



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 263 204**

51 Int. Cl.:

C07K 14/715 (2006.01) **C07K 16/28** (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01) **C12P 21/02** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) **C12N 5/20** (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01) **G01N 33/577** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) **A61K 45/00** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) **A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98914034 .8**

86 Fecha de presentación : **15.04.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **0911342**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.1999**

54 Título: **Nueva proteína y proceso para producir la misma.**

30 Prioridad: **15.04.1997 JP 9-97808**
09.06.1997 JP 9-151434
12.08.1997 JP 9-217897
21.08.1997 JP 9-224803
02.12.1997 JP 9-332241

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2006

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2006

73 Titular/es: **Sankyo Company, Limited**
5-1, Nihonbashi Honcho 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-8426, JP

72 Inventor/es: **Yamaguchi, Kyoji;**
Yasuda, Hisataka;
Nakagawa, Nobuaki;
Shima, Nobuyuki;
Kinosaki, Masahiko;
Tsuda, Eisuke;
Goto, Masaaki;
Yano, Kazuki;
Tomoyasu, Akihiro;
Kobayashi, Fumie;
Washida, Naohiro;
Takahashi, Ken;
Morinaga, Tomonori y
Higashio, Kanji

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 263 204 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nueva proteína y proceso para producir la misma.

5 La presente invención se refiere al uso de un anticuerpo para la preparación de un medicamento para el tratamiento de anormalidad del metabolismo óseo.

Antecedentes de la técnica

10 El metabolismo óseo depende de la actividad global de los osteoblastos que controlan la formación de hueso y los osteoclastos que controlan la resorción ósea. La anormalidad del metabolismo óseo se considera que está causada por un desequilibrio de la formación de hueso y la resorción ósea. Osteoporosis, hipercalcemia, enfermedades de Paget, osteodistrofia renal, artritis reumatoide, osteoartritis, y análogas son conocidas como enfermedades que acompañan a la anormalidad del metabolismo óseo. La osteoporosis es una enfermedad típica causada por dicha anormalidad del
15 metabolismo óseo. Esta enfermedad se genera cuando la resorción ósea por los osteoclastos excede a la formación de hueso por los osteoblastos. La enfermedad se caracteriza por una disminución tanto en el material óseo calcificado como en la matriz ósea. Aunque el mecanismo de esta enfermedad no se ha dilucidado por completo, la enfermedad causa dolencias en los huesos, los hace frágiles, y puede dar como resultado fracturas. Esta enfermedad está convirtiéndose en un problema social debido que aumenta el número de personas ancianas postradas en cama a medida que
20 se hace mayor la población de ancianos. El desarrollo de agentes terapéuticos para esta enfermedad es urgentemente deseado. La enfermedad con una disminución de masa ósea debida a la anormalidad del metabolismo de los huesos se espera que se cure por supresión de la resorción ósea, aceleración de la formación de hueso, o mejora del balance entre la resorción y la formación óseas. La formación de hueso se espera que aumente por aceleración de la proliferación, diferenciación, o activación de los osteoblastos que forman hueso, o por supresión de la proliferación, diferenciación
25 de osteoclastos a partir de pre-osteoclastos o de la activación de osteoclastos que reabsorben hueso. En los últimos años, se ha dirigido un gran interés hacia hormonas, sustancias de peso molecular bajo, o proteínas fisiológicamente activas que exhiben dichas actividades, y se encuentran en curso investigación y desarrollo básicos intensos acerca de estas materias.

30 Fármacos tales como agentes de calcitonina, agentes de vitamina D₃ de forma activa, agentes hormonales que contienen estradiol, ipriflavona, vitamina K₂, y compuestos de bisfosfonato se han dado ya a conocer como fármacos para tratar y acortar el periodo de tratamiento de las enfermedades relacionadas con los huesos. Se encuentran en progreso ensayos clínicos sobre derivados de vitamina D₃ de forma activa, derivados de estradiol, y compuestos de bisfosfonato de la segunda y tercera generaciones para desarrollar agentes terapéuticos con eficacia excelente y efectos
35 secundarios mínimos.

Sin embargo, las terapias que utilizan estos agentes no han resultado necesariamente satisfactorias en términos de eficacia y resultados terapéuticos. El desarrollo de nuevos agentes terapéuticos que sean más seguros y más eficientes se desea urgentemente. Algunos agentes utilizados para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el metabo-
40 lismo óseo se utilizan sólo de modo limitado debido a sus efectos secundarios. Adicionalmente, los tratamientos que utilizan dos o más agentes en combinación son actualmente la corriente principal en el tratamiento de las enfermedades relacionadas con el metabolismo óseo tales como la osteoporosis. Desde dicho punto de vista, es deseable el desarrollo de fármacos que tengan mecanismos de acción diferentes de los de los fármacos convencionales, y que exhiban una mayor eficacia y efectos secundarios mínimos.

45 Como se ha mencionado arriba, las células que controlan el metabolismo óseo son osteoblastos y osteoclastos. Se sabe que estas células ejercen interacciones íntimas mutuas denominadas "acoplamiento". Específicamente, se sabe que citoquinas tales como las Interleuquinas 1 (IL-1), 3 (IL-3), 6 (IL-6), y 11 (IL-11), el factor estimulante de colonias de macrófagos granulocíticos (GM-CSF), el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), el interferón- γ (IFN- γ), el factor de necrosis de tumores α (TNF- α), y el factor del crecimiento transformante- β (TGF- β), secretados por las células estromales osteoblásticas aceleran o suprimen la diferenciación o maduración de los
50 osteoclastos (Raisz: Disorders of Bone and Mineral Metabolism, 287-311, 1992; Suda *et al.*: Principles of Bone Biology, 87-102, 1996; Suda *et al.*: Endocrine Reviews, 4, 266-270, 1995; Lacey *et al.*: Endocrinology 136, 2369-2376, 1995). Se ha informado que las células osteoblásticas estromales juegan un papel importante en la diferenciación y maduración de los osteoclastos, así como en funciones de los osteoclastos tales como la resorción ósea por los osteoclastos maduros, a través del contacto célula-célula con precursores inmaduros de osteoclastos u osteoclastos maduros.

55 Se cree que un factor denominado factor de diferenciación de los osteoclastos (ODF, Suda *et al.*: Endocrine Rev. 13, 66-80, 1992; Suda *et al.*: Bone 17, 87S-91S, 1995) es expresado en la membrana de las células osteoblásticas estromales y está implicado en la formación de osteoclastos por contacto célula-célula. De acuerdo con esta hipótesis, un receptor ODF está presente en las células precursoras de los osteoclastos. Sin embargo, hasta ahora ni el ODF ni el receptor han sido purificados o identificados. No existen tampoco informes relacionados con sus características, mecanismo de acción, o estructura. Así pues, el mecanismo implicado en la diferenciación y maduración de los osteoclastos
60 no ha sido suficientemente esclarecido hasta ahora. La clarificación de este mecanismo contribuirá notablemente no sólo a la medicina básica, sino también al desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de las enfermedades asociadas con la anormalidad del metabolismo óseo.

Anderson D.M. *et al.*: "A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function", *Natura*, MacMillan Journals Ltd. Londres, GB, vol. 390, no. 6656, 13 de noviembre de 1997 (1997-11-13), páginas 175-179, es un documento publicado posteriormente que describe proteínas de la superfamilia de receptores de TNF.

5

Simonet W.S. *et al.*: "Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density." *Cell*, vol. 89, no. 2, 1997, páginas 309-319 es un documento post-publicado y describe la proteína OPG.

Smith C.A. *et al.*: "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, co-stimulation and death", *Cell*, Cell Press, Cambridge, NA. EE.UU., vol. 76, 25 de marzo de 1994 (1994-03-25), páginas 959-962 describe proteínas de la superfamilia de los receptores de TNF.

10

El documento EP-A-0 784 093, un documento de la técnica anterior de acuerdo con Art. 54(3) EPC, describe la proteína OPG.

15

Los autores de la presente invención han realizado estudios extensos teniendo presente esta situación y han descubierto un factor inhibidor de la osteoclastogénesis (OCIF) en un caldo de cultivo de fibroblastos de pulmón en el embrión humano, IMR-90 (ATCC, No. de Depósito CCL186) (documento WO 96/26217).

Los autores de la presente invención han tenido éxito en la clonación de DNA codificante de OCIF, la producción de OCIF recombinante en células animales, y la confirmación de efectos farmacéuticos *in vivo* (efecto mejorador del metabolismo óseo, etc.) del OCIF recombinante. Se espera que OCIF llegue a utilizarse como agente para la prevención o el tratamiento de enfermedades relacionadas con anomalías del metabolismo óseo, con mayor eficacia que los fármacos convencionales y menos efectos secundarios.

20

Los autores de la presente invención han buscado una proteína que se fije al factor inhibidor de la osteoclastogénesis (OCIF) y han descubierto que una proteína de fijación de OCIF (OBM) se expresa específicamente en las células osteoblásticas estromales cultivadas en presencia de un factor estimulante del factor de resorción ósea tal como la vitamina D₃ de forma activa y la hormona paratiroidea (PTH). Adicionalmente, los autores de la presente invención han investigado las características y las funciones fisiológicas de esta proteína que se fija a OCIF y han encontrado que la proteína exhibe la actividad biológica de un factor que soporta o promueve la diferenciación de los osteoclastos y la maduración a partir de precursores inmaduros de osteoclastos. Estos descubrimientos han conducido a la culminación de la presente invención. Investigaciones posteriores en la proteína de fijación de OCIF han demostrado que esta es una proteína importante que controla la diferenciación y maduración de los osteoclastos respecto a los precursores inmaduros de osteoclastos en un sistema de co-cultivo de las células osteoblásticas estromales y las células del bazo. El éxito en la identificación y el aislamiento de la proteína que funciona como un factor que soporta o promueve la diferenciación y maduración de los osteoclastos ha permitido el escrutinio de un nuevo medicamento útil para el tratamiento de la anomalía del metabolismo óseo basado en el mecanismo del metabolismo óseo que utiliza la proteína de fijación de OCIF.

25

De acuerdo con ello, un objeto de la presente invención es proporcionar anticuerpos contra la proteína de fijación de OCIF (OBM), métodos para preparación de los anticuerpos, composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos, y el uso de dichos anticuerpos para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la anomalía del metabolismo óseo.

30

La proteína de fijación de OCIF tiene las propiedades fisicoquímicas y actividad biológica siguientes:

- (a) Afinidad: se fija específicamente al factor inhibidor de la osteoclastogénesis (OCIF) y exhibe afinidad alta a OCIF con una constante de disociación en la membrana celular: $K_d = 10^{-9}$ M o menos;
- (b) peso molecular: tiene un peso molecular de 30.000-40.000 cuando se mide utilizando electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras y un peso molecular aparente de 90.000-110.000 cuando está reticulada a un OCIF de forma monómera; y
- (c) actividad biológica: exhibe actividad de soporte o promoción de la diferenciación y maduración de los osteoclastos en un sistema de co-cultivo de las células osteoblásticas estromales y células del bazo en presencia de factores estimulantes de la resorción ósea tales como vitamina D₃ de forma activa y hormona paratiroidea (PTH).

35

Un sistema de co-cultivo de ST2, una línea de células osteoblásticas estromales de ratón, y células de bazo de ratón en presencia de vitamina D₃ de forma activa o PTH es bien conocido como un sistema típico de cultivo *in vitro* para la formación de osteoclastos. Las células que expresan la proteína de fijación de OCIF pueden determinarse por ensayo de la fijación de OCIF a células osteoblásticas estromales de ratón o células de bazo de ratón cultivadas en presencia o ausencia de vitamina D₃ de forma activa. La proteína de fijación de OCIF está especificada como la proteína que es inducida específicamente en las células osteoblásticas estromales cultivadas en presencia de un factor estimulante de la resorción ósea tal como vitamina D₃ de forma activa o PTH. Adicionalmente, la proteína de fijación de OCIF puede especificarse como una proteína que exhibe actividad biológica de soporte o promoción de la diferenciación y maduración de los osteoclastos a partir de los resultados siguientes. A saber, la formación de osteoclastos es inhibida

40

Un sistema de co-cultivo de ST2, una línea de células osteoblásticas estromales de ratón, y células de bazo de ratón en presencia de vitamina D₃ de forma activa o PTH es bien conocido como un sistema típico de cultivo *in vitro* para la formación de osteoclastos. Las células que expresan la proteína de fijación de OCIF pueden determinarse por ensayo de la fijación de OCIF a células osteoblásticas estromales de ratón o células de bazo de ratón cultivadas en presencia o ausencia de vitamina D₃ de forma activa. La proteína de fijación de OCIF está especificada como la proteína que es inducida específicamente en las células osteoblásticas estromales cultivadas en presencia de un factor estimulante de la resorción ósea tal como vitamina D₃ de forma activa o PTH. Adicionalmente, la proteína de fijación de OCIF puede especificarse como una proteína que exhibe actividad biológica de soporte o promoción de la diferenciación y maduración de los osteoclastos a partir de los resultados siguientes. A saber, la formación de osteoclastos es inhibida

ES 2 263 204 T3

de modo dependiente de la dosis por la adición de 1 a 40 ng/ml de OCIF al sistema de co-cultivo arriba mencionado en presencia de la vitamina D₃ de forma activa, y la evolución temporal de la expresión de la proteína de fijación de OCIF en las células ST2 en presencia de vitamina D₃ de forma activa está bien correlacionada con la evolución temporal de la formación de osteoclastos en el co-cultivo. Adicionalmente, la cantidad de proteína de fijación de OCIF expresada en las células ST2 está correlacionada con la capacidad de las células para soportar la formación de osteoclastos, y la fijación de OCIF a la proteína de fijación de OCIF en las células ST2 suprime por completo la formación de osteoclastos.

La afinidad de la proteína de fijación de OCIF a OCIF puede evaluarse por marcación de OCIF y examen de la fijación del OCIF marcado a la superficie de la membrana de las células animales. El OCIF puede marcarse por un método convencional de marcación de proteínas tal como marcación con radioisótopos o marcación fluorescente. La marcación de residuos tirosina con ¹²⁵I puede darse como un ejemplo específico de la marcación del OCIF con un radioisótopo. Pueden utilizarse métodos de marcación tales como el método Iodogen, el método de la cloramina T, y el método enzimático. La fijación del OCIF marcado a la membrana superficial de las células animales puede ensayarse por un método convencional. La adición de OCIF sin marcar al medio utilizado para el ensayo de fijación a una concentración que es 100 a 400 veces mayor que la concentración de OCIF marcado, asegura la medida de la fijación inespecífica. La cantidad de fijación específica de OCIF puede calcularse por sustracción de la cantidad de fijación inespecífica de la cantidad total de fijación del OCIF marcado. La afinidad de la proteína de fijación de OCIF expresada en la membrana celular a OCIF puede evaluarse por cambio de la cantidad de OCIF marcado y análisis de la fijación específica por el gráfico de Scatchard.

La afinidad determinada de la proteína de fijación de OCIF a OCIF es aproximadamente 100-500 pM. La proteína de fijación de OCIF está especificada por una alta afinidad, y una constante de disociación en la membrana celular: K_d = 10⁻⁹ M o menos, al factor inhibidor de la osteoclastogénesis (OCIF). Puede accederse al peso molecular de OBM por cromatografía de filtración sobre gel, SDS-PAGE, o análogos. Se prefiere la SDS-PAGE a fin de determinar con exactitud el peso molecular. La OBM se especifica como una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 40.000 (40.000 ± 4.000) en condiciones reductoras.

La proteína de fijación de OCIF puede obtenerse a partir de la línea de células osteoblásticas estromales de ratón, ST2, la línea de células preadipocitos de ratón, PA6, líneas de células osteoblásticas humanas, u otras células osteoblásticas seleccionadas de mamíferos tales como humanos, ratones, o ratas. Como las sustancias para inducir la expresión de la proteína de fijación de OCIF pueden darse factores estimulantes de la resorción ósea tales como vitamina D₃ de forma activa (calcitriol), hormona paratiroidea (PTH), interleuquina (IL)-1, IL-6, IL-11, Oncostatina M, y factor inhibidor de la leucemia (LIF). Estas sustancias pueden añadirse en la concentración de 10⁻⁸ M (vitamina D₃ de forma activa y PTH), 10 ng/ml (IL-11), o 1 ng/ml (Oncostatina M). IL-6 se utiliza preferiblemente a una concentración de 20 ng/ml con 500 ng/ml del receptor de IL-6 soluble. Preferiblemente, pueden utilizarse células confluentes de la línea de células osteoblásticas estromales de ratón, ST2, cultivadas en un medio α -MEM al que se han añadido vitamina D₃ 10⁻⁸ M de forma activa, dexametasona 10⁻⁷ M, y 10% de suero de bovino fetal. Las células cultivadas pueden recogerse por rascado con un rascador de células. Las células recogidas pueden guardarse a -80°C hasta su utilización.

La proteína de fijación de OCIF puede purificarse eficientemente a partir de las fracciones de membrana de las células recogidas. Las fracciones de membrana pueden prepararse por un método convencional que se utiliza para preparar orgánulos intracelulares. Pueden añadirse diversos tipos de inhibidores de proteasas a la solución tampón utilizada para la preparación de las fracciones de membrana. Ejemplos de los inhibidores de proteasas incluyen inhibidores de serina-proteasas, inhibidores de tiol-proteasas, e inhibidores de metaproteasas. Como ejemplos específicos se citan PMSF, APMSF, EDTA, o-fenantrolina, leupeptina, pepstatina, aprotinina, inhibidores de tripsina de soja. Para homogeneizar las células se puede utilizar un homogeneizador Dounce, un homogeneizador Polytron, o un procesador ultrasónico. El homogeneizado de células se suspende en una solución tampón que contiene 0,5 M de sacarosa y se centrifuga durante 10 minutos a 600 x g, para separar el núcleo y las células inalteradas como precipitado. El sobrenadante se centrifuga durante 90 minutos a 150.000 x g para obtener una fracción de membrana como precipitado. La fracción de membrana obtenida se trata por diversos tipos de detergentes para solubilizar eficientemente y extraer la proteína de fijación de OCIF a partir de la membrana celular. Pueden utilizarse los detergentes que se utilizan comúnmente para solubilizar proteínas de la membrana celular, tales como CHAPS (3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano-sulfonato), Triton X-100, Nikkol, y n-octil-glicosido. Preferiblemente, se añade 0,5% de CHAPS a la fracción de membrana y la mezcla se agita durante 2 horas a 4°C para solubilizar la proteína de fijación de OCIF. La muestra así preparada se centrifuga a 150.000 x g durante 60 minutos para obtener la fracción de membrana solubilizada como un sobrenadante.

La proteína de fijación de OCIF puede purificarse a partir de la fracción de membrana solubilizada con una columna, gel, o resina acoplada con OCIF. El OCIF para la inmovilización puede ser el aislado de un caldo de cultivo de fibroblastos de pulmón embrionario humano, IMR-90, descrito en el documento WO'96/26217 o OCIF preparado utilizando técnicas de ingeniería genética (r OCIF). r OCIF puede prepararse por introducción de cDNA humano, cDNA de ratón, o cDNA de rata en un vector de expresión de acuerdo con un método convencional, transducción del vector construido en células animales tales como células CHO, células BHK, o células Namalwa, o en células de insecto para producir rOCIF, y purificación de rOCIF. El OCIF obtenido tiene un peso molecular de aproximadamente 60 kDa (forma monómera) por 120 kD (forma dímera). El OCIF de forma monómera es preferible para la inmovilización. Como ejemplos de los geles y resinas a los que se inmoviliza OCIF se dan ECH Sepharose 4B, EAH Sepharose 4B, Tiopropil-Sepharose 6B, Sepharose 4B activada por CNBr, Sepharose 4B activada CH, Sepharose 6B activada por epóxido,

ES 2 263 204 T3

Sepharose 4B activada tiol (éstas son fabricadas por Pharmacia Co.; TSKgel AF-Epoxy-Toyopal 650, TSKgel AF-Amino Toyopal 650, TSKgel AF-Formyl Toyopal 650, TSKgel AF-Carboxy Toyopal 650, TSKgel AF-Tresyl Toyopal 650 (éstos son fabricados por Toso Corporation), Amino-Cellulofine, Carboxi-Cellulofine, Cellulofine activada por FMP, Formyl-Cellulofine (éstas son fabricadas por Seikagaku Kogyo Co.), Affigel 10, Affigel 15, y Afiprep 10 (estos productos son fabricados por Biorad Co.). Como columnas a las cuales se inmoviliza OCIF, pueden citarse una columna HiTrap activada por NHS (Pharmacia Co.), TSKgel Tresyl-5-PW (Toxoh Corporation), etc. Como un ejemplo específico del método para inmovilización de OCIF a una columna HiTrap activada con NHS (1 ml, Pharmacia Co.), puede darse en el método siguiente. Específicamente, se inyecta 1 ml de $\text{NaHCO}_3/\text{NaCl}$ 0,5 M en solución 0,2 M (pH 8,3) que contiene 13,0 mg de OCIF en la columna para realizar la reacción de acoplamiento a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Se aplican sucesivamente a la columna etanolamina 0,5 M/ NaCl 0,5 M (pH 8,3) y ácido acético 0,1 M/ NaCl 0,5 M (pH 4,0). A continuación, la columna se lava de nuevo con etanolamina 0,5 M/ NaCl 0,5 M (pH 8,3) y se deja la columna en reposo durante 1 hora a la temperatura ambiente para bloquear el exceso de grupos activos. La columna se lava sucesivamente dos veces con etanolamina 0,5 M/ NaCl 0,5 M (pH 8,3) y ácido acético 0,1 M/ NaCl 0,5 M (pH 4,0), y se lava luego con Tris 50 mM/ NaCl 1 mM/solución CHAPS al 0,1% (pH 7,5), obteniéndose de este modo una columna inmovilizada de OCIF. La proteína de fijación de OCIF puede purificarse eficientemente por una columna inmovilizada de OCIF preparada de esta manera, o con un gel o resina inmovilizado sobre OCIF.

Es deseable añadir los diversos inhibidores de proteasas arriba mencionados a las soluciones tampón utilizadas para la purificación de la proteína a fin de suprimir la degradación de la proteína de fijación de OCIF. La proteína de fijación de OCIF puede purificarse por carga de la fracción de membrana solubilizada arriba mencionada en la columna inmovilizada de OCIF o por mezcla con el gel o resina inmovilizado de OCIF, y elución de la proteína de la columna, gel, o resina con ácido, diversos agentes desnaturizantes de proteínas, tampón de cacodilato, y análogos. Es deseable utilizar un ácido para la elución y neutralizar inmediatamente después de la elución a fin de minimizar la desnaturización de la proteína de fijación de OCIF. Como la solución ácida utilizada para la elución, pueden citarse solución de glicina 0,1 M-ácido clorhídrico (pH 3,0), solución de glicina 0,1 M-ácido clorhídrico (pH 2,0), solución de citrato de sodio 0,1 M (pH 2,0), y análogos.

La proteína de fijación de OCIF puede purificarse ulteriormente por métodos convencionales de purificación utilizados para purificación de diversas proteínas a partir de materiales biológicos y por diversos métodos de purificación utilizando las propiedades fisicoquímicas de esta proteína. Para concentrar soluciones que contienen la proteína de fijación de OCIF, pueden emplearse técnicas convencionales utilizadas en procesos de purificación de proteínas tales como ultrafiltración, liofilización, y precipitación con sal. Se utiliza preferiblemente la ultrafiltración por centrifugación con Centricon-10 (BioRad Co.) y análogos. Como medio para la purificación, se utilizan en combinación diversas técnicas empleadas convencionalmente para la purificación de proteínas, tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración sobre gel, cromatografía hidrófoba, cromatografía en fase inversa, y electroforesis preparativa. Más específicamente, es posible purificar la proteína de fijación de OCIF por una combinación de cromatografía de filtración sobre gel con la columna Superose 12 (Pharmacia Co.) o análogas, y cromatografía de fase inversa. Para detectar la proteína de fijación de OCIF en el proceso de purificación, se examina la actividad de fijación de la proteína de fijación de OCIF al OCIF inmovilizado, o el material fijado al OCIF inmovilizado se somete a inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-OCIF y se analiza por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE).

La proteína de fijación de OCIF obtenida es útil como agente para tratamiento de enfermedades causadas por anomalía del metabolismo óseo tales como osteopetrosis o como reactivo para investigación y diagnóstico de estas enfermedades.

La presente invención proporciona adicionalmente DNA codificante de una nueva proteína (molécula de fijación de OCIF o OBM) que se fija al factor inhibidor de la osteoclastogénesis, proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos codificada por este DNA, un método para la preparación de esta proteína por la técnica de ingeniería genética, y composiciones farmacéuticas que comprenden esta proteína. Adicionalmente, La presente invención proporciona métodos para escrutinio de sustancias que regulan la expresión de OBM, un método para escrutar sustancias inhibitoras o modificadoras de la actividad biológica de OBM, o un método para escrutar receptores que transducen la acción de OBM por fijación a OBM, y composiciones farmacéuticas que comprenden sustancias obtenidas como resultado del escrutinio.

La nueva proteína OBM que es codificada por el DNA de la presente invención tiene las propiedades fisicoquímicas y actividad biológica siguientes.

- (a) Se fija específicamente al factor inhibidor de la osteoclastogénesis (OCIF),
- (b) tiene un peso molecular de aproximadamente 40.000 (\pm 4.000) cuando se determina por SDS-PAGE en condiciones reductoras y un peso molecular aparente de aproximadamente 90.000-110.000 cuando se reticula a OCIF de forma monómera, y
- (c) exhibe actividad de soporte o promoción de la diferenciación y maduración de los osteoclastos.

El factor inhibidor de la osteoclastogénesis humana (OCIF) que puede utilizarse como sonda para identificar el DNA que codifica OBM, la molécula de fijación de OCIF de la presente invención, y evaluar las propiedades de OBM

puede aislarse a partir de un caldo de cultivo de una línea celular de fibroblastos de pulmón embrionario humano, IMR-90, de acuerdo con el documento WO No. 96/26217). El OCIF recombinante humano, OCIF recombinante de ratón, el OCIF recombinante de rata, y análogos, pueden utilizarse también para el aislamiento y la identificación del DNA que codifica la OBM. Estas proteínas OCIF recombinantes pueden producirse por inserción de fragmentos de DNA que codifican estas proteínas en vectores de expresión de acuerdo con métodos convencionales, expresión en células animales tales como células CHO, células BHK, o células Namalwa, o en células de insecto, y purificación de las mismas.

Como un método para el aislamiento de cDNA codificante de una proteína diana (clonación de cDNA), se puede emplear el método que comprende la determinación de una secuencia parcial de aminoácidos de la proteína y aislamiento del cDNA diana por hibridación utilizando la secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de aminoácidos. Otro método utilizable, incluso en el caso en que la secuencia de aminoácidos de la proteína no se conoce, comprende construir una genoteca de cDNA en un vector de expresión, introducir el cDNA en células, y escrutar respecto a la expresión de la proteína diana a fin de aislar el cDNA objetivo (método de expresión-clonación, D'Andrea *et al.*: Cell 57, 277-285, 1989; Fukunaga *et al.*: Cell 61, 341-350, 1990). El método de expresión-clonación, se seleccionan células hospedadoras adecuadas tales como bacterias, levaduras, células animales, y análogas dependiendo del objetivo. En muchos casos, se seleccionan células animales como las células hospedadoras para la clonación de cDNA que codifica una proteína tal como la proteína de fijación de OCIF que se considera estar presente en la superficie de las membranas de las células animales. Normalmente, se seleccionan células hospedadoras que exhiben alta eficiencia para la transfección de DNA y consecución de la expresión del DNA introducido a niveles altos. Una de tales células animales son las células de riñón de mono, COS-7, utilizadas en la presente invención. Dado que el antígeno T grande de SV40 se expresa en las células COS-7, puede estar presente un plásmido que tiene un replicador de SV40 como un episoma de copias múltiples en la célula, por lo que se espera un alto nivel de expresión. Adicionalmente, dado que la expresión de una proteína diana por las células COS-7 alcanza un máximo al cabo de unos cuantos días después de la introducción del DNA, la célula es adecuada para escrutinio rápido. Una combinación de esta célula hospedadora con un plásmido capaz de expresión elevada asegura una expresión génica de nivel extremadamente alto. El factor que exhibe la influencia máxima sobre la expresión de un gen en un plásmido es un promotor. Promotores tales como el promotor SR α y promotores derivados de citomegalovirus se utilizan como promotores de alta expresión. Para escrutar respecto al cDNA que codifica una proteína de membrana por la estrategia de expresión-clonación, se utilizan procedimientos de escrutinio tales como el método de fijación, el método de lavado en batea, o el método de emulsión de película.

EL DNA codificante de la proteína (OBM) que se fija específicamente a OCIF, se aísla por la combinación de la estrategia de expresión-clonación y el escrutinio por el método de fijación. Sustancias fisiológicamente activas pueden ser escrituradas utilizando el DNA o la proteína expresada. La OBM codificada por el DNA puede detectarse por marcación de OCIF y ensayo de la fijación del OCIF marcado a la superficie de la membrana de una célula animal. El OCIF puede marcarse por un método convencional de marcación tal como el método de marcación por radioisótopos o el método de marcación fluorescente que se utiliza para marcación de proteínas comunes. La marcación de residuos de tirosina por ^{125}I puede citarse como ejemplo específico de marcación de OCIF con un radioisótopo. Pueden utilizarse métodos de marcación tales como el método del Iodogen, el método de la cloramina T y el método enzimático. La fijación de OCIF marcado a la superficie de la membrana de las células animales puede ensayarse por métodos convencionales. La adición de OCIF sin marcar al medio utilizado para el ensayo a una concentración 100 a 400 veces mayor que la concentración de OCIF marcado, permite la cuantificación de la cantidad de fijación inespecífica. La cantidad de fijación específica de OCIF puede calcularse sustrayendo la cantidad de fijación inespecífica de la cantidad total de fijación del OCIF marcado.

Los autores de la presente invención supusieron que existe una interacción entre el factor implicado en la diferenciación de los osteoclastos y el OCIF. Sobre la base de esta hipótesis, para aislar la proteína a la que se fija OCIF, los autores de la invención escrituraron la genoteca de expresión preparada a partir de mRNA de la línea de células osteoblásticas estromales de ratón, ST2, utilizando OCIF recombinante de acuerdo con el método siguiente. Específicamente, se insertó DNA sintetizado utilizando mRNA de ST2 en un vector de expresión para células animales y el vector con la inserción se introdujo en células COS-7 de riñón de mono. La proteína objetivo expresada en las células COS-7 se escrutió utilizando OCIF marcado con ^{125}I como sonda. Como resultado, se aisló DNA codificante de la proteína que se fija específicamente a OCIF. Se determinó luego la secuencia de nucleótidos del DNA que codifica esta molécula de fijación de OCIF (molécula de fijación de OCIF; OBM). Además, se encontró que la OBM codificada por este DNA se fija específica y fuertemente a OCIF en la membrana celular.

Condiciones comparativamente moderadas para hibridación de DNA codificante de OBM son condiciones, por ejemplo, en las cuales se transfiere DNA a una membrana de nailon y se inmoviliza en la misma de acuerdo con métodos convencionales y se hibrida en una solución tampón para hibridación con una sonda de DNA marcada con un isótopo a una temperatura de 40-70°C durante aproximadamente 2 horas a una noche, seguido por lavado en 0,5 x SSC (cloruro de sodio 0,075 M, y citrato de sodio 0,0075 M) a 45°C durante 10 minutos. Específicamente, se utiliza Highbond N (Amersham Co.) como la membrana de nailon para transferir e inmovilizar DNA sobre la misma. Se hibrida luego DNA con una sonda de DNA marcada con ^{32}P en un tampón de hibridación rápido (Amersham Co.) a 65°C durante 2 horas, seguido por lavado con 0,5 x SSC (cloruro de sodio 0,075 M y citrato de sodio 0,0075 M) a 45°C durante 10 minutos.

Un sistema de co-cultivo de células osteoblásticas estromales de ratón, ST2, y células de bazo de ratón en presencia de vitamina D₃ de forma activa o PTH es bien conocido como sistema de cultivo *in vitro* típico para la formación de osteoclastos. La proteína de fijación de OCIF se especifica como la proteína que es inducida específicamente en las células osteoblásticas estromales cultivadas en presencia de un agente que acelera la resorción ósea tal como la vitamina D₃ de forma activa o PTH. Adicionalmente, debido al hecho de que la formación de osteoclastos es estimulada por la adición de la proteína codificada por el DNA codificante de OBM a las células de bazo de ratón cultivadas incluso en ausencia de vitamina D₃ de forma activa o PTH, se considera que la OBM que es codificada por el DNA está implicada en la diferenciación y maduración de los osteoclastos.

La OBM recombinante puede producirse por inserción del DNA codificante de OBM en un vector de expresión para construir un plásmido e introducir el plásmido en diversas células o microorganismos que expresan OBM recombinante. Como hospedador en el que se expresa OBM recombinante, pueden utilizarse células de mamífero tales como COS-7, CHO, Namalwa, o bacterias tales como *Escherichia coli*. La OBM puede expresarse como una proteína de forma fijada a la membrana utilizando el DNA de longitud total o como una forma de secreción o una proteína de forma soluble por eliminación de la porción codificante del dominio transmembranal. La OBM recombinante producida puede purificarse eficientemente utilizando una combinación adecuada de métodos convencionales de purificación utilizados para proteínas comunes, tales como cromatografía de afinidad utilizando columnas inmovilizadas de OCIF, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de filtración sobre gel. La proteína de fijación de OCIF obtenida es útil como agente para el tratamiento de enfermedades causadas por anomalías del metabolismo óseo tales como osteopetrosis o como reactivo para la investigación y diagnóstico de dichas enfermedades.

Las operaciones de escrutinio siguientes pueden llevarse a cabo utilizando la proteína OBM codificada por el DNA codificante de OBM: (1) escrutinio de sustancias que regulan la expresión de OBM, (2) escrutinio de sustancias que se fijan específicamente a OBM e inhiben o modulan la actividad biológica de OBM, y (3) escrutinio de proteínas que están presentes en las células precursoras de los osteoclastos y transducen la actividad biológica de OBM (receptor de OBM). Es también posible desarrollar antagonistas y agonistas utilizando este receptor de OBM. En la química combinatoria que utiliza la OBM o el receptor de OBM arriba mencionado, puede prepararse una genoteca peptídica utilizada para el escrutinio de los antagonistas o agonistas por el método siguiente. Específicamente, uno de los métodos es el método de división (Lam *et al.*: Nature 354, 82-84, 1991). De acuerdo con este método, se preparan portadores sintéticos (cuentas), cada uno de los cuales comprende un aminoácido específico (unidad) fijado al mismo, por separado para todas las unidades. Los portadores sintetizados se mezclan globalmente y se dividen en porciones iguales al número de las unidades. A continuación, se combinan las unidades siguientes. Este procedimiento se repite "n" veces para producir una genoteca que contiene portadores a los cuales están fijadas "n" unidades. De acuerdo con este método de síntesis, cada agrupación de portadores tiene un solo tipo de secuencia. Por consiguiente, es posible identificar un péptido que se fija específicamente a la proteína de fijación de OCIF por selección de la agrupación que da una señal positiva en este método de escrutinio utilizando la proteína, y determinación de la secuencia de aminoácidos del péptido fijado a la agrupación. Otro método es el método de presentación de fago, que utiliza DNA sintético portador de un fago que codifica péptidos con secuencias de aminoácidos aleatorias. El método tiene la ventaja de aumentar el número de moléculas en la genoteca en comparación con el método de la genoteca de péptidos sintéticos mencionado anteriormente, pero tiene la desventaja de una menor diversidad para un número dado de moléculas debido a que pueden existir secuencias particulares que falten en la genoteca si los fagos son incapaces de expresar dichas secuencias. En el método de presentación de fago, el sistema de escrutinio que utiliza la proteína de la presente invención puede aplicarse también para determinar la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido. A saber, el fago que se fija específicamente a la proteína de la presente invención se concentra por lavado en batea, se amplifica el fago seleccionado en *Escherichia coli*, y se determina la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido. Adicionalmente, un péptido que exhiba alta especificidad y alta afinidad para OBM o el receptor de OBM puede ser escrutado a partir de una genoteca peptídica utilizando los sistemas de escrutinio arriba mencionados en (2) y (3) por escrutinio en presencia de OBM o OCIF mientras se aumenta la concentración de OBM o OCIF. De este modo se seleccionan únicamente agrupaciones o fagos portadores positivos. Por ejemplo, se escrutaron agonistas peptídicos de peso molecular bajo que exhibían una actividad afín a EPO (eritropoyetina) a partir de una genoteca peptídica utilizando un receptor de eritropoyetina (EPO) que es una hormona hematopoyética, se analizó la estructura terciaria de esta sustancia, y sobre la base de esta estructura terciaria, se sintetizaron sustancias de peso molecular bajo (antagonistas) que exhibían la actividad afín a EPO (Nicholas *et al.*: Science, 273, 458-463, 1996).

Los autores de la presente invención han descubierto previamente, utilizando el factor inhibidor de la osteoclastogénesis, OCIF, que una proteína de fijación de OCIF se expresa específicamente en la línea de células osteoblásticas estromales, ST2, cultivada en presencia de un factor estimulante de la resorción ósea tal como la vitamina D₃ de forma activa o la hormona paratiroidea (PTH). Los autores de la invención han encontrado adicionalmente que esta proteína exhibe actividad biológica para soportar o estimular la diferenciación o maduración de los osteoclastos por las células inmaduras precursoras de los osteoclastos, y han clarificado diversas propiedades fisicoquímicas y la actividad biológica de esta proteína por purificación de la misma. A fin de comparar la OBM recombinante y la proteína de tipo natural purificada arriba mencionada que se fija específicamente a OCIF, los autores de la presente invención investigaron las propiedades fisicoquímicas y las actividades biológicas de las dos proteínas. Como resultado, se confirmó que ambas proteínas ① son ambas proteínas fijadas a la membrana que se fijan específicamente a OCIF, ② tienen pesos moleculares de aproximadamente 40.000 determinados por SDS-PAGE, y ③ tienen pesos moleculares aparentes de aproximadamente 90.000-110.000 cuando están reticuladas a un OCIF de forma monómera. No sólo estas propiedades fisicoquímicas son idénticas, sino que ambas proteínas exhiben una actividad biológica que soporta o estimula la diferenciación o maduración de los osteoclastos, lo que sugiere la posibilidad de que se trate de la misma proteína.

Adicionalmente, se confirmó que un anticuerpo policlonal de conejo anti-OBM producido por utilización de la proteína purificada preparada por expresión de DNA codificante de OBM por una técnica de ingeniería genética (OBM recombinante) reacciona cruzadamente con la proteína de tipo natural purificada arriba descrita, inhibiendo la fijación específica de esta proteína de tipo natural purificada y OCIF de la misma manera que el anticuerpo inhibe la fijación específica de OBM y OCIF. Sobre la base de estos resultados, está claro que la OBM recombinante es idéntica a la proteína de tipo natural que se fija específicamente a OCIF.

Para aislar un gen (cDNA) que codifica la proteína de fijación de OCIF humana (denominada en lo sucesivo OBM humana) que se fija específicamente a OCIF y exhibe la actividad de soporte y promoción de la diferenciación y maduración de los osteoclastos a partir de células de bazo de ratón de la misma manera que la dosis de OBM de ratón de tipo natural o recombinante, se escrutó una genoteca de cDNA preparada a partir de mRNA derivado de ganglios linfáticos humanos, utilizando como sonda un fragmento de cDNA de OBM humana. El fragmento de cDNA de OBM humana se obtuvo por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de acuerdo con el método arriba mencionado utilizando a la vez cDNA preparado a partir de ganglios linfáticos humanos como molde y el iniciador que se preparó a partir de cDNA de OBM de ratón. Como resultado, se aisló cDNA codificante de la proteína humana que se fija específicamente a OCIF y se determinó la secuencia de nucleótidos del cDNA codificante de esta molécula de proteína de fijación de OCIF humana (es decir el cDNA codificante de OBM humana). Análogamente a la OBM de ratón, esta OBM humana codificada por el cDNA tiene características de fijación fuerte y específica a OCIF en la membrana celular y exhibe la actividad de soporte y promoción de la diferenciación y maduración de los osteoclastos por las células de bazo de ratón. Específicamente, la presente invención proporciona DNA codificante de la nueva proteína OBM humana que se fija al factor inhibidor de la osteoclastogénesis (OCIF), una proteína que posee la secuencia de aminoácidos codificada por el DNA, un método para producir la proteína que exhibe características de fijación específica a OCIF y la actividad de soporte y promoción de la diferenciación y maduración de los osteoclastos por las células de bazo de ratón por técnicas de ingeniería genética, composiciones farmacéuticas que comprenden esta proteína para el tratamiento de enfermedades causadas por la anormalidad del metabolismo óseo, un método para escrutar sustancias reguladoras de la expresión de OBM humana, un método para escrutar sustancias que inhiben o modulan la actividad de OBM humana por fijación a la misma, un método para escrutar receptores que se fijan a la OBM humana y transmiten la acción de la OBM, y composiciones farmacéuticas que comprenden las sustancias obtenidas por estos escrutinios.

La presente invención proporciona además DNA codificante de la nueva proteína OBM humana que se fija específicamente a OCIF y exhibe la actividad biológica de soporte y promoción de la diferenciación y maduración de los osteoclastos, una proteína que posee la secuencia de aminoácidos codificada por el DNA, un método para producir la proteína que exhibe características de fijación específica a OCIF y la actividad de soporte y promoción de la diferenciación y maduración de los osteoclastos por técnicas de ingeniería genética, y composiciones farmacéuticas que comprenden esta proteína para el tratamiento de enfermedades causantes de anormalidad del metabolismo óseo. Adicionalmente, la presente invención proporciona un método para escrutinio de sustancias que regulan la expresión de OBM humana, un método para escrutar sustancias que inhiben o modulan la actividad de la OBM humana por fijación a la misma, un método para escrutar receptores que se fijan a la OBM humana y transmiten la acción de OBM, anticuerpos contra la proteína de fijación de OCIF humana, y composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos para la prevención o el tratamiento de enfermedades que causan anormalidad del metabolismo óseo.

La nueva molécula proteína de fijación de OCIF (OBM) humana que es codificada por el DNA de la presente invención tiene las propiedades fisicoquímicas y la actividad biológica siguientes:

- (a) se fija específicamente al factor inhibidor de la osteoclastogénesis (OCIF) (documento WO 96/26217),
- (b) tiene un peso molecular de aproximadamente 40.000 (\pm 5.000) cuando se determina por SDS-PAGE en condiciones reductoras y un peso molecular aparente de aproximadamente 90.000-110.000 cuando está reticulada con una forma monómera de OCIF, y
- (c) exhibe actividad de soporte y promoción de la diferenciación y maduración de los osteoclastos.

El cDNA de OBM de ratón que codifica la proteína de fijación de OCIF de ratón y se utiliza como sonda para aislar e identificar el cDNA codificante de la OBM humana, puede aislarse de acuerdo con el método arriba mencionado a partir de una genoteca de cDNA de la línea de células osteoblásticas estromales de ratón, ST2. El factor inhibidor de la osteoclastogénesis humana (OCIF) que es necesario para evaluar las propiedades y la actividad biológica de la proteína obtenida por la expresión de cDNA de OBM humana, puede prepararse de acuerdo con el método descrito en el documento WO 96/26217 por aislamiento a partir de un caldo de cultivo de la línea de células fibroblásticas humana, IMR-90, o por técnicas de ingeniería genética utilizando el DNA que codifica OCIF. El OCIF humano recombinante, el OCIF recombinante de ratón, el OCIF recombinante de rata, o análogos pueden utilizarse para la evaluación de las propiedades y actividad biológica de la OBM humana. Estos OCIF recombinantes pueden obtenerse de acuerdo con métodos convencionales por inserción de cDNA en un vector de expresión, expresión del cDNA en células animales tales como células CHO, células BHK, o células Namalwa, o en células de insecto, y purificación de las proteínas expresadas.

Los métodos siguientes pueden utilizarse para aislar cDNA humano codificante de la proteína diana (clonación de cDNA). ① Un método que comprende purificar la proteína, determinar la secuencia parcial de aminoácidos de la

proteína, y aislar el cDNA diana por hibridación utilizando el fragmento de DNA que comprende la secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de aminoácidos como sonda, ② un método aplicado incluso en el caso en que la secuencia de aminoácidos de la proteína no se conoce, que comprende construir una genoteca de cDNA en un vector de expresión, introducir la genoteca de cDNA en células, y escrutar en cuanto a expresión de la proteína diana para aislar el cDNA objetivo (método de expresión-clonación), y ③ un método de aislamiento de cDNA codificante de la proteína humana diana a partir de la genoteca de cDNA construida utilizando células o tejidos humanos por hibridación o por el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el cDNA codificante de la proteína de origen mamífero (distinto del humano) que posee las mismas características y actividad biológica que la proteína diana de origen humano como sonda, suponiendo que la sonda de cDNA tiene una homología alta con el cDNA de origen humano que debe clonarse. Sobre la base de la suposición de que el cDNA de OBM humana tiene una homología alta con el cDNA de OBM de ratón, es posible determinar qué células o tejidos producen OBM humana por el método de hibridación Northern utilizando el cDNA de OBM de ratón como sonda. El cDNA de OBM humana puede obtenerse por el método siguiente utilizando el iniciador de OBM de ratón preparado a partir del cDNA de OBM de ratón. Pueden prepararse fragmento de cDNA de OBM humana por el método PCR utilizando como molde cDNA preparado a partir de tejidos promotores de OBM humana tales como ganglios linfáticos humanos. Estos fragmentos de cDNA de OBM humana se utilizan como sondas para escrutar la genoteca de cDNA de células o tejidos productores de OBM humana que se identificaron de acuerdo con el método arriba mencionado. El cDNA codifica OBM humana que tiene características de fijación específica a OCIF y exhibe actividad para soportar y promover la diferenciación y maduración de los osteoclastos. Debido a que la OBM que es codificada por el DNA es una proteína de tipo fijado a la membrana que comprende un dominio transmembranal, esta proteína puede ser detectada por marcación de OCIF y por examen de la fijación del OCIF marcado a la superficie de células animales en las cuales se expresaba el cDNA. El método de marcación arriba descrito que utiliza radioisótopos o fluoresceína aplicado convencionalmente a marcación de proteínas puede utilizarse para marcar OCIF.

El peso molecular de la proteína expresada por el cDNA de OBM humana puede ser determinado por cromatografía de filtración sobre gel, SDS-PAGE, o métodos análogos. A fin de determinar exactamente el peso molecular, es deseable utilizar el método SDS-PAGE, por el cual se especificó la OBM humana como una proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 40.000 (40.000 ± 5.000) en condiciones reductoras.

Condiciones comparativamente moderadas para hibridación de DNA son, por ejemplo, condiciones en las cuales se transfiere DNA a una membrana de nailon y se inmoviliza en la misma de acuerdo con un método convencional, y se hibrida con un DNA sonda marcado con un isótopo en una solución tampón para hibridación a una temperatura de 40-70°C durante aproximadamente 2 horas a una noche, seguido por lavado en 0,5 x SSC (cloruro de sodio 0,075 M y citrato de sodio 0,075 M) a 45°C durante 10 minutos. Específicamente, se utiliza Highbond N (Amersham Co.) como la membrana de nailon para transferir e inmovilizar DNA sobre ella. El DNA se hibrida luego con un DNA sonda marcado con ³²P en un tampón de hibridación rápido (Amersham Co.) a 65°C durante 2 horas, seguido por lavado con 0,5 x SSC a 45°C durante 10 minutos.

Un sistema de co-cultivo de células osteoblásticas estromales de ratón, ST2, y células de bazo de ratón en presencia de vitamina D₃ de forma activa o PTH es bien conocido como sistema de cultivo *in vitro* típico para formación de osteoclastos. La interacción por adhesión de células osteoblásticas estromales y células de bazo y la presencia de un factor estimulante de la resorción ósea tal como vitamina D₃ de forma activa o PTH son indispensables para la formación de osteoclastos en este sistema de cultivo *in vitro*. En este sistema de cultivo *in vitro*, las células COS, células de riñón de mono que no tienen capacidad alguna de soporte de la formación de osteoclastos, adquieren capacidad para soportar la formación de osteoclastos por las células de bazo en ausencia de un factor estimulante de la resorción ósea cuando el cDNA se expresaba como lo hacía la línea de células osteoblásticas estromales ST2. Basándose en el hecho de que el cDNA codifica una proteína que comprende una forma de dominio transmembranal, este cDNA puede expresarse como una forma de secreción o forma soluble por eliminación de la parte que codifica este dominio transmembranal. Se confirmó que los osteoclastos pueden formarse por la adición de la OBM humana de la forma de secreción al sistema de cultivo *in vitro* arriba mencionado en ausencia de factores estimulantes de la resorción ósea. Basándose en estos resultados, la OBM humana que es codificada por el cDNA de la presente invención se especifica como el factor implicado en la diferenciación y maduración de los osteoclastos.

Una OBM humana recombinante puede prepararse por inserción del cDNA de la presente invención en un vector de expresión, preparación de un plásmido de expresión de OBM humana, introducción del plásmido en diversas cepas de células y expresión de OBM en las células. Como hospedador para la expresión de OBM pueden utilizarse células de mamífero tales como COS-7, CHO, células Namalwa, o bacterias tales como *Escherichia coli*. En este caso, OBM puede expresarse como una proteína de forma fijada a la membrana, utilizando el DNA de longitud total, o como una proteína de forma de secreción o de forma soluble por eliminación de la parte codificante del dominio transmembranal. La OBM recombinante así producida puede purificarse eficientemente utilizando una combinación adecuada de métodos convencionales de purificación utilizados para proteínas comunes tales como cromatografía de afinidad utilizando columnas inmovilizadas de OCIF, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de filtración sobre gel. La OBM humana de la presente invención así obtenida es útil como agente para el tratamiento de enfermedades causadas por anomalía del metabolismo óseo tales como osteopetrosis o como un reactivo para investigación y diagnóstico de tales enfermedades.

Las operaciones de escrutinio siguientes pueden llevarse a cabo utilizando la proteína OBM codificada por el cDNA de la presente invención: (1) escrutinio de sustancias que pueden regular la expresión de OBM humana, (2) escrutinio

de sustancias que se fijan específicamente a OBM humana e inhiben o modifican la actividad biológica de OBM, y (3) escrutinio de proteínas humanas que están presentes en las células precursoras de los osteoclastos y transmiten la actividad biológica de la OBM humana (receptor de OBM humana). Es también posible desarrollar antagonistas y agonistas utilizando este receptor de OBM humana. En la química combinatoria que utiliza la OBM humana o el receptor de OBM humana, pueden producirse genotecas peptídicas requeridas para el escrutinio de antagonistas o agonistas por el mismo método utilizado para el escrutinio que utiliza OBM de ratón. Puede obtenerse un péptido con especificidad y afinidad extremadamente altas por escrutinio de genotecas peptídicas utilizando OBM humana en lugar de OBM de ratón.

Aunque esta OBM es muy útil como se ha mencionado arriba y los anticuerpos que reconocen específicamente OBM y el inmunoensayo enzimático que utiliza estos anticuerpos son indispensables en la determinación de la concentración de OBM, hasta ahora no ha estado disponible anticuerpo alguno útil para el acceso a la concentración de OBM. Adicionalmente, se supone que un anticuerpo anti-OBM o anticuerpo anti-sOBM que neutraliza la actividad biológica de OBM o sOBM suprime la actividad de OBM o sOBM, específicamente la actividad para inducir la formación de osteoclastos. Se espera que éstos sean útiles como agentes terapéuticos para tratar la anomalía del metabolismo óseo. Sin embargo, hasta ahora no se ha dispuesto de ningún anticuerpo de este tipo.

Teniendo en cuenta esta situación, los autores de la presente invención han realizado estudios extensos. Como resultado, los autores de la presente invención han encontrado anticuerpos (anticuerpos anti-OBM/sOBM) que reconocen tanto OBM, una proteína fijada a la membrana que se fija específicamente al factor inhibidor de la osteoclastogénesis (OCIF), como la OBM soluble (sOBM) que carece de un dominio transmembranal. De acuerdo con ello, la presente invención proporciona anticuerpos (anticuerpos anti-OBM/sOBM) que reconocen a la vez OBM, una proteína fijada a la membrana que se fija específicamente al factor inhibidor de la osteoclastogénesis (OCIF) como sOBM que carece de un dominio transmembranal; un método para la preparación de los mismos, un método para determinación de concentraciones de OBM y sOBM utilizando estos anticuerpos; y agentes que comprenden estos anticuerpos como componente activo para la prevención o el tratamiento de enfermedades resultantes de la anomalía del metabolismo óseo.

La presente invención se refiere a anticuerpos (anticuerpos anti-OBM/sOBM) que reconocen a la vez la OBM, una proteína fijada a la membrana que se fija específicamente al factor inhibidor de la osteoclastogénesis (OCIF), como la OBM soluble (sOBM) que carece de un dominio transmembranal; un método para la preparación de los mismos; un método para cuantificar OBM y sOBM utilizando estos anticuerpos; y agentes que comprenden estos anticuerpos como componente activo para la prevención o el tratamiento de enfermedades resultantes de la anomalía del metabolismo óseo.

Los anticuerpos de la presente invención exhiben actividad neutralizadora de la actividad aceleradora de la osteoclastogénesis que es la actividad biológica de OBM y sOBM y comprende los anticuerpos que tienen las características siguientes:

- (a) anticuerpo policlonal que reconoce a la vez OBM de ratón y sOBM de ratón (anticuerpo policlonal anti-OBM/sOBM de ratón),
- (b) anticuerpo policlonal que reconoce a la vez OBM humana y sOBM humana (anticuerpo policlonal anti-OBM/sOBM humana),
- (c) anticuerpos monoclonales que reconocen a la vez OBM de ratón y sOBM de ratón (anticuerpos monoclonales anti-OBM/sOBM de ratón),
- (d) anticuerpos monoclonales que reconocen a la vez OBM humana y sOBM humana (anticuerpos monoclonales anti-OBM/sOBM humana), y
- (e) anticuerpos monoclonales anti-OBM/sOBM humana que reaccionan cruzadamente a la vez con OBM de ratón y sOBM de ratón.

El anticuerpo policlonal que reconoce a la vez OBM de ratón y sOBM de ratón (denominado en lo sucesivo anticuerpo policlonal anti-OBM/sOBM de ratón) y el anticuerpo policlonal que reconoce OBM a la vez OBM humana y sOBM humana (denominado en lo sucesivo anticuerpo policlonal anti-OBM/sOBM humana) se produjeron por el método siguiente. La OBM de ratón purificada utilizada como antígeno para inmunización puede obtenerse de acuerdo con el método arriba mencionado. Especialmente, la línea de células osteoblásticas estromales de ratón, ST2, se trató con vitamina D₃ de forma activa, y la OBM en la membrana celular se purificó utilizando una columna inmovilizada de OCIF y cromatografía de filtración sobre gel, obteniéndose de este modo OBM natural de ratón (OBM nativa). El cDNA de OBM de ratón arriba mencionado (Tabla de Secuencias, Secuencia No. 15) o cDNA de OBM humana (Tabla de Secuencias, Secuencia ID No. 12) se insertó en un vector de expresión de acuerdo con métodos convencionales. La OBM recombinante de ratón (Tabla de Secuencias, Secuencia ID No. 1) y la OBM recombinante humana (Tabla de Secuencias, Secuencia ID No. 11) pueden obtenerse por la expresión de cDNA en células animales tales como células CHO, células BHK, Namalwa, o células COS-7, células de insecto o *Escherichia coli*, y purificación de las mismas utilizando los mismos métodos de purificación mencionados anteriormente. Éstas pueden utilizarse como antígenos para inmunización. En este caso, la purificación de una gran cantidad y un alto nivel de OBM de ratón u OBM humana

que son proteínas fijadas a la membrana es una tarea que requiere una gran cantidad de mano de obra. Por otra parte, como se ha mencionado arriba, se sabe que OBM, que es una proteína fijada a la membrana y una OBM soluble (sOBM) que se obtiene por delección del dominio transmembranal de OBM son casi iguales en sus actividades de diferenciación y maduración de los osteoclastos. Es posible utilizar sOBM de ratón y sOBM humana que se expresan con relativa facilidad y se purifican a un nivel alto, como antígenos para inmunización.

La sOBM de ratón (Tabla de Secuencias, Secuencia ID No. 16) y la sOBM humana (Tabla de Secuencias, Secuencia ID No. 17) pueden obtenerse por adición de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal conocida que es originada por la otra proteína de secreción en el lado de aguas arriba del extremo 5' de, respectivamente, cDNA de sOBM de ratón (Tabla de Secuencias, Secuencia ID No. 18) y cDNA de sOBM humana (Tabla de Secuencias, Secuencia ID No. 19), e inserción de éstos en un vector de expresión por el uso de técnicas de ingeniería genética, causando así que estas proteínas se expresen en células hospedadoras tales como diversas células animales, células de insecto, o *Escherichia coli*, y purificación de los productos resultantes. Los antígenos para inmunización así obtenidos se disuelven en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se mezclan con el mismo volumen de adyuvante completo de Freund para emulsionar la solución en caso requerido, y se administran por vía subcutánea a animales aproximadamente una vez a la semana para inmunizar dichos animales varias veces. Se administra una inyección de refuerzo cuando el título de anticuerpos alcanza un máximo. Se realiza extracción de sangre 10 días después de la administración de refuerzo. El antisero resultante se trata por precipitación con sulfato de amonio. La fracción de IgG se purifica utilizando cromatografía de intercambio aniónico o se purifica por cromatografía en columna de proteína A- o proteína G-Sepharose después de diluir el antisero dos veces con Binding Buffer™ (BioRad Co.), para obtener el anticuerpo policlonal anti OBM/sOBM de ratón o anti OBM/sOBM humano.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden obtenerse de acuerdo con el método siguiente. De la misma manera que en el caso de los anticuerpos policlonales, pueden utilizarse OBM natural de ratón (OBM nativa), OBM recombinante de ratón o humana, o sOBM recombinante de ratón o humana como inmunógenos para preparar anticuerpos monoclonales. Se producen hibridomas de acuerdo con métodos convencionales por inmunización de mamíferos con estos antígenos o por inmunización de linfocitos *in vitro* y fusión de las células inmunizadas con células de mieloma. Por análisis del sobrenadante del cultivo de hibridoma así obtenido por un método ELISA en fase sólida se seleccionan hibridomas productores de anticuerpos que reconocen el antígeno altamente purificado. Los hibridomas resultantes se someten a clonación y se establecen como clones de hibridoma productores de anticuerpos estables. Estos hibridomas se cultivan para obtener los anticuerpos. Comúnmente se utilizan pequeños animales tales como ratones o ratas para producir hibridomas. Los animales se inmunizan por inyección intravenosa o intraperitoneal del antígeno diluido a una concentración adecuada utilizando un disolvente adecuado tal como solución salina fisiológica. Opcionalmente, puede utilizarse adyuvante completo de Freund junto con el antígeno. Éstos se inyectan usualmente 3-4 veces, una vez a la semana o cada dos semanas. Los animales inmunizados se someten a disección tres días después de la inmunización final. Como células inmunizadas se utilizan esplenocitos del bazo extirpado. Como mieloma de ratón para fusionar con las células inmunizadas, pueden utilizarse p3/x63-Ag8, p3-U1, NS-1, MPC-11, SP-2/0, FO, P3x63, Ag8.653, y S194. Como la célula originaria de rata se utiliza una línea de células tal como R-210. Se producen anticuerpos humanos por inmunización de linfocitos B humanos *in vitro* y fusión de las células inmunizadas con células de mieloma humanas o una línea de células transformada con el virus EB. La fusión de las células inmunizadas y células de mieloma puede llevarse a cabo de acuerdo con un método convencional tal como el método de Koehler y Milstein (Koehler *et al.*: Nature 256, 495-497 (1975)). Es también aplicable un método que utiliza pulsos eléctricos. Los linfocitos inmunizados y las células de mieloma se mezclan en una relación aceptada convencionalmente y se fusionan en un medio de cultivo exento de FCS (exento de suero de bovino fetal) que con una adición de polietilenglicol, y se cultivan en un medio de selección HAT que contiene FCS para seleccionar las células fusionadas (hibridomas). A continuación, los hibridomas que producen anticuerpos se seleccionaron utilizando un método de detección de anticuerpos convencional tal como un ELISA, una técnica de placa, el método Ouchterlony, o método de agregación, para establecer hibridomas estables. Los hibridomas establecidos de este modo pueden subcultivarse por un método de cultivo convencional o pueden guardarse por congelación en caso requerido. Un hibridoma puede cultivarse por un método convencional para recoger el sobrenadante de cultivo o implantarse en la cavidad abdominal de mamíferos para obtener el anticuerpo a partir del fluido ascítico. El anticuerpo en el sobrenadante de cultivo o la ascitis puede purificarse por un método convencional tal como separación con sal, intercambio iónico y cromatografía de filtración sobre gel, o cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G. Prácticamente la totalidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos utilizando sOBM como antígeno pueden reconocer específicamente no sólo sOBM, sino también OBM (tales anticuerpos se denominan en lo sucesivo anticuerpos monoclonales anti-OBM/sOBM). Estos anticuerpos pueden utilizarse para la cuantificación de OBM o sOBM. Las cantidades de OBM y sOBM pueden cuantificarse por marcación de estos anticuerpos con un radioisótopo o una enzima y por aplicación de los anticuerpos marcados a un sistema de cuantificación conocido como un radioinmunoensayo (RIA) o inmunoensayo enzimático (EIA). Utilizando estos sistemas de cuantificación, la cantidad de sOBM en una muestra biológica tal como una muestra de sangre u orina puede determinarse fácilmente con sensibilidad alta. Adicionalmente, la cantidad de OBM que se fija a un tejido o superficie de células puede medirse con facilidad a sensibilidad alta utilizando un ensayo de fijación que emplea estos anticuerpos.

Cuando se utiliza un anticuerpo como medicación para humanos, es deseable utilizar un anticuerpo anti OBM/sOBM de tipo humano teniendo en cuenta la antigenicidad. El anticuerpo anti-OBM/sOBM humana de tipo humano se puede preparar de acuerdo con los métodos siguientes: ①, ②, o ③. En el método ①, linfocitos humanos recogidos de sangre periférica o de bazo humano se inmunizan con un antígeno de OBM humana o sOBM humana *in vitro* en presencia de IL-4. Los linfocitos humanos inmunizados resultantes se fusionan con K6H6/B5 (ATCC CRL1823) que

es un hetero-hibridoma de ratón y humano, y se escrutan para obtener el hibridoma productor de anticuerpos objetivo. Los anticuerpos producidos por los hibridomas productores de anticuerpos resultantes son anticuerpos monoclonales anti-OBM/sOBM humana de tipo humano. Los anticuerpos que neutralizan la actividad de OBM/sOBM humana se seleccionan a partir de estos anticuerpos. Sin embargo, en general, es difícil producir un anticuerpo que exhiba afinidad alta para un antígeno por el método de inmunización de linfocitos humanos *in vitro*. Por esta razón, con objeto de obtener anticuerpos monoclonales con afinidad alta para OBM y sOBM humana, es necesario aumentar la afinidad de los anticuerpos monoclonales anti-OBM/sOBM humana de tipo humano obtenidos por el método arriba indicado. Esto puede hacerse de acuerdo con el método siguiente. Primeramente, se introduce una mutación aleatoria en una región CDR (particularmente la región CDR3) de un anticuerpo monoclonal anti-OBM/sOBM humana de tipo humano que neutraliza OBM pero tiene una afinidad baja, y se hace que el fago exprese la proteína. Los fagos que pueden fijarse fuertemente a OBM/sOBM humana que se seleccionan por un método de presentación de fago utilizando placas en las cuales están inmovilizados antígenos de OBM/sOBM humana. Los fagos seleccionados se dejan crecer en *Escherichia coli*. La secuencia de aminoácidos de la CDR que exhibe afinidad alta se determina a partir de la secuencia de nucleótidos del DNA clonado en el fago. El DNA así obtenido que codifica los anticuerpos monoclonales anti-OBM/sOBM humana de tipo humano se introduce en un vector de expresión utilizado comúnmente para células de mamífero a fin de producir los anticuerpos monoclonales anti-OBM/sOBM humana de tipo humano. Los anticuerpos monoclonales diana anti-OBM/sOBM humana de tipo humano que exhiben afinidad alta y son capaces de neutralizar la actividad biológica de OBM/sOBM humana pueden seleccionarse a partir de estos anticuerpos monoclonales. En el método ②, se producen anticuerpos monoclonales anti-OBM/sOBM humana de tipo ratón de acuerdo con el mismo método que en la presente invención utilizando un ratón BALB/c (Koehler *et al.*: Nature 256, 495-497, 1975), y se seleccionan anticuerpos monoclonales que pueden neutralizar la actividad biológica de OBM/sOBM humana y que exhiben afinidad alta. Estos anticuerpos monoclonales anti-OBM/sOBM humana de ratón de afinidad alta pueden convertirse en tipo humano utilizando la técnica de injerto de CDR (Winter y Milstein: Nature 349, 293-299, 1991) por implantación de sus regiones CDR (CDR-1, 2 y 3) en las regiones CRD de IgG humana. En el método ③, se implantan linfocitos de sangre periférica humana en un ratón con inmunodeficiencia combinada severa (SCID). Debido a que el ratón SCID implantado puede producir anticuerpos humanos (Mosier D.E. *et al.*: Nature 335, 256-259, 1988; Duchosal M.A. *et al.*: Nature 355, 258-262, 1992), los linfocitos que pueden producir los anticuerpos monoclonales humanos que tienen especificidad para OBM/sOBM humana pueden recogerse por escrutinio de ratones SCID inmunizados con OBM o sOBM humana. Los linfocitos resultantes se fusionan con K6H6/B5 (ATCC CRL1823) que es un heterohibridoma de ratón y humano, de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente para los anticuerpos humanos en el método ①. Los hibridomas resultantes se escrutan para obtener hibridomas que puedan producir los anticuerpos monoclonales humanos objetivo. Los hibridomas así obtenidos se cultivan para producir grandes cantidades de los anticuerpos monoclonales humanos objetivo. Los anticuerpos pueden purificarse por el método de purificación arriba indicado. Adicionalmente, es posible producir anticuerpos monoclonales humanos recombinantes en grandes cantidades por construcción de una genoteca de cDNA a partir del hibridoma que puede producir los anticuerpos monoclonales humanos objetivo para obtener un gen (cDNA) que codifica los anticuerpos monoclonales de tipo humano objetivo por clonación, inserción de este gen en un vector de expresión adecuado utilizando técnicas de ingeniería genética, y expresión de los anticuerpos monoclonales en células hospedadoras tales como diversas células animales, células de insecto, o *Escherichia coli*. Pueden obtenerse grandes cantidades de anticuerpos monoclonales humanos purificados por purificación del sobrenadante de cultivo resultante por los métodos de purificación mencionados anteriormente.

Los anticuerpos que pueden neutralizar la actividad biológica de OBM/sOBM pueden obtenerse a partir de los anticuerpos monoclonales anti-OBM/sOBM producidos de acuerdo con este método. Se espera que los anticuerpos que neutralizan la actividad biológica de OBM/sOBM sean útiles como agentes para el tratamiento o la prevención de anomalías del metabolismo óseo debido a su capacidad para bloquear la actividad biológica *in vivo* de OBM/sOBM, específicamente la capacidad para prevenir la formación de osteoclastos por inducción. La actividad de los anticuerpos anti-OBM/sOBM para neutralizar la actividad biológica de OBM o sOBM puede medirse por determinación de la actividad para suprimir la formación de osteoclastos en el sistema *in vitro*. Específicamente, puede utilizarse el sistema de cultivo de osteoclastogénesis *in vitro* siguiente: ① un sistema de co-cultivo de la variedad de células osteoblásticas estromales de ratón, células ST2, y células de bazo de ratón en presencia de vitamina D₃ de forma activa y dexametasona, ② un sistema de co-cultivo que comprende OBM que expresa la variedad de células de riñón de mono que expresan OBM, COS-7, inmovilizando las células que expresan OBM con formaldehído, y cultivando las células de bazo de ratón en dichas células en presencia de M-CSF, y ③ un sistema de cultivo de células de bazo de ratón en presencia de sOBM recombinante y M-CSF. La actividad inhibidora de la osteoclastogénesis de los anticuerpos anti-OBM/sOBM puede medirse por adición de los anticuerpos anti-OBM/sOBM en diversas concentraciones a estos sistemas de cultivo e investigación de sus efectos sobre la formación de osteoclastos. La actividad inhibidora de la osteoclastogénesis de los anticuerpos anti-OBM/sOBM puede evaluarse también midiendo su actividad inhibidora de la resorción ósea utilizando animales experimentales *in vivo*. Especialmente, se utiliza un modelo de animal ovariectomizado como modelo animal con formación progresiva de osteoclastos. La actividad inhibidora de la osteoclastogénesis de los anticuerpos anti-OBM/sOBM puede determinarse por la administración de los anticuerpos anti-OBM/sOBM a dichos animales experimentales y evaluación de la supresión de la resorción ósea (una actividad que incrementa la densidad ósea).

Los anticuerpos así obtenidos capaces de neutralizar la actividad biológica de OBM/sOBM son útiles en composiciones farmacéuticas, particularmente composiciones farmacéuticas para prevenir o tratar las anomalías del metabolismo óseo o como anticuerpos para una diagnosis inmunológica de dichas enfermedades. Las preparaciones que comprenden los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse por vía oral o no oral. Dichas prepa-

raciones pueden administrarse en condiciones seguras a humanos o animales como composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos que reconocen OBM y/o sOBM como componente activo. Como las formas de composición farmacéutica, pueden utilizarse agentes de inyección que incluyen goteo intravenoso, agentes de supositorios, agentes sublinguales, agentes de absorción percutánea, y análogos. Dado que los anticuerpos monoclonales son proteínas macromoleculares, los mismos se adhieren fácilmente no sólo a un envase de vidrio tal como un vial o una jeringuilla, sino que se desnaturalizan también fácilmente por factores fisicoquímicos tales como calor, pH, o humedad. Por esta razón, las preparaciones deben estabilizarse por la adición de estabilizadores, ajustadores de pH, agentes tampón, agentes solubilizantes, o detergentes. Como los estabilizadores, pueden utilizarse amino-ácidos tales como glicina y alanina, sacáridos tales como dextrano 40 y manosa, y alcoholes-azúcar tales como sorbitol, manitol, y xilitol. Estos estabilizadores pueden utilizarse individualmente o en combinaciones de dos o más. La cantidad de estabilizadores a añadir es preferiblemente de 0,01 a 100 veces, de modo particularmente preferible de 0,1 a 10 veces la cantidad del anticuerpo. La adición de estos estabilizadores aumenta la estabilidad al almacenamiento de las preparaciones líquidas o productos liofilizados de las mismas. Pueden utilizarse tampones de fosfato y tampones de citrato como ejemplos de los agentes tampón. Los agentes tampón no sólo ajustan el pH de las preparaciones líquidas o soluciones acuosas obtenidas por re-disolución de los productos liofilizados de las mismas, sino que aumentan también la estabilidad y solubilidad del anticuerpo. Es deseable añadir el agente de tamponamiento en una cantidad que produzca una concentración desde 1 mM a 10 mM de la preparación líquida o de la solución acuosa preparada a partir del producto liofilizado. Como ejemplos de detergente pueden citarse Polisorbato 20, Pluronic F-68 y polietilen-glicol. Un ejemplo particularmente preferido es Polisorbato 80. Estos detergentes pueden utilizarse sea individualmente o en combinaciones de dos o más. Las proteínas macromoleculares tales como un anticuerpo se adhieren fácilmente a los envases de vidrio. La adherencia a los envases del anticuerpo en una preparación líquida o en una solución acuosa preparada por re-disolución de un producto liofilizado puede prevenirse por adición de tales detergentes a una concentración de 0,001 a 1,0%. Las preparaciones que comprenden los anticuerpos de la presente invención pueden obtenerse por adición de estabilizadores, agentes tampón, o agentes que previenen la adsorción. Cuando las preparaciones se utilizan como agentes de inyección para medicación o para animales, dichos agentes de inyección deberían tener preferiblemente una relación de presión osmótica de 1 a 2. La relación de presión osmótica puede ajustarse aumentando o disminuyendo la cantidad de cloruro de sodio cuando se fabrican las preparaciones. La cantidad de un anticuerpo en una preparación puede ajustarse convenientemente dependiendo de la enfermedad, la vía de administración, y factores análogos. Una dosis de un anticuerpo humano para humanos puede modificarse dependiendo de la afinidad del anticuerpo para OBM/sOBM humana, y especialmente, de la constante de disociación (valor Kd) para OBM/sOBM humana. Cuanto mayor es la afinidad (o cuanto más pequeño es el valor Kd), tanto menor es la dosis a administrar a humanos para obtener un efecto medicinal determinado. Debido a que un anticuerpo de tipo humano tiene una semi-vida larga en la sangre de aproximadamente 20 días, es suficiente administrar el mismo a humanos por ejemplo a una dosis de aproximadamente 0,1-100 mg/kg una sola vez o más en un periodo de 1-30 días.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el resultado de la SDS-PAGE de la proteína OBM de ratón obtenida en el Ejemplo 3.

Explicación de los símbolos

(A): Pista 1: Marcadores de peso molecular

Pista 2: Una muestra parcialmente purificada (fracción de elución Gly-HCl (pH 2,0)) obtenida a partir de células ST2 cultivadas en presencia de vitamina D₃ de forma activa y dexametasona.

Pista 3: Una muestra parcialmente purificada (fracción de elución Gly-HCl (pH 2,0)) obtenida a partir de células ST2 cultivadas en ausencia de vitamina D₃ de forma activa y dexametasona.

(B): Pista 1: Marcadores de peso molecular

Pista 2: Proteína OBM de ratón después de purificación por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (Ejemplo 3).

La Figura 2 muestra el resultado del ensayo de fijación de OCIF marcado con ¹²⁵I a células osteoblásticas estromales, ST2, en el Ejemplo 4.

La Figura 3 muestra la capacidad de formación de osteoclastos de las células osteoblásticas estromales ST2 de diferentes generaciones en el Ejemplo 5(1).

Explicación de los símbolos

1: Capacidad de las células ST2 de un subcultivo aproximadamente 10° para soportar la formación de osteoclastos.

2: capacidad de las células ST2 de un subcultivo aproximadamente 40° para soportar la formación de osteoclastos.

ES 2 263 204 T3

La Figura 4 muestra el cambio con el paso del tiempo en la expresión de la proteína de fijación de OCIF en la membrana celular de células osteoblásticas estromales cultivadas en presencia de vitamina D₃ de forma activa y dexametasona en el Ejemplo 5(2).

5 La Figura 5 muestra el cambio con el paso del tiempo en la formación de osteoclastos en el sistema de co-cultivo del Ejemplo 5(2).

La Figura 6 muestra el efecto inhibitor sobre la formación de osteoclastos cuando se trata con OCIF durante periodos de cultivo diferentes durante el periodo de co-cultivo del Ejemplo 5(3).

10 La Figura 7 muestra los resultados de un ensayo de reticulación de OCIF marcado con ¹²⁵I con la proteína de fijación de OCIF en el Ejemplo 6.

15 *Explicación de los símbolos*

Pista 1: OCIF-CDD1 marcado con ¹²⁵I

20 Pista 2: OCIF-CDD1 marcado con ¹²⁵I reticulado con células ST2

Pista 3: OCIF-CDD1 marcado con ¹²⁵I reticulado en presencia de un exceso de 400 veces de OCIF sin marcar.

La Figura 8 muestra el resultado de la SDS-PAGE en el Ejemplo 9.

25 *Explicación de los símbolos*

Pista 1: Proteínas de células COS-7 transfectadas con pOBM291 inmunoprecipitadas en ausencia de OCIF

30 Pista 2: Proteínas de células COS-7 transfectadas con pOBM291 inmunoprecipitadas en presencia de OCIF.

La Figura 9 muestra los resultados del análisis de la capacidad de fijación de OCIF marcado con ¹²⁵I a células COS-7 transfectadas con pOBM291 del Ejemplo 10.

35 *Explicación de los símbolos*

Pistas 1 y 2: La cantidad del OCIF marcado con ¹²⁵I que se fija a células COS-7 transfectadas con pOBM291

40 Pistas 3 y 4: La cantidad del OCIF marcado con ¹²⁵I que se fija a células COS-7 transfectadas con pOBM291 en presencia de un exceso de 400 veces de OCIF sin marcar.

La Figura 10 muestra el resultado de un ensayo de reticulación que utiliza OCIF marcado con ¹²⁵I del Ejemplo 11.

45 *Explicación de los símbolos*

Pista 1: OCIF marcado con ¹²⁵I

50 Pista 2: OCIF marcado con ¹²⁵I reticulado con células COS-7 transfectadas con pOBM291

Pista 3: OCIF marcado con ¹²⁵I reticulado con células COS-7 transfectadas con pOBM291 en presencia de un exceso de 400 veces de OCIF sin marcar.

55 La Figura 11 muestra el resultado de una Transferencia Northern en el Ejemplo 12.

Explicación de los símbolos

60 Pista 1: RNA originaria de células ST2 cultivadas sin adición de vitamina D y dexametasona

Pista 2: RNA originario de células ST2 cultivadas con la adición de vitamina D y dexametasona.

65 La Figura 12 muestra la capacidad de fijación de OCIF de las proteínas en el medio acondicionado para diversas concentraciones de OCIF en el Ejemplo 14(2).

ES 2 263 204 T3

Explicación de los símbolos

○ : pCEP4

5 ● : pCEP sOBM.

La Figura 13 muestra la capacidad de fijación de OCIF de la proteína en el medio acondicionado para diversas proporciones del medio acondicionado en el Ejemplo 14(2).

10

Explicación de los símbolos

○ : pCEP4

15 ● : pCEP sOBM.

La Figura 14 muestra el resultado de la SDS-PAGE de una proteína de fusión constituida por tiorredoxina y OBM de ratón expresada en *Escherichia coli* en el Ejemplo 15(2).

20

Explicación de los símbolos

Pista 1: Marcadores de peso molecular

25 Pista 2: Fracciones solubles de proteína originarias de GI724/pTrxFus

Pista 3: Fracciones solubles de proteína originarias de GI724/pTrxOBM25.

30 La Figura 15 muestra la capacidad de fijación de OCIF para diversas proporciones de fracciones solubles de proteína en el Ejemplo 15(3).

Explicación de los símbolos

35 □ : GI724/pTrxFus

○ : GI724/pTrxOBM25.

40 La Figura 16 muestra la capacidad de fijación de OCIF de fracciones solubles de proteína (1%) para diversas concentraciones de OCIF en el Ejemplo 15(3).

Explicación de los símbolos

45 □ : GI724/pTrxFus

○ : GI724/pTrxOBM25.

50 La Figura 17 muestra los resultados de la inhibición de la fijación específica a OCIF de OBM de ratón obtenida por expresión de cDNA de OBM de ratón y purificada de proteína de fijación de OCIF natural por un anticuerpo de conejo anti-OBM de ratón.

Explicación de los símbolos

55

1: OBM purificada preparada por expresión del cDNA en presencia del anticuerpo, + ¹²⁵I-OCIF

2: La proteína natural en presencia del anticuerpo + ¹²⁵I-OCIF

60

3: OBM de ratón preparada por expresión del cDNA en ausencia del anticuerpo, + ¹²⁵I-OCIF

4: La proteína natural en ausencia del anticuerpo + ¹²⁵I-OCIF

5: 3 + OCIF sin marcar (400 veces más que ¹²⁵I-OCIF)

65

6: 4 + OCIF sin marcar (400 veces más que ¹²⁵I-OCIF).

ES 2 263 204 T3

La Figura 18 muestra el resultado de la SDS-PAGE de la proteína OBM humana expresada por cDNA.

Explicación de los símbolos

- 5 Pista 1: Marcadores de peso molecular
- Pista 2: Proteínas de células COS-7 transfectadas con phOBM (un vector de expresión que contiene cDNA, inmunoprecipitado con un anticuerpo policlonal de conejo anti-OCIF en ausencia de OCIF)
- 10 Pista 3: Proteínas de células COS-7 transfectadas con phOBM (un vector de expresión que contiene cDNA, inmunoprecipitado con un anticuerpo policlonal de conejo anti-OCIF en presencia de OCIF.

La Figura 19 muestra el resultado del análisis de la fijación de OCIF a células COS-7 transfectadas con phOBM, un vector de expresión que contiene cDNA.

15

Explicación de los símbolos

- 20 Pista 1: Células COS-7 transfectadas con phOBM y la adición de ^{125}I -OCIF.
- Pista 2: Células COS-7 transfectadas con phOBM y la adición de ^{125}I -OCIF, en presencia de un OCIF sin marcar 400 veces más.

25 La Figura 20 muestra el resultado de la reticulación de OBM humana, que es una proteína codificada por un cDNA, con ^{125}I -OCIF (tipo monómero).

Explicación de los símbolos

- 30 Pista 1: ^{125}I -OCIF
- Pista 2: Los productos reticulados de ^{125}I -OCIF con las proteínas en la membrana de células COS-7 transfectadas con phOBM.
- 35 Pista 3: Los productos reticulados de ^{125}I -OCIF con las proteínas en la membrana de células COS-7 transfectadas con phOBM, en presencia de un OCIF sin marcar 400 veces más.

40 La Figura 21 muestra la capacidad de fijación de OCIF de la proteína (hOBM de forma secretada) en el medio acondicionado para diversas concentraciones de OCIF en el Ejemplo 24(2).

Explicación de los símbolos

- 45 ○ : Medio acondicionado de células 293-EBNA transfectadas con pCEP4, que no contiene cDNA codificante de la OBM humana de forma secretada
- : Medio acondicionado de células 293-EBNA transfectadas con pCEPshOBM, que contiene cDNA codificante de OBM humana de forma secretada.

50 La Figura 2 muestra la capacidad de fijación de OCIF de la proteína (OBM humana de forma secretada) en el medio acondicionado para una concentración específica de OCIF mientras se cambia la cantidad de medio acondicionado añadida en el Ejemplo 24(2).

Explicación de los símbolos

- 55 ○ : Medio acondicionado de células 293-EBNA transfectadas con pCEP4, que no contiene cDNA codificante de OBM humana de forma secretada
- 60 ● : Medio acondicionado de células 293-EBNA transfectadas con pCEPshOBM, que contiene cDNA que codifica OBM humana de forma secretada.

65 La Figura 23 muestra el resultado de la SDS-PAGE de una proteína de fusión constituida por tiorredoxina y OBM humana expresada en *Escherichia coli*.

ES 2 263 204 T3

Explicación de los símbolos

Pista 1: Marcadores de peso molecular

5 Pista 2: Fracciones solubles de proteína originarias de *Escherichia coli* GI724/pTrxFus

Pista 3: Fracciones solubles de proteína originarias de *Escherichia coli* GI724/pTrxhOBM.

10 La Figura 24 muestra la capacidad de fijación de OCIF de la proteína de fusión constituida por tiorredoxina y OBM humana a OCIF, cuando la cantidad de la fracción soluble de proteínas originaria de *Escherichia coli* que incluía la proteína de fusión añadida se modificó en el Ejemplo 25(3).

Explicación de los símbolos

15

○ : Fracciones solubles de proteína originarias de *Escherichia coli* GI724/pTrxFus

● : Fracciones solubles de proteína originarias de *Escherichia coli* GI724/pTrxhOBM.

20 La Figura 25 muestra la capacidad de fijación de OCIF de la proteína de fusión de tiorredoxina y OBM humana en fracciones solubles de proteína originarias de *Escherichia coli* a OCIF en diversas concentraciones en el Ejemplo 25 (3).

Explicación de los símbolos

25

○ : Fracciones solubles de proteína originarias de *Escherichia coli* GI724/pTrxFus

● : Fracciones solubles de proteína originarias de *Escherichia coli* GI724/pTrxshOBM.

30

La Figura 26 muestra el resultado de la cuantificación de OBM humana y sOBM humana por el método ELISA sándwich utilizando el anticuerpo policlonal anti-OBM/sOBM humana de la presente invención.

Explicación de los símbolos

35

□ : OBM humana

● : sOBM humana.

40

La Figura 27 muestra el resultado de la cuantificación de OBM humana y sOBM humana por el método ELISA sándwich utilizando los anticuerpos monoclonales anti-OBM/sOBM humana de la presente invención.

Explicación de los símbolos

45

□ : OBM humana

● : sOBM humana.

50

La Figura 28 muestra el resultado de la cuantificación de OBM y sOBM de ratón por el método ELISA sándwich utilizando los anticuerpos monoclonales anti-OBM/sOBM humana de la presente invención que reaccionan cruzadamente con OBM y sOBM de ratón.

55

Explicación de los símbolos

□ : OBM de ratón

60

● : sOBM de ratón.

La Figura 29 muestra la actividad de la proteína de fusión constituida por tiorredoxina y OBM de ratón para estimular la formación de células semejantes a osteoclastos humanos.

65 La Figura 30 muestra la supresión por el anticuerpo anti-OBM/sOBM de la actividad de resorción ósea estimulada por la vitamina D₃.

ES 2 263 204 T3

La Figura 31 muestra la supresión por el anticuerpo anti-OBM/sOBM de la actividad de resorción ósea estimulada por la prostaglandina E2 (PGE₂).

5 La Figura 32 muestra la supresión por el anticuerpo anti-OBM/sOBM de la actividad de resorción ósea estimulada por la hormona paratiroidea (PTH).

La Figura 33 muestra la supresión por el anticuerpo anti-OBM/sOBM de la actividad de resorción ósea estimulada por la interleuquina 1 α (IL-1).

10 Modo óptimo de realización de la invención

Ejemplos

15 La presente invención se describirá con mayor detalle por vía de ejemplos que se dan para el propósito de ilustración de la invención y no son limitantes en modo alguno del resto de la descripción de la misma.

Ejemplo 1

20 *Preparación de la proteína de fijación de OCIF*

(1) *Cultivo en gran escala de células ST2*

25 La línea de células osteoblásticas estromales de ratón ST2 (RIKEN CELL BANK RCB 0224) se cultivó utilizando un α -MEM que contenía suero de bovino fetal al 10%. Las células ST2 cultivadas hasta confluencia en un matraz T de 225 cm² para cultivo de células adherentes se trataron con tripsina y se recogieron del matraz T. Después de lavado, las células se transfirieron a 5 matraces T de 225 cm². Después de la adición de 60 ml de α -MEM que contenía vitamina D₃ 10⁻⁸ M de forma activa (Calcitriol), dexametasona 10⁻⁷ M y 10% de suero de bovino fetal, las células contenidas en cada matraz se cultivaron durante 7-10 días en una incubadora de CO₂. Las células ST2 cultivadas se cosecharon utilizando un rascador de células y se guardaron a -80°C hasta su utilización.

30 (2) *Preparación de una fracción de membrana y solubilización de proteínas fijadas a la membrana*

35 A las células ST2 (volumen, aproximadamente 12 ml) descritas en el Ejemplo 1(1), cultivadas utilizando 80 matraces T de 225 cm², se añadió 3 veces el volumen (36 ml) de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,2) que contenía inhibidores de proteasas (APMSFP 2 mM, EDTA 2 mM, o-fenantrolinea 2 mM, leupeptina 1 mM, pepstatina A 1 μ g/ml, y 100 unidades/ml de aprotinina). Después de agitar enérgicamente durante 30 segundos utilizando un mezclador vorticial, se dejó que las células se mantuvieran en reposo durante 10 minutos en hielo. Las células se homogeneizaron utilizando un homogeneizador (DOUNCE TISSUE GRINDER, A syringe, WHEATON SCIENTIFIC Co.). Se añadió el mismo volumen (48 ml) de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,2) que contenía los inhibidores de proteasas arriba mencionados, sacarosa 0,5 M, cloruro de potasio 0,1 M, cloruro de magnesio 10 mM, y cloruro de calcio 2 mM a las células homogeneizadas. Después de agitar, se centrifugó la mezcla a 600 x g durante 10 minutos a 4°C, separando de este modo los núcleos y las células no homogeneizadas como precipitado. El sobrenadante obtenido por la centrifuga se centrifugó a 150.000 x g durante 90 minutos a 4°C, para obtener la fracción de membrana de las células ST2 como precipitado. Se añadieron a esta fracción de membrana 80 ml de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,2) que contenía los inhibidores de proteasas arriba mencionados, cloruro de sodio 150 mM, y sacarosa 0,1 M. Después de la adición de 200 μ l de CHAPS (3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato, Sigma Co.) al 20%, la mezcla se agitó durante 2 horas a 4°C. La mezcla se centrifugó luego a 150.000 x g durante 60 minutos a 4°C, para obtener el sobrenadante como fracción de membrana solubilizada.

50 Ejemplo 2

Purificación de la proteína de fijación de OCIF

55 (1) *Preparación de la columna de afinidad inmovilizada de OCIF*

Después de reemplazamiento de iso-propanol en una columna HiTrap activada con NHS (1 ml, fabricada por Pharmacia Co.) con ácido clorhídrico 1 mM, se añadió 1 ml de solución de NaHCO₃ 0,2 M/NaCl 0,5 M (pH 8,3) que contenía 13,0 mg de OCIF recombinante preparado por el método del documento WO 96/26217 a la columna utilizando una jeringuilla (5 ml, fabricada por Terumo Corp.), para llevar a cabo la reacción de acoplamiento a la temperatura ambiente durante 30 minutos. La columna se alimentó con 3 ml de etanolamina 0,5 M/NaCl 0,5 M (pH 8,3) y 3 ml de ácido acético 0,1 M/NaCl 0,5 M (pH 4,0) 3 veces sucesivamente para desactivar el exceso de grupos activos, después de lo cual se reemplazó la solución con etanolamina 0,5 M/NaCl 0,5 M (pH 8,3). Después de dejar en reposo a la temperatura ambiente durante 1 hora, la columna se lavó dos veces alternativamente con etanolamina 0,5 M/NaCl 0,5 M (pH 8,3) y ácido acético 0,1 M/NaCl 0,5 M (pH 4,0), y la solución se reemplazó luego con Tris 50 mM/NaCl 1 M/tampón CHAPS al 0,1% (pH 7,5).

(2) Purificación de la proteína de fijación de OCIF utilizando una columna de afinidad inmovilizada de OCIF

La purificación de la proteína de fijación de OCIF se llevó a cabo a 4°C, a no ser que se indique otra cosa. La columna de afinidad inmovilizada de OCIF arriba mencionada se equilibró con tampón de Tris-hidrocloruro 10 mM (pH 7,2) al que se añadieron los inhibidores de proteasas descritos en el Ejemplo 1(2), cloruro de sodio 0,15 M, y CHAPS al 0,5%. Se aplicaron a la columna aproximadamente 8 ml de la fracción solubilizada de la membrana descrita en el Ejemplo 1(2) a un caudal de 0,01 ml/minuto. A continuación, la columna se lavó con tampón Tris-hidrocloruro 10 mM (pH 7,2) al que se añadieron los inhibidores de proteasas arriba mencionados, cloruro de sodio 0,15 M, y CHAPS al 0,5%, durante 100 minutos a un caudal de 0,5 ml/minuto. A continuación, las proteínas adsorbidas a la columna se eluyeron con tampón de hidrocloruro de glicina 0,1 M (pH 3,3) que contenía los inhibidores de proteasas, cloruro de sodio 0,2 M, y CHAPS al 0,5% durante 50 minutos a un caudal de 0,1 ml/minuto. De la misma manera, las proteínas adsorbidas a la columna se eluyeron con tampón de citrato de sodio 0,1 M (pH 2,0) que contenía los inhibidores de proteasas, cloruro de sodio 0,2 M, y CHAPS al 0,5% durante 50 minutos a un caudal de 0,1 ml/minuto. El material eluido se recogió en fracciones de 0,5 ml. Cada fracción se neutralizó inmediatamente por la adición de solución Tris 2 M. Las fracciones derivadas de la elución con estos tampones (constituida cada fracción por 1,0-5,0 ml de material eluido) se concentraron a 50-100 μ l utilizando Centricon-10 (fabricado por Amicon de EE.UU.). Se añadió OCIF a una porción de cada fracción concentrada y se inmunoprecipitó con el anticuerpo policlonal anti-OCIF. Las fracciones precipitadas se trataron con SDS y se sometieron a SDS-PAGE. Las fracciones (Fr. No. 3-10) en las cuales aparecía la banda de la proteína con capacidad de fijación específica a OCIF se consideraron como las fracciones de proteína de la presente invención.

(3) Purificación de la proteína de fijación de OCIF por filtración sobre gel

La proteína de fijación de OCIF concentrada (las fracciones obtenidas por la elución con tampón de hidrocloruro de glicina 0,1 M (pH 3,3) y tampón de citrato de sodio 0,1 M (pH 2,0)) preparadas en el Ejemplo 2(2) se aplicó a una columna Superose 12 HR10/30 (1,0 x 30 cm, fabricada por Pharmacia Co.) que se equilibró con Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,5 M, CHAPS al 0,5% (pH 7,0) y se reveló con el tampón de equilibración como una fase móvil a un caudal de 0,5 ml/min, recogiendo cada fracción de 0,5 ml. Las fracciones que contenían la proteína de fijación de OCIF (Fr. núms. 27-32) se identificaron de acuerdo con el mismo método que se ha descrito anteriormente. Cada una de las fracciones se concentró utilizando Centricon-10 (un producto de Amicon).

(4) Purificación por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa

La proteína de fijación de OCIF arriba mencionada, purificada por la filtración sobre gel se aplicó a una columna C₄ (2,1 x 250 mm, Vydac, EE.UU.) que se equilibró con 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) y 30% de acetonitrilo. Las proteínas fijadas a la columna se eluyeron con gradientes lineales de acetonitrilo desde 30% a 55% durante los primeros 50 minutos y desde 55% a 80% durante los 10 minutos siguientes a un caudal de 0,2 ml/min. Los picos de proteínas eluidas se detectaron por medida de la densidad óptica a 215 nm. Las proteínas en los diferentes picos se analizaron para identificar las fracciones que contenían la proteína de fijación de OCIF, y se obtuvo una proteína de fijación de OCIF altamente purificada.

Ejemplo 3

SDS-PAGE de la proteína de fijación de OCIF purificada

La fracción de membrana solubilizada preparada a partir de las células ST2 que se cultivaron en presencia o ausencia de vitamina D₃ de forma activa se sometió a purificación con la columna de afinidad inmovilizada de OCIF. Las preparaciones purificadas se sometieron a SDS-PAGE. Como se muestra en la Figura 1(A), se detectó una banda principal de proteína con PM de aproximadamente 30.000-40.000 únicamente en la preparación purificada a partir de células ST2 que se cultivó en presencia de la vitamina D₃ de forma activa, demostrando que la proteína que se fija específicamente a OCIF (es decir la proteína de fijación de OCIF) puede ser purificada selectivamente por la columna de afinidad inmovilizada de OCIF. Sin embargo, se detectaron bandas de varias proteínas (distintas de la proteína de fijación de OCIF) que no se fijan específicamente a los vehículos o espaciadores de la columna de OCIF inmovilizado en ambas preparaciones purificadas. Las proteínas distintas de la proteína de fijación de OCIF se separaron de acuerdo con el método arriba descrito por filtración sobre gel y cromatografía en fase inversa C₄. La SDS-PAGE de la proteína de fijación de OCIF altamente purificada se muestra en la Figura 1(B). Se encontró que la proteína de fijación de OCIF altamente purificada era electroforéticamente homogénea y tenía un peso molecular de aproximadamente 30.000-40.000.

Ejemplo 4

*Ensayo de fijación de OCIF a osteoblastos**(1) Preparación de OCIF marcado con ¹²⁵I*

Se marcó OCIF con ¹²⁵I por el método Iodogen. Específicamente, se transfirieron 20 μ l de solución Iodogen-cloroformo de 2,5 mg/ml a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se eliminó por evaporación el cloroformo a 40°C, para obtener un tubo recubierto con Iodogen. El tubo se lavó tres veces con 400 μ l de solución tampón de fosfato de sodio

ES 2 263 204 T3

0,5 M (Na-Pi, pH 7,0). Se añadieron al tubo 5 ml de Na-Pi 0,5 M (pH 7,0). Inmediatamente después de la adición de 1,3 μ l (18,5 MBq) de solución Na-¹²⁵I (NEZ-033H20, fabricada por Amersham Co.), se añadieron al tubo 10 μ l de solución rOCIF de 1 mg/ml (tipo monómero o tipo dímero). Después de mezclar con un mezclador vorticial, la mezcla se dejó en reposo a la temperatura ambiente durante 30 segundos. La solución se transfirió a un tubo que contenía 80 μ l de una solución de yoduro de potasio de concentración 10 mg/ml en Na-Pi 0,5 M (pH 7,0) y 5 μ l de solución salina tamponada con fosfato que contenía 5% de seroalbúmina bovina, y se agitó. La mezcla se aplicó a una columna giratoria (1 ml, G-25 Fine, fabricado por Pharmacia Co.) que se equilibró con solución salina tamponada con fosfato que contenía 0,25% de seroalbúmina bovina, y la columna se centrifugó durante 5 minutos a 2.000 rpm. Se añadieron 400 μ l de una solución salina tamponada con fosfato que contenía 0,25% de seroalbúmina bovina a la fracción eluida de la columna, y se agitó la mezcla. Se retiró una parte alícuota de 2 μ l para medir la radioactividad utilizando un contador gamma. La pureza radioquímica del OCIF marcado con ¹²⁵I se determinó por medida de la radioactividad precipitada con TCA al 10%. La actividad biológica del OCIF marcado con ¹²⁵I se midió de acuerdo con el método descrito en el documento WO 96/26217. La concentración del OCIF marcado con ¹²⁵I se midió por el método ELISA de acuerdo con el procedimiento siguiente.

(2) Medida de la concentración de OCIF marcado con ¹²⁵I por ELISA

Cien μ l de NaHCO₃ 50 mM (pH 9,6) en el cual el anticuerpo policlonal de conejo anti-OCIF descrito en el documento WO 96/26217 se disolvió a una concentración de 2 μ g/ml se añadieron a cada pocillo de una inmunoplaaca de 96 pocillos (MaxiSorp™, un producto de Nunc Co.). La placa se dejó en reposo durante una noche a 4°C. Después de retirar la solución por succión, se añadieron a cada pocillo 300 μ l de Block Ace™ (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.)/solución salina tamponada con fosfato (25/75). La placa se dejó luego en reposo durante 2 horas a la temperatura ambiente. Después de separar la solución por succión, los pocillos se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato que contenía 0,01% de Polisorbato 80 (P-PBS). A continuación, se añadieron a cada pocillo 300 μ l de Block Ace™/solución salina tamponada con fosfato (25/75) a la que se añadió OCIF marcado con ¹²⁵I o la preparación de OCIF estándar. La placa se dejó luego en reposo durante 2 horas a la temperatura ambiente. Después de separar la solución por succión, cada pocillo se lavó 6 veces con 200 μ l de P-PBS.

Se añadieron a cada pocillo 100 μ l de Block Ace™ (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.)/solución salina tamponada con fosfato (25/75) que contenía anticuerpo policlonal de conejo anti-OCIF marcado con peroxidasa. La placa se dejó en reposo durante 2 horas a la temperatura ambiente. Después de separar la solución por succión, se lavaron seis veces los pocillos con 200 μ l de P-PBS. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de solución TMB (TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scytek Co.). Después de incubación a la temperatura ambiente durante 2-3 minutos, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de solución de parada (Stopping Reagent, Scytek Co.). Se midió la absorbancia de cada pocillo a 490 nm utilizando un lector de microplacas. La concentración de OCIF marcado con ¹²⁵I se determinó a partir de una curva de calibración preparada utilizando la preparación estándar de OCIF.

(3) Ensayo de fijación de OCIF a osteoblastos o células de bazo

La línea de células osteoblásticas estromales de ratón ST2 o células de bazo se suspendieron en α -MEM que contenía 10% de suero de bovino fetal (FBS), con o sin vitamina D₃ 10⁻⁸ M de forma activa (Calcitriol) y dexametasona 10⁻⁷ M, hasta una concentración de 4 x 10⁴ células/ml (células ST2) o 2 x 10⁶ células/ml (células de bazo), respectivamente. Cada suspensión de células se inoculó en una microplaca de 24 pocillos. Las células se cultivaron durante 4 días en una incubadora de CO₂. Después de lavar las células con α -MEM, se añadieron a cada pocillo 200 μ l de medio para el ensayo de fijación (α -MEM al que añadieron como complemento seroalbúmina bovina al 0,2%, tampón Hepes 20 mM, y NaN₃ al 0,2%), que contenía 20 ng/ml de OCIF marcado con ¹²⁵I arriba descrito (forma monómera o forma dímera). A los pocillos para la medida de la fijación inespecífica se añadieron 200 μ l del medio para el ensayo de fijación que contenía 8 μ g/ml de rOCIF (concentración 400 veces mayor) además de 20 ng/ml de OCIF marcado con ¹²⁵I. Las células se cultivaron durante 1 hora en una incubadora de CO₂ y se lavaron 3 veces con 1 ml de una solución salina tamponada con fosfato. En este procedimiento, se lavaron células de bazo por centrifugación de la placa de 24 pocillos en cada paso de lavado, debido a que las células de bazo no eran adherentes. Después del lavado, se añadieron a cada pocillo 500 μ l de solución 0,1N de NaOH, y la placa se dejó en reposo durante 10 minutos a la temperatura ambiente para disolver las células. La cantidad de RI en cada pocillo se midió por un contador gamma.

Como se muestra en la Figura 2, el OCIF marcado con ¹²⁵I no se fijaba a las células de bazo cultivadas, sino que se fijaba específicamente sólo a las células osteoblásticas estromales que se cultivaron en presencia de vitamina D₃ de forma activa. Los resultados indicaban que la proteína de fijación de OCIF es una proteína fijada a la membrana inducida por vitamina D₃ de forma activa y dexametasona en las células osteoblásticas estromales.

60 Ejemplo 5

Actividad biológica de la proteína de fijación de OCIF

(1) Formación de osteoclastos soportada por células osteoblásticas estromales

65 La capacidad de soporte de la formación de osteoclastos por las células osteoblásticas estromales se evaluó por medida de la actividad de fosfatasa ácida resistente al ácido tartárico (actividad TRAP) de los osteoclastos formados. Específicamente, células de bazo (2 x 10⁵ células/100 μ l/pocillo) procedentes de un ratón ddy (de 8-12 semanas) y

ES 2 263 204 T3

células osteoblásticas estromales ST2 de ratón (5×10^3 células/100 μ l/pocillo) se suspendieron en α -MEM al que se añadieron vitamina D₃ de forma activa 10^{-8} M, dexametasona 10^{-7} M, y suero de bovino fetal al 10%. Las células se inocularon en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante 1 semana en una incubadora de CO₂. Después de lavar cada pocillo con solución salina tamponada con fosfato, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de etanol/acetona (1:1), y se inmovilizaron las células a la temperatura ambiente durante 1 minuto. Después de la inmovilización, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de tampón de citrato 50 mM (pH 4,5) que contenía fosfato de p-nitrofenol 5,5 mM y tartrato de sodio 10 mM. Después de 15 minutos de reacción a la temperatura ambiente, se añadió a cada pocillo solución de NaOH 0,1N y se midió la absorbancia a 405 nm utilizando un lector de microplacas. Los resultados de la formación de osteoclastos por las células ST2 con un número de pasadas de aproximadamente 10 ó 40 después de adquirir las células de RIKEN CELL BANK se muestran en la Figura 3. Los resultados indican que las células ST2 con un número mayor de pasadas exhiben una capacidad más potente para soportar la formación de osteoclastos.

(2) *Cambio a lo largo del tiempo de la expresión de la proteína de fijación de OCIF en la membrana de las células osteoblásticas estromales en un sistema de cultivo que incluye vitamina D₃ de forma activa y dexametasona y cambio a lo largo del tiempo de la formación de osteoclastos en el sistema de co-cultivo*

De la misma manera que en Ejemplo 4(3), se cultivó la línea de células osteoblásticas estromales ST2 durante 7 días en presencia de vitamina D₃ de forma activa y dexametasona. El ensayo de fijación de OCIF se llevó a cabo utilizando OCIF marcado con ¹²⁵I (tipo monómero) como se describe en el experimento del Ejemplo 4(1). Se midió la fijación inespecífica por competencia de la fijación de OCIF ¹²⁵I a células ST2 con una concentración 400 veces mayor de OCIF sin marcar. Como resultado, se confirmó que la cantidad de fijación específica de OCIF marcado con ¹²⁵I aumenta de acuerdo con el aumento en el periodo de cultivo en presencia de la vitamina D₃ de forma activa y dexametasona. Específicamente, como se muestra en las Figuras 4 y 5, la proteína de fijación de OCIF se expresaba en la superficie de las células ST2 por la vitamina D₃ de forma activa de acuerdo con el aumento del periodo de cultivo y la expresión alcanzaba un máximo en el cuarto día de cultivo. Por otra parte, se forman células semejantes a osteoclastos por co-cultivo de células de bazo de ratón y células ST2 en presencia de vitamina D₃ de forma activa. Se forman células mononucleares TRAP (una enzima marcadora de osteoclastos)-positivas semejantes a pre-osteoclastos al tercer o cuarto día del cultivo. Se forman células multinucleares TRAP-positivas más diferenciadas y maduras del 5° al 6° día del cultivo. Se demostró así una buena correlación entre la evolución temporal de la expresión de la proteína de fijación de OCIF y la formación de osteoclastos.

(3) *Inhibición de la formación de osteoclastos por tratamiento de OCIF en periodos diferentes durante el co-cultivo*

Para establecer claramente que la proteína de fijación de OCIF es un factor implicado en la formación de osteoclastos, las células se trataron con 100 ng/ml de OCIF durante periodos de cultivo diferentes a lo largo del periodo de co-cultivo de 6 días descrito en el Ejemplo 5(2) arriba mencionado (dos días consecutivos en el periodo de 6 días, excepto el quinto día, para el cual se aplicó un periodo de un solo día). Como resultado, como se muestra en la Figura 6, se encontró que el tratamiento de OCIF a las 48-96 horas después del comienzo del cultivo, en el cual la expresión de la proteína de fijación de OCIF en las células ST2 es máxima, era sumamente efectivo para inhibir la formación de osteoclastos. Específicamente, se confirmó que OCIF controla la formación de osteoclastos por fijación a las células ST2 por la vía de la proteína de fijación de OCIF.

Basándose en los resultados de los experimentos anteriores, se confirmó que la proteína de fijación de OCIF es inducida en la membrana celular de las células osteoblásticas estromales por la vitamina D₃ de forma activa y dexametasona y exhibe una actividad biológica de soporte o aceleración de la diferenciación o maduración de los osteoclastos.

Ejemplo 6

50 *Ensayo de reticulación para OCIF marcado con ¹²⁵I y la proteína de fijación de OCIF*

Para identificar la proteína de fijación de OCIF con mayor claridad, se reticuló la proteína de fijación de OCIF con OCIF marcado con ¹²⁵I. La línea de células osteoblásticas estromales de ratón ST2 se cultivó durante 4 días en presencia o ausencia de vitamina D₃ de forma activa y dexametasona de la misma manera que se describe en el Ejemplo 4(3). Después de lavar las células con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato, se añadieron 200 μ l de medio para el ensayo de fijación (α -MEM al que se habían añadido 0,2% de seroalbúmina bovina, tampón HEPES 20 mM, 0,2% de NaN₃, y 100 μ g/ml de heparina), que contenía 25 ng/ml de OCIF marcado con ¹²⁵I (tipo monómero) o 40 ng/ml de OCIF-CDD1 marcado con ¹²⁵I que se obtuvo por expresión de la proteína de la Secuencia ID No. 76 (documento WO 96/26217) en células animales. El medio de cultivo arriba mencionado para el ensayo de fijación se complementó ulteriormente con una concentración 400 veces mayor de OCIF y se añadió a los otros pocillos para evaluar la fijación inespecífica. Después de cultivar durante 1 hora en una incubadora de CO₂, cada pocillo se lavó tres veces con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato que contenía 100 μ g/ml de heparina. Se añadieron a cada pocillo 500 μ l de solución salina tamponada con fosfato que contenía 100 μ g/ml de agente de reticulación, DSS (suberato de disuccinimidilo, Pierce Co.), y la placa se guardó durante 10 minutos a 0°C. Los pocillos se lavaron dos veces con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato a 0°C. Los pocillos se lavaron dos veces con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato a 0°C. Se añadieron luego a cada pocillo 100 μ l de tampón Hepes 20 mM que contenía 1% de Triton X-100, pepstatina 10 μ M, leupeptina 10 μ M, DMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 2 mM,

ES 2 263 204 T3

antipaina 10 μ M, y EDTA 2 mM. La placa se dejó en reposo durante 30 minutos a la temperatura ambiente para disolver las células. Se trataron 15 μ l de estas muestras con SDS en condiciones no reductoras de acuerdo con el método convencional y se sometieron a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (gradiente de poliácridamida, 4-20%, fabricado por Daiichi Chemical Co., Ltd.). Después de la electroforesis, los geles se secaron y se expusieron a película BioMax MS (fabricada por Kodak) durante 24 horas a -80°C utilizando filtros de intensificación BioMax MS (fabricados por Kodak). Después de la exposición, la película se reveló por un método convencional. Se detectó una banda de producto de reticulación con un peso molecular de 90.000-110.000 cuando se utilizó el OCIF marcado con ^{125}I (tipo monómero), 60 kDa). Cuando se utilizó el OCIF-CDD1 marcado con ^{125}I (31 kDa), se detectó una banda de productos de reticulación de aproximadamente 70-80 kDa (valor medio, 78 kDa) como se muestra en la Figura 7.

Ejemplo 7

Análisis de la proteína de fijación de OCIF expresada en células ST por el gráfico de Scatchard

Se añadió el OCIF marcado con ^{125}I arriba mencionado (tipo monómero) a una concentración de 1.000 pM al medio de cultivo para el ensayo de fijación (α -MEM que contenía 0,2% de seroalbúmina bovina, tampón Hepes 20 mM, y 0,2% de NaN_3) y el medio de cultivo se diluyó en serie a una tasa de 1/2 con el medio de cultivo que no contenía OCIF marcado con ^{125}I . Se prepararon soluciones para medir la fijación inespecífica por adición ulterior de una concentración 400 veces mayor de OCIF de forma monómera a estas soluciones. Se añadieron 200 μ l de las soluciones preparadas a los pocillos arriba mencionados con células ST2 cultivadas durante 4 días (número de pasadas, aproximadamente 10) en presencia de vitamina D_3 10^{-8} M de forma activa (Calcitriol) y dexametasona 10^{-7} M, para evaluar la fijación de OCIF marcado con ^{125}I por el mismo método que se ha descrito en el Ejemplo 4(3). Los resultados se sometieron al análisis del gráfico Scatchard para determinar la constante de disociación de OCIF y la proteína de fijación de OCIF, así como el número (sitios) de la proteína de fijación de OCIF para una célula ST2. Como resultado, se encontró que la constante de disociación de OCIF y la proteína de fijación de OCIF era 280 pM, y el número de sitios de la proteína de fijación de OCIF para una célula ST2 era aproximadamente 33.000/célula. Basándose en el descubrimiento del Ejemplo 5(1) de que la formación de osteoclastos soportada por las células ST2 con un número de pasadas de aproximadamente 40 era más extensa que la correspondiente a un número de pasadas de aproximadamente 10, se evaluó el número (sitios) de la proteína de fijación de OCIF expresados en la célula ST2 con un número de pasadas de aproximadamente 40. El número (sitios) era 58.000/célula y era claramente mayor que las células ST2 con número de pasadas aproximadamente 10, lo que indicaba que la cantidad de la proteína de fijación de OCIF expresada en células ST2 está relacionada con su potencia para soportar la formación de osteoclastos. Los resultados indicaban que la proteína de fijación de OCIF es un factor que soporta o induce la diferenciación o maduración de los osteoclastos.

Ejemplo 8

Clonación de OBMcDNA

(1) *Extracción de RNA a partir de células ST2 de ratón*

La línea de células osteoblásticas estromales de ratón ST2 (RIKEN CELL BANK, RCB0224) se cultivó en α -MEM (Gibco BRL Co.) que contenía 10% de suero de bovino fetal. Células ST2 cultivadas hasta confluencia en un matraz T de 225 cm^2 para células adherentes se trataron con tripsina para recoger las células del matraz T. Las células se lavaron y se transfirieron a 5 matraces T de 225 cm^2 . Se añadieron a cada matraz 60 ml de α -MEM que contenía vitamina D_3 10^{-8} M de forma activa (Calcitriol, Wako Pure Chemicals Co., Ltd.), dexametasona 10^{-7} M, y 10% de suero de bovino fetal, y las células se cultivaron durante 5 días en una incubadora de CO_2 . Se extrajo el RNA total de las células ST2 cultivadas utilizando ISOGEN (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.). Se preparó RNA poli A⁺ a partir de aproximadamente 600 μ g del RNA total utilizando una columna de Oligo(dT)-celulosa (5'-3' Prime Co.). Se obtuvieron aproximadamente 8 μ g de RNA poli A⁺.

(2) *Construcción de la genoteca de expresión*

Se sintetizó cDNA bicatenario a partir de 2 μ g de RNA poli A⁺ obtenido del Ejemplo 8(1) utilizando un kit de Síntesis de cDNA Great Lengths (Clontech Co.) de acuerdo con las instrucciones del manual. Específicamente, se mezclaron 2 μ g de RNA poli A⁺ e iniciador Oligo(dT)₂₅ (dN) y se añadió agua destilada a la mezcla para llevar el volumen final a 6,25 μ l. Después de incubación durante aproximadamente 3 minutos a 70°C , la mezcla se enfrió en hielo durante 2 minutos. Se añadieron a la mezcla 2,2 μ l de agua destilada, 2,5 μ l de tampón 5X de la primera cadena, 0,25 μ l de DTT (ditiotreitól) 100 mM, 0,5 μ l de inhibidor PRIME RNasa (1 U/ml) (5'-3' Prime Co.), 0,5 μ l de [α - ^{32}P] dCTP (Amersham Co., 3000 Ci/mmol) diluido a un volumen 5 veces mayor con agua destilada para hacer 2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 0,65 μ l de dNTP (20 mM cada uno), y 1,25 μ l (250 unidades) de transcriptasa inversa MMLV (RNasa H⁻). La mezcla se incubó durante 90 minutos a 42°C , seguida por la adición ulterior de 62,25 μ l de agua destilada, 20 μ l de tampón 5X de segunda cadena, 0,75 μ l de dNTP (20 mM cada uno), y 5 μ l de cóctel de enzimas de la segunda cadena. La mezcla resultante se mantuvo a 16°C durante 2 horas. Se añadieron luego 7,5 unidades de DNA-polimerasa T4 a esta mezcla de reacción. Después de incubación a 16°C durante 30 minutos, la reacción se terminó por la adición de 5 μ l de EDTA 0,2 M. Después de un tratamiento con fenol-cloroformo, el producto se precipitó con etanol. Se fijó un enlazador EcoRI-SalI, NotI (Clontech Co.) a los extremos del cDNA bicatenario resultante. A continuación, los extremos se sometieron a fosforilación y el producto se aplicó a una columna de fraccionamiento por tamaños para obtener cDNA

con una longitud mayor de 500 pb. Se precipitó el DNA con etanol, se disolvió en agua y se ligó a pcDL-SR α 296 (Molecular and Cellular Biology, vol. 8, pp 466-472, 1988) que se había cortado con una enzima de restricción EcoRI (Takara Shuzo Co.) y se trataron con CIAP (fosfatasa alcalina de intestino de ternero, Takara Shuzo Co.).

5 (3) *Escrutinio de la genoteca de expresión por medio de fijación a OCIF*

Se transformó una cepa de *Escherichia coli*, XL2 Blue MRF' (Toyobo Co., Ltd.) utilizando el DNA producido en el Ejemplo 8(2) y se cultivó sobre agar de L-carbenicilina (1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl, 60 μ g/ml de carbenicilina, 1,5% agar) preparado en una placa de plástico de 24 pocillos, para producir aproximadamente 100 colonias por pocillo. Los transformantes en cada pocillo se suspendieron en 3 ml de medio de cultivo de ampicilina Terrific Broth (1,2% triptona, 2,4% extracto de levadura, 0,4% glicerol, KH_2PO_4 0,017 M, K_2HPO_4 0,072 M, 100 μ g/ml de ampicilina) y se cultivaron a 37°C durante una noche con agitación mediante sacudidas. Las células se recogieron por centrifugación para preparar DNA plasmídico utilizando un kit QIAwell (QIAGEN Co.). La concentración de DNA se determinó por medida de la absorbancia a 260 nm. Se concentró el DNA por precipitación con etanol y se disolvió en agua destilada a una concentración de 200 ng/ μ l. Se prepararon 500 agrupaciones de DNA, cada una de las cuales se obtuvo a partir de aproximadamente 100 colonias, y se utilizaron para transfección en células COS-7 (RIKEN CELL BANK, RCB0539). Las células COS-7 se sembraron en DMEM que contenía 10% de suero de bovino fetal en cada pocillo de placas de 24 pocillos a una densidad de células de 8×10^4 células/pocillo y se cultivaron durante una noche a 37°C en una incubadora de CO_2 . Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con medio de cultivo DMEM exento de suero. El DNA plasmídico arriba descrito que se diluyó previamente con un medio de cultivo OPTI-MEM (Gibco BRL Co.), y se mezcló con Lipofectamina (un reactivo de transfección, fabricado con Gibco BRL Co.) de acuerdo con el protocolo suministrado con la lipofectamina. Después de 15 minutos, se añadió la mezcla a las células de cada pocillo. La cantidad de lipofectamina y DNA utilizada eran, respectivamente, 1 μ g y 64 μ l por pocillo. Después de 5 horas, se retiró el medio de cultivo y se añadió a cada pocillo 1 μ l de medio de cultivo DMEM (Gibco BRL Co.) que contenía 10% de suero de bovino fetal. Se incubaron las placas durante 2-3 días a 37°C en una incubadora de CO_2 (5% de CO_2). Las células COS-7 transfectadas y cultivadas durante 2-3 días de esta manera se lavaron con un medio de cultivo DMEM exento de suero (a continuación, se añadieron a cada pocillo 200 μ l de un medio de cultivo para el ensayo de fijación (medio de cultivo DMEM exento de suero que contenía 0,2% de seroalbúmina de ternero, tampón Hepes 20 mM, heparina 0,1 mg/ml, y 0,02% de NaN_3) con 20 ng/ml de OCIF marcado con ^{125}I añadido al mismo. Después de cultivar durante 1 hora a 37°C en una incubadora de CO_2 (5% CO_2), se lavaron las células dos veces con 500 μ l de una solución salina tamponada con fosfato que contenía 0,1 mg/ml de heparina. Después del lavado, se añadieron a cada pocillo 500 μ l de solución 0,1N de NaOH. Las placas se dejaron en reposo durante 10 minutos a la temperatura ambiente para lisar las células. Se midió la cantidad de ^{125}I en cada pocillo utilizando un contador gamma (Packard Co.). Se encontró una sola agrupación de DNA que contenía cDNA codificante de la proteína que se fija específicamente a OCIF por escrutinio de un total de 500 agrupaciones. La agrupación de DNA que contenía el cDNA se dividió ulteriormente, y se repitieron las operaciones de transfección y escrutinio arriba descritas para aislar el cDNA que codifica la proteína que se fija a OCIF. El plásmido que contenía este cDNA se designó pOBM291. El *Escherichia coli* que contenía este plásmido se depositó en el organismo The National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Biotechnology Laboratory, como pOBM291 el 23 de mayo de 1997 bajo el número de depósito No. FER M BP-5953.

Los métodos de marcación de OCIF con ^{125}I y análisis cuantitativo del OCIF marcado con ^{125}I por ELISA se muestran a continuación. La marcación de OCIF con ^{125}I se llevó a cabo de acuerdo con el método Iodogen. Se añadieron 20 μ l de solución Iodogen-cloroformo de 25 mg/ml a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se evaporó el cloroformo por calentamiento a 40°C, para preparar un tubo recubierto con Iodogen. El tubo se lavó tres veces con 400 μ l de tampón de fosfato de sodio 0,5 M (Na-Pi, pH 7,0), y se añadieron 5 μ l de Na-Pi 0,5 M (pH 7,0). Inmediatamente después de la adición de 1,3 μ l (18,5 MBq) de solución de Na^{125}I (NEZ-033H20, Amersham Co.), se añadieron al tubo 10 μ l de solución de rOCIF de 1 mg/ml (tipo monómero o tipo dímero). Después de mezclar el contenido con un mezclador vorticial, se dejó el tubo en reposo a la temperatura ambiente durante 30 segundos. La solución contenida en el tubo se transfirió a un tubo al que se habían añadido previamente 80 μ l de yoduro de potasio de concentración 10 mg/ml, Na-Pi 0,5 M (pH 7,0) y 5 μ l de solución salina tamponada con fosfato que contenía 5% de seroalbúmina bovina (BSA-PBS). Después de agitar, se aplicó la mezcla a una columna giratoria (1 ml, G-25 Fine, fabricada por Pharmacia Co.) equilibrada con BSA-PBS, y la columna se centrifugó durante 5 minutos a 2000 rpm. Se añadieron 400 μ l de BSA-PBS a la fracción eluida de la columna. Después de agitar, se tomó una muestra de 2 μ l de una parte alícuota de esta solución para medir la radioactividad por medio de un contador gamma. La pureza radioquímica de la solución de OCIF marcada con ^{125}I así preparada se determinó por medida de la radioactividad precipitada por TCA al 10%. La actividad biológica del OCIF marcado con ^{125}I se midió de acuerdo con el método del documento WO 96/26217. La concentración del OCIF marcado con ^{125}I se determinó por el ensayo ELISA como sigue. Específicamente, se añadieron 100 μ l de NaHCO_3 50 mM (pH 9,6) en el cual el anticuerpo policlonal de conejo anti-OCIF descrito en el documento WO 96/26917 a una concentración de 2 μ g/ml a cada pocillo de una inmuno-placa de 96 pocillos (MaxiSorp™, un producto de Nunc Co.). La placa se dejó en reposo durante una noche a 4°C. Después de retirar la solución por succión, se añadieron a cada pocillo 300 μ l de Block Ace™ (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.)/solución salina tamponada con fosfato (25/75) (B-PBS). La placa se dejó luego en reposo durante 2 horas a la temperatura ambiente. Después de retirar la solución por succión, se lavaron tres veces los pocillos con solución salina tamponada con fosfato que contenía 0,01% de Polisorbato 80 (B-PBS). A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de P-PBS que contenía OCIF marcado con ^{125}I o OCIF estándar. La placa se dejó luego en reposo durante 2 horas a la temperatura ambiente. Después de retirar la solución por succión, cada pocillo se lavó 6 veces con 200 μ l de P-PBS. Se añadieron a cada pocillo 100 μ l de anticuerpo policlonal de conejo anti-OCIF marcado con peroxidasa, diluido con P-PBS. La placa se

ES 2 263 204 T3

dejó en reposo durante 2 horas a la temperatura ambiente. Después de retirar la solución por succión, los pocillos se lavaron 6 veces con 200 μ l de P-PBS. A continuación se añadieron a cada pocillo 100 μ l de solución TMB (TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scytek Co.). Después de incubar la placa a la temperatura ambiente durante 2-3 minutos, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de solución de parada (Stopping Reagent, Scytek Co.). Se midió la absorbancia a 450 nm de cada pocillo utilizando un lector de microplacas. La concentración de OCIF marcado con ¹²⁵I se determinó sobre la base de una curva de calibración trazada utilizando la preparación estándar de OCIF.

(4) Determinación de la secuencia de nucleótidos del cDNA que codifica la secuencia entera de aminoácidos de OBM

La secuencia de nucleótidos del cDNA de OBM obtenido en el Ejemplo 8 (3) se determinó utilizando un kit Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing (un producto de Perkin Elmer Co.). Específicamente, la secuencia de nucleótidos del fragmento de inserción se determinó directamente utilizando pOBM291 como molde. Fragmentos que tenían una longitud de aproximadamente 1,0 kb y 0,7 kb que se obtuvieron por digestión de pOBM291 con una enzima de restricción EcoRI se insertaron en el sitio EcoRI del plásmido pUC19 (Takara Shuzo Co.). Se determinaron también las secuencias de nucleótidos de estos fragmentos. Se utilizaron los iniciadores siguientes: iniciador SRR2 que se utilizó para determinar secuencias nucleotídicas de fragmentos de DNA insertados en pcDL-SR α 296, M13PrimerM3 y M13PrimerRV (fabricados ambos por Takara Shuzo Co.) que se utilizaron para determinar las secuencias de nucleótidos de fragmentos de DNA insertados en el plásmido pUC19, y el iniciador sintetizado OBM#8 diseñado basándose en la secuencia de nucleótidos de OBMcDNA. Las secuencias de estos iniciadores se muestran como la Secuencia ID No. 3 a No. 6 en la Tabla de Secuencias.

Adicionalmente, la secuencia de nucleótidos de OBMcDNA determinada se muestra como Secuencia ID No. 2 y la secuencia de aminoácidos determinada a partir de ella se muestra como la Secuencia ID No. 1.

Ejemplo 9

Expresión de la proteína de fijación de OCIF codificada por cDNA

Se transfectó el plásmido pOBM291 en células COS-7 en cada pocillo de una placa de 6 pocillos utilizando Lipofectamina, y las células COS-7 transfectadas se cultivaron durante 2 días en DMEM que contenía 10% de suero de bovino fetal. Se reemplazó el medio con un DMEM exento de cisteína y metionina (Dainippon Seiyaku Co. Ltd.) (800 μ l/pocillo) que contenía 5% de suero de bovino fetal dializado. Las células se cultivaron durante 15 minutos, seguido por la adición de 14 μ l de Express Protein Labeling Mix (10 mCi/ml, fabricado por NEN Co.). Después de cultivar durante 4 horas, se añadieron 200 μ l de DMEM que incluían 10% de suero de bovino fetal. Después de una hora de cultivo, se lavaron las células dos veces con PBS. A continuación, se añadieron 0,5 ml de un tampón TSA (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) que contenía NaCl 0,14 M, y 0,025% NaN₃), que contenía 1% de Triton X-100, 1% de hemoglobina de bovino, 10 μ g/ml de leupeptina, 0,2 TIU/ml de aprotinina, PMSF 1 mM, y la mezcla se dejó enfriar durante una hora en hielo. Las células se disgregaron por pipeteado y se centrifugaron a 3000 x g durante 10 minutos a 4°C para obtener un sobrenadante. Se añadió a 100 μ l de este sobrenadante 200 μ l de tampón de dilución (tampón TSA que contenía 0,1% de Triton X-100, 0,1% de hemoglobina de bovino, 10 μ g/ml de leupeptina, 0,2 TIU/ml de aprotinina, PMSF 1 mM). La mezcla se agitó nuevamente mediante sacudidas durante una hora a 4°C con proteína A Sepharose (50 μ l). La mezcla resultante se centrifugó a 1500 x g durante 1 minuto a 4°C para recoger el sobrenadante, y de este modo se eliminaron la fracción o fracciones que no son adsorbidas específicamente por la proteína A Sepharose. Se añadió OCIF (1 μ g) a este sobrenadante y la mezcla se agitó mediante sacudidas a 4°C durante una hora para conseguir la fijación de OCIF a OBM. Se añadió un anticuerpo policlonal anti-OCIF (50 μ g) y la mezcla se agitó durante una hora a 4°C. Se añadió luego proteína A Sepharose (10 μ l) y la mezcla se agitó mediante sacudidas durante una hora más a 4°C, seguido por centrifugación a 1500 x g durante 1 minuto a 4°C para recoger un precipitado. El precipitado se lavó dos veces con tampón de dilución, dos veces con un tampón de dilución exento de hemoglobina de bovino, una sola vez con tampón TSA, y una sola vez con Tris-HCl 50 mM (pH 6,5). Después del lavado, se añadió al precipitado tampón SDS (Tris-HCl 0,125 M, 4% de dodecilsulfato de sodio, 20% de glicerol, 0,002% de Azul de Bromofenol, pH 6,8) que contenía 10% de β -mercaptoetanol. La mezcla se calentó durante 5 minutos a 100°C y se sometió a SDS-PAGE (gel de poliacrilamida al 12,5%, Daiichi Chemical Co., Ltd.). El gel se fijó de acuerdo con un método convencional. Las señales de isótopos se amplificaron utilizando AmplifyTM (Amersham Co.) y la muestra se expuso a película BioMax MR (KODAK Co.) a -80°C. Los resultados se muestran en la Figura 8, que indica que la proteína de fijación de OCIF codificada por cDNA tiene un peso molecular de aproximadamente 40.000.

Ejemplo 10

Fijación de la proteína de fijación de OCIF codificada por cDNA a OCIF

El plásmido pOBM291 se transfectó a células COS en cada pocillo de una placa de 24 pocillos utilizando Lipofectamina. Después de cultivar durante 2-3 días, las células se lavaron con medio de cultivo DMEM exento de suero. Se añadieron a los pocillos 200 μ l de medio de cultivo para el ensayo de fijación (medio de cultivo DMEM exento de suero que contenía 0,2% de suero de ternero, albúmina, Hepes 20 mM, 0,1 mg/ml de heparina y 0,2% de NaN₃), complementado con 20 ng/ml de OCIF marcado con ¹²⁵I. Se añadieron a los otros pocillos 200 μ l de medio de cultivo para el ensayo de fijación al que se habían añadido 8 μ g/ml de OCIF sin marcar, además de 20 ng/ml de OCIF marcado

ES 2 263 204 T3

con ^{125}I . Después de cultivar durante una hora a 37°C en una incubadora de CO_2 (5% de CO_2), las células se lavaron dos veces con $500\ \mu\text{l}$ de solución salina tamponada con fosfato que contenía $0,1\ \text{mg/ml}$ de heparina. A continuación, se añadieron a cada pocillo $500\ \mu\text{l}$ de solución $0,1\ \text{N}$ de NaOH y la placa se dejó en reposo durante 10 minutos a la temperatura ambiente para disolver las células. La cantidad de ^{125}I en cada pocillo se midió por un contador gamma. Como resultado, como se muestra en la Figura 9, se encontró que el OCIF marcado con ^{125}I se fijaba únicamente a las células en las cuales se había transfectado el plásmido pOBM291. Además, se confirmó que la fijación era inhibida claramente por la adición de OCIF (sin marcar) a una concentración 400 veces mayor. Estos resultados han demostrado que la proteína OBM codificada por el cDNA en el plásmido pOBM291 se fija específicamente a OCIF en la superficie de las células COS-7 transfectadas.

Ejemplo 11

Reticulación de OCIF marcado con ^{125}I y la proteína de fijación de OCIF codificada por cDNA

La reticulación del OCIF de tipo monómero marcado con ^{125}I y la proteína de fijación de OCIF codificada con cDNA se llevó a cabo para investigar las características de la proteína de fijación de OCIF codificada por cDNA con mayor detalle. Después de transfección del plásmido pOBM291 en células COS-7 de acuerdo con el método utilizado en el Ejemplo 8(3), se añadieron a los pocillos $200\ \mu\text{l}$ del medio de cultivo para el ensayo de fijación, como se ha descrito arriba, que contenía OCIF marcado con ^{125}I ($25\ \text{ng/ml}$). Se añadió a los otros pocillos el medio de cultivo al que se añadió OCIF sin marcar a una concentración 400 veces mayor además de OCIF marcado con ^{125}I . Después de cultivar durante una hora a 37°C en una incubadora de CO_2 (5% de CO_2), las células se lavaron dos veces con $500\ \mu\text{l}$ de solución salina tamponada con fosfato que contenía $0,1\ \text{mg/ml}$ de heparina. Se añadieron a las células $500\ \mu\text{l}$ de solución salina tamponada con fosfato que contenía $100\ \mu\text{g/ml}$ de un agente de reticulación, DSS (suberato de disuccinimidilo, fabricado por Pierce Co.), seguido por una reacción durante 10 minutos a 0°C . Las células contenidas en estos pocillos se lavaron dos veces con $1\ \text{ml}$ de solución salina tamponada con fosfato fría (0°C). Después de la adición de $100\ \mu\text{l}$ de tampón Hepes $20\ \text{mM}$ que contenía 1% de Triton X-100 (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.), PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, Sigma Co.) $2\ \text{mM}$, pepstatina $10\ \mu\text{M}$ (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.), leupeptina $10\ \mu\text{M}$ (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.), antipaina $10\ \mu\text{M}$ (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.) y EDTA $2\ \text{mM}$ (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.), se dejaron los pocillos en reposo durante 30 minutos a la temperatura ambiente para disolver las células. Se calentaron partes alícuotas de $15\ \mu\text{l}$ de estas muestras en presencia de SDS en condiciones de reducción de acuerdo con un método convencional y se sometieron a SDS-electroforesis utilizando un gel en gradiente de poli(acrilamida) al 4-20% (Daiichi Pure Chemical Co., Ltd.). Después de la electroforesis, el gel se secó y se expuso durante 24 horas a $0,80^\circ\text{C}$ a una película BioMax MS (Kodak Co.) utilizando un filtro de sensibilización BioMax MS (Kodak Co.). La película expuesta se reveló de acuerdo con un método convencional. Como resultado, se detectó una banda con un peso molecular comprendido en un intervalo de $90.000-110.000$, representada en la Figura 10, por reticulación del OCIF de tipo monómero marcado con ^{125}I y la proteína de fijación de OCIF codificada por cDNA.

Ejemplo 12

Análisis por transferencia Northern

Células ST2 cultivadas hasta llegar a ser confluentes en un matraz T de $25\ \text{cm}^2$ para cultivos de células unidas se trataron con tripsina y se desprendieron del matraz T. Después del lavado, las células se sembraron en un matraz T de $225\ \text{cm}^3$ y se cultivaron durante 4 días en una incubadora de CO_2 con $60\ \text{ml}$ de un medio de cultivo de α -MEM que contenía $10^{-8}\ \text{M}$ de vitamina D_3 de forma activa, $10^{-7}\ \text{M}$ de dexametasona, y 10% de suero de bovino fetal. Se extrajo el RNA total de las células ST2 cultivadas utilizando ISOGEN (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.). El RNA total se extrajo también de la misma manera a partir de células ST2 que se cultivaron en ausencia de la vitamina D_3 de forma activa y dexametasona. Después de la adición de $2,0\ \mu\text{l}$ de solución tampón de electroforesis 5x gel (ácido morfolino-propanosulfónico $0,2\ \text{M}$, pH 7,0, acetato de sodio $50\ \text{mM}$, EDTA $5\ \text{mM}$) y $3,5\ \mu\text{l}$ de formaldehído, y $10,0\ \mu\text{l}$ de formamida para $20\ \mu\text{g}$ ($4,5\ \mu\text{l}$) de cada uno de los RNAs totales, se incubaron las mezclas durante 15 minutos a 55°C y se sometieron a electroforesis. El gel para electroforesis se preparó de acuerdo con la formulación de $1,0\%$ agarosa, formaldehído desionizado $2,2\ \text{M}$, ácido morfolino-propano-sulfónico $40\ \text{mM}$ (pH 7,0), acetato de sodio $10\ \text{mM}$, y EDTA $1\ \text{mM}$. La electroforesis se llevó a cabo en una solución tampón de ácido morfolino-propanosulfónico $40\ \text{mM}$, pH 7,0, acetato de sodio $10\ \text{mM}$, y EDTA $1\ \text{mM}$. Después de la electroforesis, se transfirió el RNA a una membrana de nailon. Se obtuvieron aproximadamente $1,0\ \text{kb}$ de un fragmento de DNA por digestión de pOBM291 con una enzima de restricción, EcoRI. La hibridación se llevó a cabo utilizando este fragmento de DNA, marcado con un kit de marcación Megaprime DNA (Amersham Co.) y α - ^{32}P -dCTP (Amersham Co.), como sonda. Como resultado, como se muestra en la Figura 1, se confirmó que cuando las células ST2 se cultivaron en presencia de vitamina D_3 de forma activa y dexametasona, la expresión génica de OBM se induce fuertemente.

Ejemplo 13

Capacidad de soporte de la formación de osteoclastos de la proteína de fijación de OCIF codificada por cDNA

Se transfectó pOBM291 a células COS de acuerdo con el mismo método descrito en el Ejemplo 8 (3). Después de 3 días, las células tripsinizadas se lavaron una sola vez con solución salina tamponada con fosfato por centrifugación, y se fijaron luego con PBS que contenía 1% de paraformaldehído a la temperatura ambiente durante 5 minutos, seguido por lavado con PBS 6 veces por centrifugación. Se añadieron a una placa de 24 pocillos $700\ \mu\text{l}$ de $1 \times 10^6/\text{ml}$ células

ES 2 263 204 T3

de bazo de ratón y 350 μ l de 4 x 10⁴/ml células ST2 que se suspendieron en un medio de cultivo α -MEM que contenía 10⁻⁸ M de vitamina D₃ de forma activa, 10⁻⁷ M de dexametasona, y 10% de suero de bovino fetal. La inserción (Nunc Co.) se ajustó en cada pocillo. Las células COS fijadas arriba descritas (350 μ l) diluidas a diversas concentraciones con el medio de cultivo arriba mencionado y solución de OCIF (50 μ l) se añadieron a la inserción de TC y se cultivaron durante 6 días a 37°C. Como resultado, se confirmó que la capacidad inhibitoria de la formación de osteoclastos de OCIF puede ser inhibida por la proteína de fijación de OCIF codificada por cDNA.

Ejemplo 14

10 *Expresión de OBM de forma secretada*

(1) *Construcción de un plásmido para la expresión de OBM de forma secretada*

Se llevó a cabo una reacción PCR utilizando OBM RF (Tabla de Secuencias, Secuencia ID No. 7) y OBM XR (Tabla de Secuencias, Secuencia ID No. 8) como iniciadores y pOBM291 como molde. Después de purificación por electroforesis en gel de agarosa, el producto se digirió con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI, y se purificó ulteriormente por electroforesis en gel de agarosa. El fragmento purificado (0,6 kb), el fragmento HindIII/EcoRI (5,2 kb) de pSecTagA (Invitrogen Co.) y el fragmento EcoRI-pmacl (0,32 kb) de cDNA de OBM se ligaron utilizando un kit de ligación ver.2 (Takara Shuzo Co.). Se transformó *Escherichia coli* DH5 α utilizando el producto de reacción. Los plásmidos se purificaron por el método álcali-SDS a partir de las cepas resultantes resistentes a la ampicilina y se digirieron con enzimas de restricción para seleccionar un plásmido, insertándose fragmentos de una longitud de 0,6 Kb y 0,32 Kb en spec TagA. El plásmido seleccionado se identificó por tener una secuencia que codificaba la OBM de forma secretada (secuencia de nucleótidos: 338-1355 en la Secuencia ID No. 2, secuencia de aminoácidos: 72-316 en la Secuencia ID No. 1) por secuenciación utilizando un kit de secuenciación FS con ciclo dye-terminator (Perkin Elmer Co.). Este plásmido se digirió con las enzimas de restricción NheI y XhoI para aislar un fragmento (de 1,0 kb) que contenía el cDNA de OBM de la forma secretada por electroforesis en gel de agarosa. Este fragmento se insertó en el fragmento NheI/XhoI (10,4 kb) de un vector de expresión, pCEP4 (Invitrogen Co.); utilizando un kit de ligación y *Escherichia coli* DH5 α se transformó utilizando el producto de reacción del mismo. Se purificaron los plásmidos por el método de álcali-SDS a partir de las cepas resultantes resistentes a la ampicilina y se digirieron con enzimas de restricción para seleccionar una cepa de *Escherichia coli* que tuviera el plásmido de expresión de OBM en la forma secretada (pCEP sOBM) con la estructura correcta. La cepa de *Escherichia coli* que contenía la pCEP sOBM se cultivó y se purificó pCEP sOBM utilizando el kit "plasmid midi" con filtro QIA (QIAGEN Co.).

(2) *Expresión de OBM de forma secretada*

Se suspendieron células 293-EBNA en IMDM que contenía 10% FCS (IMDM-10% FCS), se sembraron en una placa de 24 pocillos recubierta con colágeno (fabricada por Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) a una densidad de células de 2 x 10⁵/2 ml/pocillo, y se cultivaron durante una noche. Las células se transfectaron con 1 μ g de pCEP sOBM o pCEP4 utilizando 4 μ l de lipofectamina (Gibco Co.). Después de cultivar durante 2 días en 0,5 ml de un IMDM exento de suero o IMDM-10% FCS, se recogió el medio acondicionado. La expresión de la forma secretada de OBM en el medio acondicionado se confirmó como sigue. Se añadió hidrogenocarbonato de sodio al medio acondicionado hasta una concentración final de 0,1 M, y la solución se añadió a una placa de 96 pocillos. La placa se dejó en reposo durante una noche a 4°C, con lo cual se inmovilizó la OBM en el medio acondicionado sobre la placa de 96 pocillos. La placa se llenó con una solución Block AceTM (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.), se diluyó la solución 4 veces con PBS (B-PBS) y se dejó en reposo durante 2 horas a la temperatura ambiente para bloquear los sitios de fijación residuales de la placa. Después de la adición a cada pocillo de 100 μ l de 3-100 ng/ml de OCIF que se diluyó con B-PBS, la placa se dejó en reposo durante 2 horas a 37°C, seguido por lavado con PBS que contenía 0,05% de Twin 20 (PBS-T). A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de un anticuerpo policlonal de conejo anti-OCIF marcado con peroxidasa, descrito en el documento WO 96/26217 que se diluyó con B-PBS. Después de dejar en reposo durante 2 horas a 37°C, los pocillos se lavaron 6 veces con PBS-T. A continuación, se añadió una solución de TMB (TMB soluble Reagent, High Sensitivity, Scytek Co.) en la cantidad de 100 μ l por pocillo y se dejó en reposo a la temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos, después de lo cual se terminó la reacción por adición de 100 μ l de una solución de terminación (Stopping Reagent, Scytek Co.) a cada pocillo. Se midió la absorbancia de cada pocillo a 450 nm por un lector de microplacas. Los resultados se dan en la Figura 12, que indica que la absorbancia a 450 nm aumentaba de acuerdo con la concentración de OCIF añadido en la placa en la cual se inmovilizaba el medio acondicionado de las células transfectadas con pCEP sOBM. Por el contrario, no se observó aumento alguno en la absorbancia en la placa en la que estaba inmovilizado el medio acondicionado de las células transfectadas con el vector pCEP4. La Figura 13 muestra los resultados de un experimento en el cual la proporción del medio acondicionado que se utiliza para inmovilización se cambió dentro de un intervalo de 5-90% y se añadió una concentración específica de OCIF (50 ng/ml). Puede verse que la absorbancia a 450 nm aumentaba de acuerdo con el aumento en la proporción del medio acondicionado en la placa en la que estaba inmovilizado el medio acondicionado de las células transfectadas con pCEPsOBM, mientras que no se observó aumento alguno de absorbancia de este tipo en la placa en la que se inmovilizó el medio acondicionado de las células transfectadas con el vector pCEP4. A partir de estos resultados, se confirmó que la OP M de forma secretada se produce en el medio acondicionado de las células transfectadas con pCEPsOBM.

ES 2 263 204 T3

Ejemplo 15

Expresión de la proteína de fusión tiorredoxina-OBM (Trx-OBM)

(1) Construcción de un vector de expresión de la proteína de fusión tiorredoxina-OBM (Trx-OBM)

Se mezclaron 10 μ l de tampón ExTaq 10X (Takara Shuzo Co.), 8 μ l de dNTP 10 mM (Takara Shuzo Co.), 77,5 μ l de agua destilada esterilizada, 2 μ l de una solución acuosa de pOBM291 (10 ng/ μ l), 1 μ l de iniciador OBM3 (100 pmol/ μ l, Tabla de Secuencias, Secuencia ID No. 9), 1 μ l del iniciador OBMSalR2 (100 pmol/ μ l, Tabla de Secuencias, Secuencia ID No. 10), y 0,5 μ l de ExTaq (5 u/ μ l) (Takara Shuzo Co.) y se dejaron reaccionar (reacción PCR) en un tubo de microcentrífuga. Después de reacción a 95°C durante 5 minutos, a 50°C durante 1 segundo, a 55°C durante 1 minuto, a 74°C durante 1 segundo y 72°C durante 5 minutos, se repitió 25 veces un ciclo de reacción constituido por una reacción a 96°C durante 1 minuto, a 50°C durante 1 segundo, a 55°C durante 1 minuto, a 74°C durante 1 segundo y 75°C durante 3 minutos. Una vez terminada la reacción total, un fragmento líquido de DNA de aproximadamente 750 pb se purificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando el kit de extracción de gel QIAEX II (QIAGEN Co). La cantidad total de fragmento de DNA purificado se digirió con las enzimas de restricción SanI y EcoRI (Takara Shuzo Co.) y se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para purificar un fragmento de DNA de aproximadamente 160 pb (Fragmento 1), que se disolvió en 20 μ l de agua destilada esterilizada. De la misma manera, un fragmento de DNA de aproximadamente 580 pb (Fragmento 2) obtenido por digestión de 4 μ g de pOBM291 con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI (Takara Shuzo Co.) y un fragmento de DNA de aproximadamente 3,6 kb (Fragmento 3) obtenido por digestión de 2 μ g de pTrXFus (Invitrogen Co.) con las enzimas de restricción BamHI y SalI (Takara Shuzo Co.) se purificaron respectivamente y se disolvieron en 20 μ l de agua destilada esterilizada. Se utilizó el kit de extracción de gel QIAEX II para la purificación de los fragmentos de DNA. Los fragmentos 1-3 se ligaron por incubación a 16°C durante 2,5 horas utilizando el kit de ligación de DNA ver. 2 (Takara Shuzo Co.). Utilizando el líquido de la reacción de ligación, la cepa de *Escherichia coli* GI724 (Invitrogen Co.) se transformó de acuerdo con el método descrito en el Instruction Manual of ThioFusion Expression System (Invitrogen Co.). Una cepa del microorganismo con un plásmido en el cual el fragmento de cDNA de OBM (secuencia de nucleótidos: 350-1111 en la Secuencia ID No. 2, secuencia de aminoácidos 76-316 en la Secuencia ID No. 1) está fusionado en marco con un gen de tiorredoxina se seleccionó a partir de los transformantes resultantes resistentes a la ampicilina por el análisis de los mapas de restricción obtenidos por digestión con enzimas de restricción y determinación de la secuencia de DNA. La cepa del microorganismo así obtenida se designó GI724/pTrxOMB25.

(2) Expresión de OBM en *Escherichia coli*

GI724/pTrxOMB25 y GI724 que contenía pTrXFus (GI724/pTrXFus) se cultivaron respectivamente durante 6 horas con agitación mediante sacudidas a 30°C en 2 ml de medio de cultivo RMG-Amp(0,6% Na₂HPO₄, 0,3% KH₂PO₄, 0,05% NaCl, 0,1% NH₄Cl, 1,2% casamino-aminoácido (Difco Co.), 1% glicerol, MgCl₂ 1 mM, y 100 μ g/ml de ampicilina (Sigma Co.), pH 7,4). Se añadieron 0,5 ml del caldo a 50 ml de medio de cultivo Induction (0,6% Na₂HPO₄, 0,3% KH₂PO₄, 0,05% NaCl, 0,1% NH₄Cl, 0,2% casamino-ácido, 0,5% glucosa, MgCl₂ 1 mM, 100 μ g/ml de ampicilina, pH 7,4) y se cultivaron con agitación mediante sacudidas a 30°C. Cuando la DO_{600nm} alcanzó aproximadamente 0,5, se añadió L-triptófano a una concentración final de 0,1 mg/ml, seguido por agitación mediante sacudidas del cultivo a 30°C durante 6 horas más. El caldo de cultivo se centrifugó a 3000 x g para recoger las células, las cuales se suspendieron en 12,5 ml de PBS (tampón de fosfato 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4). La suspensión se sometió a un generador de ultrasonidos (Ultrasonics Co.) para disgregar las células. Las células disgregadas se centrifugaron a 7000 x g durante 30 minutos para obtener un líquido sobrenadante como una fracción de proteínas soluble. Se sometieron 10 μ l de esta fracción de proteínas solubles a electroforesis en SDS-poliacrilamida (10%) en condiciones reductoras. Como resultado, se encontró en la fracción de proteínas soluble de GI724/pTrxOMB25 (Figura 14) una banda con un peso molecular de 40 kDa que no era detectable en la fracción de proteínas soluble de GI724/pTrXFus. De acuerdo con ello, se confirmó que se expresaba en *Escherichia coli* una proteína de fusión (Trx-OBM) de tiorredoxina y OBM.

(3) Capacidad de fijación de TrxOBM a OCIF

La fijación de la Trx-OBM expresada a OCIF se confirmó de acuerdo con el experimento siguiente. Se añadió anticuerpo anti-tiorredoxina (Invitrogen Co.) que se diluyó 5000 veces con solución de hidrogenocarbonato de sodio 10 mM a una inmunoplaaca de 96 pocillos (Nunc Co.) en la cantidad de 100 μ l por pocillo. Después de dejar en reposo durante una noche a 4°C, se desechó el líquido contenido en los pocillos. Se añadieron a cada pocillo 200 μ l de una solución preparada por dilución de Block Ace™ (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) al doble con PBS (BA-PBS). Después de dejar en reposo durante una hora a la temperatura ambiente, se desechó la solución y se añadieron a cada pocillo fracciones solubles de proteína originarias de GI724/pTrxOMB25 o GI724/pTrXFus arriba descritas, diluidas cada una con BA-PBS en diversas concentraciones, en la cantidad de 100 μ l. Después de dejar en reposo durante 2 horas a la temperatura ambiente, se lavó cada pocillo 3 veces con PBS-T y se cargó con 100 μ l de OCIF (100 ng/ml) que se diluyó con BA-PBS. Después de dejar en reposo durante 2 horas a la temperatura ambiente, se lavó 3 veces cada pocillo con PBS-T y se cargó con 100 μ l de anticuerpo policlonal de conejo anti-OCIF marcado con peroxidasa (descrito en el documento WO96/26217) que se diluyó 2.000 veces con BA-PBS. Después de dejar en reposo durante 2 horas a la temperatura ambiente, se lavó cada pocillo 6 veces con PBS-T y se cargó con 100 μ l de solución TMB (TM B Soluble Reagent High Sensitivity, Scytek Co.). Después de dejar en reposo durante aproximadamente 10 minutos a la temperatura ambiente, se cargó cada pocillo con 100 μ l de la solución de terminación (Stopping Reagent, Scytek Co.). La absorbancia de cada pocillo a 450 nm se midió por un lector de

ES 2 263 204 T3

microplacas. Los resultados se muestran en la Figura 15. No existía diferencia alguna en absorbancia entre la muestra con la fracción soluble de proteínas originaria de GI724/pTrxFus añadida a la misma y la muestra sin la adición de esta fracción de proteínas soluble. Por otra parte, la absorbancia aumentaba en las muestras a las que se añadió la fracción soluble de proteína originaria de GI724/pTrxOBM25 en proporción a la concentración de la fracción de proteínas soluble. Los resultados del otro experimento en el cual la tasa de dilución de la fracción de proteínas soluble se mantuvo constante (1%) mientras se añadía OCIF diluida con BA-PBS en concentraciones diferentes (0-100 ng/ml) se muestran en la Figura 16. Puede verse que la absorbancia se mantenía baja para cualesquiera concentraciones de OCIF en las muestras utilizando una fracción de proteína soluble originaria de GI724/pTrxFus, mientras que la absorbancia aumentaba en proporción a la concentración de OCIF en las muestras a las que se añadió la fracción soluble de proteínas originaria de GI724/pTrxOBM25. Basándose en estos resultados, se confirmó que Trx-OBM que se produce a partir de GI724/pTrxOBM25 tiene capacidad de fijación a OCIF.

(4) Cultivo en gran escala de *Escherichia coli* que produce Trx-OBM

Se extendieron células GI724/pTrxOBM25 sobre agar RMG-Amp (0,6% Na₂PO₄, 0,3% KH₂PO₄, 0,05% NaCl, 0,1% NH₄Cl, 2% casamino-ácido, 1% glicerol, MgCl₂ 1 mM, 100 µg/ml ampicilina, 1,5% agar, pH 7,4) utilizando un asa de transferencia de platino. Las células se cultivaron durante una noche a 30°C. Las células cultivadas se suspendieron en 10 ml de medio Induction. Se añadieron 5 ml de la suspensión a cada uno de 2 matraces Erlenmeyer de 2 l que contenían 500 ml de Medio de Inducción y se cultivaron a 30°C con agitación mediante sacudidas. Cuando la DO_{600 nm} alcanzó aproximadamente 0,5, se añadió L-triptófano a una concentración final de 0,1 mg/ml. El cultivo con agitación mediante sacudidas se continuó durante 6 horas a 30°C. Se centrifugó el caldo de cultivo durante 20 minutos a 3000 x g para recoger las células, las cuales se suspendieron en 160 ml de PBS. Se sometió la suspensión a un generador de ultrasonidos (Ultrasonics Co.) para disgregar las células. El líquido sobrenadante se centrifugó durante 30 minutos a 7000 x g para obtener una fracción soluble de proteínas.

(5) Preparación de la columna de afinidad inmovilizada de OCIF

Se mezclaron 2 g de TSKgel AF-Tolesyl Toyopal 650 (Tosoh Corp.) y 40 ml de tampón de fosfato de potasio 1,0 M (pH 7,5) que contenía 35,0 mg de OCIF recombinante, que se preparó de acuerdo con el método descrito en el documento WO96/26217. La mezcla se agitó suavemente mediante sacudidas durante una noche a 4°C para efectuar una reacción de acoplamiento. La mezcla de reacción se centrifugó para eliminar el sobrenadante. Para desactivar el exceso de residuos activos, se añadieron 40 ml de tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 7,5) al vehículo precipitado y la mezcla se agitó moderadamente mediante sacudidas a la temperatura ambiente durante una hora. El vehículo contenido en una columna se lavó con tampón de glicina-HCl 0,1 M (pH 3,3) que contenía 0,01% de Polisorbato 80 y NaCl 0,2 M y tampón de citrato de sodio 0,1 M (pH 2,0) que contenía 0,01% de Polisorbato 80 y NaCl 0,2 M. El vehículo contenido en la columna se equilibró por carga dos veces con tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 7,4) que contenía 0,01% de Polisorbato 80.

(6) Purificación de Trx-OBM utilizando la columna de afinidad inmovilizada de OCIF

A no ser que se indique otra cosa, la purificación de Trx-OBM se llevó a cabo a 4°C. El portador de afinidad inmovilizado de OCIF arriba mencionado (10 ml) y la fracción soluble de proteínas (120 ml) preparados en el Ejemplo 15 (4) se mezclaron. La mezcla se agitó suavemente mediante sacudidas durante una noche a 4°C en 4 tubos de centrifuga de 50 ml utilizando un rotor. Una Econo-Columna™ (diámetro interno: 1,5 cm, longitud: 15 cm, fabricada por BioRad Co.) se llenó con el vehículo en la mezcla. La columna se cargó con 300 ml de PBS que contenía 0,01% de Polisorbato 80, 100 ml de tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 7,0) que contenía 0,01% de Polisorbato 80 y NaCl 2 M, y 100 ml de tampón glicina-HCl 0,1 M (pH 3,3) que contenía 0,01% de Polisorbato 80 y NaCl 0,2 M, por este orden. A continuación, las proteínas adsorbidas en la columna se eluyeron con tampón de citrato de sodio 0,1 M (pH 2,0) que contenía 0,01% de Polisorbato 80 y NaCl 0,2 M. El material eluido se recogió en porciones de 5 ml. Cada fracción así recogida se neutralizó inmediatamente con adición de 10% en volumen de tampón Tris 2 M (pH 8,0). La presencia o ausencia de Trx-OBM en las fracciones eluidas se determinó de acuerdo con el método descrito previamente en el Ejemplo 15 (3) (la capacidad de fijación a OCIF). Las fracciones que contenían Trx-OBM se recogieron y se purificaron ulteriormente.

(7) Purificación de Trx-OBM por filtración sobre gel

Aproximadamente 25 ml de las fracciones de Trx-OBM obtenidas en el Ejemplo 15 (6) se concentraron a aproximadamente 0,5 ml por centrifugación utilizando Centriplus 10 y Centricon 10 (Amicon Co.). Esta muestra se aplicó a una columna Superose 12 HR 10/30 (1,0 x 30 cm, Pharmacia Co.) equilibrada previamente con PBS que contenía 0,01% de Polisorbato 80. Para la separación, se utilizó PBS que contenía 0,01% de Polisorbato 80 como una fase móvil a un caudal de 0,25 ml/min. El material eluido de la columna se recogió en porciones de 0,25 ml. La Trx-OBM se detectó en las fracciones así recogidas por el mismo método que se ha descrito previamente en el Ejemplo 15 (3) y por electroforesis con SDS-poliacrilamida (gel de poliácridamida al 10-15%, Pharmacia Co.) utilizando Phast System (Pharmacia Co.) y tinción con plata. Las fracciones (Fr. 20-23) que contenían Trx-OBM purificada se recogieron y se determinó la concentración de proteína de Trx-OBM. La medida de la concentración de proteína se llevó a cabo utilizando seroalbúmina bovina como una sustancia estándar con empleo del kit de ensayo DC-Protein (BioRad Co.).

Ejemplo 16

Actividad inductora de la formación de osteoclastos de OBM

5 pOBM291 y pcDL-SR α 296 se transfectaron respectivamente en células COS-7 utilizando lipofectamina (Gibco Co.). Las células se cultivaron en DMEM que contenía 10% de FCS durante un día, se tripsinizaron, se extendieron sobre cubreobjetos (forma redonda de 15 mm, fabricados por Matsunami Co.) en placas de 24 pocillos a razón de 5×10^4 células por pocillo, y se cultivaron durante 2 días. La placa de cultivo se lavó una sola vez con PBS. Las células se fijaron con PBS que contenía 1% de paraformaldehído a la temperatura ambiente durante 8 minutos. La
 10 placa a la que se unieron las células fijadas se lavó 6 veces con PBS y se añadieron a continuación a cada pocillo 700 μ l de células de bazo de ratón suspendidas a 1×10^6 /ml en α -MEM que contenía 10^{-8} M de vitamina D₃ de forma activa, 10^{-7} M de dexametasona, y 10% de suero de bovino fetal. Se ajustó PCF Millicell (Millipore Co.) en cada pocillo y se añadió una suspensión de células ST2 en el medio de cultivo arriba mencionado (4×10^4 /ml), 700 μ l por pocillo, en la PCF Millicell seguido por incubación a 37°C durante 6 días. Después del cultivo, se retiró el PCF
 15 Millicell, se lavó la placa una sola vez con PBS, y las células se fijaron con solución acetona-etanol (50:50) durante un minuto. A continuación, las células que exhibían actividad de fosfatasa ácida resistente al ácido tartárico (TRAP), que es un marcador específico para los osteoclastos, se tiñeron de modo selectivo utilizando el kit LEUKOCYTE ACID PHOSPHATASE (Sigma Co.). Como resultado de la observación al microscopio, no se detectaron células TRAP-positivas en los pocillos en los cuales se habían fijado células COS-7 transfectadas con pcDL-SR α 296. En contraste,
 20 se observaron 45 ± 18 (valor medio \pm desviación estándar, $n = 3$) células TRP-positivas en los pocillos en los cuales se fijaron las células COS-7 transfectadas con pOBM291. Además, se confirmó también que la calcitonina se fija a estas células TRP-positivas. Basándose en estos descubrimientos, se ha demostrado que la OBM tiene capacidad inductora de la formación de osteoclastos.

Ejemplo 17

Actividad inductora de la formación de osteoclastos de Trx-OBM y OBM de forma secretada

Se suspendieron células de bazo de ratón en α -MEM que contenía 10^{-8} M de vitamina D₃ de forma activa, 10^{-7}
 30 M de dexametasona, y 10% de suero de bovino fetal a una concentración de 2×10^6 /ml. La suspensión se añadió a una placa de 24 pocillos en la cantidad de 350 μ l por pocillo. Cada pocillo se cargó luego con 350 μ l de una solución preparada por dilución de Trx-OBM purificado con el medio de cultivo arriba mencionado (40 ng/ml), 350 μ l de solución preparada por dilución a un volumen 10 veces mayor de medio acondicionado que se produjo por cultivo de células 293-EBNA, en las cuales se transfectaron pCEP sOBM o pCEP4, en IMDM-10% FCS, con el medio de cultivo
 35 arriba mencionado, o 350 μ l solamente del medio de cultivo arriba mencionado. El PCF Millicell (Millipore Co.) se ajustó en cada pocillo, al que se añadieron 600 μ l de células ST2 que se suspendieron en el medio de cultivo arriba mencionado (4×10^4 /ml). Después de cultivar durante 6 días, se retiró el PCF Millicell. La placa se lavó una sola vez con PBS y las células se fijaron con solución acetona-etanol (50:50) durante un minuto. A continuación, las células que exhibían la actividad de fosfatasa ácida resistente al ácido tartárico (actividad TRAP) se tiñeron selectivamente
 40 utilizando el kit LEUKOCYTE ACID PHOSPHATASE (Sigma Co.). El resultado de la observación al microscopio reveló que no se detectaba célula alguna que exhibiera la actividad TRAP en los pocillos a los que no se añadió Trx-OBM, mientras que se observaron 106 ± 21 (valor medio \pm desviación estándar, $n = 3$) células TRAP-positivas en los pocillos a los cuales se añadió Trx-OBM. Análogamente, si bien no se detectó célula alguna que exhibiera actividad TRAP en los pocillos a los que se había añadido medio acondicionado de 293-EBNA transfectado con pCEP4, se
 45 observaron 120 ± 31 (valor medio \pm desviación estándar, $n = 3$) de células TRAP-positivas en los pocillos a los cuales se había añadido medio acondicionado de 293-EBNA transfectadas con pCEPsOBM. Se confirmó también, adicionalmente, que la calcitonina se fijaba a estas células TRAP-positivas. Estos resultados han demostrado que Trx-OBM y la forma secretada OBM exhiben actividad inductora de la formación de osteoclastos.

Ejemplo 18

*Identidad de la proteína OBM expresada por cDNA y la proteína de fijación de OCIF de tipo natural**(1) Preparación del anticuerpo policlonal de conejo anti-OBM*

55 Se inmunizaron 3 conejos blancos japoneses (peso: 2,5-3,0 kg, suministrados por Kitayama Labes Co.) con la OBM purificada (proteína de fusión tiorredoxina-OBM) producida de acuerdo con el método de los Ejemplos 14 (6) y 14 (7) por inyección subcutánea de 1 ml/dosis de la emulsión preparada por mezcla de 200 μ g/ml de la OBM purificada con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (Difco Co.), 6 veces, una vez a la semana. Diez
 60 días después de la última inmunización se sangraron los conejos. El anticuerpo se purificó a partir del suero como sigue. Se añadió sulfato de amonio al antisuero que se diluyó al doble con PBS hasta una concentración final de 40% (p/v %). Después de dejar en reposo durante una hora a 4°C, la mezcla se centrifugó durante 20 minutos a 8000 x g para obtener un precipitado. El precipitado se disolvió en una pequeña cantidad de PBS, se dializó contra PBS a 4°C, y se cargó a una columna de Proteína G-Sepharose (fabricada por Pharmacia Co.). Después de lavar con PBS, se eluyó
 65 la inmunoglobulina G adsorbida con solución tampón de glicina-HCl 0,1 M (pH 3,0). El material eluido se neutralizó inmediatamente con tampón Tris-HCl 1,5 M (pH 8,7). Después de dializar las fracciones de proteínas eluidas contra PBS, se midió la absorbancia a 280 nm para determinar la concentración de proteína ($E^{1\%}_{1\text{cm}}$ 13,5). Se preparó anticuerpo anti-OBM marcado con peroxidasa de rábano picante utilizando un kit de peroxidasa activada con maleimida (Pierce

ES 2 263 204 T3

Co.) como sigue. Se añadieron 80 μg de ácido N-succinimida-S-acetil-tioacético a 1 mg del anticuerpo purificado y se dejó reaccionar a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 5 mg de hidroxilamina a la mezcla resultante para desacetilar el anticuerpo. El anticuerpo modificado se fraccionó utilizando una columna de desalado de poliacrilamida. Las fracciones de proteína se mezclaron con 1 mg de peroxidasa activada con maleimida y se dejaron reaccionar durante una hora a la temperatura ambiente para obtener el anticuerpo marcado con enzima.

(2) *Capacidad del anticuerpo policlonal de conejo anti-OBM para inhibir la fijación específica de la proteína (OBM) expresada por cDNA o por la proteína de tipo natural con OCIF*

La OBM (proteína fusionada tiorredoxina-OBM) purificada obtenida de acuerdo con el método descrito en los Ejemplos 15 (6) y 15 (7) y la proteína de fijación de OCIF purificada de tipo natural del Ejemplo 2 (4) se disolvieron respectivamente en tampón de carbonato de sodio 0,1 M a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se añadió una parte alícuota de cada solución (100 μl) por pocillo respectivamente a una inmunoplaaca de 96 pocillos (fabricada por Nunc Co.). La placa se dejó en reposo durante una noche a 4°C. Se añadieron 200 μl de Block Ace al 50% a cada pocillo y la placa se dejó en reposo a la temperatura ambiente durante una hora. Después de lavar cada pocillo 3 veces con PBS que contenía 0,1% de Polisorbato 20 (P20-PBS), se añadieron a cada pocillo 100 μl de solución de anticuerpo de conejo anti-OBM que se disolvió en Block-Ace al 25% preparada con P20-PBS hasta una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o 100 μl de Block-Ace al 25% (que no contenía anticuerpo alguno), seguido por incubación a 37°C durante una hora. Se lavó cada pocillo 3 veces con P20-PBS y se cargó con 100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ de una solución de ensayo de fijación (P20-PBS que contenía 0,2% de seroalbúmina de ternero, Hepes 20 mM, y 0,1 mg/ml de heparina) a lo que se añadieron 20 ng/ml de OCIF marcado con ^{125}I descrito en el Ejemplo 8 (3). Alternativamente, se cargó cada pocillo con 100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ de otra solución de ensayo de fijación que contenía 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de OCIF sin marcar además de 20 ng/ml de OCIF marcado con ^{125}I . Después de incubar estas inmunoplaacas a 37°C durante una hora, se lavaron los pocillos 6 veces con P20-PBS. La cantidad de ^{125}I en cada pocillo se midió por medio de un contador gamma. Los resultados se muestran en la Figura 17. Como se muestra en la figura, tanto la OBM purificada expresada utilizando cDNA como la proteína de tipo natural que se fija específicamente, no se fijan en absoluto al OCIF marcado con ^{125}I , cuando se trataron las mismas con el anticuerpo policlonal de conejo anti-OBM, mientras que ambas proteínas se fijaban a OCIF marcado con ^{125}I cuando no se habían tratado previamente con el anticuerpo. La fijación de ambas proteínas a OCIF marcado con ^{125}I se confirmó que era claramente específica, dado que dichas fijaciones son inhibidas significativamente por la adición de una concentración 400 veces mayor de OCIF sin marcar (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Sobre la base de los resultados arriba descritos, el anticuerpo policlonal de conejo anti-OBM reconoce tanto la OBM que es la proteína expresada utilizando cDNA como la proteína de fijación de OCIF de tipo natural, e inhibe la fijación específica de estas proteínas con OCIF.

Ejemplo 19

Clonación de cDNA de OBM humana

(1) *Preparación del iniciador de OBM de ratón*

Los iniciadores de OBM de ratón preparados de acuerdo con el método de los Ejemplos (OBM#3 y OBM#8) arriba descritos, se utilizaron para escrutinio de cDNA de OBM humana. Las secuencias se muestran en la Tabla de Secuencias, secuencias ID No. 9 y No. 6, respectivamente.

(2) *Aislamiento del un fragmento de cDNA de OBM humana por PCR*

Se obtuvieron por PCR fragmentos de cDNA de OBM humana utilizando los iniciadores de cDNA de OBM de ratón preparados en (1) arriba y cDNA preparado de Human Lymph Node Marathon (Clontech Co.) como molde. Las condiciones para PCR fueron como se indica a continuación:

50	Tampón 10 x EX Taq (Takara Shuzo Co.)	2 μl
	dNTP 2,5 mM	1,6 μl
	Solución de cDNA	1 μl
	EX Taq (Takara Shuzo Co.)	0,2 μl
55	Agua destilada	14,8 μl
	Iniciador OBM#3 40 μM	0,2 μl
	Iniciador OBM#8 40 μM	0,2 μl

Estas soluciones se mezclaron en un tubo de microcentrífuga y se pre-incubaron a 95°C durante 2 minutos, seguido por 40 ciclos de una reacción en tres etapas constituida por reacciones a 95°C durante 30 segundos, a 57°C durante 30 segundos, y a 72°C durante 2,5 minutos. Después de la reacción, la solución se incubó durante 5 minutos a 72°C y una porción de la solución se sometió a electroforesis en un gel de agarosa. Se detectó un fragmento de DNA (de aproximadamente 690 pb) amplificado por los iniciadores de cDNA de OBM de ratón arriba descritos.

65

ES 2 263 204 T3

(3) Purificación del fragmento de cDNA de OBM humana amplificado por PCR y determinación de la secuencia de nucleótidos

El fragmento de cDNA de OBM humana obtenido en el Ejemplo 19 (2) se separó por electroforesis sobre un gel de agarosa y se purificó ulteriormente utilizando un kit de extracción con gel QIAEX (Qiagen Co.). Se realizó de nuevo la PCR utilizando el fragmento de cDNA de OBM humana purificada como molde y los iniciadores de cDNA de OBM de ratón arriba descritos, para producir una gran cantidad del fragmento de cDNA de OBM humana. El fragmento de DNA se purificó por medio de un kit de extracción con gel QIAEX de la misma manera que anteriormente. La secuencia de nucleótidos del fragmento de cDNA de OBM humana purificada se determinó utilizando el kit Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing FS (Perkin Elmer Co.) utilizando OBM#3 o OBM#8 (Secuencia ID No. 9 y No. 6 respectivamente) como iniciador. Cuando se comparó con la secuencia del área correspondiente del cDNA de OBM de ratón, la secuencia de nucleótidos del fragmento de cDNA de OBM humana exhibía 80,7% de homología con la del cDNA de OBM de ratón.

(4) Escrutinio de un cDNA de OBM humana de longitud total por hibridación utilizando el fragmento de cDNA de OBM humana (aproximadamente 690 pb) como sonda

Se escrutó un cDNA de OBM humana de longitud total utilizando el fragmento de cDNA de OBM humana (aproximadamente 690 pb) que se purificó en el Ejemplo 19 (3) y se marcó con [α - 32 P] dCTP utilizando un kit de Marcación de DNA Megaprime (Amersham Co.). Se escrutó la genoteca de cDNA Lymph Node 5'-STRETCH PLUS humana (Clontech Co., EE.UU.) utilizando la sonda de DNA. De acuerdo con el protocolo del fabricante, se infectó *Escherichia coli* C600 Hfl con el fago recombinante durante 15 minutos a 37°C. El *Escherichia coli* infectado se añadió a un agar LB (1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 1% NaCl, 0,7% agar) que se calentó a 45°C. El agar LB se vertió sobre una placa de agar LB que contenía 1,5% de agar. Después de incubación durante una noche a 37°C, se puso Hy-Bond-NTM (Amersham Co.) en la placa sobre la cual se produjeron calvas y se guardaron durante aproximadamente 3 minutos. De acuerdo con un método convencional, se trató el filtro con solución alcalina, se neutralizó, y se sumergió en solución 2xSSC. Se inmovilizó luego DNA sobre el filtro utilizando el UV CROSSLINKER (Stratagene Co.). El filtro resultante se sumergió en tampón Rapid-hyb (Amersham Co.). Después de pretratamiento durante 15 minutos a 65°C, se puso el filtro en tampón Rapid-hyb que contenía el fragmento de cDNA de OBM humana desnaturalizado por calentamiento (aproximadamente 690 pb, 5 x 10⁵ cpm/ml) arriba descrito. Después de hibridación durante una noche a 65°C, se lavó el filtro con 2x SSC, 1x SSC, y 0,1x SSC, cada uno de los cuales contenía 0,1% de SDS, en este orden, respectivamente, durante 15 minutos a 65°C. Varios clones positivos obtenidos se purificaron ulteriormente por repetición del escrutinio 2 veces. Un clon que poseía una inserción (aproximadamente 2,2 kb) se seleccionó de los clones purificados y se utilizó en los experimentos siguientes. Este fago purificado se designó lhOBM. Aproximadamente 10 μ g de DNA se obtuvieron a partir del lhOBM purificado utilizando un kit QIAGEN Lambda (Qiagen Co.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El DNA se digirió con la enzima de restricción Sall y se sometió a electroforesis sobre un gel de agarosa para separar el cDNA de la inserción de hOBM (aproximadamente 2,2 kb). Este fragmento de DNA purificado utilizando el kit de extracción con gel QIAEX (Qiagen Co.) se digirió con la enzima de restricción Sall y se insertó en el plásmido pUC19 (MBI Co.) que se digirió previamente con una enzima de restricción Sall y se desfosforiló, utilizando un kit de ligación de DNA ver.2 (Takara Shuzo Co.). Se transformó *Escherichia coli* DH 5 α (Gibco BRL Co.) con el pUC19 que contenía el fragmento de DNA resultante. El transformante resultante se designó pUC19hOBM. El transformante se dejó crecer y se insertó pUC19hOBM en el cual se insertó el cDNA de OBM humana (aproximadamente 2,2 kb) y se purificó por un método convencional.

(5) Determinación de la secuencia de nucleótidos de cDNA codificante de la secuencia de aminoácidos entera de OBM humana

La secuencia de nucleótidos del cDNA de OBM humana resultante obtenido en el Ejemplo 19 (4) se determinó utilizando el kit Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing FS (Perkin Elmer Co.). Específicamente, la secuencia de nucleótidos del fragmento insertado se determinó utilizando como molde pUC19hOBM. Como iniciadores, se utilizaron iniciadores para la determinación de la secuencia de nucleótidos del DNA del fragmento insertado en pUC19hOBM, M13 Primer M3 y M13 Primer RV (fabricados por Takara Shuzo Co.) y un iniciador sintético, OBM#8 humano, diseñado sobre la base de la secuencia de nucleótidos del fragmento de cDNA de OBM humana (aproximadamente 690 pb).

Las secuencias de nucleótidos de los iniciadores usados, M13 Primer M3 y M13 Primer RV, se muestran respectivamente como la Secuencia ID No. 4 y No. 5. La secuencia de aminoácidos de OBM humana deducida de la secuencia de nucleótidos de cDNA de OBM humana se muestra en la Tabla de Secuencias como Secuencia ID No. 11. La secuencia de nucleótidos de cDNA de OBM humana se muestra como Secuencia ID No. 12.

El *Escherichia coli* que fue transformado por el pUC19hOBM, que es el plásmido que contiene el cDNA de OBM humana resultante, fue depositado en National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Human Technology, en fecha 13 de Agosto de 1997 como No. de depósito FER M BP-6058.

ES 2 263 204 T3

Ejemplo 20

Radioyodación de OCIF con ¹²⁵I y análisis cuantitativo de OCIF marcado con ¹²⁵I por ELISA

5 Se marcó OCIF con ¹²⁵I utilizando el método IODO-GEN.

Se transfirieron 20 μ l de solución IODO-GEN-cloroformo de concentración 2,5 mg/ml a un tubo Eppendorf de 5 ml y se evaporó el cloroformo a 40°C, proporcionando de este modo un tubo recubierto con IODO-GEN. El tubo se lavó 3 veces con 400 μ l de solución tampón de fosfato de sodio 0,5 M (Na-Pi, pH 7,0), seguido por la adición de 5 μ l de Na-Pi 0,5 M (pH 7,0). Se añadieron a este tubo 1,3 μ l (18,5 MBq) de solución de Na-¹²⁵I (Amersham Co., NEZ-0,33 H), seguido inmediatamente por la adición de 10 μ l de solución OCIF de 1 mg/ml (tipo monómero o tipo dímero). La mixtura se mezcló en un mezclador vorticial y se dejó en reposo a la temperatura ambiente durante 30 segundos. Esta solución se transfirió a un tubo al que se añadieron previamente 80 μ l de Na-Pi 0,5 M (pH 7,0) que contenía 10 mg/ml de yoduro de potasio y 5 μ l de una solución salina tamponada con fosfato que contenía 5% de seroalbúmina bovina (BSA-PBS). La solución se mezcló, se aplicó a una columna rotatoria (1 ml, G25 Sephadex Fine, fabricada por Pharmacia Co.) que se equilibró previamente con BSA-PBS, y se centrifugó durante 5 minutos a 2000 rpm. Se añadieron 400 μ l de BSA-PBS a las fracciones eluidas de la columna. Después de mezclar, se utilizaron 2 μ l de la solución para medir la radiactividad por medio de un contador gamma. La pureza radioquímica de la solución de OCIF marcada con ¹²⁵I arriba obtenida se midió por recuento de la radiactividad de las fracciones precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) al 10%.

La actividad biológica del OCIF marcado con ¹²⁵I se midió de acuerdo con el método descrito en el documento WO96/26217. La concentración del OCIF marcado con ¹²⁵I se midió utilizando el método ELISA como sigue. Específicamente, NaHCO₃ 50 mM (pH 9,6) en el cual se disolvió el anticuerpo policlonal de conejo anti-OCIF descrito en el documento WO96/26217 hasta una concentración de 2 μ g/ml se añadieron a cada pocillo de una inmunoplaaca de 96 pocillos (MaxiSorp™, fabricada por Nunc Co.) en la cantidad de 100 μ l por pocillo. Después de dejar estos pocillos en reposo durante una noche a 4°C, se retiró la solución. Se cargaron luego los pocillos con una solución acuosa mixta de Block Ace™ (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) y una solución salina tamponada con fosfato (25:75) (B-PBS) en la cantidad de 200 μ l/pocillo. La placa se dejó en reposo luego durante 2 horas a la temperatura ambiente. Después de retirar la solución, los pocillos se lavaron 3 veces con una solución salina tamponada con fosfato que contenía 0,01% de Polisorbato 80 (P-PBS). A continuación, se añadió B-PBS que contenía una muestra de OCIF marcado con ¹²⁵I u OCIF estándar, en la cantidad de 100 μ l/pocillo. La placa se dejó luego en reposo durante 2 horas a la temperatura ambiente. Después de retirar la solución, se lavó cada pocillo 6 veces con 200 μ l de P-PBS. Se añadió una solución preparada por dilución con B-PBS del anticuerpo policlonal de conejo anti-OCIF marcado con peroxidasa en la cantidad de 100 μ l/pocillo. La placa se dejó en reposo durante 2 horas a la temperatura ambiente. Después de retirar la solución, los pocillos se lavaron 6 veces con 200 μ l de P-PBS. A continuación, se añadió una solución de TMB (TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scytek Co.) en la cantidad de 100 μ l/pocillo. Después de dejar en reposo a la temperatura ambiente durante 2-3 minutos, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de una solución de terminación (Stopping Reagent, Scytek Co.). Se midió la absorbancia de cada pocillo a 450 nm utilizando un lector de microplacas. La concentración de OCIF marcado con ¹²⁵I se determinó con una curva de calibración preparada utilizando el OCIF estándar.

Ejemplo 21

Expresión de la proteína de fijación de OCIF codificada por cDNA

45 (1) *Construcción del vector de expresión hOBM para células animales*

Se digirió pUChOBM con la enzima de restricción Sall y un fragmento de DNA (aproximadamente 2,2 kb) se purificaron por electroforesis sobre un gel de agarosa al 1%. Los extremos de los fragmentos de DNA se hicieron romos utilizando un kit de producción de extremos romos en DNA (Takara Shuzo Co.) (Fragmento hOBMcDNA con extremos romos). El plásmido de expresión pcDL-SR α 296 (Molecular and Cellular Biology, Vol. 8, pp 466-472 (1988)) se digirió con la enzima de restricción EcoRI, se hizo romo con un kit de producción de extremos romos y se ligó con el fragmento de cDNA de hOBM de extremos romos utilizando el kit de ligación de DNA ver.2. Se transformó *Escherichia coli* DH α con la reacción de ligación. Un plásmido en el transformante resultante resistente a ampicilina se sometió a digestión con enzima de restricción para analizar el mapa de restricción de DNA y determinar la secuencia de DNA. Como resultado, se seleccionó una cepa que tenía un plásmido en el cual está insertado cDNA de hOBM en la misma dirección de transcripción que la del promotor SR α . La cepa del microorganismo se designó DH5 α /phOBM.

60 (2) *Expresión de OBM humana en células COS-7*

Se cultivó *Escherichia coli* DH5 α /phOBM y el plásmido phOBM se purificó utilizando el kit Qiafilter Plasmid Midi (Qiagen Co.). Se transfectó phOBM utilizando Lipofectamina en células COS-7 en los pocillos de una placa de 6 pocillos y se cultivó durante 2 días en DMEM que contenía 10% de suero de bovino fetal. El medio de cultivo se reemplazó con DMEM exento de cisteína y metionina (fabricado por Dainippon Seiyaku Co., Ltd.) a lo que se añadió 5% de suero de bovino fetal dializado (88 μ l/pocillo). Las células se incubaron durante 15 minutos, seguidos por la adición de 14 μ l de Express Protein Labeling Mix (NEN Co., 10 mCi/ml). Después de 4 horas de incubación, se añadieron a cada pocillo 200 μ l de DMEM que contenía 10% de suero de bovino fetal. Las células se cultivaron durante una hora y se lavaron dos veces con PBS. Se añadieron luego a cada pocillo 0,5 ml de un tampón de TSA (Tris-HCl 10

ES 2 263 204 T3

mM que contenía NaCl 0,14 M y 0,025% de NaN_3 , pH 8,0) que contenía 1% de Triton X-100, 1% de hemoglobina de bovino, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina, 0,2 TIU/ml de aprotinina, y PMSF 1 mM, y las mezclas se dejaron en reposo durante una hora en hielo. Se mezclaron las células por pipeteado y se centrifugaron a 3000 x g, durante 10 minutos a 4°C, para obtener sobrenadantes. Se añadieron 200 μl de un tampón de dilución (tampón TSA que contenía 0,1% de Triton X-100, 0,1% de hemoglobina de bovino, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina, 0,2 TIU/ml de proteína, y PMFS 1 mM) a 100 μl del sobrenadante de cada pocillo. Las mezclas resultantes se agitaron a 4°C durante una hora junto con Proteína A Sepharose (50 μl) y se centrifugaron a 1500 x g durante 1 minuto a 4°C, para recoger sobrenadantes, eliminando con ello la proteína que no adsorbía específicamente Proteína A Sepharose. Se añadió OCIF (1 μg) a los sobrenadantes y las mezclas se agitaron durante 1 hora a 4°C para fijar OBM humana y OCIF. A continuación, se añadió anticuerpo policlonal de conejo anti-OCIF (50 μg), seguido por agitación a 4°C durante una hora. Se añadió Proteína A Sepharose (10 μl) a la solución resultante, seguido por agitación a 4°C durante una hora más. Las mezclas así obtenidas se centrifugaron durante 1 minuto a 1500 x g a 4°C para recoger precipitados. Los precipitados se lavaron dos veces con un tampón de dilución, dos veces con tampón de dilución exento de hemoglobina de bovino, una sola vez con tampón TSA, y una sola vez con Tris-HCl 50 mM (pH 6,5). Después de la adición de tampón SDS que contenía 10% de β -mercaptoetanol (Tris-HCl 0,125 M, 4% de dodecilsulfato de sodio, 20% de glicerol, 0,002% de Azul de Bromofenol, pH 6,8), la mezcla se calentó durante 5 minutos a 100°C y se sometió a SDS-PAGE (gel de poli(acrilamida al 12,5%, Daiichi Pure Chemical Co.). El gel se fijó y se secó de acuerdo con un método convencional. Después de mejorar las señales de isótopos utilizando Amplify™ (Amersham Co.), el gel secado se sometió a autorradiografía a -80°C utilizando película Bio Max MR (Kodak Co.). Los resultados se presentan en la Figura 18, que muestra que el peso molecular de la proteína codificada por cDNA es aproximadamente 40.000.

Ejemplo 22

Fijación de la proteína de fijación de OCIF codificada por cDNA y OCIF

PhOBM, que se purificó de la misma manera que en el Ejemplo 21 (2), se transfectó a células COS-7 en cada pocillo de una placa de 24 pocillos utilizando Lipofectamina. Después de ser cultivadas durante 2 a 3 días, las células se lavaron con DMEM exento de suero. Se añadieron a los pocillos 200 μl de un medio de cultivo para un medio de ensayo de fijación (DMEM exento de suero al que se añadieron 0,2% de seroalbúmina bovina, solución tampón Hepes 20 mM, 0,1 mg/ml de heparina y 0,2% NaN_3) que contenía 20 ng/ml de OCIF marcado con ^{125}I . Se añadieron a los otros pocillos 200 μl de medio de cultivo para el medio de ensayo de fijación que contenía 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de OCIF sin marcar además de 20 ng/ml de OCIF marcado con ^{125}I . Después de incubación durante una hora a 37°C en una incubadora de CO_2 (5% CO_2), las células se lavaron dos veces con 500 μl de una solución salina tamponada con fosfato que contenía 0,1 mg/ml de heparina. Se añadieron luego a cada pocillo 500 μl de solución 0,1 N de NaOH y la placa se dejó en reposo durante 10 minutos a la temperatura ambiente para disolver las células. Se midió la radiactividad de ^{125}I en los pocillos por medio de un contador gamma. Como resultado, como se muestra en la Figura 19, se confirmó que el OCIF marcado con ^{125}I se fija únicamente a las células transfectadas con phOBM. Además, la fijación era inhibida significativamente por adición de un exceso de 400 veces de OCIF sin marcar (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Basándose en los resultados arriba descritos, se confirmó que la proteína OBM humana codificada por el cDNA en el phOBM se fija específicamente a OCIF en la superficie de las células COS-7.

Ejemplo 23

Reticulación de OCIF marcado con ^{125}I y la proteína de fijación de OCIF codificada por cDNA

Se llevó a cabo la reticulación de OCIF de tipo monómero marcado con ^{125}I y la proteína de fijación de OCIF codificada por cDNA para investigar ulteriormente las características de la proteína de fijación de OCIF codificada por cDNA. Después de la construcción del vector de expresión phOBM y la transfección en células COS-7 de acuerdo con el método utilizado en los Ejemplos 21 (1) y 21 (2), se añadieron 200 μl de medio de ensayo de fijación que contenía OCIF marcado con ^{125}I (25 ng/ml) arriba descrito. El medio del ensayo de fijación al que se añadió OCIF sin marcar a una concentración 400 veces mayor además de OCIF marcado con ^{125}I se utilizó para los otros pocillos. Después de cultivo durante una hora a 37°C en una incubadora de CO_2 (5% CO_2), se lavaron las células dos veces con 500 μl de solución salina tamponada con fosfato que contenía 0,1 mg/ml de heparina. Se añadieron a las células 500 μl de solución salina tamponada con fosfato en la cual se disolvieron 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de un agente de reticulación (DSS: suberato de disuccinimidilo, fabricado por Pierce Co.), seguido por incubación durante 10 minutos a 0°C. Las células contenidas en estos pocillos se lavaron dos veces con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato enfriada en hielo. Después de una adición de 100 μl de solución tampón Hepes 20 mM que contenía 1% de Triton X-100 (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.), PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, Sigma Co.) 2 mM, pepstatina 10 μM (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.), leupeptina 10 μM (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.), antipain 10 μM (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.) y EDTA 2 mM (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.), se dejaron los pocillos en reposo durante 30 minutos a la temperatura ambiente para disolver las células. Estas muestras (partes alícuotas de 15 μl) se trataron con SDS en condiciones reductoras de acuerdo con un método convencional y se sometieron a SDS-electroforesis utilizando un gel en gradiente de poli(acrilamida 4-20% (Daiichi Pure Chemical Co., Ltd.). Después de la electroforesis, se secó el gel y se sometió a autorradiografía durante 24 horas a -80°C utilizando película BioMax MS (Kodak Co.) y un filtro de sensibilización BioMax MS (Kodak Co.). La película sometida a autorradiografía se reveló de acuerdo con un método convencional. Como resultado, se detectó una banda de un peso molecular comprendido en el intervalo de 90.000-110.000, representada en la Figura 20, por reticulación del OCIF de tipo monómero marcado con ^{125}I y la proteína de fijación de OCIF codificada por cDNA.

Ejemplo 24

*Expresión de OBM humana de forma secretada*5 (1) *Construcción del plásmido de expresión de OBM humana de forma secretada*

Se llevó a cabo una PCR utilizando OBM SF humana (Tabla de Secuencias, Secuencia ID No. 13) y OBM#8 de ratón (Tabla de Secuencias, Secuencia ID No. 6) como iniciadores y pUC19hOBM como molde. Después de purificación por electroforesis en un gel de agarosa, el producto se digirió con las enzimas de restricción SphI y HindIII, y se purificó ulteriormente por electroforesis en un gel de agarosa para obtener un fragmento purificado (0,27 kb). Se digirió parcialmente cDNA de OBM humana con la enzima de restricción DraI y los fragmentos de DNA digeridos con DraI en un sitio se purificaron por electroforesis sobre un gel de agarosa. El fragmento purificado se digirió ulteriormente con la enzima de restricción HindIII. El fragmento DraI/HindIII de 0,53 kb se purificó por electroforesis sobre un gel de agarosa. El fragmento purificado se ligó con el fragmento SphI/HindIII de 0,27 kb derivado de la PCR arriba descrita utilizando el kit de ligación ver.2 (Takara Shuzo Co.) junto con el fragmento HindIII/EcoRI (5,2 kb) de pSec TagA (Invitrogen Co.). se transformó *Escherichia coli* DH5 α utilizando el producto de reacción. Los plásmidos se purificaron por el método álcali-SDS a partir de los transformantes resultantes resistentes a ampicilina y se digirieron con enzimas de restricción para seleccionar un plásmido que contenía fragmentos de 0,27 kb y 0,53 kb como inserciones en pSec TagA. Se confirmó que este plásmido tenía una secuencia que codificaba la OBM humana secretada por secuenciación utilizando el kit FS Tag de secuenciación de ciclo dides-oxi-terminador (Perkin Elmer Co.). El plásmido se digirió con las enzimas de restricción NheI y XhoI para preparar un fragmento (0,8 kb) correspondiente al cDNA de OBM humana secretada por electroforesis en un gel de agarosa. Este fragmento se insertó en el fragmento NheI y XhoI (10,4 kb) de un vector de expresión pCEP4 (Invitrogen Co.) utilizando el kit de ligación y se transformó *Escherichia coli* DH5 α utilizando el producto de reacción. Los plásmidos se purificaron por el método de álcali-SDS a partir de los transformantes resultantes resistentes a ampicilina y se digirieron con enzimas de restricción para seleccionar un *Escherichia coli* que tenía el plásmido de expresión para la OBM humana de forma secretada (pCEPshOBM). El *Escherichia coli* que contenía el pCEPshOBM se cultivó y se purificó pCEPshOBM utilizando el kit Qiafilter Plasmid Midi (Qiagen Co.).

30 (2) *Expresión de OBM de forma secretada*

Se suspendieron células 293-EBNA en IMDM que contenía 10% de FCS (IMDM-10% FCS), se añadieron a una placa de 24 pocillos recubierta con colágeno (fabricada por Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) en una densidad de células de $2 \times 10^5/2$ ml/pocillo y se cultivaron durante una noche. Se transfectaron las células con 1 μ g de pCEPshOBM o pCEP4 utilizando 4 μ l de Lipofectamina (Gibco Co.). Después de cultivo durante dos días en 0,5 ml de un IMDM exento de suero o IMDM-10% FCS, se recogieron los sobrenadantes de cultivo. La expresión de la OBM humana secretada en el sobrenadante del cultivo se detectó como sigue. Se añadió bicarbonato de sodio a los sobrenadantes de cultivo hasta una concentración final de 0,1 M y se añadieron las mezclas a una placa de 96 pocillos. La placa se dejó en reposo durante una noche a 4°C, con lo cual se inmovilizó la OBM humana en los sobrenadantes de cultivo sobre la placa de 96 pocillos. La placa se bloqueó utilizando solución Block Ace™ (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) diluida al cuádruplo con PBS (B-PBS) y se dejó en reposo durante dos horas a la temperatura ambiente. Después de añadir a cada pocillo 3-100 ng/ml de OCIF que se diluyó con B-PBS, se dejó la placa en reposo durante dos horas a 37°C, seguido por lavado con PBS que contenía 0,05% de Polisorbato 20 (P-PBS). A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de un anticuerpo policlonal de conejo anti-OCIF marcado con peroxidasa, descrito en el documento WO96/26217 que se diluyó con B-PBS. Después de dejar en reposo durante dos horas a 37°C, se lavaron 6 veces los pocillos con P-PBS. Después de ello, se añadió solución de TMB (TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scytek Co.) en la cantidad de 100 μ l por pocillo, y la mezcla se dejó en reposo a la temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos. La reacción se terminó por la adición de 100 μ l de solución de terminación (Stopping Reagent, Scytek Co.) a cada pocillo. Se midió la absorbancia a 450 nm para cada pocillo por medio de un lector de microplacas. Los resultados se muestran en la Figura 1, que indica que la absorbancia a 450 nm aumentaba de acuerdo con la concentración del OCIF añadido en la placa en la que estaba inmovilizado el medio acondicionado de las células transfectadas con pCEPshOBM. Por el contrario, no se observó aumento alguno en absorbancia en los pocillos en los cuales estaba inmovilizado el medio acondicionado de las células transfectadas con el vector pCEP4. La Figura 22 presenta los resultados de un experimento en el cual la proporción del medio acondicionado utilizado para inmovilización se cambió dentro de un intervalo de 5-90% en presencia de una concentración constante de OCIF (50 ng/ml). La absorbancia a 450 nm aumentaba de acuerdo con el aumento en la proporción del medio acondicionado en la placa en la cual estaba inmovilizado el medio acondicionado de las células transfectadas con pCEPshOBM, mientras que no se observó aumento alguno de este tipo en absorbancia en la placa en la cual estaba inmovilizado el medio acondicionado de las células transfectadas con el vector pCEP4. Por estos resultados, se confirmó que la OBM humana de forma secretada se produce en el medio acondicionado de las células transfectadas con pCBPshOBM.

65

Ejemplo 25

*Expresión de la proteína de fusión tiorredoxina-OBM humana (Trx-hOBM)*5 (1) *Construcción de un vector de expresión de la proteína de fusión tiorredoxina-OBM humana (Trx-hOBM)*

Se mezclaron 10 μ l de tampón 10X ExTaq (Takara Shuzo Co.), 8 μ l de dNTP 10 mM (Takara Shuzo Co.) 77,5 μ l de agua destilada esterilizada, 2 μ l de una solución acuosa de pUC19hOBM (10 ng/ μ l), 1 μ l de iniciador, OBM#3 de ratón (100 pmol/ μ l, Tabla de Secuencias, Secuencia ID No. 9), 1 μ l de iniciador, hOBM SalR2 (100 pmol/ μ l, Tabla de Secuencias, Secuencia ID No. 14) y 0,5 μ l de ExTaq (5 u/ μ l) (Takara Shuzo Co.) y se hicieron reaccionar (PCR) en un tubo de microcentrífuga. Después de la reacción a 95°C durante 5 minutos, a 50°C durante 1 segundo, a 55°C durante 1 minuto, a 74°C durante 1 segundo, y a 72°C durante 5 minutos, se repitió 25 veces un ciclo de reacción consistente en una reacción a 96°C durante 1 minuto, a 50°C durante 1 segundo, a 55°C durante 1 minuto, a 74°C durante 1 segundo, y a 72°C durante 3 minutos. A partir de la mezcla de reacción total se purificó un fragmento de DNA (750 pb). La cantidad total del fragmento de DNA purificado se digirió con las enzimas de restricción Sall (Takara Shuzo Co.) y BspHI (New England Biolabs Co.), y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% para obtener un fragmento de DNA purificado (Fragmento 1, aproximadamente 320 pb). El fragmento se disolvió en 20 μ l de agua destilada esterilizada. De la misma manera, un fragmento de DNA (Fragmento 2, aproximadamente 450 pb) obtenido por digestión de 4 μ g de pUC19hOBM con las enzimas de restricción BamHI, y BspHI (Takara Shuzo Co.) y un fragmento de DNA (Fragmento 3, aproximadamente 3,6 kb), obtenido por digestión de 2 μ g de pTrxFus (Invitrogen Co.) con las enzimas de restricción BamHI, y Sall (Takara Shuzo Co.) se purificaron respectivamente y se disolvieron en 20 μ l de agua destilada esterilizada. Se utilizó el kit de extracción de gel QIAEXII para purificación de los fragmentos de DNA. Los fragmentos 1-3 se ligaron por incubación a 16°C durante 2,5 horas utilizando el kit de ligación de DNA ver.2 (Takara Shuzo Co.). Utilizando la reacción de ligación, se transformó *Escherichia coli* GI724 (Invitrogen Co.) de acuerdo con el método descrito en el Instruction Manual of ThioFusion Expression System (Invitrogen Co.). Una cepa de microorganismo con plásmido en el cual el fragmento de cDNA hOBM está fusionado en marco con el gen de tiorredoxina se seleccionó a partir de los transformantes resultantes resistentes a ampicilina por análisis del mapa de restricción de DNA obtenido por digestión con enzima de restricción y por determinación de la secuencia de DNA. La cepa de microorganismo así obtenida se designó GI724/pTrxhOBM.

30

(2) *Expresión de Trx-hOBM en Escherichia coli*

GI724/pTrxhOBM y GI724 que contenía pTrxFus (GI724/pTrxFus) se cultivaron respectivamente 6 horas con agitación mediante sacudidas a 30°C en 2 ml de medio RMG-Amp (0,6% de Na₂HPO₄, 0,3% de KH₂PO₄, 0,05% de NaCl, 0,1% de NH₄Cl, 2% de casamino-ácido, 1% de glicerol, MgCl₂ 1 mM, 100 μ g/ml de ampicilina, pH 7,4). El caldo (0,5 ml) se añadió a 50 ml de medio Induction (0,6% Na₂HPO₄, 0,3% de KH₂PO₄, 0,05% de NaCl, 0,1% de NH₄Cl, 0,2% casamino-ácido, 0,5% glucosa, MgCl₂ 1 mM, 100 μ g/ml ampicilina, pH 7,4) y se cultivó con agitación mediante sacudidas a 30°C. Cuando la DO_{600 nm} alcanzó aproximadamente 0,5, se añadió L-triptófano a una concentración final de 0,1 mg/ml, seguido por cultivo con agitación mediante sacudidas a 30°C durante 6 horas adicionales. El caldo de cultivo se centrifugó a 3000 x g para recoger las células, las cuales se suspendieron luego en 12,5 ml de PBS. La suspensión se sometió a un generador de ultrasonidos (Ultrasonics Co.) para disgregar las células. Las células disgregadas se centrifugaron a 7000 x g durante 30 minutos para obtener un líquido sobrenadante como una fracción soluble de proteínas. Se sometieron 10 μ l de esta fracción soluble de proteínas a electroforesis en SDS-poliacrilamida (10%) en condiciones reductoras. Como resultado, como se muestra en la Figura 23, se encontró una banda con un peso molecular de 40.000 que no se detectaba en la fracción soluble de proteínas de GI724/pTrxFus en la fracción soluble de proteínas de GI724/pTrxhOBM. De acuerdo con ello, se confirmó que una proteína de fusión (Trx-hOBM) de tiorredoxina y OBM humana se expresaba en *Escherichia coli*.

45

(3) *Capacidad de fijación de Trx-hOBM a OCIF*

50

Se confirmó la fijación de la Trx-hOBM expresada a OCIF de acuerdo con el experimento siguiente. El anticuerpo anti-tiorredoxina (Invitrogen Co.) que se había diluido 5000 veces con solución 10 mM de hidrogenocarbonato de sodio se añadió a una inmunoplaaca de 96 pocillos (Nunc Co.) en la cantidad de 100 μ l por pocillo. Después de dejar en reposo durante una noche a 4°C, se desechó el líquido contenido en los pocillos. Se añadieron a cada pocillo 200 μ l de una solución preparada por dilución de Block Ace™ (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) al doble con PBS (BA-PBS). Después de dejar en reposo durante una hora a la temperatura ambiente, los pocillos se lavaron 3 veces con P-PBS. Las fracciones solubles de proteína procedentes del GI724/pTrxhOBM o de GI724/pTrxFus arriba descritos, eluidas cada una con BA-PBS en diversas concentraciones se añadieron a cada pocillo en la cantidad de 100 μ l. Después de dejar en reposo durante 2 horas a la temperatura ambiente, cada pocillo se lavó 3 veces con P-PBS y se cargó con 100 μ l de OCIF (100 ng/ml) que se diluyó con BA-PBS. Después de dejar en reposo durante 2 horas a la temperatura ambiente, se lavó cada pocillo 3 veces con P-PBS y se cargó con 100 μ l de anticuerpo anti-OCIF marcado con peroxidasa (descrito en el documento WO96/26217) que se diluyó 2000 veces con BA-PBS. Después de dejar en reposo durante 2 horas a la temperatura ambiente, cada pocillo se lavó 6 veces con P-PBS y se cargó con 100 μ l de solución de ¹²⁵I-B. Después de dejar en reposo durante aproximadamente 10 minutos a la temperatura ambiente, cada pocillo se cargó con 100 μ l de solución de terminación (Stopping Reagent). Se midió la absorbancia de cada pocillo a 450 nm por un lector de microplacas. Los resultados se muestran en la Figura 24. No había diferencia alguna en la absorbancia entre la muestra con la fracción soluble de proteínas originaria de GI724/pTrxFus añadida a ella y la muestra sin la adición de esta fracción soluble de proteínas. Por otra parte, la absorbancia aumentaba

65

ES 2 263 204 T3

en las muestras a las que se añadió la fracción soluble de proteínas originaria de GI724/pTrxhOBM en proporción a la concentración de la fracción soluble de proteínas. Los resultados del otro experimento en el cual la tasa de dilución de la fracción soluble de proteínas se mantuvo constante (1%) mientras se añadía OCIF diluida con PA-PBS en concentraciones diferentes (0-100 ng/ml) se muestran en la Figura 25. Puede verse que la absorbancia se mantenía
5 baja para cualesquiera concentraciones de OCIF en las muestras utilizando una fracción soluble de proteínas originaria de GI724/pTrxFus, mientras que la absorbancia aumentaba en proporción a la concentración de OCIF en las muestras a las que se añadió la fracción soluble de proteínas originaria de GI724/pTrxhOBM. Sobre la base de estos resultados, se confirmó que la Trx-hOBM que es producida por GI724/pTrxhOBM tiene capacidad de fijación para OCIF.

10 (4) Cultivo a gran escala de *Escherichia coli* que produce Trx-hOBM

Se extendieron células GI724/pTrxhOBM sobre agar RMG-Amp (0,6% Na₂HPO₄, 0,3% KH₂PO₄, 0,05% NaCl, 0,1% NH₄Cl, 2% casamino-ácido, 1,5 agar, pH 7,4) utilizando un asa de transferencia de platino. Las células se
15 cultivaron durante una noche a 30°C. Las células cultivadas se suspendieron en 10 ml de medio Induction. Se añadió la suspensión (5 ml a cada uno) a dos matraces Erlenmeyer de 2 l que contenían 500 ml de medio Induction y se cultivó a 30°C con agitación mediante sacudidas. Cuando la DO₆₀₀ alcanzó aproximadamente 0,5, se añadió L-triptófano a una concentración final de 0,1 mg/ml. Se continuó el cultivo con agitación mediante sacudidas durante 6 horas a 30°C. Se centrifugó el caldo de cultivo durante 20 minutos a 3000 x g para recoger las células, que se suspendieron en 160
20 ml de PBS. La suspensión se sometió a un generador de ultrasonidos (Ultrasonics Co.) para disgregar las células. El líquido sobrenadante se centrifugó durante 30 minutos a 7000 x g para obtener una fracción soluble de proteínas.

(5) Preparación de una columna de afinidad inmovilizada de OCIF

Se mezclaron 2 g de TSKgel AF-Tresyl Toyopal 650 (Tosoh Corp.) y 40 ml de tampón de fosfato de potasio 1,0 M
25 (pH 7,5) que contenía 35,0 mg de OCIF recombinante, que se preparó de acuerdo con el método descrito en el documento WO96/26217. La mezcla se agitó suavemente mediante sacudidas durante una noche a 4°C para efectuar una reacción de acoplamiento. La mezcla de reacción se centrifugó para separar el sobrenadante. Para desactivar el exceso de residuos activos, se añadieron 40 ml de tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 7,5) al vehículo precipitado y la mezcla se agitó suavemente mediante sacudidas a la temperatura ambiente durante una hora. El vehículo contenido en una columna se
30 lavó con tampón glicina-HCl 0,1 M (pH 3,3) que contenía 0,01% de Polisorbato 80 y NaCl 0,2 M y tampón de citrato de sodio 0,1 M (pH 2,0) que contenía 0,01% de Polisorbato 80 y NaCl 0,2 M. El vehículo contenido en la columna se equilibró por carga dos veces con tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 7,4) que contenía 0,01% de Polisorbato 80.

(6) Purificación de Trx-hOBM utilizando una columna de afinidad inmunizada con OCIF

A no ser que se indique otra cosa, la purificación de Trx-hOBM se llevó a cabo a 4°C. El vehículo de afinidad
35 inmunizado con OCIF arriba mencionado (10 ml) y la fracción soluble de proteínas (120 ml) preparada en el Ejemplo 25(4) se mezclaron. La mezcla se agitó suavemente mediante sacudidas a 4°C en 4 tubos de centrifuga de 50 ml utilizando un rotor. Una Econo-Columna™ (diámetro interno: 1,5 cm, longitud: 15 cm, fabricada por BioRad Co.) se llenó con el vehículo en la mezcla. La columna se cargó con 300 ml de PBS que contenía 0,01% de Polisorbato
40 80, 100 ml de tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 7,0) que contenía 0,01% de Polisorbato 80 y NaCl 2,0 M, y 100 ml de tampón glicina-HCl 0,1 M (pH 3,3) que contenía 0,01% de Polisorbato 80 y NaCl 0,2 M, en este orden. A continuación, las proteínas adsorbidas a la columna se eluyeron con tampón de citrato de sodio 0,1 M (pH 2,0) que contenía 0,01% de Polisorbato 80 y NaCl 0,2 M. El producto eluido se recogió en porciones de 5 ml. Cada fracción
45 así recogida se neutralizó inmediatamente con adición de 10% en volumen de solución tampón Tris 2 M (pH 8,0). La presencia o ausencia de Trx-hOBM en las fracciones eluidas se determinó de acuerdo con el método descrito previamente en el Ejemplo 25 (3) (la capacidad de fijación a OCIF). Las fracciones que contenían Trx-hOBM se recogieron y se purificaron ulteriormente.

50 (7) Purificación de Trx-hOBM por filtración sobre gel

Aproximadamente 25 ml de las fracciones Trx-hOBM obtenidas en el Ejemplo 25 (6) se concentraron a aproxima-
55 madamente 0,5 ml por centrifugación utilizando Centriplus 10 y Centricon 10 (Amicon Co.). Esta muestra se aplicó a una columna Superose 12 HR 10/30 (1,0 x 30 cm, Pharmacia Co.) equilibrada previamente con PBS que contenía 0,01% de Polisorbato 80. Para la separación, se utilizó PBS que contenía 0,01% de Polisorbato 80 como fase móvil a un caudal de 0,25 ml/min. El producto eluido originaria de la columna se recogió en porciones de 0,25 ml. La Trx-hOBM en las fracciones así recogidas se detectó por el mismo método que se ha descrito previamente en el Ejemplo 25 (3) y SDS-PAGE. Las fracciones que contenían Trx-hOBM purificada se recogieron y se determinó la concentración de proteína de Trx-hOBM. La medida de la concentración de proteína se llevó a cabo utilizando seroalbúmina bovina
60 como sustancia estándar utilizando el kit de ensayo DC-Protein (BioRad Co.).

Ejemplo 26

Actividad inductora de la formación de osteoclastos de hOBM

65 Se transfectaron respectivamente phOBM y pcDL-SR α 296 en células COS-7 utilizando Lipofectamina (Gibco Co.). Las células se cultivaron durante 1 día en DMEM que contenía 10% de FCS, se tripsinizaron, se extendieron sobre cubreobjetos (forma redonda de 15 mm, fabricados por Matsunami Co.) en placas de 24 pocillos a 5 x 10⁴ células

ES 2 263 204 T3

por pocillo, y se cultivaron durante 2 días. La placa de cultivo se lavó una sola vez con PBS. Las células se fijaron con PBS que contenía 1% de paraformaldehído a la temperatura ambiente durante 8 minutos. La placa a la que se habían unido las células fijadas se lavó 6 veces con PBS, y se añadieron luego a cada pocillo 700 μ l de células de bazo de ratón suspendidas a 1×10^6 /ml en α -MEM que contenía vitamina D₃ 10^{-8} M de forma activa, dexametasona 10^{-7} M, y 10% de suero de bovino fetal. Se adaptó Millicell PCF (Millipore Co.) en cada pocillo y se añadió una suspensión de células ST2 en el medio de cultivo arriba mencionado (4×10^4 /ml), 700 μ l por pocillo, en el Millicell PCF, seguido por incubación a 37°C durante 6 días. Después del cultivo, se retiró el Millicell PCF, se lavó la placa una sola vez con PBS, y se fijaron las células con solución acetona-etanol (50:50) durante un minuto. A continuación, las células que exhibían actividad de fosfatasa ácida resistente al ácido tartárico (TRAP), que es un marcador específico para los osteoclastos, se tiñeron selectivamente utilizando el kit LEUKOCYTE ACID PHOSPHATASE (Sigma Co.). Como resultado de la observación al microscopio, no se detectaban células TRAP-positivas en los pocillos en los que se habían fijado células COS-7 transfectadas con pcDL-SR α 296. En contraste, se observaron 65 ± 18 (valor medio \pm desviación estándar, $n = 3$) células TRAP-positivas en los pocillos en los que se fijaron células COS-7 transfectadas con pOBM. Además, se confirmó la expresión del receptor de calcitonina por el hecho de que la calcitonina de salmón marcada con ¹²⁵I (Amersham Co.) se fijaba específicamente a estas células TRAP-positivas. Basándose en estos descubrimientos, se ha demostrado que la OBM humana, que es la proteína de fijación de OCIF codificada por cDNA, tiene actividad inductora de la formación de osteoclastos.

Ejemplo 27

Actividad inductora de la formación de osteoclastos de Trx-hOBM y OBM humana de forma secretada

Se suspendieron células de bazo de ratón en un α -MEM que contenía vitamina D₃ 10^{-8} M de forma activa, dexametasona 10^{-7} M, y 10% de suero de bovino fetal a una concentración de 2×10^6 /ml. La suspensión se añadió a una placa de 24 pocillos en la cantidad de 350 μ l por pocillo. Cada pocillo se cargó luego con 350 μ l de una solución preparada por dilución de Trx-hOBM purificado con el medio de cultivo arriba mencionado (40 ng/ml), 350 μ l de solución preparada por dilución al decuplo de un medio acondicionado que se produjo cultivando células 293-EBNA, en el cual se transfectaron pCEPshOBM o pCEP4, en un medio de cultivo IMDM-10% FCS, con el medio de cultivo arriba mencionado, o 350 μ l solamente del medio de cultivo arriba mencionado. Se colocó en cada pocillo el Millicell PCF (Millipore Co.), al que se añadieron 600 μ l de células ST2 que se suspendieron en el medio de cultivo arriba mencionado (4×10^4 /ml). Después de cultivo durante 6 días, se retiró el Millicell PCF. La placa se lavó una sola vez con PBS y las células se fijaron con solución acetona-etanol (50:50) durante 1 minuto. A continuación, las células que exhibían la actividad de fosfatasa ácida resistente al ácido tartárico (actividad TRAP) se tiñeron selectivamente utilizando el kit LEUKOCYTE ACID PHOSPHATASE (Sigma Co.). Los resultados de la observación al microscopio revelaron que no se detectaba célula alguna que exhibiera la actividad TRAP de los pocillos a los que no se añadió Trx-hOBM, mientras que se observaron 115 ± 19 (valor medio \pm desviación estándar, $n = 3$) células TRAP-positivas en los pocillos a los que se añadió Trx-hOBM. Análogamente, si bien no se detectaron células que exhibieran actividad TRAP en los pocillos a los que se había añadido medio acondicionado de células 293-EBNA transfectadas con pCEP4, se observaron 125 ± 23 (valor medio \pm desviación estándar, $n = 3$) células TRAP-positivas en los pocillos a los que se había añadido medio acondicionado de células 293-EBNA transfectadas con pCEPshOBM. Además, la expresión del receptor de calcitonina se confirmó por el hecho de que la calcitonina de salmón marcada con ¹²⁵I (Amersham Co.) se fija específicamente a estas células TRAP-positivas. Estos resultados han demostrado que Trx-hOBM y hOBM de forma secretada exhiben actividad inductora de la formación de osteoclastos.

Ejemplo 28

Preparación de anticuerpo policlonal

Se preparó sOBM de ratón o sOBM humana utilizada como inmunógeno de acuerdo con el método descrito arriba. Específicamente, cDNA de sOBM de ratón (cDNA (Secuencia ID No. 18) que codificaba sOBM de ratón (Secuencia ID No. 16) que no tiene la región de fijación de membrana de la OBM de ratón debido a la ausencia de los aminoácidos del terminal N más abajo hasta el aminoácido 72-avo) o cDNA de sOBM humana (cDNA (Secuencia ID No. 19) que codifica sOBM humana (Secuencia ID No. 17) que no tiene la región de fijación de membrana de la OBM humana debido a la ausencia de los aminoácidos del terminal N más abajo hasta el aminoácido 71-avo) se ligó con un fragmento HindIII/EcoRV (5,2 kb) del vector de expresión spec TagA (Invitrogen Co.) incluyendo la secuencia de nucleótidos codificante de un péptido de señal de cadena κ de inmunoglobulina, junto con un fragmento EcoRI/PmaC1 (0,32 kb) de cDNA de OBM, utilizando un kit de ligación ver.2 (Takara Shuzo Co.). Se transformó *Escherichia coli* DH5 α con el producto de reacción. Los plásmidos obtenidos a partir de las cepas resultantes resistentes a la ampicilina se purificaron por el método álcali-SDS y se digirieron con una enzima de restricción para seleccionar un plásmido con fragmentos de 0,6 kb y 0,32 kb insertados en pSec TagA. La secuencia de este plásmido se identificó utilizando el kit Dydeoxyterminator Cycle Sequencing FS (Producto de Perkin Elmer Co.). Como resultado, se confirmó que este plásmido tiene una secuencia que codifica sOBM de ratón o humana. Después de digerir el plásmido con enzimas de restricción NheI/XhoI, un fragmento (1,0 kb) correspondiente al cDNA de OBM de forma de secreción se recuperó por electroforesis en gel de agarosa. Este fragmento se insertó en un fragmento NheI/XhoI (10,4 kb) del vector de expresión pCEP4 (Invitrogen Co.) utilizando un kit de ligación. Se transformó *Escherichia coli* DH5 α utilizando el producto de reacción. Se purificaron los plásmidos por el método álcali-SDS a partir de las cepas resistentes a ampicilina. Por el análisis de estos plásmidos por digestión con una enzima de restricción, se seleccionó *Escherichia coli* que poseía un plásmido de expresión de OBM de tipo secreción (pCEP sOBM) que tenía la estructura objetivo.

ES 2 263 204 T3

La cepa de *Escherichia coli* que tenía el pCEP sOBM se cultivó y se purificó pCEP sOBM utilizando un kit Qiafilter Plasmid Midi (Qiagen Co.). A continuación, se suspendieron células 293-EBNA en IMDM (IMDM-10% FCS) que contenía 10% FCS y se extendieron sobre una placa de 24 pocillos recubierta con colágeno (producto de Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) a una densidad de células de 2×10^5 células/2 ml/pocillo. Después de cultivar durante una noche, las células se transformaron con 1 μg de pCEP sOBM o pCEP4 utilizando 4 μl de Lipofectamina (Gibco Co.) y se cultivaron posteriormente durante dos días en 0,5 ml de IMDM exenta de suero o IMDM-10% FCS. Se recuperó el sobrenadante de cultivo. Se escrutó una línea de células con productividad alta de OBM soluble recombinante de ratón (msOBM) o OBM soluble humana (hsOBM) como sigue. Se añadió bicarbonato de sodio al sobrenadante del cultivo que se supone contiene msOBM o hsOBM a una concentración final de 0,1 M. Se añadieron 100 μl del sobrenadante de cultivo a cada pocillo en inmunoplasmas de 96 pocillos (Nunc Co.) y se dejaron en reposo durante una noche a 4°C, con lo cual la msOBM o hsOBM en el sobrenadante de cultivo se inmovilizó en cada pocillo. Se añadieron a cada pocillo 200 μl de solución Block Ace™ (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) diluida 4 veces con PBS (B-PBS) y las placas se dejaron en reposo durante 2 horas a la temperatura ambiente. Después de lavar cada pocillo 3 veces en las placas con PBS (P-PBS) que contenía 0,1% de Polisorbato 20, se añadieron a cada pocillo 100 μl de cada solución de OCIF recombinante (rOCIF) (3-100 ng/ml) diluido en serie con P-PBS. Las placas se dejaron en reposo durante 2 horas a 37°C. Después de lavar las placas 3 veces con PBS, se añadieron a cada pocillo 100 μl de un anticuerpo policlonal anti-OCIF marcado con peroxidasa (documento WO96/26217) diluido con B-PBS. Después de dejar en reposo durante 2 horas a 37°C, los pocillos se lavaron 6 veces con P-PBS. A continuación, se añadieron a cada pocillo de las placas 100 μl de solución TMB (TMB Soluble Reagent, High Sensitivity, Scytek Co.) y las placas se dejaron en reposo a la temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos, después de lo cual se terminó la reacción por adición de 100 μl de una solución de parada (Stopping Reagent, Scytek Co.) a cada pocillo. Se midió la absorbancia a 450 nm de cada pocillo utilizando un lector de microplacas. Se confirmó que la absorbancia aumentaba notablemente en proporción a la concentración de OCIF añadido en las placas en las cuales la msOBM o hsOBM contenida en el sobrenadante de cultivo de la línea de células productora de msOBM o hsOBM estaba inmovilizada.

La línea de células que exhibía una tasa elevada de aumento de absorbancia se seleccionó como cepa con productividad alta. Células 293-EBNA así relacionadas con productividad alta de msOBM o hsOBM se cultivaron en gran escala en un medio IMDM que contenía 5% de FCS, utilizando 25 matraces T (T-225). Después que las células alcanzaron la confluencia, se añadió un medio de cultivo reciente a cada matraz T-225 en la cantidad de 100 ml por matraz y se cultivaron las células durante 3-4 días, para recoger el sobrenadante de cultivo. Estos procedimientos se repitieron 4 veces para obtener 10 l del sobrenadante de cultivo que contenía msOBM o hsOBM. A partir del sobrenadante de cultivo se obtuvieron msOBM (10 mg) o hsOBM (12 mg) purificadas, que muestran una banda homogénea (peso molecular: 32 kDa) en la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, por medio de cromatografía de afinidad con una columna inmovilizada de OCIF y cromatografía de filtración sobre gel de acuerdo con el método descrito en los Ejemplos 25 (6) y 25 (7). Cada preparación purificada así obtenida se utilizó como antígeno para inmunización. Cada antígeno proteínico obtenido se disolvió en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se emulsionó con un volumen equivalente de adyuvante completo de Freund. Se inmunizó por vía subcutánea 1 ml de la emulsión a cada uno de 3 conejos blancos japoneses aproximadamente una vez cada semana. Se administró una inyección de refuerzo cuando el título de anticuerpos alcanzó un pico. Se recogió sangre entera 10 días después de ello. El suero se diluyó al doble con un tampón de fijación para cromatografía con Proteína A Sepharose (BioRad Co.) y se aplicó a una columna de Proteína A equilibrada con el mismo tampón. Después de lavar la columna concienzudamente con el mismo tampón, el anticuerpo anti-sOBM adsorbido a la columna se eluyó con un tampón de elución (BioRad Co.) o tampón glicina-HCl 0,1 M, pH 2,9 ~ pH 3,0. Para neutralizar inmediatamente el producto eluido, se fraccionó dicho producto utilizando tubos de ensayo que contenían una pequeña cantidad de Tris-HCl 1,0 M (pH 8,0). El producto eluido se dializó contra PBS durante una noche a 4°C. El contenido de proteínas en la solución de anticuerpo se midió por el método de Lowry utilizando IgG de bovino como proteína estándar. De este modo, se obtuvieron aproximadamente 10 mg de inmunoglobulina (IgG) purificada que contenía el anticuerpo policlonal de la presente invención por cada 1 ml de antisuero de conejo.

50 Ejemplo 29

Medida de OBM y sOBM por ELISA utilizando anticuerpo policlonal

Se construyó un ELISA sándwich utilizando el anticuerpo policlonal anti-sOBM humana de conejo obtenido en el Ejemplo 28 como el anticuerpo de fase sólida y anticuerpo marcado con enzima. Se preparó un anticuerpo marcado con peroxidasa (POD) de acuerdo con el método de Ishikawa (Ishikawa *et al.*, J. Immunoassay, Vol. 4, 209-327, 1983).

El anticuerpo policlonal anti-sOBM humana obtenido en el Ejemplo 28 se disolvió en una solución 0,1 M de NaHCO_3 a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se añadieron 100 μl de la solución resultante a cada pocillo en inmunoplasmas de 96 pocillos (Nunc. Co.), que se dejaron luego en reposo a la temperatura ambiente durante una noche. A continuación, se añadieron a cada pocillo 200 μl de Block Ace™ al 50% (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) y las placas se dejaron en reposo durante una hora a la temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos 3 veces con PBS que contenía 0,1% de Polisorbato 20 (tampón de lavado).

Se expresó OBM humana de acuerdo con el método del Ejemplo 26 y se purificó de acuerdo con el método del Ejemplo 2. La OBM humana purificada y la sOBM humana purificada preparadas en el Ejemplo 28 se diluyeron en serie con el primer tampón de reacción (tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2, que contenía 40% de Block Ace™ y 0,1% de Polisorbato 20), respectivamente, y se añadieron a cada pocillo en las placas 100 μl de la solución diluida. Las

placas se dejaron en reposo a la temperatura ambiente durante 2 horas, y se lavaron 3 veces con el tampón de lavado arriba mencionado. Subsiguientemente, se añadieron a cada pocillo en las placas 100 μ l de anticuerpo policlonal anti-sOBM humana marcado con POD, diluido 1000 veces con el segundo tampón de reacción (tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2, que contenía 25% de Block Ace™ y 0,1% de Polisorbato 20). Después de dejar las placas en reposo a la temperatura ambiente durante 2 horas, se lavó cada pocillo 3 veces con el tampón de lavado. A continuación, se añadieron a cada pocillo en las placas 100 μ l de solución sustrato de enzima (TMB, ScyTek Co.) y las placas se dejaron en reposo durante 10 minutos, seguido por la adición de 100 μ l de una solución de terminación de la reacción (Stopping Reagent, ScyTek Co.) para detener la reacción enzimática. Se midió la absorbancia a 450 nm de cada pocillo utilizando un lector de microplacas. Los resultados se muestran en la Figura 26. El ELISA sándwich utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-sOBM humana reconocía prácticamente igual la sOBM humana (peso molecular, aproximadamente 32 kDa) como la OBM humana (peso molecular, aproximadamente 40 kDa), con una sensibilidad de medida de aproximadamente 12,5 x 10⁻³ pmol/ml (OBM humana: aproximadamente 500 pg/ml, sOBM humana: aproximadamente 400 pg/ml). La medida de la sOBM de ratón y OBM de ratón por ELISA utilizando el anticuerpo policlonal de conejo anti-sOBM de ratón obtenido en el Ejemplo 28 pudo realizarse del mismo modo. Se confirmó que puede medirse una cantidad extremadamente pequeña de sOBM de ratón o OBM de ratón casi con la misma sensibilidad que se ha descrito arriba.

Como se ha mencionado arriba, el anticuerpo policlonal anti-sOBM humana de la presente invención preparado en el Ejemplo 28 puede reconocer igualmente a la vez los antígenos de sOBM humana y de OBM humana. Por esta razón, el anticuerpo se designó anticuerpo policlonal anti-sOBM/OBM humana. Análogamente, el anticuerpo policlonal anti-sOBM de ratón preparado en el Ejemplo 28 puede reconocer igualmente a la vez los antígenos sOBM de ratón y OBM de ratón. Este anticuerpo se designó por esta razón anticuerpo policlonal anti-OBM/sOBM de ratón.

Ejemplo 30

Preparación de anticuerpo monoclonal

La sOBM humana purificada preparada en el Ejemplo 28 se utilizó como el antígeno para inmunización. La sOBM humana purificada se disolvió en solución salina fisiológica a una concentración de 10 μ g/ml y se emulsionó por mezcla con un volumen equivalente de adyuvante completo de Freund. La emulsión se administró por vía intraperitoneal a ratones BALB/c a una dosis de 200 μ l 3 veces, una vez a la semana, para inmunizar los ratones. A continuación, se añadió el volumen equivalente del adyuvante incompleto de Freund a una solución salina fisiológica que contenía 5 μ g/ml de sOBM humana y la mezcla se emulsionó suficientemente. Esta emulsión se inyectó por vía intraperitoneal a ratones BALB/c a una dosis de 200 μ l, una vez a la semana durante 4 semanas para inmunización. Una semana después de la cuarta inmunización, se administraron por vía intravenosa a los ratones BALB/c 100 μ l de una solución salina fisiológica que contenía 10 μ g/ml de sOBM humana como refuerzo. El tercer día después de la inmunización final, se extirpó el bazo y se separaron células de bazo. Las células de bazo se fusionaron con células de mieloma de ratón, P3x63Ag.653 de acuerdo con un método convencional (Koehler, G. y Milstein, C., Nature, 256, 495 (1975)). Las células fusionadas suspendidas se cultivaron durante 10 días en un medio HAT que contenía hipoxantina, aminopterina, y timidina. Después que las células de mieloma murieron y aparecieron los hibridomas, se reemplazó el medio HAT con un medio HAT exento de aminopterina, y se continuó el cultivo de células.

Ejemplo 31

Selección de hibridoma y clonación

La aparición de hibridomas se reconoció 10 días después de la fusión celular en el Ejemplo 20. Se seleccionaron anticuerpos monoclonales que reconocían la sOBM humana con afinidad alta e hibridomas productores de estos anticuerpos, de acuerdo con el procedimiento siguiente utilizando el ELISA en fase sólida mejorado que se describe más adelante. Adicionalmente, para seleccionar el anticuerpo monoclonal anti-OBM que reconoce a la vez sOBM humana y sOBM de ratón, se utilizó sOBM de ratón preparada en el Ejemplo 27 además de sOBM humana como el antígeno para el ELISA en fase sólida. La sOBM humana y la sOBM de ratón se disolvieron respectivamente en una solución 0,1 M de dicarbonato de sodio a una concentración de 5 μ g/ml. Se añadieron 50 ml de cada solución de antígeno a cada pocillo en inmunoplasmas de 96 pocillos (Nunc Co.). Las placas se dejaron en reposo a 4°C durante una noche para inmovilizar los antígenos. La solución de antígeno en cada pocillo se desechó. Cada pocillo se llenó luego con 200 μ l de Block Ace™ al 50% (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) y se dejó en reposo a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar cada pocillo con solución salina tamponada con fosfato (PBS-P) que contenía 0,1% de Polisorbato 20, se añadieron a cada pocillo 40 μ l de suero de ternero (Hiclone Inc.). Subsiguientemente, se añadieron a cada pocillo 10 μ l de cada sobrenadante de cultivo de hibridoma y se incubó cada pocillo a la temperatura ambiente durante 2 horas en presencia de suero de ternero al 80%. El objeto del ELISA en fase sólida en presencia de suero de ternero al 80% es seleccionar un hibridoma que produzca un anticuerpo que pueda detectar una cantidad muy pequeña de sOBM humana o sOBM de ratón incluso en una solución que contenga una concentración elevada de proteínas y en presencia de una sustancia que interfiere la inmunorreacción derivada del suero, es decir un hibridoma que puede producir un anticuerpo con afinidad alta para sOBM humana o sOBM de ratón. Después de la reacción a la temperatura ambiente durante 2 horas, se lavaron las placas con PBS-P y subsiguientemente se añadieron a cada pocillo 50 μ l de IgG anti-ratón marcada con peroxidasa (KPL Co.) diluida 5000 veces con solución salina fisiológica que contenía Block Ace™ al 25%. Después de la reacción a la temperatura ambiente durante 2 horas, la placa se lavó 3 veces con PBS-P. Después de la adición de 50 μ l de una solución sustrato

ES 2 263 204 T3

de enzima (TMB, ScyTek Co.) a cada pocillo, se continuó la reacción a la temperatura ambiente durante 5 minutos. La reacción enzimática se paró por la adición de 50 μ l de una solución de terminación de la reacción (Stopping Reagent, SciTek Co.). Los hibridomas que producen anticuerpos que reconocen sOBM humana o sOBM de ratón se seleccionaron por medida de la absorbancia a 450 nm de cada pocillo utilizando un lector de microplacas (Immune Reader NJ2000TM, Nippon InterMed Co.). Se seleccionaron hibridomas que producían anticuerpos que exhibían una absorbancia particularmente alta ($DO_{450\text{ nm}}$). La clonación de estos hibridomas por el método de dilución limitante se repitió 3 a 5 veces para establecer hibridomas estables. Los hibridomas que exhibían productividad de anticuerpos particularmente alta se seleccionaron entre los clones de hibridoma productores de anticuerpos establecidos.

10 Ejemplo 32

Producción y purificación de anticuerpo monoclonal

15 Los hibridomas productores de anticuerpos obtenidos en el Ejemplo 31, es decir hibridoma productor de anticuerpos con afinidad alta que reconoce sOBM humana e hibridoma que produce un anticuerpo que exhibe reactividad cruzada con la sOBM de ratón se cultivaron, respectivamente. Cada hibridoma se implantó por vía intraperitoneal a ratones BALB/c (1×10^6 células por ratón) a los cuales se administró pristano (Aldrich Co.) una semana antes. Después de aproximadamente 2-3 semanas, se recogieron las ascitis acumuladas. El anticuerpo monoclonal, que reconoce sOBM humana de la presente invención o a la vez la sOBM humana y sOBM de ratón en la ascitis, se purificó de acuerdo con el método de purificación de los anticuerpos policlonales anti-OBM/sOBM utilizando una columna de Proteína A descrita en el Ejemplo 28. El anticuerpo monoclonal purificado se obtuvo así a partir de la ascitis por cromatografía en columna de Proteína A (Pharmacia Co.).

25 Ejemplo 33

Especificidad antigénica del anticuerpo monoclonal

La especificidad de antígeno de un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente sOBM humana y el anticuerpo monoclonal que exhibe reactividad cruzada a la vez con la sOBM humana y la sOBM de ratón se investigó utilizando sOBM humana, OBM humana intacta que tenía una región de fijación de membrana, sOBM de ratón, y OBM de ratón intacta que tenía una región de fijación de membrana. Se obtuvieron más de 30 clases de anticuerpo monoclonal. Los resultados sobre varios anticuerpos representativos se muestran en la Tabla 1. Como resultado, se encontró que la mayoría de los anticuerpos monoclonales anti-sOBM humana que reconocen específicamente sOBM humana reconocen también la OBM humana intacta que tiene una región de fijación de membrana, pero no la sOBM de ratón y la OBM intacta de ratón que tiene una región de fijación de membrana. Por otra parte, se encontró que solamente se obtuvieron un pequeño número de anticuerpos monoclonales que reconocían a la vez la sOBM humana y la sOBM de ratón y que estos anticuerpos exhiben reactividad cruzada a la vez con la OBM humana y la OBM de ratón. Estos resultados indican que existe un sitio común de reconocimiento de antígeno, a saber un epítipo común, a la vez en la OBM humana y la OBM de ratón. Basándose en el hecho de que el anticuerpo monoclonal anti-sOBM humana preparado utilizando la sOBM humana como antígeno reconoce también igualmente OBM humana que tiene una región de fijación de membrana. El anticuerpo monoclonal anti-sOBM humana se designó anticuerpo monoclonal anti-OBM/sOBM humana.

TABLA 1

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

hsOBM: OBM humana soluble, hOBM: OBM humana de tipo de fijación de membrana,
msOBM: OBM soluble de ratón, mOBM: OBM de ratón de tipo de fijación de membrana.

Ejemplo 34

Determinación de la clase y subclase del anticuerpo monoclonal

5 La clase y subclase del anticuerpo monoclonal de la presente invención se determinaron por medio del kit de análisis de clases y subclases de inmunoglobulinas (Amersham Co.) de acuerdo con el protocolo indicado. Los resultados sobre anticuerpos monoclonales representativos se muestran en la Tabla 2. Como se muestra en la Tabla 2, la mayoría de los anticuerpos monoclonales anti-OBM/sOBM humana eran IgG₁, y los restantes eran IgG_{2a} e IgG_{2b}. Las cadenas ligeras para todos los anticuerpos eran cadenas κ.

10

TABLA 2

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

25

Ejemplo 35

Medida de la constante de disociación (valor K_d) del anticuerpo monoclonal

30 La constante de disociación del anticuerpo monoclonal se midió de acuerdo con un método conocido (Betrand Friguet *et al.*: Journal of Immunological Methods, 77, 305-319, 1986). A saber, el anticuerpo purificado obtenido en el Ejemplo 32 se diluyó con tampón Tris-HCl 0,4 M (un tampón primario, pH 7,4) que contenía Block Ace al 40% y 0,1% de Polisorbato 20 para dar una concentración de 5 ng/ml. La solución se mezcló con un volumen equivalente de una solución diluida de OBM humana soluble purificada (hsOBM) obtenida en el Ejemplo 28 en el tampón primario
 35 con un intervalo de concentración de 6,25 ng/ml a 10 μg/ml. La mezcla se dejó en reposo durante 15 horas a 4°C para fijar la hsOBM al anticuerpo monoclonal. Después de 15 horas, el anticuerpo no fijado a la hsOBM se midió utilizando un ELISA en fase sólida en el cual estaba inmovilizada hsOBM (10 μg/ml, 100 μl/pocillo) para calcular la constante de disociación del anticuerpo monoclonal a la hsOBM. Adicionalmente, se midió la afinidad para msOBM de un anticuerpo, que es un anticuerpo monoclonal para la hsOBM y exhibe también la reactividad cruzada con
 40 la OBM soluble de ratón (msOBM), de acuerdo con el mismo método excepto que se utilizó msOBM en lugar de hsOBM. Constantes de disociación de los anticuerpos, que exhiben afinidad alta para cada antígeno y son útiles para inmunoensayo enzimático y ensayo de fijación, se muestran en la Tabla 3.

45

TABLA 3

Anticuerpo	Subclase	Antígeno	Constante de disociación Kd(M)
50 H-OBM 1	IgG ₁ (κ)	hsOBM	$1 \times 10^{-11} < kd < 1 \times 10^{-10}$
H-OBM 4	IgG ₁ (κ)	hsOBM	$1 \times 10^{-11} < kd < 1 \times 10^{-10}$
H-OBM 9	IgG ₁ (κ)	hsOBM	$1 \times 10^{-9} < kd < 1 \times 10^{-8}$
55 H-OBM 9	IgG ₁ (κ)	msOBM	$1 \times 10^{-8} < kd < 1 \times 10^{-7}$

Como resultado, las constantes de disociación (Kd) de H-OBM 1 y H-OBM 4 que son los anticuerpos específicos para OBM soluble humana (hsOBM) eran del orden de 10⁻¹¹ M, indicando la afinidad bastante alta para hsOBM. Por
 60 otra parte, el valor Kd del anticuerpo H-OBM 9 que reconoce a la vez la hsOBM y la OBM soluble de ratón (msOBM) era del orden de 10⁻⁸ M para msOBM y del orden de 10⁻⁹ M para hsOBM. Adicionalmente, la constante de disociación del otro anticuerpo que reconoce ambos antígenos en la Tabla 1, es decir la constante de disociación de H-OBM 13 para cada antígeno, era la misma que la de H-OBM 9, y estos dos anticuerpos pertenecen a la misma subclase. Estos descubrimientos sugieren la posibilidad de que se trate de anticuerpos idénticos que reconocen el mismo epítipo de
 65 cada antígeno.

Ejemplo 36

Método de medida de OBM y sOBM humana por ELISA sándwich utilizando anticuerpos monoclonales anti-OBM/sOBM humana

Se construyó un ELISA sándwich utilizando los dos anticuerpos monoclonales de afinidad alta obtenidos en el Ejemplo 35, H-OBM 1 y H-OBM 4, como anticuerpo en fase sólida y anticuerpo marcado con enzima, respectivamente. La marcación del anticuerpo se llevó a cabo utilizando un kit de peroxidasa activada con maleimida (Pierce Co.). El anticuerpo, H-OBM 1, se disolvió en una solución 0,1 M de bicarbonato de sodio a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, y se añadieron 100 μl de la solución a cada pocillo en inmunoplasmas de 96 pocillos (Nunc Co.). Después de dejar en reposo durante una noche a 4°C para inmovilizar el anticuerpo, la solución de desechó y se añadieron 300 μl de solución Block Ace™ al 50% a cada pocillo en las placas. Cada pocillo de las placas se bloqueó dejando en reposo a la temperatura ambiente durante 2 horas. Después del bloqueo, las placas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato que contenía 0,1% de Polisorbato 20 (PBS-P). OBM humana (hOBM) y OBM humana soluble (hsOBM) se diluyeron respectivamente con tampón Tris-HCl 0,4 M, pH 7,4, que contenía Block Ace™ al 40% (Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) y 0,1% de Polisorbato 20 (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.) (el primer tampón de reacción) para preparar muestras de ensayo con diversas concentraciones. Estas muestras de ensayo con diferentes concentraciones se añadieron a cada pocillo en la cantidad de 100 μl por pocillo y se hicieron reaccionar con el anticuerpo, H-OBM 1 inmovilizado en cada pocillo por incubación a la temperatura ambiente durante 2 horas. Después de 2 horas, las placas se lavaron con PBS-P. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 μl de una solución de anticuerpo H-OBM 4 marcado con POD en tampón Tris-HCl 0,2 M, pH 7,4, que contenía Block Ace™ al 25% y 0,1% de Polisorbato 20 (el segundo tampón de reacción), seguido por incubación ulterior a la temperatura ambiente durante 2 horas. Se lavaron luego las placas con PBS-P y se añadieron a cada pocillo 100 μl de una solución sustrato enzimática (TMB, Scytek Co.) para iniciar la reacción enzimática. La reacción enzimática se terminó por adición de 100 μl de una solución de terminación de la reacción (Stopping Reagent, Scytek Co.) a cada pocillo. La absorbancia de cada pocillo a 450 nm se midió utilizando un lector de microplacas. Los resultados se muestran en la Figura 27.

Como resultado, se confirmó que el ELISA sándwich construido utilizando los dos anticuerpos monoclonales anti-OBM/sOBM humana, H-OBM 1 y H-OBM 4 con afinidad alta para OBM/sOBM humana preparados en el Ejemplo 35, reconoce igualmente OBM humana y sOBM humana, y es capaz de medir una cantidad muy pequeña de OBM humana o sOBM humana hasta un límite cuantitativo de aproximadamente $1,25 \times 10^{-3}$ a $2,5 \times 10^{-3}$ pmol/ml (aproximadamente 50-100 pg/ml para OBM humana con un peso molecular de aproximadamente 40 kDa, y aproximadamente 40-80 pg/ml para sOBM humana con un peso molecular de aproximadamente 32 kDa). Los hibridomas que producen estos dos anticuerpos monoclonales anti-OBM/sOBM humana, H-OBM 1 y H-OBM 4 se designaron H-OBM 1 y H-OBM 4, respectivamente. El hibridoma productor del anticuerpo monoclonal anti-OBM/sOBM humana (H-OBM 9) que reconoce OBM de ratón y sOBM de ratón y tiene también actividad inhibitora de la formación de osteoclastos se designó H-OBM 9. Estos hibridomas fueron depositados en el National Institute of Bioscience and Human Technology, The Agency of Industrial Science and Technology, en fecha 5 de Noviembre de 1997, con los números de depósito FERM BP-6264 (H-OBM 1), FERM BP-6265 (H-OBM 4), y FERM BP-6266 (H-OBM 9).

Ejemplo 37

Medida de OBM de ratón y sOBM de ratón utilizando el anticuerpo monoclonal anti-OBM/sOBM humana que reconoce OBM de ratón y sOBM de ratón

Se construyó un ELISA sándwich utilizando el anticuerpo monoclonal anti-OBM/sOBM humana, H-OBM 9, que reconoce OBM de ratón y sOBM de ratón obtenido como un anticuerpo en fase sólida en los Ejemplos 33 y 35, y el anticuerpo policlonal anti-OBM/sOBM de ratón como anticuerpo marcado con enzima obtenido en el Ejemplo 28. La OBM de ratón y sOBM de ratón se diluyeron respectivamente con el primer tampón de reacción para dar diversas concentraciones de la misma manera que en el Ejemplo 35 y se midió luego sOBM de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 36. Los resultados se presentan en la Figura 28. Como resultado, se encontró que la OBM de ratón y sOBM de ratón pueden medirse de modo similar utilizando H-OBM 9 que es el anticuerpo monoclonal anti-OBM/sOBM humana que reconoce la OBM de ratón y sOBM de ratón de la presente invención. Como se muestra por el resultado del Ejemplo 35, este anticuerpo monoclonal anti-OBM/sOBM humana, H-OBM 9, tiene una constante de disociación alta con relación a la sOBM de ratón, es decir tiene una afinidad comparativamente baja para sOBM de ratón. La sensibilidad en la medida de la OBM de ratón (peso molecular, aproximadamente 40 kDa) y sOBM de ratón (peso molecular, aproximadamente 32 kDa) por este ensayo ELISA era aproximadamente 25×10^{-3} pmol/ml (aproximadamente 1 ng/ml para OBM de ratón y aproximadamente 0,8 ng/ml para sOBM de ratón).

Ejemplo 38

Actividad inhibitora de la osteoclastogénesis del anticuerpo anti-OBM/sOBM

Es sabido que células semejantes a osteoclastos (OCL) son inducidas por co-cultivo de células de bazo de ratón y células ST2 (células estromales derivadas de la médula ósea de ratón; Endocrinology, 125, 1805-1813 (1989)). Se estudió la capacidad del anticuerpo anti-OBM/sOBM para inhibir la formación de OCL cuando se añade al sistema de co-cultivo. Debido a que la OBM de ratón se expresa en este sistema de co-cultivo, se utilizaron un anticuerpo policlonal de conejo anti-OBM/sOBM de ratón que reconoce OBM de ratón y un anticuerpo monoclonal anti-

ES 2 263 204 T3

OBM/sOBM humana (H-OBM 9) que reconoce a la vez los antígenos de OBM humana y OBM de ratón se utilizaron como los anticuerpos en este ejemplo. Se añadieron a cada pocillo 700 microlitros por pocillo de cada anticuerpo anti-OBM diluidos en serie con α -MEM que contenía 10% de FCS y 350 μ l/pocillo de esplenocitos de ratón macho (2×10^6 /ml) suspendidos en el mismo medio arriba descrito, en una placa de 24 pocillos (Nunc). A continuación, se añadieron a cada pocillo células ST2 tripsinizadas y suspendidas en el medio de cultivo arriba mencionado que contenía vitamina D₃ 4×10^{-8} M y dexametasona 4×10^{-7} M (8×10^4 células/ml), en la cantidad de 350 μ l/pocillo, seguido por cultivo durante 6 días a 37°C. Después de lavar las placas una sola vez con PBS, las células contenidas en cada pocillo se fijaron con una mezcla de etanol y acetona (50:50) durante un minuto a la temperatura ambiente. Las placas se secaron al aire, y se añadieron a cada pocillo 500 μ l de solución sustrato de acuerdo con el protocolo del kit LEUKOCYTE ACID PHOSPHATASE (Sigma Co.), seguido por incubación durante 55 minutos a 37°C. Únicamente las células que exhibían la actividad de fosfatasa ácida resistente al ácido tartárico (actividad TRAP), que es un marcador específico para osteoclastos, se tiñeron por esta reacción. Las placas se lavaron una sola vez con agua destilada y se secaron al aire, y se contó el número de células TRAP-positivas. Los resultados se presentan en la Tabla 4. Como se muestra en la Tabla 4, tanto el anticuerpo policlonal de conejo anti-OBM/sOBM de ratón como el anticuerpo monoclonal anti-OBM/sOBM humana, H-OBM 9, que reconoce que la OBM de ratón inhibía la formación de OCL de una manera dependiente de la dosis. Se encontró que estos anticuerpos poseen actividad inhibitoria de la osteoclastogénesis al igual que el factor inhibitor de la osteoclastogénesis, OCIF/OPG, y por consiguiente son prometedores como agente terapéutico para el tratamiento de los síntomas de anormalidad del metabolismo óseo.

TABLA 4

Cantidad de anticuerpo (ng/ml)	Número de células multinucleadas TRAP-positivas	
	Anticuerpo policlonal de conejo anti-OBM/sOBM de ratón	Anticuerpo monoclonal de ratón anti-OBM/sOBM humana (H-OBM 9)
0	1155 \pm 53	1050 \pm 45
10	510 \pm 24	650 \pm 25
100	10 \pm 3	15 \pm 4

(Valor medio \pm desviación estándar, n = 3).

Ejemplo 39

Actividad inductora de la formación de osteoclastos humanos de Trx-OBM

Se prepararon células mononucleares a partir de sangre entera recogida de la vena de un individuo adulto sano por gradiente de densidad utilizando Histopaque (Sigma Co.) de acuerdo con el protocolo unido al mismo. Las células mononucleares se suspendieron a una densidad de células de $1,3 \times 10^6$ /ml en α -MEM que contenía dexametasona 10^{-7} M, 200 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos (The Green Cross Corp.), 10% de suero bovino fetal, y Trx-BM purificada (0-100 ng/ml) obtenida en el Ejemplo 15. La suspensión de células se añadió a cada pocillo en placas de 48 pocillos en la cantidad de 300 μ l por pocillo, y las células se cultivaron a 37°C durante 3 días. Después de reemplazar el caldo de cultivo con el medio de cultivo arriba mencionado, las células se cultivaron a 37°C durante 4 días. Las células cultivadas que tenían actividad de fosfatasa ácida resistente al ácido tartárico (actividad TRAP) se tiñeron selectivamente de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 5. Se midió por observación al microscopio el número de células multinucleadas teñidas. Los resultados se presentan en la Figura 29. Se confirmó que los multinucleados TRAP-positivos eran inducidos de una manera dependiente de la dosis por adición de Trx-OBM, mientras que no se detectaba célula TRAP-positiva alguna en los pocillos a los que no se añadió Trx-OBM. Además, estos multinucleados TRAP-positivos se encontraron positivos para el receptor de vitronectina que es un marcador para los osteoclastos. Adicionalmente, cuando se llevó a cabo un cultivo de células similar sobre rodajas de marfil colocadas en cada pocillo en una placa de 48 pocillos, se observó formación de pozos en las rodajas de marfil únicamente en presencia de Trx-OBM. Sobre la base de estos descubrimientos, se encontró que Trx-OBM tiene actividad de inducción de la formación de osteoclastos humanos.

Ejemplo 40

Inhibición de la actividad de resorción ósea por el anticuerpo anti-OBM/sOBM

Se inyectó subcutáneamente una solución de [⁴⁵Ca]-CaCl₂ (Amersham Co.) a un ratón ddY (Japan SLC Co.) en el día decimoquinto de preñez a una dosis de 25 μ Ci por ratón para marcar el hueso del feto con ⁴⁵Ca. Al día siguiente,

se sacrificó el ratón para obtener el feto. La pata delantera del feto se extrajo y se retiraron la piel y los músculos para acceder a los huesos largos. Se retiró el cartílago para obtener los diáfisis de los huesos largos. Los diáfisis de los huesos largos se flotaron uno por uno en 0,5 ml de medio de cultivo (medio BGJb (Gibco BRL Company) que contenía 0,2% de seroalbúmina bovina (Sigma Co.)) en cada pocillo en placas de 24 pocillos, y se cultivaron durante 24 horas a 37°C en 5 de CO₂. Después del precultivo, se transfirieron los huesos a diversos medios de cultivo recientes (0,5 ml), cada uno de los cuales contenía uno de diferentes factores de la resorción ósea (vitamina D₃, prostaglandina E₂, hormona paratiroidea, interleuquina 1 α), e IgG de conejo normal (100 μ g/ml; como control), o el anticuerpo policlonal de conejo anti-OBM/sOBM preparado en el Ejemplo 28, seguido por cultivo ulterior durante 72 horas. Después del cultivo, se pusieron los huesos largos en 0,5 ml de una solución acuosa de ácido tricloroacético al 5% (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.) y se dejaron en reposo a la temperatura ambiente durante más de 3 horas para descalcificación. Se añadieron al caldo de cultivo 5 ml de un agente de centelleo (AQUASOL-2, Packard Co.) y el extracto de la solución de ácido tricloroacético (0,5 ml de cada uno) para medir la radiactividad de ⁴⁵Ca, con lo cual se calculó la relación del ⁴⁵Ca que se liberaba en el caldo de cultivo por resorción ósea. Los resultados se presentan en las Figuras 30 a 33. Como resultado, se encontró que la vitamina D₃ (10⁻⁸ M) aumenta la actividad de resorción ósea, pero el anticuerpo policlonal de conejo anti-OBM/sOBM suprimía la resorción ósea estimulada por la vitamina D₃ de una manera dependiente de la concentración, inhibiendo completamente la resorción ósea incrementada a una concentración de 100 μ g/ml (Figura 30). La prostaglandina E₂ (10⁻⁶ M) y la hormona paratiroidea (100 ng/ml) aumentaban también la actividad de resorción ósea. Sin embargo, la adición de 100 μ g/ml del anticuerpo policlonal de conejo anti-OBM/sOBM inhibía casi por completo la resorción ósea estimulada por la prostaglandina E₂ y la hormona paratiroidea (Figuras 31 y 32). Por otra parte, la IgG de conejo normal (100 μ g/ml), que se utilizó como control positivo, no afectaba a la actividad de resorción ósea inducida por la prostaglandina E₂ y la hormona paratiroidea. La resorción ósea era incrementada también por la interleuquina 1 α (10 ng/ml), pero era inhibida significativamente por la adición del anticuerpo policlonal de conejo anti-OBM/sOBM (100 μ g/ml) (Figura 33). Sobre la base de estos resultados, está claro que el anticuerpo de la presente invención es una sustancia excelente como inhibidor de la resorción ósea. Los resultados obtenidos por experimentos similares utilizando H-OBM 9 que es un anticuerpo de ratón anti-OBM/sOBM humana, confirmaron que este anticuerpo exhibe un efecto inhibidor de la resorción ósea prácticamente equivalente al del anticuerpo policlonal de conejo anti-OBM/sOBM.

30 Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona un anticuerpo para la proteína que se fija específicamente al factor de inhibición de la osteoclastogénesis (OCIF), y un agente para tratamiento de la anomalía del metabolismo óseo que utiliza el anticuerpo.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un anticuerpo para la proteína humana de fijación de OCIF, y un agente para prevención y/o tratamiento de los síntomas de anomalía del metabolismo óseo que utiliza el anticuerpo.

Adicionalmente, la presente invención proporciona anticuerpos que reconocen ambos antígenos (anticuerpos anti-OBM/sOBM), uno de los cuales es una proteína fijada a la membrana que se fija específicamente a OCIF (molécula de fijación de OCIF; OBM), siendo el otro una OBM soluble (sOBM) que carece de una región de fijación de membrana, un proceso para preparar los anticuerpos, un método para medir la OBM y la sOBM utilizando estos anticuerpos, y un agente para prevenir y/o tratar los síntomas de anomalía en el metabolismo óseo que utiliza el anticuerpo como un componente eficaz.

El anticuerpo es útil como medicamento.

50 Descripción de microorganismos depositados

- (1) Nombre y dirección de la organización depositaria en la que se depositó el microorganismo

Agency of Industrial Science and Technology 1-3, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón (código postal 305)

Fecha de depósito en la organización depositaria

23 de mayo de 1997

Número de depósito

FERM BP-5953

- (2) Nombre y dirección de la organización depositaria en la que se depositó el microorganismo

Agency of Industrial Science and Technology 1-3, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón (código postal 305)

ES 2 263 204 T3

Fecha de depósito en la organización depositaria

13 de agosto de 1997

5

Número de depósito

FERM BP-6058

(3) Nombre y dirección de la organización depositaria en la que se depositó el microorganismo

10

Agency of Industrial Science and Technology 1-3, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón
(código postal 305)

Fecha de depósito en la organización depositaria

15

5 de Noviembre de 1997 (fecha de depósito original)

Número de depósito

20

FERM BP-6264

(4) Nombre y dirección de la organización depositaria en la que se depositó el microorganismo

25

Agency of Industrial Science and Technology 1-3, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón
(código postal 305)

Fecha de depósito en la organización depositaria

30

5 de Noviembre de 1997 (fecha de depósito original)

Número de depósito

35

FERM BP-6265

(5) Nombre y dirección de la organización depositaria en la que se depositó el microorganismo

40

Agency of Industrial Science and Technology 1-3, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón
(código postal 305)

Fecha de depósito en la organización depositaria

45

5 de Noviembre de 1997 (fecha de depósito original)

Número de depósito

50

FERM BP-6266

55

60

65

65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de un anticuerpo para la preparación de un medicamento para el tratamiento de las anormalidades del metabolismo óseo, anticuerpo que está dirigido contra una proteína como componente activo, proteína que tiene las características fisicoquímicas y la actividad biológica siguientes:

10 (a) afinidad: se fija específicamente al factor inhibidor de la osteoclastogénesis (OCIF) y exhibe afinidad alta a OCIF con una constante de disociación en la membrana celular: $K_d = 10^{-9}$ M o menos;

(b) peso molecular: tiene un peso molecular de 30.000-40.000 cuando se mide utilizando electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida en condiciones no reductoras y un peso molecular aparente de 90.000-110.000 cuando está reticulada a un OCIF de tipo monómero; y

15 (c) actividad biológica: exhibe actividad de soporte o promoción de la diferenciación y maduración de los osteoclastos en un sistema de co-cultivo de las células osteoblásticas estromales y células del bazo en presencia de factores estimulantes de la resorción ósea tales como vitamina D₃ de forma activa y hormona paratiroidea (PTH).

20 2. Uso de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la anomalía del metabolismo óseo es una enfermedad seleccionada del grupo constituido por osteoporosis, hipercalcemia, enfermedad de Paget, osteodistrofia renal, artritis reumatoide y osteoartritis.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

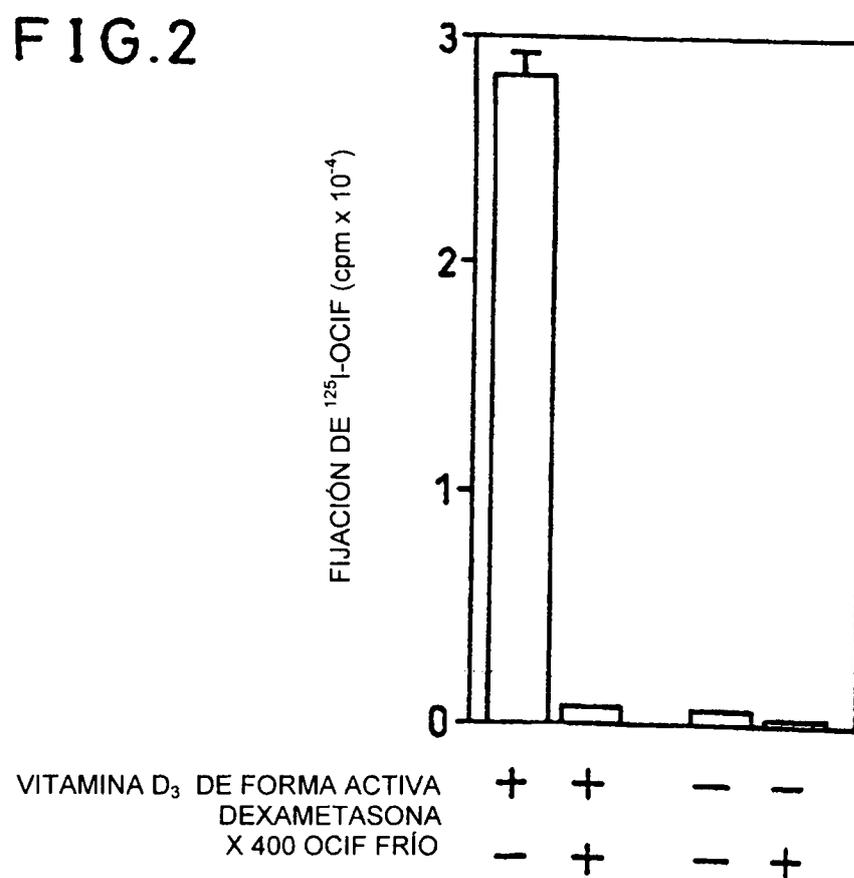


FIG.3

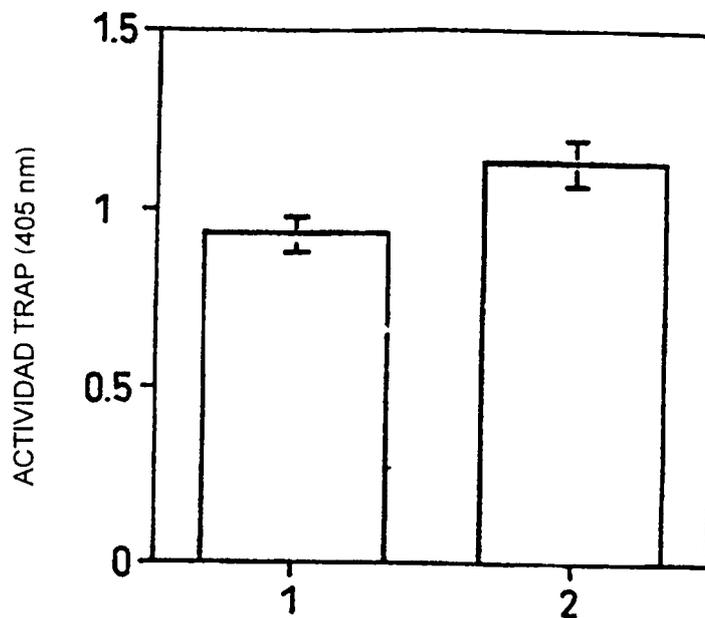


FIG.4

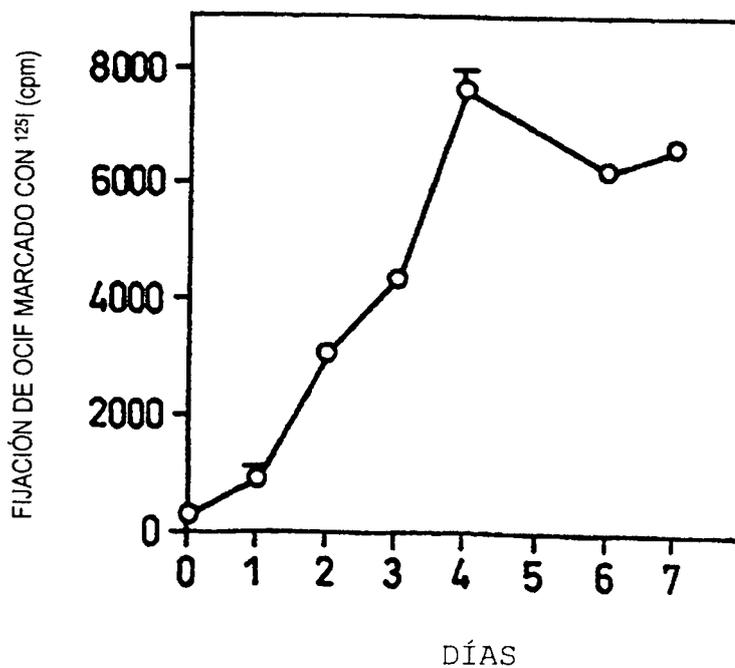


FIG.5

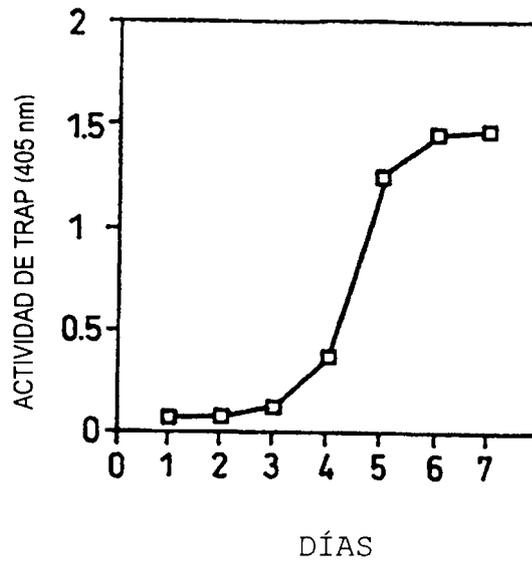


FIG.6

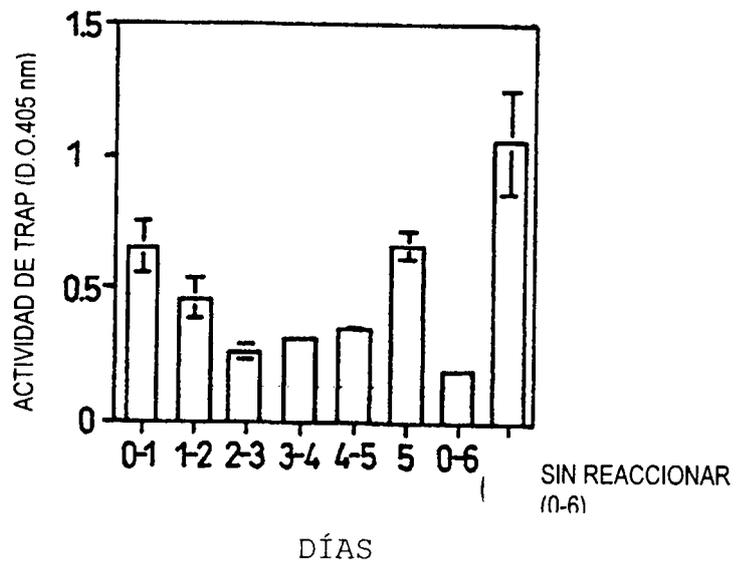


FIG.7

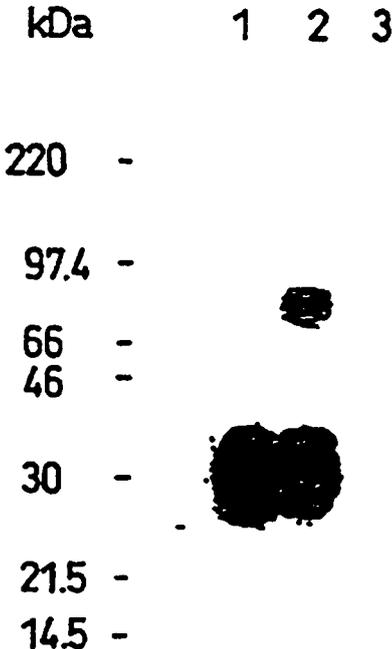


FIG.8

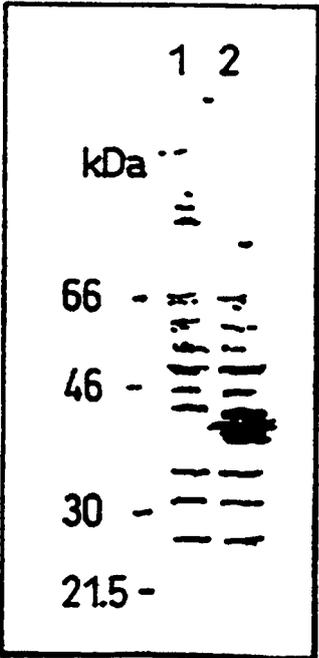


FIG.9

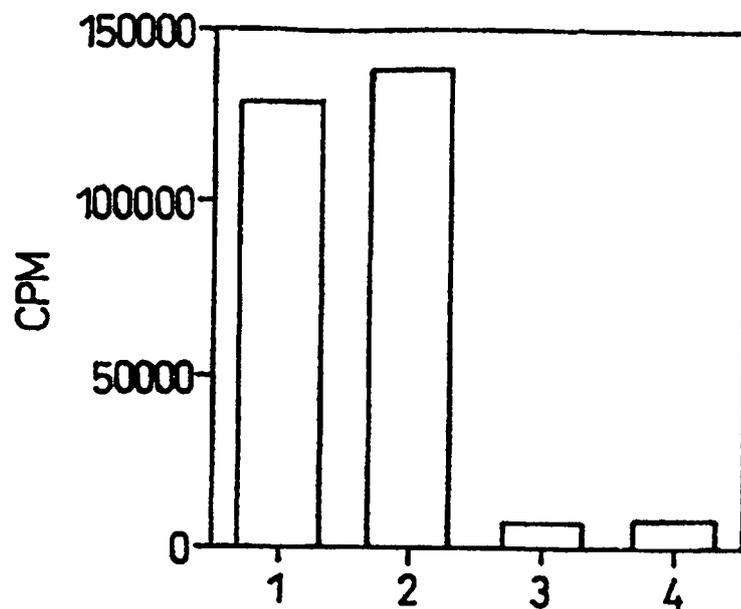


FIG.10

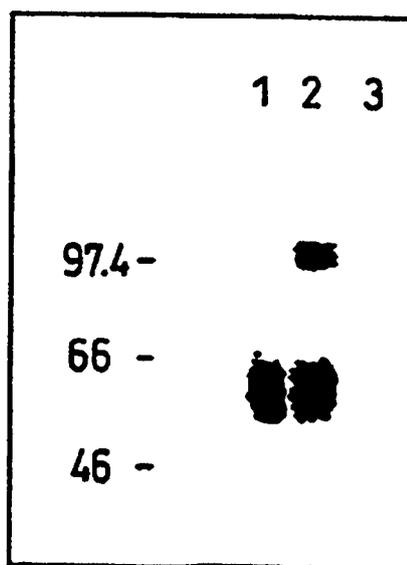


FIG.11



FIG.12

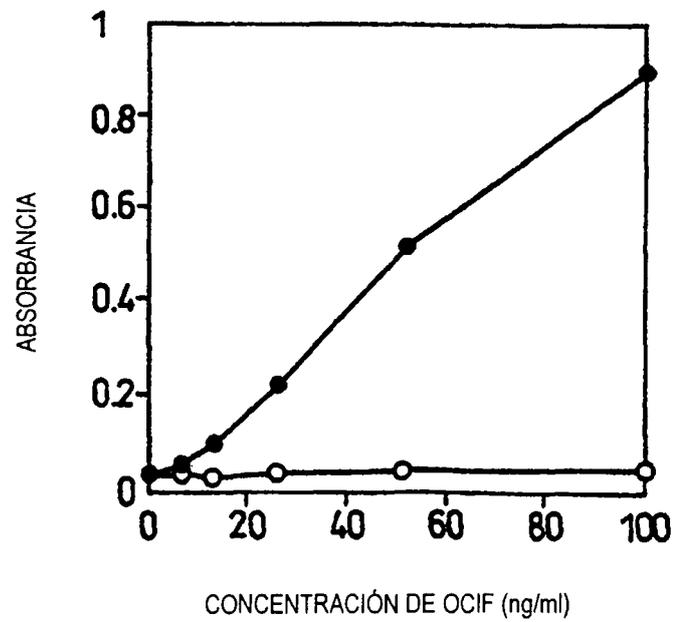


FIG.13

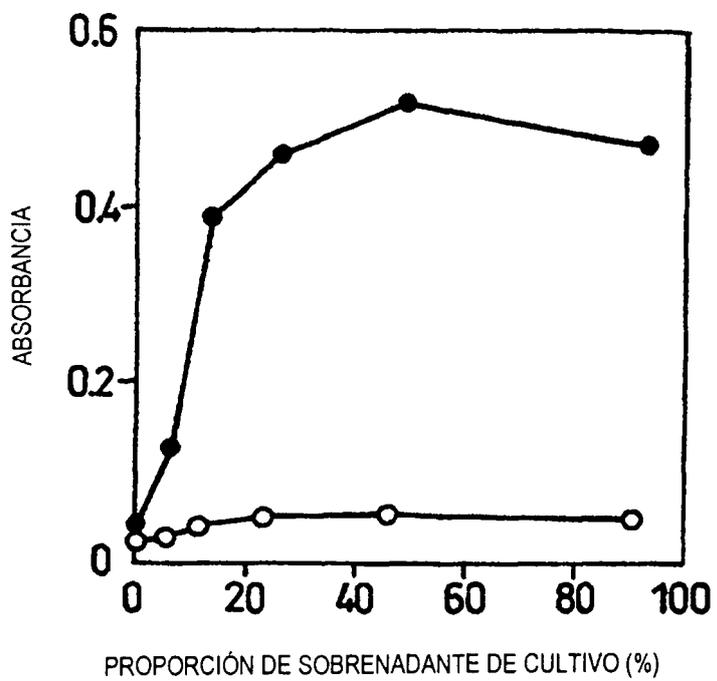


FIG.14

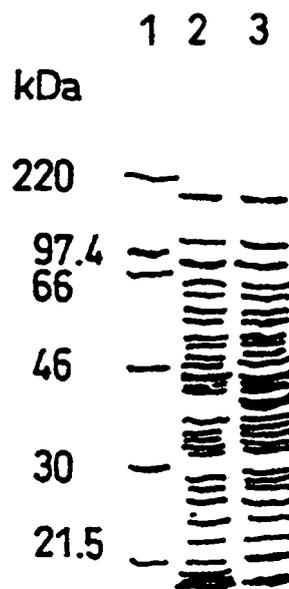


FIG.15

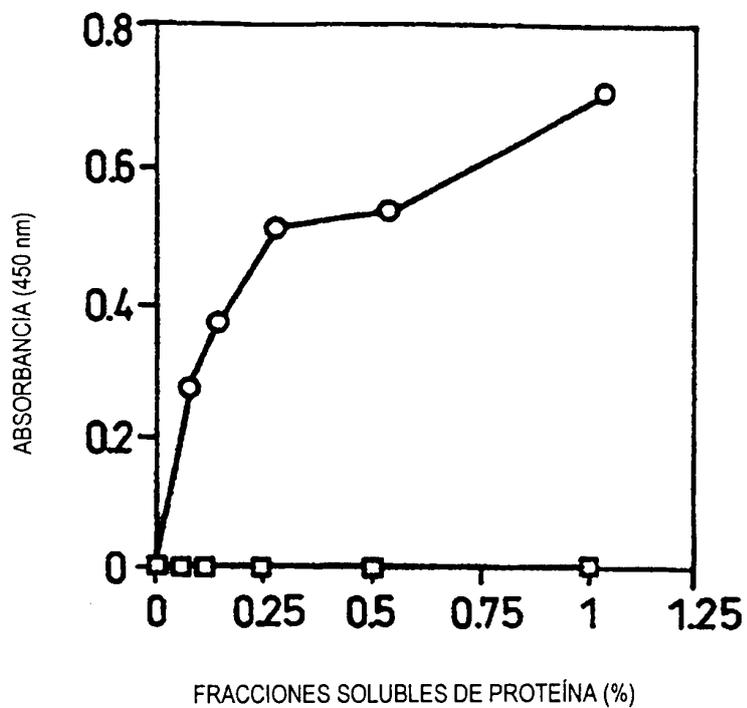


FIG.16

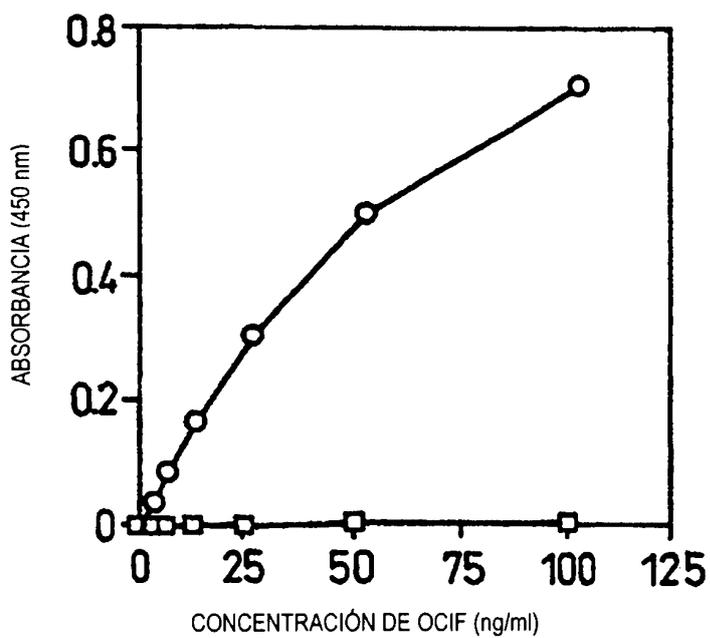


FIG.17

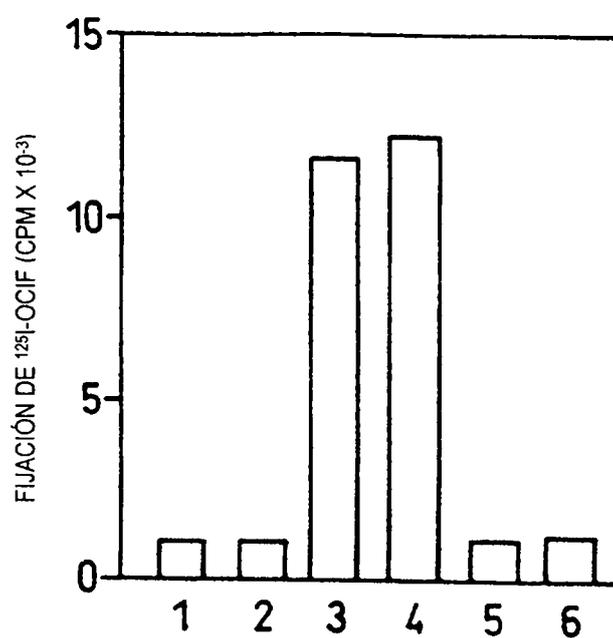


FIG. 18

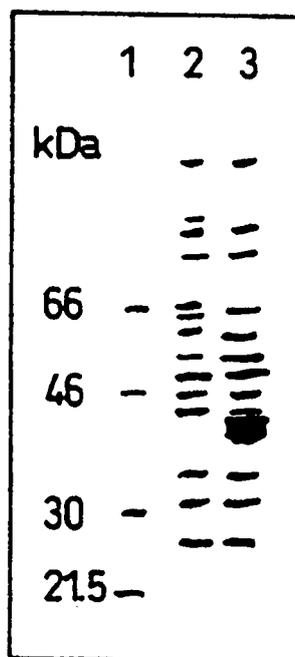


FIG.19

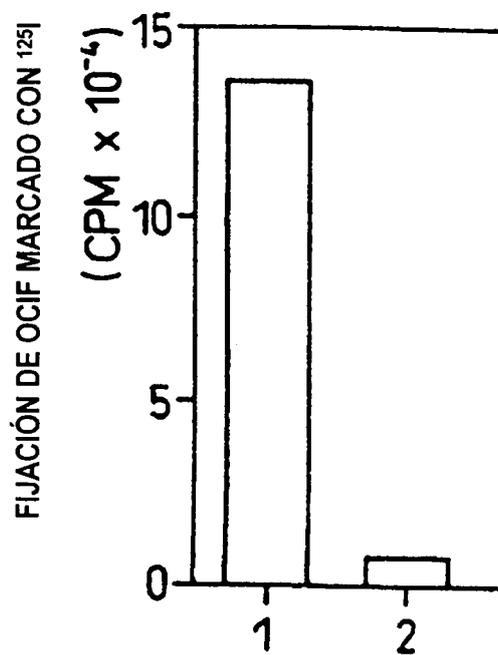


FIG.20

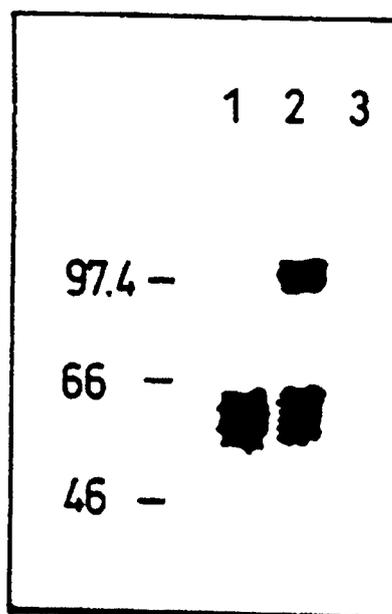


FIG.21

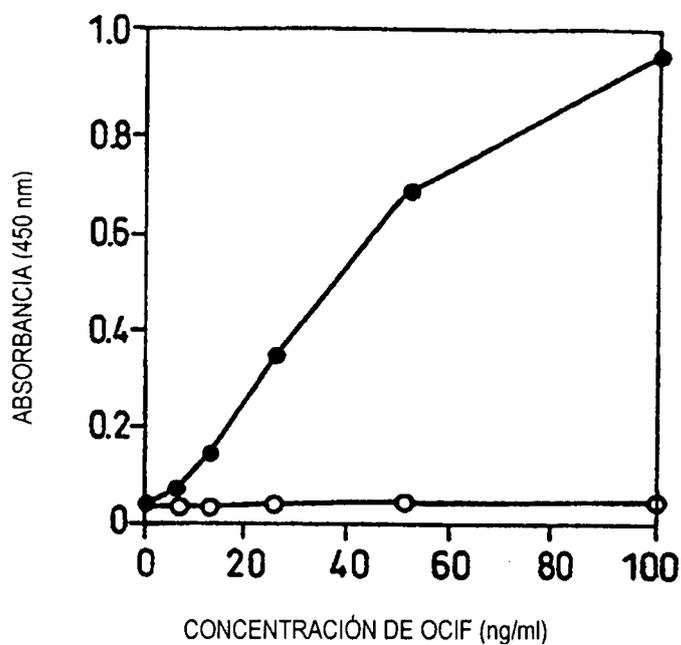


FIG.22

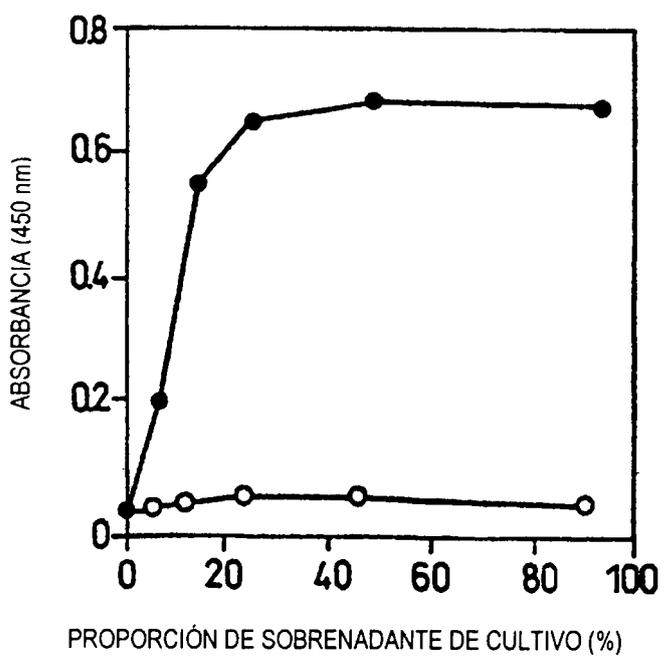


FIG. 23

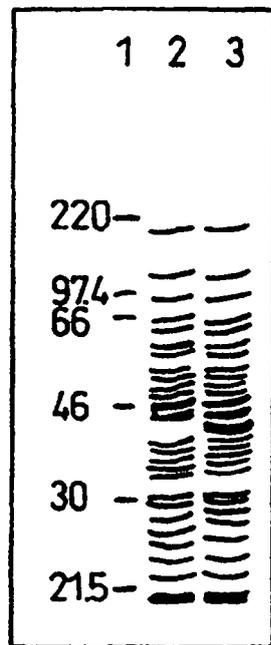


FIG. 24

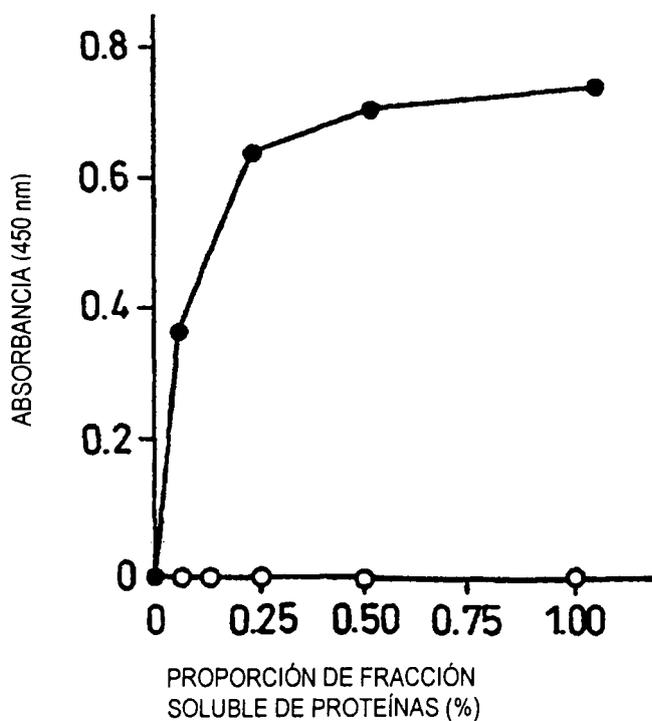


FIG. 25

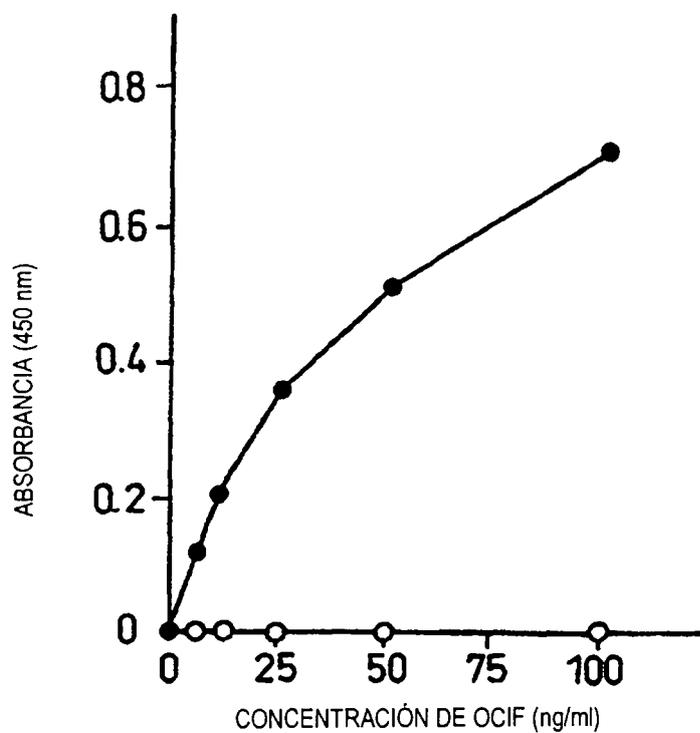


FIG. 26

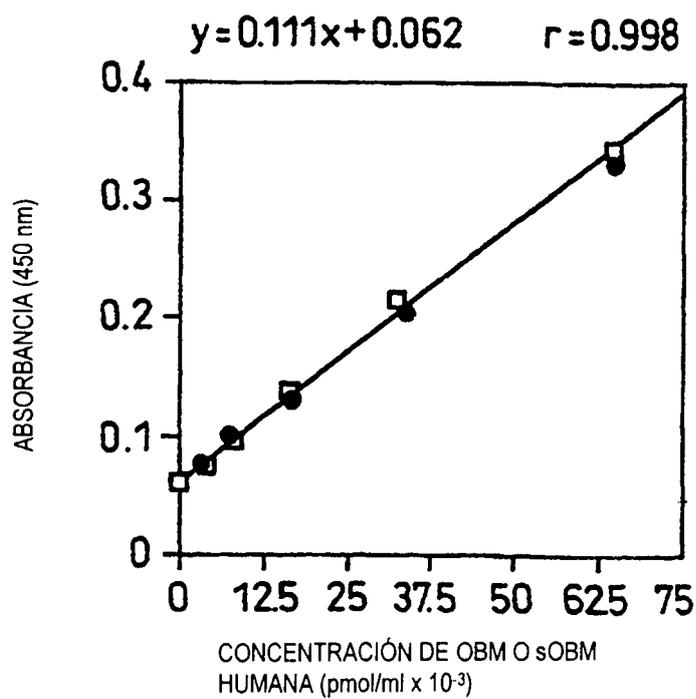


FIG. 27

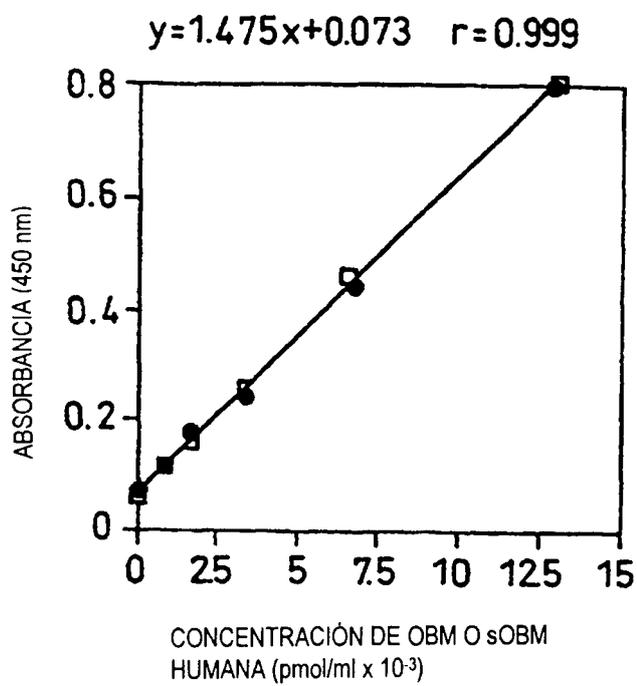


FIG. 28

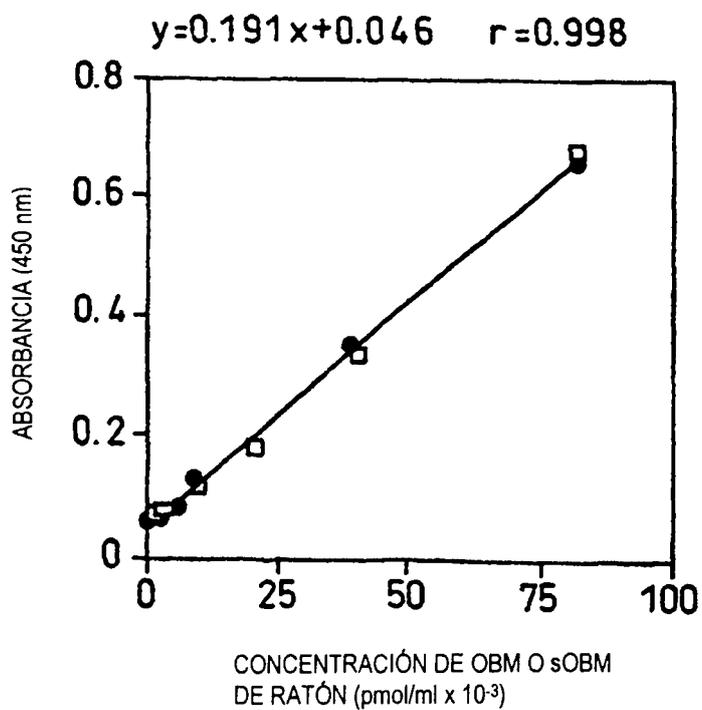


FIG. 29

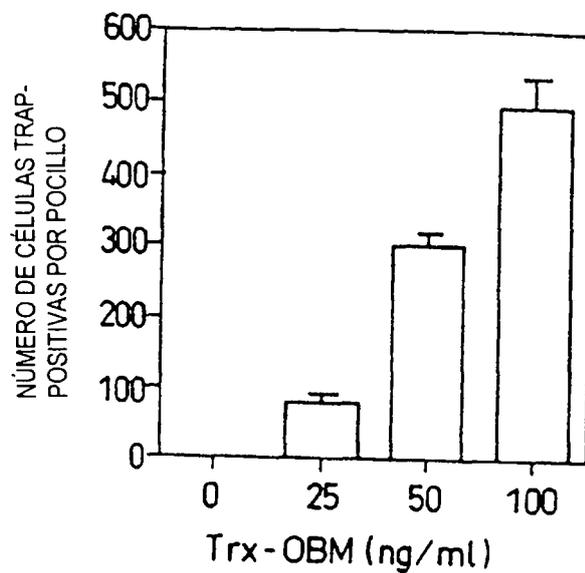
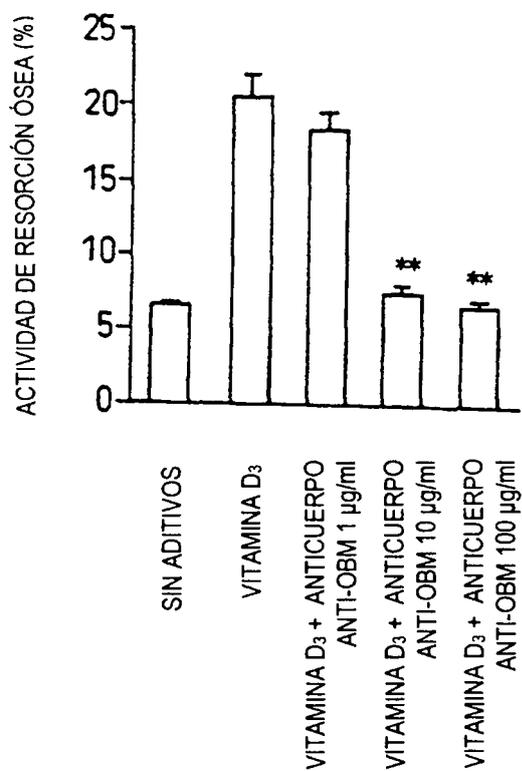


FIG. 30



T

FIG. 31

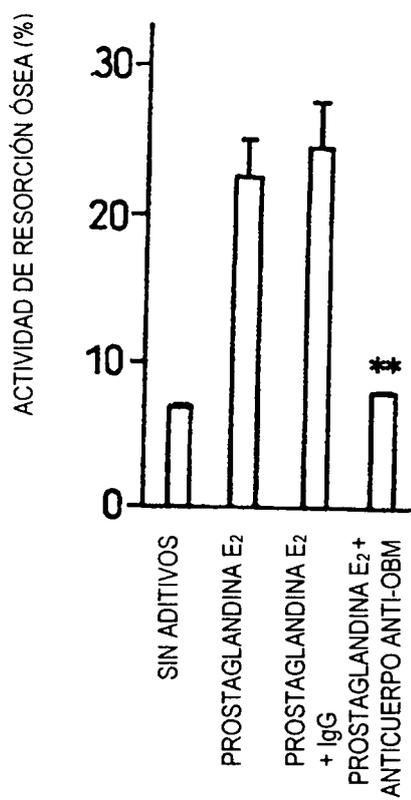


FIG. 32

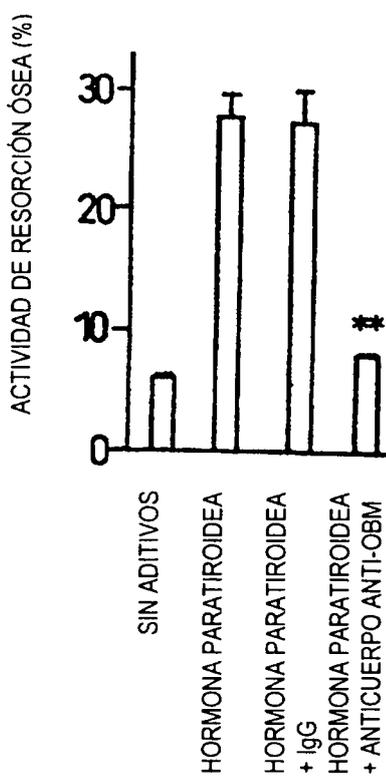
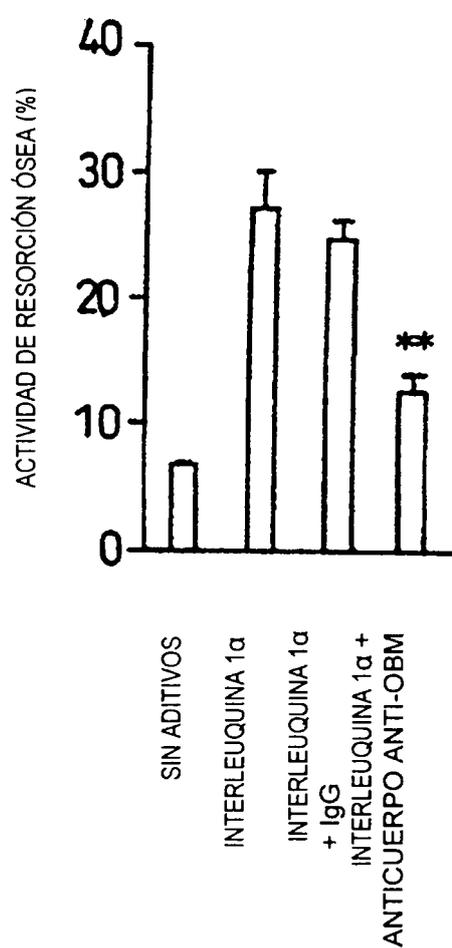


FIG. 33



ES 2 263 204 T3

LISTA DE SECUENCIAS

Secuencia ID No. 1

Longitud de secuencia: 316

Tipo de Secuencia: aminoácido

Clase de cadena: 1

Topología: lineal

Tipo de molécula: proteína

Secuencia:

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

ES 2 263 204 T3

5	Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro Asp Ser Cys Arg Arg Met Lys Gln	110	115	120
10	Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly	125	130	135
15	Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala Met Met Glu Gly Ser Trp	140	145	150
20	Leu Asp Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu Ala Gln Pro Phe Ala	155	160	165
25	His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser His Lys	170	175	180
30	Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile	185	190	195
35	Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp	200	205	210
40	Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu	215	220	225
45	Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr	230	235	240
50	Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met	245	250	255
55	Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His	260	265	270
60	Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly	275	280	285
65				

ES 2 263 204 T3

TGAGGCCAG CCATTTGCAC ACCTCACCAT CAATGCTGCC AGCATCCCAT CGGGTTCCCA 660
 5 TAAAGTCACT CTGTCCTCTT GGTACCACGA TCGAGGCTGG GCCAAGATCT CTAACATGAC 720
 GTTAAGCAAC GGAAACTAA GGGTTAACCA AGATGGCTTC TATTACCTGT ACGCCAACAT 780
 10 TTGCTTTCGG CATCATGAAA CATCGGGAAG CGTACCTACA GACTATCTTC AGCTGATGGT 840
 GTATGTCGTT AAAACCAGCA TCAAAATCCC AAGTTCTCAT AACCTGATGA AAGGAGGGAG 900
 15 CACGAAAAAC TGGTCGGGCA ATTCTGAATT CCACTTTTAT TCCATAAATG TTGGGGGATT 960
 TTTCAAGCTC CGAGCTGGTG AAGAAATTAG CATTCAAGTG TCCAACCCTT CCCTGCTGGA 1020
 TCCGGATCAA GATGCGACGT ACTTTGGGCC TTTCAAAGTT CAGGACATAG ACTGAGACTC 1080
 20 ATTTCTGTTG ACATTAGCAT GGATGTCCTA GATGTTTGGG AACTTCTTAA AAAATGGATG 1140
 ATGTCTATAC ATGTGTAAGA CTACTAAGAG ACATGGCCCA CGGTGTATGA AACTCACAGE 1200
 25 CCTCTCTCTT GAGCCTGTAC AGGTTGTGTA TATGTAAAGT CCATAGGTGA TGTTAGATTC 1260
 ATGGTGATTA CACAACGGTT TTACAATTTT GTAATGATTT CCTAGAATTG AACCAGATTG 1320
 30 GGAGAGGTAT TCCGATGCTT ATGAAAAACT TACACGTGAG CTATGGAAGG GGGTCACAGT 1380
 CTCTGGGTCT AACCCTGGA CATGTGCCAC TGAGAACCTT GAAATTAAGA GGATGCCATG 1440
 35 TCATTGCAAA GAAATGATAG TGTGAAGGGT TAAGTTCTTT TGAATTGTTA CATTGCGCTG 1500
 GGACCTGCAA ATAAGTTCTT TTTTCTAAT GAGGAGAG 1538

40 Secuencia ID No. 3

Longitud de secuencia: 21
 Tipo de Secuencia: ácido nucleico
 Clase de cadena: 1
 45 Topología: lineal
 Tipo de molécula: otro ácido nucleico (DNA sintético)
 Secuencia:

50 AAACGCAAAA AACCAGAAAG G

21

Secuencia ID No. 4

Longitud de secuencia: 17
 55 Tipo de Secuencia: ácido nucleico
 Clase de cadena: 1
 Topología: lineal
 Tipo de molécula: otro ácido nucleico (DNA sintético)
 60 Secuencia:

GTAAAACGAC GGCCAGT

17

65

ES 2 263 204 T3

	Secuencia ID No. 5	
	Longitud de secuencia: 17	
	Tipo de Secuencia: ácido nucleico	
5	Clase de cadena: 1	
	Topología: lineal	
	Tipo de molécula: otro ácido nucleico (DNA sintético)	
	Secuencia:	
10	CAGGAAACAG CTATGAC	17
	Secuencia ID No. 6	
	Longitud de secuencia: 22	
15	Tipo de Secuencia: ácido nucleico	
	Clase de cadena: 1	
	Topología: lineal	
	Tipo de molécula: otro ácido nucleico (DNA sintético)	
20	Secuencia:	
	AAGCCCAA GTACGTCGCA TC	22
	Secuencia ID No. 7	
25	Longitud de secuencia: 26	
	Tipo de Secuencia: ácido nucleico	
	Clase de cadena: 1	
30	Topología: lineal	
	Tipo de molécula: otro ácido nucleico (DNA sintético)	
	Secuencia:	
	CGAAGCTTTC GAGCGCAGAT GGATCC	26
35	Secuencia ID No. 8	
	Longitud de secuencia: 27	
	Tipo de Secuencia: ácido nucleico	
40	Clase de cadena: 1	
	Topología: lineal	
	Tipo de molécula: otro ácido nucleico (DNA sintético)	
	Secuencia:	
45	CCTCTAGAGT CTATGTCCTG AAGTTTG	27
	Secuencia ID No. 9	
	Longitud de secuencia: 20	
50	Tipo de Secuencia: ácido nucleico	
	Clase de cadena: 1	
	Topología: lineal	
	Tipo de molécula: otro ácido nucleico (DNA sintético)	
55	Secuencia:	
	ATCAGAAGAC AGCACTCACT	20
	Secuencia ID No. 10	
60	Longitud de secuencia: 33	
	Tipo de Secuencia: ácido nucleico	
	Clase de cadena: 1	
	Topología: lineal	
65	Tipo de molécula: otro ácido nucleico (DNA sintético)	

ES 2 263 204 T3

Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Phe Ser Asn Gly Lys Leu Ile Val
5 195 200 205

Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His
10 210 215 220

His Glu Thr Ser Gly Asp Leu Ala Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Met Val
15 225 230 235 240

Tyr Val Thr Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Thr Leu Met
20 245 250 255

Lys Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe
25 260 265 270

Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ser Gly Glu Glu
30 275 280 285

Ile Ser Ile Glu Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp
35 290 295 300

Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Arg Asp Ile Asp
40 305 310 315

Secuencia ID No. 12

45 Longitud de secuencia: 954
Tipo de Secuencia: ácido nucleico
Clase de cadena: 1
Topología: lineal
50 Tipo de molécula: cDNA a mRNA
Secuencia:

55

60

65

ES 2 263 204 T3

ATGCGCCGCG CCAGCAGAGA CTACACCAAG TACCTGCGTG GCTCGGAGGA GATGGGCGGC 60
 GGCCCCGGAG CCCCACCGA GGGCCCCCTG CACGCCCCGC CGCCGCCTGC GCCGCACCAG 120
 5 CCCCCTGCCG CCTCCCGCTC CATGTTCTGT GCCCTCCTGG GGCTGGGGCT GGGCCAGGTT 180
 GTCTGCAGCG TCGCCCTGTT CTTCTATTTT AGAGCCGAGA TGGATCCTAA TAGAATATCA 240
 10 GAAGATGGCA CTCACTGCAT TTATAGAATT TTGAGACTCC ATGAAAATGC AGATTTTCAA 300
 GACACAATC TGGAGAGTCA AGATACAAA TTAATACCTG ATTCATGTAG GAGAATTA 360
 15 CAGGCCTTTC AAGGAGCTGT GCAAAGGAA TTACAACATA TCGTTGGATC ACAGCACATC 420
 AGAGCAGAGA AAGCGATGGT GGATGCCTCA TGGTITAGATC TGGCCAAGAG GAGCAAGCTT 480
 GAAGCTCAGC CTTTTGCTCA TCTCACTATT AATGCCACCG ACATCCCATC TGGTTCCCAT 540
 20 AAAGTGAGTC TGTCCTCTTG GTACCATGAT CGGGGTGGG CCAAGATCTC CAACATGACT 600
 TTTAGCAATG GAAAATAAT AGTTAATCAG GATGGCTTTT ATTACCTGTA TGCCAACATT 660
 25 TGCTTTCGAC ATCATGAAAC TTCAGGAGAC CTAGCTACAG AGTATCTTCA ACTAATGGTG 720
 TACGTCACTA AAACCAGCAT CAAAATCCCA AGTTCTCATA CCCTGATGAA AGGAGGAAGC 780
 30 ACCAAGTATT GGTCAGGGAA TTCTGAATTC CATTTTTATT CCATAAACGT TGGTGGATTT 840
 TTTAAGTTAC GGTCTGGAGA GGAAATCAGC ATCGAGTCT CCAACCCCTC CTTACTGGAT 900
 35 CCGGATCAGG ATGCAACATA CTTTGGGGCT TTTAAAGTTC GAGATATAGA TTGA 954

Secuencia ID No. 13

Longitud de secuencia: 27

Tipo de Secuencia: ácido nucleico

Clase de cadena: 1

Topología: lineal

Tipo de molécula: otro ácido nucleico (DNA sintético)

Secuencia:

GGCGTACGCA GAGCGCAGAT GGATCCT

27

Secuencia ID No. 14

Longitud de secuencia: 34

Tipo de Secuencia: ácido nucleico

Clase de cadena: 1

Topología: lineal

Tipo de molécula: otro ácido nucleico (DNA sintético)

Secuencia:

GGGGTTCGACC ATCCAGGAAA TATCATAACA CTCC

34

Secuencia ID No. 15

Longitud de secuencia: 951

Tipo de Secuencia: ácido nucleico

Clase de cadena: 1

Topología: lineal

Tipo de molécula: cDNA a mRNA

Secuencia:

ES 2 263 204 T3

5 ATGCCCGGG CCAGCCGAGA CTACGGCAAG TACCTGCGCA GCTCGGAGGA GATGGGCAGC 60
 GGGCCCGGG TCCCACACGA GGGTCCGCTG CACCCCGCC CTTCTGCACC GGCTCCGGCG 120
 CCGCCACCCG CCGCCTCCCG CTCCATGTTT CTGGCCCTCC TGGGGCTGGG ACTGGGCCAG 180
 10 GTGGTCTGCA GCATCGCTCT GTTCCTGTAC TTTGAGCGC AGATGGATCC TAACAGAATA 240
 TCAGAAGACA GCACTCACTG CTTTTATAGA ATCCTGAGAC TCCATGAAAA CGCAGGTTTG 300
 CAGGACTCGA CTCTGGAGAG TGAAGACACA CTACCTGACT CCTGCAGGAG GATGAAACAA 360
 15 GCCTTTCAGG GGGCCGTCCA GAAGGAACTG CAACACATTG TGGGGCCACA GCGCTTCTCA 420
 20
 GGAGCTCCAG CTATGATGGA AGGCTCATGG TTGGATGTGG CCCAGCCAGG CAAGCCTGAG 480
 GCCCAGCCAT TTGCACACCT CACCATCAAT GGTGCCAGCA TCCCATCGGG TTCCCATAAA 540
 25 GTCACTCTGT CCTCTTGGTA CCACGATCGA GGCTGGGCCA AGATCTCTAA CATGACGTTA 600
 AGCAACGGAA AACTAAGGGT TAACCAAGAT GGCTTCTATT ACCTGTACCG CAACATTGTC 660
 30 TTTGCGCATC ATGAAACATC GGAAGCGTA CCTACAGACT ATCTTCAGCT GATGGTGTAT 720
 GTCGTTAAAA CCAGCATCAA AATCCCAAGT TCTCATAACC TGATGAAAGG AGGGAGCAGC 780
 35 AAAAAGTGGT CGGGCAATTC TGAATTCCAC TTTTATTCCA TAAATGTTGG GGGATTTTTT 840
 AAGCTCCGAG CTGGTGAAGA AATTAGCATT CAGGTGTCCA ACCCTTCCCT GCTGGATCCG 900
 40 GATCAAGATG CGACGTAATT TGGGGCTTTC AAAGTTCAGG ACATAGACTG A 951

Secuencia ID No. 16

Longitud de secuencia: 244

Tipo de Secuencia: aminoácido

Clase de cadena: 1

Topología: lineal

Tipo de molécula: proteína

Secuencia:

55 Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser Glu Asp Ser Thr His Cys Phe
 1 5 10 15
 Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn Ala Gly Leu Gln Asp Ser Thr
 60 20 25 30
 Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro Asp Ser Cys Arg Arg Met Lys Gln
 65 35 40 45

ES 2 263 204 T3

Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Pro
 5 50 55 60
 Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala Met Met Glu Gly Ser Trp Leu Asp
 10 65 70 75 80
 Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr
 15 85 90 95
 Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser
 20 100 105 110
 Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu
 25 115 120 125
 Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr
 30 130 135 140
 Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr
 35 145 150 155 160
 Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile
 40 165 170 175
 Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser
 45 180 185 190
 Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe
 50 195 200 205
 Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser
 55 210 215 220
 Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val
 60 225 230 235 240
 Gln Asp Ile Asp
 65

ES 2 263 204 T3

Secuencia ID No. 17

Longitud de secuencia: 246

Tipo de Secuencia: aminoácido

5 Clase de cadena: 1

Topología: lineal

Tipo de molécula: proteína

Secuencia:

10
Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser Glu Asp Gly Thr His Cys Ile
1 5 10 15

15
Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr
20 25 30

20
Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys Leu Ile Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile
35 40 45

25
Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile Val
50 55 60

30
Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu Lys Ala Met Val Asp Gly Ser Trp
65 70 75 80

35
Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser Lys Leu Glu Ala Gln Pro Phe Ala His
85 90 95

40
Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val Ser
100 105 110

45
Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn Met

ES 2 263 204 T3

GCGCAGATGG ATCCTAACAG AATATCAGAA GACAGCACTC ACTGCTTTTA TAGAATCCTG 60
 AGACTCCATG AAAACGCAGG TTTGCAGGAC TCGACTCTGG AGAGTGAAGA CACACTACCT 120
 5 GACTCCTGCA GGAGGATGAA ACAAGCCTTT CAGGGGGCCG TGCAGAAGGA ACTGCAACAC 180
 ATTGTGGGGC CACAGCGCTT CTCAGGAGCT CCAGCTATGA TGGAAAGCTC ATGTTTGGAT 240
 10 GTGGCCCAGC GAGGCAAGCC TGAGGCCAG CCATTTGCAC ACCTCACCAT CAATGCTGCC 300
 AGCATCCAT CGGGTCCCA TAAAGTCACT CTGTCTCTT GGTACCACGA TCGAGGCTGG 360
 GCCAAGATCT CTAACATGAC GTTAAGCAAC GAAAACTAA GGGTTAACCA AGATGGCTTC 420
 15 TATTACCTGT ACGCCAACAT TTGCTTTCGG CATCATGAAA CATCGGGAAG CGTACCTACA 480
 GACTATCTTC AGCTGATGGT GTATGTCGTT AAAACCAGCA TCAAAATCCC AAGTTCTCAT 540
 20 AACCTGATGA AAGGAGGGAG CACGAAAAAC TGGTCGGGCA ATTCTGAATT CCACTTTTAT 600
 TCCATAAATG TTGGGGGATT TTTCAAGCTC CGAGCTGGTG AAGAAATTAG CATTGAGGTG 660
 25 TCCAACCCCTT CCCTGCTGGA TCCGGATCAA GATCGGACGT ACTTTGGGGC TTTCAAAGTT 720
 CAGGACATAG ACTGA 735

Secuencia ID No. 19

30 Longitud de secuencia: 741
 Tipo de Secuencia: ácido nucleico
 Clase de cadena: 1
 Topología: lineal
 35 Tipo de molécula: cDNA a mRNA
 Secuencia:

40 GCGCAGATGG ATCCTAATAG AATATCAGAA GATGGCACTC ACTGCATTTA TAGAATTTTG 60
 AGACTCCATG AAAATGCAGA TTTTCAAGAC ACAACTCTGG AGAGTCAAGA TACAAAATTA 120
 ATACCTGATT CATGTAGGAG AATTAACAG GCCTTTCAAG GAGCTGTGCA AAAGGAATTA 180
 45 CAACATATCG TTGGATCACA GCACATCAGA GCAGAGAAAG CGATGGTGGG TGGCTCATGG 240
 TTAGATCTGG CCAAGAGGAG CAAGCTTGAA GCTCAGCCTT TTGCTCATCT CACTATTAAT 300
 50 GCCACCGACA TCCCATCTGG TTCCATAAA GTGAGTCTGT CCTCTTGGTA CCATGATCGG 360
 GGTGGGGCCA AGATCTCAA CATGACTTTT AGCAATGGAA AACTAATAGT TAATCAGGAT 420
 55 GGCTTTTATT ACCTGTATGC CAACATTTGC TTTGACATC ATGAAACTTC AGGAGACCTA 480
 GCTACAGAGT ATCTTCAACT AATGGTGTAC GTCATAAAA CCAGCATCAA AATCCCAAGT 540
 60 TCTCATACCC TGATGAAAGG AGGAAGCACC AAGTATTGGT CAGGGAATTC TGAATTCCAT 600
 TTTTATTCCA TAAACGTTGG TGGATTTTTT AAGTTACGGT CTGGAGAGGA AATCAGCATC 660
 GAGGTCTCCA ACCCTCCTT ACTGGATCCG GATCAGGATG CAACATACTT TGGGGCTTTT 720
 65 AAAGTTCGAG ATATAGATTG A 741