile după ultima injecție din ziua 3, șoarecii s-au sacrificat și li s-au făcut radiografii.

Proteina recombinantă de legare OPG [158-316] a produs o creștere semnificativă
15 în calciu ionizat din sânge după două zile de tratament la doza de 5 μg/zi și mai mare (fig.
8). Gravitatea hipercalcemiei indică o inducere puternică a activității osteoclastului care
17 rezultă din resorbția osului crescut. Administrarea convergentă a OPG a limitat hiperglicemia
la doze ale proteinei de legare OPG [158-316] de 5 și 25 μg/zi, dar nu la 100 μg/zi. Aceste
19 animale s-au analizat prin radiografie pentru a determina dacă au existat oarecare efecte
asupra densității minerale a osului vizibil prin raze X (fig. 9). Recombinantă proteinei de
21 legare OPG [158-316] injectată timp de 3 zile a scăzut densitatea osului în tibia proximală
a șoarecilor într-un mod dependent de doză. Reducerea densității osului s-a evidențiat în
23 special la șoareci care au primit 100 μg/zi confirmând că hiperglicemia profundă la aceste
animale s-a produs de la resorbția crescută a osului și eliberarea de calciu rezultantă din
25 schelet. Aceste date indică cu claritate că proteina de legare OPG [158-316] acționează *in*
vivo pentru a sprijini resorbția osului, ducând la hipercalcemia sistemică și OPG recom-
27 binantă anulează aceste efecte.

29 **Exemplul 10. Clonarea și expresia proteinei de legare OPG la celule mamifere**

Clona de lungime întragă a proteinei de legare OPG murină și umană se poate
31 exprima în celule mamifere așa cum s-a descris anterior în Exemplul 2. Alternativ, clonele
cADN se pot modifica pentru a codifica forme secretate de proteină care exprimă în celule
mamifere. Pentru a face aceasta, capătul 5' natural al ADNc codifică codonul inițial și se
33 extinde aproximativ până la primii 69 aminoacizi ai proteinei, incluzând regiunea domeniu
transmembrantar, ar putea fi înlocuit cu o secvență lider de peptidă semnal. De exemplu,
35 secvențe ADN care codifică codonul inițial și peptidă semnal a unei gene cunoscute pot fi
îmbinate la secvența ADNc a proteinei de legare OPG care începe oriunde după regiunea
37 care codifică restul de aminoacid 68. Se crede că clonele recombinante rezultante produc
forme secretate ale proteină de legare OPG în celule mamifere și vor suferi modificări post
39 translaționale care se întâlnesc, în mod normal, în domeniul extracelular C-terminal al
proteinei de legare OPG, cum ar fi glicozilarea. Folosind această strategie, s-a construit o
41 formă secretată a proteinei de legare OPG care are la capătul său 5' peptida semnal OPG
murină și la capătul său 3' domeniul IgG1 Fc uman. Vectorul plasmidic pCEP4/ muOPG[22-
43 401]-Fc, așa cum s-a descris în cererea **US 08/577788**, depusă la 22 decembrie 1995, s-a
digerat cu NotI pentru a cliva între capătul 3' al OPG și gena Fc. ADN linearizat s-a digerat
45 apoi parțial cu XmnI pentru a cliva numai resturile 23 și 24 ale OPG lăsând un capăt teșit.
Digestele de restricție s-au defosforilat apoi cu CIP și s-a purificat pe gel partea vector a
47 acestui digest (care include resturile 1-23 ale OPG și Fc).

RO 122495 B1

Regiunea cADN a proteinei de legare OPG murină care codifică resturile aminoacide	1
69-316 s-au amplificat PCR folosind Pfu Polymerase (Stratagene, San Diego, CA) de la	
matrița plasmidică folosind primerii oligonucleotidelor următoare:	3
1602-61: CCT CTA GGC CTG TAC TTT CGA GCG CAG ATG (SECV. ID NR: 27)	
1602-59: CCT CTG CGG CCG CGT CTA TGT CCT GAA CTT TG (SECV. ID NR: 28)	5
Oligonucleotida 1602-61 amplifică capătul 5' al genei și conține un situs artificial Stul.	
Primerul 1602-59 amplifică capătul 3' al genei și conține un situs artificial NotI. Produsul PCR	7
rezultant obținut s-a digerat cu NotI și Stul, apoi s-a purificat pe gel. Produsul PCR purificat	
s-a ligat cu vector, apoi s-a folosit pentru a transforma celulele <i>E.coli</i> DH10B electrocompe-	9
tente. Clona rezultantă s-a secvențat pentru a confirma integritatea secvenței amplificate și	
joncțiunile situsului de restricție. Această plasmidă s-a folosit apoi pentru a transfecta fibro-	11
blaste 293 umane și proteina de legare OPG-proteina de fuziune Fc se colectează din mediul	
de cultură cum s-a descris anterior în cererea US 08/577.788 , depusă la 22 decembrie 1995.	13
Folosind o strategie similară, un vector de expresie s-a desemnat că este capabil să	
exprime o trunchiere N-terminală a domeniul IgG1 Fc uman fuzionat. Acest construct constă	15
din peptida semnal OPG murină (rest aa 1-21), fuzionat în cadru la 158-316 resturi de	
proteină de legare OPG, urmat de o fuziune în cadru la domeniul IgG1 Fc uman. Pentru a	17
face aceasta, vectorul plasmidian pCEP4/OPG [22-401] murin (cererea US 08/577.788	
depusă la 22 decembrie 1995), s-a digerat cu HindIII și NotI pentru a îndepărta întregul cadru	19
de citire OPG. Proteina de legare OPG murină, resturile 158-316 s-au aplicat PCR folosind	
de la matrița plasmidică pCDNA/32D-F3 folosind următorii primeri:	21
1616-44: CCT CTC TCG AGT GGA CAA CCC AGA AGC CTG AGG CCC AGC CAT	
TTG C(SECV. ID NR: 29)	23
1602-59: CCT CTG CGG CCG CGT CTA TGT CCT GAA CTT TG (SECV. ID NR: 30)	
1616-44 aplică proteina de legare OPG plecând de la restul 158 conținând, de	25
asemenea, resturile 16-21 ale peptidei semnal muOPG cu un situs XhoI artificial. 1602-59	
amplifică capătul 3' al genei și adăugă un situs NotI în cadru. Produsul PCR s-a digerat cu	27
NotI și XhoI și apoi s-a purificat pe gel.	
Următorii primeri complementari s-au normalizat unul pe altul pentru a forma un	29
adaptor care codifică peptida semnal OPG murină și secvența Kozak care înconjoară situsul	
de inițiere a transcrierii:	31
1616-41: AGC TTC CAC CAT GAA CAA GTG GCT GTG CTG CGC ACT CCT GGT GCT	
CCT GGA CAT CA (SECV. ID NR: 31)	33
1616-42: TCG ATG ATG TCC AGG AGC AGG AGT GCG CAG CAC AGC CAC TTG TC	
ATG GTG GA (SECV. ID NR: 32)	35
Acești primeri s-au normalizat, generând o proeminență 5' compatibilă cu HindIII pe	
capătul 5' și XhoI pe capătul 3'. Vectorul digerat obținut mai sus, oligo normalizat și	37
fragmentul PCR digerat s-au ligat împreună și s-au electroporat în celule DH10B. Clona	
rezultantă s-a secvențat pentru a confirma reconstrucția autentică a legăturii între peptida	39
semnal, fragmentul proteinei de legare OPG care codifică resturile 158-316 și domeniul IgG1	
Fc. Plasmida recombinantă s-a purificat, transfectat în fibroblaste umane 293 și s-a exprimat	41
ca un produs mediu condiționat așa cum s-a descris mai sus.	
ADNc-uri murine și umane de lungime întregă s-au clonat în vectorul de expresie	43
pCEP4 (Invitrogen, San Diego, CA) apoi s-au transfectat în culturi de fibroblaste 293 umane	
așa cum s-a descris în Exemplul 1. Culturile de celule s-au selectat cu higromicină, așa cum	45
s-a descris mai sus, și s-a preparat mediul condiționat fără ser. Mediul condiționat s-a expus	

RO 122495 B1

1 la o coloană de OPG recombinant imobilizat și formele difuzate ale OPG bp recombinante
murine și umane s-au purificat prin afinitate. Analiza secvenței N-terminale a proteinelor de
3 legare OPG clivată de preferință înainte de restul omolog, izoleucina 140. Suplimentar, pro-
teina umană se clivează, de preferință, înainte de glicina 145. Aceasta sugerează că forme
5 solubile întâlnite natural ale proteinei de legare OPG umană au resturi de aminoacizi fie la
izoleucina la poziția 40, fie glicină la poziția 145.

7 **Exemplul 11. Peptide ale proteinei de legare OPG și prepararea anticorpilor
policlonali și monoclonali la proteină**

9 Anticorpi la regiunile specifice ale proteinei de legare OPG se pot obține prin
imunizarea cu peptide de la proteina de legare OPG. Aceste peptide se pot folosi singure,
11 sau se pot folosi forme conjugate ale peptidei pentru imunizare.

13 Structura cristalină a TNF α matură a fost descrisă [E.Y. Jones, D.I. Stuart și N.P.C.
Walker (1990) J. Cell Sci. Suppl, 13, 11.18] și monomerul formează un sandwich plan β -pliat
antiparalel cu o topologie jelleiformă, jellyroll. S-au observat 10 fâșii- β antiparalele în această
15 structură cristalină și se formează un sandwich beta cu un plan beta constând din fâșii
B'BIDG și altul din fâșii C'CHEF [E.Y. Jones și al., ibid.]. Au fost implicate două bucle de
17 TNF α matur de la studii de mutagenză pentru a face contacte cu receptorul, acestea fiind
buclele formate între fâșia beta B & B' și bulca dintre fâșiile beta E & F [C.R. Goh, C-S. Loh
19 și A.G. Porter (1991) Protein Engineering 4, 785-791]. Structura cristalină a complexului
format între TNF β și domeniul extracelular al receptorului TNF 55 kd (TNFA-R55) s-a dizolvat
21 și s-au descris contactele receptor-ligand [D.W. Banner, A.D'Arcy, W. James, R. Gentz, H-J.
Schoenfeld, C. Broger, H. Loetscher și W. Lesslauer (1993) Cell 73, 431-445]. În conformitate
23 cu studiile mutagenezei descrise mai sus [C.R. Goh și colab., ibid] buclele BB' și EF
corespunzătoare ale TNF β ligand s-au găsit a produce majoritatea contactelor cu receptorul
25 în structura cristalină redizolvată a complexului TNF β :TNF-R55. Secvența de aminoacizi a
proteinei de legare OPG s-a comparat cu secvența de aminoacizi a proteinei de legare OPG
27 s-a comparat cu secvențele de aminoacizi ale TNF α și TNF β . Regiunile proteinei de legare
OPG corespunzătoare buclelor BB' și EF s-au anticipat pe baza acestei comparații și pepti-
29 dele s-au desemnat și s-au descris mai jos.

A. Antigen(i):

31 Proteina de legare OPG murină recombinantă [158-316] s-a folosit ca un antigen (ag)
pentru imunizarea animalelor cum s-a descris mai jos și serul s-a examinat folosind
33 demersurile descrise mai jos. Peptidele până la buclele BB' și EF probabile ale proteinei de
legare OPG murină s-au sintetizat și se vor folosi pentru imunizare; aceste peptide sunt:

35 Peptida buclei BB': NH₂--NAASIPSGSHKVTLSSWYHDRGWAKIS--
COOH (SECV. ID NR: 33)

37 Peptida buclei-Cys BB': NH₂-- NAASIPSGSHKVTLSSWYHDRGWAKISC--COOH
(SECV. ID NR: 34)

39 Peptida buclei EF: NH₂--VYVVKTSIKIPSSHNLN--COOH (SECV. ID NR: 35)

41 Peptida buclei-Cys EF: NH₂--VYVVKTSIKIPSSHNLNMC--COOH
(SECV. ID NR: 36)

43 Peptide cu un rest cisteină carboxi-terminal s-au folosit pentru conjugare utilizând
demersuri descrise în B de mai jos și s-au folosit pentru imunizare.

B. Conjugare hemocianină de melc turtit sau albumină serică bovină:

45 Peptide sau fragmente de proteină selectate se pot conjuga la hemocianină de melc
turtit (KLH) cu scopul de a crește imunogenicitatea lor la animale, de asemenea, peptide sau
47 fragmente de proteină conjugate de albumină serică bovină (BSA) se pot utiliza în protocolul
EIA. Imject Maleimide Activated KLH sau BSA (Pierce Chemical Company, Rockford, IL) se

RO 122495 B1

reconstituie în dH₂O până la o concentrație finală de 10 mg/ml. Peptida sau fragmentul de proteină s-a dizolvat în tampon fosfat apoi s-a amestecat cu o masă echivalentă (g/g) de KLH sau BSA. Conjugarea se lasă să reacționeze timp de 2 ore la temperatura camerei (te) cu agitare blândă. Soluția s-a trecut apoi pe o coloană de desalinizare sau s-a dializat contra PBS peste noapte. Conjugatul peptidă se depozitează la -20°C până la folosire în imunizări sau în EIA-uri.

C. Imunizare:

Șoareci Balb/c, șobolani Lou (Charles Rivers Laboratories, Wilmington, MA), sau iepuri albi New Zealand s-au injectat subcutanos (SQI) cu ag (50 μg, 150 μg, și respectiv, 100 μg) emulsificat în adjuvatul complet al lui Freund (CFA, 50% vol/vol; Difco Laboratories, Detroit, MI). Apoi, iepurii s-au suplimentat de două sau trei ori la intervale de 2 săptămâni cu antigen preparat în mod similar, în adjuvatul incomplet al lui Freund (ICFA; Difco Laboratories, Detroit, MI). Șoarecii și șobolanii s-au suplimentat aproximativ la fiecare 4 săptămâni. La șapte zile după cea de-a doua suplimentare, s-a realizat testul recoltării de sânge și s-au determinat titrurile de anticorp din ser. Când s-a dezvoltat la iepuri, recoltarea săptămânală de 50 ml sânge s-a luat timp de 6 săptămâni consecutive. Șoarecii și șobolanii s-au selectat pentru producerea de hibridoma pe baza nivelurilor de titru în ser; s-au folosit animale cu titruri jumătate din maxim mai mari de 5000. Corecțiile la acest protocol se pot aplica de către un specialist în domeniu; de exemplu, diferite tipuri de imunomodulatori sunt acum disponibili și pot fi încorporate în acest protocol.

D. Testul imunoabsorbant de legat enzima (EIA):

EIA-urile se vor realiza pentru a determina titrurile de anticorp (ab) din ser al animalelor individuale și mai târziu pentru cercetarea hibridomilor potențiali. Plăci de microtitrare cu fund plat EIA/RIA cu 96 godeuri (Costar Corporation, Cambridge, MA) se vor acoperi cu proteină sau fragment de proteină recombinante purificate (antigen, ag) la 5 μg per ml în tampon carbonat-bicarbonat, pH 9,2 (0,015 M Na₂CO₃, 0,035 M NaHCO₃) dacă este necesar se pot conjuga fragmente de proteină de albumină serică bovină (BSA). La fiecare godeu se adaugă 15 μl ag. Apoi plăcile se acoperă cu film de acetat la temperatura camerei (tc) pe o platformă rotitoare sau peste noapte la 4°C. Plăcile s-au blocat timp de 30 minute la temperatura camerei cu 250 μl per godeu soluție 5% BSA preparată prin amestecarea a 1 parte BSA diluant/ concentrat soluție de blocare (Kirkegaard și Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) cu 1 parte apă deionizată (dH₂O). Soluția de blocare se îndepărtează și la fiecare godeu se adaugă 50 μl diluții 2X ser (1:100 până la 1:12.800) sau supernatante din cultura de țesut hibridoma. Diluantul pentru ser este BSA 1% (10% BSA diluant/ concentrat soluție de blocare diluat 1:10 în soluție salină tamponată fosfat Dulbecco, D-PBS; Gibco BRL, Grand Island, NY) în timp ce supernatantele hibridoma se testează nediluate. În cazul cercetării hibridoma, un godeu se menține ca un martor pentru conjugat și al doilea godeu ca martor pentru Ab pozitiv. Plăcile se incubează din nou la temperatura camerei, se rotesc timp de 1 oră, apoi se spală de 4 ori folosind 1x preparare soluție de spălare 20x concentrată (Kirkegaard și Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD) în dH₂O. Peroxidază de hrean conjugată cu Ac secundar (Boeringer Lannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) diluat în 1% BSA apoi fiecare godeu este incubat timp de 30 minute. Plăcile se spală ca mai înainte, se colorează în pete și se adaugă apoi substratul de component simplu de peroxidază ABTS (Kirkegaard și Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD). Absorbanța se citește la 405 nm pentru fiecare godeu folosind un cititor Microplat EL310 (Bio-tek Instruments, Inc., Winooski, VT). Titrul jumătate maximal al anticorpului din ser se calculează prin reprezentare grafică a log₁₀ a diluției de ser față de densitatea optică la 405, apoi extrapolare la 50% punct al densității optice maxime obținută prin acest ser. Se selectează hibridoma ca pozitivă dacă densitatea optică înregistrează mai mult decât 5 ori mai mare decât baza. Se pot aplica corecții la acest protocol; în exemplu, anticorpul conjugat secundar se poate alege pentru specificitate sau reactivitate neîncrucișată.

1 E. Fuziune celulară:

3 Animalul selectat pentru producerea de hibridoma se injectează intravenos cu 50
până la 100 µg Ag în PBS. Patru zile mai târziu, animalul se sacrifică cu dioxid de carbon și
splina sa se colectează în condiții sterile în mediu Eagle modificat Dulbecco conținând 100
5 U/ml Penicilină G, 200 µg/ml sulfat de streptomycină și 4 mM glutamină (2x P/S/G DMEM).
Splina se curăță de excesul de țesut gras, apoi se clătește prin 4 vase cu 2x P/S/G DMEM.
7 Se transferă apoi la o pungă stomacală sterilă (Tekmar, Cincinnati, OH) care conține 10 ml
2x P/S/G DMEM și se distruge până la suspensie de celule simple cu Stomacher Lab
9 Blender 80 (Seward Laborator UAC House; London, England). Deoarece celulele se eli-
berază din capsula splinei în mediu, se îndepărtează din pungă și se transferă la un tub steril
11 de centrifugă conică de 50 ml (Becton Dickinson and Company, Lincoln Park, NJ). Mediu
proaspăt se adaugă la pungă și procedeul se continuă până când întregul conținut de celule
13 se eliberează din splină. Aceste splenocite se spală de 3 ori prin centrifugare la 225 x g timp
de 10 minute.

15 În mod concurențial, culturile în faza log din celule mielomice, Sp2/0-Arl4 sau Y3-
Agl.2.3 pentru splenocite de șoarece sau șobolan fuzionate, respectiv (American Type
17 Culture Collection; Rockville, MD) crescute în mediu complet (DMEM, 10% ser bovin fetal
inactivat, 2 mM glutamină, 0,1 mM aminoacizi neesențiali, 1 mM piruvat de sodiu și 10 mM
19 tampon hepes; Gibco Laboratories, Grand Island, NY) se spală în mod similar. Splenocitele
se combină cu celule mielomice și se peletează încă o dată. Mediul se aspiră de la peletul
21 de celule și 2 ml polietilen glicol 1500 (PEG 1500; Boehringer Mannheim Biochemicals,
Indianapolis, IN) se amestecă blând în celule pe durata a 1 minut. După aceasta se adaugă
23 încet un volum egal de 2x P/S/G DMEM. Celulele sunt lăsate să fuzioneze la 37°C timp de
2 minute, apoi se adaugă suplimentar 6 ml 2x P/S/G DMEM. Celulele se lasă din nou să stea
25 la 37°C timp de 3 minute. În final, se adaugă 35 ml 2x P/S/G DMEM la suspensia de celule
și celulele se peletează prin centrifugare. Mediul se aspiră de la pelet și celulele se resu-
27 spensă blând în mediu complet. Celulele se distribuie în plăci pentru cultură de țesut cu fund
plat cu 96 de godeuri (Becton Dickinson Labware; Lincoln Park, NJ) prin picături simple de
29 la o pipetă de 5 ml. Plăcile se incubează peste noapte în condiții de umiditate la 37°C, 5%
CO₂. A doua zi, la fiecare godeu se adaugă un volum egal de mediu selecționat. Selecțio-
31 narea constă din 0,1 mM hipoxantină, 4x10⁻⁴ mM aminopterină și 1,6x10⁻² mM timidină în
mediu complet. Plăcile fuzionate se incubează timp de 7 zile urmat de 2 schimbări de mediu
33 în timpul următoarelor 3 zile; mediu selecționat HAT se folosește după fiecare schimbare de
fluid. Supernatantele culturii celulare se iau 3 până la 4 zile după ultima schimbare de fluid
35 pentru fiecare godeu care conține hibrid și se testează prin EIA pentru reactivitate anticorp
specifică. Acest protocol se modifică prin cel din Hudson și Hay, "Practical Immunology,
37 Second Edition", Blacwell Scientific Publications.

39 **Exemplul 12.** *Clonarea unui receptor proteină de legare OPG exprimat pe celule
precursor hematopoietic*

41 Proteina de legare OPG murină recombinantă [158-316] biologic activă s-a conjugat
la fluorescein-izotiocianat (FITC) pentru a genera o sondă fluorescentă. Marcarea fluores-
43 centă s-a realizat prin incubarea proteinei de legare OPG murină recombinantă [158-316]
cu esterul succinimidilic al acidului 6-fluorescein-5-(și 6) carboxiamido hexanoic (Molecular
45 Probes, Eugene, OR) la un raport molar 1:6 timp de 12 ore la 4°C. Proteina de legare OPG
marcată-FITC [158-316] s-a purificat suplimentar prin cromatografie cu filtrare pe gel. Celu-
47 lele din măduva osoasă de șoarece s-au izolat și s-au incubat în cultură în prezența CSF-1
și proteinei de legare OPG [158-316] așa cum s-a descris în Exemplul 10. Celule din măduva
osoasă de șoarece s-au cultivat peste noapte în CSF-1 (30 ng/ml) și proteină de legare OPG

RO 122495 B1

[158-316] (20 ng/ml). Celulele neaderente s-au îndepărtat mai întâi și s-au colectat pe gheață și celulele aderente rămase s-au îndepărtat prin incubare cu tampon pentru disocierea celulelor (Sigma Chemicals, St. Louis, MO), s-au depozitat cu populația neaderentă și apoi s-au colorat cu FITC-proteină de legare OPG așa cum s-a descris mai sus. După spălare și resuspendare în PBS cu 0,5% BSA, celulele s-au expus la FITC-proteină de legare OPG, s-au spălat, apoi s-au ales prin FACS. Populația de celule care au fost pozitive pentru colorare cu FITC-proteină de legare OPG s-au colectat și s-a izolat ARNm așa cum s-a descris în Exemplul 2. Această preparare a ARNm s-a folosit pentru a face o bancă ADNc urmând procedurile descrise în Exemplul 2.

Banca ADNc produsă de la această sursă s-a folosit pentru analiza aleatorie a secvenței EST așa cum s-a descris anterior în publicația **PCT W097/23614** și în Simonet și colab., (Cell 81, 309-319 (1997)). Folosind această metodă s-a detectat un cADN de -2,1 kb care codifică o nouă proteină înrudită -TNFR. Cadrul de citire larg deschis al ADNc ODAR murină codifică o proteină de 623 resturi de aminoacizi și conține trăsături caracteristice ale proteinelor înrudite TNFR: o peptidă semnal hidrofobă la N-terminalul său, patru secvențe tandem repetat bogate în cisteină, un domeniu transmembrantar hidrofobic și un domeniu citoplasmatic de semnalizare. Omologia acestei proteine cu alți membri ai familiei receptorului TNF și expresia sa în celulele măduvei osului care leagă proteina de legare OPG marcată FITC sugerează că este un receptor potențial pentru proteina de legare OPG înrudită TNF. Această proteină este desemnată ODAR, sau receptor de diferențiere și activare a osteoclastului. Secvența acidului nucleic și secvența aminoacidă anticipată a ODAR murină sunt arătate în fig. 10.

Analize recente ale secvențelor din baze de date disponibile publicului arată că această proteină este omologul murin al proteinei înrudite TNFR umană cunoscută ca RANK (Anderson et al., Nature 390, 175-179 (1997)).

Exemplul 13. Producerea proteinei ODAR recombinantă în celule de mamifer

Un domeniu extracelular ODAR solubil fuzionat la regiunea Fc a IgG₁ umană s-a produs folosind procedurile pentru construirea și expresia proteinelor de fuziune Fc așa cum s-a descris anterior în **W09/23614** și în Simonet et al., *supra*. Pentru a genera proteina ODAR solubilă în celule de mamifer, domeniu extracelular care codifică cADN al ODAR murină (aminoacizi 27-211) s-a amplificat PCR cu setul următor de primeri oligonucleotidici

5' TCT CCA AGC TTG TGA CTC TCC AGG TCA CTC C-31 (SECV. ID NR: 37)
5' TCT CCG CGG CCG CGT AAG CCT GGG CCT CAT TGG GTG-3' (SECV. ID NR: 38)

Reacțiile PCR s-au realizat într-un volum de 50 μl cu 1 unitate de polimerază ADN aerisită (New England Biolabs) în 20 mM Tris-HCl pH 8,8, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Triton-X100, 10 μM din fiecare dNTP, 1 μM din fiecare primer și 10 ng matrită ODAR cADN. Reacțiile s-au realizat la 94°C timp de 30 sec, 55°C timp de 30 sec și 72°C timp de 1 min, pentru un total de 16 cicluri. Fragmentul PCR s-a izolat prin electroforeză. Fragmentul PCR creează un sit de restricție Hind III la capătul 5' și un sit de restricție Not I la capătul 3'. Fragmentul PCR digerat Hind III-Not I s-a subclonat apoi în cadru într-un vector pCEP4-Fc modificat în fața secvenței cu catenă grea IgG-yl umană cum s-a descris anterior în **W097/23614** și în Simonet et al. *supra*). S-a introdus un linker care codifică doi aminoacizi neimportanti care cuprind joncțiunea între domeniul ODAR extracelular și regiunea IgG Fc.

Constructul s-a digerat apoi cu Nhe I și Hind III și următoarea pereche de oligonucleotide normalizate care codifică peptida semnal OPG (aminoacid 1-21) s-a inserat în cadru:

5' CTA GCA CCA TGA ACA AGT GGC TGT GCT GCG CAC TCC TGG TGC TCC TGG ACA TCA TTG AAT GGA CAA CCC AGA-3' (SECV. ID NR: 39)

5' AGC TTC TGG GTT GTC CAT TCA ATG ATG TCC AGG AGC ACC AGG AGT GCG CAG CAC AGC CAC TTG TTC ATG GTG-3' (SECV. ID NR: 40)

RO 122495 B1

1 Un linker care codifică doi aminoacizi neimportanti s-a introdus între peptida semnal
OPG și secvențe ODAR. Constructul programat final (ODAR-Fc/pCEP4) codifică o proteină
3 de fuziune conținând de la amino terminus până la carboxi terminus: peptida semnal OPG
(aminoacizi 1-21)-linker (LysLeu)-ODAR (aminoacizi 27-211)-linker (AlaAla)-IgG Fc umană.

5 Constructul s-a transfectat în celule 293-EBNA-1 prin metoda fosfat de calciu așa
cum s-a descris (Ausubel et al., Curr. Prot. Mol. Biol. 1, 9.1.1.-9.1.3, (1994)). Celulele
7 transfectate s-au selectat apoi în 200 μg/ml higromicină (GibcoBRL) și culturile de masă
rezistente la medicament rezultate s-au colectat și cresc la confluență. Celulele s-au spălat
9 în PBS o dată și apoi s-au cultivat în mediu fără ser timp de 72 ore. Mediul condiționat s-a
colectat. Proteina de fuziune ODAR-Fc în mediu s-a detectat prin analiza blot western cu
11 anticorp IgG Fc anti-umană.

Proteina de fuziune Fc s-a purificat prin cromatografie pe coloană proteină-A (Pierce)
13 folosind procedurile recomandate de fabricant. Apoi 15 pmoli proteină purificată s-au supus
analizei secvenței N-terminale prin degradare automată Edman așa cum s-a descris în
15 principal de către Matsudaira și colab., (J.Biol. Chem. 262, 10-35 (1987)). Următoarea
secvență aminoacidică s-a citit după 10 cicluri:

17 NH₂- K L V T L Q V T P-CO₂H.

Activitatea de legare a ODAR-Fc cu proteina de legare OPG s-a examinat prin
19 colorare imunofluorescentă a culturilor de celule COS-7 transfectate așa cum s-a descris în
Exemplul 2. Celulele COS-7 s-au lipofectat cu 1 μg vector de expresie conținând ADN care
21 codifică proteina de legare OPG murină. După 48 ore de incubare, celulele s-au incubat apoi
în soluție PBS-FBS care conține 10 mg/μl IgG Fc uman, ODAR-Fc, sau proteină OPG-Fc la
23 4°C timp de 1 oră. Apoi celulele s-au spălat cu PBS de două ori și apoi s-au incubat în soluție
PBS-FBS care conține 20 μl/ml IgG capră anti-uman marcat FITC (Southern Biotech
25 Associates) pentru altă oră. După spălare cu PBS, celulele s-au examinat prin microscopie
confocală (ACAS, Ultima, Insight Biomedical Imaging, Inc., Okemos, MI). Atât ODAR-Fc cât
27 și OPG-Fc se leagă la celule COS-7 OPGL transfectate (fig. 11).

29 **Exemplul 14. Activitatea biologică in vitro a ODAR solubilă recombinantă**

Capacitatea ODAR de a stimula inhibarea formării osteoclastului prin proteina de
legare OPG s-a evaluat într-o cultură de măduvă osoasă de șoarece în prezență de CSF-1
31 (30 ng/ml) și proteină de legare OPG (5 ng/ml). Procedurile pentru folosirea culturilor de
măduvă osoasă pentru a studia maturizarea osteoclastului sunt descrise în **W097/23614** și
33 în Exemplul 8. ODAR-proteina de fuziune Fc produsă cum s-a descris în Exemplul 12 s-a
adăugat la concentrații de 65 până la 1500 ng/ml. Formarea osteoclastului s-a estimat prin
35 citochimie fosfatazei alcaline rezistente la tartrat (TRAP) și analiza soluției TRAP după cinci
zile în cultură.

37 O inhibare dependentă de doză a formării osteoclastului prin fuziune ODAR-Fc s-a
observat atât prin citochimie cât și prin activitate TRAP (fig. 12). ODAR-proteina de fuziune
39 Fc a inhibat formarea osteoclastului cu un ED₅₀ de aproximativ 10...50 ng/ml.

41 **Exemplul 15. Activitatea biologică in vivo a ODAR solubilă recombinantă**

41 Șoareci BDF1 masculi tineri care cresc rapid, în vârstă de 3-4 săptămâni au primit
diferite doze de ODAR-proteină de fuziune Fc printr-o singură injecție subcutanoasă zilnic
43 în purtător (PBS/0,1% BSA) timp patru zile. În ziua 5 șoarecii s-au iradiat cu raze X. Dozele
de ODAR-proteină de fuziune Fc folosite au fost 0,5, 1,5 și 5 mg/kg/zi. Pentru fiecare
45 tratament, toți șoarecii din acest grup și din grupul de control care au primit PBS/0,1% BSA
s-au iradiat cu raze X cu un singur film.

RO 122495 B1

Regiunea metafizală tibială proximală s-a comparat între perechile de control și tibiile tratate și s-a înregistrat ca un "+" dacă tibia tratată a fost mai densă prin evaluarea vizuală decât controlul care dă 8 scoruri arătate mai jos. Un scor arbitrar de 5/8 s-a cerut pentru un rezultat "pozitiv". (Doza este în mg/kg/zi). (n=4).

După sacrificare, s-a îndepărtat tibia dreaptă de la fiecare animal și s-a măsurat densitatea osului în metafiza tibială proximală prin tomografie computerizată periferică cantitativă (pQCT) (Stratec, Germany). S-au analizat două secțiuni încrucișate de 0,5 mm din os, 1,5 mm și 2,0 mm de la capătul apropiat a tibiei (XMICE 5,2, Stratec, Germany) pentru a determina densitatea minerală totală a osului în metafiza. S-a folosit o separare de țesut moale limitată la 1500 pentru a defini granița osului metafiseal.

Administrarea ODAR-Fc la șoareci tineri în creștere a inhibat resorbția osului la placa de creștere tibială proximală care produce o regiune a densității osului crescută care s-a evidențiat vizual prin radiografii. Schimbările radiografice au apărut la o doză de 1,5 mg/kg/zi și mai sus în două experimente (Tabel). Măsurarea densității osului prin pQCT în probe de la al doilea experiment într-o regiune similară a tibiei a confirmat dependența de doză crescută în densitatea osului la acești șoareci (fig. 13).

Inhibarea resorbției osului prin ODAR-proteină de fuziune Fc

Experiment #1

Factor	Doză	1 2 3 4 5 6 7 8	Rezultat
ODAR-Fc	5,0	++++++	Pozitiv 8/8
ODAR-Fc	1,5	-+++++	Pozitiv 6/8
ODAR-Fc	0,5	- - - - -	Negativ 0/8
ODAR-Fc	0,15	- - - - -	Negativ 0/8

Experiment #2

Factor	Doză	1 2 3 4 5 6 7 8	Rezultat
ODAR-Fc	5,0	++++++	Pozitiv 8/8
ODAR-Fc	1,5	++++++	Pozitiv 8/8
ODAR-Fc	0,5	- - + - -	Negativ 1/8

În timp ce prezenta invenție a fost descrisă în termenii realizărilor preferate, este de înțeles că variantele și modificările vor fi disponibile celor cu pregătire în domeniu. Totuși, se intenționează ca revendicările anexate să acopere total astfel de variante echivalente care sunt cuprinse în întinderea invenției așa cum s-au revendicat.

Revendicări

1. Utilizarea unui anticorp sau a unui fragment al acestuia pentru prepararea unui medicament pentru prevenirea sau tratamentul unei boli a oaselor, în care anticorpul se leagă la o proteină de legare a osteoprotegerinei (OPGbp) din SECV. ID NR.: 4 și este un antagonist al OPGbp.

2. Utilizare conform revendicării 1 în care anticorpul este un anticorp monoclonal.

3. Utilizare conform revendicării 1 în care anticorpul este un anticorp recombinant.

RO 122495 B1

- 1 4. Utilizare conform revendicării 1 în care anticorpul este un anticorp himeric sau un
anticorp grefat pe CDR.
- 3 5. Utilizare conform revendicării 1 în care anticorpul este un anticorp uman.
- 5 6. Utilizare conform revendicării 1 în care anticorpul se leagă la domeniul extracelular
al OPGbp din fig. 4 (SECV. ID NR.: 4) sau se leagă la un fragment al domeniului extracelular
al OPGbp.
- 7 7. Utilizare conform revendicării 1 în care anticorpul se leagă la o formă asociată la
o membrană a OPGbp din fig. 4 (SECV. ID NR.: 4).
- 9 8. Utilizare conform revendicării 1 în care anticorpul se leagă la o formă solubilă a
OPGbp din fig. 4 (SECV. ID NR.: 4).
- 11 9. Utilizare conform revendicării 8 în care forma solubilă a OPGbp cuprinde resturile
de amino-acizi 69-317 din fig. 4 (SECV. ID NR.: 4) sau un fragment al acestora.
- 13 10. Utilizare conform revendicării 1 în care anticorpul este prezent într-o cantitate efi-
cientă pentru a inhiba resorbția osoasă.
- 15 11. Utilizare în conformitate cu revendicarea 1 în care anticorpul sau fragmentul ace-
stuia este administrat împreună cu unul sau mai mulți dintre un factor morfogenic osos, un
17 factor de creștere de transformare beta, un membru al familiei de factor de creștere de trans-
formare beta, un factor de creștere a fibroblastelor, un inhibitor de interleukină-1, un inhibitor
19 de alpha TNF, hormon paratiroidian, o prostaglandină din seria E, un bifosfonat sau un
element mineral de îmbogățire a masei osoase.
- 21 12. Utilizare în conformitate cu revendicarea 1 în care boala de os este selectată
dintre osteoporoză, osteomielită, hipercalcemie, osteopenia asociată cu chirurgia, cu
23 administrarea de steroizi, sau cu imobilizarea, boala Paget, osteonecroză, pierdere osoasă
datorată artritei reumatoide, pierdere osoasă periodontală, stabilire a protezelor și metastaze
25 osteolitice.

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

GAGCTCGGAT CCACTACTCG ACCCACCGGT CCGGCCAGGA CCTCTGTGAA CCGGTCGGGG	60
CGGGGGCCGC CTGGCCGGGA GTCTGCTCGG CGGTGGGTGG CCGAGGAAGG GAGAGAAGGA	120
TCGGGAGCA GGGCGCCCGA ACTCCGGGG CCGGCC ATG CGC CGG GCC AGC CGA	175
Met Arg Arg Ala Ser Arg	5
1	
GAC TAC GGC AAG TAC CTG CGC AGC TCG GAG GAG ATG GGC AGC GGC CCC	223
Asp Tyr Gly Lys Tyr Leu Arg Ser Ser Glu Glu Met Gly Ser Gly Pro	20
10	
GGC GTC CCA CAC GAG GGT CCG CTG CAC CCC GCG CCT TCT GCA CCG GCT	271
Gly Val Pro His Glu Gly Pro Leu His Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala	35
25	
CCG GCG CCG CCA CCC GCC GCC TCC CGC TCC ATG TTC CTG GCC CTC CTG	319
Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met Phe Leu Ala Leu Leu	50
40	
45	

Fig. 1A

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

367	GGG CTG GGA CTG GGC CAG CTG GTC TGC AGC ATC GCT CTG TTC CTG TAC	70
	Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Ile Ala Leu Phe Leu Tyr	
	55	60
	65	
415	TTT CGA GCG CAG ATG GAT CCT AAC AGA ATA TCA GAA GAC AGC ACT CAC	85
	Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser Glu Asp Ser Thr His	
	75	80
	85	
463	TGC TTT TAT AGA ATC CTG AGA CTC CAT GAA AAC GCA GGT TTG CAG GAC	100
	Cys Phe Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn Ala Gly Leu Gln Asp	
	90	95
	100	
511	TCG ACT CTG GAG AGT GAA GAC ACA CTA CCT GAC TCC TGC AGG AGG ATG	115
	Ser Thr Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro Asp Ser Cys Arg Arg Met	
	105	110
	115	
559	AAA CAA GCC TTT CAG GCG GCC GTG CAG AAG GAA CTG CAA CAC ATT GTG	130
	Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val	
	120	125
	125	130

Fig. 1B

RO 122495 B1

(5) Int.Cl.

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

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

Fig. 1C

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

ACG TTA AGC AAC GGA AAA CTA AGG GTT AAC CAA GAT GGC TTC TAT TAC	799
Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr	
200	210
CTG TAC GCC AAC ATT TGC TTT CGG CAT CAT GAA ACA TCG GGA AGC GTA	847
Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr Ser Gly Ser Val	
215	225
CCT ACA GAC TAT CTT CAG CTG ATG GTG TAT GTC GTT AAA ACC AGC ATC	895
Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile	
235	240
AAA ATC CCA AGT TCT CAT AAC CTG ATG AAA GGA GGG AGC ACG AAA AAC	943
Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn	
250	255
TGG TCG GGC AAT TCT GAA TTC CAC TTT TAT TCC ATA AAT GTT GGG GGA	991
Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly	
265	270
	275

Fig. 1D

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

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

Fig. 1E

(51) Int.Cl.

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

CAATTTTGTA ATGATTTCCCT AGAATTGAAC CAGATTGGGA GAGGTATTCC GATGCTTATG 1376
 AAAAACTTAC ACGTGAGCTA TGGAAGGGGG TCACAGTCTC TGGGTCTAAC CCTGGGACAT 1436
 GTGCCACTGA GAACCTTGAA ATTAAGAGGA TGCCATGTCA TTGCAAAGAA ATGATAGTGT 1496
 GAAGGGTTAA GTTCTTTTGA ATTGTTACAT TGGCGTGGGA CCTGC AAATA AGTTC TTTT 1556
 TTCTAATGAG GAGAGAAAA TATATGTATT TTTATATAAT GTCTAAAGTT ATATTT CAGG 1616
 TGTAAATGTT TCTGTGCAAA GTTTTGTA AA TTATATTTGT GCTATAGTAT TTGATTCAAA 1676
 ATATTTAAA ATGTCTCACT GTTGACATAT TTAATGTTT AAATGTACAG ATGTATTTAA 1736
 CTGGTGCACT TTGTAAATTCC CCTGAAGGTA CTCGTAGCTA AGGGGGCAGA ATACTGTTTC 1796
 TGGTGACCAC ATGTAGTTTA TTTCTTTTATT CTTTTTAACT TAATAGAGTC TTCAGACTTG 1856

Fig. 1F

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

```
TCAAAACTAT GCAAGCAAAA TAAATPAAATA AAAATAAAAT GAATACCTTG AATAATAAGT 1916
AGGATGTTGG TCACCAGGTG CCTTTCAAAT TTAGAAGCTA ATTGACTTTA GGAGCTGACA 1976
TAGCCAAAAA GGATACATAA TAGGCTACTG AAATCTGTCA GGAGTATTTA TGCAATTATT 2036
GAACAGGTGT CTTTTTTTAC AAGAGCTACA AATTGTAAT TTGTGTTCTT TTTTTTCCCA 2096
TAGAAAATGT ACTATAGTTT ATCAGCCAAA AAACAATCCA CTTTTTAATT TAGTGAAAAGT 2156
TATTTTATTA TACTGTACAA TAAAAGCATT GTCTCTGAAT GTTAATTTTT TGGTACAAAA 2216
AATAAATTG TACGAAAACC TGAAAAAAA AAAAATAAAA AAAAAAGGG CGGCCGCTCT 2276
AGAGGGCCCT ATTCTATAG 2295
```

Fig. 1G

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

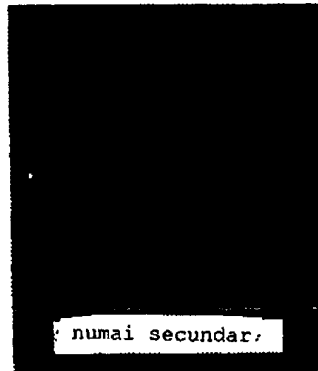


Fig. 2A

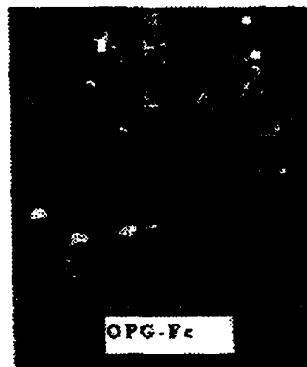


Fig. 2B

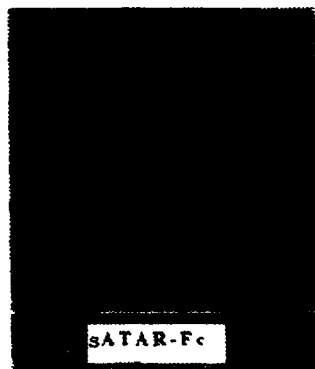


Fig. 2C

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

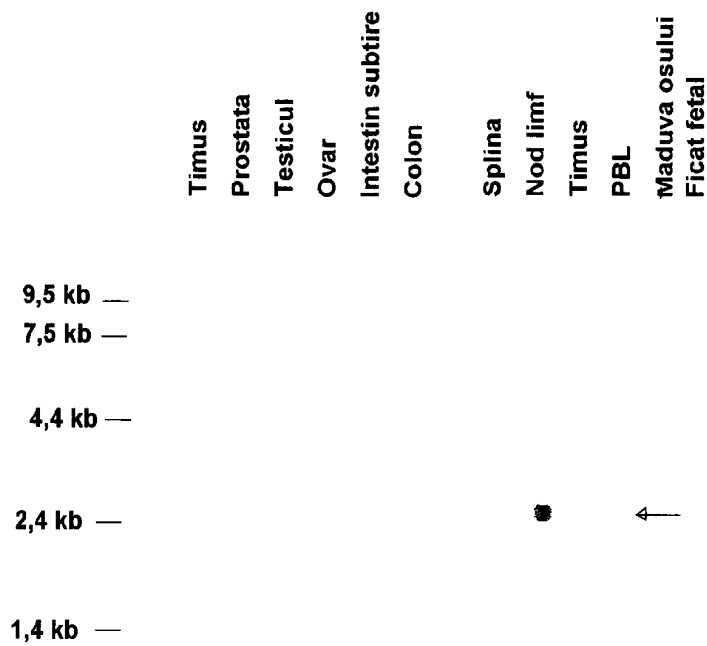


Fig. 3

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

```

10      30      50
AAGCTGGTACCGAGCTCGGATCCACTACTCGACCCACGGTCCGGCCGCCAGGAGCC

70      90      110
AAAGCCGGCTCCAAAGTCCGGCCCCCACGTCGAGGCTCCGCCCCAGCCTCCGGAGTTGGC

130     150     170
CGCAGACAAGAGGGGAGGGAGCGGGAGGAGGGAGGAGGCTCCGAAGCCGAGAGGCCGAG

190     210     230
CGCCATGGCCCGCCGAGCAGAGACTACACCAAGTACCTGGGTGGCTCGGAGGATGGG
M R R A S R D Y T K Y L R G S E M G

250     270     290
CGGGGGCCCCGGAGCCCCGACGAGGGCCCCCTGCACGCCCCCGCCGCTGGCCGCA
G G P G A P H E G P L H A P P P A P H

310     330     350
CCAGCCCCCGCCCTCCCGCTCCATGTTCTGTTGGCCCTCCCTGGGGCTGGGCCA
Q P P A A S R S M F V A L L G L G L G Q

370     390     410
GGTGTCTGCAGCGTCCGCCCTGTTCTTCTATTTTCAGAGCCGAGATGGATCCTAATAGAT
V V C S V A L F F Y F R A Q M D P N R I
```

Fig. 4A

(51) Int.Cl.

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

430 450 470
 ATCAGAAGATGGCACTCACTGCATTTATAGAAATTTTGAGACTCCATGAAAATGCAGATTT
 S E D G T H C I Y R I L R L H E N A D F

490 510 530
 TCAAGACACAACCTCTGGAGAGTCAAGATACAAAATTAATACTGATTCATGTAGGAGAAT
 Q D T T L E S Q D T K L I P D S C R R I

550 570 590
 TAAACAGGCCCTTTC AAGGAGCTGTGCAAAAAGGAATTACAACATATCGTTGGATCACAGCA
 K Q A F Q G A V Q K E L Q H I V G S Q H

610 630 650
 CATCAGAGCAGAGAAAGCGATGGTGGATGGCTCATGGTTAGATCTGGCCCAAGAGGAGCAA
 I R A E K A M V D G S W L D L A K R S K

670 690 710
 GCTTGAAGCTCAGCCTTTTGCTCATCTCACTATTAATGCCACCGACATCCCATCTGGTTC
 L E A Q P F A H L T I N A T D I P S G S

730 750 770
 CCATAAAGTGAGTCTGTCCCTCTGGTACCATGATCGGGTGGCCCAAGATCTCCAACAT
 H K V S L S S W Y H D R G W A K I S N M

Fig. 4B

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

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

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

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

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

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

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

Fig. 4C

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

```
1150      1170      1190
CCCAGTTTGGAGTGTATGTATTCCCTGGATGTTGGAAACATTTTAAACAAGCC
1210      1230      1250
AAGAAAGATGTATATAGGTGTGAGACTACTAAGAGGCATGGCCCCAACGGTACACGAC
1270      1290      1310
TCAGTATCCATGCTCTTGACCTTGTAGAGAAACACCGGTATTACAGCCAGTGGGAGATGT
1330      1350      1370
TAGACTCATGGTGTACACAATGGTTTTTAAATTTGTAATGAATTCCTAGAATTAA
1390      1410      1430
CCAGATTGGAGCAATTACGGGTTGACCTTATGAGAAACTGCATGTGGGCTATGGGAGGGG
```

Fig. 4D

RO 122495 B1

(5) Int.Cl.

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

```
1450          1470          1490
TTGGTCCCCTGATGTGCCCCCTCGCAGCTGAAGTGGAGAGGGTGTCTATCTAGCGCAAT

1510          1530          1550
TGAAGGATCATCTGAAGGGGCAAAATTCCTTTTGAATTGTTACATCATGCTGGAACCTGCCAA

1570          1590          1610
AAAAFACTTTTTCTAAATGAGGAGAGAAAATAATATGTATTTTTATATAATAATCTAAAGTTA

1630          1650          1670
TATTTTCAGATGTAATGTTTTCTTTGCAAAGTATTGTAATAATATATTTGTGCTATAGTATT

1690          1710          1730
TGATTCAAAATATTTAAAAATGCTCTTGCTGTGACRTATTTAATGTTTTAAATGTACAGA

1750          1770          1790
CATATTTAACTGGTGCACCTTTGTAAATTCCTGGGAAACTTGCAGCTAAGGAGGGGAA

1810          1830          1850
AAAAATGTTGTTCCCTAATATCAAATGCAGTATATTTCTTCGTTCTTTTAAAGTTAATAG
```

Fig. 4E

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

```
1870          1890          1910
ATTTTTCAGACTTGTCAAGCCCTGTGCAAAAATAATAATGGATGCCCTTGAATAAAG

1930          1950          1970
CAGGATGTTGGCCACCAGGTGCCCTTTCAAATTTAGAAACTAATGACTTTAGAAAGCTGA

1990          2010          2030
CATTGCCAAAAGGATACATAATGGGCCACTGAAATCTGTCAAGAGTAGTTATAAATTG

2050          2070          2090
TTGAAACAGGTGTTTTCCACAAGTGCCGCAAAATGTACCTTTTTTTTTCAAAATAG

2110          2130          2150
AAAAGTTATTAGTGGTTATCAGCAAAAAGTCCCAATTTTAAATTTAGTAAATGTTATCTT

2170          2190          2210
ATACTGTACCAATAAAAACATTGCCCTTTGAAATGTTAAATTTTTTGGTACAAAATAAATTTA

2230          2250          2270
TATGAAAAAAAATAAAAAGGGGGCCCTCTAGAGGGCCCTATTCTATAG
```

Fig. 4F

(51) Int.Cl.

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

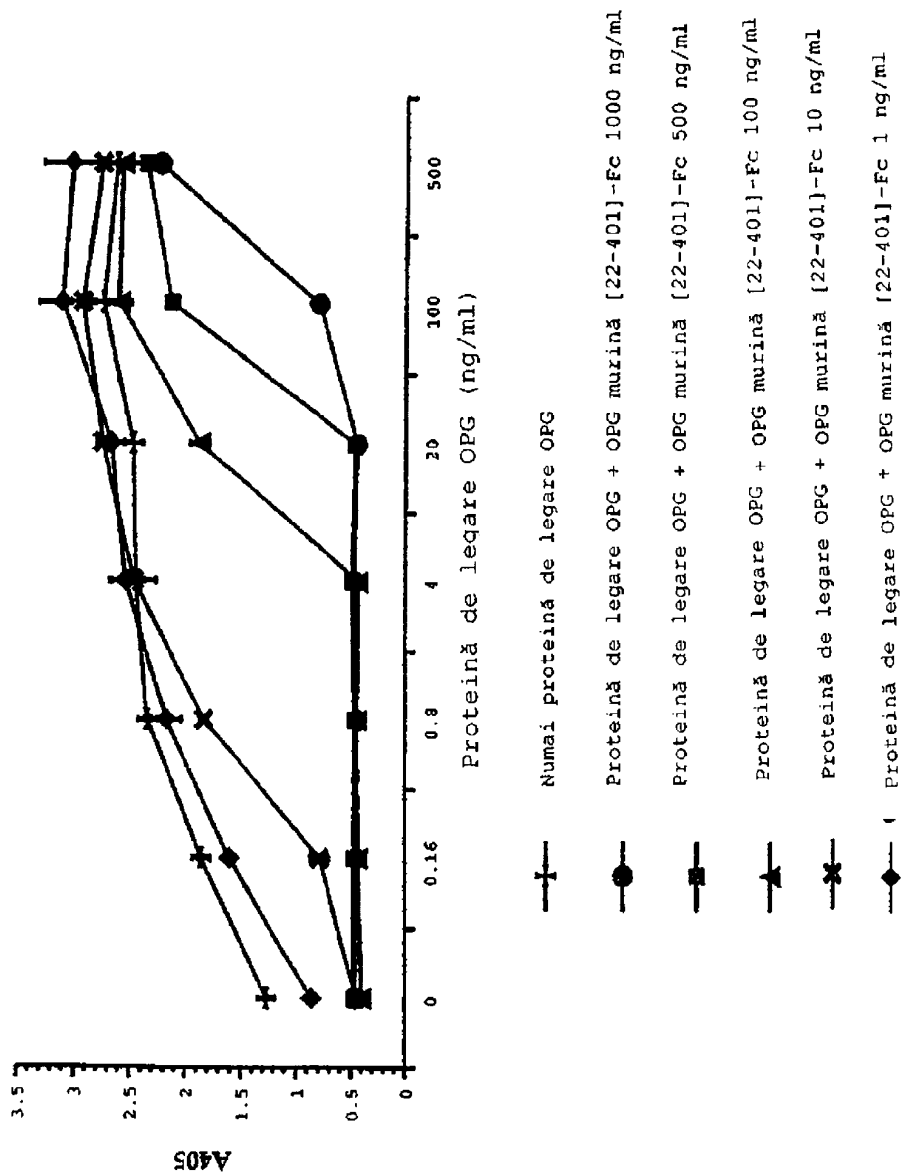


Fig. 5

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

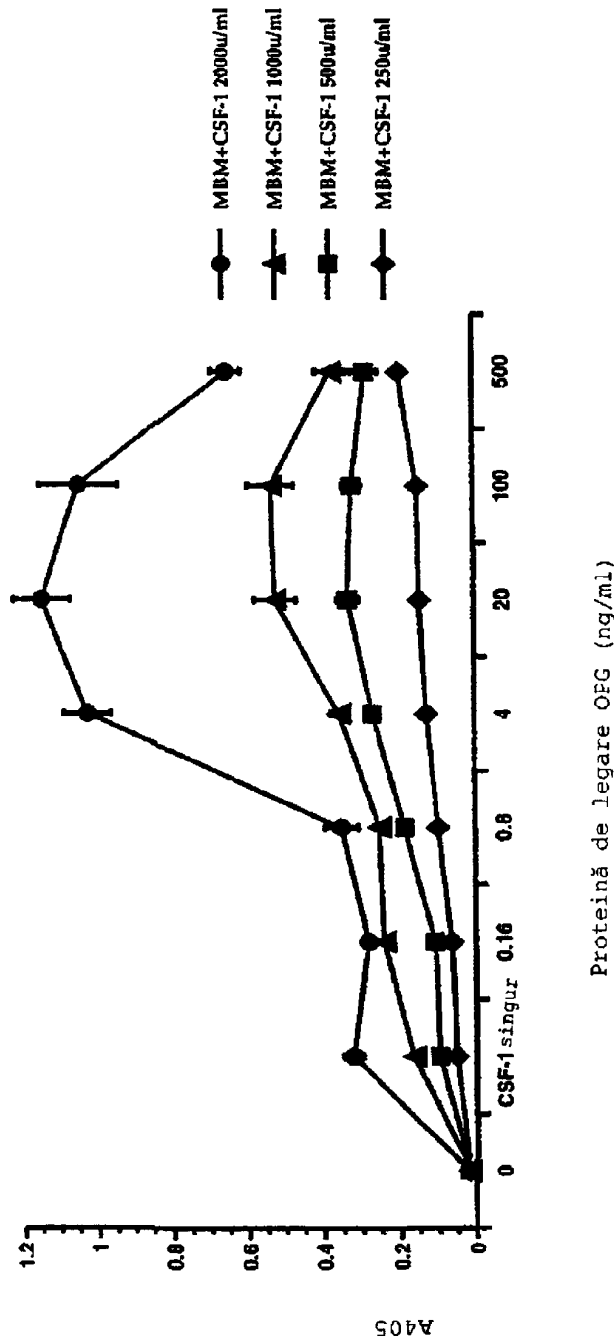


Fig. 6

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

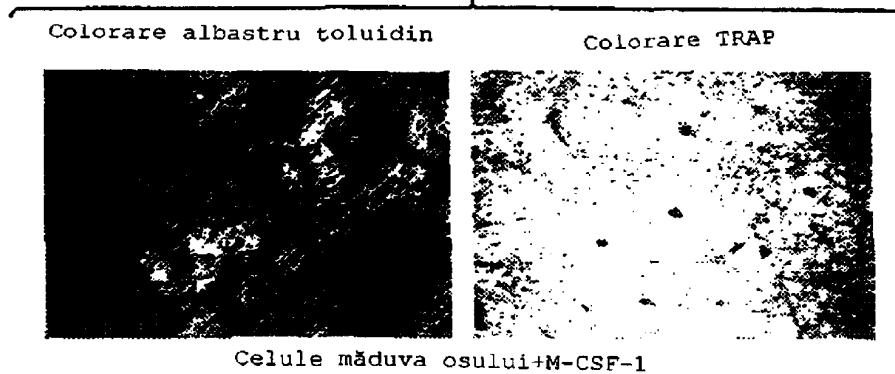


Fig. 7A

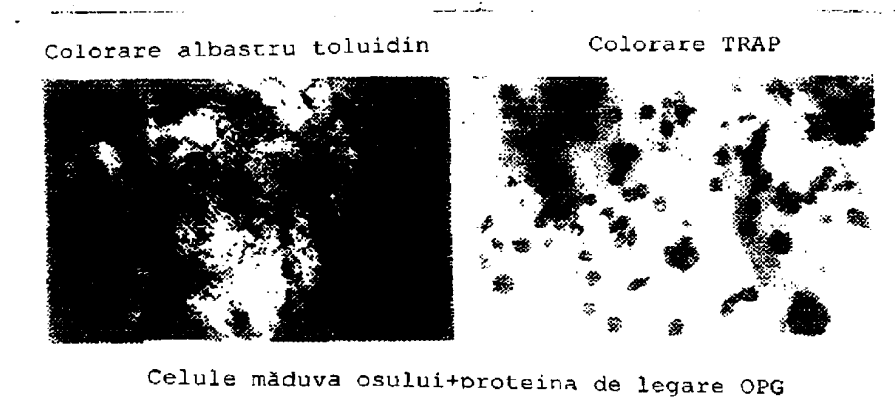


Fig. 7B

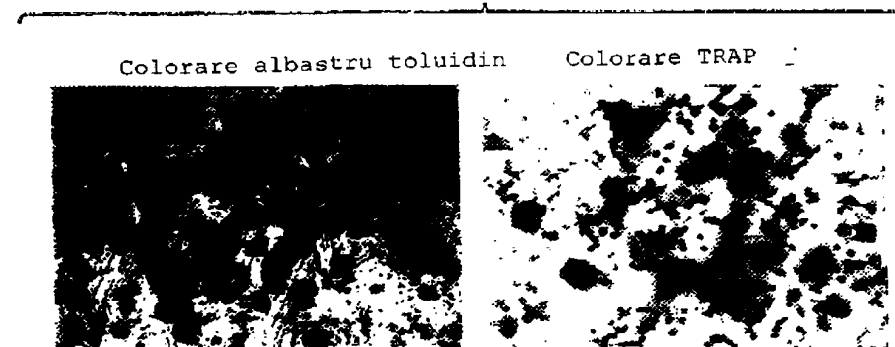


Fig. 7C

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

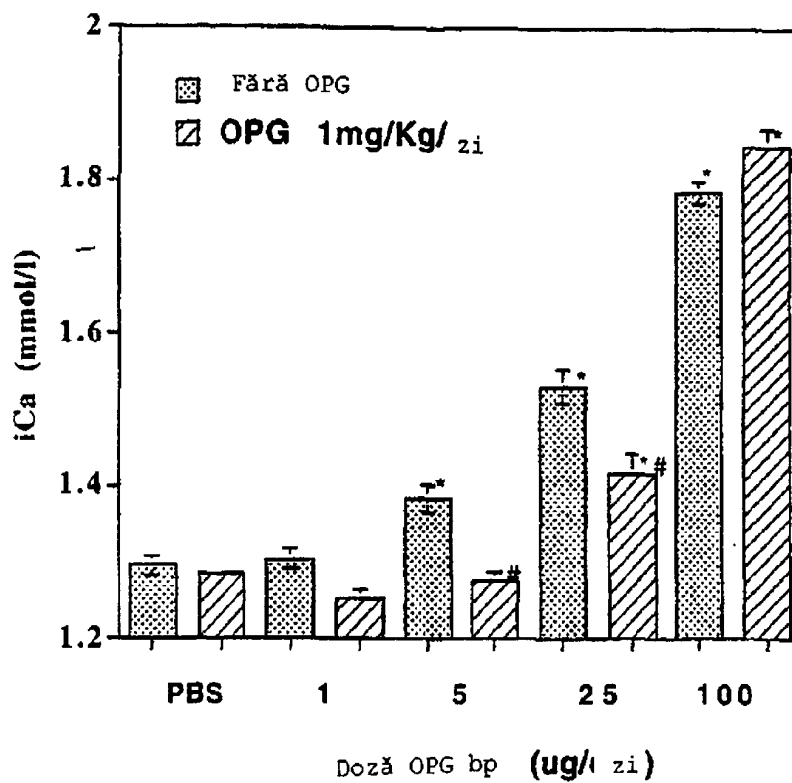


Fig. 8

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

PBS



Fig. 9A

OPGbp 5ug/d



Fig. 9B

OPGbp 25ug/d



Fig. 9C

OPGbp 100ug/d



Fig. 9D

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

```

10          30          50
ACTCGACCCACGGGTCCGCCCCCGCCACCGCGCCATGGACCCCGCGCCCGCGGGCGCC
          70          90          110
GCCAGCTGCCCGCGCGCTGCTGGCGCTCTGCCGTGCTGCTGCTCCACTGCAGGTGACTC
Q L P A P L L A L C V L L V P L O V T L
          130          150          170
TCCAGGTCCTCCTCCATGCACCCAGGAGGCATATGAGCATCTCGGACGGTGTGCA
Q V T P P C T Q E R H Y E H L G R C C S
          190          210          230
GCAGATGCGAACCCAGGAAAGTACCTGTCTCTAAGTGCACTCTACCTCCGACAGTGTG
R C E P G K Y L S S K C T P T S D S V C
          250          270          290
GTCTGCCCTGTGGCCCCGATGAGTACTTGGACACCTGGAAATGAAGAAGATAATGCTTGC
L P C G P D E Y L D T W N E E D K C L L
          310          330          350
TGCATAAAGTCTGTGATGCAGGCAAGGCCCTGGTGGCGGTGGATCCTGGCAACCCACACGG
H K V C D A G K A L V A V D P G N H T A
```

Fig. 10A

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

```

370                               390           410
CCCCGGTGGCTGCTTGCACGGCTGGCTACCACTGGAACCTCAGACTGGAGTGGCTGCC
P R R C A C T A G Y H W N S D C E C C R
430                               450           470
GCAGGAACACGGAGTGTCCACCTGGCTTCGGAGCTCAGCAATCCCTTGCAGCTCAACAAGG
R N T E C A P G F G A Q H P L Q L N K D
490                               510           530
ATACGGTGTGCACACCCCTGCCCTCCCTGGGCTTCTCAGATGTCTTTTCGTCCACAGACA
T V C T P C L L G F F S D V F S S T D K
550                               570           590
AATGCAAACCTTGGACCAACTGCCACCCCTCCCTTGGAAAGCTAGAAGCACACCCAGGGACAA
C K P W T N C T L L L G K L E A H Q G T T
610                               630           650
CGGAATCAGATGGTCTGCAGCTCTTCCATGACACTGAGGAGACCACCCCAAGGAGGCC
E S D V V C S S S M T L R R P P K E A Q
```

Fig. 10B

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

670 690 710
AGGCTTACCTGCCCCAGTCTCATCGTTCTGCTCCCTCTTTCATCTCTGTGGTAGTAGTGGCTG
A Y L P S L I V L L L L F I S V V V V A A
730 750 770
CCATCATCTTCGGCGTTTACTACAGGAAGGGAGGAAAGCCGTGACAGCTAATTTGTGGA
I I F G V Y Y R K G G K A L T A N L W N
790 810 830
ATTGGTCAATGATGCTTTCAGTAGTCTAAGTGAATAAAGGAGTCTCAGGGACCGTT
W V N D A C S S L S G N K E S S G D R C
850 870 890
GTGCTGGTTCCTCCACTCGGCAACCTCCAGTCCAGCAAGAAGTGTGAAGGTATCTTACTAA
A G S H S A T S S Q Q E V C E G I L L M
910 930 950
T G A C T C G G G A G A A G A T G G T T C C A G A A G A C G G T G C T G G A G T C T G T G G C C T G T G T G T G
T R E E K M V P E D G A G V C G P V C A
970 990 1010
C G G C A G G T G G G C C C T G G C A G A A G T C A G A G A T T C T A G G A C G T T C A C A C T G G T C A G C G G A G G
A G G P W A E V R D S R T F T L V S E V

Fig. 10C

(51) Int.Cl.

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

```

1030          1050          1070
TTGAGACGCAAGGAGACCTCTCGAGGAAGATTTCCACAGAGGATGAGTACACGGACCGGC
    E T Q G D L S R K I P T E D E Y T D R P
1090          1110          1130
CCTCGCAGCCCTTCGACTGGTTCACTGCTCCTTAATCCAGCAGGGAAGCAATCTATACCCC
    S Q P S T G S L L L I Q Q G S K S I P P
1150          1170          1190
CATTCAGGAGCCCTGGAAAGTGGGGGAGAACACACAGTTTAAAGCCAGTGTTCACCCGGGA
    F Q E P L E V G E N D S L S Q C F T G T
1210          1230          1250
CTGAAAGCACGGTGGATTCTGAGGGCTGTGACTTCACTGAGCCTCCGAGCAGAACTGACT
    E S T V D S E G C D F T E P P S R T D S
1270          1290          1310
CTATGCCCGTGTCCCTGAAAAGCACCTGACAAAGAATAAGAGGTGACAGTTGCCCTCC
    M P V S P E K H L T K E I E G D S C L P
1330          1350          1370
CCTGGGTGGTCAGCTCCAACACTCAACAGATGGCTACACAGGCAGTGGGAACACTCCTGGGG
    W V V S S N S T D G Y T G S G N T P G E
    
```

Fig. 10D

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

```
1390          1410          1430
AGGACCATGAACCCCTTCCAGGGTCCCTGAAATGTGGACCATTGCCCCAGTGTGCCCTACA
D H E P F P G S L K C G P L P Q C A Y S
1450          1470          1490
GCATGGGCCTTCCAGTGAAGCAGCAGCCAGCAFGGCAGAGGGGGAGTACGGCCCCAGG
M G F P S E A A A S M A E A G V R P Q D
1510          1530          1550
ACAGGGCTGATGAGAGGGGAGCCCTCAGGGTCCGGAGCTCCCCAGTGACCCACCTG
R A D E R G A S G S G S S P S D Q P P A
1570          1590          1610
CCTCTGGGAACGTGACTGGAAACAGTAACTCCACGTTTCATCTCTAGCGGGCAGGTGATGA
S G N V T G N S N S T F I S S G Q V M N
1630          1650          1670
ACTTCAAGGGTGACATCATCGTGGTGTATGTTCAGCCAGACCCTGCCAGGAGGGCCCCGGTTF
F K G D I I V V Y V S Q T S Q E G P G S
1690          1710          1730
CCGCAGAGCCCGAGTCGGAGCCCGTGGGCCCGCCCTGTGCAGGAGGAGACCGCTGGCACACA
A E P E S E P V G R P V Q E E T L A H R
```

Fig. 10E

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

```
1750          1770          1790
GAGACTCCTTTGGGGCACC CGCGCGCTTCCCCGACGTCGTGTGCCACCGGGGCTGGGC
D S F A G T A P R F P D V C A T G A G L
1810          1830          1850
TGCAGGAGGGGCACCCCGG CAGAGGACGGGACATCGCGGCCGGTGCAGGAGCAGG
Q E Q G A P R Q K D G T S R P V Q E Q G
1870          1890          1910
GTGGGGCAGACTTCAC TCCATACCCAGGGTCCGGACAAATGTCAGAAATGACCTCACC
G A Q T S L H T Q G S G Q C A E
1930          1950          1970
TTCTCTGTGCCCTGGGTGCAGGCCACCAGTGCCTTTCCAAAACATGGTGTAGCTAGC
1990          2010          2030
CACTGTGCACCTCCCTCA CTGGTGCAGGCTGCTGGCATGGTGATGGAGCCCCACCTCTCACT
2050          2070
TCCTCCAGTGCCCCCTCT CCTCTGCCCTCCTAC
```

Fig. 10F

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

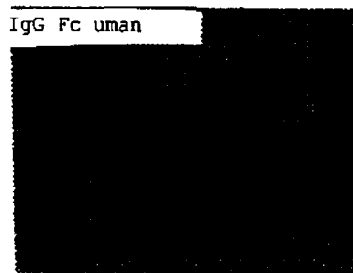


Fig. 11A

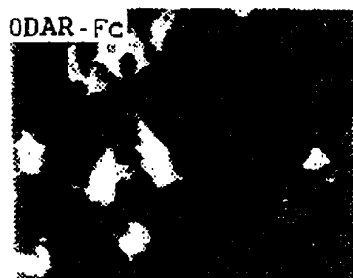


Fig. 11B



Fig. 11C

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

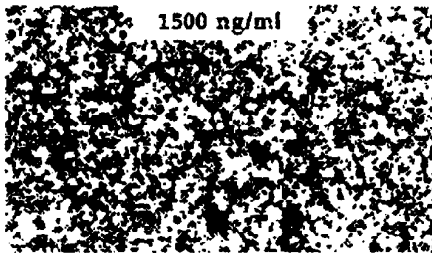


Fig. 12A

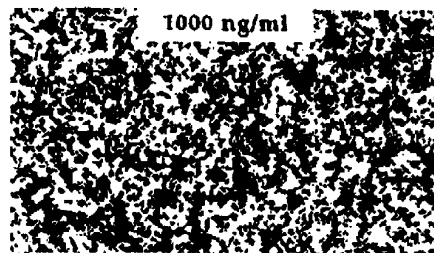


Fig. 12B

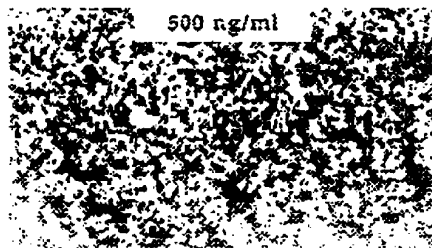


Fig. 12C

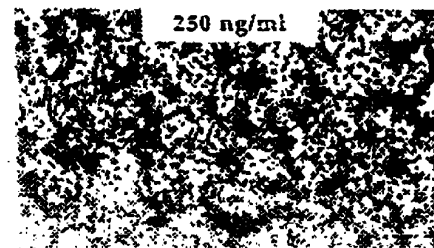


Fig. 12D

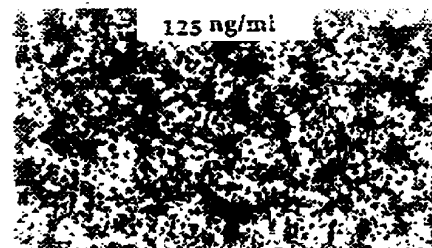


Fig. 12E

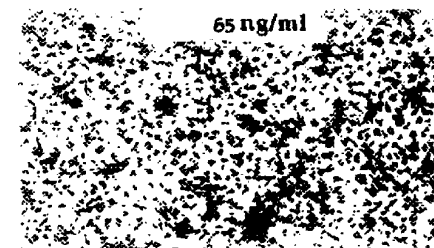


Fig. 12F



Fig. 12G

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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

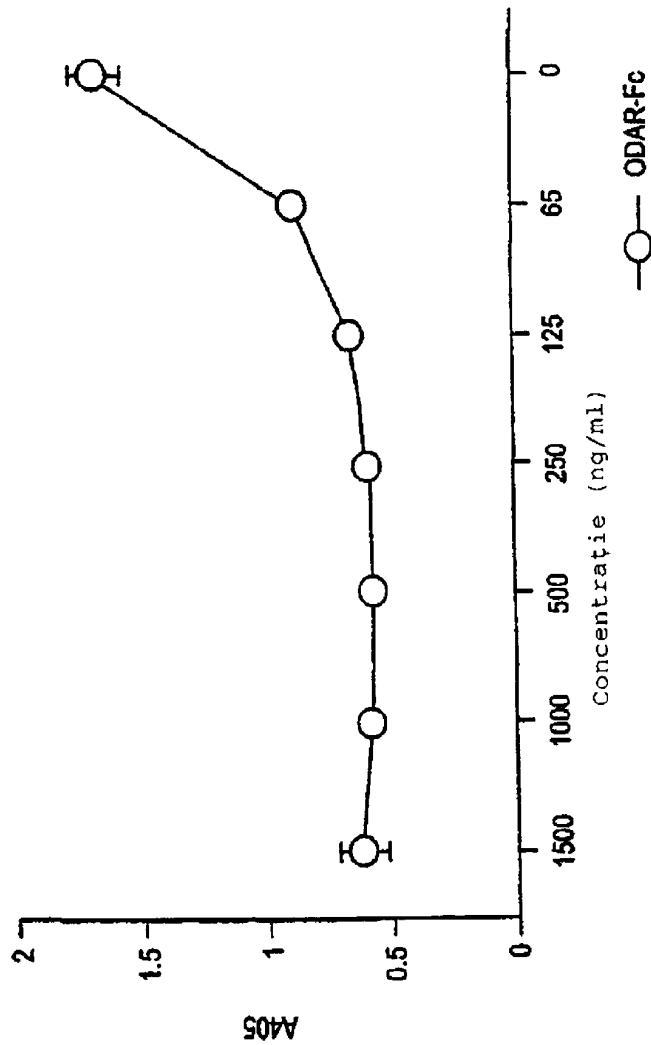
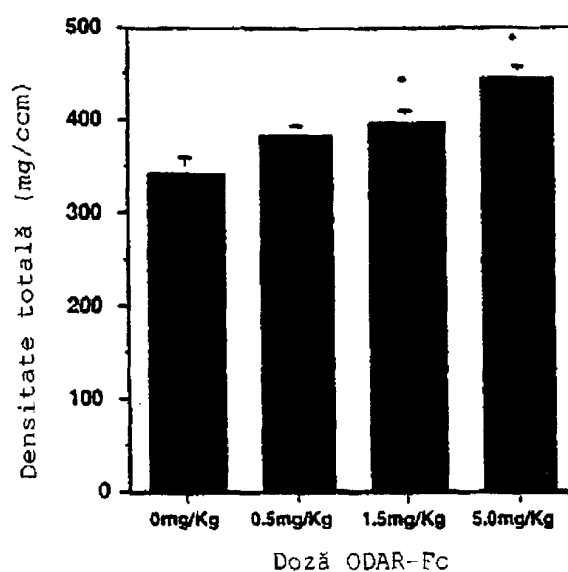


Fig. 12H

RO 122495 B1

(51) Int.Cl.

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



Diferit la vehicul control tratat $p < 0,05$

Fig. 13



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci