

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º** 94 241

**REQUERENTE:** CHIRON CORPORATION, americana, industrial e comercial, com sede em 4560 Horton Street, Emeryville, California 94608, Estados Unidos da América

**EPÍGRAFE:** "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE FACTOR DE CALCIFICAÇÃO ÓSSEA E DE COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS QUE O CONTEM"

**INVENTORES:** MICHAEL C. KIEFER, FRANK R. MASIARZ e PHILIP J. BARR

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

Prioridade nos E.U.A. em 2.6.89 sob o No. 360,826

- 2 -  
*Wifama*

**RESUMO:**

Esta invenção refere-se a uma classe de proteínas de mamíferos naturais maduras que são responsáveis pela iniciação da calcificação e é na presente memória descritiva denominada factor de calcificação óssea (BCF). São compostos representativos desta classe os BCF humano e bovino, para os quais as sequências de codificação de comprimento total são proporcionados. O BCF é obtido pelo isolamento a partir de fontes ósseas e por síntese usando para tal técnicas recombinantes de ADN.

ENQUADRAMENTO GERAL DA INVENÇÃO

É sabido que a matriz óssea desmineralizada provoca a formação de nova massa óssea quando implantada em tecidos macios através de um processo normalmente designado por formação óssea induzida por matriz (ver M.R. Urist, Science, 150: 893 - 899 (1965) ). Têm sido feitos numerosos esforços para extrair e identificar o material activo (ou materiais) que induz este processo, e tem sido normalmente referido na literatura como proteínas morfogenéticas ósseas (BMP). É ainda desconhecido se BMP é uma substância única ou uma mistura de substâncias e não parece haver acordo entre os investigadores sobre que substâncias, se alguma, formam a proteína morfogenética óssea.

O uso terapêutico de BMP oferece vantagens consideráveis em relação ao uso tradicional de materiais de enscerto ósseo. De acordo com uma das hipóteses, admite-se que BMP transforma células tecidulares em osteoblastos (células que produzem tecido ósseo), muito embora não se pretenda ficar limitado por qualquer teoria. Durante um processo que repete o desenvolvimento normal do feto humano os osteoblastos induzidos por BMP formam cartilagem que, durante um período de vários meses evolui transformando-se em tecido ósseo sólido. Assim, o BMP pode ser útil: para substituir tecido ósseo que foi destruído por doença ou acidente, para uso no tratamento de vítimas de escoliose, para tratamento de conformações defeituosas ou deformações ósseas, para uso na soldadura de uma fractura, etc.

Um objectivo da presente invenção é consequentemente o de produzir um factor de calcificação óssea funcional ou um seu componente, o qual é uma proteína com 22KD identificada pela sua sequência de aminoácidos completa, que inicia a calcificação.

Um outro objectivo da presente invenção é o de produzir esta proteína com 22KD biologicamente activa por meio de tecnologia de ADN recombinante.



Um outro objectivo da invenção é ainda o de preparar amostras de ácido nucleico de selecção para isolamento do gene que compreende o BCF com 22 KD.

Outro objectivo da presente invenção é ainda o de proporcionar uma sequência de amino ácidos do BCF com 22 KD maturo que pode então ser preparada por síntese bioquímica directa ou a partir dos amino ácidos constituintes por síntese de péptidos, por exemplo, pelo processo de Merrifield, e particularmente por meio de uso da tecnologia de síntese de péptidos automática.

Estes e outros objectivos da invenção serão evidentes a partir da descrição que se segue das formas de realizações preferidas e a partir da prática da invenção.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona uma classe de proteínas naturais de mamíferos amadurecidas (a classe é denominada na presente memória descritiva por BCF), representada por BCF natural humano e bovino, descrito, que inicia a calcificação em vivo e que é importante para a formação de tecido ósseo. O BCF humano e/ou bovino pode ser usado para identificar e isolar outras proteínas de BCF de mamíferos que podem ser ou não homólogas (nas suas sequências de aminoácidos e de nucleotídeos) ao BCF humano ou bovino e que exibem a actividade biológica do BCF. Reconhece-se que podem existir variações alélicas no BCF dentro duma espécie e tais variantes alélicas encontram-se também dentro do âmbito da classe das proteínas proporcionadas pela presente invenção.

A presente invenção proporciona ainda polipéptidos que são análogos do BCF, tais como muteínas de BCF, proteínas de fusão, compreendendo BCF ou domínios de BCF, e fragmentos de BCF. O termo "proteína de fusão" inclui uma proteína que compreende uma sequência de BCF completa ou um domínio de BCF, e uma sequência N-terminal ou C-terminal heteróloga (tal como uma sequência de sinal ou uma sequência que protege a proteína da degradação). Uma muteína de BCF é uma proteína substancialmente homóloga de uma sequência de BCF natural (por exemplo, um mínimo de cerca de 75%, 85%, 90% ou 95% de homologia) em que pelo menos um aminoácido é diferente. Um fragmento BCF ou um domínio de BCF é uma sequência de aminoácidos de comprimento suficiente obtida a partir de uma proteína de BCF tal que seja identificável como tendo sido derivada dessa proteína de BCF. A origem de um péptido particular pode ser determinada, por exemplo, por comparação da sua sequência com a das bases de dados públicas.

A presente invenção proporciona ainda um factor de calcifica-

*Wif...* - 4 -

ção de tecido ósseo de 22 KD que possui as sequências de aminoácidos humana e bovina, representadas na Figura 1. A presente invenção proporciona também processos para a preparação do factor de calcificação de tecido ósseo de 22 KD (BCF) por meio de técnicas de ADN recombinantes.

A presente invenção proporciona a sequência de ADN que codifica BCF, que pode ser usada para construir vectores para expressão em sistemas hospedeiros por meio técnicas de ADN recombinantes.

A presente invenção proporciona ainda composições terapêuticas que compreendem BCF e a proteína Gla de matriz (MGP) para iniciar a calcificação, e processos para a indução da calcificação em vertebrados por introdução in vivo no sítio desejado de uma quantidade de BCF e MGP efectiva para iniciação de calcificação. A identidade de MGP foi primeiramente registada por Price, Urist e Otawara em Biochem. Biophys. Res. Lomm. 117:765-771 (1983).

#### DESCRIÇÃO BREVE DOS DESENHOS

A figura 1 representa as sequências de ADN e as sequências de aminoácidos codificadas de BCF humano e bovino incluindo as suas sequências de sinal;

A figura 1A representa a sequência de aminoácidos do BCF humano (HBCF) sem o seu péptido de sinal;

A figura 1B representa a sequência de aminoácidos do BCF bovino (bBCF) sem o seu péptido de sinal;

A figura 1C representa a sequência de ADN que codifica hBCF sem a sua sequência de sinal;

A figura 1D representa a sequência que codifica bBCF sem a sua sequência de sinal;

A figura 2 ilustra a sequência do fragmento Truptico do BCF humano nº. 41, uma amostra de oligonucléotidos de dobra dupla de 45 meros de generada (amostra A), e uma segunda amostra B, concebida a partir dela consistindo em 64 conjunto de 18-meros que são comple-

mentares de todos os codões possíveis representados.

A figura 3 ilustra a amostra C (derivada do clone Ost 3-7) e quatro clones de cDNA de BCF isolados de uma biblioteca de cDNA bovino (bbl.1-7) e duas bibliotecas de cDNA de osteossarcoma humano (ost 1-7, Ost 3-7 e Ost 3-17). O comprimento, a região de codificação envolvida numa caixa, e o mapa de restrição parcial dos clones estão também incluídos. Os sítios NcoI e SpeI (\*) estão apenas presentes nas sequências de BCF humano;

A figura 4 ilustra adaptadores de oligonucleótidos (envolvidos numa caixa) usados para preparar vectores de expressão de BCF que são segregados a partir de levedura usando o péptido de sinal do x-factor;

A figura 4A ilustra a junção entre o ADN que codifica BCF e o promotor num vector de expressão usado para expressar BCF não segregado na levedura;

A figura 5, 6 e 7 são fotomicrográficas das bolsas do músculo quadríceps de ratos, 21 dias após a implantação de um composto do recombinante hBCF e MGP, mostrando a iniciação de calcificação.

#### DESCRIÇÃO PORMONORIZADA DA INVENÇÃO

O BCF de acordo com a presente invenção pode ser obtido, isento de outros factores osteoindutores associados, directamente a partir de fontes ósseas, por síntese preparativa de péptidos (tal como o processo de síntese de Merrifield) ou por tecnologia de ADN recombinante.

Tal como se descreve mais especificamente no exemplo 1, o BCF pode ser obtido por purificação a partir de tecido ósseo bovino, humano ou de outros vertebrados, a partir de extractos parcialmente purificados (por exemplo, Patente Norte-Americana 4.795.804 e referências nela citadas) por meio de electroforesse preparativa em gel e electroeluição de proteína 22 K.

O BCF pode também ser obtido por métodos de ADN recombinantes,

tal como por selecção de transcritos inversos de mANR, ou por selecção de bibliotecas genómicas a partir de qualquer célula. O ADN pode também ser obtido por simples síntese do ADN usando as técnicas vulgarmente disponíveis e os dispositivos de síntese de ADN. A síntese pode ser vantajosa porque podem ser introduzidos sitios de restrição únicos no momento em que se faz a preparação do ADN, facilitando conseqüentemente o uso do gene em vectores que contêm os sitios de restrição que, de outra forma, não estão presentes na fonte natural. Além disso, qualquer modificação do sitio desejada no ADN pode ser introduzida por síntese, sem que haja a necessidade de modificar adicionalmente o ADN por mutagénese.

Em geral, ADN que codifica BCF pode ser obtido a partir de fontes humanas, bovinas ou outras através da construção de bibliotecas de cADN a partir de mARN isolado a partir de ossos de vertebrados; e seleccionando com amostras de ADN marcadas que codificam porções ou cadeias derivadas de seres humanos com o fim de detectar clores na biblioteca de cADN que contém sequências homólogas; ou por amplificação por reacção em cadeia com polimerase (PCR) do cADN (a partir de mARN) e subclonação e selecção com amostras de ADN marcadas; e analisando então os clores por análise de restrição enzimática e sequenciamento dos ácidos nucleicos a fim de identificar clores de comprimento completo e, se os clores de comprimento completo não estiverem na biblioteca a recuperação dos fragmentos apropriados a partir dos vários clores e a sua ligação em sitios de restrição comuns aos clores para se obter um clore que codifica uma molécula de comprimento completo. Amostras de ADN particularmente preferidas são referidos nos Exemplos seguintes. Quaisquer sequências que faltam na biblioteca podem ser obtida pela extensão em 3' no mARN complementar de oligodesoxipucleótidos sintéticos e identificados por selecção de cADN na biblioteca denominada extensão primária ou sequências homólogas podem ser obtidas a partir de cADN derivados de sequências humanas ou bovinas tal como se mostra na Figura 1.

A realização prática da presente invenção, usa a não ser que se indique outra forma usa técnicas de biologia molecular convencional, microbiologica e técnicas recombinantes de ADN que são do conhecimento dos peritos da técnica. Estas técnicas estão completamente explicadas na literatura. Ver exemplo, Maniatis, Fritsch & Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1982); "DNA Cloning: A Practical Approach, "Vol I e II (D.N. Glover ed. 1985); " Oligonucleotides Synthesis" (M.J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" (B.D. Hames & S.J. Higgins, edicon 1985); "Transcription And Translation" (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney ed. 1986); "Imobilized Cells And Enzymes" (IRL Press, 1986); B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Clo-



ning " (1984).

Na descrição da presente invenção, usa-se a seguinte terminologia de acordo com as definições estabelecidas abaixo.

A expressão "factores osteoindutores associados" incluem factores conhecidos na técnica que estão presentes no tecido ósseo de mamíferos ou em outros tecidos de mamíferos e tendem a copurificar-se com BMP ou com a actividade de BMP. Tais factores incluem proteínas que foram isoladas a partir de tecido ósseo tendo pesos registados de 34KD, 24KD, 18,5KD, 17,5KD, 17KD, 16,5KD, 14KD (tal como é referido na Patente Norte-Americana Nº. 4.761.471) e 6KD (referido por P.A. Price., et al., de PNAS, 73, pág. 1447-1451, 1976).

Um "replição" é qualquer elemento genético (por exemplo, plasmideo, cromossoma, vírus) que funciona como uma unidade autónoma da replicação de ADN in vivo, isto é, capaz de replicação sob o seu próprio controlo.

Um "vector" é um replição, tal como um plasmideo, fago ou cosmideo, ao qual pode ser ligado um outro segmento ADN para originar a replicação do segmento ligado.

Uma "molécula ADN de dupla cadeia" refere-se à forma polimérica de desoxiribonucleótidos (adenina, guanina, timina ou citosina) com o seu aspecto de dupla hélice normal. Este termo refere-se apenas às estruturas primárias e secundárias da molécula e não se limita a quaisquer formas terciárias particulares. Assim, este termo inclui ADN de cadeia dupla encontrado, inter alia, em moléculas de ADN lineares (por exemplo, fragmentos de restrição), vírus plasmídeos e cromossomas. Discutindo a estrutura das moléculas de ADN de dupla cadeia particulares, as sequências podem ser descritas de acordo com as convenções normais em que apenas se indica a sequência no sentido 5' para 3' ao longo da cadeia não transcrita de ADN (isto é, a cadeia que possui uma sequência homóloga à do mRNA).

Uma "sequência que codifica" ADN é a porção duma sequência de ADN cujo transcrito é transportado para um polipéptido in vivo quando colocado sob o controlo de sequências de regulação apropriadas. A cadeia de ADN complementar será entendida como sendo aquela que é transcrita. As fronteiras das sequências que codificam são determinadas por um codão de iniciação na extremidade 5' (amino) e um codão de interrupção de passagem na extremidade 3' (carboxi). Uma sequência que codifica pode incluir, mas não se limita a sequências procarióticas, CADN de mRNA eucariótico, sequências de ADN genómicas de ADN eucariótico (por exemplo, de mamíferos), e mesmo sequências sintéticas de ADN. Uma sequência de sinal de poliadenilação e de interrupção de transcrição localizera-se-á em 3' de sequência que codifica.

*Wifama*

Uma "sequência promotora" é uma região de regulação de ADN capaz de ligar ARN polimerase numa célula e iniciar a transcrição de uma sequência que com a jusante (sentido 3'). Para propósitos de definição da presente invenção, a sequência promotora é ligada na sua extremidade 3' pelo codão de início de passagem de uma sequência que codifica e prolonga-se para montante (sentido 5') para incluir o número mínimo de bases ou de elementos necessários para iniciar a transcrição a níveis detectáveis acima da base. Dentro da sequência promotora, encontrar-se-á um sítio de iniciação de transcrição (convenientemente definida por mapeamento com a nuclease S1), bem como domínios de ligação de proteínas (sequências de consenso) responsáveis pela ligação da ARN polimerase. Promotores encarióticos compreenderão frequentemente, mas nem sempre, caixas "TATA" e caixas "CAT". Os promotores procarióticos compreendem sequências de Shine - Dalgarno em adição às sequências de consensos - 10 e - 35.

A sequência que codifica está "sob o controlo" da sequência promotora numa célula quando a ARN polimerase que liga a sequência promotora transcreve a sequência que codifica para mRNA é então por sua vez passado para a proteína codificada pela sequência de codificação.

Uma célula foi "transformada" por ADN exógeno quando este é introduzido na membrana celular. O ADN exógeno pode ou não ser integrado (ligado por covalência) ao ADN cromossómico, produzido o génome da célula. Em procarionotas e levedura, por exemplo, o ADN exógeno pode ser mantido num elemento episomal, tal como um plasmídeo. No que se refere a células encarióticas, uma célula transformada estavelmente é aquela em que o ADN exógeno ficou integrado num cromossoma de maneira que é passado para as células filhas através da replicação cromossómica. Esta estabilidade é demonstrada pela capacidade de as células encarióticas estabelecerem linhas de células ou clones compreendidos numa população de células filhas que contêm o ADN exógeno. Um "clone" é uma população de células derivadas de uma única célula ou célula "antepassado" comum por mitose. Uma "linha de células" é um clone de uma célula primária que é capaz de possuir crescimento estável in vitro durante várias gerações.

As sequências de ADN são "substancialmente homólogas" quando pelo menos cerca de 85% (de preferência cerca de pelo menos 90%, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 95%) dos nucleotídeos se correspondem ao longo do comprimento definido das sequências de ADN. As sequências que são substancialmente homólogas podem ser identificadas numa experiência de hibridização Southern, por exemplo, sob condições restritas, como são definidas para este sistema específico. A definição de condições de hibridização apropriadas está dentro do âmbito do perito de téc-

*W. J. ...*

nica. Ver, por exemplo Maniatis et al., Supra; DNA Cloning, Vols. I e II, Supra; Nucleic Acid Hybridization, Supra.

Uma região "heteróloga" da construção de ADN é um segmento identificável de ADN dentro de uma molécula de ADN maior, que não é encontrada em associação com a molécula maior na natureza. Assim quando a região heteróloga codifica um gene de mamífero, o gene será normalmente flanqueado pelo ADN que não flanqueia o ADN genómico de mamíferos no génoma do organismo de origem. Um outro exemplo de uma sequência de codificação heteróloga é uma construção onde a sequência que codifica por si só não é encontrada na natureza (por exemplo, um ADNc onde a sequência genómica que codifica compreende intrões, ou sequências sintéticas que compreendem cordões diferentes dos do gene nativo). Variações alélicas ou acontecimentos mutacionais que ocorrem naturalmente não originam o aparecimento de regiões heterólogas de ADN como aqui se definiram.

Uma composição compreendendo "A" ( em que "A" é uma proteína simples, uma molécula de ADN, um vector, etc.) é essencialmente isenta de "B" (em que "B" compreende uma ou mais proteínas contaminantes, moléculas de ADN, vectores, etc.) quando pelo menos cerca de 75% em peso de proteínas, ADN, vectores (dependendo da categoria das espécies às quais pertencem A e B) na composição é "A". de preferência "A" compreende pelo menos cerca de 90% em peso das espécies A+B na composição, preferencialmente pelo menos cerca de 99% em peso. É também preferido que uma composição, que é essencialmente isenta de contaminação, compreende apenas uma espécie única de peso molecular possuindo a actividade, ou característica, de espécie de interesse.

Tal como será descrito mais pormenorizadamente nos Exemplos que se seguem, as bibliotecas de cADN bovino e humano foram inicialmente amostradas quanto a sequências que codificam as sequências BCF. usando para tal oligodesoxilucleotídeos marcados cujas sequências eram baseadas numa sequência parcial de aminoácido determinada a partir de análises de amostras de proteínas purificadas obtidas a partir do tecido ósseo aqui descrito. No entanto, note-se que, uma vez que se disponha de ADN não-cromossómico que codifica o BCF humano e bovino e as suas sequências principais, como aqui se descreve, um perito na técnica reconhecerá que podem ser preparadas outras amostras que hibridizam com precisão, a partir das sequências descritas, no sentido de obter prontamente os restantes genes humanos ou bovinos desejados.

O ADN não-cromossómico proporcionado pela presente invenção é novo, pois acredita-se que os genes (cromossómicos) bovinos e humanos que ocorrem naturalmente compreendem intrões (sequências transcritas, cujos aminoácidos correspondentes não apare-

Wifaria<sup>10</sup> -

- cem nas proteínas maduras). Assim, o termo "não cromossômico" exclui as sequências de ADN que ocorrem naturalmente nos cromossomas das células de bovinos e humanos. A presente invenção abrange também as sequências de cADN não cromossômica deriváveis das sequências de ADN aqui representadas.

Os vectores são usados para ampliar o ADN que codifica as cadeias, tanto no sentido de preparar quantidades de ADN para posterior processamento (vectores de clonagem) como para expressão das cadeias (vectores expressão). Os vectores compreendem plasmídeos, vírus, (incluindo fagos), e fragmentos de ADN integráveis, isto é, fragmentos que são integráveis no genoma do hospedeiro por recombinação. Os vectores de clonagem não necessitam de conter sequências de controlo de expressão. No entanto, as sequências de controlo num vector de expressão incluem um promotor de transcrição, uma sequência operadora opcional para controlar a transcrição, uma sequência que codifica sítios de ligação ribossômica de rARN adequados (para expressão procariótica), e sequências que controlam a terminação da transcrição e passagem. O vector de expressão deverá incluir de preferência um gene de selecção para facilitar a expressão estável do BCF e/ou para identificar transformantes. No entanto, o gene de selecção para manter a expressão pode ser fornecido por um vector separado em sistemas de co-transformação, usando células hospedeiras encarióticas.

Vectores adequados geralmente contêm replicões (origens de replicação, para uso nos vectores não integradores e sequências de controlo que são obtidas a partir de espécies compatíveis com o hospedeiro de expressão pretendido. O termo vector "replicável", tal como aqui é usado, entende-se como abrangendo vectores que compreendem tais replicões, bem como vectores que são replicados por integração num genoma de hospedeiro. As células hospedeiras transformadas são células que foram transformadas ou modificadas com vectores que compreendem BCF que codifica o ADN. O BCF expresso será depositado intracelularmente ou segregado tanto para o espaço periplasmático como para sobrenadante da cultura, dependendo da célula hospedeira seleccionada e da presença de sinais de processamento adequados nos peptídeos expressos, por exemplo sequências de sinal homólogas ou heterólogas.

As células hospedeiras adequadas são procariotes ou células encarióticas. Os procariotes incluem organismos Gram negativos ou Gram positivos, por exemplo E. Coli ou bacilos. As células encarióticas incluem fungos, células encarióticas superiores, tais como as linhas de células estabelecidas de origem em mamíferos, ou de células de insectos. A expressão em células de insectos pode ser executada usando células hospedeiras e vectores de expressão em insectos, como é revelado por Luchow, V.A., e Summers M.B. Biotechnology 6:47 - 55 (1976).

Os vectores de expressão para células hospedeiras incluem normalmente uma origem de replicação, um promotor localizado a montante relativamente à sequência que codifica o BCF, em conjunto com um sítio de ligação de ribossomos, um sítio de poliadenilação, e uma sequência de terminação de transcrição. Os peritos na técnica compreenderão que algumas destas sequências não são exigidas para expressão em certos hospedeiros. Um vector de expressão para uso com micróbios necessita apenas de compreender uma origem de replicação pelo hospedeiro, um promotor que seja activo no hospedeiro e um gene de selecção.

Um vector de expressão é construído de acordo com a presente invenção de forma que a sequência que codifica BCF esteja localizada no vector com as sequências de regulação apropriadas, sendo o posicionamento e a orientação da sequência que codifica, no que diz respeito às sequências de controlo tais que a sequência de codificação seja transcrita sob "controlo" das sequências de controlo (isto é o ARN polimerase que se liga à molécula de ADN nas sequências de controlo transcreve a sequência da codificação).

As sequências de controlo podem ser ligadas à sequência de codificação anteriormente à inserção num vector, tal como os vectores de clonação acima descritos. Alternativamente, a sequência de codificação pode ser clonada directamente num vector de expressão que contém já as sequências de controlo e um sítio de restrição apropriada. Para expressão do BCF em procariotes e leveduras, as sequências de controlo serão necessariamente heterólogas relativamente às sequências de codificação. Se a célula hospedeira é um procariote, é também necessário que a sequência de codificação seja isenta de intrões (por exemplo, cADN). Se a célula hospedeira escolhida for uma célula de um mamífero, as sequências de controlo podem ser heterólogas ou homólogas relativamente à sequência que codifica BMP, e a sequência de codificação pode ser ou ADN genómico compreendendo intrões, ou cADN. Tanto as sequências genómicas como sequências que codificam cADN podem ser expressas em leveduras.

Os vectores de expressão têm que conter um promotor que seja reconhecido pelo organismo hospedeiro. Os promotores comumente conhecidos e disponíveis que são usados na construção de ADN recombinantes incluem B-lactamases (penicilinase) e sistemas promotores de lactose, um sistema promotor de triptofano (trp) e o promotor tac. Embora estes sejam comumente usados, outros promotores microbianos conhecidos são também adequados.

Em adição aos procariotes, as células encarióticas, tais como leveduras são transformadas com vectores que codificam BCF. A Sacharomyces cerevisial, ou o fermento de padeiro comum, é o microorganismo mais comumente usado entre os hospedeiros encarióticos inferiores. No entanto numerosas outras espécies estão

comumente disponíveis e são aqui úteis. Os vectores de leveduras contêm normalmente uma origem de replicação de plasmídeos da levedura com 2 microns ou uma sequência de replicação autónoma (ARS), um promotor, ADN que codifica BCF, sequências para poliadenilação e terminação de transcrição, e um gene de selecção.

As sequências de promoção adequadas em vectores de leveduras incluem os promotores para as enzimas glicolíticas, tais como emolase, 3-fosfoglicerato cinase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, hexocinase, piruvato descarboxilase, fosfofructocinase, glucose-6-fosfato isomerase, 3-fosfoglicerato mutase, piruvato cinase, triosefosfato isomerase, fosfoglucose isomerase, e glucocinase.

Outros promotores de leveduras, que possuem a vantagem adicional da transcrição controlada pelas condições de crescimento são as regiões de promotor para álcool desidrogenase 1 ou 2, isocitocroma C, fosfatase ácida, bem como as enzimas responsáveis pela utilização da maltose e da galactose.

Podem ser usadas culturas de células encarióticas superiores, quer as células de vertebrados que as de invertebrados, incluindo insectos, e as técnicas de sua propagação são conhecidas. Ver por exemplo, Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Paterson, editors (1973).

As células hospedeiras adequadas para expressão de BCF em encariotes superiores incluem: linha CVI de rim de macaco transferida por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); células de rim de hamster jovem (BHK, ATCC CRL 10); células de ovários de hamster chinês - DHFR (descrita por Urlaub e Chemin, PNAS (USA) 77: 4216 (1980)); células "sertoli" de rato (TM4, Mather, J.P., Biol.Reprod. 23: 243-251 (1980)); células de rim de macaco (CVI ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde africano (Vero-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de rim de cães (MDCK, ATCC CCL 34); células de fígado de rato búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmão humano (W 138, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor da mama do Rato (MMT 060652, ATCC CCL 51); células de hepatoma de Rato (HTC, M1, 54, Baumann, M., et al., J. Cell. Biol. 85: 1-8 (1980) e células TRI (Mather, J.P., et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44 - 68 (1982)). Os promotores comumente usados são obtidos a partir de poliovírus, Adenovírus 2, e Simian Virus 40 (SV40). Note-se que, quando expresso em tecidos de mamíferos, o BCF recombinante pode ter um peso molecular mais elevado devido à glicosilação. Pretende-se consequentemente que as formas glicosiladas, parcial ou completamente, do BCF que possuem pesos moleculares maiores do que é devido ao esqueleto de aminoácido sejam considerados no âmbito da invenção.

— Numerosos vectores de expressão procarióticos são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Patentes Americanas N<sup>o</sup>s. 4.440.859; 4.436.815; 4.431.740; 4.431.739; 4.428.941; 4.425.437; 4.418.149; 4.411.994; 4.366.246; 4.342.832; ver também Publicações Inglesas N<sup>o</sup>s. GB 2.121.054; GB 2.008.123, GB 2.007.675; e a Memória Descritiva Europeia N<sup>o</sup>. 103.395. Os sistemas de expressão procarióticos preferidos encontram-se na E. Coli. Outros vectores de expressão preferidos são aqueles para uso em sistemas encarióticos. Um sistema de expressão encariótico para exemplo é aquele que usa o virus vaccinia, o qual é bem conhecido na técnica. Ver por exemplo Macket et al. (1984) J. Virol 49 : 857; " DNA Cloning " Vol. II, pp. 191-211, Supra; PCT Pub. No. W0 86/07593. Os Vectores de expressão de leve duras são conhecidos na técnica. Ver por exemplo as Patentes Americanas N<sup>o</sup>s. 4.446.235; 4.443.539; 4.430.428; ver também as Publicações Europeias N<sup>o</sup>s. 103.409; 100.561; 96.491. Um outro sistema de expressão é o vector pHS1, que transforma células ovárias de hamster chinês. O uso do vector é descrito na PCT Pub. N<sup>o</sup>. W0 87/02062, cuja descrição aqui é incorporada como referência.

Os tecidos de mamíferos podem ser cotransformados com ADN que codifica um marcador seleccionável, tal como o di-hidrofolato reductase (DHFR) ou timidina cinase e ADN que codifica BCF. Se se empregar proteína DHFR de tipo selvagem, é preferível escolher uma célula hospedeira que seja deficiente em DHFR, permitindo assim o uso da sequência de codificação de DHFR como marcador para uma transferência bem sucedida num meio hgt-, ao qual falta a hipoxantina, glicina, e a timidina. Uma célula hospedeira apropriada neste caso é a linha de células de ovário de hamster chinês (CHO) deficiente em actividade DHFR, preparada e propagada como é descrito por Urlaub e Chamin, 1980, Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 77 : 4216.

Recentemente, os vectores de expressão obtidos a partir de Bacchovirus para uso em células de insectos tornaram-se conhecidos na técnica.

Dependendo do sistema de expressão e do hospedeiro seleccionado, o BCF é produzido cultivando células hospedeiras transformadas por um vector de expressão acima descrito, sob condições em que a proteína do BCF é expressa. A proteína enzimática é então isolada a partir das células hospedeiras e purificada. Se o sistema de expressão segregar o enzima no meio de crescimento, a proteína pode ser purificada directamente a partir de um meio isento de células. Se a proteína de BCF não for segregada, é isolada a partir do lisado de células. A selecção das condições de cultura apropriadas e dos métodos de recuperação estão no âmbito dos peritos da técnica.

— O BCF produzido por técnica recombinante é recuperada a partir

de células transformadas de acordo com técnicas conhecidas por si será usado de preferência um vector de expressão que promova a secreção do BCF a partir de células transformadas, deste modo as células podem ser separadas por centrifugação. O BCF normalmente é purificado por técnicas gerais de purificação de proteínas, compreendendo, mas não de forma limitativa, a exclusão dimensional, cromatografia por permuta iónica, HPLC e semelhantes.

Assim que tiver sido preparada ou isolada uma sequência que codifica o BCF, esta pode ser clonada em qualquer vector ou replicação adequado e deste modo mantida numa composição que é essencialmente isenta de vectores que não contêm uma sequência que codifica BCF (por exemplo isento de outros clones da biblioteca). Numerosos vectores de clonagem são conhecidos pelos procedimentos na técnica. Os exemplos de vectores de ADN recombinante para clonagem e de células hospedeiras que eles podem transformar compreendem os varios vectores lambda bacteriofagos (E. Coli) pBR322 (E. coli), pACYC177 (E.coli), pKT 230 (bactéria gram negativa), pGV1106 (bactéria gram negativa), pLAFR1 (bactéria gram negativa), pME 290 (não-E.coli bactéria gram negativa), pHV14 (E.coli e Bacillus subtilis), pBD9 (Bacillus), pIJ61 (Streptomyces), pUC6 (Streptomyces), actimofago, ØC31 (Streptomyces), YIpS (Saccharomyces), YCp19 (Saccharomyces), e virus do papilome bovino (células de mamíferos). Ver principalmente, DNA Cloning: Vols I e II, Supra.; T. Maniatis et al, Supra; B. Perbal, Supra.

Considera-se ainda que os fragmentos de BCF de iniciação da calcificação estão dentro do âmbito da presente invenção. Tais fragmentos activos podem ser preparados, por exemplo, por digestão por pepsina do BCF. Os fragmentos activos podem ser identificados por ensaios in vivo e/ou in vitro descritos adiante. Em alternativa o BCF pode ser preparado por síntese peptídica convencional usando para tal os princípios de síntese de Merrifield e de preferência usando dispositivos automáticos comerciais projectados para aplicar a técnica de síntese de Merrifield. Os peptídeos preparados por meio desta técnica podem ser purificados utilizando a cromatografia de afinidade convencional, filtração por gel e/ou RP-HPLC.

A Figura 1 apresenta a sequência de nucleotídeos alinhados e as sequências de aminoácidos deduzidas para os BCF tanto humano como bovino, para a identidade máxima da sequência de aminoácidos. Os aminoácidos que não se conservam em ambas as espécies estão colocadas dentro de um retângulo. O suposto codão de iniciação está localizado na posição - 17, seguindo por um grupo de aminoácidos que apresentam as características de forte hidrofobicidade dos peptídeos de sinal. A seta indica um possível sitio de clivagem do peptídeo de sinal. As possíveis proteínas maduras começam na posição 1 (Gln), e compreendem 183

aminoácidos, dos quais 96,2% são idênticos. O peso molecular calculado do BCF humano é de 21.967 e o do BCF bovino é de 21.984. As sequências sublinhadas são aquelas a partir das quais se obtiveram as amostras de oligonucléotidos.

O BCF substancialmente puro, as suas formas glicolisadas de peso molecular superior, ou os seu fragmentos activos, ou os seus sais não tóxicos, combinados com uma substância veicular farmacêuticamente aceitável, de modo a formarem uma composição farmacêutica, podem ser administrados a mamíferos, incluindo o homem, tanto por via intravenosa, como por via sub-cutânea, por-cutânea, intremuscular ou oral.

Tais proteínas são requentemente administrados sob a forma de sais não tóxicos farmacêuticamente aceitáveis, tais como sais de adição de ácido ou complexos metálicos, por exemplo com Zinco, ferro ou semelhante (que são considerados como sais para os propósitos da invenção) São representativos de tais sais de adição de ácido: cloridato, bromidato, sulfato, fosfato, maleato, acetato, citrato, benzoato, succinato, maldito, ascorbato, tartarato e semelhantes. Se o ingrediente activo por administrado sob a forma de comprimido, este deve compreender um agente ligante, tal como o tragacanto, amido de milho ou gelatina; um agente de desintregração, tal como o ácido alginico; e um lubrificante, tal como o estearato de magnésio. Se se desejar a administração sob a forma líquida, é desejável o uso de um edulcorante e/ou aromatizante, e pode efectuar-se a administração intravenosa em soro fisiológico isotónica soluções tampão de fosfato ou semelhantes.

As composições farmacêuticas normalmente compreenderão uma quantidade efectiva de BCF em conjunto com uma substância veicular convencional farmacêuticamente aceitável. A dosagem variará em função do fim específico para o qual a proteína é administrada, e podem ser usados níveis de dosagem compreendidos no intervalo entre cerca de 0,1mg a cerca de 100mg por KG de peso corporal.

Os implantes do BCF recombinantes, quando misturados com a proteína Gla de matriz (MGP) (ver Exemplo 7), iniciação a calcificação. O BCF tanto pode ser humano ou bovino, como pode ser uma das suas misturas. Similarmente, o MGP pode ser qualquer forma de mamífero, de preferência humana, bovina ou suas misturas. A proteína Gla de matriz (MGP) pode ser isolada no decorrer da preparação de proteína morfogenética do tecido ósseo (BMP) a partir de tecido ósseo cortical de bovino, gelatinado e desmineralizado, pelos processos de Urist et al. [Ver: Price et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 73 : 1447, 1976; Urist, M.R.,

Heo, Y.K. Brownell, A.G., Hohl, W.M. Buyske, J., Lietze, A., Tempst, P., Humkapillar, M., e de Lange, R.J.: Purification of bovine

bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. Proc. Natl Acad. Sci.: 81:371-375, 1984 e Urist, M.R., Chang, J.J., Lietzes, A., Huo, Y.K. Brownell. A.G., e De Lange, R.J.: Methods of preparation and bioassay of bone morphogenetic protein and polypeptide fragments. In: Barnes, D., e Sirbaska, D.A. (eds): Methods in Enzymology, vol. 146. New York, Academic Press, 1987, pags 294-312]. Uma preparação que compreende MGP é primeiramente separada de outras proteínas de matriz de tecido ósseo por ultrafiltração por fibras ôcas através de um filtro cujo tamanho de poros é 10K. Sob condições de dissociação em ureia 6M e ácido edético 0,02M (EDTA), o MGP assume uma estrutura alongada em que as proteínas com um peso molecular compreendido entre 14K a 15K passam através do filtro 10K. O MGP é posteriormente purificado por cromatografia de permuta iônica (Berg, R.A. In: Methods in Enzymology, 1982, vol. 82 :372.398).

Além disso, para iniciar a calcificação o BCF e o MGP podem ser misturados com qualquer combinação de uma ou mais proteínas, particularmente, com uma ou mais proteínas obtidas a partir do tecido ósseo. Tais misturas podem não só iniciar a calcificação, mas induzem também a formação de cartilagem e o crescimento ósseo.

Implantas de misturas de BCF e MGP induzem a calcificação no compartimento dos quadricapes. O CADN de BCF pode ser utilizado num teste de diagnóstico para identificação de indivíduos que possuem genes BCF defeituosos, BCF defeituoso ou autoanticorpos dirigidos contra o BCF; ou para detectar níveis de BCF que podem indicar uma osteoporose.

As preparações de BCF podem ser testados in vivo de acordo com o processo descrito por Urist et al., Methods in Enzymology (D. Barnes and D.A. Sirbaska, Eds.), Vol. 146, pp. 294-312, Academic Press, N.Y. (1987) e in vitro pelo processo de Sato and Urist, Clin. Orthop., 183:180-187 (1984) modificado por Kawamura e Urist, Dev. Biol. 130:435-442 (1988), sendo todos estes aqui mencionados como referência.

É preferível que o BCF seja misturado com a proteína Gla de matriz (MGP) para formar um sistema de propagação compreendendo estas duas proteínas. Não se crê que a quantidade MGP na composição seja crítica e por conveniência. Podem ser usadas porções iguais de BCF e MGP no intervalo compreendido entre cerca de 0,1 mg (peso combinado de BCF e MGP) a cerca de 100mg/Kg de peso conforal.

O BCF e MGP podem ser implantados na forma de uma composição encapsulada de libertação, retardada, por exemplo, em lipossomas ou outras membranas de libertação retardadas naturais ou sintéticas,

que sejam absorvíveis pelo hospedeiro. Os protocolos de purificação, descrito abaixo em pormenor, permitem pela primeira vez a purificação do BCF natural em quantidade suficiente e a um grau de pureza suficientemente elevado para permitir um processo rigoroso de sequenciação dos aminoácidos. As sequências dos aminoácidos obtidos do BCF purificado permite conceber amostras que auxiliem o isolamento da sequência do ácido nucleico do BCF natural ou conceber sequências de ácido nucleico sintético, que codifica a sequência de aminoácidos do BCF.

Os antisoros ou anticorpos monoclonais específicos (abaixo descritos) podem ser convertidos num peptideo BCF recombinante ou sintético possuindo a sequência, ou fragmentos de sequência, dos resíduos de aminoácidos, tais como os apresentados na Figura 1A ou 1B. Um exemplo é o fragmento triptico apresentado na Figura 2, e anticorpos antagonicos a este podem ser usados para emunoprecipitarem qualquer BCF presente num tecido, num extracto celular ou num fluido corporal seleccionados. O BCF purificado proveniente desta fonte pode então ser sequenciado e usado como uma base para conceber amostras especificas, tal como se descreveu anteriormente. Podem também ser usados. Anticorpos para outras regiões que divergem do BCF conhecido. Também úteis como antigenos são BCF recombinante ou natural purificados.

Tal como acima se mencionou, a sequência de ADN que codifica o BCF pode ser preparada sinteticamente, em vez de serem clonadas. A sequência de ADN pode ser construida com os codões apropriados para a sequência de aminoácidos do BCF. Em geral, seleccionar-se-ão os codões preferidos para o hospedeiro em causa se a sequência for usada para expressão. A sequência completa é construida a partir dos oligonucleotideos que se sobrepõem preparados por meio de técnicas padrão e reunidas numa sequência de codificação completa. Ver, por exemplo Edge (1981) Nature 292 :756; Namnair et al. (1984) Science 223 : 1299; Jay et al. (1984) J. Biol. Chem. 259: 6311.

As sequências de ADN sintéticas permitem a construção conveniente de genes que expressam análogos de BCF ou " muteinos ". Em alternativa, o ADN que codifica os " mutantes " pode ser produzido por mutagénese localizada de genes de BCF naturais ou cADN, e as muteinas podem ser produzidos usando para tal os processos de síntese polipeptídica convencional. As muteinas alteradas, por exemplo, pela substituição de resíduos ácidos (por exemplo Glu ou Asp) podem possuir actividade reduzida em relação a substratos ligados à membrana ou substratos complexos, ou possuem aplicação terapêutica anti-senso para sobreprodução do BCF.

A mutagénese dirigida a um sítio é conduzida usando um oligonucleotideo sintético principal complementar a um ADN fago de

*W. J. ...*

cadeia simples para ser submetido a mutagénese excepto para pontos limitados de não coincidência representados a nutação desejada. Em resumo, o oligomecleotideo sintético é usado como primário para dirigir a síntese de uma cadeia complementar para o fago, e o ADN de dupla cadeia resultante é transformada numa bactéria hospedeira de suporte de fagos. As culturas de bactérias transformadas são aplicadas em placas sobre agar top, permitindo a formação de placa a partir de células simples que protegem o fago.

Teoricamente, 50% das placas novas contêm o fago que possui, como uma cadeia simples, a forma mutada; 50% possuirá a sequência original. As placas resultantes são hobridizadas com o primário sintético reagido com cinase, a uma temperatura que permitia a hibridização de uma forma exacta mas à qual as não coincidência com a cadeia original são suficientes para impedir a hibridização. As placas que hibridizam com a amostra são então removidas, cultivadas, e o ADN é recuperado.

Os peptideos de BCF sintéticos, recombinantes ou naturais (de comprimento total ou de sub-unidades) podem ser usados para produzir quer anticorpos policlonais quer anticorpos monoclonais. Se são desejados os anticorpos policlonais o peptideo de BCF purificado é usado para imunizar uns mamíferos seleccionados (por exemplo, rato, coelho, cabra, cavalo, etc.), e o soro do animal imunizado é posteriormente colhido e tratado de acordo com técnicas conhecidas. As composições que compreendem anticorpos policlonais para uma variedade de antigenes em adição ao BCF, podem ser tornadas substancialmente isentos de anticorpos que não são anti-BCF por cromatografia de imunoafinidade.

Os anticorpos anti-BCF monoclonais podem também prontamente produzidos por um perito na técnica a partir desta descrição. A metodologia geral para a preparação de anticorpos monoclonais por meio de hibridomas é bem conhecida. Linhas de células imortais produtoras de anticorpos podem também ser criadas por técnicas que não a de fusão tais como a transformação directa de linfócitos B com ADN oncogénico, ou transfecção com o vírus Epstein-Barn. Ver, por exemplo, M. Schreier et al., "Hybridoma Techniques" (1980); Hammerling et al., "Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas" (1981); Kennett et al. "Monoclonal Antibodies" (1980); ver também as Patentes Americanas N<sup>os</sup>. 4.341.761; 4.399.191; 4.427.783; 4.444.887; 4.451.570; 4.466.917; 4.472.500; 4.491.632; 4.493.890.

Painéis de anticorpos monoclonais produzidos contra péptideos do BCF podem ser separados segundo várias propriedades; isto é inotipos, epítotos, afinidade, etc. Apresentam um particular interesse os anticorpos monoclonais que neutralizam a actividade

de de BCF. Tais anticorpos monoclonais podem ser prontamente identificados nos testes de actividade de BCF. Os anticorpos de elevada afinidade são também úteis na purificação por imunoafinidade de BCF recombinante ou natural.

Os anticorpos para as formas de BCF aqui descritas (tanto policlonal como monoclonal) podem ser usados para inibir ou para inverter a calcificação arterial. Um processo terapêutico apropriado será o de tratar o paciente com uma dose efectiva de anticorpos anti-BCF através da via intravenosa convencional. No tratamento da inflamação aguda local, o tratamento com anticorpos anti-BCF será indicado, talvez por injeção intramuscular. Estas composições podem também ser úteis na marcação de várias formas de tumores uma vez que se sabe que os tumores por vezes calcificam, sugerindo a presença de BCF. Os antagonistas de BCF, tais como muteínas de BCF, podem também ser usados em vez de anticorpos.

A determinação do regime de tratamento apropriado (isto é dosagem, frequência de administração, sistémico vs. local, etc.) encontra-se no âmbito dos peritos na técnica.

Para administração, os anticorpos serão formulados numa forma de dosagem unitária injectável (solução, suspensão, emulsão, etc.) em associação com uma substância veicular parentérica farmacêuticamente aceitável. Tais substâncias veiculares são normalmente não tóxicas e não terapêuticas. São exemplos de tais substâncias veiculares a água soro fisiológico, solução de Ringer, solução de dextrose, e solução de Hank. As substâncias veiculares não aquosas, tais como óleos fixos e oleato de etilo também podem ser usadas. Uma substância veicular preferida é albumine humana 95% (p/p) em soro fisiológico. A substância veicular pode compreender quantidades menores de aditivos, tais como as substâncias que aumentam a isotonicidade e estabilidade química, por exemplo tampões e conservantes. O anticorpo é tipicamente formulado em tais substâncias veiculares a concentrações compreendidas no intervalo entre cerca de 1mg/ml a 10 mg/ml.

Os anticorpos anti-BCF serão também úteis em aplicações de diagnóstico. A presente invenção contempla um processo, particularmente um processo de diagnóstico, em que se colhe uma amostra de um ser humano (ou de outro mamífero), e a quantidade de BCF é medida quantitativamente num ensaio. Por exemplo o emprego de anticorpos anti-BCF num imuno ensaio quantitativo pode ser usado para detectar deficiência genética em BCF. Os anticorpos específicos para BCF podem ser formulados para qualquer formato de imuno ensaio convencional; por exemplo radio-imunoensaios heterogeneos ou homogeneos ou ELISA. Os vários formatos são bem conhecidos pelos peritos na técnica. Ver, por exemplo, "Immunoassay" A Practical Guide (D.W. Chan and M.T.

Perlstein, eds. 1987) cuja descrição aqui é incorporada como referência.

Em geral, a produção recombinante de BCF pode proporcionar composições do BCF substancialmente isento de outras proteínas que possuem funções osteoindutivas associadas. A capacidade para obter níveis elevados de pureza é um resultado dos sistemas de expressão recombinantes que podem produzir BCF em quantidade substancial, face às fontes in vivo. Assim aplicando técnicas convencionais a culturas recombinantes, podem ser produzidas composições de BCF que são substancialmente mais puras do que as composições susceptíveis de serem obtidas a partir de fontes ósseas.

O BCF purificado será particularmente útil como utensílio na corrupção e selecção de inibidores de calcificação. Primeiro, são obtidas quantidades a nível de miligramas do material de acordo com a presente invenção. Quantidades na ordem dos miligramas são passíveis de cristalização para permitir estudos tridimensionais usando difracção por raio X e análises por computador. Este facto pode permitir a dedução no que diz respeito à forma de molécula, definindo assim formas próprias para substâncias utilizáveis como inibidores de actividade normalmente exibida pelo BCF. Geralmente os antagonistas têm sido "peptídeos" cujas interacções com um factor que é inibido são estabilizadas pela modificação dos "resíduos" que participam na ligação peptídica no sentido de aumentar a capacidade do "peptídeo" para interactuar especificamente com o factor de consersão. Assim as ligações peptídicas unem-se a ácidos carboxílicos e amins especialmente escolhidos (não necessariamente aminoácidos).

Estes "peptídeos" são configurados numa serie tridimensional de modo a complementar o contorno do objectivo pretendido o enzima de conversão uma disposição espacial similar tipo "chave e fechadura" pode resultar de moléculas designadas complementarmente ao contorno da superficie do BCF da invenção.

Entende-se que o termo "superficie" inclui convulções que podem ser interiores, e incluem especificamente o sitio activo. Além disso por "complementarmente" entende-se como significando que, para além de conformações espaciais que se "adaptam", as interacções entre a proteína e a molécula que se adapta aos contornos da sua superficie são de atracção e positivas. Estas interacções podem ser ligações de hidrogénio, ligação iónica ou afinidade hidrofóbica.

Em conformidade a invenção contempla antagonistas ou agomista de peptídeos (2 a 15 aminoácidos) para BCF que são caracterizados por contornos tridimensionais complementares aos contornos tridimensionais na superficie do BCF recombinante.

Por peptídeos neste contexto entende-se que os antagonistas ou agonistas compreendem ligações amida-ácido carboxílico que correspondem ao número de resíduos menos 1. Os ácidos carboxílicos e amina participantes não necessitam ser  $\alpha$ -aminoácidos.

Em segundo lugar, mesmo sem a assistência de uma determinação de estrutura tridimensional. O BCF purificado da invenção tem significado como um reagente na selecção de inibidores de BCF in vitro como uma tentativa ad hoc para avaliação. As preparações do BCF impuras disponíveis correspondentemente originam dados confusos devido à influência das impurezas nos resultados do teste. Por exemplo, os contaminantes que se tornam eles mesmo em inibidores, activadores ou substratos para o BCF podem interferir com a avaliação. Logo, um aperfeiçoamento essencial em técnicas de selecção correntes para os inibidores do BCF será proporcionado pela disponibilidade da proteína BCF purificada. Note-se que esta descrição e inovações desta invenção pretende cobrir todas as alterações e modificações da invenção que estão dentro do espírito e âmbito da invenção. Encontra-se dentro dos conhecimentos de técnica a inserção, a eliminação ou substituição de aminoácidos de uma sequência de aminoácidos de um BCF sem que afecte substancialmente a actividade de indução de calcificação e crescimento ósseo de molécula. A invenção é expressamente estabelecida para ser suficientemente lata para incluir remoções, adições ou substituições intencionais. Além disso, reconheceu-se que um perito na técnica pode produzir de forma recombinante tais proteínas modificadas.

Os peptídeos do BCF sintéticos, recombinantes ou naturais (comprimido completo ou nebulizadores) podem ser ainda usados para produzir anticorpos monoclonais e policlonais. Se se desejar anticorpos policlonais, o BCF purificado é usado para imunizar um mamífero escolhido (por exemplo, o rato, coelho, cabra, cavalo, etc.) e o soro do animal imunizado é posteriormente resolvido e tratado de acordo com as técnicas conhecidas. As composições que compreendem anticorpos policlonais contra uma variedade de antigénas, em adição ao BCF, podem ser tomados substancialmente isentos de anticorpos que não são anti-BCF pela cromatografia de imunoafinidade.

Anticorpos anti-BCF monoclonais podem também ser prontamente produzidos por um perito na técnica a partir da descrição aqui apresentada. A metodologia geral para preparar os anticorpos monoclonais por meio de hibridomas é bem conhecida. As linhas de células imortais produtoras de anticorpos podem também ser criadas por outras técnicas que não a da fusão, tal como a transformação directa de linfócitos B com ADN onco-génico, ou a transfecção com o vírus Epstein-Barr. Ver, por exemplo, M.

Schneider et al. "Hybridoma Techniques" (1980); Hammerling et al., "Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas" (1981); Kennett et al., "Monoclonal Antibodies" (1980); ver também as Patentes Americanas N<sup>o</sup>s. 4.341.761; 4.399.121; 4.427.783; 4.444.887; 4.451.570; 4.466.917; 4.472.500; 4.491.632; 4.493.890.

Os painéis anticorpos monoclonais produzidos contra os peptídeos de BCF podem ser seleccionados quanto a várias propriedades; isto é isotipos, epitopos, afinidade, etc. Apresentam particular interesse os anticorpos monoclonais que neutralizam a actividade do BCF. Tais monoclonais podem ser prontamente identificados nos ensaios de actividade de BCF. Anticorpos de elevada afinidade são também úteis na purificação por imunoafinidade do BCF recombinante ou natural.

Os anticorpos anti-BCF são também úteis em aplicações de diagnóstico, por exemplo a massa óssea isolada a partir de pacientes com osteoporose pode mostrar que aquela é deficientemente em BCF. Deste modo, a presente invenção contempla um processo, particularmente um processo de diagnóstico, em que é colhida uma amostra de tecido óssea de um ser humano (ou de outros mamíferos) e a quantidade do BCF é medida quantitativamente num ensaio. Os anticorpos específicos para o BCF podem ser formulados a partir de qualquer formato de um imunoensaio convencional, por exemplo radioimunoensaio homogêneo ou heterogêneo, ou ELISA. Os vários formatos são bem conhecidos pelos peritos na técnica. Ver, por exemplo, "Immunoassay: A Practical Guide" (D.W. Chan and M.T. Perlstein, eds. 1987) cuja descrição é aqui incorporada como referência. Ensaio quantitativo, outros que não os imunoensaios, podem também ser usados para medir os níveis relativos de BCF comparados com um padrão, ou com um nível de BCF observado anteriormente num paciente.

Os exemplos que se seguem são revelados com o propósito de ilustrar, mas não pretendem limitar a invenção de forma alguma.

#### Exemplo 1

##### Análise de Sequência do BCF

As proteínas 22K de interesse, parcialmente purificadas a partir de fontes humanas e bovinas, como descrito por Urist, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81, 371-375 (1984), foram anteriormente purificadas para se obter homogeneidade, por meio de electroforese por gel e electroeluição preparativas Methods in Enzymology, 91 : 227-236 (1983). Esta purificação mostrou que as amostras iniciais parcialmente purificadas compreendiam, em adição ao BCF de 22K, outras proteínas de mamíferos a 34K, 19K, 14K e 6K. Após a precipitação com acetona (W.H. Konigsberg e L. Henderson, Methods in Enzymology 91 : 254-259 (1983 e quantificação pelas

análises de aminoácido (B.A. Bidlingmeyer, S.A. Cohen e T.L. Tarvin, Journal of Chromatography, 336:93-104 (1984). O material foi reduzido sob condições de desnaturação com 2-mercaptoetanol e os resíduos de cisteína foram derivadas com 4-vinil-piridina (M. Friedman, L.G. Krull e J.F. Cavins, Journal of Biological Chemistry, 245: 3868-3871 (1970). Após diálises exaustivas para remoção do desnaturante, a recuperação de proteínas foi controlada pela repetição das análises de aminoácidos. As proteínas foram digeridas com TPCK-tripsina em presença de ureia 2M para gerar fragmentos de peptídeos não bloqueados adequados para a análise de sequências (G. Allen, Sequencing of Proteins and Peptides, págs 51-62 (1981) Elsevier/North Holland Publishing Company, Amsterdão, Holanda). Os produtos da digestão foram resolvidos por cromatografia líquida de alta resolução em fase inversa usando gradientes de acetoni-nitrilo ou acetonitrilo/isopropanol em ácido trifluoroacético aquoso (J.E. Shively, Methods of Protein Microcharacterization, págs. 41-87 (1986), Humane Press, Clifton, New Jersey). As frações peptídicas foram submetidas à degradação de Edman automática usando para tal um sequenciador de proteínas Applied Biosystems 470A (M.W. Hunkapiller, R.M. Hewick, W.J. Dreyer e L.E. Hood, Methods in Enzymology, 91:399-413 (1983). Os derivados de aminoácidos do feniltiohidantoína foram identificados por cromatografia num analisador Applied Biosystems 120A PTH (M.W. Hunkapiller, Applied Biosystems, User Bulletin Number 14 (1985), Applied Biosystems, Foster City, California). A sequência de hBCF determinada por este processo é confirmada pela sequência deduzida a partir do cADN humano na Figura 1.

## EXEMPLO 2

### Isolamento de ARN

O mRNA foi isolado a partir de tecido ósseo recente de vitelos de 7 meses ( obtidos no Rancho Veal Meat Packers, Petaluma, CA) ou a partir de células de osteosarcoma humano.

Fragmentos longitudinais de fêmur de vitelo foram partidos e removeu-se o tecido conjuntivo e a medula, foram partidos em pequenos fragmentos e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As células do osteosarcoma humano foram também congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O ARN foi isolado de ambos os tecidos congelados pelo processo do tiocianato de guanidínio / GCl (Maniatis, T., Fritsch, E. F. e Sambrook, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual ( Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY (1982); Freeman, G.J., Clayberger, C., Dekrulyff, R., Rosenblum, D.S. e Cantor H. Proc. Natl. Acad.Sci.; USA, 80:4094-4098 (1983). Foi usado um triturador para pulverizar o tecido bovino directamente na solução de extracção de tiocianato de guanidínio. O poli (A)+ARN foi purificado por um fracçãoamento simples sobre oligo(dT)-celulose-(Maniatis, et al, supra).

Wifan<sup>24</sup> -

### Construção das bibliotecas de cADN

A primeira cadeia de cADN foi sintetizada a partir de ARN de matriz bovina ou poly(A)+ARN do osteosarcoma humano usando para tal condições similares às descritas por Okayama e Berg (Okayama, H e Berg, P. Molec. and Cell Biol. 3: 4094-4098 (1983). Cerca de 5mg de poly (A)+ARN em 20mg de tris-cloridrata 5mM (pH 7,5) foram aquecidos a 65°C durante 3 minutos e depois rapidamente arrefecidos num banho de gelo e imediatamente ajustados (à temperatura ambiente) de modo a conter Tris-cloridrato 50mM (pH 8,3 a 42°C), MgCl<sub>2</sub> 8 mM, KCl 30mM, ditro treitol 10mM, e dATP, dGTP, dTTP, [X-32P] dCTP cada um deles a uma concentração de 2 mM ( $n_{300}$  cpm/pmol), 60 unidades ARN sина e 2,5 mg oligo de (dt) 12-18 (volume total 40ml). A reação foi iniciada com a adição de 50 a 60 unidades de transcriptase inversa do virus de leucemia de murideo " moloney " clonada e foi continuada durante 60 minutos a 42°C. A síntese de cADN de dupla cadeia (ds) e a adição de ligantes ECORI realizaram-se por meio de dois métodos diferentes. Inicialmente a segunda cadeia de cADN foi sintetizada pelo processo de Wickens et al. (Wickens, M.P., Buell. G.N. e Schimke, R.T. J. Biol.Chem. 253:2483-2495 (1978). O anel foi removido do cADN ds pela nuclease SI, foi metilado com Eco RI metilase, foi cortado com extremidades alruptas com ADN-polimeras T4, ligada a ligantes ECORI fosforilados e finalmente digeridos com ECORI (Maniatis et al. Supra). Posteriormente, a segunda cadeia de cADN foi sintetizada pelo processo de Gubler e Hoffman ( Gubler, U. and Hoffman, B.J. Gene 25: 263-269 (1983), modificado por Aruffo e Seed (Aruffo, A. and Seed, B. Proc. Natl. Acad. Sci.: USA 74:8573-8577 (1987). O cADN ds foi então ligado a adaptadores ECORI fosforilados assimetricamente (hemifosforilados) ver síntese de oligonucleotideos) como descrito por Aruffo e Seed, Supra, foi fosforilado com T4 polinucleotideo-cinase (Maniatis et al., Supra), ajustado com NaCl a 0,5M, EDTA 25mM, e aquecido a 75°C. durante 15 minutos para inativar a polinucleotideo-cinase. O cADN ds preparado por meio de ambas as técnicas foi separado dos ligantes adaptadores não ligados por cromatografia sobre Biogel A-15m e recuperados por precipitação em etanol. O cADN foi ligado aos braços ZAP (Stratagene) com T4 ADN-ligase (New England Biolabs) como é descrito pelo fornecedor mas inclui 15% de polietileno glicol (PEG) 8000 (Sigma), uma modificação descrita por Pfeiffer e Zimmerman (Pfeiffer, B.H. e Zimmerman, S.B. Nucl. Acids. Res. 11:7853-7871 (1983). O ADN ligado foi recuperado pela centrifugação (12.000 X g), foi levado com clorofórmio, seco, foi posto de novo em suspensão em 4ml de água e incubado com um extracto embalado in vitro ( Stratagene ) de acordo com o fornecedor. O fago recombinante foi propagado em E. coli BB4 (Stratagene).

### Síntese de oligonucleótidos

Os oligonucleótidos foram sintetizados pelo processo de fosforamidite com um sintetizador Applied Biosystems (Foster City CA) modelo 380A foi purificado por electroforese por gel de poliacrilamina e dessalinado numa cartuxa Waters SEP-PAK (C18). Um oligonucleótido 10-mero (5'CCGAATTCGG3') foi sintetizado e usado como ligante ECORI para a construção da biblioteca de cADN. Antes da ligação, o ligante foi fosforilado com T4 polinucleotido-cinase (Maniatis, T., Fritsch, E.F. e Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY 1982). Um oligonucleótido 14-mero (5'CCTGTAGACTCCG 3') e um oligonucleotido 18-mero (5' AATTCGGAGATCTACAGG3') foram sintetizados e usados como adaptadores ECORI. O 14-mero foi fosforilado (Maniatis, et al., Supra) e subssequentemente aquecido a 95°C durante 15 minutos para inactivar a polinucleotido-cinase, antes do recozimento com o 18-mero. Estes adaptadores fosforilados assimetricamente compreendiam também um sitio de ataque do enzima de restrição Bg III interna. Baseada na sequênciã do aminoácido do fragmento triptico BCF humano, foi construída uma amostra de oligonucleotido 45-mero duplamente degenerado (Figura 2, Amostra A) seguindo as regras de Lathe (Lathe, R., J. Mol. Biol. 183:1-12 (1985)). As duas amostras de oligonucleotidos (A e B) foram sintetizadas com base na sequênciã de aminoácidos de um peptideo triptico purificado do factor de calcificação de tecido ósseo humano (hBCF) (Figura 2).

### EXEMPLO 4

#### Seleccãõ das bibliotecas de cADN

##### a. Bibliotecas do osteosarcoma humano

Aproximadamente 300.000 fagos recombinantes foram colocados em placas (50.000 fagos placas de 137mm de diametro) em E. coli BB4, foram cultivados durante 5 a 6 h a 37°C, transferidos para filtros de nitrocelulose (Millipore, HATF 137), processados de acordo com Benton e Davis (Benton, W.D. and Davis, R.W., Science 196:180 (1977) e visualizado com uma amostra de oligonucleótido A. Dezoito clores de cADN de hBCF dos 300.000 recombinantes foram identificados. Realizaram-se análises de manche Southern (abaixo descritas) dos insectos de ADN usando a amostra A e também a amostra B (Figura 2), um oligonucleótido 18-mero completamente degenerado, contido dentro de amostra A. A maioria dos clores hibridizaram com ambas as amostras. A amostra foi marcada na extremidade com o T4 polinucleotido-cinase e [Y32-P] ATP (Maniatis, et al. Supra) para uma actividade especifica de  $1-2 \times 10^8$  cpm/mg. Os filtros foram pré-hibridizados durante 1 a 2 h a 37°C em formamida a 20% (Vol/vol), 5 X 55C (1 X 55C = cloreto de sódio 0,15M/ citrato de sódio 0,15M, PH 7) 5 X soluçãõ de Denhardt's (1 X soluçãõ Denhardt= polivinilpirrolidona 0,02%/Ficoll 0,02%/ albumine de so

*inform*

ro de bovino 0,02%), 10% sulfato de dextrano, fosfato de sódio 50mM pH 6,8, pirofosfato de sódio 1mM, NaDodSo4 0,1% e 50 mg/ml de ADN de esperma de salmão desnaturado. A amostra marcada foi adicionada a uma concentração de  $10^6$  cpm/ml e foi continuada a hibridização durante a noite a 37°C com agitação suave. Os filtros foram lavados duas vezes (20 minutos/lavagem) em 2 X 55C, Na Dod S04 0,1%, a 55°C e expostos a uma película KODAK XAR-2 com filtro intensificador Lightning Plus, durante a noite, a -80°C. As áreas de placas originando sinais nos filtros duplicados foram removidas, recolocadas em placas e seleccionadas de novo como acima até se obterem placas puras.

Dois dos clones duplamente positivos (Ost 3-7 e Ost 3-17, Fig 3) foram sequenciados e provaram conter sequências sobrepostas idênticas, bem como uma região que codifica o fragmento triptico (Figura 1 sublinhado e Figura 2). O Ost. 3-17 Compreende a sequência completa que codifica a proteína madura, mas não o peptideo sinal completo, tal como é evidente a partir do cADN de bBCF apresentado na Figura 1.

Uma quantidade adicional de 300.000 fagos recombinantes de duas bibliotecas de cADN de osteosarcoma diferentes foram posteriormente colocadas em placas e seleccionadas como acima se descreveu, mas com as seguintes alterações: (1) A mistura de hibridização compreendida formamida 40%, 5 X 55C, 5 X solução de Denhart, PEG 8000 a 10%, fosfato de sódio 50mM pH 6,8, Na DodS04 0,5% e 50mg/ml de desnaturado; (2) os filtros foram lavados a 65°C em 2 X 55C, NaDodS04 0,1%; e (3) a amostra era um. O fragmento do ADN de 24 Obp. obtido por digestão do clone de cADN Ost 3-7 com BglIII e Asp 718 (amostra C, Figura 3). A amostra foi purificada e marcada pelo método de oligo-primário (Feinberg, A.P. e Vogelstein, B., Anal. Biochem. 137. 266-267 (1984) para uma actividade específica de  $-1 \times 10^9$  cpm/mg. Aproximadamente 20 clones de cada biblioteca originaram sinais de hibridização fortes e análises com enzimas de restrição destes clones identificaram vários maiores do que Ost 3-17. Um destes, Ost 1-7 (Figura 3) foi sequenciado e considerado de comprimento total com base na sua homologia com o clone de cADN do BCF de bovino, abaixo descrito.

#### b. Biblioteca de cADN da matriz de tecido ósseo de bovino

Aproximadamente 300.000 recombinantes da biblioteca de cADN da matriz de tecido ósseo de bovino foram seleccionados com a amostra C (Figura 3), um fragmento de ADN de 240 bp Bg III-Asp 718 do Ost 3-7, sob condições descritas para a amostra A, excepto o facto de se ter omitido a formamida da solução de hibridização. Os filtros foram lavados a 55°C em 2 X 55C, Na Dod S04 0,1%. Foram identificados vinte e quatro placas positivas. O clone bbP.1-7 (Figura 4), que compreendia a maior inserção, foi sequenciado e mostrou compreender sequências homologas

27 -  
*W. F. ...*

ao hBCF. A sequência de aminoácido deduzida do cADN de bBCF indica que o aminoácido-4 não é o codão de iniciação devido à presença de val nesta posição. O codão de iniciação mais provável está localizado na posição 17 do aminoácido que se encontra 28 nucleotídeos à frente do extremo 5' do clone hBCF Ost 3-17. A Met na posição 17 é também precedida por uma zona de ligação ribossômica aceitável.

#### EXEMPLO 5

##### Subclonação, Sequenciação e Análises

Os plasmídeos recombinantes foram libertados em Bluescript SK (-) vector do  $\lambda$ ZAP pelo protocolo recuperação/excisão M 13 descrito pelo fornecedor (Stratagene). Os plasmídeos foram propagados em *E. coli* BB4, e o ADN do plasmídeo foi isolado pelo processo de lise alcalina (Maniatis, et al., supra). Os insertos de cADN foram excisados com os enzimas de restrição ECORI e BglIII (Boehringer-Mannheim), purificados por electroforese por gel de poliácridamida (Maniatis et al. Supra) e passadas através de uma coluna Elutipid (Schleicher e Schnell) e subclonadas em vectores de sequenciação M13 (Manisch-Perron, C. Viera, J., Gene 33:103-119 (1985). A sequenciação de ADN foi realizada pelo processo de terminação de cadeia de didesoxi (Sanger, F. Nicklen, S. and Coulson, A.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-67 (1977) usando primários M13 bem como os primários internos específicos. Foram resolvidas regiões ambíguas usando trifosfato de 7-desaza-2-desoxiguanidina (Barr, P.J., Thayer, R.M., Laybourn, P., Najarian, R.C., Seela, F., e Tolan, D., Biotechniques 4 : 428-32 (1986) e Sequenase (U.S. Biochemicals)

##### a. Manche Notherm

O Poly(A)+ARN foi fraccionado em gel de agarose a 1,4% na presença de formaldeído (Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. e Boedtker, H., Biochemistry 16:4743-51 (1977), e directamente transferido para nitrocelulose, de acordo com Thomas (Thomas, P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5 (1980). Os filtros hibridizados com a amostra C, tal como foi previamente descrito (Exemplo 4, selecção das bibliotecas do cADN) em formamida a 40% compreendendo a solução de hibridização e foram lavados a 55°C em 2 X 55C, NaDodSO4 em 0,1% e 0,1 X 55C, NaDodSO4 com autoradiografia após cada fase de lavagem.

As análises de mancha de transferência de ARN demonstram a presença de duas formas de mARN de ~0,9 e 1,8KB em tecido de osteosarcoma humano. As duas formas foram também observadas em placenta humana mas encontrava-se ausentes numa linha de células do fígado humano, HEPG2. As duas formas foram também observadas em células de matriz de tecido osseo de bovino, sendo a forma

*W. F. ...*

maior a predominante. Vertigios da especie maior foram também observadas na medula óssea de bovino. Os dois mARN são muito provavelmente gerados pela poliadenilação diferencial em 2 sítios (AATAAA) encontradas na região 3' não transferida.

#### b. Mancha Southern

##### 1. Genómica

10 mg de ADN genómico (clontech) foram digeridos com ECORI, fraccionados em gel de agarose a 0,7% e transferido para nitrocelulose de acordo com Maniatis, et al., Supra. As condições de hibridização e lavagem foram idênticas às descritas em a. acima.

As análises de mancha de transferência de ADN genómico sugerem que hBCF e bBCF são genes de cópia simples (cópias inferiores) devido às poucas bandas vistas na digerido do ECORI.

##### 2. Clones de cADN

O ADN dos clones de cADN foram digeridos com ECORI ou Bgl II, fraccionados em gel de agarose a 1,0%, transferido para nitrocelulose (Maniatis et al., supra) e hibridizados com a amostra A, como foi previamente descrito, ou com a amostra B num cloreto de tetrametilamónia contendo a solução de hibridização, sob condições descritas por Wood (Wood, W.I. Gitschier, J, Laskey, L. e Lawn, R, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 1585-88 (1985).

#### EXEMPLO 6

##### Expressão do hBCF em levedura

Foram construídas os vectores de expressão para produção intracelular ou secreção de hBCF do promotor regulável ADH2/GAPDH. Uma vez que o primeiro clone de cADN não contém ADN que codifica um peptídeo sinal, a metionina-4, foi usada como aminoácido N-terminal para estas construções. As análises de ADN subsequentes e a identificação de um peptídeo de sinal clássico e um sítio de clivagem de peptidase sinal, permitiu a construção de uma fusão factor de levedura hBCF com glutamina +1 como aminoácido N-terminal do hBCF recombinante. Para clonação em vectores de expressão, os sítios naturais Nco-1, Bgl 1-1 e Spe - 1 foram usados em conjunto com os adaptadores de oligonucleótidos sintéticos apresentados (Figura 4). Uma vez que o Spe-1 e Xba 1 originam igual projecção de enzima de restrição, a construção inicial foi a simples inserção de um gene Nco-1/SPE-1 hBCF em pBS 100ha FGF, digerido com Nco-a/Xba-1, um vector compreendendo o promotor ADH2/GAPDH e elementos terminadores GAPDH flanquendo um gene sintético do factor de crescimen-

*Wifaria*

to de fibroblásto ácido humano. (FGF). O gene haFGF compreende um sitio Nco-1 e Xba-1 única. Os plasmídeos resultante, pBS100hBCF, foi usado para posteriores construções. Deste modo o fragmento Nco-1/Sal-1 contendo o gene hBCF foi clonado em conjunto com fragmentos BAMH1/Nco-1 que codificam os promotores GAPH e ADH2/GAPDH em pBS24./diregido com Bam H1/Sal-1. Os plasmídeos resultantes, pBS24A/GHBCFK(-4 a 183) e pBS24 GAPHB-CF (-3 a 183), foram usados para a expressão intracelular directamente directa do hBCF. para secreção os fragmentos, Bgl-1/Sal - 1 foram excusados e clonados em pBS24,1 em conjunto com os fragmentos Bam H1/Xba-1 que codificam o promotor ADH2/GAPDH o sinal de secreção/sequência líder do factor da levedura, e os ligantes sintéticos apresentados na Figura 4. (em caixa), para expressão do hBCF (-4 a 183) e hBCF (1 a 183). As células da levedura transformadas com os plasmídeos de expressão que codificam as fusões o promotor ADH2/GAPDH-hBCF (-4-183) e promotor GAPDH-hBCF (-4 a 183), quando analisados por SDS-PAGE e tingimento com azul de coomassie das proteínas totais, não revelaram expressão, em comparação com as células da levedura de controlo. Consequentemente para estudar os sistemas de secreção construíram-se os plasmídeos pBS24 contendo as fusões factor líder - hBCF (-3-183) e hBCF (1-183). Em cada caso a transcrição foi conduzida pelo promotor ADA2/GAPDH. A estirpe de levedura AB110 foi transformada com os plasmídeos de expressão da levedura, e os sobrenadantes da levedura foram analisados por precipitação com ácido tricloroacético a 10% e separação por SDS-PAGE. Observaram-se elevados níveis de expressão do produto de aproximadamente 22KD pelo tingimento com azul de Comassie, quando comparado com as células da levedura de controlo transformadas com o vector da levedura original pBS24. O transformando AB 110 (pBS24,1 22KQ) está depositado com o número de acesso ATCC 20948. O lote activo de células de levedura compreendia um grupo de dois lotes, KQ-2 e KQ-3, a partir do qual o BCF recombinante foi isolado e purificado como se segue.

Lote KQ-2

As células foram removidas por contrifegação a partir do meio de fermentação, e o meio foi concentrado usando um cartuxo YM 10 Amicon espiral. O concentrado foi diafiltrado em água e depois em Tris-C1 20mM, EDTA 1mM, NaCl 3M, PH7,5. Tal solução passou através de uma coluna preparativa de Superose 12 a 4°C, e depois à temperatura ambiente. O 22KBCF não aderiu às colunas. O fluxo eluido foi purificado por adsorção em Superose 12HR 10/30, e cluido com o mesmo tampão, mas com NaCl 1M.

Lote KQ-3

As células foram renovadas e o meio concentrado como acima se descreveu. O concentrato foi diafiltrado contra a água e depois Tris-Cl 20M, EDTA 1mM, pH 7,5. Esta solução foi carregada numa coluna Mono-Q HR 10/10, levada e eluída com um gradiente de NaCl 0,5M. As fracções que compreendiam 22KBCF foram identificadas por electroforese por gel, foram reunidas, ajustadas a NaCl 3M com NaCl sólido, e carregadas numa coluna Superose 12HR 10/30. O 22KBCF foi eluído com um tampão contendo NaCl 1M.

#### Lote KQ-2/3

Os fragmentos eluídos da Superose (dos Lotes KQ-2 e KQ-3) foram reunidos, concentrados usando uma membrana YM10 em células agitadas Amicon, dialisadas contra água, e liophilizados.

Em alternativa, o BCF recombinante pode ser isolado e purificado como se segue.

Os meios são removidos das células e concentrados para aproximadamente 10 vezes. O pH é ajustado a 7,5, o concentrado é diluído até uma condutividade abaixo de 5mS/cm, e é depois aplicada numa resina de permuta iónica, Fast Flow Q, pré-equilibrada com Tris-HCl 50mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM, pH 7,5. A coluna é lavada com 1 volume igual ao da coluna do tampão anterior e é eluída com um gradiente salino de NaCl 0 a 1M no tampão anterior. O 22KBCF é eluído a uma condutividade de 20 a 30 ms/cm, que é confirmada usando para tal SDS-PAGE. As fracções contendo o 22KBCF são reunidas, o pH é mantido a 7,5 e é tornado 4M relativamente à ureia, é concentrada e passado através de uma coluna dimensionante S-100 em ureia 4M, tris/HCl 100 mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM a pH 7,5. As fracções contendo 22 KBCF são identificadas por SDS-PAGE, reunidas concentradas e dialisadas contra bicarbonato de sódio 10mM pH 7,8. O 22KBCF é então liophilizado e pode ser armazenado a seco a 4°C.

#### EXEMPLO 7

Uma amostra de BCF (rhBCF) humano recombinante purificado, expresso como no Exemplo 6, 1 mg (lote KQ 2/3), foi dissolvido em água que continha 5 mg de fibrina humana. O composto rbcF-fibrina foi liophilizado e implatado na bolsa muscular da coxa do rato. Num outro rato, a proteína G1 a da matriz de bovino foi dissolvida em ureia 6M compreendendo 1mg de RhBCF humano e dializado contra água. O precipitado e sobrenadentes foram liophilizadas para preparar um composto de proteínas MGP e hB-

*W. J. ...*  
-31 -

- CF. O compósito foi implantado nas bolsas dos quadricépes. Para controlos, as coxas contralaterais foram implantadas com a proteína Gla da matriz de bovino mais albumina num rato; no outro rato controlado consistiu em 5mg de fibrina humana e 1,0 mg de albumina.

As microradiografias do compósito rBCF-proteína de Gla de matriz apresentaram áreas de tecido calcificado. As secções histológicas apresentaram pequenas células redondas, células multinucleadas, macrófagos com hiperplasia e hipertrofia das células tipo mesênquima. Existiam placas de substâncias calcificadas mas não existia cartilagem ou células ósseas. A Figura 5 é uma fotomicrografia que mostra uma hiperplasia e hipertrofia de células de tecido conjuntivo na superfície de um compósito implantado (indicado por P) de proteína recombinante hBCF (Lot KQ 2/3, 1mg) e 1mg de proteína Gla de matriz humana. A calcificação das proteínas implantadas é indicada por CP nas bolsas das quadricépes de um rato no dia 21. Os envólucros de tecido conjuntivo fibroso é indicado por F.

A Figura 6 é uma fotomicrografia que mostra ilhas de proteínas calcificadas (CP) induzidas por um compósito do hBCF recombinante e a proteína biológica Gla de matriz humana. Note-se a célula espumosa grande (seta). O implante inteiro está envolvido numa capsula fibrosa (F) no 21º dia.

A Figura 7, é uma fotomicrografia que apresenta um compósito de hBCF recombinante e a proteína Gla de matriz no 21º dia. Note-se o interior altamente vascularizado do implante incluindo células redondas pequenas, células multinucleadas, macrófagos, substância intercelular calcificante (CP) e células espumosas grandes (Seta). Todas as proteínas implantadas e tecido reactivo foram envolvidas num envólucro fibroso (F) ao 21º dia.

*W. J. ...* - 32 -

**REIVINDICAÇÕES:**

1ª. - processo para a preparação de factor de calcificação óssea, caracterizado pelo facto de compreender as operações que consistem em

a) se construir um vector que inclui a seguinte sequência de ADN humano. **CAG TAT GGC GAT TAT GGA TAC CCA**

	<b>TAC</b>
humano	<b>CAG CAG TAT CAT GAC TAC AGC GAT</b>
	<b>GAT GGG TGG GTG AAT TTG AAC CGG</b>
	<b>CAA GGC TTC AGC TAC CAG TGT CCC</b>
	<b>CAG GGG CAG GTG ATA GTG GCC GTG</b>
humano	<b>AGG AGC ATC TTC AGC AAG AAG GAA</b>
	<b>GGT TCT GAC AGA CAA TGG AAC TAC</b>
	<b>GCC TGC ATG CCC ACG CCA CAG AGC</b>
	<b>CTC GGG GAA CCC ACG GAG TGC TGG</b>
humano	<b>TGG GAG GAG ATC AAC AGG GTC GGC</b>
	<b>ATG GCT GGC ATG GAA TGG TAC CAG</b>
	<b>ACG TGC TCC AAC AAT GGG CTG GTG</b>
	<b>GCA GGA TTC CAG AGC CGC TAC TTC</b>
	<b>GAG TCA GTG</b>
humano	<b>CTG GAT CGG GAG TGG CAG TTT TAC</b>
	<b>TGT TGT CGC TAC AGC AAG AGA TGC</b>
	<b>CCA TAT TCC TGC TGG CTA ACA ACA</b>
	<b>GAA TAT CCA GGT CAC TAT GGT GA</b>
humano	<b>GAG ATG GAC ATG ATT TCC TAC AAT</b>
	<b>TAT GAT TAC TAT ATC CGA GGA GCA</b>
	<b>ACA ACC ACT TTC TCT GCA GTG GAA</b>
	<b>AGG GAT CGC CAG TGG AAG TTC ATG</b>
humano	<b>ATG TGC CGG ATG ACT GAA TAC GAC</b>
	<b>TGT GAA TTT GCA AAT GTT TAG</b>

Fig. 1C

ou um seu fragmento;

b) se transformar uma célula hospedeira com o citado vector e;

c) se cultivarem as células transformadas resultantes em condições em que se expressa o péptido codificado pela referida sequência de ADN ou pelo seu fragmento.

2ª. - Processo para a preparação de factor de calcificação óssea, caracterizado pelo facto de compreender as operações que consistem em

a) se construir um vector que inclui a seguinte sequência de ADN bovino **CAG TAT GGT GAC TAT GGG TAC TCC TAT**

Bovino	<b>CAT CAG TAC CAT GAC TAC AGT GAC GAT GGG TGG GTG AAT CTG AAC CGG CAG GGC TTC AGC TAC CAG TGT CCC CAC GGG CAG GTG GTG GTG GCC GTG</b>
Bovino	<b>AGG AGC ATC TTC AAC AAG AAG GAA GGT TCC GAC AGA CAG TGG ACC TAC GCC TGC ATG CCC ACA CCC CAG AGC CTG GGG GAG CCT ACG GAG TGC TGG</b>
Bovino	<b>TGG GAG GAG ATC AAC AGG GCT GGA ATG GAA TGG TAC CAG ACA TGC TCC AAC AAT GGA CTG GTG GCA GGA TTC CAG AGC CGC TAC TTC GAG TCA GTG</b>
Bovino	<b>CTG GAT CGG GAG TGG CAA TTT TAC TGG TGT CGC TAC AGG AGG AGA TGC CCA TAT TCC TGC TGG CTG ACA ACA GAA TAT CCA GGC CAC TAT GGT GAG</b>
Bovino	<b>GAG ATG GAC ATG ATT TCC TAC AAT TAT GAT TAC TAT ATG CGA GGG GCA ACA ACC ACT TTC TCT GCA GTG GAA AGG GAT CGC CAG TGG AAA TTC AT</b>
Bovino	<b>ATG TGC CGG ATG ACT GAC TAT GAC TGT GAA TTT GAC AAT GTT TAG</b>

Fig. 1D

ou um seu fragmento de iniciação de calcificação;

- b) se transformar uma célula hospedeira com o referido vector; e
- c) se cultivarem as células transformadas resultantes em condições em que se expressa o péptido codificado pela citada sequência de ADN ou por um seu fragmento.

3<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a mencionada sequência de ADN compreender ainda uma sequência 5' escolhida do grupo constituído pela sequência principal ATG, GAC, CTC AGT CTT CTC TGG GTA CTT CTG CCC CTA GTC ACC ATG GCC TGG GGC e qualquer sequência derivada por remoção de um ou de vários desoxinucleótidos a partir da extremidade 5' da mencionada sequência principal.

4<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de a mencionada sequência de nucleótidos de ADN compreender ainda uma sequência 5' escolhida do grupo formado pela sequência principal ATG GAC CTC AGT CTT CTC TGG GTG CTT CTG CCA CTG GTC ACC ATG GCC TGG GGA e qualquer sequência derivada por remoção de um ou de vá-

*Wifan*  
- 34 -

rios desoxinucleótidos a partir da extremidade 5' da referida sequência principal.

- 5<sup>a</sup>. - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo facto de a citada célula hospedeira ser uma célula eucariótica.
- 6<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de a citada célula hospedeira compreender uma levedura.
- 7<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de o mencionado vector compreender um promotor GAPDH que controla a expressão do citado péptido.
- 8<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de o referido promotor ADH2/GAPDH que controla a expressão do referido péptido.
- 9<sup>a</sup>. -- Processo de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelo facto de se produzir ADN não cromossómico com a sequência

humano CAG TAT GGC GAT TAT GGA TAC CCA TAC  
humano CAG CAG TAT CAT GAC TAC AGC GAT GAT GGG TGG  
GTG AAT TTG AAC CGG CAA GGC TTC AGC TAC CAG  
TGT CCC CAG GGG CAG GTG ATA GTG GCC GTG  
humano AGG AGC ATC TTC AGC AAG AAG GAA GGT TCT GAC  
AGA CAA TGG AAC TAC GCC TGC ATG CCC ACG CCA  
CAG AGC CTC GGG GAA CCC ACG GAG TGC TGG  
humano TGG GAG GAG ATC AAC AGG GCT GGC ATG GAA TGG  
TAC CAG ACG TGC TCC AAC AAT GGG CTG GTG GCA  
GGA TTC CAG AGC CGC TAC TTC GAG TCA GTG  
humano CTG GAT CGG GAG TGG CAG TTT TAC TGT TGT CGC  
TAC AGC AAG AGA TGC CCA TAT TCC TGC TGG CTA  
ACA ACA GAA TAT CCA GGT CAC TAT GGT GA  
humano GAG ATG GAC ATG ATT TCC TAC AAT TAT GAT TAC  
TAT ATC CGA GGA GCA ACA ACC ACT TTC TCT GCA  
GTG GAA AGG GAT CGC CAG TGG AAG TTC ATC  
humano ATG TGC CGG ATG ACT GAA TAC GAC TGT GAA TTT  
GCA AAT GTT TAG

Fig. 1C

10<sup>a</sup>. - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8 caracterizado pelo facto de se obter ARN complementar da sequência referida na reivindicação 9.

11<sup>a</sup>. - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo facto de se produzir ADN não cromossómico com a sequência

Bovino CAG TAT GGT GAC TAT GGG TAC TCC TAT  
Bovino CAT CAG TAC CAT GAC TAC AGT GAC GAT GGG TGG GTG  
AAT CTG AAC CGG CAG GGC TTC AGC TAC CAG TGT CCC  
CAC GGG CAG GTG GTG GTG GCC GTG  
Bovino AGG AGC ATC TTC AAC AAG AAG GAA GGT TCC GAC AGA  
CAG AGG AGC TAC GCC TGC ATG CCC ACA CCC CAG AGC  
CTG GGG GAG CCT ACG GAG TGC TGG  
Bovino TGG GAG GAG ATC AAC AGG GCT GGA ATG GAA TGG TAC  
CAG ACA TGC TCC AAC AAT GGA CTG GTG GCA GGA TTC  
CAG AGC CGC TAC TTC GAG TCA GTG  
Bovino CTG GAT CGC GAG TGG CAA TTT TAC TGC TGT CGC TAC  
AGC AAG AGA TGC CCA TAT TCC TGC TGG CTG ACA ACA  
GAA TAT CCA GGC CAC TAT GGT GAG  
Bovino GAG ATG GAC ATG ATT TCC TAC AAT TAT GAT TAC TAT  
ATG CGA GGG GCA ACA ACC ACT TTC TCT GCA GTG GAA  
AGG GAT CGC CAG TGG AAA TTC AT  
Bovino ATG TGC CGG ATG ACT GAC TAT GAC TGT GAA TTT GCA  
AAT GTT TAG

Fig. 1D

12<sup>a</sup>. - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo facto de se obter ADN complementar da sequência referida na reivindicação 11.

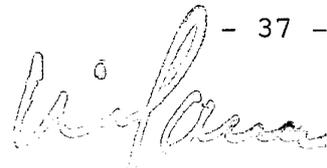
13<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo facto de se obter ADN não cromossómico que compreende ainda a sequência 5' escolhida do grupo constituído pela sequência principal ATG GAC CTC AGT CTT CTC TGG GTA CTT CTG CCC CTA GTC ACC ATG GCC TGG GGC e sequências derivadas por remoção de um ou de vários desoxinucleótidos a partir da extremidade 5' da mencionada sequência principal.

14<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo facto de se obter ADN não cromossómico que compreende ainda a sequência 5' escolhida do grupo formado pela sequência principal ATG GAC CTC ACT CTT CTG TGG GTG CTT CTG CCA CTG GTC ACC GTG GCT TGG GGA e sequências derivadas por remoção de um ou vários desoxinucleótidos a

*Wifama*

partir da extremidade 5' da mencionada sequência principal.

- 15<sup>a</sup> - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo facto de se obter um vector replicável que compreende ADN de acordo com a reivindicação 9.
- 16<sup>a</sup> - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo facto de se obter um vector replicável compreendendo ADN de acordo com a reivindicação 11.
- 17<sup>a</sup> - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo facto de se obter um vector replicável compreendendo ADN de acordo com a reivindicação 14.
- 18<sup>a</sup> - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo facto de se obter um vector replicável compreendendo ADN de acordo com a reivindicação 14.
- 19<sup>a</sup> - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo facto de se obter células de um hospedeiro transformadas com um vector replicável de acordo com a reivindicação 15.
- 20<sup>a</sup> - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo facto de se obter células de um hospedeiro transformadas com um vector replicável de acordo com a reivindicação 16.
- 21<sup>a</sup> - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo facto de se obter células de um hospedeiro transformadas com um vector replicável de acordo com a reivindicação 17.
- 22<sup>a</sup> - Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo facto de se obter células de um hospedeiro transformadas com um vector replicável de acordo com a reivindicação 18.
- 23<sup>a</sup> - Processo para a preparação de composições farmacêuticas caracterizado pelo facto de se misturar um polipéptido



escolhidos do grupo que consiste em factor de calcificação óssea (BCF) de mamíferos e seus análogos substancialmente isentos de outros factores osteoindutores associados, preparados de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, com as substâncias veiculares e auxiliares farmacêuticamente aceitáveis.

24<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo facto de o referido factor de calcificação óssea de mamíferos ser BCF humano.

25<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo facto de o citado factor de calcificação óssea de mamíferos ser BCF bovino.

26<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo facto de o mencionado polipeptido compreender uma sequência de aminoácidos como se segue

humano	<b>GLN TYR GLY ASP TYR GLY TYR PRO TYR</b>
humano	<b>GLN GLN PIR HIS ASP TYR SER ASP ASP GLY TRP</b>
	<b>VAL ASN LEU ASN ARG GLN GLY LEU SER TYR GLN</b>
	<b>CYS PRO GLN GLY GLN VAL ILE VAL ALA VAL</b>
humano	<b>ARS SER ILE PHE SER LYS LYS GLU GLY SER ASP</b>
	<b>ARG GLY TRP ASN TYR ALA CYS TET PRO TAR PRO</b>
	<b>GLN SER LEU GLY GLU PRO THR GLU CYS TRP</b>
humano	<b>TRP GLU GLU ILE ASN ARG ALA GLY MET GLU TRP</b>
	<b>TYR SLN THR CYS SER ASN ASN ELY LEU VAL ALA</b>
	<b>GLY PHE GLN SER ARG TYR PHE GLU SER VAL</b>
humano	<b>LEU ASP ARG GLU TRP GLN PHE TYR CYS CYS ARG</b>
	<b>THR SER LYS ARG CYS PRO TYR SER CYS TRP LEU</b>
	<b>THR THR GLU TYR PRO GLY HIS TYR GLY GL</b>
humano	<b>GLU MET ASP MET ILE SER PYR ASN TYR ASP PYR</b>
	<b>PYR ILE ARG GLY ALA THR THR THR PHE SER ALA</b>
	<b>VAL GLU ARG ASP ARG GLN TRP LYS PHE ILE</b>
humano	<b>MET CYS ARG MET THR GLU TYR ASP CYS GLU PHE</b>
	<b>ALA ASN VAL</b>

Fig. 1A

ou um seu fragmento.

27<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo facto de o mencionado polipeptido compreender a seguinte sequência de aminoácidos

Bovino	<b>GLN TYR GLY ASP THR GLY TYR SER TYR</b>
Bovino	<b>HIS GLN TYR HIS ASP TYR SER ASP ASP GLY TRP</b>
	<b>VAL ASN LEU ASN ARG GLN GLY LEU SER TYR GLN</b>
	<b>CYS PRO HIS GLY GLN VAL VAL VAL ALA VAL</b>

*Wifama*

Bovino	A	G	SER	ILE	ASN	LYS	LYS	GLU	GLY	SER	ASP	ARG
	ELN	TRP	ASN	TYR	ALA	CYS	MET	PRO	THR	PRO	GLN	
	SER	LEU	GLY	GLU	PRO	THR	GLU	CYS	TRF			
Bovino	TRP	GLU	GLU	ILE	ASN	ARG	ALA	GLY	MET	GLU	TRP	
	TYR	GLN	THR	CYS	SER	ASN	ASN	GLY	LEU	VAL	ALA	
	GLY	PHE	GLN	SER	ARG	TYR	PHE	GLU	SER	VAL		
Bovino	LEU	ASP	ARG	GLU	TRP	GLN	PHE	TYR	CYS	CYS	ARG	
	TYR	SER	LYS	ARG	SYS	PRO	TYR	SER	CYS	TRP	LEU	
	THR	THR	GLU	TYR	PRO	GLY	HIS	TYR	GLY	GL		
Bovino	GLU	MET	ASP	MET	ILE	SER	TYR	ASN	TYR	ASP	TYR	
	TYR	MET	ARG	GLY	ALA	THR	THR	THR	PHE	SER	ALA	
	VAL	GLU	ARG	ASP	ARG	GLN	TRP	LYS	PHE			
Bovino	MET	CYS	ARG	MET	THR	ASP	TYR	ASP	CYS	GLU	THE	
	ALA	ASN	VAL									

Fig. 1B

ou um seu fagmento.

- 28<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo facto de o citado polipéptido compreender uma extremidade amino escolhida do grupo formado pela sequência de péptido de sinal met-asp-leu-ser-leu-leu-trp-val-leu-leu-pro-leu-val-thr-met-ala-trp-gly- e sequências da citada sequência de péptido de sinal derivadas por meio da anulação de um ou de vários aminoácidos da extremidade amino da referida sequência de péptido de sinal.
- 29<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo facto de o mencionado polipéptido compreender uma extremidade amino escolhida do grupo formado pela sequência de péptido de sinal met-asp-leu-thr-leu-leu-trp-val-leu-leu-pro-leu-val-thr-val-ala-trp-gly e sequências da referida sequência de péptido de sinal, derivadas por remoção de um ou vários aminoácidos da extremidade amino da citada sequência de péptido de sinal.
- 30<sup>a</sup>. - Processo para a preparação de uma composição farmacéutica que provoca a calcificação, caracterizado pelo facto de se misturar uma quantidade de uma mistura de factor de calcificação óssea de mamíferos, ou um seu análogo com uma proteína Gla de matriz.
- 31<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo facto de o citado factor compreender o factor de calcificação óssea humano.

*Wifan*<sup>39</sup>

32<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo facto de o citado factor compreender o factor de calcificação óssea bovina.

33<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo facto de o citado factor possuir a seguinte sequência de aminoácidos

humano	GLN	TYR	GLY	ASP	TYR	GLY	TYR	PRO	TYR			
humano	GLN	GLN	TYR	HIS	ASP	TYR	SER	ASP	ASP	GLY	TRP	VAL
	ASN	LEU	ASN	ARG	GLN	GLY	LEU	SER	TYR	GLN	CYS	PRO
	GLN	GLY	GLN	VAL	ILE	VAL	ALA	VAL				
humano	ARS	SER	ILE	PHE	SER	LYS	LYS	GLU	GLY	SER	ASP	ARG
	GLN	TRP	ASN	TYR	ALA	CYS	TET	PRO	THR	PRO	GLN	SER
	LEU	GLY	GLU	PRO	THR	GLU	CYS	TRP				
humano	TRP	GLU	GLU	ILE	ASN	ARG	ALA	GLY	MET	GLU	TRP	TYR
	SLN	THR	CYS	SER	ASN	ASN	GLY	LEU	VAL	ALA	GLY	PHE
	GLN	SER	ARG	TYR	PHE	GLU	SER	VAL				
humano	LEU	ASP	ARG	GLU	TRP	GLN	PHE	TYR	CYS	CYS	ARG	TYR
	SER	LYS	ARG	CYS	PRO	TYR	SER	CYS	TRP	LEU	THR	THR
	GLU	TYR	PRO	GLY	HIS	TYR	GLY	GL				
humano	GLU	MET	ASP	MET	ILE	SER	TYR	ASN	TYR	ASP	TYR	TYR
	ILE	ARG	GLY	ALA	THR	THR	THR	PHE	SER	ALA	VAL	GLU
	ARG	ASP	ARG	GLN	TRP	LYS	PHE	ILE				
humano	MET	CYS	ARG	MET	THR	GLU	TYR	ASP	CYS	GLU	PHE	ALA
	ASN	VAL										

Fig. 1A

ou um seu fragmento

34<sup>a</sup>. - Processo de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo facto de o referido factor ter a seguinte sequência aminoácido

Bovino	GLN	TYR	GLY	ASP	TYR	GLY	TYR	SER	TYR			
Bovino	HIS	GLN	TYR	HIS	ASP	TYR	SER	ASP	ASP	GLY	TRP	VAL
	ASN	LEU	ASN	ARG	GLN	GLY	LEU	SER	TYR	GLN	CYS	PRO
	HIS	GLY	GLN	VAL	VAL	VAL	VAL	VAL				
Bovino	AAG	SER	ILE	PHE	ASN	LYS	LYS	GLU	GLY	SER	ASP	ARG
	ELN	TRP	ASN	TYR	ALA	CYS	MET	PRO	THR	PRO	GLN	SER
	LEU	GLY	GLU	PRO	THR	GLU	CYS	TRP				
Bovino	TRP	GLU	GLU	ILE	ASN	ARG	ALA	GLY	MET	GLU	TRP	TYR
	GLN	TYH	CYS	SER	ASN	ASN	GLY	LEU	VAL	ALA	GLY	PHE
	GLN	SER	ARG	TYR	PHE	GLU	SER	VAL				
Bovino	LEU	ASP	ARG	GLU	TRP	GLN	PHE	TYR	CYS	CYS	ARG	TYR
	SER	LYS	ARG	CYS	PRO	TYR	SER	CYS	TRP	LEU	TRH	TRH
	GLU	TYR	PRO	GLY	HIS	TYR	GLY	GL				
Bovino	GLU	MET	ASP	MET	ILE	SER	TYR	ASN	TYR	ASP	TYR	TYR
	MET	ARG	GLY	ALA	THR	THR	THR	PHE	SER	ALA	VAL	GLU

*Américo da Silva Carvalho* 40

ARG ASP AFG GLN TRP LYS PHE  
Bovino MET CYS ARG MET THR ASP TYR ASP CYS GLU PHE ALA  
ASN VAL

Fig. 1B  
ou um seu fragmento.

- 35<sup>a</sup> - Processo para a preparação de composições para reconhecer um único epítipo para o factor de calcificação óssea de mamíferos, caracterizado pelo facto des e misturarem anti-corpos que reconhecem o referido epítipo com as substâncias auxiliares e veiculares farmacêuticamente aceitaveis.
- 36<sup>a</sup> - Processo para provocar a calcificação para a formação de tecido ósseo num vertebrado, caracterizado pelo facto de se administrar ao referido vertebrado, de uma maneira farmacêuticamente eficaz, uma quantidade efectiva, para provocar a calcificação, de uma composição de acordo com qualquer das reivindicações 30 a 34, de preferência, compreendida entre cerca de 0,1 micrograma e cerca de 100 miligramas por kilograma de peso corporal.
- 37<sup>a</sup> - Processo de diagnóstico, caracterizado pelo facto de compreender as operações que consistem em se obter uma amostra de osso de um mamífero, e se medir a quantidade de factor de calcificação óssea existente na mencionada amostra mediante um ensaio quantitativo.

Lisboa,

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

*Américo da Silva Carvalho*

**Américo da Silva Carvalho**  
Agente Oficial da Propriedade Industrial  
R. Castilho, 201-B. E.-1000 LISBOA  
Telefs. 65 13 39 - 65 46 13

*Wiferna*

FIG. 1

```

GCCMAATCCCAGGCAGC ATG GAC CTC AGT CTT CTC TGG GTA CTT CTG CCC
  AGAAGCCCAGACGGC ATG GAC CTC ACT CTT CTG TGG GTG CTT CTG CCA
  ←Ost 1-7          -17          -10          ←Ost 3-17
                    MET ASP LEU SER LEU LEU TRP VAL LEU LEU PRO
                    MET ASP LEU THR LEU LEU TRP VAL LEU LEU PRO

CTA GTC ACC ATG GCC TGG GGC CAG TAT GGC GAT TAT GGA TAC CCA TAC
CTG GTC ACC GTG GCT TGG GGA CAG TAT GGT GAC TAT GGG TAC TCC TAT
                    -1 ↓ 1          ←Ost 3-7
LEU VAL THR MET ALA TRP GLY GLN TYR GLY ASP TYR GLY TYR PRO TYR
LEU VAL THR VAL ALA TRP GLY GLN TYR GLY ASP TYR GLY TYR SER TYR

CAG CAG TAT CAT GAC TAC AGC GAT GAT GGG TGG GTG AAT TTG AAC CGG
CAT CAG TAC CAT GAC TAC AGT GAC GAT GGG TGG GTG AAT CTG AAC CGG

GLN GLN TYR HIS ASP TYR SER ASP ASP GLY TRP VAL ASN LEU ASN ARG
HIS GLN TYR HIS ASP TYR SER ASP ASP GLY TRP VAL ASN LEU ASN ARG

CAA GGC TTC AGC TAC CAG TGT CCC CAG GGG CAG GTG ATA GTG GCC GTG
CAG GGC TTC AGC TAC CAG TGT CCC CAC GGG CAG GTG GTG GTG GCC GTG

GLN GLY LEU SER TYR GLN CYS PRO GLN GLY GLN VAL ILE VAL ALA VAL
GLN GLY LEU SER TYR GLN CYS PRO HIS GLY GLN VAL VAL VAL ALA VAL

AGG AGC ATC TTC AGC AAG AAG GAA GGT TCT GAC AGA CAA TGG AAC TAC
AGG AGC ATC TTC AAC AAG AAG GAA GGT TCC GAC AGA CAG TGG AAC TAC

ARG SER ILE PHE SER LYS LYS GLU GLY SER ASP ARG GLN TRP ASN TYR
ARG SER ILE PHE ASN LYS LYS GLU GLY SER ASP ARG GLN TRP ASN TYR

GCC TGC ATG CCC ACG CCA CAG AGC CTC GGG GAA CCC ACG GAG TGC TGG
GCC TGC ATG CCC ACA CCC CAG AGC CTG GGG GAG CCT ACG GAG TGC TGG

ALA CYS MET PRO THR PRO GLN SER LEU GLY GLU PRO THR GLU CYS TRP
ALA CYS MET PRO THR PRO GLN SER LEU GLY GLU PRO THR GLU CYS TRP

TGG GAG GAG ATC AAC AGG GCT GGC ATG GAA TGG TAC CAG ACG TGC TCC
TGG GAG GAG ATC AAC AGG GCT GGA ATG GAA TGG TAC CAG ACA TGC TCC

TRP GLU GLU ILE ASN ARG ALA GLY MET GLU TRP TYR GLN THR CYS SER
TRP GLU GLU ILE ASN ARG ALA GLY MET GLU TRP TYR GLN THR CYS SER
    
```

*Wifama*

FIG. 1 ( )

AAC AAT GGG CTG GTG GCA GGA TTC CAG AGC CGC TAC TTC GAG TCA GTG  
AAC AAT GGA CTG GTG GCA GGA TTC CAG AGC CGC TAC TTC GAG TCA GTG

ASN ASN GLY LEU VAL ALA GLY PHE GLN SER ARG TYR PHE GLU SER VAL  
ASN ASN GLY LEU VAL ALA GLY PHE GLN SER ARG TYR PHE GLU SER VAL

CTG GAT CGG GAG TGG CAG TTT TAC TGT TGT CGC TAC AGC AAG AGA TGC  
CTG GAT CGC GAG TGG CAA TTT TAC TGC TGT CGC TAC AGC AAG AGA TGC

LEU ASP ARG GLU TRP GLN PHE TYR CYS CYS ARG TYR SER LYS ARG CYS  
LEU ASP ARG GLU TRP GLN PHE TYR CYS CYS ARG TYR SER LYS ARG CYS

CCA TAT TCC TGC TGG CTA ACA ACA GAA TAT CCA GGT CAC TAT GGT GAG  
CCA TAT TCC TGC TGG CTG ACA ACA GAA TAT CCA GGC CAC TAT GGT GAG

PRO TYR SER CYS TRP LEU THR THR GLU TYR PRO GLY HIS TYR GLY GLU  
PRO TYR SER CYS TRP LEU THR THR GLU TYR PRO GLY HIS TYR GLY GLU

GAG ATG GAC ATG ATT TCC TAC AAT TAT GAT TAC TAT ATC CGA GGA GCA  
GAG ATG GAC ATG ATT TCC TAC AAT TAT GAT TAC TAT ATG CGA GGG GCA

GLU MET ASP MET ILE SER TYR ASN TYR ASP TYR TYR ILE ARG GLY ALA  
GLU MET ASP MET ILE SER TYR ASN TYR ASP TYR TYR MET ARG GLY ALA

ACA ACC ACT TTC TCT GCA GTG GAA AGG GAT CGC CAG TGG AAG TTC ATA  
ACA ACC ACT TTC TCT GCA GTG GAA AGG GAT CGC CAG TGG AAA TTC ATA

THR THR THR PHE SER ALA VAL GLU ARG ASP ARG GLN TRP LYS PHE ILE  
THR THR THR PHE SER ALA VAL GLU ARG ASP ARG GLN TRP LYS PHE ILE

ATG TGC CGG ATG ACT GAA TAC GAC TGT GAA TTT GCA AAT GTT TAG  
ATG TGC CGG ATG ACT GAC TAT GAC TGT GAA TTT GCA AAT GTT TAG

MET CYS ARG MET THR GLU TYR ASP CYS GLU PHE ALA ASN VAL \*  
MET CYS ARG MET THR ASP TYR ASP CYS GLU PHE ALA ASN VAL \*

DESENHOS 12-1103

*[Handwritten signature]*

FIG. 1A

GLN TYR GLY ASP TYR GLY TYR  
PRO TYR GLN GLN TYR HIS ASP TYR SER ASP ASP GLY TRP VAL ASN LEU  
ASN ARG GLN GLY LEU SER TYR GLN CYS PRO GLN GLY GLN VAL ILE VAL  
ALA VAL ARG SER ILE PHE SER LYS LYS GLU GLY SER ASP ARG GLN TRP  
ASN TYR ALA CYS MET PRO THR PRO GLN SER LEU GLY GLU PRO THR GLU  
CYS TRP TRP GLU GLU ILE ASN ARG ALA GLY MET GLU TRP TYR GLN THR  
CYS SER ASN ASN GLY LEU VAL ALA GLY PHE GLN SER ARG TYR PHE GLU  
SER VAL LEU ASP ARG GLU TRP GLN PHE TYR CYS CYS ARG TYR SER LYS  
ARG CYS PRO TYR SER CYS TRP LEU THR THR GLU TYR PRO GLY HIS TYR  
GLY GLU GLU MET ASP MET ILE SER TYR ASN TYR ASP TYR TYR ILE ARG  
GLY ALA THR THR THR PHE SER ALA VAL GLU ARG ASP ARG GLN TRP LYS  
PHE ILE MET CYS ARG MET THR GLU TYR ASP CYS GLU PHE ALA ASN VAL

Phimon Corporation

DESENHOS 12-1104

FIG. 1B

GLN TYR GLY ASP TYR GLY TYR  
SER TYR HIS GLN TYR HIS ASP TYR SER ASP ASP GLY TRP VAL ASN LEU  
ASN ARG GLN GLY LEU SER TYR GLN CYS PRO HIS GLY GLN VAL VAL VAL  
ALA VAL ARG SER ILE PHE ASN LYS LYS GLU GLY SER ASP ARG GLN TRP  
ASN TYR ALA CYS MET PRO THR PRO GLN SER LEU GLY GLU PRO THR GLU  
CYS TRP TRP GLU GLU ILE ASN ARG ALA GLY MET GLU TRP TYR GLN THR  
CYS SER ASN ASN GLY LEU VAL ALA GLY PHE GLN SER ARG TYR PHE GLU  
SER VAL LEU ASP ARG GLU TRP GLN PHE TYR CYS CYS ARG TYR SER LYS  
ARG CYS PRO TYR SER CYS TRP LEU THR THR GLU TYR PRO GLY HIS TYR  
GLY GLU GLU MET ASP MET ILE SER TYR ASN TYR ASP TYR TYR MET ARG  
GLY ALA THR THR THR PHE SER ALA VAL GLU ARG ASP ARG GLN TRP LYS  
PHE ILE MET CYS ARG MET THR ASP TYR ASP CYS GLU PHE ALA ASN VAL

Al... Peptidomimetic

Desenhos 12-11<sup>o</sup>5

*Wilson*

FIG. 1C

CAG TAT GGC GAT TAT GGA TAC  
CCA TAC CAG CAG TAT CAT GAC TAC AGC GAT GAT GGG TGG GTG AAT TTG  
AAC CGG CAA GGC TTC AGC TAC CAG TGT CCC CAG GGG CAG GTG ATA GTG  
GCC GTG AGG AGC ATC TTC AGC AAG AAG GAA GGT TCT GAC AGA CAA TGG  
AAC TAC GCC TGC ATG CCC ACG CCA CAG AGC CTC GGG GAA CCC ACG GAG  
TGC TGG TGG GAG GAG ATC AAC AGG GCT GGC ATG GAA TGG TAC CAG ACG  
TGC TCC AAC AAT GGG CTG GTG GCA GGA TTC CAG AGC CGC TAC TTC GAG  
TCA GTG CTG GAT CGG GAG TGG CAG TTT TAC TGT TGT CGC TAC AGC AAG  
AGA TGC CCA TAT TCC TGC TGG CTA ACA ACA GAA TAT CCA GGT CAC TAT  
GGT GAG GAG ATG GAC ATG ATT TCC TAC AAT TAT GAT TAC TAT ATC CGA  
GGA GCA ACA ACC ACT TTC TCT GCA GTG GAA AGG GAT CGC CAG TGG AAG  
TTC ATA ATG TGC CGG ATG ACT GAA TAC GAC TGT GAA TTT GCA AAT GTT  
TAG

01. Anotações

DESENHOS 12-1106

*W. J. ...*

FIG. 1D

CAG TAT GGT GAC TAT GGG TAC  
TCC TAT CAT CAG TAC CAT GAC TAC AGT GAC GAT GGG TGG GTG AAT CTG  
AAC CGG CAG GGC TTC AGC TAC CAG TGT CCC CAC GGG CAG GTG GTG GTG  
GCC GTG AGG AGC ATC TTC AAC AAG AAG GAA GGT TCC GAC AGA CAG TGG  
AAC TAC GCC TGC ATG CCC ACA CCC CAG AGC CTG GGG GAG CCT ACG GAG  
TGC TGG TGG GAG GAG ATC AAC AGG GCT GGA ATG GAA TGG TAC CAG ACA  
TGC TCC AAC AAT GGA CTG GTG GCA GGA TTC CAG AGC CGC TAC TTC GAG  
TCA GTG CTG GAT CGC GAG TGG CAA TTT TAC TGC TGT CGC TAC AGC AAG  
AGA TGC CCA TAT TCC TGC TGG CTG ACA ACA GAA TAT CCA GGC CAC TAT  
GGT GAG GAG ATG GAC ATG AAT TCC TAC AAT TAT GAT TAC TAT ATG CGA  
GGG GCA ACA ACC ACT TTC TCT GCA GTG GAA AGG GAT CGC CAG TGG AAA  
TTC ATA ATG TGC CGG ATG ACT GAC TAT GAC TGT GAA TTT GCA AAT GTT  
TAG

Al. ... Parbov. - tion

DESENTHOS 12-1107

*Wilson*

FIG. 2

CYS TRP LEU THR THR GLU TYR PRO GLY HIS TYR GLY GLU GLU MET  
 5' TGC TGG CTG ACC ACA GAG TAC CCT GGC CAC TAT GGC GAG GAG ATG 3'  
                   T

Probe A

3' ACG ACC GAC TGG TGT CTC ATG GGA CCG GTG ATA CCG CTC CTC TAC 5'  
                   A

HIS TYR GLY GLU GLU MET  
 5' CAC TAC GGX GAA GAA ATG 3'  
           T      T          G      G

B

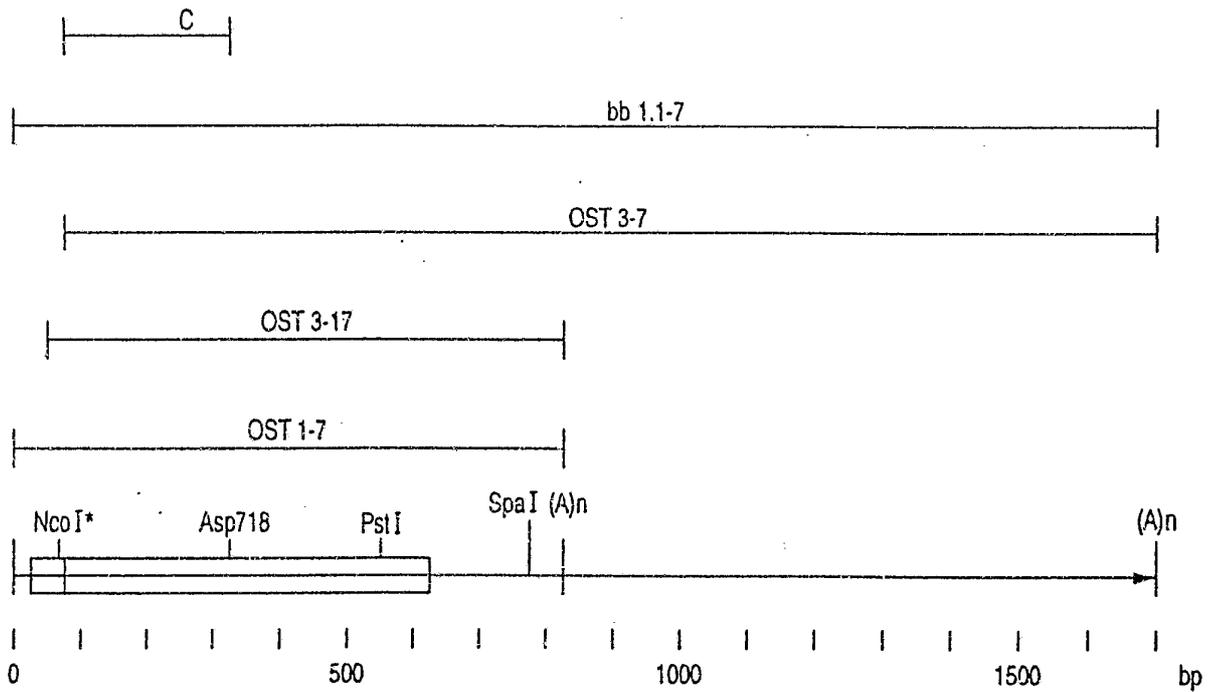
3' GTG ATG CCX CTT CTT TAC 5'  
           A      A          C      C

*Oliver Robertson*

DESENHOS 12-Nº 8

*Handwritten signature*

FIG. 3



Cl : *Restriction*

*Wifama*

FIG. 4A

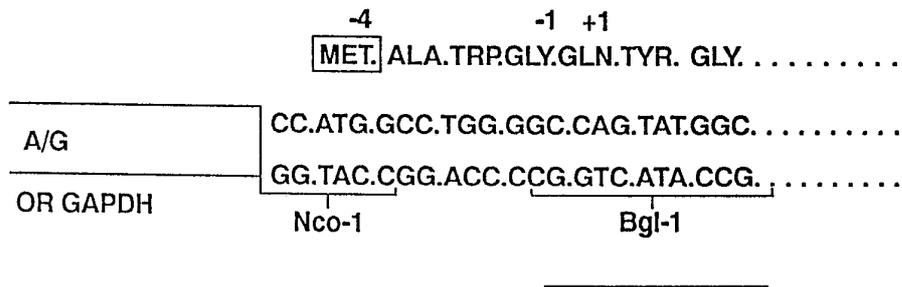
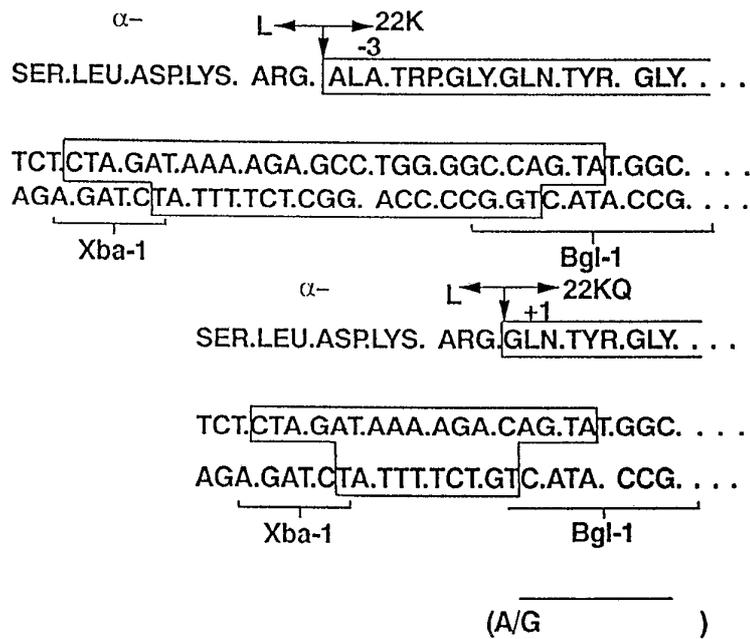


FIG. 4

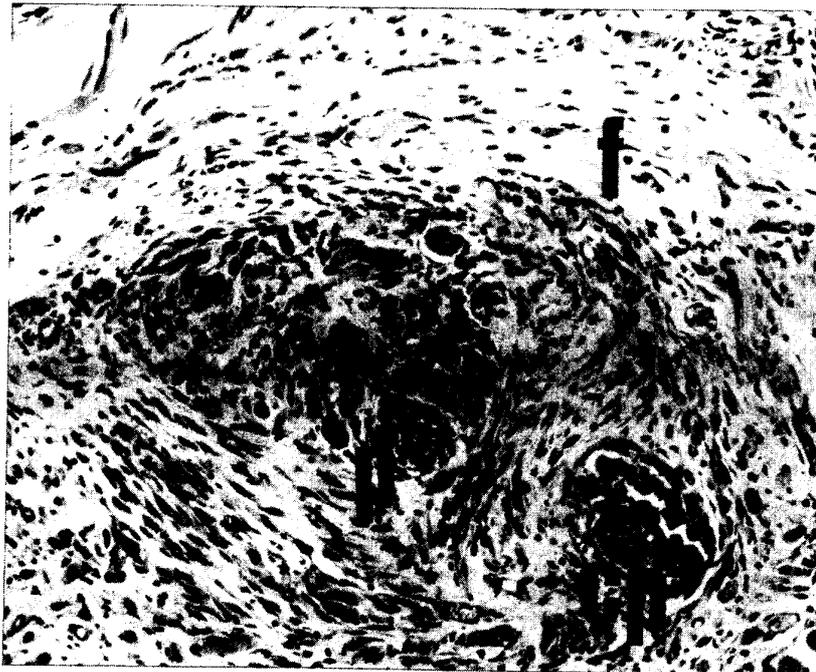


Desenhos 12 - Nº 10

PORTUGAL

*Wifam*

FIG.5



Chiron Corporation

*Vifora*

FIG.6

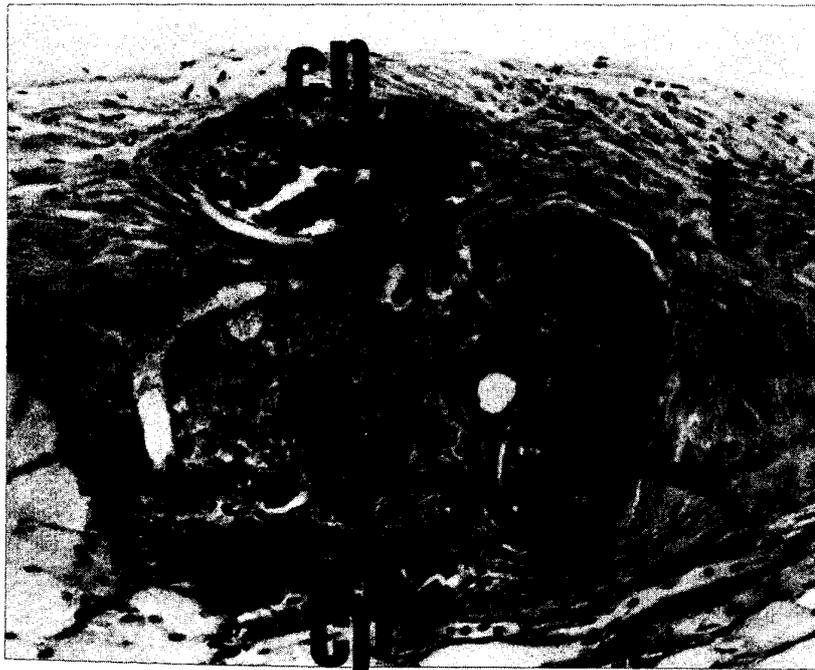


Chiron Corporation

DESENHOS 12 - N.º 12

*M. J. Sousa*

FIG. 7



Chiron Corporation