

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 666**

51 Int. Cl.:  
**C07K 2/00** (2006.01) **A61P 19/10** (2006.01)  
**C07K 4/00** (2006.01) **A61P 21/00** (2006.01)  
**C07K 7/06** (2006.01)  
**C07K 14/00** (2006.01)  
**A61K 38/02** (2006.01)  
**A61K 38/03** (2006.01)  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**C07H 21/00** (2006.01)  
**C12N 15/00** (2006.01)  
**A61P 19/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02707454 .1**
- 96 Fecha de presentación: **10.01.2002**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1387854**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.02.2004**

54 Título: **sFRP y motivos peptídicos que interactúan con sFRP y sus métodos de uso**

30 Prioridad:  
**10.01.2001 US 260908 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.07.2012**

73 Titular/es:  
**THE UNITED STATES GOVERNMENT AS  
 REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF  
 HEALTH AND HUMAN SERVICES 'C : : 7 9 '  
 OF TECHNOLOGY TRANSFER, SUITE' & '  
 6011 EXECUTIVE '6 CI @ J5 F8  
 FC7 ? J=@@ žA8 '&\$, ) &' , \$( žI G''''''  
 GH" J-B79BH'G'-BGH#H H9 'C: 'A98 75 @F9G95 F7 <'''  
 .....  
 .....**

72 Inventor/es:  
**RUBIN, Jeffrey S.;**  
**UREN, Aykut;**  
**HORWOOD, Nicole Joy;**  
**GILLESPIE, Matthew Todd;**  
**KAY, Brian K. y**  
**WEISBLUM, Bernard**

74 Agente/Representante:  
**Arias Sanz, Juan**

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

ES 2 385 666 T3

**DESCRIPCIÓN**

sFRP y motivos peptídicos que interactúan con sFRP y sus métodos de uso.

5 La divulgación se refiere a la diferenciación de osteoclastos, concretamente a un motivo peptídico y proteínas que contienen el motivo, que son capaces de unirse a miembros de la familia de las proteínas secretadas relacionadas con el receptor Frizzled.

**ANTECEDENTES**

10 La remodelación ósea, un proceso responsable de la constante renovación del esqueleto humano adulto, es tarea de los osteoclastos y osteoblastos, dos tipos de células especializadas que se originan a partir de progenitores hematopoyéticos y mesenquimales de la médula ósea, respectivamente. El suministro constante y ordenado de estas células resulta fundamental para la homeostasis esquelética, dado que una producción incrementada o reducida de osteoclastos u osteoblastos y/o los cambios en el ritmo de su apoptosis son en gran parte responsables del desequilibrio entre la formación y la reabsorción de hueso que explica diversas enfermedades de huesos sistémicas o localizadas.

15 Una actividad intensificada de los osteoclastos desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la osteoporosis postmenopáusica, la enfermedad de Paget, metástasis osteolíticas, mieloma múltiple, hiperparatiroidismo, artritis reumatoide, periodontitis e hipercalcemia de malignidad. Estos problemas clínicos están asociados con una importante morbilidad o mortalidad y afectan a más de 10 millones de pacientes en los Estados Unidos. Sin embargo, solamente se dispone de un número limitado de agentes que inhiben la formación de osteoclastos o la reabsorción ósea y, en la mayoría de los casos, se desconocen sus mecanismos de acción. Por  
20 otra parte, muchos de estos agentes tienen importantes efectos secundarios que limitan su utilidad. Por tanto, existe la necesidad de identificar y caracterizar los inhibidores de la formación de osteoclastos y reabsorción ósea, como parte de la constante búsqueda para ofrecer beneficios terapéuticos a estos pacientes.

25 Por lo contrario, el descenso de la actividad de los osteoclastos desempeña un importante papel en la patogénesis de la osteopetrosis, la osteodistrofia de Albright y la acondroplasia, para las que no existe una terapia específica. Por tanto, también existe la necesidad de identificar y caracterizar los tratamientos que intensifican la formación de osteoclastos y la reabsorción ósea, a fin de proporcionar terapias útiles para estos pacientes.

30 La identificación de los mecanismos implicados en los trastornos óseos es fundamental para entender la fisiología de los huesos. A pesar de que se han identificado y clonado numerosos genes y familias de genes (y los polipéptidos que estos codifican) que participan en la regulación de las células óseas, sus funciones todavía no se han definido con claridad, debido a las complejidades que presentan las vías de formación del hueso. Existe una gran necesidad de realizar una identificación definitiva de los objetivos para el tratamiento de los trastornos óseos, incluyendo los trastornos de reabsorción ósea, como la osteoporosis postmenopáusica, la enfermedad de Paget, las metástasis osteolíticas, el mieloma múltiple, la artritis reumatoide, la hipercalcemia de malignidad, la osteopetrosis, la osteodistrofia de Albright y la acondroplasia.

35 WO01/19855A divulga el concepto general de las SFRP y las composiciones farmacéuticas que las contienen.

Baranski et al, *Developmental Biology*, vol 217, nº 1 (2000) páginas 25-41 se refiere a los patrones de expresión dinámicos de frzb-1,  
Hausler et al, *Bone*, vol 27, nº 4 (2000) página 335 se refiere a las SFRP expresadas por los osteoblastos.

40 Rattner et al, *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, vol 94, nº 7 (1997) páginas 2859-2863, se refiere a una familia de proteínas secretadas que contienen homología con los receptores Frizzled.

Hijkata et al, *FEBS*, vol 457, nº 3 (1999) páginas 405-408 se refiere a la introducción de apoptosis de las células de la línea monocito-macrófago.

45 Van Der Pluijm et al, *Journal of Bone and Mineral Research*, vol 9, Nº 7 (1994) páginas 1021-1028, se refiere a las integrinas y a la reabsorción osteoclástica en tres cultivos de órganos óseos.

Finch et al, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol 94, Nº 13 (1997) páginas 6770-6775, se refiere a la purificación y clonación molecular de un antagonista de la acción de Wnt.

**RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN**

50 En el presente se divulgan proteínas que se unen a la proteína secretada relacionada con el receptor Frizzled-1 (sFRP-1). En una realización, el péptido de unión de sFRP-1 es un péptido purificado.

En otra realización, se divulga un método para intensificar la diferenciación de osteoclastos. En un ejemplo específico, no limitador, el método incluye la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de los péptidos purificados divulgados en el presente (o fragmentos, fusiones o miméticos efectivos) a un sujeto, a fin de intensificar la diferenciación de osteoclastos.

- 5 En otra realización, se proporciona un método para inhibir la formación de osteoclastos en un sujeto. El método incluye la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de sFRP-1 (SEC. ID. N°: 3), fragmentos de SEC. ID. N°: 3, o fusiones o variantes de SEC. ID. N°: 3, a un sujeto, donde el polipéptido se une a una molécula de RANKL, identificada con el número de acceso GenBank AF013171, número de acceso GenBank AF019047, o número de acceso GenBank AP053712, u otro miembro de la familia del TNF.
- 10 En otra realización más, se proporciona un método para modular la actividad de las células T. En un ejemplo específico, no limitador, el método incluye la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de los péptidos de unión a sFRP-1 purificados divulgados en el presente, con el fin de modular la actividad de las células T.

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

- 15 El polipéptido no tiene la secuencia para la SARP-2 humana, divulgada en Melcomyant et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 13636 – 13641, con alanina en la posición 174 (Uni Prot IDNo.Q8N474).

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 **FIG. 1** es una gráfica que muestra el resultado de la unión de la proteína de fusión A-C2 (SEC. ID. N°: 14)/AP (fosfatasa alcalina) a sFRP-1 (SEC. ID. N°: 3). Se incubaron caldos de colonias bacterianas separadas infectadas con fagos que expresan la quimera A-C2/AP en pocillos ELISA recubiertos de sFRP-1 (y posteriormente se bloquearon con BSA) o BSA solamente. Cada uno de los caldos (identificados como I-1,1-2,1-6,1-12,1-13 and 1-14) contenía actividad de AP, medida mediante reacción con pNPP y desarrollo de color a 405 nm, que se unía específicamente a los pocillos recubiertos de sFRP-1 (SEC. ID. N°: 3) (barras grises) en comparación con los pocillos recubiertos solamente con BSA (barras negras). Cada muestra se testó individualmente; esto es representativo de varios experimentos.

30 **FIG. 2** es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo de unión competitivo de A-C2/AP (SEC. ID. N°: 14) y los péptidos 12-mer A-C2 (SEC. ID. N°: 14) y A-F7 (SEC. ID. N°: 12) a BSA o sFRP-1 (SEC. ID. N°: 3). Los péptidos 12-mer solubles, A-C2 (SEC. ID. N°: 14) y A-F7 (SEC. ID. N°: 12), fueron preincubados durante 30 minutos a las concentraciones indicadas con caldo bacteriano que contenía la quimera A-C2/AP antes de añadirlos a los pocillos ELISA recubiertos de sFRP-1 (A-C2 cuadrados abiertos y A-F7 rombos abiertos) o BSA (A-C2 círculos abiertos y A-F7 triángulos abiertos). Las muestras se testaron por triplicado y los resultados se muestran como la media +/- SD. Esto es representativo de los tres experimentos.

35 **FIG. 3** es una gráfica que muestra los resultados de ensayos de unión de proteínas de fusión de A-C2 (SEC. ID. N°: 14)/fosfatasa alcalina con alanina sustituida a sFRP-1 (SEC. ID. N°: 3) en un ELISA. La gráfica de barras indica la media +/- S.D. de mediciones por triplicado de un único experimento representativo. Un análisis paralelo de estas muestras en pocillos recubiertos con anticuerpo monoclonal para el epítipo FLAG indicó que la concentración de quimera en los diferentes caldos era similar.

40 **FIG. 4** es un conjunto de diagramas que muestran un análisis calorimétrico de la interacción entre el péptido AC2 y sFRP-1. La FIG. 4 es un seguimiento y muestreo que indica el calor generado cuando se añadieron partes alícuotas de una solución de AC2 a una cámara que contenía sFRP-1 disuelta en PBS. La FIG. 4 es un seguimiento y muestreo del calor generado en el control de PBS correspondiente. Basándose en la cantidad de calor liberado, se calcularon diversos parámetros de la reacción de unión, incluyendo la entalpía ( $\Delta H$ ) y la constante de disociación ( $K_d$ ).

45 **FIG. 5** es una gráfica que muestra los resultados de ensayos de unión ELISA utilizando RANKL soluble (sRANKL) y sFRP-1 (SEC. ID. N°: 3). El rombo abierto representa la unión de sRANKL a sFRP-1, y el símbolo más («+») representa la unión de sRANKL a la albúmina de suero bovino (BSA).

50 **FIG. 6** es un conjunto de gráficas que muestra que la sFRP-1 inhibe la formación de osteoclastos en dos modelos experimentales diferentes. La FIG. 6A es una gráfica que muestra los resultados de experimentos de cocultivo en los que los osteoblastos primarios y la médula espinal se incubaron con diferentes concentraciones de sFRP-1. Posteriormente, los pocillos fueron teñidos para determinar el número de células multinucleadas (MNC) TRAP+. Los resultados demuestran que a medida que la concentración de sFRP-1 aumenta, la maduración de osteoclastos disminuye (como evidencia el descenso de TRAP+). Los resultados mostrados son la media +/- S.D. de mediciones por cuadruplicado. La FIG. 6B es una gráfica que muestra los resultados de experimentos en los que células de un bazo adulto fueron tratadas con RANKL, un factor de estimulación de la colonia de macrófagos (M-CSF), y diversas concentraciones de sFRP-1 (SEC. ID. N°: 3). Posteriormente, se tiñeron los pocillos para determinar el número de

células multinucleadas (MNC) TRAP+. Los datos presentados son la media +/- S.D. de mediciones por cuadruplicado. Los resultados demuestran que a medida que la concentración de sFRP-1 aumenta, la maduración de osteoclastos disminuye.

5 **FIG. 7** son dos gráficas que muestran que el antisuero de sFRP-1 estimula la formación de osteoclastos en cocultivos de osteoblastos primarios y células de un bazo adulto. La FIG. 7A es una gráfica que muestra que el anticuerpo específico de sFRP-1 que se une a sFRP-1 causa un aumento de la formación de osteoclastos. La formación de osteoclastos, medida mediante tinción de TRAP+, se evaluó en cocultivos de osteoblastos primarios y células de un bazo adulto sin suplementos hormonales o con dosis subóptimas de  $1\alpha,25(\text{OH})_2$  vitamina  $\text{D}_3$  ( $10^{-10}\text{M}$ ) y dexametasona ( $10^{-9}\text{M}$ ) en presencia o ausencia de inmunoglobulina purificada ( $\sim 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) de un conejo inmunizado con sFRP-1 recombinante. Los resultados son la media +/- S.D. de células TRAP+ mononucleadas y multinucleadas detectadas en muestras cuadruplicadas tras siete días en cultivo. La FIG. 7B es una gráfica que muestra que los anticuerpos específicos de sFRP-1 se unen a sFRP-1 y provocan un aumento de la formación de osteoclastos en presencia de dosis óptimas de  $1\alpha,25(\text{OH})_2$  vitamina  $\text{D}_3$  ( $10^{-8}\text{M}$ ) y prostaglandina E2 (PGE2)  $10^{-7}\text{M}$ . La formación de osteoclastos, medida mediante tinción de TRAP+, se evaluó en cocultivos de osteoblastos primarios y células de un bazo adulto sin suplementos hormonales o con dosis óptimas de  $1\alpha,25(\text{OH})_2$  vitamina  $\text{D}_3$  ( $10^{-8}\text{M}$ ) y prostaglandina E2 (PGE2,  $10^{-7}\text{M}$ ) en presencia o ausencia de inmunoglobulina purificada ( $\sim 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) de un conejo inmunizado con sFRP-1 recombinante. Los resultados son la media +/- S.D. de las células TRAP+ mononucleadas y multinucleadas detectadas en muestras cuadruplicadas tras siete días en cultivo.

20 **FIG. 8** es una gráfica que muestra que el péptido A-C2 estimula la formación de osteoclastos en cocultivos de osteoblastos y células de un bazo adulto. La formación de osteoclastos en respuesta a dosis óptimas de  $1\alpha,25(\text{OH})_2$  vitamina  $\text{D}_3$  ( $10^{-8}\text{M}$ ) y PGE2 ( $10^{-7}\text{M}$ ) no se vio intensificada por la adición concomitante del dominio de homología de la netrina (NHD) de sFRP-1 (SEC. ID. N°: 13;  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), pero resultó notablemente estimulada por la incubación simultánea con el péptido A-C2 (SEC. ID. N°: 14;  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Como control positivo para la osteoclastogénesis intensificada, las células se trataron con dosis subóptimas de  $1\alpha,25(\text{OH})_2$  vitamina  $\text{D}_3$  ( $10^{-10}\text{M}$ ) y PGE2 ( $10^{-9}\text{M}$ ) en ausencia o presencia del anticuerpo específico 1/500 de sFRP-1. La gráfica de barras muestra la media +/- S.D. de células TRAP+ multinucleadas testadas por cuadruplicado.

25 **FIG. 9** es una gráfica que muestra los resultados de un experimento en el que A-C2 (SEC. ID. N°: 14) se incubó durante diversos períodos de tiempo con células de un bazo adulto. El Grupo 1 era el grupo de control que no contenía el péptido A-C2 (SEC. ID. N°: 14). El Grupo 2 fue tratado con A-C2 (SEC. ID. N°: 14) del día 0 al día 3, el Grupo 3 fue tratado con A-C2 (SEC. ID. N°: 14) del día 4 al día 7, el Grupo 4 fue tratado con A-C2 (SEC. ID. N°: 14) del día 7 al día 10 y el Grupo 5 fue tratado con A-C2 (SEC. ID. N°: 14) del día 0 al día 10. Todos los grupos de tratamiento recibieron RANKL a  $50 \text{ ng}/\text{mL}$  y M-CSF a  $25 \text{ ng}/\text{mL}$ . La presencia de A-C2 (SEC. ID. N°: 14) durante los días 0 a 3 provocó un aumento de la producción de osteoclastos.

30 **FIGS. 10A y 10B** son gráficas que ilustran los resultados de la incubación de A-C2 (SEC. ID. N°: 14) con células de un bazo adulto que contienen células T (FIG. 10A) y células de un bazo sin células T (FIG. 10B): Las células T fueron separadas inmunomagnéticamente de las células del bazo. La formación de osteoclastos fue inducida por RANKL ( $50 \text{ ng}/\text{mL}$ ) y M-CSF ( $25 \text{ ng}/\text{mL}$ ), y valorada mediante un recuento de las células multinucleadas TRAP+ tras nueve días de cultivo. La formación de osteoclastos se midió en cultivos de células de un bazo adulto (FIG. 10A) o en cultivos que carecían de células T (FIG. 10B) en ausencia (Control +ve) o presencia de A-C2 ( $5 \text{ mg}/\text{mL}$ ). Estos cultivos no contienen ningún osteoblasto, por lo que los efectos de A-C2 se limitaron a las células linfocíticas o hematopoyéticas. La gráfica de barras muestra la media +/- S.D. de células multinucleadas TRAP+ de muestras por cuadruplicado. Los controles para este experimento incluían células de bazo [completas (FIG. 10A) o con reducción de células T (FIG. 10B)] en ausencia de RANKL y M-CSF (control -ve) y en estas condiciones no se produjo ningún osteoclasto. Como control positivo para el sistema del ensayo (Control +ve), los cultivos se trataron con RANKL ( $50 \text{ ng}/\text{mL}$ ) y M-CSF ( $25 \text{ ng}/\text{mL}$ ), y los efectos de la adición de A-C2 se compararon con este cultivo.

35 **FIGS. 11A y 11B** son gráficas que ilustran la estimulación con A-C2 (SEC. ID. N°: 14) de la diferenciación de las células multinucleadas TRAP+ en cultivos de células RAW264.7 (TIB-71). El Grupo 1 fue el control positivo que contenía  $50 \text{ ng}/\text{mL}$  RANKL. Los Grupos 2, 3 y 4 contenían  $50 \text{ ng}/\text{mL}$  RANKL y  $5 \text{ Ug}/\text{mL}$ ,  $1 \text{ ng}/\text{mL}$ , o  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  de A-C2 (SEC. ID. N°: 14), respectivamente. Se observó la estimulación cuando se añadieron células T a los cultivos (FIG. 11A) en comparación con los casos en los que no se añadieron células T a los cultivos (FIG. 11B).

40 **FIG. 12** es una gráfica de la avidéz de unión de diversos mutantes por delección de sFRP-1 para RANKL en ensayos ELISA. Los pocillos fueron recubiertos con sFRP-1 completa o bien con cualquiera de una serie de mutantes por delección de sFRP-1 marcados con epítomos (Uren et al, J Biol Chem 275:4374-382,2000) o control de BSA y, posteriormente, fueron incubados de forma secuencial con RANKL soluble y reactivos para detectar el RANKL unido a los pocillos. Los resultados mostrados son la media +/- S.D. de mediciones por triplicado de un experimento representativo.

45 **FIG. 13** es un conjunto de cuatro gráficas que muestran que la unión de RANKL al CRD expresado bacterianamente en ensayos ELISA es sólida y puede tener dos afinidades. **FIG. 13A** es una gráfica que muestra la unión de RANKL a pocillos recubiertos con el CRD. La densidad óptica en los pocillos es una medida de la cantidad de RANKL

retenida en los pocillos y se traza como una función de la concentración de RANKL soluble incubada en los pocillos. **FIG. 13B** es una representación de Scatchard de los datos de unión de RANKL mostrados en la FIG. 13A. La unión parece caracterizarse por más de una afinidad. FIG. 13C es un cambio de formato del análisis de Scatchard de la **FIG. 13B**, perteneciente a un sitio de unión de mayor afinidad putativa. La **FIG. 13D** es un cambio de formato del análisis de Scatchard de la **FIG. 13B**, perteneciente a un sitio de unión de menor afinidad putativa.

**FIG. 14** es un conjunto de tres gráficas que muestran que el CRD expresado bacterianamente de sFRP-1 inhibe la formación de osteoclastos en diversos modelos experimentales, incluyendo el que no es dependiente de RANKL. Estos fueron: (1) RAW264.7 + TNF $\alpha$  + TGF $\beta$  (FIG. 14A; Horwood et al, Journal of Immunology 166:4915-4921, 2001; Quinn et al, Journal of Bone and Mineral Research. 16, 1787-1794, 2001) (2) la línea celular de macrófago/monocito RAW264.7 + RANKL (FIG. 14B), y (3) células de médula espinal + RANKL + M-CSF (FIG. 14C). En cada sistema, tanto los dependientes de RANKL (FIG. 14B y FIG. 14C) como los independientes de RANKL (FIG. 14A, formación de osteoclastos dependiente de TNF $\alpha$ ), el CRD expresado bacterianamente imitó la acción de la sFRP-1 de longitud completa con una potencia similar.

**FIG. 15** es una gráfica que muestra que la sFRP-1 puede inhibir la formación de osteoclastos en las células RAW264.7 tratadas con una combinación de citocinas que incluye TNF $\alpha$ , pero no RANKL. El efecto de la sFRP-1 se evaluó con un método de formación de osteoclastos independiente de RANKL, empleando la línea celular de monocito/macrófago RAW264.7 (Quinn et al., Journal of Bone and Mineral Research. 16, 1787-5 1794, 2001) y se comparó con el de la osteoprotegerina. Se añadió TGF $\alpha$  durante los tres primeros días de cultivo para incrementar el número de osteoclastos. La sFRP-1 inhibió la formación de osteoclastos dependiente de TNF $\alpha$  cuando estaba presente durante los tres primeros días de cultivo, mientras que la OPG no tuvo ningún efecto que sugiera que la sFRP-1 estaba actuando independientemente de RANKL, mediante la unión a TNF $\alpha$  o mediante la señalización de WNT.

**FIG. 16** es un diagrama esquemático de un posible mecanismo de unión sFRP-1 (SEC. ID. N°: 3)/RANKL. Cabe señalar que el motivo de unión de sFRP-1 en la secuencia RANKL se encuentra justo por debajo de los sitios de clivaje de TACE (flechas). TACE es la enzima de conversión de TNF $\alpha$ , que se sabe que procesa RANKL (L. Lum et al, J. Biol. Chem. 274:13613-13618, 1999). La unión de sFRP-1 a RANKL podría alterar el procesamiento de RANKL por parte de TACE, lo que a su vez podría alterar la actividad de RANKL.

**FIG. 17** es un diagrama que muestra un posible modelo del papel de la sFRP-1 en la formación de osteoclastos. Una célula de soporte de los osteoclastos que expresa RANKL interactúa con sFRP-1 (SEC. ID. N°: 3) provocando la inhibición de la formación de osteoclastos. Cuando se añade el motivo peptídico (SEC. ID. N°: 9) a la solución se une a sFRP-1 (SEC. ID. N°: 3) y promueve la diferenciación de osteoclastos.

#### LISTA DE SECUENCIAS

Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos recogidas en la lista de secuencias adjunta se muestran empleando las abreviaturas estándar en letra para las bases de nucleótidos y un código de tres letras para los aminoácidos. Solamente se muestra una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, aunque la cadena complementaria se da por incluida por cualquier referencia a la cadena mostrada.

**SEC. ID. N°: 1** muestra la secuencia de cDNA de la sFRP-1 humana.

**SEC. ID. N°: 2** muestra la secuencia de ácido nucleico del marco abierto de lectura de la sFRP-1 humana.

**SEC. ID. N°: 3** muestra la secuencia de aminoácido de la sFRP-1 humana.

**SEC. ID. N°: 4** muestra la secuencia de aminoácido de la sFRP-1-M/H humana.

**SEC. ID. N°: 5** muestra la secuencia de aminoácido de la sFRP- $\Delta$ 1-M/H humana.

**SEC. ID. N°: 6** muestra la secuencia de aminoácido de la sFRP- $\Delta$ 2-M/H humana.

**SEC. ID. N°: 7** muestra la secuencia de aminoácido de la sFRP- $\Delta$ 3-M/H humana.

**SEC. ID. N°: 8** muestra la secuencia de aminoácido de la sFRP- $\Delta$  CRD-M/H humana.

**SEC. ID. N°: 9** muestra la secuencia de aminoácido del motivo peptídico.

**SEC. ID. N°: 10** muestra el motivo peptídico del receptor A del ANP (humano).

**SEC. ID. N°: 11** muestra la secuencia de aminoácido del péptido A-E4.

**SEC. ID. N°: 12** muestra la secuencia de aminoácido del péptido A-F7.

**SEC. ID. N°: 13** muestra la secuencia de aminoácido del dominio de homología a netrina de la sFRP-1.

**SEC. ID. N°: 14** muestra la secuencia de aminoácido del péptido A-C2.

**SEC. ID. N°: 15-26** muestra los péptidos generados para su uso en experimentos de exploración de alanina.

**SEC. ID. N°: 27** muestra la secuencia de aminoácido de B-B9.

**SEC. ID. N°: 28** muestra una secuencia de aminoácido que se encuentra en RANKL y que contiene una secuencia similar a la de la SEC. ID. N°: 9.

**SEC. ID. N°: 29** muestra una secuencia de aminoácido que se encuentra en RANKL y que contiene una secuencia similar a la de la SEC. ID. N°: 9.

**SEC. ID. N°: 30-39** muestra las secuencias de ácido nucleico de varios cebadores y sondas empleados en PCR y en los experimentos de hibridación.

**SEC. ID. N°: 40** muestra la secuencia de aminoácido del péptido A-D9.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. **Abreviaturas**

- BSA: Albúmina de suero bovino  
 CRD: Dominio rico en cisteína  
 5 ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas  
 HSPG: Proteoglicanos de heparán sulfato  
 mAb: Anticuerpo monoclonal  
 MDCK: Riñón canino Madin-Darby  
 M/H: Epítomos marcadores Myc-His  
 10 PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida  
 PBS: Solución tampón de fosfatos  
 sFRP: Proteína secretada relacionada con el receptor Frizzled  
 Wnt: Proteínas Wnt

II. **Términos**

- 15 A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se emplean de acuerdo al uso convencional. Las definiciones de los términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, Genes V, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).  
 20

A fin de facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la revelación, se proporcionan las 35 explicaciones de términos específicos siguientes:

- Anómalo:** Desviación de las características normales. Las características normales se pueden encontrar en un grupo de control, un estándar para una población, etc. Por ejemplo, cuando la condición anómala es una enfermedad, como la osteoporosis (caracterizada por una reducción de la masa ósea), algunas fuentes apropiadas de características normales podrían incluir a un individuo que no padece la enfermedad (p.ej., la osteoporosis), un estándar de la población de individuos que se cree que no sufren la enfermedad, etc.  
 25

- Del mismo modo, anómalo se puede referir a una condición asociada con una enfermedad. El término «asociado con» incluye un riesgo mayor de desarrollar la enfermedad, así como la enfermedad en sí. Por ejemplo, una determinada anomalía (como una reducción en la expresión de sFRP, que a su vez conlleva una regulación al alza de la formación de osteoclasto) se puede describir como asociada con la condición biológica de la osteoporosis (descenso de la masa ósea); por tanto, la anomalía es predictiva tanto de un riesgo mayor de desarrollar la osteoporosis como de la presencia de osteoporosis.  
 30

- Una expresión de proteína anómala, como la expresión de proteína sFRP anómala, se refiere a la expresión de una proteína que es de algún modo diferente de la expresión de la proteína en una situación normal (expresión natural). Esto incluye, a título meramente enunciativo, lo siguiente: (1) una mutación de la proteína de forma que uno o más de los residuos de aminoácidos son diferentes; (2) una corta eliminación o adición de uno o algunos residuos de aminoácidos en la secuencia de la proteína; (3) una eliminación o adición más larga de residuos de aminoácidos, de forma que se elimina o añade un dominio o subdominio completo de la proteína; (4) expresión de una cantidad aumentada proteína, en comparación con una cantidad estándar o de control; (5) expresión de una cantidad reducida de la proteína, en comparación con una cantidad estándar o de control; (6) alteración de la ubicación subcelular o del objetivo de la proteína; (7) alteración de la expresión temporalmente regulada de la proteína (de forma que la proteína se expresa cuando normalmente no lo haría o, alternativamente, no se expresa cuando normalmente sí lo haría); (8) alteración del procesamiento post-translacional; y (9) alteración de la expresión localizada (p. ej., específica para el órgano o el tejido) de la proteína (de forma que la proteína no se expresa cuando normalmente sí lo haría o se expresa cuando normalmente no lo haría), todo ello en comparación con un grupo de control o estándar.  
 35  
 40  
 45

- Los controles o estándares apropiados para la comparación con una muestra, para determinar una anomalía, incluyen muestras consideradas normales y valores de laboratorio, aún cuando posiblemente se hayan fijado de forma arbitraria, teniendo en cuenta que estos valores pueden variar de un laboratorio a otro. Los valores y estándares de laboratorio se pueden fijar basándose en un valor de la población determinado o conocido y se pueden proporcionar en forma de una gráfica o tabla que permita una sencilla comparación de los valores medidos determinados experimentalmente.  
 50

- cDNA (DNA complementario):** Una pieza de ácido desoxirribonucleico que carece de segmentos internos no codificantes (intrones) y secuencias reguladoras que determinan la transcripción. El cDNA se sintetiza en el laboratorio mediante transcripción inversa del RNA mensajero extraído de las células.  
 55

**CRD:** Un dominio rico en cisteína que normalmente tiene unos 120 aminoácidos de largo y se encuentra en la mitad amino-terminal de las proteínas Fz. En la sFRP prototípica aquí descrita, el CRD comprende los residuos 38-166 de la FRP-1. Se añadió Met (ATG) al extremo N-terminal para facilitar la expresión de la proteína. Típicamente el clivaje de Met en la bacteria se produce cuando se procesa la proteína. La secuencia de CRD se muestra a continuación:

MFQSDIGPYQ SGRFYTKPPQ CVDIPADLRL CHNVGYKKMV

LPNLLEHETM AEVKQQASSW.VPLLKNKCHA GTQVFLCSLF

5

APVCLDRPIY PCRWLCEAVRDSCEPVMQFF

GFYWPEMLKC.DKFPEGDVCI (amino ácidos 38-166 of SEQ ID NO:3)

**Etiqueta o marcador detectable:** Una «etiqueta» o «marcador detectable» es cualquier molécula o compuesto que se puede detectar, por ejemplo, por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inorgánicos, eléctricos o químicos. Algunos ejemplos de etiquetas, incluyendo isótopos radiactivos, sustratos enzimáticos, cofactores, ligandos, agentes quimioluminiscentes, haptenos, enzimas, partículas de oro coloidal, partículas de látex coloreadas, y epítopos marcadores, han sido divulgados con anterioridad y son conocidos para los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, las Patentes estadounidenses nº 4.275.149; 4.313.734; 4.373.932; y 4.954.452).

Los **epítopos marcadores** son pequeños tramos de aminoácidos a los que se puede unir un anticuerpo específico, que en algunas realizaciones permite identificar específicamente y seguir la proteína marcada que se ha añadido a un organismo vivo o a las células cultivadas. La detección de la molécula marcada se puede conseguir empleando diversas técnicas. Algunos ejemplos de estas técnicas incluyen: inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, citometría de flujo, microscopía de inmunofluorescencia, ELISA, inmunotransferencia (Western blot) y cromatografía de afinidad. Algunos ejemplos de epítopos marcadores útiles incluyen FLAG, T7, HA (hemaglutinina) y myc.

**Fluoróforo:** Un compuesto químico, que cuando se excita mediante exposición a una determinada longitud de onda de luz, emite luz (es decir, fluorescencia), por ejemplo a una longitud de onda diferente. Los fluoróforos se pueden describir en términos de su perfil de emisión o «color». Los fluoróforos verdes, como Cy3, FITC, y Oregon Green, se caracterizan por su emisión a unas longitudes de onda que generalmente oscilan entre 515-540 nm. Los fluoróforos rojos, como Texas Red, Cy5 y terrametilrodamina, se caracterizan por su emisión a longitudes de onda que generalmente oscilan entre 590-690 nm.

Algunos ejemplos de fluoróforos que se pueden utilizar se recogen en la Patente estadounidense nº 5.866.366, e incluyen, por ejemplo: 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbeno-2,2'-ácido disulfónico, acridina y derivados como acridina e isotiocianato de acridina, 5-(2,-aminoetil)aminonaftaleno-1-ácido sulfónico (EDANS), 4-amino-N-[3-vinilsulfonil]fenilnaftalimida-3,5 disulfonato (Lucifer Yellow VS), N-(4-anilino-1-naftil)maleimida, antranilamida, Brilliant Yellow, cumarina y derivados como cumarina, 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Coumarin 120), 7-amino-4-trifluorometilcumarina (Coumaran 151); cianosina; 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI); 5', 5"-dibromopirogalol-sulfoneftalina (Bromopyrogallol Red); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina; pentaacetato de dietilenotriamina; 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbeno-2,2'-ácido disulfónico; 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-ácido disulfónico; 5-[dimetilamino]naftaleno-1-cloruro de sulfonilo (DNS, cloruro de dansilo); 4-(4'-dimetilaminofenilazo)ácido benzoico (DABCYL); 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC); eosina y derivados como eosina e isotiocianato de eosina; eritrosina y derivados, como eritrosina B e isotiocianato de eritrosina; etidio; fluoresceína y derivados, como 5-carboxifluoresceína (FAM), 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF), 27'-dimetoxi-4',5',-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), y QFITC (XRTTC); fluorescamina; IR144; IR1446; isotiocianato Malachite Green; 4-metilumbeliferona; ortocresoltaleína; nitrotirosina; pararosanilina; Phenol Red; B-ficoeritrina; o-ftaldialdehído; pireno y derivados como pireno, butirato de pireno y succinimidil 1-pireno butirato; Reactive Red 4 (Cibacron .RTM. Brilliant Red 3B-A); rodamina y derivados, como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-rodamina (R6G), cloruro de lisamina rodamina B sulfonilo, rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, rodamina X isotiocianato, sulforhodamina B, sulforhodamina 101 y derivado de cloruro de sulfonilo de sulforhodamina 101 (Texas Red); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA); tetrametil rodamina; isotiocianato de tetrametil rodamina (TRJTC); riboflavina; ácido rosólico y derivados de quelato de terbio.

Otros fluoróforos adecuados incluyen GFP (proteína fluorescente verde), Lissamine™, dietilaminocumarina, clorotriazinilo de fluoresceína, naftofluoresceína, 4,7-diclororodamina y derivados de los mismos. También se pueden emplear otros fluoróforos conocidos por los expertos en la materia.

**Proteína de fusión:** Una proteína que comprende dos secuencias de aminoácidos que no se encuentran naturalmente unidas. El término «proteína de fusión al motivo peptídico de sFRP» se refiere a una proteína que comprende una primera secuencia de aminoácidos que se une a sFRP y una segunda secuencia de aminoácidos. El motivo de unión a sFRP y la segunda secuencia de aminoácidos se pueden denominar alternativamente dominios

de la proteína de fusión. Así, por ejemplo, la presente divulgación proporciona proteínas de fusión que comprenden un primer y un segundo dominio, donde el primer dominio incluye un motivo peptídico que se une a sFRP. El enlace entre el primer y el segundo dominio de la proteína de fusión suele ser, aunque no necesariamente, un enlace peptídico.

5 **Aislado:** Un componente biológico «aislado» (como un ácido nucleico, una proteína o un organelo) ha sido sustancialmente separado o purificado de otros componentes biológicos de la célula del organismo en la que el componente se encuentra naturalmente presente (es decir, otros RNA y DNA cromosómicos y extracromosómicos, proteínas y organelos). Los ácidos nucleicos y las proteínas que han sido «aislados» incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante métodos de purificación estándar. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados mediante expresión recombinante en una célula hospedadora, así como ácidos nucleicos sintetizados químicamente.

10 **Grupo de enlace o grupo de unión:** Un grupo de unión es un «brazo químico» entre una proteína o un péptido y un marcador detectable. Como reconocerán los expertos en la materia, para formar un enlace de brazo químico, cada uno de los reactivos debe contener los grupos necesarios para unir el péptido al marcador detectable. Algunas combinaciones representativas de estos grupos son amino con carboxilo para formar enlaces de amida, o carboxi con hidroxilo para formar enlaces de éster; o amino con haluros de alquilo para formar enlaces alquiloamino, o tioles con tioles para formar disulfuros, o tioles con maleimidias o haluros de alquilo para formar tioésteres. Las funcionalidades hidroxilo, carboxilo y amino, entre otras, cuando no están presentes, se pueden introducir mediante métodos conocidos. Del mismo modo, como reconocerán los expertos en la materia, se pueden emplear diversos grupos de unión. La estructura del enlace debe ser un enlace covalente estable formado para unir la proteína o el péptido a la etiqueta o al marcador detectable. En algunos casos, el grupo de unión debe estar diseñado para ser hidrófilo o hidrófobo, a fin de mejorar las características de unión deseadas del ligando y del receptor. Los enlaces covalentes deben ser estables con respecto a las condiciones de la solución a las que el ligando y el grupo de unión están sometidos. Por lo general, los grupos de unión preferibles serán de 1-20 carbonos y 0-10 heteroátomos (NH, O, S) y pueden ser una cadena recta o ramificada. Sin limitar lo anterior, para una persona con conocimientos en el campo resultará obvio que solamente las combinaciones de átomos que son químicamente compatibles comprenden el grupo de unión. Por ejemplo, los grupos de amida, éster, tioéster, éster de tiol, ceto, hidroxilo, carboxilo en combinaciones con uniones carbono-carbono son ejemplos aceptables de grupos de unión químicamente compatibles.

15 **Mimético:** Una molécula (como un compuesto químico orgánico) que imita la actividad de una proteína, como sFRP o sus fragmentos, el motivo peptídico (como la SEC. ID. N°: 9 o la SEC. ID. N°: 40), o variantes o fusiones de los mismos. Las realizaciones peptidomiméticas y organomiméticas se encuentran dentro del campo de aplicación de este término, donde la disposición tridimensional de los componentes químicos de estos peptidomiméticos y organomiméticos imitan la disposición tridimensional del segmento principal peptídico y de las cadenas laterales de aminoácido que componen el péptido, resultando en estos peptidomiméticos y organomiméticos de los péptidos que tienen una importante actividad inhibidora o actividad agonista específica. Para las aplicaciones de modelización informática, un farmacóforo es una definición tridimensional idealizada de los requisitos estructurales para la actividad biológica. Los peptidomiméticos y organomiméticos pueden ser diseñados para adaptarse a cada farmacóforo con el actual software de modelización informática (utilizando el diseño de fármacos asistido por ordenador o CADD). Véase Walters, "Computer-Assisted Modeling of Drugs," en Klegerman & Groves, eds., Pharmaceutical Biotechnology, Interpharm Press: Buffalo Grove, IL, pp. 165-174, 1993 y Principles of Pharmacology (ed. Munson), capítulo 102, 1995, para obtener una descripción de las técnicas utilizadas en el diseño de fármacos asistido por ordenador.

20 **Oligonucleótido:** Una secuencia de polinucleótidos lineal de hasta unas 100 bases de nucleótidos de largo. En varias realizaciones un oligonucleótido tiene al menos 10, 20, 30, 40, o 50 oligonucleótidos de largo.

25 **Operativamente unido:** Una primera secuencia de ácido nucleico es operativamente unida con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se encuentra en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico.

30 Por ejemplo, un promotor está operativamente unido a una secuencia de codificación si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia de codificación.

35 Por lo general, las secuencias de DNA operativamente unidas se encuentran contiguas y, cuando es necesario para unir dos regiones de codificación de proteínas, en el mismo marco de lectura.

40 **ORF (marco abierto de lectura):** Una serie de tripletes de nucleótidos (codones) que codifican aminoácidos sin ningún codón de terminación. Por lo general, estas secuencias se pueden traducir en un péptido.

45 **Osteoclasto:** Los osteoclastos son grandes células multinucleadas que reabsorben activamente el hueso. Los osteoclastos se derivan de las células madre hematopoyéticas y comparten características fenotípicas con los monocitos en circulación y los macrófagos de los tejidos. Se forman a partir de una población de células mononucleares en circulación que son trasladadas de la sangre a la superficie del hueso, donde se someten a diferenciación y fusión para formar células multinucleadas.

La osteopetrosis es una familia de enfermedades que se caracteriza porque los huesos largos no se remodelan. Los huesos largos resultantes tienen infiltración cartilaginosa hacia el centro del hueso desde la placa de crecimiento y un centro escasamente remodelado. Mientras que la osteoporosis puede estar causada por tener demasiados osteoclastos, la osteopetrosis puede estar causada por no tener un número suficiente de estas células.

- 5 La pérdida de la función ovárica tras la menopausia a menudo se traduce en una pérdida progresiva de masa ósea trabecular. Esta pérdida de hueso se debe en parte a un aumento de la producción de osteoclastos. Este aumento de la producción de osteoclastos parece deberse a un aumento de la producción por parte de las células de apoyo de las citoquinas osteoclastogénicas como IL-1, el factor de necrosis tumoral, y EL-6, todas ellas negativamente reguladas por los estrógenos.
- 10 Por lo general, los osteoclastos se encuentran en las enfermedades degenerativas de huesos en los sitios donde se produce la osteolisis. La superproducción de osteoclastos está asociada con enfermedades como el hiperparatiroidismo y la enfermedad de Paget. Los osteoclastos también se encuentran en los sitios donde se producen reacciones inflamatorias asociadas con el aflojamiento aséptico de la prótesis de cadera total, la artritis reumatoide y la periodontitis. Dos citocinas producidas por las células inflamatorias que pueden tener efectos
- 15 directos sobre la función y formación de los osteoclastos son la interleucina-1 (JX-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ).

**Motivo peptídico:** Una secuencia de aminoácido que se une a sFRP-1. Por lo general, un motivo peptídico es una secuencia de dos o más aminoácidos unidos a péptidos que proporciona una función o estructura característica. En una realización, se puede encontrar un motivo peptídico en más de una proteína o más de una vez en una única

20 proteína. Por ejemplo, el motivo peptídico mostrado en la SEC. ID. N°: 9 se caracteriza por su capacidad para unirse a sFRP y modular la actividad de sFRP. Sin dejarse guiar por la teoría, los tres residuos centrales de la SEC. ID. N°: 9 (D-G-R) se cree que son importantes para la unión de sFRP-1. Por tanto, en una realización, un motivo peptídico incluye estos tres aminoácidos. En otra realización, un motivo peptídico incluye los cinco aminoácidos centrales de la SEC. ID. N°: 9 (V-D-G-R-W). Además del motivo peptídico prototípico, hay varios otros ejemplos de motivos (SEC. ID. N°: 9-11, 14-17, y 24-26) que se unen a sFRP y que pueden ser capaces de modular la actividad de sFRP.

A pesar de que la secuencia de aminoácidos de una realización del motivo peptídico que se une a sFRP-1 se muestra en la SEC. ID. N°: 9, un experto en la materia apreciará que las variaciones en esta secuencia de aminoácidos, como 1, 2 o 3 deleciones, adiciones o sustituciones, se pueden realizar sin afectar sustancialmente a las actividades del motivo peptídico. Por tanto, el término «motivo peptídico» abarca tanto el motivo proporcionado

30 en la SEC. ID. N°: 9, como los motivos peptídicos adicionales proporcionados en las SEC. ID. N°: 10 y 11 y 14-26, así como las secuencias de aminoácidos que se basan en estas secuencias pero que incluyen una o más variantes de la secuencia o fragmentos de estas secuencias que contienen al menos 3, 4, 5 o 5 aminoácidos contiguos del motivo peptídico. Estos fragmentos o variantes de la secuencia también se pueden definir por el grado de identidad de la secuencia de aminoácidos que comparten con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°: 9.

35 Típicamente, las variantes de la secuencia del motivo peptídico compartirán al menos un 80% de identidad con las secuencias mostradas en SEC. ID. N°: 9-12 y 14-26. Las variantes más conservadas compartirán al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% de identidad con las secuencias mostradas en SEC. ID. N°: 9-12, 14-17, y 24-26.

El motivo peptídico se caracteriza por su capacidad para unirse a sFRP. Esta actividad se puede testar utilizando el ensayo ELISA descrito más adelante en la sección sobre los métodos. La capacidad de los motivos peptídicos para unirse a sFRP y modular la actividad de sFRP es beneficiosa en una serie de aplicaciones, incluyendo aplicaciones clínicas como el tratamiento de enfermedades asociadas con una remodelación anómala del hueso y más concretamente cuando se desea una mayor actividad de los osteoclastos.

**Marcador peptídico:** Una secuencia peptídica que se une (por ejemplo, mediante ingeniería genética) a otro péptido o a una proteína, para proporcionar una función a la fusión resultante. Por lo general, los marcadores peptídicos son relativamente cortos en comparación con una proteína a la que se fusionan; a modo de ejemplo, los marcadores peptídicos tienen cuatro o más aminoácidos de longitud, como 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 ó 25 o más aminoácidos de longitud. Normalmente, un marcador peptídico no tendrá más de 100 aminoácidos de longitud y puede que no más de unos 75, no más de unos 50, no más de unos 40 o no más de unos 30.

50 Los marcadores peptídicos confieren una o más funciones diferentes a una proteína de fusión («funcionalizando» de este modo a la proteína) y estas funciones pueden incluir la unión a anticuerpo (un epítipo marcador), purificación y diferenciación (p. ej., de una proteína nativa). Por otra parte, se puede utilizar un sitio de reconocimiento para una proteasa, para la que se conoce un anticuerpo de unión, como epítipo marcador específicamente clivable. El uso de este marcador clivable puede proporcionar el clivaje selectivo y la activación de una proteína (p. ej., sustituyendo el

55 sitio de clivaje de TGF- $\beta$ 1 por el de la procaspasa 3.

La detección de la molécula marcada se puede conseguir utilizando varias técnicas diferentes. Estas incluyen: inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, citometría de flujo, microscopía de inmunofluorescencia, ELISA, inmunotransferencia (Western blot) y cromatografía de afinidad.

Los epítomos marcadores añaden un epítomo conocido (sitio de unión de anticuerpo) a la proteína del sujeto, proporcionando la unión de un anticuerpo conocido y a menudo de alta afinidad, y permitiendo así identificar específicamente y seguir la proteína marcada que se ha añadido a un organismo vivo o a las células cultivadas. Algunos ejemplos de epítomos marcadores incluyen myc, T7, GST, GFP, HA (hemaglutinina) y marcadores FLAG .  
 5 Los primeros cuatro ejemplos son epítomos obtenidos de moléculas existentes. Por lo contrario, FLAG es un epítomo marcador sintético diseñado para una alta antigenicidad (véanse, por ejemplo, las Patentes estadounidenses nº 4.703.004 y 4.851.341).

Los marcadores de purificación se utilizan para permitir una fácil purificación de la proteína marcada, por ejemplo mediante cromatografía de afinidad. Un marcador de purificación muy conocido es el marcador hexahistidina (6x His), literalmente una secuencia de seis residuos de histidina. El sistema de purificación de proteína 6x His está comercializado por Q LA GEN (Valencia, CA), bajo el nombre de QIAexpress®.  
 10

Un único péptido marcador puede servir para más de un fin; cualquier marcador unido, por ejemplo, incrementará el peso molecular de la proteína de fusión, permitiendo así la diferenciación entre las proteínas marcadas y las nativas. Se pueden emplear anticuerpos específicos para un «epítomo marcador» para construir una columna de inmunoafinidad, permitiendo así el uso de un epítomo marcador para la purificación de la proteína marcada. Del mismo modo, en algunos casos hay anticuerpos monoclonales específicos para un marcador de purificación disponible (p. ej., anticuerpos monoclonales contra el péptido 6x His, que comercializa QIAGEN o CLONTECH, Palo Alto, CA).  
 15

**Excipientes farmacéuticamente aceptables:** Los excipientes farmacéuticamente aceptables útiles en la presente divulgación son los convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª Edición (1975), describe composiciones y fórmulas adecuadas para la administración farmacéutica de las proteínas de fusión divulgadas en el presente documento.  
 20

En general, la naturaleza del excipiente dependerá del modo de administración concreto que se vaya a emplear. Por ejemplo, las formulaciones parenterales normalmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables, como agua, suero fisiológico, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para las composiciones sólidas (p. ej., en forma de polvo, píldoras, tabletas o cápsulas), los excipientes sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, almidón o estearato de magnesio. Además de los excipientes biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener pequeñas cantidades de sustancias auxiliares no tóxicas, como agentes emulsionantes o humectantes, conservantes y agentes tamponadores de pH o similares, como el acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.  
 25  
 30

**Polinucleótido:** Una secuencia de ácido nucleico que incluye al menos dos residuos de ácido nucleico.

**Polipéptido:** Un fragmento de proteína que incluye al menos dos residuos de aminoácidos.

**Fragmento de proteína:** Una secuencia de aminoácidos que contiene menos residuos de aminoácidos de los que se encuentran en una proteína naturalmente presente y que incluye al menos dos residuos de aminoácidos. Por ejemplo, si una proteína naturalmente presente, es decir una proteína expresada por un gen, tiene 300 residuos de aminoácidos de longitud, un polipéptido derivado de la proteína podría tener 299 residuos de aminoácidos o menos. En determinados ejemplos, el polipéptido podría tener menos de 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50, o 25 residuos de aminoácidos.  
 35

**Purificado:** El término purificado no implica una pureza absoluta; se trata más bien de un término relativo. Así, por ejemplo, un preparado de péptidos o proteínas purificados es aquella en la que la proteína o el péptido es más puro que la proteína o el péptido en su entorno natural dentro de la célula. Estas proteínas o péptidos se pueden producir, por ejemplo, mediante técnicas de purificación estándar o mediante expresión recombinante. En algunas realizaciones, un preparado de una proteína o péptido se purifica de forma que la proteína o el péptido representa al menos el 50%, por ejemplo, o al menos el 70% del contenido de proteína total del preparado.  
 40  
 45

**RANK y RANKL:** El receptor activador de NF-KB (RANK) es un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF). El ligando, el receptor activador del ligando NF-KB (RANKL), es un miembro de la superfamilia del TNF y se ha caracterizado en múltiples entornos recibiendo diversos nombres, como factor de diferenciación de osteoclasto (ODF), citocina inducida por la activación relacionada con el factor de necrosis tumoral (TRANCE) y ligando de osteoprotegerina (OPGL). RANK es una proteína transmembrana de Tipo I que tiene 616 residuos de aminoácidos y que interactúa con el factor asociado al receptor de TNF 3 (TRAF3). La activación de RANK mediante sobreexpresión, coexpresión de RANK y del ligando RANK unido a la membrana (RANKL), o la adición de RANKL soluble o anticuerpos agonistas a RANK, resulta en la regulación al alza del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción ubicuo muy utilizado en las células del sistema inmunitario (Patente estadounidense nº 6.017.729).  
 50  
 55

RANK se expresa en precursores de osteoclastos y osteoclastos maduros. El RANKL producido por los osteoblastos estimula la formación y la actividad de los osteoclastos, lo que facilita el desarrollo normal del hueso y su remodelación. La focalización en los genes de RANKL o RANK provoca osteopetrosis (aumento de la masa ósea), así como graves defectos en la formación de nódulos linfáticos. La osteoprotegerina (OPG) es un factor soluble que también pertenece a la familia de receptores del TNF. La OPG se une a RANKL e inhibe la formación de osteoclastos multinucleados funcionales *in vitro*. La sobreexpresión de OPG en los ratones transgénicos causa osteopetrosis severa, con una pérdida de cavidades de la médula ósea y una pronunciada reducción de los osteoclastos. Los mismos efectos se observaron tras la administración de OPG en ratones normales. Estos efectos fueron todos atribuibles a la unión de OPG a RANKL, que impidió la unión del ligando y la activación de RANK. Alternativamente, se cree que la expresión de RANKL por las células T de las articulaciones de los sujetos afectados por artritis reumatoide contribuye a una mayor actividad de los osteoclastos y de la característica pérdida ósea de esta enfermedad.

**Recombinante:** Un ácido nucleico recombinante es aquel que tiene una secuencia que no está naturalmente presente o que tiene una secuencia producida mediante una combinación artificial de dos segmentos de la secuencia que de lo contrario estarían separados. Esta combinación artificial a menudo se realiza mediante síntesis química o, más frecuentemente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo con técnicas de ingeniería genética.

**Identidad de las secuencias:** La similitud entre las secuencias de aminoácidos se expresa en términos de similitud entre las secuencias, denominada también identidad de las secuencias. A menudo la identidad de la secuencia se mide en términos de identidad porcentual (o similitud u homología); cuanto más elevado es el porcentaje, más similares son las dos secuencias. Los homólogos o variantes de sFRP (cuyo miembro prototípico se muestra en la SEC. ID. Nº: 1), o el motivo peptídico que se une a sFRP (por ejemplo, SEC. ID. Nº 9), divulgado en el presente, poseerán un grado relativamente elevado de identidad de la secuencia al alinearlos empleando métodos estándar.

Los métodos de alineación de las secuencias para fines de la comparación son bien conocidos en el campo. Diversos programas y algoritmos de alineación se describen en: Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, 1988; Higgins y Sharp, Gene 73:237-244, 1988; Higgins y Sharp, CABIOS 5:151-153, 1989; Corpet et al, Nucleic Acids Research 16:10881-10890, 1988; y Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, 1988. Altschul et al, Nature Genet. 6:119-129, 1994.

La herramienta BLAST™ (NCBI Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al, J. Mol Biol. 215:403-410, 1990) está disponible en múltiples fuentes, incluyendo el Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI, Bethesda, MD) y en Internet para su uso en relación con los programas de análisis de las secuencias blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx.

Las variantes de sFRP, los fragmentos de sFRP o el motivo peptídico que se une a sFRP se caracterizan típicamente por poseer al menos un 50% de identidad de la secuencia en la alineación de toda la longitud con la secuencia de aminoácidos de sFRP, los fragmentos de sFRP o el motivo peptídico (por ejemplo, SEC. ID. Nº: 9) utilizando el NCBI Blast 2.0, Gapped Blastp configurado con los parámetros por defecto. Para las comparaciones de secuencias de aminoácidos de más de unos 30 aminoácidos, la función de las secuencias Blast 2 se emplea utilizando la matriz BLOSUM62 por defecto configurada conforme a los parámetros por defecto (coste de existencia de vacío de 11 y coste de vacío por residuo de 1). Al alinear los péptidos cortos (menos de unos 30 aminoácidos), la alineación se debe realizar utilizando la función de las secuencias Blast 2, empleando la matriz PAM30 configurada conforme a los parámetros por defecto (vacío abierto de 9 y penalizaciones de vacío de extensión 1). Las proteínas con una similitud incluso mayor a las secuencias de referencia mostrarán identidades porcentuales crecientes al evaluarlas con este método, como al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% o el 98% de identidad de la secuencia. Cuando se compara menos de la secuencia completa para averiguar la identidad de la secuencia, las homólogas y variantes típicamente poseerán al menos un 75% de identidad de la secuencia en ventanas cortas de 10-20 aminoácidos, y pueden poseer identidades de la secuencia de al menos el 85% o al menos el 90%, 95%, o el 98% dependiendo de su similitud con la secuencia de referencia. Los métodos para determinar la identidad de la secuencia en ventanas cortas se describen en el sitio web que mantiene el Centro Nacional de Información de Biotecnología en Bethesda, Maryland. Un experto en la materia apreciará que estos rangos de identidad de la secuencia se proporcionan únicamente con fines orientativos; es perfectamente posible obtener homólogos muy importantes que no se encuentren dentro de los rangos proporcionados.

**sFRP:** La proteína secretada relacionada con el receptor Frizzled (sFRP) es una proteína secretada que se compone de unos 300 aminoácidos, incluyendo un CRD que es típicamente entre un 30% y un 50% idéntico al CRD (dominio rico en cisteína) de los miembros de la familia de las proteínas Fz. Hay varias proteínas sFRP diferentes y la secuencia de ácido nucleico del miembro prototípico, sFRP-1, se recoge en la SEC. ID. Nº: 1. Las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de otros miembros de la familia sFRP se pueden encontrar en el sitio web del Centro Nacional de Biotecnología, por ejemplo el número de acceso GenBank AF218056 (Gallus gallus FRP-2), número de acceso GenBank AV354083 (Mus musculus-FKP-1), número de acceso GenBank AV304328 (Mus musculus s-FRP-

2), número de acceso GenBank U24163 (homo sapiens sFRP-3/FrzB) y número de acceso GenBank AI587049 (Homo sapiens sFRP-1). El marco abierto de lectura de la sFRP prototípica se muestra en la SEC. ID. N°: 2, mientras que la secuencia de la proteína se muestra en la SEC. ID. N°: 3. Conforme se divulga en el presente, sFRP se une a RANKL e inhibe la formación de osteoclastos.

- 5 La actividad de unión de sFRP-1 y su capacidad para modular la formación de osteoclastos se puede someter a ensayo utilizando el método ELISA y los métodos de bioensayo de osteoclastogénesis aquí descritos. La capacidad de la proteína sFRP-1, o un fragmento de la misma, para realizar estas actividades es beneficiosa en diversas aplicaciones, incluyendo aplicaciones clínicas como el tratamiento de las enfermedades asociadas con una remodelación anómala del hueso.
- 10 A pesar de que la secuencia de aminoácidos de la sFRP prototípica se muestra en SEC. ID. N°: 3, un experto en la materia apreciará que las variaciones en esta secuencia de aminoácidos, como 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40 o 50 deleciones, adiciones o sustituciones (incluyendo sustituciones de aminoácidos conservadoras), se pueden realizar sin afectar sustancialmente a las actividades de la proteína (o fragmentos de la misma) como se ha indicado anteriormente. De este modo, el término fragmentos de «sFRP» abarcan tanto las proteínas que tienen las
- 15 secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC. ID. N°: 4-8, como las secuencias de aminoácidos que se basan en estas secuencias, pero que incluyen una o más variantes de la secuencia. Estas variantes de la secuencia también se pueden definir por el grado de identidad de la secuencia de aminoácidos que comparten con la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEC. ID. N°: 4-8. Típicamente, las variantes de la secuencia de sFRP compartirán al menos un 80% de identidad de la secuencia con las secuencias mostradas en las SEC. ID. N°: 4-8.
- 20 Las variantes más conservadas compartirán al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% de identidad de la secuencia con las secuencias mostradas en SEC. ID. N°: 4-8. Además de compartir la identidad de la secuencia con la secuencia de la proteína sFRP prototípica, estas variantes de la secuencia poseen la capacidad de unirse a miembros de la familia del TNF como RANKL.

25 **Sujeto:** Organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye mamíferos tanto humanos como no humanos.

**Dosis terapéuticamente efectiva:** Una dosis suficiente para prevenir el avance o provocar la regresión de la enfermedad, o que es capaz de aliviar los síntomas causados por la enfermedad.

30 **Familia de proteínas del TNF:** La familia de proteínas del factor de necrosis tumoral (TNF) contiene tanto ligandos unidos a la membrana como proteínas solubles. Algunos miembros de la familia, como TNF y RANKL, son activos tanto en forma anclada a la membrana como en forma soluble, siendo esta última enzimáticamente liberada en la solución, en particular mediante TACE (enzima de conversión de TNF alfa) (J. Hardy, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:2095-2097, 1997; J.D. Buxbaum et al, Proc. Natl. Acad. Sci. V.S.A. 89: 10075-10078, 1992). La región primaria de homología entre los miembros de la familia del TNF es un tramo de 150 residuos de aminoácidos en el carboxi-terminal, que se encuentra situado en el espacio extracelular. Este dominio es responsable de la unión a miembros

35 cognados de la familia del receptor de TNF. Esta familia de proteínas receptoras se caracteriza por cuatro dominios con residuos de cisteína con una separación regular: cada una tiene un único dominio transmembrana y se une a los miembros de la familia TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ , incluyendo, por ejemplo, TNFRL, TNFRU, Fas, CD30 y CD30.

40 **Transformado:** Una célula transformada es una célula en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico mediante técnicas de biología molecular. Para los fines del presente, el término transformación abarca todas las técnicas con las que se podría introducir una molécula de ácido nucleico en esa célula, incluyendo la transfección con vectores virales, la transformación con vectores plásmidos y la introducción de DNA desnudo mediante electroporación, lipofección y aceleración con pistola de partículas.

45 **Vector:** Una molécula de ácido nucleico introducida en una célula hospedadora, produciendo así una célula hospedadora transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en una célula hospedadora, como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en el campo. Un vector también puede incluir una secuencia que codifica un motivo aminoacídico que facilita el aislamiento del producto de proteína deseado, como una secuencia que codifica proteína de unión a maltosa, c-myc o GST.

50 **WNT:** Un grupo de genes y las proteínas codificadas por ellos que desempeñan un importante papel en la regulación del desarrollo celular es la familia de glicoproteínas Wnt. Las proteínas Wnt son una familia de factores de crecimiento que se componen de más de una docena de moléculas estructuralmente relacionadas y que participan en la regulación de procesos biológicos fundamentales, como la apoptosis, embriogénesis, organogénesis, morfogénesis y tumorigénesis. Estos polipéptidos son factores multipotentes y tienen actividades biológicas similares a las de otras proteínas secretoras, como el factor de crecimiento de transformación (TGF)- $\beta$ , factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento nervioso (NGF) y proteínas morfogenéticas óseas (BMP).

55

Un miembro de la familia del factor de crecimiento Wnt se expresa preferiblemente en el tejido óseo y en células derivadas del hueso, y parece estar implicado en el mantenimiento del fenotipo del osteoblasto maduro (célula formadora de hueso).

5 A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente tienen el significado que normalmente entiende una persona con conocimientos en el campo al que pertenece la presente divulgación. «Comprende» significa «incluyendo». Los términos en singular «un», «una», «el» y «la» incluyen sus plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, «comprende A y B» significa «incluyendo A y B», sin excluir otros elementos. A pesar de que en la práctica o para la comprobación de la presente divulgación, se pueden emplear métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluyendo las explicaciones de los términos. Por otra parte, los materiales, métodos y ejemplos se ofrecen únicamente a título ilustrativo y no pretenden establecer limitaciones.

### III. Descripción de diversas realizaciones

15 La divulgación proporciona métodos para inhibir la formación de osteoclastos en un sujeto. Estos métodos incluyen la administración de sFRP 1 (SEC. ID. N°: 3), variantes de sFRP-1 (SEC. ID. N°: 3), o 3 fusiones o fragmentos de sFRP -1 (SEC. ID. N°: 3). La administración de estos péptidos incluye la administración y expresión de ácidos nucleicos que codifican los péptidos. Las proteínas o los péptidos administrados se caracterizan por su capacidad para unirse a RANKL, por ejemplo, RANKL humano, denominado «TRANSE» (AF013171), RANKL humano (AF019047), y RANKL humano, denominado «OPGI» (AF053 712), e inhiben la formación de osteoclastos. La inhibición de la formación de osteoclastos será útil para el tratamiento de trastornos osteopáticos, como la osteoporosis postmenopáusica, la enfermedad de Paget, las metástasis osteolíticas, el mieloma múltiple, el hipoparatiroidismo, la artritis reumatoide, la periodontitis y la hipercalcemia de malignidad.

25 La divulgación también proporciona métodos de selección de las proteínas sFRP, y fragmentos y variantes de las mismas, que se unen a miembros de la familia de proteínas del TNF. Estos métodos incluyen poner en contacto una proteína sFRP con al menos un miembro de la familia TNF, y detectar el miembro de la familia TNF que se une a la proteína sFRP. Los miembros de la familia TNF que son de particular interés incluyen RANKLrApo2/TRAIL, FasL, CD40L, CD27L, CD30L, Apo3I/TWEAK, TNF y LT-alpha (SI. Baker and EP Reddy, Oncogene 17:3261-3270,1998). Los miembros de la familia sFRP que son de particular interés incluyen sFRP-1 (SEC. ID. N°: 3), sFRP 2 (número de acceso GenBank MMTJ8856 7, sJRP-3 (número de acceso GenBank MMU88568, sFRP4 (número de acceso GenBank AF012891 y sFRP-5 (número de acceso GenBank AF11 7 758).

30 La divulgación también proporciona el péptido purificado mostrado en la SEC. ID. N°: 14. Este péptido resulta útil para estimular la diferenciación de osteoclastos *in vitro* e *in vivo*. Cuando el péptido se utiliza *in vivo* puede ser administrado a sujetos para potenciar la diferenciación de osteoclastos.

### 35 IV. Expresión y purificación de la sFRP, fragmentos, fusiones y variantes de la misma, así como del motivo péptido

La sFRP, fragmentos y variantes de la misma, se pueden purificar a partir de células MDCK (ATCC N° CCL-34) transfectadas con vectores que codifican sFRP, tal y como se describe más abajo. La sFRP, fragmentos y variantes de la misma, también se pueden purificar a partir de una fuente de tejido empleando métodos bioquímicos convencionales, o se pueden producir recombinantemente en células procaríóticas o eucarióticas empleando métodos bien conocidos en el campo (por ejemplo, los descritos en Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989). La expresión recombinante de los fragmentos de sFRP se describe en (Urea et al, J Biol Chem 275:4374 4382, 2000). Por otra parte, las secuencias de ácido nucleico que codifican los miembros de la familia sFRP están disponibles en GenBank, e incluyen la secuencia de cDNA mostrada en SEC. ID. N°: 1.

45 Los fragmentos de sFRP recombinante, fusiones y variantes de la misma, se pueden obtener utilizando sistemas comercializados diseñados para una expresión y purificación óptimas de la proteína de fusión. Estas proteínas de fusión incluyen típicamente un marcador proteico que facilita la purificación. Algunos ejemplos de estos sistemas incluyen: la fusión de la proteína pMAL y el sistema de purificación (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA); el sistema de fusión de genes de GST (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, Piscataway, NT); y el sistema del vector de expresión de pTrcHis (Invitrogen, Carlsbad, CA). Por ejemplo, el sistema de expresión de pMAL utiliza un vector que añade una proteína de unión a maltosa a la proteína expresada. La proteína de fusión se expresa en E.coli, y la proteína de fusión es purificada de un extracto de célula en bruto empleando una columna de amilosa. Si es necesario, el dominio de la proteína de unión a maltosa se puede clivar de la proteína de fusión mediante tratamiento con una proteasa adecuada, como el Factor Xa. El fragmento de unión a maltosa se puede entonces retirar de la preparación pasándola por una segunda columna de amilosa. También se pueden utilizar los sistemas de expresión eucarióticos, incluyendo sistemas de expresión de *Pichia*, tabaco y *Baculovirus*, como los que comercializa invitrogen.

Para cada uno de estos sistemas, la proteína sFRP completa, variantes o fragmentos de la misma, se pueden producir ligando el marco abierto de lectura (ORF) de la secuencia deseada al vector. Para garantizar la expresión efectiva, el ORF debe estar operativamente ligado al vector, es decir, que debe estar unido de forma que el marco de lectura del ORF esté alineado con el marco de lectura del marcador proteico. Cuando se desea expresar fragmentos de sFRP, un ORF que codifica el fragmento deseado puede ser amplificado mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) del cDNA de la sFRP, clonado, purificado y después ligado al vector de expresión. Alternativamente, el fragmento amplificado se puede ligar directamente al vector de expresión. También se podría, dependiendo de la disponibilidad de sitios de restricción adecuados en el cDNA de la sFRP, obtener el fragmento deseado mediante la digestión de una endonucleasa de restricción apropiada, de forma que pueda ser directamente clonado en el vector de expresión.

La purificación de la proteína expresada se puede conseguir utilizando el régimen de purificación apropiado para la marca de expresión (si se emplea un sistema de expresión/purificación comercializado) o también se puede emplear la cromatografía de afinidad convencional, empleando anticuerpos, preferiblemente anticuerpos monoclonales, que reconocen las regiones apropiadas de la sFRP o procedimientos de cromatografía establecidos para las sFRP.

Cuando se vayan a emplear fragmentos de sFRP, estos fragmentos se pueden generar alternativamente mediante la digestión de una proteína completa con diversas proteasas. Los fragmentos se pueden entonces separar basándose en su tamaño, su carga u otras características. Estos fragmentos también se pueden generar sintéticamente mediante el uso de métodos conocidos de síntesis de péptidos

#### **V. Métodos para inhibir la formación de osteoclastos**

Los osteoclastos son grandes células multinucleadas que reabsorben hueso activamente, derivan de células madre hematopoyéticas y comparten características fenotípicas con monocitos en circulación y macrófagos de tejidos. Se forman a partir de la población de células mononucleadas circulantes que se trasladan de la sangre a la superficie del hueso, donde se someten a diferenciación y fusión para formar células multinucleadas.

La osteopetrosis es una familia de enfermedades que se caracteriza porque los huesos largos no se remodelan. Los huesos largos resultantes tienen infiltración cartilaginosa hacia el centro del hueso desde la placa de crecimiento y un centro escasamente remodelado. Mientras que la osteoporosis puede estar causada por osteoclastos que son demasiado numerosos o demasiado activos, la osteopetrosis puede estar causada por carecer de un número suficiente de estas células o por su actividad inadecuada. Así, potenciar la diferenciación de los osteoclastos puede resultar recomendable en los sujetos con una remodelación ósea anómala, como la acondroplasia y la osteopetrosis. Los métodos de administración de estas sFRP para inhibir la diferenciación de osteoclastos en un sujeto se definen a continuación.

Por otra parte, la sFRP-1 se puede usar para inhibir la formación de osteoclastos. La pérdida de función ovárica tras la menopausia suele provocar una pérdida progresiva de masa ósea trabecular y finalmente osteoporosis. Esta pérdida de hueso se debe en parte al aumento de la producción de osteoclastos. Esta producción incrementada de osteoclastos parece deberse al aumento de la producción de las células de soporte de las citocinas osteoclastogénicas, como IL-1, el factor de necrosis tumoral e IL-6, todas ellas reguladas negativamente por los estrógenos.

Los osteoclastos también están implicados en enfermedades de huesos degenerativas en los sitios donde se produce la osteolisis. Del mismo modo, una sobreproducción de osteoclastos está asociada con enfermedades como el hiperparatiroidismo y la enfermedad de Paget. Los osteoclastos también se encuentran en sitios de reacciones inflamatorias asociadas con el aflojamiento aséptico de la prótesis de cadera total, la artritis reumatoide y la periodontitis. Dos citocinas producidas por células inflamatorias que pueden tener un efecto directo sobre la formación de los osteoclastos y sobre su función son la interleucina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ). Así, la inhibición de la formación de osteoclastos resulta deseable en sujetos con trastornos de huesos caracterizados por la reabsorción de hueso no deseada.

En vista de la capacidad de la sFRP-1 para inhibir la osteoclastogénesis, ésta puede tener utilidad clínica en condiciones en las que una actividad excesiva de los osteoclastos tiene consecuencias patológicas. La osteoporosis y la artritis reumatoide son ejemplos de condiciones que resultan unos objetivos particularmente apropiados para el tratamiento con sFRP-1, porque el RANKL soluble de las células T se cree que tiene un importante papel en la pérdida de hueso asociada con estas enfermedades. Los métodos de administración de sFRP-1 para inhibir la formación de osteoclastos en un sujeto se divulgan en el presente documento.

Los trastornos de la homeostasis del calcio también se pueden ver afectados por la actividad de los osteoclastos. Por ejemplo, los osteoclastos son capaces de movilizar el calcio fuera de los huesos y provocar estados hipocalcémicos. Alternativamente, la inhibición de los osteoclastos puede ayudar a minimizar la movilización en estados hipercalcémicos. Por tanto, la modulación de la actividad de los osteoclastos se puede utilizar como intervención terapéutica para tratar la hipocalcemia e hipercalcemia.

## VI. Incorporación de fragmentos, fusiones y variantes de la sFRP terapéuticamente efectivos a preparaciones farmacéuticas y métodos de tratamiento

5 Para la administración a animales, por lo general la sFRP purificada, los fragmentos de sFRP o variantes de sFRP se combinan con un excipiente farmacéuticamente aceptable. La preparación farmacéutica puede contener un único péptido o estar compuesta por más de una variedad de fragmentos de sFRP. En general, la naturaleza del excipiente dependerá del modo concreto de administración que se vaya a emplear. Por ejemplo, las formulaciones parenterales suelen comprender fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables, como agua, suero fisiológico, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol, albúmina humana o similares, como vehículo. Para las composiciones sólidas (por ejemplo, en forma de polvo, tabletas o cápsulas) los excipientes sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o esterato de magnesio. Además de los excipientes biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener pequeñas cantidades de sustancias auxiliares no tóxicas, como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes, agentes tamponadores del pH y similares, como acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

15 Como es sabido en el campo, los productos farmacéuticos a base de proteínas solamente se pueden administrar de forma no efectiva mediante ingestión. No obstante, se pueden administrar formas basadas en píldoras de proteínas farmacéuticas subcutáneamente, en particular si están formuladas en composición de liberación lenta. Estas formulaciones de liberación lenta se pueden producir combinando la proteína diana con una matriz biocompatible, como el colesterol. Otro posible método de administrar los productos farmacéuticos a base de proteínas es a través del uso de minibombas osmóticas. Como ya se ha señalado anteriormente, también se emplearía un excipiente biocompatible conjuntamente con este método de administración.

También se contempla que la sFRP se podría administrar a las células en forma de ácido nucleico y posteriormente ser trasladada por la célula hospedadora. Esto se podría hacer, por ejemplo, a través del uso de vectores virales o liposomas. Los liposomas también se podrían emplear para la administración de la proteína en sí.

25 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden administrar por cualquier medio que consiga su propósito previsto. Las cantidades y los regímenes de administración de los fragmentos de sFRP pueden ser determinados fácilmente por los expertos en la materia del tratamiento de enfermedades asociadas con una remodelación ósea anómala. Para utilizarlas en el tratamiento de estas enfermedades, las proteínas descritas se administran en una cantidad efectiva para incrementar o reducir la actividad de osteoclastogénesis. Estas dosis incluyen cantidades que incrementan las concentraciones en los tejidos diana hasta unos niveles en los que la actividad terapéutica se ha observado *in vitro*. Las proteínas divulgadas en el presente también se pueden utilizar para modular las interacciones de las células T y las funciones del sistema inmunitario. Las dosis suficientes para conseguir una concentración en los tejidos que provoque un aumento o una reducción de la osteoclastogénesis y/o actividad de las células T se pueden determinar empleando las cantidades descritas en los ejemplos siguientes. Los péptidos o proteínas se pueden administrar a un huésped in vivo, como por ejemplo, mediante administración sistémica (como la administración intravenosa o intraperitoneal). Por otra parte, los péptidos o las proteínas se pueden administrar intralesionalmente: es decir, que el péptido o la proteína se inyecta directamente en el tumor o la zona afectada.

40 Las dosis efectivas de los péptidos divulgados para su aplicación terapéutica variarán dependiendo de la naturaleza y de la gravedad de la condición a tratar, la edad y el estado del sujeto, así como de otros factores clínicos. Por tanto, el médico se encargará de determinar finalmente el régimen de tratamiento adecuado. Típicamente, el rango de dosis oscilará de unos 0,1 µg/kg de peso corporal a unos 100 mg/kg de peso corporal. Otros rangos adecuados incluyen dosis de unos 1 µg/kg a 10 mg/kg de peso corporal. El programa de dosificación puede variar desde una vez a la semana a una vez al día, dependiendo de una serie de factores clínicos, como la sensibilidad del sujeto a la proteína. Algunos ejemplos de programas de dosificación son 3 µg/kg administrados dos veces a la semana, tres veces a la semana o diariamente; una dosis de 7 µg/kg dos veces a la semana, tres veces a la semana o diariamente; una dosis de 10 µg/kg dos veces a la semana, tres veces a la semana, o diariamente; o una dosis de 30 µg/kg dos veces a la semana, tres veces a la semana o diariamente. En el caso de las enfermedades más agresivas, puede ser preferible administrar dosis como las descritas anteriormente por vías alternativas, incluyendo intravenosamente o intratecalmente. La infusión continua también puede resultar apropiada.

### Ejemplos

El análisis ELISA usando RANKL y sFRP-1 ha indicado que sFRP-1 se une a RANKL. RANKL es conocido por estar involucrado con la diferenciación de osteoclastos. Subsecuentemente, sFRP-1 (SEC. ID N°:3) se mostró para inhibir la osteoclastogénesis.

**Referencia Ejemplo 1****Materiales y métodos****1. Materiales**

La sFRP-1 humana recombinante se preparó como se describe (Uren et al. J Biol Chem 275:43 74-4382,2000). La secuencia de codificación de la sFRP-2 murina fue amplificada mediante RT-PCR, utilizando RNA completo de riñón de ratón embrionario como fuente, subclonada en el vector de expresión pcDNA3.1, transfectada en células MDCK y la proteína recombinante fue purificada mediante cromatografía de afinidad a la heparina, básicamente como se describe para la sFRP-1 en Uren et al, J. Biol. Chem. 275:4374-4382, 2000. El antisuero policlonal de conejo se unió a la sFRP-1 humana recombinante, inyectando ~10 µg de proteína purificada con adyuvante de Freund completo en los nódulos linfáticos inguinales y posteriormente inyectando intramuscularmente a intervalos de 2 ó 3 semanas cantidades similares del antígeno disuelto en el adyuvante de Freund incompleto. Tras varias dosis de recuerdo, se obtuvo una fracción de inmunoglobulina del suero mediante cromatografía con sefarosa unida a proteína G (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia).

Los péptidos fueron sintetizados empleando la química de fase sólida estándar, purificados mediante HPLC de fase inversa y su identidad se verificó mediante un análisis espectroscópico de masas (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL).

Para los ensayos ELISA, el TRAIL y RANKL soluble recombinante, y los anticuerpos dirigidos contra estas proteínas se obtuvieron de PeproTech (Rocky Hill, NJ). El anticuerpo monoclonal murino (designado anti-FLAG M2) dirigido contra el epítipo FLAG se adquirió a Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY. Los conjugados de fosfatasa alcalina con IgG de cabra anti-conejo y la fosfatasa alcalina con IgG de conejo anti-ratón y paranitrofenolfosfato (pNPP) se adquirieron a Sigma (St. Louis, MO).

Para los bioensayos, el RANKL soluble recombinante se adquirió a Peprotech, Rocky Hill, New Jersey, o los residuos 158-317 del RANKL murino se prepararon como una proteína expresada en GST. M-CSF se obtuvo de Research Genetics Institute (Boston, MA, USA).

La biblioteca de péptidos aleatorios expresados en el fago M13 se construyó como se describe (Adey et al. Methods in Molecular and Cellular Biology 6:3-14, 1995/1996).

Los ratones recién nacidos (de 0 a 1 días de vida) C57BL/6J y los ratones macho de 6 a 9 semanas de vida C57BL/6J se compraron a Monash University Animal Services Centre (Clayton, Australia). Las líneas celulares estromales murinas, tsJ2, tsJ10 y tsJ14, se generaron mediante transfección con un vector retroviral expresando una variante sensible a la temperatura del gen inmortalizador SV40 (ts A58; Chambers et al, Proc Natl. Acad. Sci. USA 90:5578-5582,1993; Owens et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 222:225-229, 1996). Las células RAW264.7 se adquirieron en ATCC, y las líneas celulares KUSA/O y mc-3T3-el se describen en Horwood et al. Endocrinology 139:4743-4746, 1998. Los agentes osteotrópicos regulan la expresión del factor de diferenciación de los osteoclastos y la osteoprotegerina en las células estromales osteoblásticas.  $\alpha,25(\text{OH})_2$  vitamina D3 se adquirió a Wako Pure Chemicals Co. (Osaka, Japón). PGE2 se obtuvo de Sigma (St Louis, MO). Otros productos químicos y reactivos eran de grado analítico.

**2. Cultivo de células**

Las células MDCK (American Type Culture Collection) se cultivaron en el medio de Eagle modificado por Dulbecco (Life Technologies, Inc., Rockville, Maryland) que contenía un 10% de suero bovino fetal (Colorado Serum Company, Denver, Colorado) en 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.

**3. Selección de la biblioteca de péptidos expresados en fagos**

El aislamiento del fago que contiene segmentos del péptido de unión a sFRP-1 en su superficie se realizó básicamente como se ha descrito con anterioridad (Sparks et al. Screening phage-displayed random peptide libraries, in Phage Display Peptides and Proteins Eds. BK Kay et al. Academic Press, NY, 227-253,1996). En resumen, se incubó un único pocillo de una placa ELISA de 96 pocillos (Costar #3590, superficie de poliestireno) durante una hora con la sFRP-1 (1 µg/50 µl) purificada recombinante. Esta y todas las demás manipulaciones con placas ELISA se realizaron a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 150 µl de 1% BSA al pocillo y se incubaron durante dos horas. Tras tres lavados con PBS/0.1% Tween 20, se añadieron  $2,5 \times 10^{10}$  fagos de la biblioteca del péptido 12-mer aleatorio expresado en el fago M13 al pocillo ya recubierto y se incubaron durante 3,5 horas. Tras un lavado con PBS/0,1% Tween 20, el pocillo fue incubado durante 10 minutos con 50 µl de 0,05 M de glicina con pH 2 para liberar el fago de la superficie. La suspensión del fago fue aspirada del pocillo, neutralizada con 50 µl de 0.2 M de fosfato de sodio, pH 7.4, y amplificada durante 6-8 horas en un caldo bacteriano DH5aFTQ.

El fago amplificado recuperado del caldo bacteriano después de este primer paso de enriquecimiento se sometió a dos rondas más de cribado en pocillos recubiertos con s-FRP-1, tal y como se describe en el párrafo anterior, salvo por que el fago fue incubado solamente durante dos horas y una hora en el segundo y el tercer paso de cribado, respectivamente. Después de la tercera ronda de cribado, el fago obtenido del pocillo recubierto con sFRP-1 fue titulado y sembrado en un lecho de bacterias para permitir el aislamiento del fago de 200 colonias separadas. Las bacterias de cada una de estas colonias se cultivaron en un caldo, se peletizaron mediante centrifugación y se recuperó el fago del supernatante. Cada uno de estos supernatantes de fagos fue testado para comprobar la unión a los pocillos ELISA recubiertos de sFRP-1 frente a los pocillos recubiertos solamente con la solución de bloqueo BSA. Los fagos fueron detectados en este ensayo con el anticuerpo primario dirigido contra la proteína recubierta de fago (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden, #27-9411-01) y reactivos de detección estándar. Se seleccionaron unos 100 aislados de fagos para el análisis de la secuencia, basándose en si presentaban una unión al menos cinco veces mayor a sFRP-1 con respecto a los pocillos recubiertos de BSA.

#### 4. Análisis de la secuencia de los segmentos peptídicos presentes en la superficie del fago aislado

La secuencia del elemento insertado de DNA que codifica el segmento peptídico unido a la proteína de revestimiento III del gen M13 de cada aislado de fagos se determinó utilizando cebadores de secuenciación correspondientes a la secuencia del vector adyacente. Se realizó un análisis de búsqueda BLAST avanzada de las bases de datos de GenBank para identificar proteínas que contenían las porciones de las secuencias correspondientes a las secuencias peptídicas identificadas mediante selección en la biblioteca de péptidos expresados en fagos.

#### 5. Generación de moléculas quiméricas de fosfatasa alcalina/péptido

Los oligonucleótidos sintéticos que codifican los péptidos de interés se unieron al vector de fusión de fosfatasa alcalina bacteriana, pMY 101, que había sido digerido con Sal I y Xho I (Yamabhai and Kay, Anal Biochem. 247:143-151, 1997). Todos los recombinantes fueron confirmados mediante análisis de secuencia de DNA. Las bacterias (*E. coli*, cepa DH5aF<sup>+</sup>) transformadas con las estructuras péptido/AP fueron cultivadas en caldo que contenía ampicilina (50 µg/mL) hasta una densidad óptica de 0,5 (at 600 nm), tratadas con 1 mM isopropil-β-D-tiogalactopiranosida y posteriormente incubadas hasta el día siguiente a 37°C. El medio condicionado que contenía la quimera péptido/AP fue recuperado mediante centrifugación a 7000 g durante 15 minutos. Las proteínas quiméricas en el medio condicionado eran estables cuando se almacenaban durante algunas semanas a 4°C o durante varios meses a -80°C.

#### 6. Análisis ELISA de la unión de péptido y proteína a sFRP

Por lo general, los experimentos ELISA se realizaron como se ha descrito anteriormente (Uren et al., J. Biol. Chem. 275:4374-4382, 2000), con modificaciones dependiendo del elemento de unión a sFRP a testar. Típicamente, los pocillos fueron recubiertos con 0,5 o 1 µg de sFRP-1, bloqueados con BSA (0,2%, 1%, o 4%) y posteriormente incubados con el elemento de unión putativo hasta el día siguiente a temperatura ambiente. Para investigar la unión de quimeras péptido/AP, tras la aspiración de los caldos bacterianos, los pocillos fueron lavados e incubados con p-nitrofenolfosfato (pNPP). El desarrollo del color se determinó a 405 nm con un lector ELISA. Para los experimentos competitivos, los péptidos solubles fueron preincubados con quimeras péptido/AP en caldo bacteriano durante 30 minutos a temperatura ambiente, antes de su transferencia a los pocillos ELISA recubiertos con sFRP-1 o BSA. Para testar la unión de RANKL a sFRP-1, las diluciones en serie de RANKL soluble fueron sometidas a ensayo por duplicado. Tras haber sido incubadas hasta el día siguiente a temperatura ambiente, las soluciones de RANKL fueron aspiradas y el RANKL unido fue detectado mediante incubaciones secuenciales con el anticuerpo primario para RANKL, el anticuerpo secundario unido a AP y pNPP. Se emplearon diseños experimentales similares para examinar la unión a sFRP de otros miembros de la familia del TNF y cuando los derivados de sFRP -1 o sFRP-2 eran los objetivos de unión para RANKL.

#### 7. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

Los experimentos de ITC se realizaron con un VP-ITC MicroCalorimeter (MicroCal, LLC, Northampton, MA) conforme al Manual del usuario del fabricante. En resumen, se inyectaron partes alícuotas de 6 µl de A-C2 (200 µM, disuelto en PBS) a intervalos regulares en una cámara que contenía sFRP-1 (10 µM, también en PBS). Los incrementos de la temperatura de la cámara resultantes de la unión de A-C2 y sFRP-1 fueron determinados como una medida del calor producido por la reacción de la unión. Diversos parámetros, incluyendo la entalpía y la constante de disociación, se calcularon a partir de estas mediciones. Esta técnica se utiliza habitualmente para cuantificar las propiedades termodinámicas de las interacciones de unión entre proteínas y péptidos. Por ejemplo, véase el artículo de McNemar et al., Biochemistry 36:10006-10014, 1997.

#### 8. PCR diferencial

Se extrajo la totalidad del RNA celular de las líneas celulares o tejidos murinos empleando tiocianato de guanidina-fenol cloroformo y se empleó para la PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR), básicamente como se describe (Southby et al. Endocrinology 137:1349-1357, 1996 y Traianedes et al, J. Biol. Chem. 270:20891-20894, 1995). La

ddPCR se realizó básicamente como se describe (Liang et al, Science 257:967-971,1992 y Traianedes et al, J. Biol. Chem. 270:20891-20894, 1995), salvo 1 ug de RNA total que se sometió a transcripción inversa. Los productos de la PCR fueron clonados en pCRScriptII (Stratagene, LaJolla, CA) o pGEM-T (Promega, Madison, WI). El análisis de la secuencia de DNA se realizó utilizando un kit de secuenciación T7 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Los oligonucleótidos se sintetizaron en un Oligo 1000M DNA Synthesizer (Beckman Instruments Inc., Fullerton CA, EE.UU.). Los oligonucleótidos fueron: para ddPCR, DDMR-2 (5'-CTTGATTGCC-3'; SEC. ID. N°: 37) y T12VA (5'-TTTTTTTTTTTT[A,C,G]A; SEC. ID. N°: 32-3').

Para ddPCR, el 3' oligonucleótido es T12VC, donde V = A, C, o G. Este oligonucleótido se anillaría a las transcripciones de mRNA que tuviesen G y B (B = C, G, o T) como los nucleótidos último y penúltimo antes de la cola poli-A. Los fragmentos parciales de cDNA se amplificaron utilizando 5-10mers, provocando la síntesis de DNA de varias longitudes, debido al anillado aleatorio a diferentes especies de mRNA de transcripción. Esta reacción PCR se realiza a una temperatura de anillado de 40°C y en presencia de [ $\alpha^{35}\text{S}$ ]-dATP para permitir la visualización de los productos resultantes. Los productos de la PCR fueron disueltos en genes de secuenciación de poli(acrilamida al 6% y expuestos a una película de rayos X durante 1-3 días. Los fragmentos de cDNA regulados diferencialmente fueron separados del gel, superponiendo la película y recortando la región de interés. Utilizando los mismos oligonucleótidos, el fragmento de cDNA fue reamplificado mediante dos rondas de PCR (un total de 80 ciclos de PCR). El producto reamplificado fue después clonado molecularmente en pGEM-T (Promega Inc., Madison, Wisconsin), y se determinó la secuencia de ácido nucleico del elemento insertado amplificado.

## 9. Análisis de expresión de sFRP-1 mediante RT-PCR

El RNA total aislado de las líneas celulares o tejidos se sometió a transcripción inversa con oligo-dT y la PCR se realizó con los cebadores sfrp-1a (5'-TTAAAATTGCTGCCTGCCTGAG-3'; SEC. ID. N°: 38) y sfrp-1b (5'-TCCGAACTACAGGGACAACAGG-3'; SEC. ID. N°: 39) durante 22 ciclos, que se descubrió que se encontraban en la fase log-lineal de la amplificación para las transcripciones de sFRP-1 a partir de fuentes osteoblásticas. Las amplificaciones se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de la PCR resultantes fueron sometidos a electroforesis, transferidos a una membrana de nylon, e hibridados con un oligonucleótido de detección interna etiquetado con  $\alpha$ -32P, sfrp-1c (5'-GCCAGAGGTATTTCTCAAAGTTG-3'; SEC. ID. N°: 39). gapdh-2 (5'-ATGAGGTCCACCACCTGTT-3'; SEC. ID. N°: 33, nucleótidos 640-659; Tso et al, Nucl. Acids Res. 13:2485-2502, 1985) y gapdh-4 se utilizaron para amplificar el gen de normalización, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, mediante 20 ciclos de PCR y los productos se detectaron con gapdh-1 etiquetado con  $\alpha$ -32P, tal como se describe (Suda et al, J. Cell Physiol. 166:94-104,1996).

## 10. Análisis de la hibridación in situ de sFRP-1 de las muestras de tejido

Se generó una ribsonda de sFRP-1 murina mediante PCR utilizando RNA obtenido de células tsJ2. El fragmento resultante de 750 bp fue clonado en pGEM-T (Promega, Madison, WI, EE. UU.). El plásmido fue linearizado y transcrito con polimerasa de RNA SP6 o T7 para generar ribosondas de sentido o antisentido. Las ribosondas fueron etiquetadas con digoxigenina (DIG) durante la transcripción de RNA utilizando un kit de marcado de RNA (Boehringer Mannheim, Mannheim GmbH, Germany) conforme a las instrucciones del fabricante. La hibridación *in situ* se realizó como se ha descrito anteriormente (Kartsogiannis et al., Bone 21:385-392, 1997).

## 11. Bioensayos de osteoclastogénesis

### A. Sistemas de cocultivo

Las células osteoblásticas se prepararon a partir de la calvaria de ratones recién nacidos mediante digestión con colagenasa al 1% (Worthington Biochemical Co., Freefold, Australia) y dispasa al 0,2% (Godo Shusei, Tokyo, Japón). Las células de médula ósea y esplénicas se obtuvieron de ratones adultos y recién nacidos,

respectivamente (Udagawa et al., J. Exp. Med. 182: 1461-1468, 1995). Las células osteoblásticas fueron cocultivadas con células de la médula espinal o esplénicas como se ha descrito anteriormente (Udagawa et al, J. Exp. Med. 182: 1461-1468, 1995,). En resumen, las células osteoblásticas primarias ( $2 \times 10^4$ /pocillo) y las células esplénicas nucleadas ( $1 \times 10^6$ /pocillo) o células de la médula ( $5 \times 10^5$ /pocillo) fueron cocultivadas en placas de 48 pocillos (Corning Glass Inc., Corning, NY) con 0,4 mL de  $\alpha$ -MEM (GIBCO/BRL, Grand Island, NY) que contenían suero bovino fetal al 10% (Cytosystems, Castle Hill, NSW, Australia) en presencia de productos químicos de ensayo. Los cultivos fueron incubados por cuadruplicado y las células se rellenaron el día 3 con un medio limpio. La formación de osteoclastos se evaluó tras el cultivo durante 6 ó 7 días. Las células adherentes fueron fijadas y teñidas para comprobar la presencia de fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), y el número de osteoclastos TRAP-positivos se puntuó como se describe (Udagawa et al, J. Exp. Med. 182: 1461-1468, 1995). Para el teñido de TRAP, las células adherentes fueron fijadas con formaldehído al 4% en PBS durante tres minutos. Tras el tratamiento con etanol-acetona (50/50, vol/vol) durante 1 minuto, la superficie del pocillo se secó con aire y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en una solución tampón de acetato (0,1 M acetato de sodio, pH 5.0) que contenía naftol AS-MX fosfato al 0,01% (Sigma) como sustrato y sal LB violeta rojizo al 0,03% (Sigma) como tinte para el producto de reacción en presencia de 50 mM de tartrato de sodio. Las células TRAP-positivas aparecían de color

rojo oscuro y las que tenían tres o más núcleos fueron puntuadas como multinucleadas y consideradas osteoclastos. La validación de la formación de osteoclastos se consiguió utilizando el marcador específico de la expresión del receptor de calcitonina (CTR) y la reabsorción ósea. La expresión de CTR se determinó mediante autorradiografía con <sup>125</sup>I-calcitonina de salmón o mediante localización inmunohistoquímica utilizando un conjunto de anticuerpos que hemos desarrollado como se describe en Quinn et al, Bone 25:1-8, 1999.

## B. Formación de osteoclastos inducida por RANKL a partir de células hematopoyéticas

En algunos casos, se realizaron experimentos con células esplénicas de ratón adulto o con células RAW264.7 tratadas con M-CSF y RANKL como se describe en Quinn et al, Endocrinology 139:4424-4427, 1998. Cuando estuvo indicado, estos ensayos se realizaron en presencia o ausencia de células T esplénicas. Se prepararon fracciones de células T como las descritas en Horwood et al, Journal of Clinical Investigation 101:595-603, 1998.

### Ejemplo 2

#### Identificación de péptidos que se unen a sFRP-1

Para identificar las secuencias de péptidos que se unen a sFRP-1, se estudiaron  $25 \times 10^9$  fagos de una biblioteca que contenía un diverso repertorio de segmentos de 12 residuos de aminoácidos unidos a la proteína de revestimiento del gen III del fago M13. Después de tres rondas sucesivas de crivado de los fagos que se unen a los pocillos ELISA preincubados con sFRP-1, la preparación de fagos seleccionada por su capacidad para unirse a sFRP-1 fue titulada y después colocada en un lecho de bacterias. Se recogieron los fagos de 200 colonias separadas de bacterias lisadas, se cultivaron en caldo bacteriano hasta el día siguiente, se recuperaron en supernatante y se comprobó su capacidad para unirse preferencialmente a sFRP-1 frente a BSA en un ELISA. Los fagos que se unieron con una avidez al menos cinco veces mayor a sFRP-1 que a los pocillos recubiertos de BSA fueron sometidos al análisis de la secuencia de los nucleótidos para determinar la identidad de la secuencia peptídica responsable de la especificidad de esta unión.

De los aproximadamente 100 aislados de fagos que fueron secuenciados, se dedujeron 11 secuencias peptídicas únicas. Cabe señalar que tres de estas 11 secuencias contenían un motivo conservado compuesto por los siete residuos de aminoácidos siguientes: I/V-V-D-G-R-W-I/V (SEC. ID. Nº: 9). La importancia de este motivo heptapeptídico se puso de manifiesto por el hecho de que dos tercios de los fagos que registraban una elevada especificidad para sFRP-1 en el ELISA presentaban en su superficie una de las tres secuencias con este motivo (Tabla 1)

Tabla 1

SEC. ID. Nº:	Código de referencia	Secuencia de aminoácido	Frecuencia	Especificidad (sFRP-1/BS)
14	AC2	OGTLVDGRWLOL SEC. ID. Nº: 14	54	10:1
11	A-E4	WDGRWVOGLED SEC. ID. Nº: 11	9	10:1
27	B-B9	LVDGRWLYNPHH SEC. ID. Nº: 27	4	5:1

Debido al predominio de este patrón, se examinaron también las propiedades de unión de estos tres péptidos, A-C2 (SEC. ID. Nº: 14), A-E4 (SEC. ID. Nº: 11), y B-B9 (SEC. ID. Nº: 27), y la importancia general del motivo peptídico. Posteriormente, se realizó un análisis similar con la segunda secuencia observada más frecuentemente identificada mediante el análisis de expresión de péptidos en fagos, que se denominó A D9: WECAMYDGRCLT (SEC. ID. Nº: 40).

### Ejemplo 3

#### Confirmación de la actividad de unión del motivo peptídico de sFRP-1

Se generó un conjunto de proteínas de fusión de fosfatasa alcalina-péptido que contenían los motivos peptídicos (SEC. ID. Nº: 14, 11, y 27). Estas proteínas de fusión se testaron para comprobar la unión específica a sFRP 1 (SEC. ID. Nº: 3) en un formato ELISA. Tal y como se ilustra en la FIG. 1, los caldos de múltiples aislados de la proteína de fusión fosfatasa alcalina/A-C2 (SEC. ID. Nº: 14) mostraron todos una fuerte unión específica a los pocillos preincubados con sFRP-1. Unos resultados similares se obtuvieron con la proteína de fusión fosfatasa alcalina/A-E4 (SEC. ID. Nº: 11). No obstante, la proteína de fusión fosfatasa alcalina/B-B9 (SEC. ID. Nº: 27) no demostró una unión específica a sFRP-1. Esta diferencia cualitativa entre los derivados de A-C2 (SEC. ID. Nº: 14), A-E4 (SEC. ID. Nº: 11), y B-B9 (SEC. ID. Nº: 27) fue coherente con la diferencia cuantitativa observada durante el estudio ELISA de los respectivos fagos. Los fagos de expresión de A-C2- (SEC. ID. Nº: 14) y A E4- (SEC. ID. Nº: 11)

eran más abundantes en la preparación de fagos seleccionada para la unión a sFRP-1 (Tabla 1) y mostraron un mayor ratio de unión sFRP-1:BSA que el fago de B-B9 (SEC. ID Nº: 2 7). El contraste más drástico observado con las proteínas de fusión es atribuible a la diferencia en la valencia de las entidades de unión: cada partícula de los fagos tiene cinco copias del péptido desplegadas en su superficie, mientras que las proteínas de fusión fosfatasa alcalina-péptido existen como dímeros en solución. Por tanto, la avidez de unión relativamente más débil de la secuencia B-B9 originalmente percibida con la partícula de los fagos pentavalentes resultó todavía más evidente al testar reactivos diméricos. Estos resultados indican que la unión asociada con el motivo peptídico podría verse afectada por la composición de residuos de aminoácidos cercanos.

Experimentos posteriores demostraron que el motivo peptídico (SEC. ID. Nº: 9) fue un factor en la unión de la proteína de fusión fosfatasa alcalina/A-C2 (SEC. ID. Nº: 14) a sFRP 1. Por ejemplo, la inhibición dependiente de la dosis de unión de la proteína de fusión fosfatasa alcalina/A-C2 (SEC. ID. Nº: 14) a sFRP-1 se observó con A-C2 (SEC. ID. Nº: 14), pero no con un péptido sintético de control (FIG. 2). La fosfatasa alcalina en sí no mostró ninguna unión preferencial a los pocillos recubiertos de sFRP-1. Las sustituciones individuales de un residuo de alanina en cada uno de los doce sitios de la secuencia A-C2 (SEC. ID. Nº: 14) de la proteína de fusión fosfatasa alcalina/A-C2 (SEC. ID. Nº: 14) establecieron que los cinco residuos centrales (V-D-G-R -W) del motivo peptídico nativo mejoraron la unión a sFRP-1, al igual que los residuos que flanquearon de inmediato esta secuencia central (FIG 3). Las sustituciones de alanina en otros sitios también tuvieron un impacto sobre la unión y en algunos casos incrementaron la avidez de unión a sFRP-1 (SEC. ID. Nº: 3)

Juntos, los análisis de expresión peptídica en fagos seguidos de los experimentos ELISA con proteínas de fusión fosfatasa alcalina/péptido establecieron la existencia de un motivo peptídico (SEC. ID. Nº: 9) que se une a sFRP-1. Por otra parte, la unión de las proteínas que contienen este motivo peptídico, L/V-V-D- G-RW-L/V (SEC. ID. Nº: 9), se podría intensificar o reducir introduciendo cambios en la composición de los residuos cercanos al motivo peptídico (SEC. ID. Nº: 9).

Se empleó la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) para demostrar la unión del péptido AC2 y sFRP-1 en solución y calcular la afinidad de la interacción. La unión resultó evidente, dado que se generó calor cuando se añadieron partes alícuotas de una solución de AC2 a una cámara que contenía sFRP-1 disuelta en PBS. Por el contrario, no se produjo calor cuando se añadió AC2 a una cámara que contenía solamente PBS. El Kd calculado fue 3,9 +/- 0,46 micromolar (Fig. 4A y 4B).

Los experimentos ELISA se realizaron básicamente tal y como se ha descrito anteriormente con una serie de mutantes de delección de sFRP-1 (in Uren et al, J. Biol Chem, 2:43 74-4382,2000 82,2000) para determinar qué región o regiones de la proteína eran necesarias para la unión a la quimera AC2/fosfatasa alcalina. La unión óptima se observó con el derivado Δ3, que contiene todos los Fz CRD y una porción de la región C-terminal. Se detectó una escasa unión con derivados que contenían el CRD solamente o la región C-terminal solamente.

Así pues, fue necesaria una combinación de elementos del CRD y el dominio C-terminal para la unión de AC2. Dado que los derivados que no se unieron bien a la quimera AC2 se unieron a otros reactivos y, en algunos casos, demostraron actividad biológica, es poco probable que simplemente estuviesen mal plegados.

Otro péptido, A-D9, se analizó de manera similar a la rutina seguida para A-C2. En particular, los experimentos ELISA realizados con una quimera A D9/AP demostraron que esta quimera se unía específicamente a los pocillos recubiertos con sFRP-1 y no con BSA. Esta unión se bloqueó de manera dependiente de la dosis con un péptido sintético soluble que contenía la secuencia A-D9. La unión de la quimera A-D9/AP a sFRP-1 en los pocillos ELISA se interrumpió mediante sustituciones de alanina en la secuencia de A-D9. Cabe señalar que el péptido A-C2 también pudo inhibir la unión de la quimera A-D9/AP a sFRP-1 y que el péptido A-D9 inhibió la unión de la quimera A-C2/AP a sFRP-1. Esto significa que A-C2 y A-D9 reconocieron sitios de unión solapados en sFRP-1, lo que es coherente con la presencia de un elemento común (DGR) en los dos péptidos.

#### Ejemplo 4

##### Identificación de proteínas con secuencias semejantes al motivo péptido

El análisis BLAST de las secuencias de GenBank indicó que el motivo peptídico recién descubierto (SEC. ID Nº: 9) no estaba presente en ninguna proteína Wnt. No obstante, se observaron secuencias similares en algunas otras proteínas, tal y como se ilustra en la Tabla 2.

Tabla 2

SEC. ID. Nº:	Proteína identificada de homología con el motivo peptídico	Secuencia de aminoácido
29	Receptor de netrina (UNC5H3)	TLCPVDGRW
28	RANKL	MVDGSWLDL
10	Receptor A de AMP (humano)	WDGRFVLKTTD

Cabe señalar el segmento V D G-R-W en UNC5H3 porque esta proteína es un receptor de netrina. Por tanto, es posible que la sFRP-1 (SEC. ID. N°: 3) interactúe con UNC5H3 en una relación ligando/receptor. También cabe señalar la presencia de la secuencia M -V-D-G-S-W-L (SEC. ID. N°: 28) en RANKL/IRANCE/OPGI porque evidencia también que sFRP-1 (SEC. ID. N° 3) y RANKL están coexpresados en muchos tejidos, incluyendo huesos donde el RANKL tiene un papel crítico en la formación de osteoclastos (véase debajo). La secuencia V-V-D G-R-F-V (SEC. ID. N°: 10) del receptor A del péptido natriurético atrial (ANP) humano también es importante debido a la coexpresión de este producto genético y de la sFRP-1 en tejidos del riñón y del ojo. Como se describe en el presente, la sFRP-1 (SEC. ID. N°: 3) y el RANKL interactúan entre sí de forma que tienen consecuencias biológicas importantes y su interacción se puede modular de forma que influya en la osteoclastogénesis.

### Ejemplo 5

#### sFRP-1 y expresión en huesos

Se realizaron análisis de hibridación in situ de transcripciones de sFRP-1 (SEC. ID. N°: 1) en estructuras esqueléticas de embriones de ratón (Día 19), ratón recién nacido (Día 1) y ratón adulto (cinco semanas) para examinar el papel de la sFRP-1 en el desarrollo de los huesos. Los condrocitos hipertróficos fueron claramente positivos en los embriones murinos (E19). En la médula espinal del ratón del Día 1, se observó una fuerte expresión en el centro de osificación dentro del primordio del cartílago del cuerpo vertebral lumbar y el núcleo pulposo de la parte central del disco intervertebral lumbar. En el adulto, las células que recubren los huesos fueron positivas, así como algunas células aisladas de la médula, y los osteocitos fueron ligeramente positivos. También se observó mRNA de la sFRP-1 en la epidermis. El RANKL se expresa en un patrón similar (Kartsogiannis et al, Bone 25:525-534, 1999). También se detectó la expresión de sFRP-1 en sitios esqueléticos. Por tanto, es probable que la sFRP-1 participe en la morfogénesis esquelética y la expresión de sFRP-1 se mantiene en diversos sitios durante toda la edad adulta.

Se estudió la expresión de la sFRP-1 en los osteoblastos (células tsJJ2) (para obtener una descripción de la línea celular tsJJ2 y la línea celular tsJ14, véase Chambers et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA 90:5578-5582, 1993). Los resultados demostraron que la sFRP-1 se expresa preferencialmente en los osteoblastos (células tsJ2) que promueven la formación de osteoclastos. Las transcripciones de sFRP-1 murina se amplificaron utilizando los oligonucleótidos sfrp-la y sfrp-lb. Los productos amplificados fueron verificados mediante análisis Southern blot utilizando el oligonucleótido sfrp-lb de extremo marcado con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP como sonda. La PCR diferencial (ddPCR) también demostró que la sFRP-1 es regulada al alza en líneas de osteoblastos que estimulan la osteoclastogénesis, pero no en los productos de otras dos líneas que no soportan la diferenciación de osteoclastos. Los análisis RT-PCR semicuantitativos de la expresión de sFRP-1 confirmaron que el nivel de transcripción era muy superior en las líneas que eran capaces de promover la formación de osteoclastos en cocultivos con células progenitoras hematopoyéticas. Este patrón se observó al comparar líneas de osteoblastos adicionales, reforzando la conclusión de que la expresión de sFRP-1 estaba asociada con la osteoclastogénesis.

No obstante, en general, los factores osteotrópicos como  $1\alpha,25(\text{OH})_2$  vitamina D<sub>3</sub> causaron una estimulación limitada de la expresión de sFRP-1 por parte de las líneas osteoblásticas. El RNA total fue aislado a partir de células sin tratar o células tratadas con  $1\alpha,25(\text{OH})_2$  vitamina D<sub>3</sub> durante 24 horas, se sometió a transcripción inversa con oligo (dT), y posteriormente a PCR para comprobar la presencia de GAPDH y SFRP1 murina. Un cocultivo de osteoblastos y médula ósea tratado durante 24 horas con  $1\alpha,25(\text{OH})_2$  vitamina D<sub>3</sub> fue incluido como control positivo. La combinación del cebador de sfrp-la (5'- AGC CTT GGC AGT CAA CGA CG-3' SEC. ID. N°: 30) y sfrp-lb (5'- GTT GTG GCT TTT GCA TTG CAC-3' SEC. ID. N°: 31) se empleó para la amplificación de la sFRP-1 y la combinación del cebador de gapdh-2 (5'-ATG AGG TCC ACC ACC CTG TT-3' SEC. ID. N°: 33) y gapdh-4 (5'-CAT GGA GAA GGC TGG GGC TC-3' SEC. ID. N°: 34) se utilizó para la amplificación de GAPDH. Los productos de la PCR resultantes fueron sometidos a electroforesis, transferidos a una membrana de nylon, e hibridados con un oligonucleótido de detección interna etiquetado con  $\alpha$ -<sup>32</sup>P, sfrp-lc (5'-TGT TGA AAA CTA GTA GCT G-3'; SEC. ID. N°: 35) y gapdh-1 (5'-GCT GTG GGC A AG GTC ATC CC-3' SEQ ID NO: 36), respectivamente, tal y como se describe (Southby et al., Endocrinology 137:1349-1357,1996). El análisis RT-PCR se repitió por triplicado. El análisis RT-PCR semicuantitativo se realizó tres veces con cada reacción de RT y se examinaron dos reacciones de RT independientes.

Estos resultados indican que la sFRP-1 puede ser una mediadora de la formación de osteoclastos hormonalmente dependientes. Por otra parte, la expresión de sFRP-1 aumentó notablemente cuando se cocultivaron progenitores de osteoblastos y osteoclastos. El marco temporal de este aumento coincidió con el aumento de la aparición de células TRAP+, un marcador de la diferenciación de osteoclastos. Estos resultados indican que la regulación al alza de la expresión de sFRP-1 es dependiente de la comunicación célula-célula entre las líneas de osteoblastos y osteoclastos. En particular, la correlación entre la expresión de sFRP-1 y la formación de osteoclastos sugirió que la inducción de sFRP-1 podría ser una consecuencia de la osteoclastogénesis.

**Ejemplo 6****sFRP-1 bloquea la osteoclastogénesis en bioensayos de cultivos celulares**

La posibilidad de que la sFRP-1 (SEC. ID. N°: 3) y el RANKL interactúen directamente entre sí se testó utilizando un ensayo ELISA. El ensayo ELISA implicó el uso de pocillos que fueron recubiertos con sFRP-1 recombinante (SEC. ID. N°: 3) y posteriormente con BSA. Después se incubó el RANKL en estos pocillos y en los pocillos adyacentes que solamente habían sido tratados con BSA. La posterior detección con antisuero de RANKL y reactivos secundarios reveló que el RANKL se unía específicamente a sFRP-1 (FIG. 5). Este resultado se confirmó en varios experimentos separados. El uso de reactivos recombinantes indica que la sFRP-1 (SEC. ID. N°: 3) y el RANKL se unen directamente entre sí.

El efecto de la sFRP-1 se evaluó con un método de formación de osteoclastos independiente de RANKL, empleando la línea celular de monocito/macrófago RAW264.7 (Quinn et al., Journal of Bone and Mineral Research. 16, 1787-1794, 2001) y se comparó con el de la osteoprotegerina (FIG. 14). En ausencia de TGF $\beta$ , solamente se produce una cantidad limitada de osteoclastos por parte de las células RAW264.7 tratadas con TNF $\alpha$  (Quinn et al., Journal of Bone and Mineral Research. 16, 1787-1794, 2001), por lo que se añadió TGF $\beta$  durante los tres primeros días de cultivo para incrementar el número de osteoclastos (FIG. 14). La sFRP-1 inhibió la formación de osteoclastos dependiente de TNF $\alpha$  cuando estaba presente durante los tres primeros días de cultivo, mientras que la OPG no tuvo ningún efecto que sugiriera que la sFRP-1 estaba actuando independientemente de RANKL, mediante la unión a TNF $\alpha$  o mediante la señalización de WNT.

El efecto del CRD expresado bacterianamente se evaluó en tres modelos de cultivo celular diferentes. Éstos fueron: (1) células de la médula ósea + RANKL + M-CSF, (2) línea celular macrófago/monocito RAW264.7 + RANKL, y (3) RAW264.7 + TNF $\alpha$  + TGF $\beta$  (Horwood et al., Journal of Immunology 166:4915-4921, 2001; Quinn et al., Journal of Bone and Mineral Research. 16, 1787-1794, 2001). En cada sistema, tanto dependiente de RANKL (cultivos 1 y 2) como independiente de RANKL (cultivo 3, formación de osteoclastos dependiente de TNF $\alpha$ ), el CRD expresado bacterianamente imitó la acción de la sFRP-1 en toda su longitud y con una potencia similar (FIG. 15).

Como se ha mostrado anteriormente, los experimentos ELISA con mutantes por delección de sFRP-1 indicaron que el derivado  $\Delta 1$  (Uren et al J Biol Chem, 275:4374-4382,2000), que se compone básicamente del F'z CRD, conservó una buena unión a RANKL (véase la FIG. 12). Por otra parte, la unión de RANKL a una preparación de CRD bacterianamente expresado fue notable.

Los análisis de Scatchard de los datos ELISA indican que hay dos sitios de unión diferentes: un sitio de alta afinidad y un sitio de baja afinidad con afinidades de 5-10 nM y 80-120 nM, respectivamente (véase la FIG 13) (véase Meshul et al, J. Neurochem 67:1965, 1996).

Los ensayos que miden el efecto de la sFRP-1 sobre la osteoclastogénesis demostraron que la sFRP-1 tiene una actividad inhibitoria dependiente de la dosis sobre la formación de osteoclastos (FIG. 6A). Estos resultados se observaron en cocultivos de osteoblastos primarios y células de la médula espinal tratadas con vitamina D3 ( $10^{-8}$  M) y PGE2 ( $10^{-7}$  M). La sFRP-1 redujo el número de células TRAP+ internucleadas en un 50% cuando se usaba a una concentración de 300 ng/mL, mientras que una dosis de 16  $\mu$ g/mL redujo el número de células en un 95% (FIG. 15 6A). Un patrón de respuesta a la dosis similar se observó al tratar células esplénicas de ratón adulto con RANKL y M-CSF (FIG 6B). Estos resultados indican que una interacción directa entre sFRP-1 y RANKL bloqueó la diferenciación de osteoclastos.

La importancia de los datos obtenidos con sFRP-1 recombinante se ve incrementada por los resultados de los experimentos realizados con anticuerpos policlonales de conejo purificados con proteína G para la sFRP-1 recombinante. La preparación del anticuerpo provocó un aumento de las células TRAF+ mononucleadas y multinucleadas entre 7 y 10 veces mayor, en cocultivos de osteoblastos primarios y células esplénicas murinas que habían sido tratados con dosis submáximas de D3 ( $10^{-10}$  M) y Dex ( $10^{-9}$  M) (FIG. 7A). Se observó un aumento de estas células entre dos y tres veces mayor en los cocultivos que recibían dosis óptimas de D<sub>3</sub> ( $10^{-8}$  M) y PGE2 ( $10^{-7}$  M) (FIG 1). Estos resultados indicaron que la sFRP-1 naturalmente presente se encontraba en los cultivos e inhibía la formación de osteoclastos. Al neutralizar esta actividad endógena, los anticuerpos de sFRP-1 impulsaron el número de células TRAP+ producidas en cocultivos.

El CRD expresado bacterianamente bloqueó la formación de osteoclastos en tres modelos de cultivo diferentes, imitando la acción de la sFRP-1 completa y con una potencia similar (FIG. 14)

Las tres condiciones utilizadas en estos ensayos fueron: (1) células de la médula espinal + RANKL + M- CSF, (2) RAW264 7 + RANKT, y (3) RAW264 7 + TNF $\alpha$  4 TGF $\beta$ . Sin dejarse guiar por la teoría, dado que se observó actividad en el grupo (3) (en ausencia de RANKL), es posible que el CRD se una al TNF, que está estructuralmente relacionado con el RANKL.

**Ejemplo 7****El péptido sintético A-C2 promueve la formación de osteoclastos**

Dado que el polipéptido A-C2 (SEC. ID. N°: 14) tiene una homología de secuencia con RANKL y dado que A-C2 (SEC. ID. N°: 14) se une a sFRP-1, se realizaron ensayos para determinar si A-C2 (SEC. ID. N°: 24) bloquearía la unión de sFRP-1 a RANKL y, por tanto, incrementaría la osteoclastogénesis. Concordando con esta hipótesis, el tratamiento con osteoblastos y los cocultivos de células de un bazo adulto con A-C2 (SEC. ID. N°: 14) provocaron un aumento diez veces mayor de las células multinucleadas TRAP+ (FIG 8). A C2 (SEC. ID. N°: 14) y solamente afectaba a la formación de osteoclastos cuando se encontraba presente durante los días 0 a 3 del experimento de cocultivo. La presencia de RANKL también es necesaria para la osteoclastogénesis durante los días 0 a 3 (Suda et al Endocrine Reviews 20:345-357, 1999). Por tanto, estos resultados son coherentes con el concepto de que AC2 (SEC. ID. N°: 14) muy probablemente tiene un impacto sobre la actividad de RANKL.

Adicionalmente, el efecto positivo de A C2 (SEC. ID. N°: 14) en los ensayos de cocultivo estuvo correlacionado con la presencia de células T. Cuando las células T se retiraban de los preparados con células de un bazo adulto con perlas magnéticas del anticuerpo integradas, la formación de osteoclastos aumentaba y no se producía ninguna respuesta adicional a A-C2 (SEC. ID. N°: 14; FIG. 10). De forma similar a lo que ocurre con la estimulación dependiente de dosis de AC2 (SEC. ID. N°: 14) de TRAP+, la diferenciación de células multinucleadas en cultivos de RAW2647 solamente se observó cuando se añadieron células T a los cultivos (FIG 11). Estos resultados indican que las células T expresan un factor inhibidor (muy probablemente sFRP-1) que es bloqueado por A-C2 (SEC. ID. N°: 14)

**Ejemplo 8****El análisis estructural demuestra que la unión de sFRP-1/RANKL se extiende más allá del motivo peptídico**

El análisis de la función de la estructura de la interacción sFRP-1/RANKL se realizó testando la capacidad de RANKL para unirse a un conjunto de mutantes por delección de sFRP 1 (Figura 12). La unión más sólida se observó con un derivado que contenía el CRD y posteriormente se observó una unión sólida con una variante similar que comprendía el CRD que estaba expresado en la bacteria. Cabe señalar que también observamos la unión de sFRP-1 a un derivado de RANKL que carecía de la secuencia correspondiente al motivo de A-C2 (esta variante del RANKL tenía una secuencia amino terminal que comenzaba por el residuo 158). Esto implicaba que la unión de RANKL y sFRP-1 no dependía completamente de la presencia de la secuencia de A-C2. Por otra parte, implicaba que otras proteínas estructuralmente relacionadas con RANKL pero que carecían de la secuencia A-C2-Kke también podrían unirse a sFRP-1. Hemos testado esta hipótesis y ahora disponemos de pruebas que confirman que TNFa también se puede unir a sFRP-1 en un formato ELISA, utilizando condiciones comparables a las descritas anteriormente para los estudios de unión a RANKL. Por otra parte, experimentos similares realizados con sFRP-2 indican que se puede unir a RANKL y a otro miembro de la familia del TNFa, el ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL). Así, ahora pensamos que ocurren interacciones adicionales entre miembros de las familias de las sFRP y los TNF, además de la que implica a sFRP-1 y RANKL.

**Ejemplo 9****Identificación de un motivo peptídico biológicamente relevante**

El motivo peptídico L/V-V-D-G-R W-L/V (SEC. ID. N°: 9), no ha sido previamente identificado por su capacidad de unirse a sFRP-1. Esta actividad de unión se ha caracterizado utilizando una serie de experimentos ELISA, empleando proteínas de fusión de péptido/fosfatasa alcalina, mutagénesis de rastreo de alanina y péptidos sintéticos. Estos experimentos también han demostrado que las sustituciones en los residuos cercanos podrían potenciar o reducir la unión de sFRP-1/el motivo peptídico, lo que implica que las sustituciones sistemáticas en los residuos adyacentes y los cambios conservadores dentro del motivo peptídico son capaces de reforzar la interacción con sFRP-1.

Las sustituciones conservadoras sustituyen un aminoácido por otro similar en tamaño, hidrofobicidad, etc. Por lo general, estas sustituciones son conservadoras cuando se desea modular de forma precisa las características de la proteína. Los ejemplos de aminoácidos que pueden ser sustituidos por un aminoácido original en una proteína y que se consideran sustituciones conservadoras incluyen: Ser por Ala; Lys por Arg; Gin o His por Asn; Glu por Asp; Ser por Cys; Asn por Gin; Asp por Glu; Pro por Gly; Asn o Gin por His; Leu o Val por Ile; Ile o Val por Leu; Arg o Gin por Lys; Leu o He por Met; Met, Leu o Tyr por Phe; Thr por Ser; Ser por Thr; Tyr por Trp; Trp o Phe por Tyr; y He o Leu por Val. El efecto de unión de los péptidos en los que se han hecho sustituciones se puede confirmar fácilmente mediante el ensayo de unión del motivo peptídico divulgado en el presente.

Se pueden obtener cambios más sustanciales en la función u otras características, seleccionando sustituciones menos conservadoras que las anteriormente descritas, es decir seleccionando residuos que difieren de forma más significativa en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura del segmento principal del polipéptido en la

- región de sustitución, por ejemplo, como una conformación plana o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Las sustituciones que, en general, se espera que produzcan mayores cambios en las propiedades de las proteínas serán aquellas en las que (a) un residuo hidrófilo, como seril o treonil, sea sustituido por un residuo hidrófobo, como leucil, isoleucil, fenilalanil, valil o alanil; (b) una cisteína o prolina sea sustituida por cualquier otro residuo; (c) un residuo que tenga una cadena lateral electropositiva, como lisil, arginil o histadil, sea sustituido por un residuo electronegativo, como glutamil o aspartil; o (d) un residuo que tenga una cadena lateral abultada, como fenilalanina, sea sustituido por uno que no tenga cadena lateral, como glicina. Los efectos de estas sustituciones o deleciones o adiciones de aminoácidos se pueden evaluar a través del uso del ensayo de unión ELISA proporcionado aquí.
- 5
- 10 Adicionalmente, un experto en la materia apreciará que las secuencias de ácido nucleico que codifican el motivo peptídico pueden ser diseñadas sintetizando sintéticamente la secuencia de ácido nucleico apropiada o utilizando la PCR para amplificar la secuencia apropiada. Una vez obtenida, la secuencia de ácido nucleico se puede colocar en un vector de expresión apropiado y transformarse en un organismo, de forma que el organismo produzca después el péptido.
- 15 La importancia del motivo peptídico (SEC. ID. N°: 9) se demostró en experimentos que revelaron un notable efecto estimulador de un péptido sintético que contenía el motivo peptídico en bioensayos de osteoclastogénesis. La capacidad del péptido A-C2 (SEC. ID. N°: 14) para promover la formación de osteoclastos era coherente con la idea de que el péptido incrementaba la actividad de RANKL bloqueando el efecto inhibitor de la sFRP-1 endógena (FIG. 17).
- 20 La necesidad de células T para que el péptido A-C2 (SEC. ID. N°: 14) estimule la formación de osteoclastos implicaba que las células T esplénicas expresan un inhibidor de la osteoclastogénesis sensible a A-C2 (SEC. ID. N°: 14). Se cree que ese inhibidor es sFRP-1, dado que la sFRP-1 se expresa en el bazo (Finch et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:6770-6775, 1997). Por tanto, se cree que los reactivos que poseen un motivo de unión a sFRP-1 son útiles para regular la señalización de RANKL implicada en la comunicación dendrítica de las células T que está modulada por la sFRP-1 endógena. Esta regulación se puede explotar para optimizar las terapias con vacunas en diferentes entornos en los que las interacciones de las células dendríticas/células T tienen un papel importante en la respuesta inmunitaria.
- 25
- Se ha demostrado que las células dendríticas promueven las respuestas a las vacunas, lo que se puede determinar midiendo los títulos para conocer los antígenos desarrollados en los animales inoculados (M. Di Nicola et al, Cytokines Cell Mol Ther. 4: 265-273, 1998; C. Reis e Sousa et al, Curr. Opin. Immunol. 11: 392-399, 1999; K. Tarte and B. Klein, Leukemia 13: 653-663, 1999). Se están realizando esfuerzos por optimizar la expansión de las células dendríticas inmunológicamente reactivas, a fin de mejorar la eficacia de la terapia con vacunas (R. Hajek y A.W. Butch, Med. Oncol. 17: 2-15, 2000). Utilizando los métodos mencionados en las anteriores referencias, los reactivos correspondientes al motivo de unión de sFRP-1 y a sFRP-1 pueden ser útiles para mejorar la respuesta inmunitaria en las terapias con vacunas.
- 30
- 35 La asociación de la sFRP-1 y las células T indica que la sFRP-1 puede ser útil para modular el clivaje proteolítico endógeno de RANKL. Una fracción importante del RANKL expresada por las células T es procesada proteolíticamente para liberar una forma soluble, biológicamente activa. Este proceso, que puede ser mediado por la enzima de conversión de TNF (TACE), implica el clivaje en uno o dos sitios de la secuencia RANKL justo por encima del motivo de unión del péptido putativo (SEC. ID. N°: 9). Por tanto, se cree que la sFRP-1 regula el procesamiento proteolítico de RANKL de una manera que se podría invertir mediante reactivos que contienen el motivo peptídico (SEC. ID. N°: 9).
- 40
- 45 La capacidad de la sFRP-1 para regular el procesamiento de RANKL se testa cultivando células T que expresan RANKL y tratando los cultivos con diversas concentraciones de sFRP-1. Las proteínas RANKL solubles resultantes son entonces identificadas utilizando la inmunotransferencia (Western blot) específica para RANKL. El grado de procesamiento de RANKL se correlaciona entonces con la concentración de sFRP de la muestra.
- 50 Además del impacto de los motivos peptídicos (SEC. ID. N°: 9) sobre la unión de sFRP-1/RANKL, los reactivos que rodean al motivo peptídico (SEC. ID. N°: 9) también son útiles para alterar la interacción de la sFRP-1 con otras proteínas. Como se ha mencionado anteriormente, otras proteínas conocidas como el receptor de netrina y UNC5H3 y el receptor A de ANP tienen secuencias similares al motivo de unión, y se pueden estudiar rutinariamente las secuencias genéticas recién identificadas en busca de estas secuencias. Es probable que las proteínas con este motivo sean potenciales elementos de unión adicionales para sFRP-1 y objetivos para los reactivos que contienen el motivo de unión de sFRP-1. Por ejemplo, la unión de sFRP-1 al receptor A de ANP podría regular la liberación de sodio y fluido en el riñón y el ojo. Otros han demostrado que los componentes relevantes del sistema del péptido natriurético se expresan funcionalmente en el ojo humano donde podrían actuar como moduladores de la presión intraocular (J. Ortego and M. Coca-Prados, Biochem. Biophys. Res. Commun. 258: 21-28, 1999). En el ojo, la sFRP-1 o su péptido de unión podría tener un impacto importante sobre la liberación de fluido dentro del ojo con cambios resultantes de la presión intraocular. Estos efectos se testan utilizando modelos de ojos perfundidos en cultivo
- 55

orgánico, como el originalmente descrito por D.H. Johnson y R.C. Tschumper, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 28: 945-953, 1987. La regulación de la presión intraocular tiene ventajas terapéuticas para el tratamiento del glaucoma.

### Ejemplo 10

#### sFRP-1 bloquea la formación de osteoclastos

- 5 Como se ha demostrado en el presente, la sFRP-1 tiene un efecto inhibitorio sobre la osteoclastogénesis, que se debe probablemente a su interacción con RANKL. La expresión elevada de transcripción de sFRP-1 específicamente en las líneas de osteoblastos capaces de estimular la formación de osteoclastos sugería inicialmente que la sFRP-1 favorece la osteoclastogénesis. No obstante, el incremento de la transcripción de sFRP-1 observado en cocultivos de osteoblastos y progenitores hematopoyéticos a medida que avanzaba la formación de osteoclastos implicó que la sFRP-1 era, sin embargo, parte de un mecanismo tónico para limitar el grado de formación de osteoclastos (FIG. 17). Se cree que es importante para la homeostasis garantizar que se mantenga un equilibrio apropiado de las poblaciones de osteoblastos y osteoclastos, junto con una reserva de progenitores de osteoclastos que estaría disponible cuando se necesitara en el futuro. Por otra parte, es posible que unas bajas concentraciones de sFRP-1 puedan tener un efecto permisivo sobre la formación de osteoclastos.
- 10
- 15 En vista de la capacidad de la sFRP-1 para inhibir la osteoclastogénesis, ésta puede tener utilidad clínica en condiciones en las que una actividad excesiva de los osteoclastos tiene consecuencias patológicas. La osteoporosis, la hipercalcemia y la osteopenia son ejemplos de estas condiciones; la artritis reumatoide es otra, que podría representar un objetivo particularmente adecuado para la terapia con sFRP-1, dado que se cree que el RANKL soluble de las células T tiene un importante papel en la pérdida de hueso asociada con esta enfermedad.

### 20 Ejemplo 11

#### Otras interacciones entre miembros de las familias sFRP y TNFa

- Los resultados anteriormente descritos (Ejemplo 8) indican que hay puntos de contacto adicionales dentro de RANKL, además del motivo de unión peptídica recientemente identificado, que participan en la interacción de sFRP-1 (SEC. ID. N°: 3) y RANKL. Estos resultados indican también que los miembros de la familia sFRP interactúan con los miembros de la familia del ligando del TNF.
- 25

- Los miembros de la familia del ligando del TNF son conocidos por encontrarse entre las citocinas más pleiotrópicas, induciendo un gran número de respuestas celulares, incluyendo la citotoxicidad, la actividad antiviral, las actividades inmunorreguladoras y la regulación transcripcional de varios genes. Las respuestas celulares a los ligandos de la familia del TNF incluyen no solamente respuestas fisiológicas normales, sino también enfermedades asociadas con un incremento de la apoptosis o la inhibición de la apoptosis. La muerte celular programada por la apoptosis es un mecanismo fisiológico implicado en la deleción de linfocitos T periféricos del sistema inmunitario y su desregulación puede provocar una serie de procesos patógenos diferentes. Las enfermedades asociadas con un aumento de la supervivencia de las células o la inhibición de la apoptosis incluyen los cánceres, los trastornos autoinmunes, las infecciones virales, las inflamaciones, la enfermedad de injerto contra huésped, el rechazo de injerto agudo y el rechazo de injerto crónico. Las enfermedades asociadas con un aumento de la apoptosis incluyen el SIDA, los trastornos neurodegenerativos, los síndromes mielodisplásicos, la lesión isquémica, la enfermedad hepática inducida por toxinas, el shock séptico, la cachexia y la anorexia.
- 30
- 35

- Por tanto, la divulgación proporciona también métodos para modular las interacciones entre el ligando del TNF/receptor del TNF. Estos métodos implican poner en contacto la sFRP, un fragmento o variante de sFRP, o el motivo peptídico (SEC. ID. N°: 9) con un miembro de la familia de proteínas del ligando del TNF y detectando un cambio en la actividad biológica del ligando del TNF.
- 40

- El hecho de si la sFRP, el fragmento o la variante de la sFRP, o el motivo péptido actúa como «agonista» o «antagonista» se puede determinar fácilmente utilizando uno de los bien conocidos ensayos de respuesta celular del ligando de la familia del TNF/receptor, como los descritos en las referencias citadas en las siguientes revisiones: D WaHach et al., Annu. Rev Immunol 17:331-367, 1999; S J Bakey y EP. Reddy, Oncogene 17: 3261 3270,1998
- 45

Por tanto, la divulgación proporciona métodos de estudio para determinar si un agonista o antagonista candidato es capaz de potenciar o inhibir la respuesta celular a un ligando de la familia del TNF.

### Ejemplo 12

#### Unión sFRP-1/péptido

- 50 Los experimentos ELISA se realizaron básicamente tal y como se ha descrito anteriormente con una serie de mutantes de deleción de sFRP-1 (in Uren et al, J. Biol Chem, 275:43 74-43 82,2000) para determinar qué región o regiones de la proteína eran necesarias para la unión a la quimera AC2/fosfatasa alcalina. La unión óptima se

observó con el derivado  $\Delta 3$ , que contiene todos los Fz CRD y una porción de la región C-terminal. Se detectó una escasa unión con derivados que contenían el CRD solamente o la región C-terminal solamente.

5 Por tanto, para la unión de AC2 se necesitaba una combinación de elementos del CRD y del dominio C-terminal. Dado que los derivados que no se unieron bien a la quimera AC2 se unieron a otros reactivos y, en algunos casos, demostraron actividad biológica, es poco probable que simplemente estuviesen mal plegados.

Habiendo ilustrado y descrito los principios de la divulgación en múltiples divulgaciones y ejemplos, debería resultar evidente para los expertos en la materia que la divulgación se puede modificar en cuanto a su disposición y sus detalles, sin desviarse de estos principios. Reivindicamos todas las modificaciones introducidas dentro del ámbito de aplicación de las reivindicaciones siguientes.

10

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Rubin, Jeffery et al.

<120> SFRP Y MOTIVO PÉPTIDO QUE INTERACTÚAN CON SFRP Y LOS MÉTODOS DE SU USO

<130> 4239-61994

5 <140>

<141>

<150> US 60/260,908

<151> 10-01-2001

<160> 40

10 <170> PatentIn vers. 2.1

<210> 1

<211> 2075

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

<400> 1

ES 2 385 666 T3

```

cctgcagcct ccgagtcag tgccgcgcgc ccgcccggcc ggccttctct gctcgcgcga 60
cctccgggag ccggggcgca cccagcccgc agcggccgct ccccgcccgc gcegcctccg 120
accgcaggcc gagggccgcc actggccggg gggaccgggc agcagcttgc ggccgcggag 180
ccgggcaacg ctggggactg cgccttttgt ccccgagggt ccctggaagt ttgcggcagg 240
acgcgcgcgg ggaggcggcg gaggcagccc cgacgtcgcg gagaacaggg cgagagccg 300
gcatgggcat cgggcgcagc gagggggggc gccgcggggc cctgggcgtg ctgctggcgc 360
tgggcgcggc gcttctggcc gtgggctcgg ccagcagta cgactacgtg agcttccagt 420
cggacatcgg ccgtaccag agcgggcgct tetacaccaa gccacctcag tgcgtggaca 480
tccccgcgga cctgcggctg tgccacaacg tgggctacaa gaagatgggt ctgcccaacc 540
tgctggagca cgagaccatg gcgagggtga agcagcaggc cagcagctgg gtgccctgc 600
tcaacaagaa ctgccacgcc gggaccagg tcttctctg ctgcctctc gcgcccgtct 660
gcctggaccg gccatctac ccgtgtcgt ggctctgcga ggccgtgcgc gactcgtgcg 720
agccggatc gacgttcttc ggcttctact ggcccagat gcttaagtgt gacaagttcc 780
cggaggggga cgtctgcac gccatgacgc cgcaccaatgc caccgaagcc tccaagcccc 840
aaggcacaac ggtgtgtcct ccctgtgaca acgagttgaa atctgaggcc atcattgaac 900
atctctgtgc cagcaggttt gactgagga tgaataaaa agaagtgaaa aaagaaaatg 960
gcgacaagaa gattgtcccc aagaagaaga agcccctgaa gttggggccc atcaagaaga 1020
aggacctgaa gaagcttggt ctgtacctga agaatggggc tgactgtccc tcccaccagc 1080
tgacaacct caccaccac ttcctcatca tgggcccga ggtgaagagc cagtcttgc 1140
tgacggccat ccacaagtg gacaagaaaa acaaggagt caaaaacttc atgaagaaaa 1200
tgaaaaacca tgagtgcgcc accttctagt ccgtgtttaa gtgattctcc cgggggcagg 1260
gtggggagg agcctcgggt ggggtgggag cgggggggac agtgcccggg aaccctggt 1320
cacacacacg cactgcctgt tcagtagtgg acattgtaat ccagtcggct tgttcttga 1380
gcattcccgc tccccttccc tccatagcca cgtccaaac cccagggtag ccatggccg 1440
gtaaagcaag ggccatttag attaggaagg tttttaagat ccgcaatgtg gagcagcagc 1500
cactgcacag gaggaggtga caaaccattt ccaacagcaa cacagccact aaaacacaaa 1560
aagggggatt gggcggaag tgagagccag cagcaaaaac tacattttgc aacttgttgg 1620
tgtggatcta ttggctgatc tatgccttcc aactagaaaa ttctaagat tggcaagtca 1680
cgttgttttc aggtccagag tagtttcttt ctgtctgctt taaatggaaa cagactcata 1740
ccacacttac aattaaggtc aagcccagaa agtgataagt gcagggagga aaagtgcaag 1800
tccattatct aatagtgaca gcaaaggac caggggagag gcattgcctt ctctgccac 1860
agtctttccg tgtgattgtc tttgaatctg aatcagccag tctcagatgc ccaaagttt 1920

cggttctat gagcccggg catgatctga tcccacagac atgtggagg gcagcctgtg 1980
cctgcctttg tgtcagaaaa aggaaaccac agtgagcctg agagagacgg cgattttcgg 2040
gctgagaagg cagtgtttt caaacacat agtta 2075

```

<210> 2

5 <211> 942

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

10 <400> 2

ES 2 385 666 T3

```
atgggcatcg ggcgcacgga ggggggcccgc cgcggggcag ccctgggcgt gctgctggcg 60
ctgggcggcg cttctggccg tgggctcggc agcgagtag actacgtgag cttccagtcg 120
gacatcggcc cgtaccagag cgggcgcttc tacaccaagc cacctcagtg cgtggacatc 180
cccgcggacc tgcggctgtg ccacaacgtg ggctacaaga agatggtgct gcccaacctg 240
ctggagcacg agaccatggc ggaggtgaag cagcaggcca gcagctgggt gccctgctc 300
aacaagaact gccacgcccg gacccaggtc ttctctgct cgctcttcgc gccctgctgc 360
ctggaccggc ccatctacc gtgtcgtggt ctctgcgagg ccgtgcgga ctctgctgag 420
ccggtcatgc agttcttcgg cttctactgg cccgagatgc ttaagtgtga caagttcccg 480
gagggggacg tctgcatcgc catgacgccc cccaatgcca ccgaagcctc caagcccaa 540
ggcacaacgg tgtgtcctcc ctgtgacaac gagttgaaat ctgaggccat cattgaacat 600
ctctgtgcca gcgagtttgc actgaggatg aaaataaaag aagtgaaaaa agaaaatggc 660
gacaagaaga ttgtcccaa gaagaagaag cccctgaagt tggggcccat caagaagaag 720
gacctgaaga agcttgtgct gtacctgaag aatggggctg actgtccctg ccaccagctg 780
gacaacctca gccaccactt cctcatcatg ggccgcaagg tgaagagcca gtacttgctg 840
acggccatcc acaagtggga caagaaaaac aaggagttca aaaacttcat gaagaaaatg 900
aaaaacctg agtgcccac ctttcagtcc gtgtttaagt ga 942
```

<210> 3

<211> 313

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

<400> 3

ES 2 385 666 T3

Met Gly Ile Gly Arg Thr Glu Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly  
 1 5 10 15

Val Leu Leu Ala Leu Gly Gly Ala Ser Gly Arg Gly Leu Gly Ser Glu  
 20 25 30

Tyr Asp Tyr Val Ser Phe Gln Ser Asp Ile Gly Pro Tyr Gln Ser Gly  
 35 40 45

Arg Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Cys Val Asp Ile Pro Ala Asp Leu  
 50 55 60

Arg Leu Cys His Asn Val Gly Tyr Lys Lys Met Val Leu Pro Asn Leu  
 65 70 75 80

Leu Glu His Glu Thr Met Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser Trp  
 85 90 95

Val Pro Leu Leu Asn Lys Asn Cys His Ala Gly Thr Gln Val Phe Leu  
 100 105 110

Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro Cys  
 115 120 125

Arg Trp Leu Cys Glu Ala Val Arg Asp Ser Cys Glu Pro Val Met Gln  
 130 135 140

Phe Phe Gly Phe Tyr Trp Pro Glu Met Leu Lys Cys Asp Lys Phe Pro  
 145 150 155 160

Glu Gly Asp Val Cys Ile Ala Met Thr Pro Pro Asn Ala Thr Glu Ala  
 165 170 175

Ser Lys Pro Gln Gly Thr Thr Val Cys Pro Pro Cys Asp Asn Glu Leu  
 180 185 190

Lys Ser Glu Ala Ile Ile Glu His Leu Cys Ala Ser Glu Phe Ala Leu  
 195 200 205

Arg Met Lys Ile Lys Glu Val Lys Lys Glu Asn Gly Asp Lys Lys Ile  
 210 215 220

Val Pro Lys Lys Lys Lys Pro Leu Lys Leu Gly Pro Ile Lys Lys Lys  
 225 230 235 240

Asp Leu Lys Lys Leu Val Leu Tyr Leu Lys Asn Gly Ala Asp Cys Pro  
 245 250 255

Cys His Gln Leu Asp Asn Leu Ser His His Phe Leu Ile Met Gly Arg  
 260 265 270

Lys Val Lys Ser Gln Tyr Leu Leu Thr Ala Ile His Lys Trp Asp Lys  
 275 280 285

Lys Asn Lys Glu Phe Lys Asn Phe Met Lys Lys Met Lys Asn His Glu  
 290 295 300

Cys Pro Thr Phe Gln Ser Val Phe Lys  
 305 310

<210> 4

<211> 338

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

<400> 4

```

Met Gly Ile Gly Arg Thr Glu Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly
  1           5           10           15
Val Leu Leu Ala Leu Gly Gly Ala Ser Gly Arg Gly Leu Gly Ser Glu
          20           25           30
Tyr Asp Tyr Val Ser Phe Gln Ser Asp Ile Gly Pro Tyr Gln Ser Gly
          35           40           45
Arg Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Cys Val Asp Ile Pro Ala Asp Leu
          50           55           60
Arg Leu Cys His Asn Val Gly Tyr Lys Lys Met Val Leu Pro Asn Leu
          65           70           75           80
Leu Glu His Glu Thr Met Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser Trp
          85           90           95
Val Pro Leu Leu Asn Lys Asn Cys His Ala Gly Thr Gln Val Phe Leu
          100           105           110
Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro Cys
          115           120           125
Arg Trp Leu Cys Glu Ala Val Arg Asp Ser Cys Glu Pro Val Met Gln
          130           135           140

```

ES 2 385 666 T3

Phe Phe Gly Phe Tyr Trp Pro Glu Met Leu Lys Cys Asp Lys Phe Pro  
 145 150 155 160  
 Glu Gly Asp Val Cys Ile Ala Met Thr Pro Pro Asn Ala Thr Glu Ala  
 165 170 175  
 Ser Lys Pro Gln Gly Thr Thr Val Cys Pro Pro Cys Asp Asn Glu Leu  
 180 185 190  
 Lys Ser Glu Ala Ile Ile Glu His Leu Cys Ala Ser Glu Phe Ala Leu  
 195 200 205  
 Arg Met Lys Ile Lys Glu Val Lys Lys Glu Asn Gly Asp Lys Lys Ile  
 210 215 220  
 Val Pro Lys Lys Lys Lys Pro Leu Lys Leu Gly Pro Ile Lys Lys Lys  
 225 230 235 240  
 Asp Leu Lys Lys Leu Val Leu Tyr Leu Lys Asn Gly Ala Asp Cys Pro  
 245 250 255  
 Cys His Gln Leu Asp Asn Leu Ser His His Phe Leu Ile Met Gly Arg  
 260 265 270  
 Lys Val Lys Ser Gln Tyr Leu Leu Thr Ala Ile His Lys Trp Asp Lys  
 275 280 285  
 Lys Asn Lys Glu Phe Lys Asn Phe Met Lys Lys Met Lys Asn His Glu  
 290 295 300  
 Cys Pro Thr Phe Gln Ser Val Phe Lys Gln Ala Tyr Val Glu Gln Lys  
 305 310 315 320  
 Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His  
 325 330 335  
 His His

<210> 5

<211> 195

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

<400> 5

ES 2 385 666 T3

Met Gly Ile Gly Arg Thr Glu Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Val Leu Leu Ala Leu Gly Gly Ala Ser Gly Arg Gly Leu Gly Ser Glu  
 20 25 30  
 Tyr Asp Tyr Val Ser Phe Gln Ser Asp Ile Gly Pro Tyr Gln Ser Gly  
 35 40 45  
 Arg Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Cys Val Asp Ile Pro Ala Asp Leu  
 50 55 60  
 Arg Leu Cys His Asn Val Gly Tyr Lys Lys Met Val Leu Pro Asn Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Glu His Glu Thr Met Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser Trp  
 85 90 95  
 Val Pro Leu Leu Asn Lys Asn Cys His Ala Gly Thr Gln Val Phe Leu  
 100 105 110  
 Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro Cys  
 115 120 125  
 Arg Trp Leu Cys Glu Ala Val Arg Asp Ser Cys Glu Pro Val Met Gln  
 130 135 140  
 Phe Phe Gly Phe Tyr Trp Pro Glu Met Leu Lys Cys Asp Lys Phe Pro  
 145 150 155 160  
 Glu Gly Asp Val Cys Ile Ala Met Thr Pro Gln Ala Tyr Val Glu Gln  
 165 170 175  
 Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His  
 180 185 190  
 His His His  
 195

<210> 6

<211> 246

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

<400> 6

Met Gly Ile Gly Arg Thr Glu Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly  
 1 5 10 15

10

ES 2 385 666 T3

Val Leu Leu Ala Leu Gly Gly Ala Ser Gly Arg Gly Leu Gly Ser Glu  
 20 25 30  
 Tyr Asp Tyr Val Ser Phe Gln Ser Asp Ile Gly Pro Tyr Gln Ser Gly  
 35 40 45  
 Arg Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Cys Val Asp Ile Pro Ala Asp Leu  
 50 55 60  
 Arg Leu Cys His Asn Val Gly Tyr Lys Lys Met Val Leu Pro Asn Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Glu His Glu Thr Met Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser Trp  
 85 90 95  
 Val Pro Leu Leu Asn Lys Asn Cys His Ala Gly Thr Gln Val Phe Leu  
 100 105 110  
 Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro Cys  
 115 120 125  
 Arg Trp Leu Cys Glu Ala Val Arg Asp Ser Cys Glu Pro Val Met Gln  
 130 135 140  
 Phe Phe Gly Phe Tyr Trp Pro Glu Met Leu Lys Cys Asp Lys Phe Pro  
 145 150 155 160  
 Glu Gly Asp Val Cys Ile Ala Met Thr Pro Pro Asn Ala Thr Glu Ala  
 165 170 175  
 Ser Lys Pro Gln Gly Thr Thr Val Cys Pro Pro Cys Asp Asn Glu Leu  
 180 185 190  
 Lys Ser Glu Ala Ile Ile Glu His Leu Cys Ala Ser Glu Phe Ala Leu  
 195 200 205  
 Arg Met Lys Ile Lys Glu Val Lys Lys Glu Asn Gly Asp Gln Ala Tyr  
 210 215 220  
 Val Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp  
 225 230 235 240  
 His His His His His His  
 245

<210> 7

5 <211> 267

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

10 <400> 7

ES 2 385 666 T3

Met Gly Ile Gly Arg Thr Glu Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Val Leu Leu Ala Leu Gly Gly Ala Ser Gly Arg Gly Leu Gly Ser Glu  
 20 25 30  
 Tyr Asp Tyr Val Ser Phe Gln Ser Asp Ile Gly Pro Tyr Gln Ser Gly  
 35 40 45  
 Arg Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Cys Val Asp Ile Pro Ala Asp Leu  
 50 55 60  
 Arg Leu Cys His Asn Val Gly Tyr Lys Lys Met Val Leu Pro Asn Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Glu His Glu Thr Met Ala Glu Val Lys Gln Gln Ala Ser Ser Trp  
 85 90 95  
 Val Pro Leu Leu Asn Lys Asn Cys His Ala Gly Thr Gln Val Phe Leu  
 100 105 110  
 Cys Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Arg Pro Ile Tyr Pro Cys  
 115 120 125  
 Arg Trp Leu Cys Glu Ala Val Arg Asp Ser Cys Glu Pro Val Met Gln  
 130 135 140  
 Phe Phe Gly Phe Tyr Trp Pro Glu Met Leu Lys Cys Asp Lys Phe Pro  
 145 150 155 160  
 Glu Gly Asp Val Cys Ile Ala Met Thr Pro Pro Asn Ala Thr Glu Ala  
 165 170 175  
 Ser Lys Pro Gln Gly Thr Thr Val Cys Pro Pro Cys Asp Asn Glu Leu  
 180 185 190  
 Lys Ser Glu Ala Ile Ile Glu His Leu Cys Ala Ser Glu Phe Ala Leu  
 195 200 205  
 Arg Met Lys Ile Lys Glu Val Lys Lys Glu Asn Gly Asp Lys Lys Ile  
 210 215 220  
 Val Pro Lys Lys Lys Lys Pro Leu Lys Leu Gly Pro Ile Lys Lys Lys  
 225 230 235 240  
 Asp Leu Gln Ala Tyr Val Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu  
 245 250 255  
 Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His  
 260 265

<210> 8

5 <211> 229

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 385 666 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

<400> 8

```

Met Gly Ile Gly Arg Thr Glu Gly Gly Arg Arg Gly Ala Ala Leu Gly
 1           5           10           15
Val Leu Leu Ala Leu Gly Gly Ala Ser Gly Arg Gly Leu Gly Ser Glu
           20           25           30
Tyr Asp Tyr Val Ser Phe Gln Ser Asp Ile Gly Pro Tyr Gln Ser Gly
           35           40           45
Arg Phe Tyr Thr Lys Pro Pro Gln Ile Ala Met Thr Pro Pro Asn Ala
           50           55           60
Thr Glu Ala Ser Lys Pro Gln Gly Thr Thr Val Cys Pro Pro Cys Asp
 65           70           75           80
Asn Glu Leu Lys Ser Glu Ala Ile Ile Glu His Leu Cys Ala Ser Glu
           85           90           95
Phe Ala Leu Arg Met Lys Ile Lys Glu Val Lys Lys Glu Asn Gly Asp
           100          105          110
Lys Lys Ile Val Pro Lys Lys Lys Lys Pro Leu Lys Leu Gly Pro Ile
           115          120          125
Lys Lys Lys Asp Leu Lys Lys Leu Val Leu Tyr Leu Lys Asn Gly Ala
           130          135          140
Asp Cys Pro Cys His Gln Leu Asp Asn Leu Ser His His Phe Leu Ile
           145          150          155          160
Met Gly Arg Lys Val Lys Ser Gln Tyr Leu Leu Thr Ala Ile His Lys
           165          170          175
Trp Asp Lys Lys Asn Lys Glu Phe Lys Asn Phe Met Lys Lys Met Lys
           180          185          190
Asn His Glu Cys Pro Thr Phe Gln Ser Val Phe Lys Gln Ala Tyr Val
           195          200          205
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His
           210          215          220
His His His His His
           225

```

5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Secuencia de Sonda del Cebador

<220>

<221> Misc\_feature

5 <222> (1)..(1)

<223> Xaa = Val o Leu

<220>

<221> Misc\_feature

10 <222> (7)..(7)

<223> Xaa = Val o Leu

<400> 9

Xaa Val Asp Gly Arg Trp Xaa  
1 5

15 <400> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 10

Val Val Asp Gly Arg Phe Val Leu Lys Ile Thr Asp  
1 5 10

<210> 11

<211> 12

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descrizione della Secuencia artificial : Öncül / Prob dizilimi

30

<400> 11

Val Val Asp Gly Arg Trp Val Gln Gly Leu Glu Asp  
1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

<400> 12

Asn Gln Gly Arg Asp Val Pro Glu Arg Trp Ser Lys  
 1 5 10

<210> 13

10 <211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

15

Cys Ile Ala Met Thr Pro Pro Asn Ala Thr Glu Ala Ser Lys Pro Gln  
 1 5 10 15

Gly Thr Thr Val Cys Pro Pro Cys Asp Asn Glu Leu Lys Ser Glu Ala  
 20 25 30

Ile Ile Glu His Leu Cys Ala Ser Glu Phe Ala Leu Arg Met Lys Ile  
 35 40 45

Lys Glu Val Lys Lys Glu Asn Gly Asp Lys Lys Ile Val Pro Lys Lys  
 50 55 60

Lys Lys Pro Leu Lys Leu Gly Pro Ile Lys Lys Lys Asp Leu Lys Lys  
 65 70 75 80

Leu Val Leu Tyr Leu Lys Asn Gly Ala Asp Cys Pro Cys His Gln Leu  
 85 90 95

Asp Asn Leu Ser His His Phe Leu Ile Met Gly Arg Lys Val Lys Ser  
 100 105 110

Gln Tyr Leu Leu Thr Ala Ile His Lys Trp Asp Lys Lys Asn Lys Glu  
 115 120 125

Phe Lys Asn Phe Met Lys Lys Met Lys Asn His Glu Cys  
 130 135 140

<210> 14

<211> 12

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 385 666 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

5 <400> 14

Gln Gly Thr Leu Val Asp Gly Arg Trp Leu Gln Leu  
1 5 10

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

15 <400> 15

Ala Gly Thr Leu Val Asp Gly Arg Trp Leu Gln Leu  
1 5 10

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

25 <400> 16

Gln Ala Thr Leu Val Asp Gly Arg Trp Leu Gln Leu  
1 5 10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

<400> 17

ES 2 385 666 T3

Gln Gly Ala Leu Val Asp Gly Arg Trp Leu Gln Leu  
1 5 10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

10 <400> 18

Gln Gly Thr Ala Val Asp Gly Arg Trp Leu Gln Leu  
1 5 10

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

20 <400> 19

Gln Gly Thr Leu Ala Asp Gly Arg Trp Leu Gln Leu  
1 5 10

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

30 <400> 20

Gln Gly Thr Leu Val Ala Gly Arg Trp Leu Gln Leu  
1 5 10

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

<400> 21

Gln Gly Thr Leu Val Asp Ala Arg Trp Leu Gln Leu  
 1 5 10

<210> 22

10 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

<400> 22

Gln Gly Thr Leu Val Asp Gly Ala Trp Leu Gln Leu  
 1 5 10

<210> 23

20 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

<400> 23

Gln Gly Thr Leu Val Asp Gly Arg Ala Leu Gln Leu  
 1 5 10

<210> 24

30 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

## ES 2 385 666 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

<400> 24

Gln Gly Thr Leu Val Asp Gly Arg Trp Ala Gln Leu  
1 5 10

5 <210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

<400> 25

Gln Gly Thr Leu Val Asp Gly Arg Trp Leu Ala Leu  
1 5 10

15 <210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

<400> 26

Gln Gly Thr Leu Val Asp Gly Arg Trp Leu Gln Ala  
1 5 10

25 <210> 27

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

<400> 27

ES 2 385 666 T3

Leu Val Asp Gly Arg Trp Leu Tyr Asn Pro His His  
1 5 10

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

10 <400> 28

Met Val Asp Gly Ser Trp Leu Asp Leu  
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

20 <400> 29

Thr Leu Cys Pro Val Asp Gly Arg Trp  
1 5

<210> 30

<211> 20

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

<400> 30

-----  
agccttggca gtcaacgacg

30

20

<210> 31

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

<400> 31

gttggtggctt ttgcattgca c

21

<210> 32

10 <211> 14

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia de Sonda del Cebador

<220>

<221> Misc\_feature

<222> (13)..(13)

20 <223> n = cualquier residuo

<400> 32

tttttttttt ttna

14

<210> 33

25 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Yapay Dizilim Tarifi: Öncül/Prob dizilimi

<400> 33

atgagggtcca ccaccctggt

20

<210> 34

35 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

<400> 34

catggagaag gctggggctc

20

<210> 35

10 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

<400> 35

tgttgaaaac tagtagctg

19

<210> 36

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

25

<400> 36

gctgtgggca aggtcatccc

20

<210> 37

<211> 10

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

35

ES 2 385 666 T3

<400> 37

cttgattgcc

10

<210> 38

<211> 22

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

10

<400> 38

ttaaaattgc tgctgcctg ag

22

<210> 39

<211> 22

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

20

<400> 39

tccgaactac agggacaaca gg

22

<210> 40

<211> 12

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de Sonda del Cebador

30

<400> 40

Trp Glu Cys Ala Met Tyr Asp Gly Arg Cys Leu Thr  
1 5 10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un polipéptido compuesto por (i) una secuencia de aminoácidos como la recogida en la SEC. ID. Nº: 3, (ii) una secuencia de aminoácidos como la recogida en la SEC. ID. Nº: 5, la SEC. ID. Nº: 6 o la SEC. ID. Nº: 7, o (iii) una variante de (i) o (ii) que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia con una de esas secuencias, donde el polipéptido tiene la capacidad de unirse a RANKL y donde el polipéptido inhibe la diferenciación de las células progenitoras de los osteoclastos, para su uso en el tratamiento de un sujeto con una afección de los huesos caracterizada por la reabsorción ósea no deseada, como la artritis reumatoide, las metástasis osteolíticas o el mieloma múltiple, mediante la administración del polipéptido, donde el polipéptido no tiene la secuencia para la SARP-2 humana, con alanina en la posición 174, Uniprot ID nº Q8N474y.
- 10 2. El polipéptido de la reivindicación 1 donde el polipéptido se selecciona del grupo compuesto por la SEC. ID. Nº: 5, la SEC. ID. Nº: 6 y la SEC. ID. Nº: 7, para su uso en el tratamiento de un sujeto con una afección de huesos caracterizada por la reabsorción ósea no deseada, como la artritis reumatoide, las metástasis osteolíticas o el mieloma múltiple, mediante la administración del polipéptido.
- 15 3. Un método para inhibir la formación de osteoclastos *in vivo*, poniendo en contacto las células progenitoras de los osteoclastos con un polipéptido compuesto por (i) una secuencia de aminoácidos como la recogida en la SEC. ID. Nº: 3, (ii) una secuencia de aminoácidos como la recogida en la SEC. ID. Nº: 5, la SEC. ID. Nº: 6 o la SEC. ID. Nº: 7, o (iii) una variante de (i) o (ii) que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia con una de esas secuencias, donde el polipéptido tiene la capacidad de unirse a RANKL, donde el polipéptido no tiene la secuencia para la SARP-2 humana, con la alanina en la posición 174, Uniprot ID nº Q8N474.

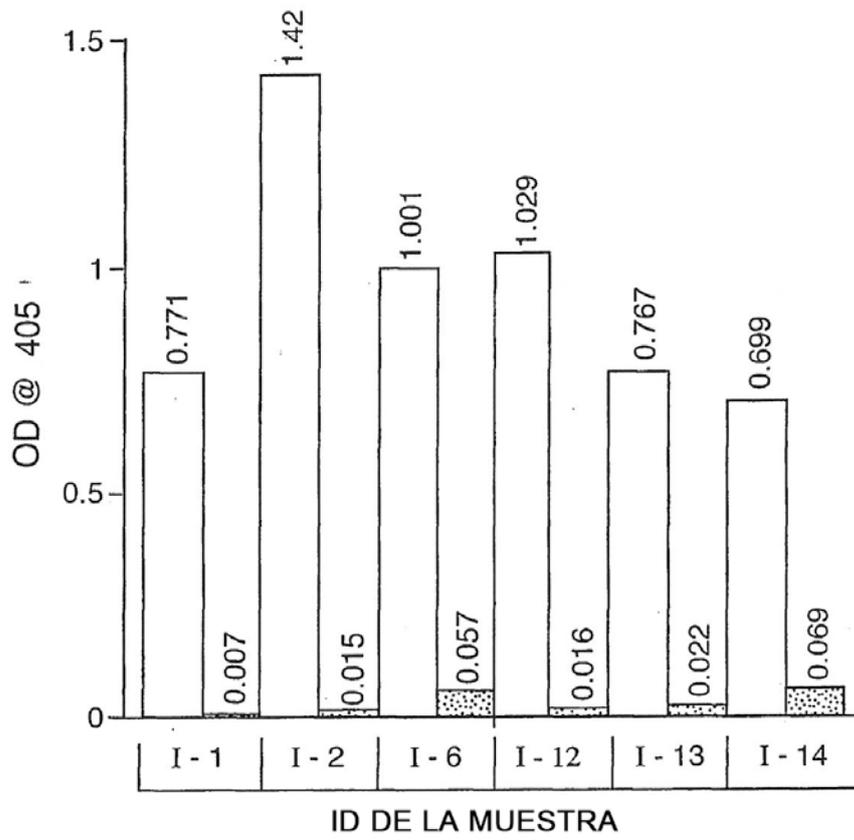


FIG. 1

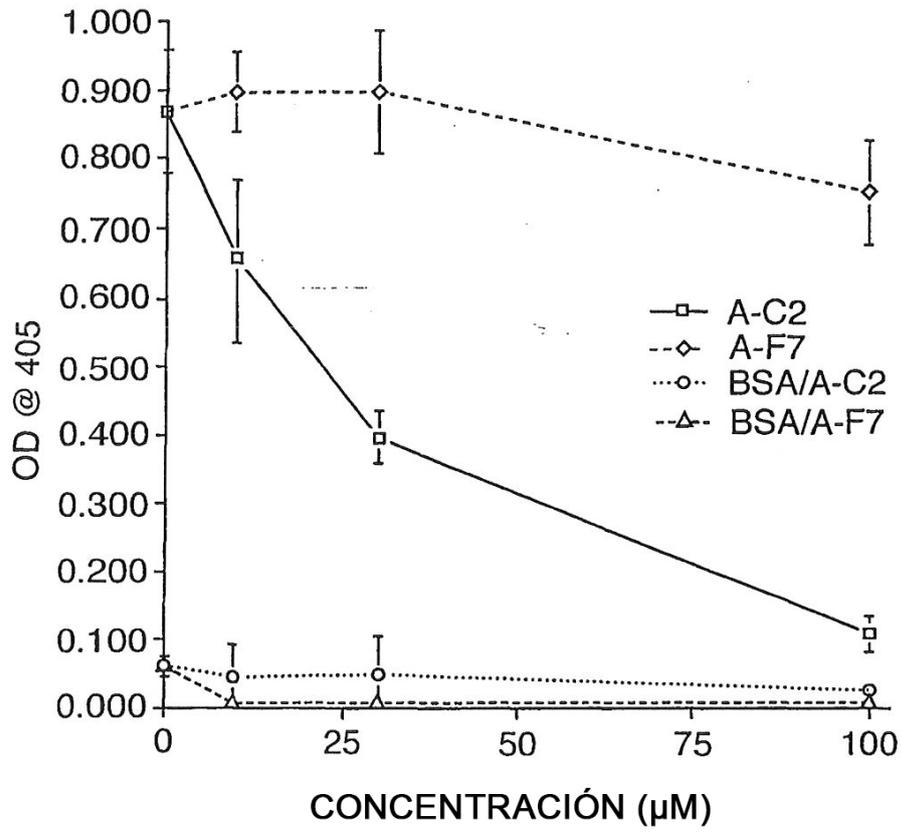


FIG. 2

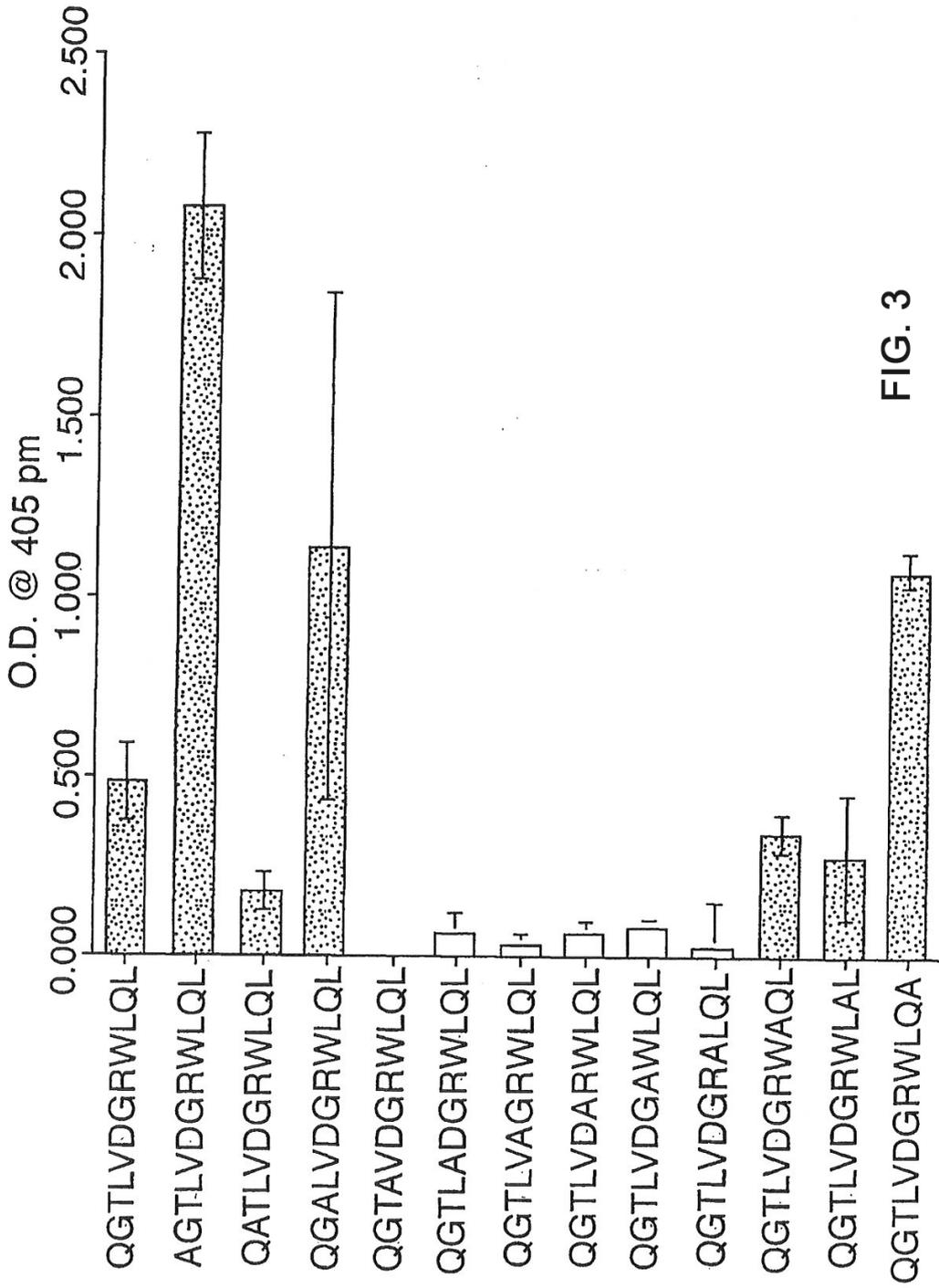


FIG. 3

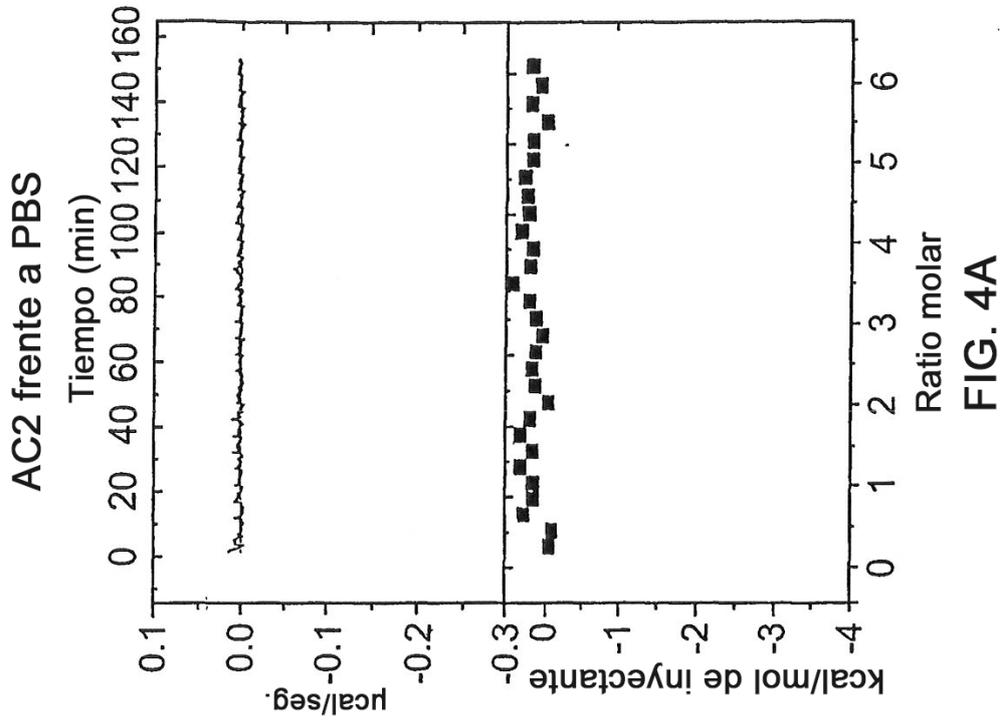


FIG. 4A

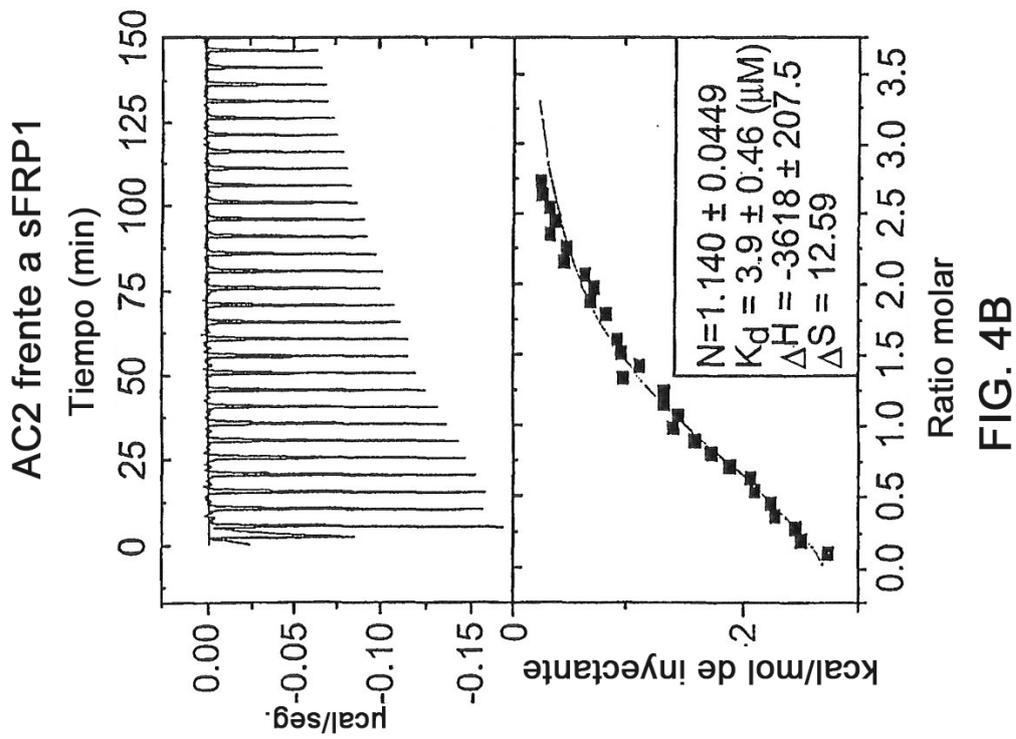


FIG. 4B

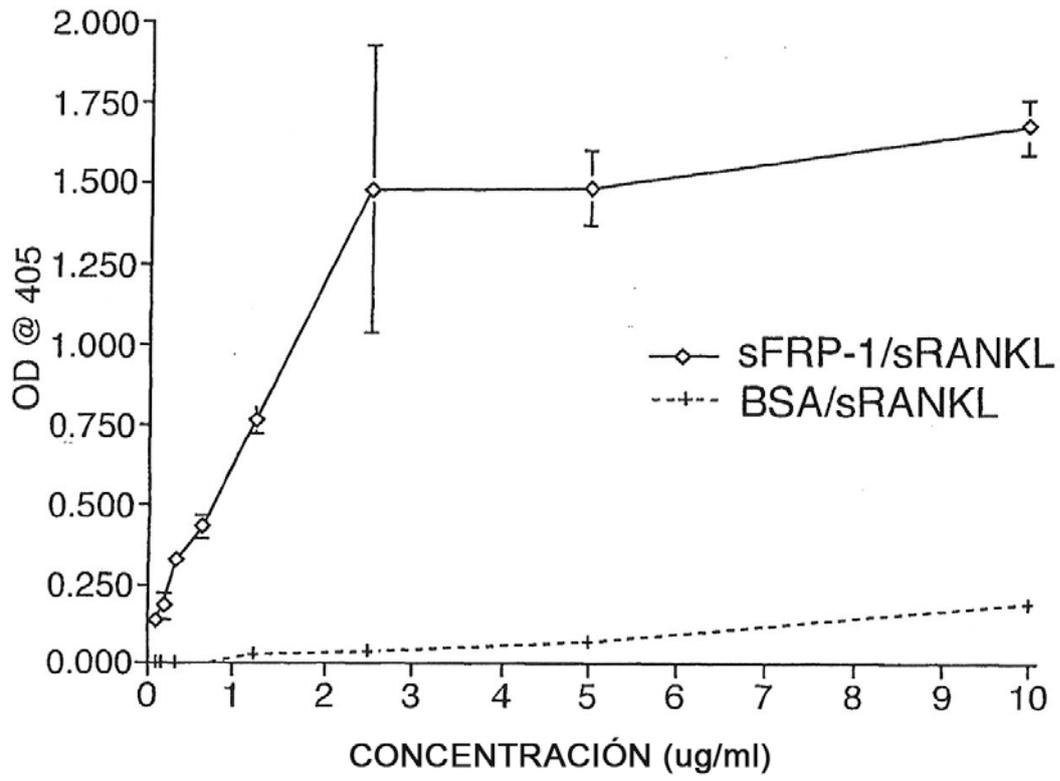
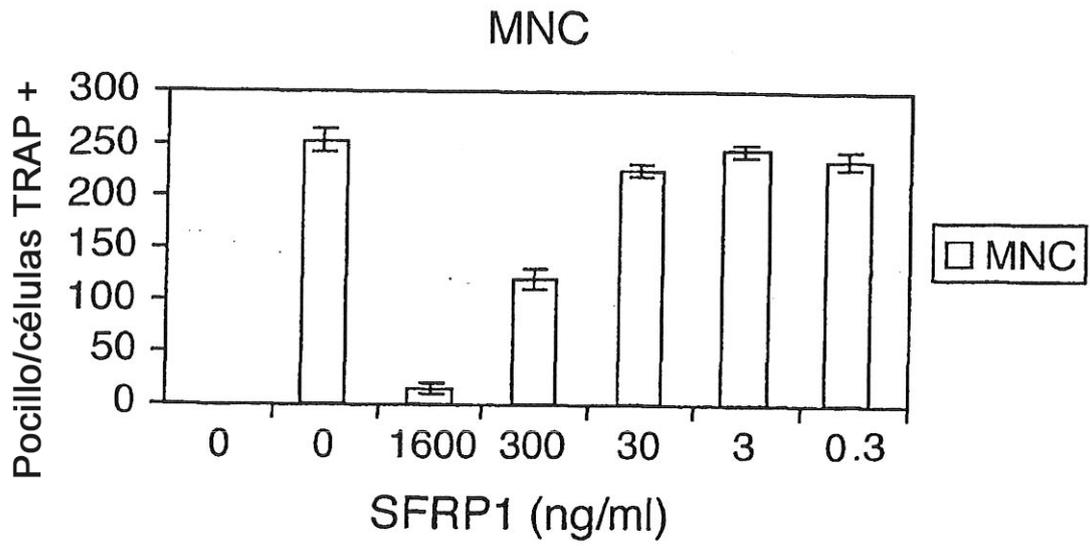
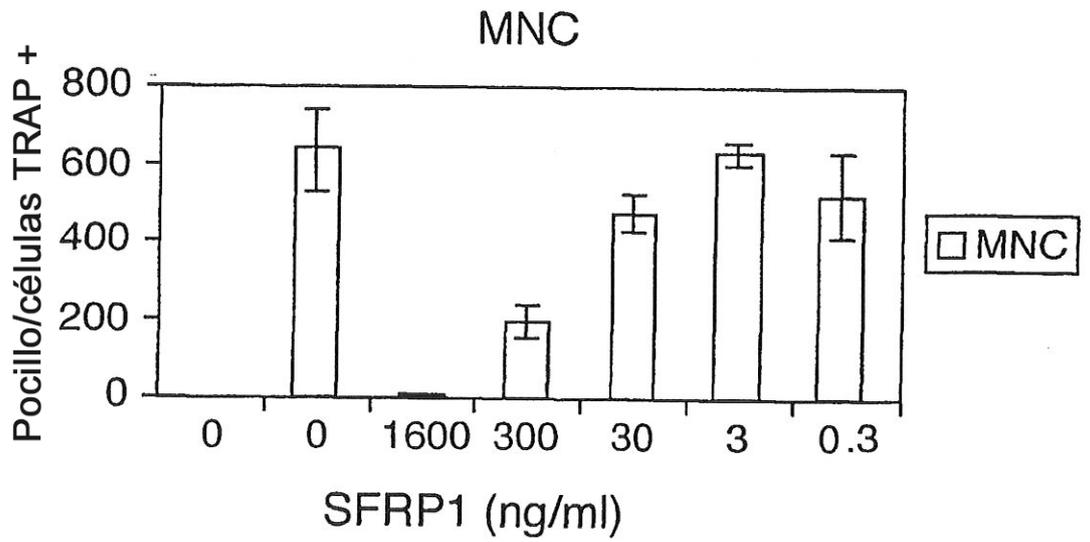


FIG. 5



**FIG. 6A**



**FIG. 6B**

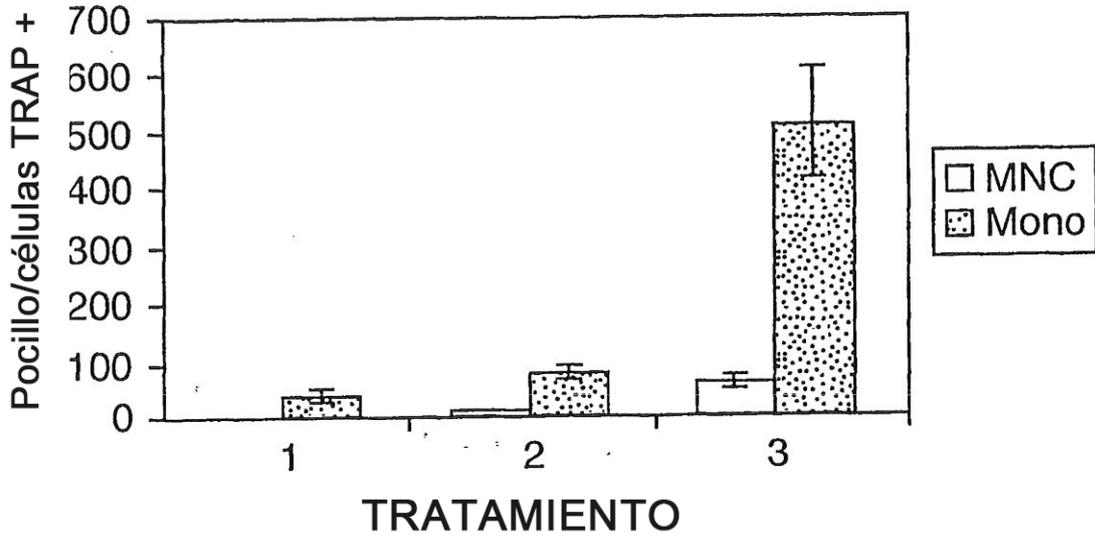


FIG. 7A

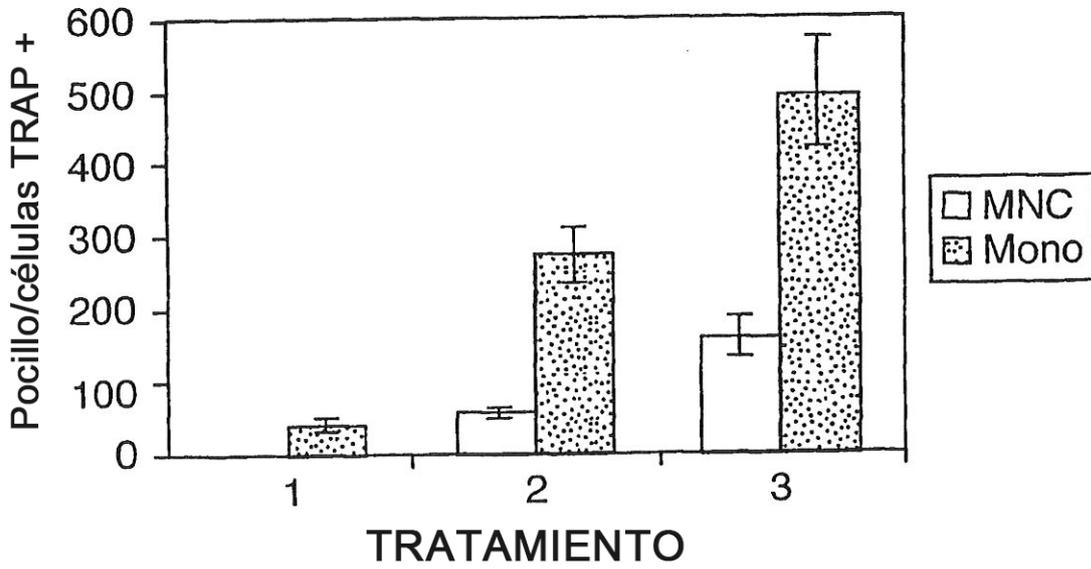


FIG. 7B

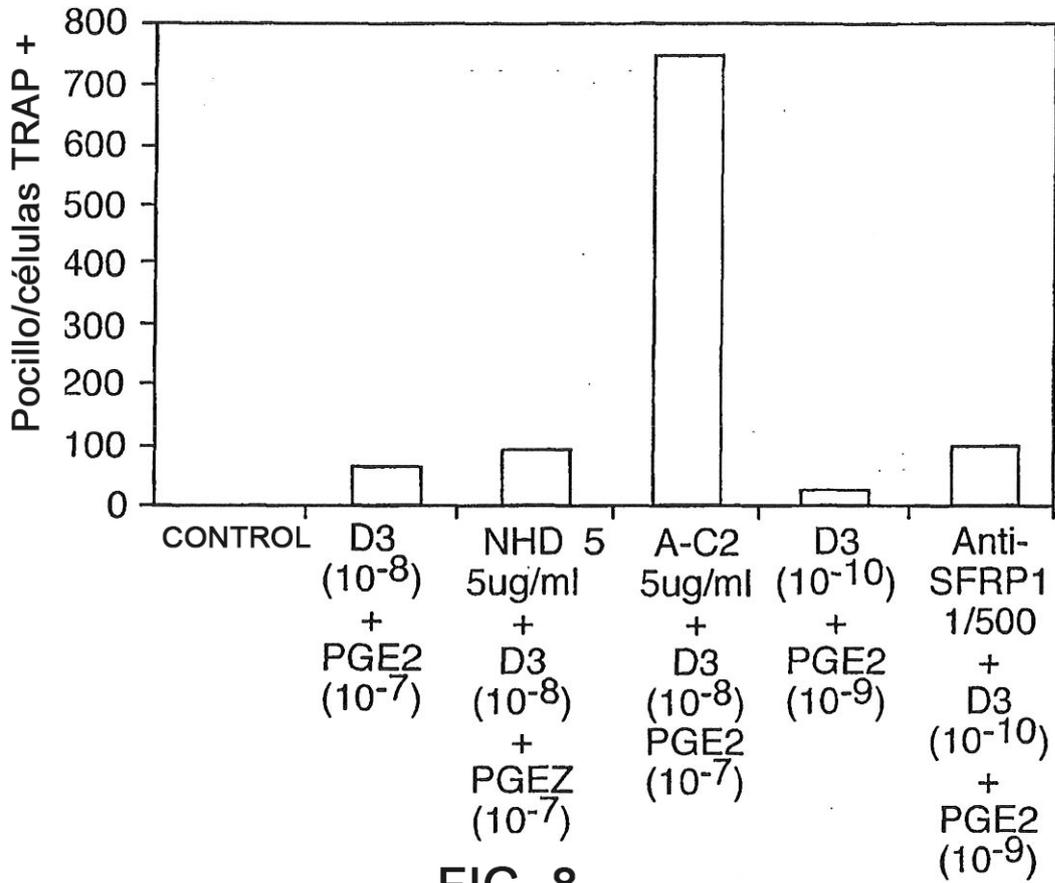


FIG. 8

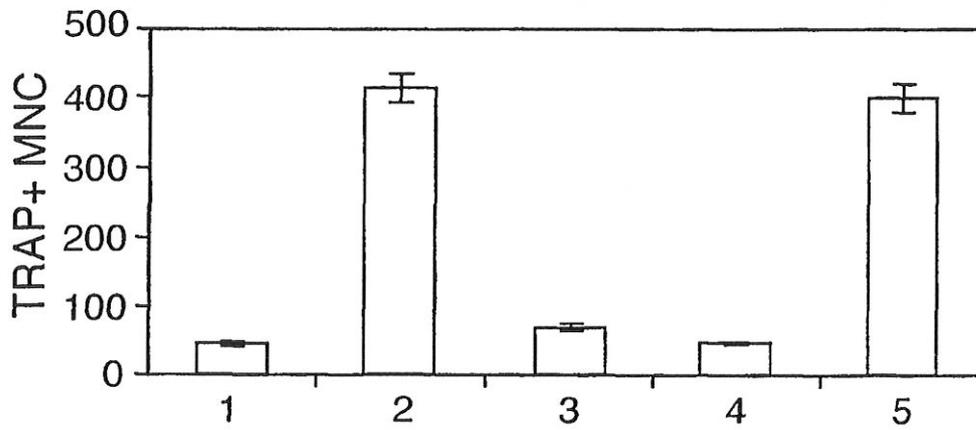
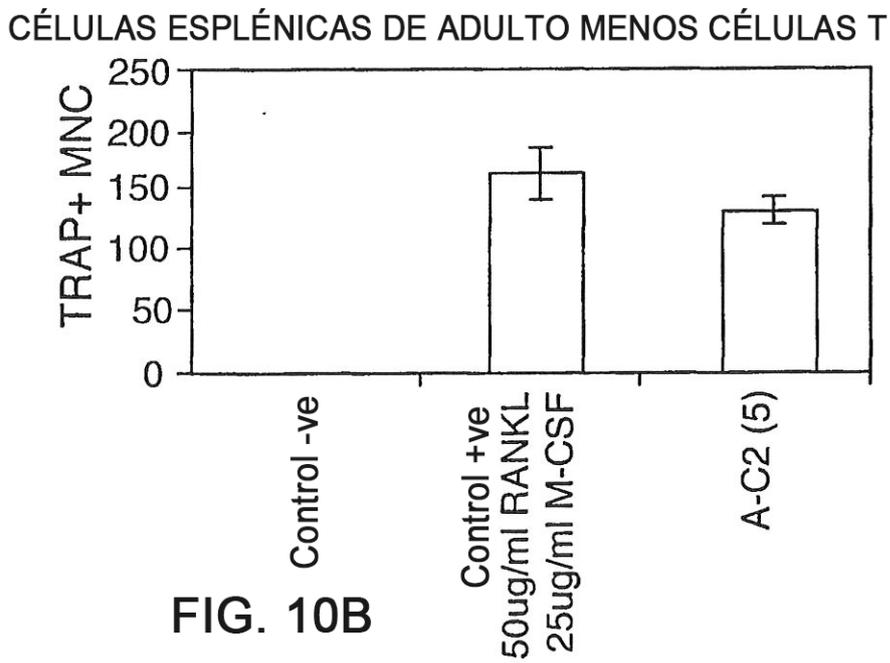
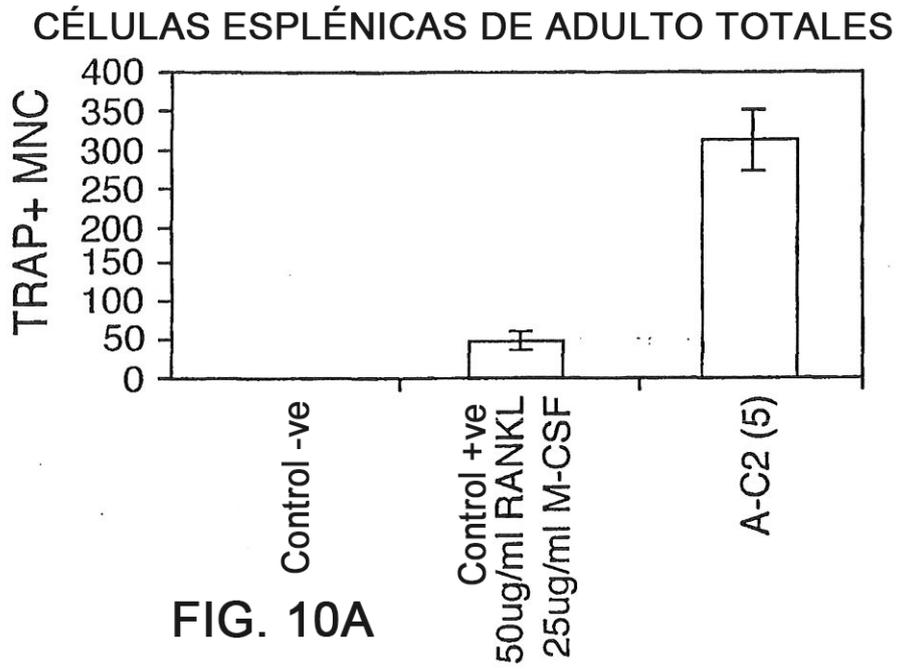
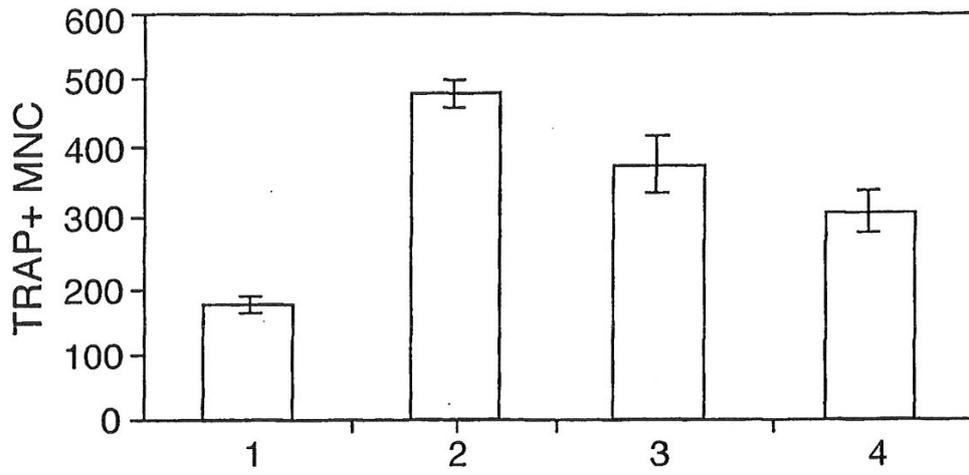
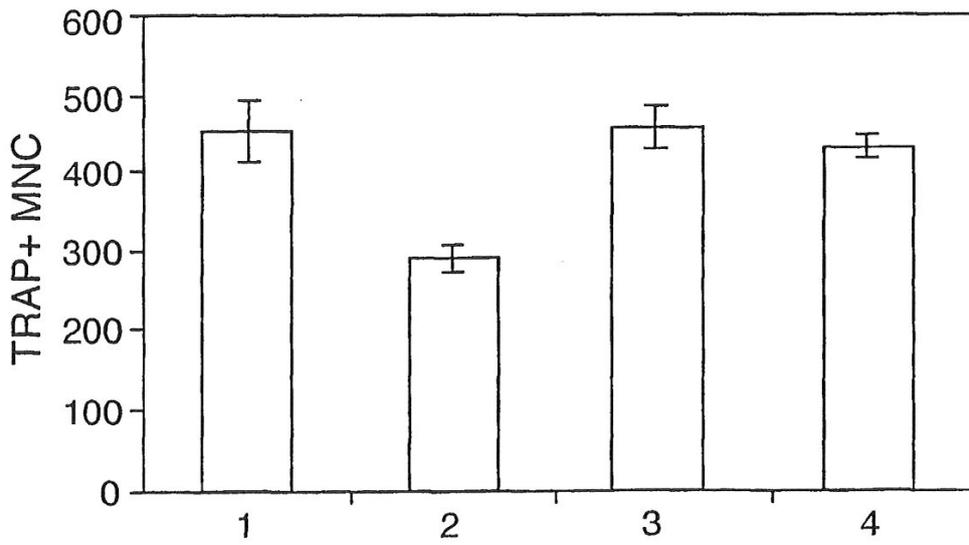


FIG. 9





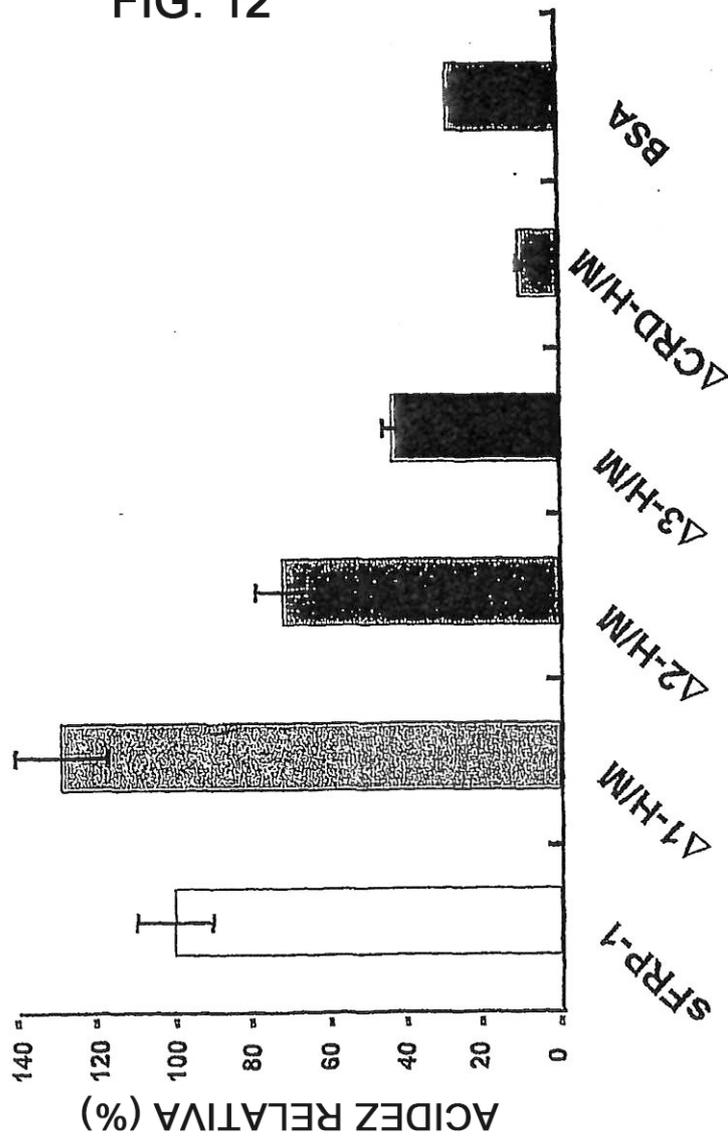
**FIG 11A**



**FIG. 11B**

**UNIÓN DE RANKL A DERIVADOS DE Sfrp1**

FIG. 12



# UNIÓN DE RANKL AL CRD BACTERIANO Y ANÁLISIS DE SATCHARD

RANKL frente a CRD bacteriano

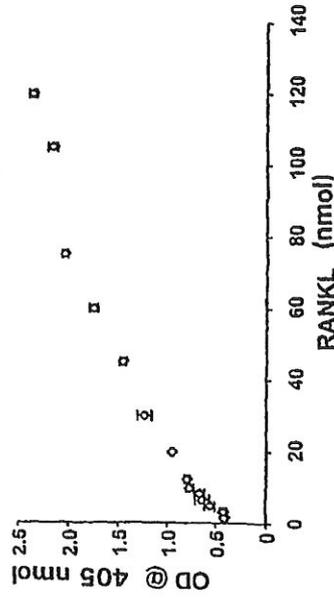


FIG. 13A

Análisis de Scatchard

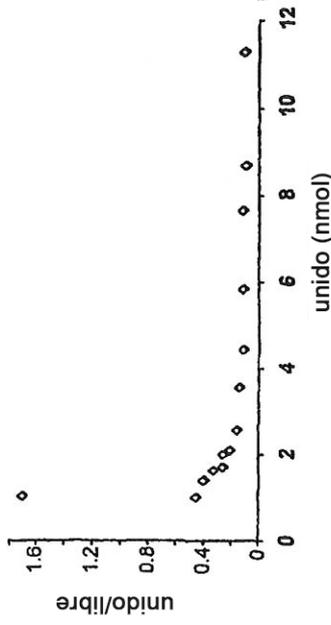


FIG. 13B

Sitio de alta afinidad

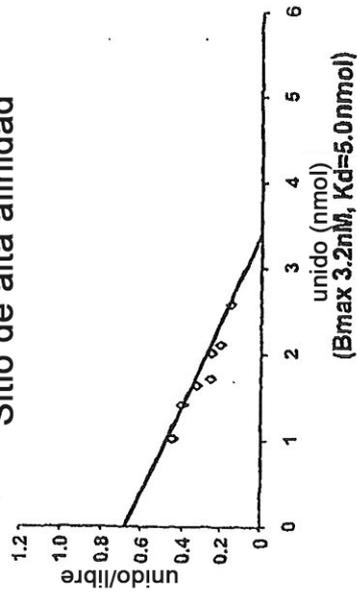


FIG. 13C

Sitio de baja afinidad

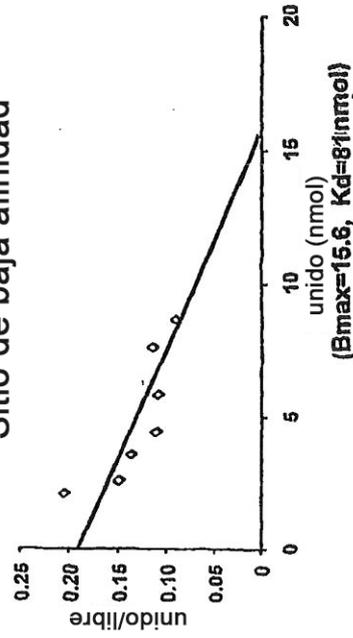


FIG. 13D

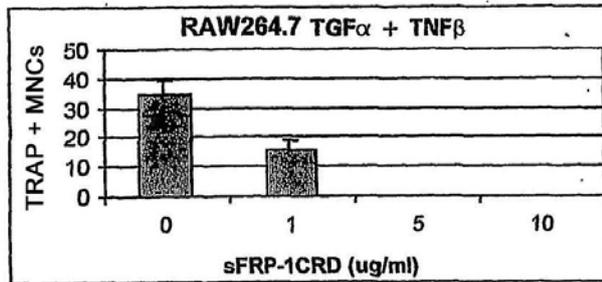


FIG. 14A

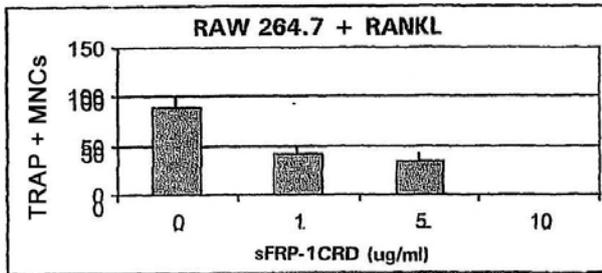


FIG. 14B

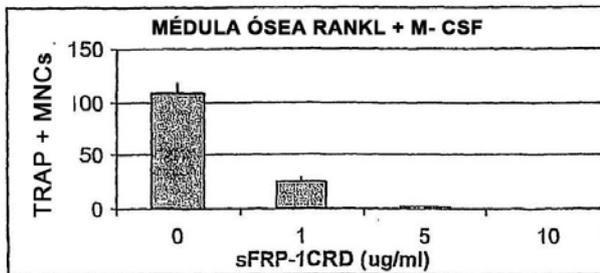


FIG. 14C

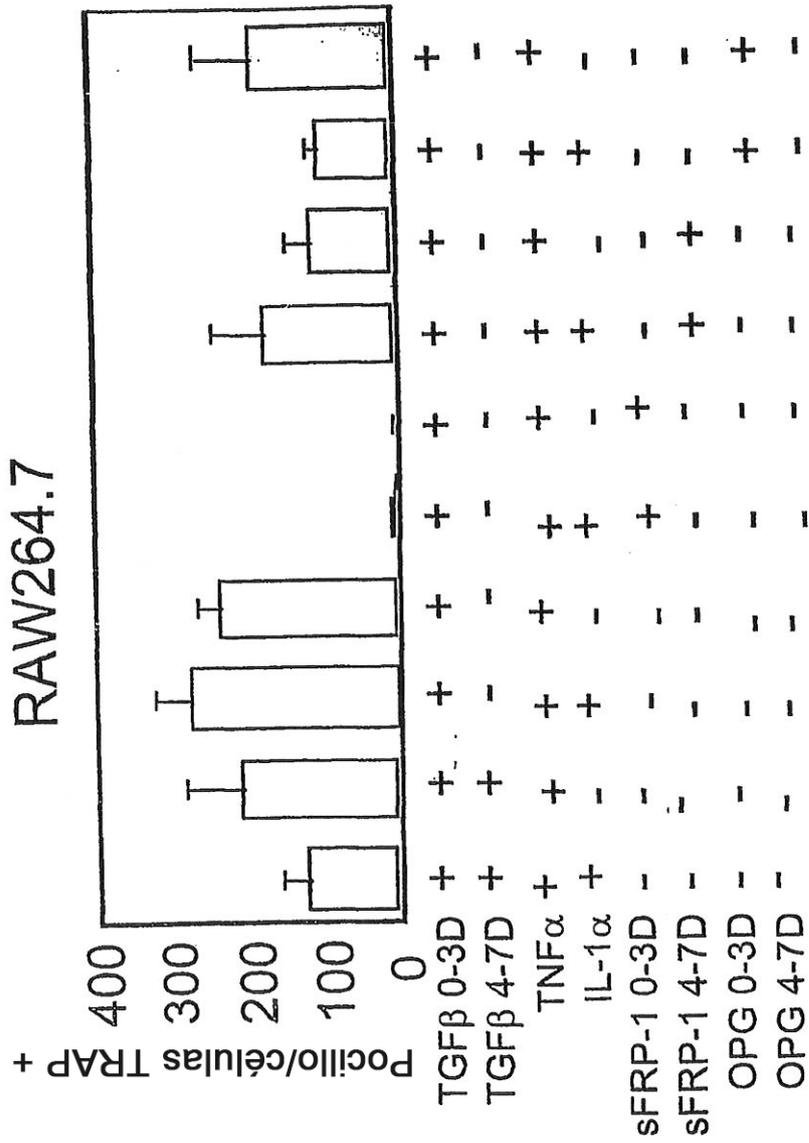
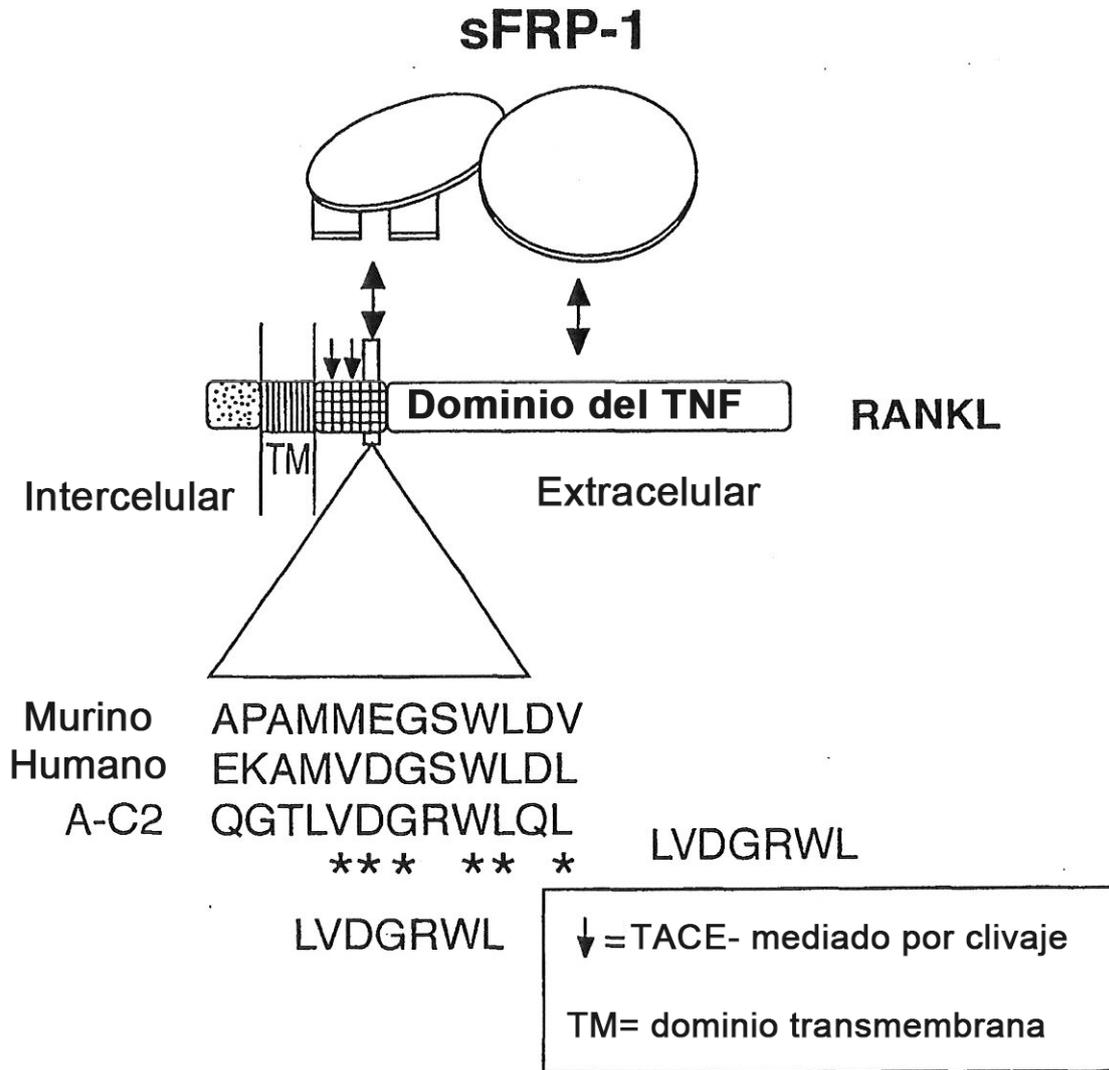


FIG. 15



**FIG. 16**

**FIG. 17**

