

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 893**

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

A61B 17/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07834699 .6**

96 Fecha de presentación: **16.11.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2097515**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.09.2009**

54 Título: **Métodos para controlar la mineralización de la matriz extracelular, métodos terapéuticos basados en los mismos y medicamentos para la utilización en los mismos**

30 Prioridad:

17.11.2006 WO PCT/NL2006/000576

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

14.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

14.12.2012

73 Titular/es:

ARCARIOS B.V. (100.0%)

Dr. Molewaterplein 40

3015 GE ROTTERDAM, NL

72 Inventor/es:

VAN LEEUWEN, JOHANNES PETRUS THOMAS

MARIA y

EIJKEN, HERMANUS JOHANNES MARCO

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Carlos

ES 2 392 893 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para controlar la mineralización de la matriz extracelular, métodos terapéuticos basados en los mismos y medicamentos para la utilización en los mismos.

SECTOR DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos biológicamente activos para su utilización en métodos de tratamiento y a medicamentos para su utilización en dichos métodos de tratamiento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La osteoporosis es una enfermedad en que se reducen la densidad y la calidad del hueso, conduciendo a una debilidad del esqueleto y un mayor riesgo de fractura, de manera particular de la columna vertebral, muñeca, cadera, pelvis y brazo. La osteoporosis y las fracturas asociadas son una causa importante de mortalidad y morbilidad. La calidad del hueso es una característica crucial en la osteoporosis, y los osteoblastos juegan un papel principal como las células formadoras de hueso y la dirección de la resorción ósea por los osteoclastos. Los osteoblastos tienen un origen mesenquimal y la diferenciación de células madre mesenquimales en un linaje osteoblástico está regulada por muchos factores endocrinos, paracrinós y autocrinos. Durante la formación de los huesos los osteoblastos producen una matriz extracelular orgánica (ECM) u osteoide (la matriz inmadura antes de la mineralización), que está compuesta principalmente de colágeno de tipo I y proteínas no colagenosas. A continuación, esta ECM se mineraliza, mediante la deposición en la misma de fosfatos de calcio, para formar espículas óseas. El inicio de la mineralización ósea, u osificación, requiere la precipitación y unión de los cristales de fosfato de calcio, en particular de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), a la ECM.

Este proceso de mineralización no es único para las células óseas. También tiene lugar en condrocitos hipertróficos como parte de la formación de huesos endocondrales durante el crecimiento. Además, en afecciones patológicas de calcificación vascular, se cree que la mineralización de la ECM de células vasculares de músculo liso (VSCM) está implicada en la calcificación vascular, así como en la calcificación de cartilago articular que tiene lugar con el envejecimiento, enfermedades degenerativas de las articulaciones (por ejemplo, osteoartritis) y diversos trastornos metabólicos y genéticos. De este modo, la mineralización de la ECM es un proceso fisiológico en el hueso y un proceso patológico en tejidos blandos.

La mineralización ósea, y en particular su regulación, es un proceso complicado controlado por muchos factores que incluyen concentraciones de calcio y fosfato en suero, hormonas, enzimas y la estructura de la ECM. La organización macromolecular de colágeno de tipo I es un factor que facilita la mineralización ósea. Inicialmente, se deposita fosfato de calcio en los huecos de las fibrillas de colágeno y, posteriormente, rellena los poros y el resto del espacio en las fibrillas de colágeno.

La calcificación vascular, y en particular la calcificación arterial, se ha considerado durante mucho tiempo como un proceso pasivo que implica el centro necrótico de la placa que sirve como centro nucleante para la deposición de mineral fosfato de calcio. El reciente conocimiento científico ha desafiado esta hipótesis en que las aberraciones genéticas de un conjunto de moléculas de la matriz celular (ECM), que incluyen la proteína Gla de la matriz y osteoprotegerina, dan lugar a una calcificación arterial espontánea, lo cual indica que como la mineralización ósea, la calcificación arterial es un proceso regulado de manera delicada.

Es evidente que se desea la posibilidad de controlar el proceso de mineralización de la ECM, tanto en la dirección de inducir la mineralización como en el caso de la osteoporosis y la curación de fracturas, como en el caso de reducir o prevenir la mineralización como en el caso de la calcificación vascular, en particular la calcificación aterosclerótica y la calcificación de cartilago.

Es un objetivo de la presente invención dar a conocer métodos para seleccionar agentes terapéuticos candidatos para controlar la mineralización de una matriz extracelular en un tejido de un paciente, de manera preferente en un mamífero, de la forma más preferente un humano. Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer métodos para controlar la mineralización de la ECM en tejido blando de un mamífero, de manera preferente un humano, en particular en relación con la calcificación patológica de cartilago y vasos sanguíneos, tal como la mineralización de la ECM producida por VSCM y la aterosclerosis. Es otro objetivo de la presente invención dar a conocer métodos de control, por un lado, mediante la disposición de posibilidades para estimular la mineralización y, por otro lado, mediante la disposición de posibilidades para reducir o prevenir la mineralización. Es un objetivo adicional dar a conocer composiciones farmacéuticas y medicamentos para utilizar en dichos métodos.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

En el presente documento se describe un método para seleccionar un agente terapéutico candidato para controlar la mineralización de una matriz extracelular en tejido de un paciente, comprendiendo dicho método las etapas de:

a) exponer una célula de dicho tejido que produce una matriz extracelular a un compuesto de prueba bajo condiciones que ayudan en la formación de la matriz extracelular y la maduración de la matriz;

b) determinar la expresión en dicha célula, como mínimo, de un gen en respuesta a dicha exposición, en el que dicho gen se selecciona del grupo A que comprende genes que codifican la trombospondina 1; colágeno de tipo V alfa 1; colágeno de tipo XVI alfa 1; colágeno de tipo VIII alfa 2; repetición de la triple hélice de colágeno que contiene 1; hialuronano y proteína 1 de unión a proteoglicanos; proteoglicano 2 de sulfato de condroitina (versicano); proteína 2 de unión al factor beta de crecimiento transformante latente; biglicano; metalopeptidasa 2 de matriz; periostina, factor específico de osteoblasto; fibulina 5; SPOCK1, Sparc/osteonectina, cwcw y proteoglicanos de dominios de tipo kazal (testicano); y metalopeptidasa ADAM con motivo de trombospondina de tipo 1; y/o

- grupo B que comprende los genes que codifican el antígeno CD248, endosialina; agente de interfase 2 de microfibrillas de elastina; matrilina 2; distrobrevina, alfa; colágeno, tipo IV, alfa 6; nidógeno 2 (osteonidógeno); papilina, glicoproteína sulfatada de tipo proteoglicano; familia 3 de dominio de lectinas de tipo C, miembro B; colágeno tipo V, alfa 3; e inhibidor 4 de metalopeptidasa TIMP; y

c) seleccionar dicho compuesto de prueba como agente terapéutico candidato para el control de la mineralización de una matriz extracelular en un tejido de un individuo en caso de que la expresión de dicho, como mínimo, un gen en dicha célula esté regulada como un resultado directo de dicha exposición.

La etapa de exposición de una célula productora de la matriz extracelular del tejido a un compuesto de prueba se realiza durante un periodo de tiempo que es eficaz para ejercer una respuesta (es decir, desde unas horas a varios días o más) sobre la expresión génica celular. Dado que el repertorio genético de la célula también está influido por otras condiciones externas, la célula debe colocarse bajo condiciones que ayudan en la formación de la matriz extracelular y la maduración de la matriz en presencia del compuesto de prueba.

La etapa de determinación de la expresión en la célula, como mínimo, de un gen pueden comprender de manera adecuada la determinación del nivel de expresión de dos genes, de manera más preferente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ó 24 genes seleccionados del grupo A y B tal como se han definido anteriormente. De manera más preferente, se determina un incremento o descenso en el nivel de expresión, como mínimo, de un gen del grupo A en combinación con un descenso o incremento concomitante (es decir, inverso) en el nivel de expresión, como mínimo, de un gen del grupo B. En la realización más preferente, se determina un incremento o descenso en el nivel de expresión de esencialmente todos los genes del grupo A en combinación con un descenso o incremento concomitante en el nivel de expresión de esencialmente todos los genes del grupo B. De este modo, de la manera más preferente, la expresión relativa de los genes del grupo A se termina en relación con la expresión de los genes del grupo B, en la que el compuesto de prueba se identifica como un agente terapéutico candidato para el control de la mineralización en caso de que una regulación por descenso relativa de los genes del grupo A coincida con una regulación por incremento relativa de los genes del grupo B, o viceversa, dependiendo de si el agente es eficaz en la inhibición o la estimulación de la maduración de la matriz y la posterior mineralización.

El método anterior para la selección de agentes terapéuticos candidatos se ejemplifica de manera adecuada en un modelo de cultivo celular para el cribado de la eficacia terapéutica de un compuesto en la mineralización (un modelo de mineralización). Este modelo de cultivo celular es esencialmente un cultivo de células que producen una matriz extracelular, la cual se puede mineralizar debido a la deposición de fosfato de calcio. Los presentes inventores han descubierto que la mineralización de la matriz, por ejemplo, de osteoblastos humanos o células madre mesenquimales, no se mineraliza de manera completa antes de que se pueda determinar el efecto del compuesto en la potencial mineralización de la matriz. El modelo de mineralización se basa en el conocimiento de que la señalización de activina da como resultado el bloqueo del desarrollo de la matriz hacia un estado maduro (mineralizable o mineralizado previamente), el cual se define por una cierta composición de proteínas de la matriz. El bloqueo del desarrollo de la matriz es el resultado de la regulación de la expresión génica de proteínas de la matriz. De este modo, mediante la medición del efecto en el nivel de expresión génica de proteínas específicas de la matriz, de manera preferente la regulación por incremento de ciertos genes y la regulación por descenso de otros, en particular entre los grupos A y B tal como se define en el presente documento, se puede evaluar el potencial de un compuesto de prueba para ejercer un efecto (terapéutico) en la mineralización (o la prevención de la misma, y se puede identificar el compuesto de prueba como un agente terapéutico candidato y finalmente se puede seleccionar haciéndolo disponible para ese fin terapéutico.

En el presente documento se describe que el cultivo de células que producen una matriz extracelular puede comprender células de líneas celulares "knockout", en las que uno o más genes implicados en la cascada de señalización de activina o implicados en la maduración de la matriz (por ejemplo, que codifican proteínas de la matriz o factores de transcripción implicados en la maduración de la matriz) están desactivados, por ejemplo, mediante la utilización de estrategias de ARNsi conocidas en la técnica. Dichas líneas celulares pueden formar la base de un sistema modelo apropiado para varios trastornos de la mineralización, y se pueden utilizar para descubrir y finalmente seleccionar compuestos que neutralizan o mejoran el trastorno, o identificar las dianas terapéuticas apropiadas para tratar dichos trastornos.

La validez de los modelos se demostró mediante la activina-A que inhibía la mineralización y la folistatina, la cual podía neutralizar el efecto de la activina A. De este modo, en la presente invención se describe un método de cribado muy mejorado para agentes terapéuticos candidatos basado en los modelos de mineralización de cultivos celulares en los que se determina la expresión de proteínas de matriz. Los modelos preferentes se ilustran en los siguientes ejemplos.

El modelo de mineralización de cultivo celular comprende de manera esencial i) un cultivo de una célula que produce matrices extracelulares bajo condiciones que ayudan a la formación de matrices extracelulares y la maduración de las matrices, ii) un compuesto de prueba, y iii) medios y métodos para determinar el nivel de expresión en que la célula de los genes del grupo A y/o el grupo B, tal como se definen anteriormente, como resultado de la exposición de las células en dicho cultivo a dicho compuesto de prueba. El funcionamiento del modelo, el cual puede tener la forma de un kit de diversas partes, implica la adición de un compuesto de prueba al medio del cultivo celular, exponiendo, de este modo, dicha célula a dicho compuesto de prueba, permitiendo que la exposición continuara durante la duración del periodo previo a la mineralización, y determinando el nivel de expresión, como mínimo, de un gen del grupo A y/o del grupo B, tal como se define anteriormente, en esa célula, en la que una regulación de la expresión como resultado de la exposición, de manera preferente una regulación específica por incremento y descenso de expresiones de genes particulares, tal como se describen a continuación, es indicativa del potencial del compuesto de prueba para ser un agente terapéutico candidato para controlar la mineralización de una matriz extracelular en un tejido de un paciente.

En un método, tal como se describe en el presente documento, la expresión de dicho, como mínimo, un gen se puede determinar mediante cualquier medio para medir los niveles de ARNm transcrito a partir de dicho, como mínimo, un gen, o mediante el análisis de proteínas de dicha célula o dicha matriz extracelular. Los medios y métodos para determinar en esa célula el nivel de expresión de los genes del grupo A y/o el grupo B, tal como se describen anteriormente de forma adecuada, implican un chip ("array") de ácidos nucleicos (chip genético) y los protocolos de hibridación para determinar los niveles de expresión génica en una célula de tejido. Dichos protocolos de hibridación son conocidos en la técnica e implican, en general, la transcripción inversa de ARNm en ADNc, la amplificación del ADNc obtenido en presencia de nucleótidos marcados con un marcador detectable para producir un producto de amplificación de ADNc marcado, la hibridación del ADNc marcado a ácidos nucleicos en el chip de ácidos nucleicos bajo condiciones de hibridación rigurosas, la eliminación del producto no hibridado y la detección de la hibridación en el chip mediante la detección del marcador.

En una realización particularmente preferente de un método, tal como se describe en el presente documento, para seleccionar un agente terapéutico candidato para controlar la mineralización, el agente es para estimular la mineralización, la curación ósea, la formación ósea y/o para el tratamiento de la osteoporosis. En dicho método, la célula es de manera preferente un osteoblasto. En una realización adicional de dicho método, el compuesto de prueba se identifica como agente terapéutico candidato para estimular la mineralización, la curación ósea, la formación ósea y/o para el tratamiento de la osteoporosis cuando, como mínimo, un gen del grupo A, tal como se define en el presente documento, se regula por descenso y/o, como mínimo, un gen del grupo B, tal como se define en el presente documento, se regula por incremento. El método puede realizarse de manera adecuada mediante la utilización de cualquier compuesto, de manera preferente, análogos funcionales de folistatina, inhibidores de activina A, inductores de inhibidores de activina A y antagonistas del receptor de activina del tipo II, como compuesto de prueba.

Después de la identificación de un agente terapéutico candidato, se puede desear, de manera opcional, verificar si el agente es adecuado para el control de la mineralización de la matriz. Dicho ensayo de verificación puede comprender las etapas de continuar la exposición de las células cultivadas al agente terapéutico candidato durante un periodo de tiempo después de la fase de maduración de la matriz y en la fase en que el desarrollo de la matriz implica la deposición de fosfato de calcio (mineralización). Para alcanzar esta fase, la exposición continúa, de manera preferente, durante un periodo superior a 12 días (inicio de la mineralización), de manera preferente superior a 15 días, de manera más preferente durante aproximadamente 19 días, o, como mínimo, ya en la fase de mineralización. A continuación el ensayo implica la medición de la deposición de fosfato de calcio en dicha matriz a efectos de evaluar el verdadero efecto del agente en la mineralización. Se pueden utilizar compuestos de control adecuados, tales como activina A (como inhibidor de la mineralización) o folistatina (como inhibidor de la activina A). El ensayo para medir la deposición de fosfato de calcio en la matriz es conocido en la técnica y se puede basar en la determinación del contenido de calcio en la matriz. Esto puede tener lugar de forma colorimétrica mediante la utilización de un reactivo de color para medir el calcio basado en un complejo de orto-cresolfaleína (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 4.448.889 y 4.871.678. De manera alternativa, se puede utilizar la tinción con Rojo S de Alizarina (por ejemplo, tal como se dispone en el mercado en forma de un Kit de Cuantificación de la Osteogénesis de Millipore Corporation)

En otra realización particularmente preferente de un método, tal como se describe en el presente documento, para seleccionar un agente terapéutico candidato para controlar la mineralización, el agente es para prevenir la mineralización o para tratar trastornos de calcificación. El trastorno de la calcificación puede ser, por ejemplo, una calcificación patológica seleccionada del grupo que comprende calcificación aterosclerótica, calcificación pulmonar

metastásica, calcificación de las válvulas cardíacas y las calcificaciones en las articulaciones asociadas con la tendinitis; artritis; bursitis; espolones óseos; osificación cutánea; piedras en los riñones; miositis osificante; osificación pulmonar; cataratas; calcinosis estriopalidodentada bilateral; osificación heterotópica neurogénica y osteosarcoma. En dicho método, la célula es, de manera preferente, una célula vascular de músculo liso. En una realización adicional de dicho método, el compuesto de prueba se identifica como un agente terapéutico candidato para prevenir la mineralización o para tratar trastornos de la calcificación cuando, como mínimo, un gen del grupo A, tal como se define en el presente documento, se regula por incremento y/o, como mínimo, un gen del grupo B, tal como se define en el presente documento, se regula por descenso. El método se puede realizar, de manera adecuada, mediante compuestos que incluyen análogos funcionales de activina A, un inductor endógeno de activina A y un agonista del receptor de activina del tipo II.

También se describe en el presente documento un agente terapéutico para prevenir la mineralización o para tratar trastornos de la calcificación, en el que dicho agente terapéutico candidato es activina A.

También se describe en el presente documento una composición farmacéutica para prevenir la mineralización o para tratar trastornos de la calcificación, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de activina A y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención da a conocer un agente terapéutico para estimular la mineralización, la curación ósea, la formación ósea y/o para tratar la osteoporosis, en el que dicho agente terapéutico candidato es folistatina.

También se describe en el presente documento una composición farmacéutica para prevenir la mineralización o para tratar trastornos de la calcificación, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de activina A y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un método para tratar o prevenir calcificaciones patológicas, la célula que produce dicha matriz extracelular es, de manera preferente, una célula vascular, de manera más preferente una célula vascular de músculo liso. De manera alternativa, la célula puede ser un condrocito o la célula que impulsa las calcificaciones patológicas en cualquiera de las siguientes patologías: calcificación pulmonar metastásica, calcificación de las válvulas cardíacas, tendinitis; artritis; bursitis; espolones óseos; osificación cutánea; piedras en los riñones; miositis osificante; osificación pulmonar; cataratas; calcinosis estriopalidodentada bilateral; osificación heterotópica neurogénica y osteosarcoma.

También se describe en el presente documento un método de producción de una matriz extracelular no mineralizante. Dicha matriz se produce, de manera esencial, como parte de un tejido (por ejemplo, una colección de células similares y las sustancias que las rodean), y la matriz se puede aislar, de manera opcional, a partir del tejido, entre otros modos, mediante la extracción de las células. Dicho método comprende, de manera esencial, el cultivo de un tejido productor de una matriz adecuado bajo condiciones en las que las células de dicho tejido producen una matriz extracelular. Según un método de la presente invención, para producir una matriz no mineralizante, el método se realiza en combinación con cualquier método de la presente invención, en el que se previene o inhibe la maduración y/o la mineralización de la matriz.

También se describe en el presente documento un método de producción de una matriz extracelular mineralizante de manera rápida. Dicho método es, de manera esencial, análogo al descrito para la producción de la matriz no mineralizante, aunque aquí el método se realiza en combinación con cualquier método de la presente invención en el que se estimula la maduración y/o la mineralización de la matriz.

También se describe en el presente documento un marcador para el diagnóstico de la osteoporosis en un paciente, en el que dicho marcador es la proporción de la cantidad de activina A con respecto a la cantidad de folistatina en una muestra de fluido o de tejido de dicho paciente y en el que dicha proporción es elevada cuando se compara con los pacientes de control. Entre las muestras de fluido adecuadas se incluyen sangre, suero, orina, saliva, fluido sinovial y jugos, y entre las muestras de tejido adecuadas se incluyen hueso y cartílago u otro tejido conectivo, tejido muscular, tejido lipídico, médula ósea, (células de la) sangre y epitelio de los intestinos o la piel.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra la inhibición de la mineralización por la señalización de activina. Se cultivaron osteoblastos (SV-HFO) durante 19 días en presencia de varias concentraciones de activina A. Se cuantificó el contenido de calcio en el día 19. ** $p < 0,01$ en comparación con cultivos del vehículo.

La figura 2 muestra la producción y localización de activina A en tejido óseo humano. (A) Expresión (ARNm) de subunidades de inhibina/activina y receptores de activina de tipo I y tipo II en cultivos de osteoblastos (SV-HFO). (B) Producción de la proteína activina A por osteoblastos humanos (SVHFO). Los niveles de activina A se midieron en el sobrenadante de cultivo de cultivos de osteoblastos de control y cultivos de osteoblastos que fueron inducidos para la mineralización. La producción se corrigió para el contenido de ADN en el cultivo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ en comparación con los cultivos de control; # $p < 0,01$ en comparación con el día 5 de los cultivos mineralizantes. (C) Tinción inmunohistológica de inhibina β A (INHBA) (paneles

izquierdos; coloración marrón fuerte (oscura)) e inhibina α (INHA) (paneles centrales; sin ninguna coloración) en tejido óseo humano. La IgG2b de ratón se utilizó como control negativo (paneles derechos; ligera coloración), este anticuerpo no reacciona con ningún marcador de superficie celular humana.

La figura 3 muestra la inhibición de la señalización de activina endógena por folistatina en cultivos de osteoblastos (SV-HFO). El panel (A) muestra la inducción de una construcción informadora sensible a activina (CAGA-luciferasa) en respuesta a varias concentraciones de activina A (0,5 y 20 ng/ml de cultivo celular) en ausencia (vehículo) y presencia de folistatina 500 ng/ml (24 h después del inicio del tratamiento). La folistatina reduce de forma clara el nivel del ensayo de luciferasa. (B) Se forma similar a (A) se utilizó únicamente una construcción informadora sensible a BMP (BRE-Luciferasa) y los cultivos se trataron con BMP-2a en lugar de activina A, de manera opcional en combinación con folistatina. De forma clara, no se observa ningún efecto de la folistatina. (C) Se trataron cultivos de osteoblastos con folistatina o activina A durante 19 días y se midió el contenido de calcio en el día 19. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ en comparación con el vehículo.

La figura 4 muestra la relación cuantitativa entre activina A y folistatina. (A) Producción de folistatina por osteoblastos humanos (SV-HFO) en los días 5, 12 y 19 en condiciones de control y mineralizantes. (B) Las concentraciones de activina A y folistatina se midieron en el sobrenadante de cultivo de los osteoblastos de control y mineralizantes en los días 5, 12 y 19, posteriormente se calculó la proporción molar entre activina A y folistatina. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ en comparación con osteoblastos de control.

La figura 5 ejemplifica el efecto específico con el tiempo de la señalización de activina. (A) Se trataron los osteoblastos (SV-HFO) con activina A antes del inicio de la mineralización (día 0 a 10), después del inicio de la mineralización (día 10 a 19), durante todo el periodo de cultivo (día 0 a día 19) o no se trataron. Al final del cultivo (día 19) se midió el contenido de calcio. (B) Se trataron los osteoblastos (SV-HFO) con activina A en un periodo de tiempo específico antes del inicio de la mineralización. Se midió el contenido de calcio en el día 12. (C) Se cultivaron cultivos de osteoblastos (SV-HFO) durante 12 días en presencia o ausencia de activina A. En el día 12, los cultivos se fijaron y se destruyeron mediante congelación y, posteriormente, se cultivaron en un medio de cultivo normal. En el momento de la fijación y después de 3 y 7 días de fijación, se midió el contenido de calcio. ** $p < 0,01$ en comparación con cultivos no tratados.

La figura 6 muestra la inhibición de la mineralización por la activina A en osteoblastos y células vasculares de músculo liso. Se indujeron dos modelos diferentes de diferenciación de osteoblastos (SV-HFO y NHOst) y células vasculares de músculo liso (VSMC) para mineralizar en ausencia (fila superior) y presencia continua (fila inferior) de activina A (20 ng/ml). La mineralización se visualizó mediante tinción con Rojo S de Alizarina en el día 14 para cultivos de SVHFO y cultivos de NHOst y en el día 30 para VSMC utilizando una observación microscópica a 1 y 40 aumentos. La inducción de la mineralización en ausencia de activina A dio lugar a una tinción intensa con Rojo S de Alizarina indicativa de la presencia de calcio en la matriz (fila superior), mientras que la inducción de la mineralización en presencia de activina A no daba lugar prácticamente a ninguna tinción. (fila inferior).

La figura 7 muestra la identificación de genes regulados por la señalización de activina. La figura es un esquema en escala de grises de un esquema original en color. (A) Búsqueda de la selección basada en el fenotipo en base a los datos en microchips de expresión Affymetrix de cultivos de osteoblastos (SV-HFO) tratados con vehículo, activina A (50 ng/ml) y folistatina (500 ng/ml). Se seleccionaron los genes que se regularon por incremento en cultivos tratados con activina A (mineralización baja) y en el mismo instante se regularon por descenso en cultivos tratados con folistatina (mineralización elevada) en comparación con cultivos del vehículo o viceversa tanto en el día 5 como en el día 12. Además, la diferencia en la expresión génica entre los cultivos tratados con activina A y folistatina debe ser, como mínimo, de 2 veces en uno de estos dos días. (B) Agrupación jerárquica de 520 grupos de sondas Affymetrix que cumplen con la búsqueda de selección, representando 397 genes únicos y 62 grupos de sondas no anotadas. Los colores rojo (mitad superior del día 5 F, mitad inferior del día 5 "A", mitad superior del día 12 "F" y mitad inferior del día 12 "A") indican la regulación por incremento y los colores verde (mitad inferior del día 5 F, mitad superior del día 5 "A", mitad inferior del día 12 "F" y mitad superior del día 12 "A") indican la regulación por descenso en comparación con cultivos del vehículo (V). Las intensidades de color indican la magnitud de la regulación.

La figura 8 muestra la expresión de genes localizados en la matriz extracelular que son regulados por la señalización de activina. La figura es un esquema en escala de grises de un esquema original en color. Se proporciona la agrupación jerárquica de genes que cumplían la búsqueda por selección (figura 7) y presentaban un anotación GO en la matriz extracelular (ECM). El símbolo oficial de los genes, el nombre de los genes y los grupos de sondas de Affymetrix se indican juntos con la regulación de los genes en el día 5 y 12. Los colores rojos (dispuestos con un "+") indican la regulación por incremento y los colores verdes (parte superior de las columnas "F" y parte inferior de las columnas "A") indican la regulación por descenso en comparación con los cultivos de control (V).

La figura 9 muestra la expresión de genes localizados en la matriz extracelular que son regulados por la señalización de activina en osteoblastos (SV-HFO) y células vasculares de músculo liso (VSMC). Análisis QPCR de varios genes de la ECM seleccionados mostrados en la figura 8 junto con ALPL como control positivo. La expresión se midió en cultivos de osteoblastos (SV-HFO, día 7) y VSMC (día 12) tratados con activina A y folistatina. La expresión de ARNm en cultivos del vehículo se fijó a 1 y se utilizó como referencia. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ en comparación con el vehículo. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ en comparación con la folistatina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A efectos de disponer de una comprensión más clara y consistente de la memoria y las reivindicaciones, incluyendo el alcance dado a dichos términos, se disponen las siguientes definiciones.

El término "matriz extracelular", abreviada como "ECM", se refiere al material estructural complejo que se es producido por las células en tejidos de mamífero, de manera particular células del tejido conectivo, por ejemplo, células, tales como fibroblastos, osteoblastos, condrocitos, células epiteliales, células de músculo liso, adipositos y células mesenquimales, y cuyo material *in vivo* rodea y hace de soporte de estas células. Habitualmente, la ECM está compuesta de fibras incrustadas en lo que normalmente se hace referencia como "sustancia base". Las fibras están compuestas de proteínas estructurales, de manera general colágeno y/o elastina. En aspectos de la presente invención, las fibras de la matriz son, de manera preferente, colágeno. Los colágenos particularmente adecuados son colágenos que forman fibrillas. El colágeno de tipo I, el colágeno de tipo II, el colágeno de tipo III, el colágeno de tipo IV o el colágeno de tipo X son particularmente preferentes. El colágeno de tipo I es el más preferente. La "sustancia base" está compuesta de proteoglicanos (o mucopolisacáridos) y puede comprender proteínas que aportan funcionalidad, tales como fibrilina, fibronectina y/o laminina. En aspectos de la presente invención, la ECM comprende de manera adecuada, como mínimo, un proteoglicano como componente de la sustancia base. El proteoglicano está compuesto de una proteína central con moléculas de glicosaminoglicano (GAG) colgando. Las GAG adecuadas son, por ejemplo, ácido hialurónico, condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, sulfato de dermatán, sulfato de heparano, sulfato de heparina y sulfato de queratán. Las GAG están unidas, de manera preferente, a la proteína central a través de un enlazador trisacárido (por ejemplo, un enlazador GalGalXyl). Los proteoglicanos de ejemplo son decorina, biglicano, versicano y agregano. De manera opcional, los proteoglicanos pueden estar interconectados por moléculas de ácido hialurónico. De manera alternativa, se pueden unir múltiples proteoglicanos a un único esqueleto de ácido hialurónico. En ambos casos, la sustancia base forma una red de polímeros o gel capaz de contener agua. La red puede comprender además proteínas, tales como glicoproteínas, tales como: laminina, entactina, tenascina, fibrilina o fibronectina, para mejorar la integridad estructural de la red y para la unión de células a la ECM; la osteocalcina (proteína Gla), como proteína que se une al calcio durante la mineralización; la osteonectina, que sirve como función puente entre el colágeno y el componente mineral; y las sialoproteínas, tales como la sialoproteína ósea (BSP), la osteopontina (OPN), la proteína de la matriz dentinaria 1 (DMP1), sialofosfoproteína de dentina (DSPP) y fosfoglicoproteína de la matriz extracelular (MEPE). La matriz puede comprender además citoquinas y factores de crecimiento. Entre las citoquinas y factores de crecimiento adecuados se incluyen la osteoprotegerina (OPG), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), los factores de crecimiento de fibroblastos (bFGF, FGF-1 y FGF-2), interferón- α (IFN- α), interleuquinas (IL-1, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-11), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los factores de crecimiento transformantes (TGF- α y TGF- β), los factores de necrosis tumoral (TNF), factores de crecimiento de tipo insulina (IGF-I e IGF-II), el factor de diferenciación de osteoclastos (ODF, también conocido como OPGL (ligando de osteoprotegerina), RANKL (activador del receptor del ligando de NFB), TRANCE (citoquina inducida por la activación relacionada con los TNF)) y factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). La mayoría de éstos (IL-1, IL-4, IL-6, IL-11, TNF, EGF, bFGF, FGF-2, PDGF y M-CSF) estimulan la resorción ósea. Algunos (IGF-I e IGF-II, FGF-2 y TGF-3) aumentan la formación ósea, mientras que otros (OPG) inhiben la resorción ósea. Otros (PDGF y TGF- β) también estimulan la proliferación y diferenciación de células sintetizadoras de colágeno. Una citoquina preferente es OPG. Entre los factores de crecimiento preferentes se incluyen BMP, IGF, PTH y PDGF. Cuando se utiliza en los aspectos de la presente invención, el término "matriz extracelular" se refiere tanto al material *in vivo*, como al material en forma aislada, separada de las células que lo producen. La ECM, en los aspectos de la presente invención, puede ser un material natural o artificial (por ejemplo, un hidrogel proteico o peptídico).

El término "activina", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a moléculas que comprenden homodímeros de subunidades β de inhibina unidos por un enlace disulfuro. Existen varias isoformas de la subunidad β , que incluyen las más comunes inhibina β A e inhibina β B, que crean tres isoformas de activina, activina A (β A β A), activina B (β B β B) y activina AB (β A β B). Las activinas necesitan receptores de activina de tipo I y de tipo II para su transducción de señal. Las activinas se unen al receptor de activina de tipo II (ACVR2A/2B), lo que conduce al reclutamiento y la fosforilación del receptor de activina de tipo I (ACVR1B también conocido como ALK4). El receptor de tipo I fosforilado, a su vez, fosforila las proteínas de señalización intracelulares conocidas como Smads. Las Smad1/5/8 son fosforiladas por los ligandos del tipo BMP, mientras que las Smad2/3 son fosforiladas por activinas y TGF β . El término "activina A", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la isoforma β A β A de activina. La activina A, tal como se utiliza para los fines terapéuticos en los aspectos de la presente invención, es, de manera preferente, activina A humana, tal como activina A humana recombinante.

El término "receptor de activina, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier receptor que después de la unión a su ligando da lugar a la señalización de activina, tal como se define en el presente documento. El receptor puede ser, y de manera preferente es, el receptor de activina de tipo II y el ligando puede ser activina, de manera preferente activina A. Sin embargo, cualquier célula determinada puede comprender otros receptores que desencadenan la señalización de activina después de la unión al ligando. Se puede analizar si un receptor es un receptor de activina, tal como se define en el presente documento, de la siguiente manera. Si después de la activación del receptor, tienen lugar cambios en la expresión de las proteínas de la matriz extracelular

que son análogos (idénticos de manera sustancial) a los observados cuando la activina A se une al receptor de activina del tipo II, tal como se indica en las tablas 1 y 2, entonces el receptor se define en el presente documento como un receptor de activina.

El término "inhibidor de activina" pretende incluir cualquier compuesto, y de manera especial cualquier proteína (o péptido), que sea capaz de inhibir de manera selectiva la actividad de activina para modificar cualquiera de las funciones de la activina, que incluyen la supresión de la capacidad de la activina de unirse al receptor de activina, en particular receptores de señalización de activina en la superficie celular de la célula que produce ECM. Cuando se administra a un paciente con necesidad de tratamiento, los compuestos inhibidores de activina de la presente invención están, de manera sustancial, libres de contaminantes naturales que se asocian con dicho compuesto, ya sea en un huésped (procariota o eucariota) *in vivo*, o *in vitro* (como resultado de una síntesis química). Entre dichos compuestos se incluyen, aunque sin constituir limitación, compuestos de unión a activina extracelulares y compuestos intracelulares que regulan la señalización de activina intracelular. Entre los compuestos inhibidores de activina en el alcance de los métodos de la presente invención también se incluyen, aunque sin constituir limitación, a) compuestos inhibidores de activina que secuestran, de manera predominante, monómeros de activina, es decir, se unen a monómeros en un complejo que es resistente a la dimerización; b) compuestos inhibidores de activina que secuestran dímeros de activina y evitan que la activina interaccione con sus receptores de señalización (por ejemplo, folistatina o derivados biológicamente activos de la misma); o c) evita la señalización de activina mediante la interferencia con la cascada de señalización de activina en la célula productora de la ECM. La folistatina es una proteína soluble que funciona como proteína de unión a activina que evita que la activina interaccione con su receptor de señalización.

Los anticuerpos contra activina A se pueden utilizar en realizaciones de la presente invención como inhibidores de ligando. Si se desea, dichos compuestos se pueden administrar al paciente en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

El término "señalización de activina", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la activación mediada por receptor de procesos celulares causados por la unión del ligando a un receptor de activina, cuya activación se puede acoplar de manera directa o indirecta a la respuesta de la célula al ligando. El acoplamiento indirecto se refiere a la necesidad del receptor activado para interactuar con otras proteínas en el interior de la célula antes de que se produzca el efecto fisiológico final del ligando en el comportamiento de la célula. A menudo, el comportamiento de una cadena de varias proteínas celulares que interactúan se altera después de la activación del receptor. El grupo completo de cambios celulares inducidos por la activación del receptor se refiere a menudo como un mecanismo de transducción de señales y normalmente culmina en cambios específicos a nivel de transcripción y expresión de genes. Por lo tanto, la señalización de activina, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al mecanismo de transducción de señales que se puede definir mejor mediante los cambios específicos en la expresión de las proteínas de la matriz celular indicadas en las tablas 1 y 2 siguientes. De este modo, a efectos de determinar si una sustancia es un agonista o análogo funcional para la activina A, se puede evaluar la capacidad de la sustancia para interactuar con el receptor de activina y los cambios resultantes en la expresión de las proteínas de la matriz celular indicados en las tablas 1 y 2 siguientes. Si la sustancia interactúa con el receptor de activina y causa, de este modo, cambios en la expresión de las proteínas de la matriz extracelular indicados en las tablas 1 y 2 análogos (idénticos de manera sustancial) a los efectuados por la activina A, de manera preferente cuando la unión de la misma tiene lugar al receptor de activina II, entonces la sustancia es un agonista o un análogo funcional.

El término "mineralización", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al proceso general de deposición de fosfato de calcio en una matriz extracelular. El término es equivalente al término "calcificación". Este último término también se utiliza en el presente documento en relación con las deposiciones patológicas de fosfato de calcio en las matrices extracelulares, tales como en condiciones patológicas.

El término "osificación" se utiliza para referirse al proceso fisiológico normal de formación ósea, en particular asociado con osteoblastos.

El término "fosfato de calcio", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere, en particular, a fosfatos de calcio que se obtienen mediante la precipitación de una solución acuosa a baja temperatura. Los fosfatos de calcio altamente preferentes son los ortofosfatos de calcio, los cuales representan una familia de compuestos que contienen un catión calcio, Ca^{2+} , y un anión fosfato, PO_4^{3-} . Existen múltiples ortofosfatos de calcio, incluyendo ortofosfato de monocalcio (monobásico), ortofosfato de dicalcio (dibásico), ortofosfato de tricalcio (tribásico) e hidroxiapatita (trifosfato de pentacalcio), todos ellos depositados en la ECM durante su mineralización.

Una "cantidad eficaz" de un ligando, inhibidor de ligando, agonista, antagonista o análogo funcional es aquella que es suficiente para conseguir el efecto de controlar la mineralización de la ECM en la localización deseada y con la magnitud deseada *in vivo* o *in vitro*.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar, mejorar, o prevenir una enfermedad o patología deseada, o para

exhibir un efecto terapéutico o profiláctico detectable. La cantidad eficaz precisa necesaria para un paciente dependerá de la complejidad y la salud del paciente, la naturaleza y el grado de la patología, y los agentes terapéuticos o combinación de agentes terapéuticos seleccionados para la administración. De este modo, no es útil especificar por adelantado una cantidad terapéuticamente eficaz. Sin embargo, la cantidad terapéuticamente eficaz para una situación determinada se puede determinar mediante experimentación rutinaria.

Un "agonista" de un receptor significa un compuesto que se une al receptor y para el que dicha unión presenta un resultado funcional similar a la unión del ligando endógeno natural al receptor. Es decir, el compuesto debe producir, después de la interacción con el receptor, los mismos efectos transmembrana y/o intracelulares o similares de manera sustancial que el ligando endógeno. De este modo, un agonista de un receptor de activina se une al receptor y dicha unión presenta el mismo resultado funcional o similar que la unión del ligando (por ejemplo, la inhibición de la mineralización). La actividad o potencia de un agonista puede ser inferior a la del ligando natural, en cuyo caso se dice que el agonista es un "agonista parcial", o puede ser igual o superior a la del ligando natural, en cuyo caso se habla de un "agonista completo". De este modo, por ejemplo, se pueden utilizar como un equivalente del ligando un péptido pequeño u otra molécula que pueden mimetizar la actividad de un ligando en la unión al receptor del ligando y la activación del mismo. De manera preferente, el agonista es un agonista completo, pero también se pueden utilizar de manera ventajosa los agonistas parciales de receptores. Los métodos de identificación de dichos agonistas son fácilmente previsibles por un experto en la materia e incluyen ensayos para compuestos que inducen respuestas mediadas por la señalización de activina (por ejemplo, inhibición de la maduración de la matriz, y similares). A dicho agente también se puede hacer referencia como ligando "imitador", "mimético" o "análogo".

El término "análogos" se refiere a elementos estrechamente relacionados de un quimiotipo, una familia de moléculas que demuestran una estructura o andamio central único, en los que los elementos muestran modificaciones químicas menores entre sí. Un "análogo", tal como se hace referencia en el presente documento, se refiere a un compuesto que muestra modificaciones químicas menores, tales como la sustitución química de ciertos grupos químicos, en relación a un compuesto indicado, es decir, un derivado químico. El análogo muestra, de manera esencial, actividad biológica comparable a la del compuesto indicado, es decir, la inhibición o estimulación de la señalización de activina A, pero puede proporcionar ventajas sobre el compuesto indicado, tal como una semivida más larga, resistencia a la degradación, afinidad de unión a la diana mejorada, mayor potencia, menos toxicidad o mayor tolerabilidad.

Un "análogo funcional" de una activina A es un derivado químico, el cual posee una actividad biológica que es similar de manera sustancial a la actividad biológica de activina A. Por "similar de manera sustancial" se entiende una actividad que es diferente de manera cuantitativa, pero igual de manera cualitativa. El término "análogo funcional" pretende incluir los "fragmentos", "análogos", "derivados" o "derivados químicos" de una molécula. Los fragmentos de activina A se refieren en el presente documento a fragmentos biológicamente activos de activina A que mantienen la capacidad de iniciar la señalización de activina. Un "análogo" de activina A pretende referirse a un compuesto similar de manera sustancial en la función a una activina A natural o a un fragmento de la misma. Por ejemplo, un análogo de activina A es una proteína que no presenta la misma secuencia de aminoácidos que la activina A, pero que es suficientemente homóloga a activina A para mantener la actividad biológica de la activina A. Por ejemplo, un derivado funcional de activina A contendría el mismo esqueleto de aminoácidos que la activina A, pero también contendría otras modificaciones, tales como modificaciones después de la traducción, tales como, por ejemplo, fosfolípidos unidos o carbohidrato unido de forma covalente, dependiendo de la necesidad de dichas modificaciones para la acción del tratamiento terapéutico. Tal como se utiliza en el presente documento, el término también pretende incluir un derivado químico de activina A. Dichos derivados pueden mejorar la solubilidad del compuesto, la absorción, la semivida biológica, etc. Los derivados también pueden disminuir la toxicidad de la molécula, o eliminar o atenuar cualquier efecto secundario no deseable de la molécula, etc. Los derivados y de manera específica, los grupos químicos capaces de mediar dichos efectos, se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences ("Ciencia Farmacéutica de Remington") (1980). Los procedimientos para acoplar dichos grupos a una molécula son conocidos en la técnica.

El término "análogo funcional" cubre además compuestos que no están químicamente relacionados, pero que, por ejemplo, bloquean un inhibidor del compuesto primario. Por ejemplo, la folistatina como inhibidor de la activina A se puede inhibir por una proteína de unión a folistatina, actuando así como señuelo para la folistatina a efectos de neutralizar la folistatina y finalmente permitir la activación de la señalización de activina por la activina A.

El término "administración" pretende incluir la introducción de los compuestos terapéuticos a un paciente con necesidad de los mismos mediante cualquier medio apropiado conocido en el sector médico, incluyendo, aunque sin constituir limitación, la administración entérica y parenteral (por ejemplo, intravenosa).

El término "sal farmacéuticamente aceptable" pretende incluir sales de los compuestos terapéuticos utilizados en los aspectos de la presente invención. Dichas sales se pueden formar a partir de ácidos o bases farmacéuticamente aceptables, tales como, por ejemplo, ácidos, tales como sulfúrico, clorhídrico, nítrico, fosfórico, etc., o bases, tales como hidróxidos de metales alcalinos o alcalinotérreos, hidróxidos de amonio, hidróxidos de alquilamonio, etc.

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir disolventes, portadores, diluyentes, y similares,

que se utilizan como aditivos para preparaciones de los compuestos terapéuticos utilizados en los aspectos de la presente invención para proporcionar un portador o adyuvante para la administración de dichos compuestos.

La "célula", en los aspectos de la presente invención, incluye, aunque sin constituir limitación, osteoblastos, células madre mesenquimales, condrocitos, célula de músculo liso (en particular, células vasculares de músculo liso); fibroblastos, células mesenquimales y adipositos.

El término "paciente" pretende incluir todos los animales, de manera preferente un mamífero, de la manera más preferente un humano en que se desea el aumento de la mineralización de la ECM y en el que dicha mineralización es ventajosa para la fisiología del animal, o en el que se desea la prevención de la mineralización de la ECM y en el que dicha mineralización sería perjudicial para la fisiología del animal. En primer lugar, entre dichos animales están los humanos; sin embargo, la presente invención no pretende ser tan limitante, contemplándose en la presente invención el tratamiento de cualquiera y todos los animales que puedan experimentar el efecto ventajoso de la presente invención.

Descripción básica del mecanismo para controlar la mineralización de la matriz extracelular

El factor β de crecimiento transformante (TGF β) y la proteína morfogénica ósea (BMP) son reguladores conocidos de la formación ósea. Tanto el TGF β como la BMP inducen el desarrollo óseo mediante la estimulación de la diferenciación de las células progenitoras de osteoblastos. También se cree que el TGF β inhibe las fases posteriores de la diferenciación y la mineralización de osteoblastos. Las activinas pertenecen a la superfamilia de los TGF β , aunque su papel en la formación ósea es relativamente desconocida y está menos estudiado en comparación con los TGF β . La estructura de las activinas está estrechamente relacionada con los TGF β y actúan de una forma similar a las moléculas de señalización intracelular. Las activinas y sus inhibinas relacionadas se purificaron inicialmente a partir de fluidos gonadales y se caracterizaron en base a su capacidad de modular la secreción de FSH de los gonadotropos pituitarios (véanse las revisiones por Chen y otros, Exp Biol Med, 2006. 231: 534-44; Bilezikjian y otros, Mol Cell Endocrinol, 2004. 225:29-36).

Además del papel clásico de las activinas como moduladores de la secreción de FSH, las activinas realizan funciones reguladoras en otros tipos de células y tejidos, por ejemplo, la glándula adrenal, hígado, neuronas y páncreas.

Varias publicaciones dan a conocer que la activina A aumenta la formación ósea. Por ejemplo, Centrella y otros (Mol Cell Biol, 1991. 11: 250-8) muestran que la activina A actúa de forma similar a TGF- β en el sentido que aumenta la síntesis de colágeno y ADN en los osteoblastos. Ogawa y otros (J Biol Chem, 1992. 267: 14233-7) muestran que la activina en combinación con la proteína morfogenética ósea (BMP-2, BMP-3) aumenta la formación de hueso ectópico en un implante de colágeno/portador cerámico *in vivo*. Gaddy-Kurten y otros (Endocrinology, 2002. 143: 74-83) demuestran que la activina estimula la osteoblastogénesis, cuya estimulación es antagonizada por la inhibina. Sakai y otros (Bone, 1999. 25(2): 191-6) muestran que la activina ayuda en la formación del callo, aumenta la resistencia mecánica del hueso y ayuda en la formación ósea endocondral durante la curación de fracturas óseas. Sakai y otros (Bone, 2000. 27: 91-6) y Sakai y Eto (Mol Cell Endocrinol, 2001. 180: 183-8) demuestran que la administración sistémica de activina en ratas ovariectomizadas de edad aumenta la masa ósea y la resistencia mecánica de las vértebras y sugieren que la activina se puede utilizar en la terapia de fracturas y osteoporosis. Hirotani y otros (Calcif Tissue Int, 2002. 70: 330-8) muestran que la administración tópica de activina A en hueso isoinjertado de ratones estimula la formación ósea periosteal y aumenta la masa ósea. Gaddy-Kurten y otros han dado a conocer en Endocrinology 143(1): 74-83 (2002) que la activina estimula la formación *in vitro* de colonias osteoblásticas totalmente diferenciadas murinas (CFU-OB).

En resumen, muchos informes indican que la activina induce la osteogénesis en cultivos de médula ósea de murino e induce la formación ósea y la curación de fracturas *in vivo* en roedores.

Los presentes inventores han descubierto que la señalización de activina en osteoblastos y VSMC afecta en la maduración de la ECM excretada por estas células, manteniendo de este modo la ECM en un estado inmaduro y evitando de manera eficaz que se mineralice. De este modo, la señalización de activina en un momento temprano en el desarrollo de la ECM es la más eficaz en la prevención de su mineralización.

Como resultado de estos descubrimientos, los presentes inventores han descubierto que la mineralización de una matriz extracelular o la deposición de fosfato de calcio sobre la misma, en particular la matriz extracelular madura de osteoblastos o VSMC, se puede evitar o suprimir por la activina A. En cambio, la mineralización de una matriz extracelular, en particular una ECM madura de osteoblastos o VSMC, se puede inducir o estimular mediante inhibidores de activina A, tales como folistatina.

Ambos descubrimientos permiten ahora la disposición de métodos para controlar la mineralización de la ECM en ambas direcciones. La capacidad de controlar la mineralización en ambas direcciones se basa, de este modo, en el descubrimiento de que la maduración de la ECM es esencial para la posterior mineralización y que esta maduración

está controlada por activina A.

Los presentes inventores han descubierto de este modo que la activina A juega un papel importante en la producción y la maduración de la ECM que conduce a la mineralización y que la activina A ejerce un efecto inhibitor en la mineralización a través de la estructuración de la ECM inmadura y, de este modo, del osteoide. En resumen, los presentes inventores han descubierto que:

1) los osteoblastos humanos expresan activina A y su inhibidor natural folistatina para controlar la señalización de activina de una manera dependiente con la diferenciación.

2) la activina inhibe la mineralización en un modelo humano de formación ósea, así como en un modelo para la mineralización vascular, y

3) la activina actúa de este modo mediante el cambio de la expresión de una amplia gama de proteínas de la matriz antes del inicio de la mineralización conduciendo a una composición de matriz con una capacidad mineralizante nula o reducida.

Esto condujo a las conclusiones de que la señalización de activina es un regulador potente de la formación y mineralización de la matriz ósea y, de este modo, un mecanismo interesante en el control y el mantenimiento de la calidad ósea. Utilizando activina A, folistatina o análogos de estos compuestos, la mineralización se puede controlar en dos direcciones. Como consecuencia, los genes diana de la señalización de activina y la activina son dianas terapéuticas importantes para controlar la mineralización de la matriz en el hueso, así como la mineralización en afecciones patológicas.

A continuación, se puede disponer una presentación esquemática del mecanismo de control:

	Activina A*	Inhibidor de activina A	Folistatina*	Inhibidor de folistatina
Mineralización	Inhibida	Estimulada	Estimulada	Inhibida
*o análogos de los mismos				

El mecanismo básico descrito anteriormente ha proporcionado el conocimiento de que la base biológica de este mecanismo de control reside en la interferencia con la interacción normal receptor-ligando y, de este modo, que el proceso de mineralización, ya sea patológico o normal, está, como mínimo, controlado de manera parcial a nivel de la interacción receptor-ligando asociada con el receptor de activina y, de este modo, a nivel de la señalización de activina. Una vez se llevó a cabo, se hallaron pruebas científicas para esta hipótesis en la capacidad de manipular la expresión de genes que codifican proteínas específicas de la matriz extracelular mediante la interferencia en la interacción entre el receptor de activina y el ligando. En particular, se descubrió que la expresión de ciertos genes que codifican una proteína o glicoproteína que es parte de la ECM, aumenta como resultado de una estimulación de la activina, mientras que se aumenta la expresión de otros genes como resultado de la estimulación de folistatina (véase la figura 8).

Dado que se encontró que la activina estaba implicada en la inhibición de la maduración y/o mineralización de la matriz, debe concluirse que los genes que muestran una expresión aumentada después de la estimulación de activina, y que consecuentemente son la respuesta celular iniciada por la activina (es decir, los genes diana de la activina), también están asociados con la inhibición de la maduración y/o mineralización de la matriz.

Los genes que codifican una proteína o glicoproteína que es parte de la ECM que son regulados por incremento (se incrementa la expresión) como resultado de la exposición a activina son los genes para periostina, factor específico de osteoblasto (POSTN); metalopeptidasa 2 de matriz (MMP2); biglicano (BGN); Sparc/osteonectina, cwcw y proteoglicanos de dominios de tipo kazal (testicano) (SPOCK1); fibulina 5 (FBLN5); proteína 2 de unión al factor beta del crecimiento transformante latente (LTBP2); proteoglicano 2 de sulfato de condroitina (versicano) (VCAN); hialuronano y proteína 1 de unión a proteoglicano (HAPLN1); colágeno de tipo VIII alfa 2 (COL8A2); colágeno de tipo XVI alfa 1 (COL16A1); repetición de la triple hélice de colágeno que contiene 1 (CTHRC1); metalopeptidasa ADAM con motivo de trombospondina de tipo 1 (ADAMTS3); colágeno de tipo V alfa 1 (COL5A1); y trombospondina 1 (THBS1). De este modo, la regulación por incremento o aumento de la expresión de estos genes dará lugar a la inhibición o prevención de la maduración y/o mineralización de la matriz. De manera inversa, la regulación por descenso de dichos genes estimula o aumenta la maduración y/o mineralización.

Los genes que codifican una proteína o glicoproteína que es parte de la ECM que son regulados por descenso (se disminuye la expresión) como resultado de la exposición a activina A son los genes para la familia 3 del dominio de lectinas del tipo C, miembro B (CLEC3B); Colágeno de tipo V, alfa 3 (COL5A3); Nidógeno 2 (osteonidógeno) (NID2); inhibidor 4 de metalopeptidasa TIMP (TIMP4); Papilina, glicoproteína sulfatada de tipo proteoglicano (PAPLN); Colágeno, tipo IV, alfa 6 (COL4A6); Distrobrevina, alfa (DTNA); antígeno CD248, endosialina (CD248); Matrilina 2 (MATN2); y agente de interfase 2 de microfibrillas de elastina (EMILIN2). De este modo, la regulación por incremento o aumento de la expresión de estos genes dará lugar a la estimulación o aumento de la maduración y/o mineralización de la matriz. De manera inversa, la regulación por incremento de dichos genes inhibe o previene la maduración y/o mineralización.

5 Dado que se descubrió que la folistatina estaba implicada en la estimulación de la maduración y/o mineralización de la matriz, debe concluirse que los genes que codifican una proteína o glicoproteína que es parte de la ECM que muestran una expresión aumentada después de la estimulación con folistatina también están asociados con la estimulación de la maduración y/o mineralización de la matriz. Los genes que son regulados por incremento (se aumenta la expresión) como resultado de la exposición a folistatina son los genes para antígeno CD248, endosialina; agente de interfase 2 de microfibrillas de elastina; Matrilina 2; Distrobrevina, alfa; Colágeno, tipo IV, alfa 6; Nidógeno 2 (osteonidógeno); Papilina, glicoproteína sulfatada de tipo proteoglicanos; familia 3 del dominio de lectinas del tipo C, miembro B; Colágeno de tipo V, alfa 3; inhibidor 4 de metalopeptidasa TIMP. De este modo, la regulación por incremento o aumento de la expresión de estos genes dará lugar a la estimulación de la maduración y/o mineralización de la matriz. De manera inversa, la regulación por descenso de dichos genes inhibe o previene la maduración y/o mineralización.

Tabla 1

Proteínas de la matriz extracelular reguladas por incremento por activina A (reguladas por descenso por folistatina)						
Símbolo del gen	Descripción del gen	ID Affymatrix	día 5		día 12	
			FST	Act. A	FST	Act. A
POSTN	Periostina, factor específico de osteoblasto	210809_s_at	-1,46	2,26	-0,73	1,56
MMP2	Metalopeptidasa 2 de matriz	201069_at	-0,68	1,92	-0,91	1,28
BGN	Biglicano	201261_x_at; 201262_s_at; 213905_x_at	-0,57	1,68	-0,67	0,97
SPOCK1	Sparc/osteonectina, cwcv y proteoglicanos de dominios de tipo kazal (testicano)	202363_at	-0,31	1,57	-0,36	1,84
FBLN5	Fibulina 5	203088_at	-0,09	1,44	-0,64	2,60
LTBP2	Proteína 2 de unión al factor beta del crecimiento transformante latente	204682_at	-0,64	1,35	-0,65	0,73
VCAN	Proteoglicano 2 de sulfato de condroitina (versicano)	204620_s_at; 204619_s_at; 211571_s_at; 221731_x_at	-0,99	1,26	-0,33	0,77
HAPLN1	Hialuronano y proteína 1 de unión a proteoglicano	205523_at; 205524_s_at	-0,68	1,09	-0,34	0,92
COL8A2	Colágeno de tipo VIII alfa 2	52651_at; 221900_at	-0,58	1,01	-0,20	0,72
COL16A1	Colágeno de tipo XVI alfa 1	204345_at	-0,26	0,91	-0,60	0,71
CTHRC1	Repetición de la triple hélice de colágeno que contiene 1	225681_at	-0,68	0,85	-0,18	0,96
ADAMTS3	Metalopeptidasa ADAM con motivo 3 de trombospondina de tipo 1	214913_at	-0,42	0,62	-0,28	0,33
COL5A1	Colágeno de tipo V alfa 1	203325_s_at; 212488_at; 212489_at	-0,43	0,62	-0,38	0,68
THBS1	Trombospondina 1	201107_s_at	-0,36	0,15	-0,85	0,64

Las proteínas de la matriz extracelular se identificaron en base a los criterios de selección mostrados en la figura 7A. Los genes se clasifican en base al efecto de la activina A en el día 5. Los cambios de 2 veces logarítmicas mostrados son con respecto al tratamiento con vehículo en el mismo día. Los valores con el vehículo no están mostrados. FST = folistatina; Act A = Activina A.

Tabla 2

Proteínas de la matriz extracelular reguladas por descenso por activina A (reguladas por incremento por folistatina)						
Símbolo del gen	Descripción del gen	ID Affymatrix	día 5		día 12	
			FST	Act. A	FST	Act. A
CLEC3B	Familia 3 del dominio de lectinas del tipo C, miembro B	205200_at	1,16	-1,60	1,03	-1,90
COL5A3	Colágeno de tipo V, alfa 3	52255_s_at; 218975_at	0,47	-1,50	0,68	-1,87
NID2	Nidógeno 2 (osteonidógeno)	204114_at	0,09	-1,33	0,90	-0,88
TIMP4	Inhibidor 4 de metalopeptidasa TIMP	206243_at	0,68	-1,31	0,51	-1,26
PAPLN	Papilina, glicoproteína sulfatada de tipo proteoglicano	226435_at	0,05	-1,18	0,51	-0,97
COL4A6	Colágeno, tipo IV, alfa 6	213992_at	0,01	-0,85	0,97	-0,54
DTNA	Distrobrevina, alfa	205741_s_at	0,09	-0,82	0,49	-0,63
CD248	Antígeno CD248, endosialina	219025_at	0,97	-0,71	0,48	-0,93
MATN2	Matrilina 2	202350_s_at	0,03	-0,46	0,50	-0,88
EMILIN2	Agente de interfase 2 de microfibrillas de elastina	224374_s_at	0,59	-0,45	0,43	-0,32

Las proteínas de la matriz extracelular se identificaron en base a los criterios de selección mostrados en la figura 7A. Los genes se clasifican en base al efecto de la activina A en el día 5. Los cambios de 2 veces logarítmicas mostrados son con respecto al tratamiento con vehículo en el mismo día. Los valores con el vehículo no están mostrados. FST = folistatina; Act A = Activina A.

Métodos de control de la mineralización

- 5 En base a lo anterior, se describen en el presente documento un conjunto de métodos para mejorar o prevenir la mineralización, todos ellos basados en el conocimiento de la expresión de genes selectivos como resultado de la activación de un receptor de activina. De este modo, la mineralización se puede controlar en dos direcciones.

A. Inhibición de la mineralización y calcificación de la ECM a través de la interacción con el receptor.

- 10 En una primera dirección de control de la mineralización, se inhibe o previene la mineralización y/o calcificación de una ECM. Según un método de la presente invención, esta inhibición o prevención de la mineralización y/o calcificación se realiza mediante la activación de un receptor de activina.

- 15 De este modo, en un aspecto, la presente invención da a conocer un método para inhibir o prevenir la mineralización de una matriz extracelular, que comprende la etapa de activar un receptor de activina. De este modo, se entenderá que los métodos, tal como se describen en el presente documento, se pueden realizar con métodos y composiciones que comprenden, por ejemplo, ligandos o agonistas de un receptor de activina, de manera preferente un ligando o agonista del receptor de activina de tipo II.

- 20 El término "ligando", tal como se utiliza en el presente documento, a menos que se indique expresamente lo contrario, debe entenderse que se refiere a un ligando de receptor de activina. Se entenderá que el ligando puede ser un ligando endógeno, o un ligando exógeno del receptor capaz de interactuar con el receptor de activina, es decir, se implica en dicha interacción, lo que da lugar a la señalización de activina tal como se define en el presente documento.

- 25 En el caso de que el ligando del receptor de señalización de activina sea el receptor de activina del tipo II, un ejemplo de un ligando adecuado es la activina A.

De manera alternativa, se puede utilizar un agente estimulador de ligando o inductor de ligando en lugar de un ligando. Un "inductor de ligando" es un compuesto que estimula la producción *in vivo*, por ejemplo, la expresión de una concentración terapéuticamente eficaz de un ligando endógeno del receptor en el cuerpo de un mamífero suficiente para conseguir la activación del receptor, que en el caso de la activina A se refiere a una concentración suficiente para mantener o estimular la mineralización de la ECM o para inhibir la mineralización de la ECM, según sea necesario. Se entiende que dichos compuestos incluyen sustancias que, cuando se administran a un mamífero, actúan sobre las células de un tejido o tejidos u órgano u órganos que normalmente son competentes para producir y/o secretar un ligando codificado en el genoma del mamífero, y que provoca que se altere el nivel endógeno del ligando en el cuerpo del mamífero. Los ligandos endógenos o administrados pueden actuar como factores endocrinos, paracrininos o autocrinos. Es decir, los ligandos endógenos pueden ser sintetizados por las células que producen la ECM, por células vecinas o por células de un tejido distante, en cuyas circunstancias el ligando endógeno secretado es transportado al sitio de prevención o estimulación de la mineralización, por ejemplo, mediante el torrente sanguíneo del individuo. En realizaciones preferentes, el agente estimula la expresión y/o secreción de un ligando endógeno para incrementar las cantidades del mismo en el tejido en que debe controlarse la mineralización de la ECM.

En aún otras realizaciones, un agente que actúa como un agonista de un receptor de activina se puede administrar en lugar del propio ligando.

En realizaciones adicionales, se pueden utilizar análogos funcionales del ligando. Un análogo funcional adecuado es, por ejemplo, una proteína de unión a folistatina o un anticuerpo dirigido contra folistatina. Dichos compuestos son inhibidores eficaces de los inhibidores de ligando, que evitan, de este modo, la inactivación del ligando y permiten la activación del receptor.

Los ligandos, inductores, agonistas y análogos funcionales de la presente invención se pueden administrar mediante cualquier ruta de administración que sea compatible con el agente seleccionado y se pueden formular con cualquier portador farmacéuticamente aceptable apropiado para la ruta de administración. Las rutas de administración preferentes son parenteral y, en particular, intravenosa, intraperitoneal e intracapsular. En otras aplicaciones, tales como cuando los implantes quirúrgicos son el objeto de la calcificación, el propio implante se puede impregnar con el ligando, el inductor o el agonista. De manera muy adecuada, el material del implante puede formar o comprender una matriz de liberación lenta, capaz de liberar el compuesto durante un periodo de tiempo en una localización predeterminada. Los tratamientos también se realizan de manera preferente durante un periodo de tiempo prolongado, de manera preferente en base a un paciente externo con dosis diarias para compuestos activos en el intervalo de aproximadamente 0,01-1000 µg/kg de peso corporal, y de manera más preferente aproximadamente 0,1-100 µg/kg de peso corporal.

Se puede utilizar un método para inhibir o prevenir la mineralización de una matriz extracelular en varias aplicaciones terapéuticas y no terapéuticas. Por ejemplo, la aplicación terapéutica de un método para inhibir o prevenir la mineralización de una matriz extracelular se puede encontrar en el tratamiento o la prevención de la calcificación patológica. En la tabla 3 siguiente se indican ejemplos de dichos procesos de calcificación patológica.

Tabla 3: Enfermedades de mineralización patológica

Tejido	Enfermedad	Patrón clínico
Vasos sanguíneos	Aterosclerosis	Calcificación en la formación ósea en/alrededor de células vasculares de músculo liso
Corazón	Calcificación de las válvulas cardíacas	Calcificación en/alrededor de miofibroblastos
Articulaciones	Tendinitis	Calcificación del tendón
	Artritis	Calcificación del cartílago articular
	Bursitis	Calcificación de las paredes bursales
	Espolones óseos	Osteofitos en osteoartritis
Piel	Osificación cutánea	Formación ósea en la piel
Riñón	Piedras en los riñones	Piedras de oxalato de calcio o fosfato de calcio
Músculos	Miositis osificante	Formación ósea en los músculos
Pulmón	Pulmonar metastásica	Calcificación en la septa alveolar
	Osificación pulmonar	Formación ósea en compartimentos alveolares
Ojos	Cataratas	Calcificación del cristalino
Cerebro	Calcinosis estriopalidodentada bilateral	Calcificación simétrica de los ganglios basales
Médula espinal	Osificación heterotópica neurogénica	Formación ósea en la médula espinal
Tumor	Osteosarcoma	Cáncer de hueso que puede producir metástasis en otro punto

De este modo, en una realización preferente de un método para inhibir o prevenir la mineralización de una matriz extracelular, la mineralización es una calcificación patológica. Dichas calcificaciones pueden tener lugar en varios tejidos, ya sea en asociación directa con estos tejidos como resultado de una afección patológica, o asociadas en dichos tejidos con implantes sintéticos, semisintéticos o modificados en tejidos; todas estas calcificaciones se denominan de manera colectiva como patológicas. De manera preferente, dicha calcificación patológica se selecciona del grupo que comprende calcificación aterosclerótica, calcificación pulmonar metastásica, calcificación de las válvulas cardíacas y las calcificaciones asociadas con la tendinitis; artritis; bursitis; espolones óseos; osificación cutánea; piedras en los riñones; miositis osificante; osificación pulmonar; cataratas; calcinosis estriopalidodentada bilateral; osificación heterotópica neurogénica y osteosarcoma.

Además, se dan a conocer varias aplicaciones no terapéuticas de métodos. Por ejemplo, la calcificación de cartílago en aplicaciones de ingeniería de tejidos *in vitro* o *ex vivo*, en particular en cultivo tisular de condrocitos.

B. Estimulación de la mineralización y calcificación de la ECM a través de la interacción con el receptor.

En una segunda dirección del control de la mineralización, se estimula la mineralización y/o la calcificación de una ECM. La estimulación de la mineralización se lleva a cabo evitando la interacción entre un receptor de activina y su ligando endógeno.

Por lo tanto, la presente invención da a conocer un método para estimular la mineralización de una matriz celular, que comprende la etapa de prevenir la interacción entre un receptor de activina y su ligando endógeno. De este modo, se entenderá que la presente invención se puede realizar con métodos y composiciones que comprenden un secuestrante ("scavenger") o inhibidor de un ligando de un receptor de activina, un inductor de dicho inhibidor de ligando o un antagonista de dicho receptor. El experto en la materia entenderá que las realizaciones de este aspecto de la presente invención, que se refieren a la estimulación de la mineralización, son análogas, aunque opuestas, a las descritas anteriormente para la inhibición de la mineralización. De este modo, se entenderá que la presente invención se puede realizar con métodos y composiciones que comprenden un inhibidor de un ligando de un receptor de activina.

El término "inhibidor de un ligando" o su equivalente "inhibidor de ligando", tal como se utiliza en el presente documento, a menos que se indique expresamente lo contrario, debe entenderse que se refiere a un inhibidor del ligando del receptor de activina. Se entenderá que el inhibidor de ligando puede ser un inhibidor endógeno o un inhibidor exógeno.

En los aspectos de la presente invención, el inhibidor de ligando es folistatina.

En otras realizaciones, para bloquear el receptor se puede administrar un agente que actúa como antagonista para el receptor que va a activarse. Un "antagonista" de un receptor significa un compuesto que, cuando se une a un

receptor, bloquea el receptor, pero no lo estimula y evita que tenga lugar la respuesta de señalización o disminuye la intensidad de la respuesta.

Los inhibidores de ligando, inductores de inhibidores de ligando y antagonistas de la presente invención se pueden administrar mediante cualquier ruta de administración que sea compatible con el agente seleccionado y se pueden formular con cualquier portador farmacéuticamente aceptable apropiado para la ruta de administración. Las rutas de administración preferentes son parenteral y, en particular, intravenosa, intraperitoneal e intracapsular. En otras aplicaciones, tales como cuando se requiere la osificación rápida de implantes quirúrgicos, el propio implante se puede impregnar con el inhibidor de ligando, el inductor del inhibidor de ligando o el antagonista. De manera muy adecuada, el material del implante puede formar o comprender una matriz de liberación lenta, capaz de liberar el compuesto durante un periodo de tiempo en una localización predeterminada. Los tratamientos también se realizan de manera preferente durante un periodo de tiempo prolongado, de manera preferente en base a un paciente externo con dosis diarias para compuestos activos en el intervalo de aproximadamente 0,01-1000 µg/kg de peso corporal, y de manera más preferente aproximadamente 0,1-100 µg/kg de peso corporal.

Se puede utilizar un método de la presente invención para estimular la mineralización de una matriz extracelular en varias aplicaciones terapéuticas y no terapéuticas. Por ejemplo, la aplicación terapéutica de un método para estimular la mineralización de una matriz extracelular se puede encontrar en el tratamiento o la prevención de la osteoporosis y en la curación ósea. Entre las aplicaciones no terapéuticas se incluyen la producción sintética de huesos en cultivos celulares y la osificación en la ingeniería de tejidos.

C. Inhibición de la mineralización y calcificación de la ECM a través de la alteración de la expresión génica.

Tal como se indica anteriormente, se han identificado varios genes que están dirigidos por la señalización de activina y que son regulados por incremento como resultado de dicha señalización. Como una elaboración de esto, se describe en el presente documento un método para inhibir o prevenir la maduración y/o mineralización de la matriz mediante el aumento de la expresión, como mínimo, de un gen seleccionado del grupo que comprende la trombospondina 1; colágeno de tipo V alfa 1; colágeno de tipo XVI alfa 1; colágeno de tipo VIII alfa 2; repetición de la triple hélice de colágeno que contiene 1; hialuronano y proteína 1 de unión a proteoglicanos; proteoglicano 2 de sulfato de condroitina (versicano); proteína 2 de unión al factor beta de crecimiento transformante latente; biglicano; metalopeptidasa 2 de matriz; periostina, factor específico de osteoblasto; fibulina 5; SPOCK1, Sparc/osteonectina, cwcv y proteoglicanos de dominios de tipo kazal (testicano); y metalopeptidasa ADAM con motivo de trombospondina de tipo 1.

La regulación por incremento o aumento de la expresión génica se puede realizar, por ejemplo, mediante terapia génica. De manera alternativa, tal como se indica anteriormente, se han identificado varios genes de proteínas de la matriz extracelular, cuya expresión también está afectada por la señalización de activina, pero de una manera opuesta, es decir, cuya expresión está regulada por incremento como resultado de la exposición a fostatina. Como una elaboración de esto, la presente invención da a conocer un método para inhibir o prevenir la maduración y/o mineralización de la matriz mediante el bloqueo de la expresión, como mínimo, de un gen seleccionado del grupo que comprende los genes para antígeno CD248, endosialina; agente de interfase 2 de microfibrillas de elastina; matrilina 2; distrobrevina, alfa; colágeno, tipo IV, alfa 6; nidógeno 2 (osteonidógeno); papilina, glicoproteína sulfatada de tipo proteoglicano; familia 3 de dominio de lectinas de tipo C, miembro B; colágeno tipo V, alfa 3; e inhibidor 4 de metalopeptidasa TIMP.

El bloqueo de la expresión génica se puede realizar, por ejemplo, mediante métodos, tales como ARNi, que son conocidos por los expertos en la materia.

D. Estimulación de la mineralización y calcificación de la ECM a través de la alteración de la expresión génica

De forma contraria a los métodos descritos anteriormente para la inhibición de la mineralización de la ECM, en el presente documento se describe un método para estimular la maduración y/o mineralización de la matriz mediante

i) el bloqueo de la expresión, como mínimo, de un gen seleccionado del grupo que comprende la trombospondina 1; colágeno de tipo V alfa 1; colágeno de tipo XVI alfa 1; colágeno de tipo VIII alfa 2; repetición de la triple hélice de colágeno que contiene 1; hialuronano y proteína 1 de unión a proteoglicanos; proteoglicano 2 de sulfato de condroitina (versicano); proteína 2 de unión al factor beta de crecimiento transformante latente; biglicano; metalopeptidasa 2 de matriz; periostina, factor específico de osteoblasto; fibulina 5; SPOCK1, Sparc/osteonectina, cwcv y proteoglicanos de dominios de tipo kazal (testicano); y metalopeptidasa ADAM con motivo de trombospondina de tipo 1; o

ii) aumento de la expresión, como mínimo, de un gen seleccionado del grupo que comprende los genes para antígeno CD248, endosialina; agente de interfase 2 de microfibrillas de elastina; matrilina 2; distrobrevina, alfa; colágeno, tipo IV, alfa 6; nidógeno 2 (osteonidógeno); papilina, glicoproteína sulfatada de tipo proteoglicano; familia 3 de dominio de lectinas de tipo C, miembro B; colágeno tipo V, alfa 3; e inhibidor 4 de metalopeptidasa TIMP.

Descripción de realizaciones particularmente preferentes

Un método para seleccionar un agente terapéutico candidato para controlar la mineralización de una matriz extracelular en un tejido de un paciente comprende la etapa de exponer una célula de dicho tejido que produce una matriz extracelular a un compuesto de prueba bajo condiciones que ayudan a la formación de la matriz extracelular y la maduración de la matriz.

El término "condiciones que ayudan en la formación de la matriz extracelular y la maduración de la matriz" se refiere a condiciones de cultivo para células cultivadas en las que las células se proveen con los nutrientes, factores de crecimiento y otros complementos necesarios para la formación de la ECM alrededor de las células y para conseguir de manera potencial una composición que se puede mineralizar (por ejemplo, por osteoblastos vivos), cuya composición se refiere como "madura". En particular, el término "condiciones que ayudan en la formación de la matriz extracelular y la maduración de la matriz" se refiere a dichas condiciones durante un periodo que va desde el inicio de la formación de la matriz extracelular hasta el inicio de la mineralización de la matriz extracelular, de manera preferente sin incluir la mineralización y, por lo tanto, de manera preferente sin incluir las condiciones de mineralización. En general, el periodo de cultivo para células SVHFO y NHOst entre el inicio de la formación de una matriz extracelular y el inicio de la mineralización está entre el día 5 y el día 12, pero puede cambiar entre diferentes tipos de célula. De este modo, el término "condiciones que ayudan en la formación de la matriz extracelular y la maduración de la matriz" se refiere, en particular, a condiciones durante el periodo previo a la mineralización.

El término "condiciones mineralizantes" se refiere a las condiciones de cultivo para células cultivadas en las que las células se proveen con los nutrientes, factores de crecimiento y otros complementos necesarios para la mineralización de la ECM. En particular, dichas condiciones requieren la presencia de una fuente mineralizable de calcio y a menudo beta-glicerofosfato.

El cultivo de una célula productora de matriz extracelular bajo condiciones que producen una matriz mineralizada (es decir, la "condición mineralizante") es conocido en la técnica y puede diferir entre tipos de células.

Las células productoras de matriz extracelular, de manera preferente osteoblastos humanos, células madre mesenquimales humanas o células vasculares de músculo liso humanas se pueden cultivar en un medio de cultivo celular general, tal como Medio Esencial Alfa (α MEM) o Modificación de Dulbecco de Medio de Eagle (DMEM), de manera preferente complementada con suero (de manera preferente Suero de Ternera Bovina). En esencia, dichos medios son capaces de ayudar en la formación y mineralización de la matriz extracelular. A efectos de proporcionar condiciones mineralizantes, se debe disponer de una fuente adecuada de fosfato de calcio. De manera muy adecuada, a efectos de proporcionar condiciones mineralizantes, se cultivan cultivos celulares sin subcultivar durante un periodo de hasta 30 días en presencia de hormonas esteroides (en particular glucocorticoides, de manera preferente dexametasona o cortisol), de manera opcional en presencia de ácido ascórbico, y con una fuente adecuadas de calcio, tal como cloruro de calcio y una fuente adecuada de fosfato, tal como β -glicerofosfato (ambos requeridos para la deposición en forma de un fosfato de calcio). El cultivo puede tener lugar bajo condiciones normales de cultivo celular (a 37°C y CO₂ al 5% en una atmósfera humidificada).

Las condiciones que ayudan en la formación de la matriz extracelular y la maduración de la matriz pueden estar provistas por células con las mismas condiciones de cultivo que para las condiciones mineralizantes con la excepción de que se omiten los glucocorticoides y/o las fuentes de calcio y/o fosfato, se requieren pequeñas cantidades de calcio y fósforo para la función normal de las células, aunque de manera opcional se pueden omitir las cantidades requeridas para la mineralización. Por ejemplo, unas condiciones muy adecuadas pueden estar provistas mediante el cultivo en un medio de cultivo celular apropiado, tal como α MEM o DMEM, complementado con suero tal como se describe anteriormente, de manera preferente sin subcultivar durante un periodo de hasta 30 días bajo condiciones normales de cultivo celular.

A efectos de exponer las células al compuesto de prueba bajo condiciones que ayudan en la formación de la matriz extracelular y la maduración de la matriz, el compuesto se añade de manera adecuada al medio de cultivo. La concentración del compuesto de prueba en que se dispone a la célula durante la exposición de paciente no es particularmente limitante. De manera muy adecuada, la concentración del compuesto de prueba es de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 ng/ml.

Como compuestos de prueba se pueden elegir moléculas químicas pequeñas, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, carbohidratos, lípidos y combinaciones de los mismos.

Un método para seleccionar un agente terapéutico candidato para controlar la mineralización de una matriz extracelular en un tejido de un paciente (que puede incluir un tejido natural o un tejido artificial tal como se utiliza en la ingeniería de tejidos) comprende además la etapa de determinar la expresión en dicha célula de, como mínimo, un gen en respuesta a dicha exposición. Esta determinación se realiza, de manera preferente, durante el periodo de premineralización, que es, en general, entre 5 y 12 días después de proporcionar a las células las condiciones que ayudan en la formación de la matriz extracelular y la maduración de la matriz. La determinación del nivel de expresión de un gen en una célula es práctica rutinaria para el experto en la materia. El nivel de expresión se puede

determinar mediante análisis de microchips ("micro-array") tal como se describe en los siguientes ejemplos. En general, la obtención del perfil de expresión con microchips es una práctica rutinaria e implica la medición de ADNc preparado a partir de ARNm aislado de células de interés en chips de ADN. De manera alternativa, el nivel se puede determinar mediante la medición del nivel de ARNm individuales por RT-PCR cuantitativa (qPCR) o métodos equivalentes. En una realización alternativa adicional, el nivel de expresión se puede medir a nivel de proteína. Dichos métodos se pueden realizar, por ejemplo, mediante la utilización de métodos con espectrómetros de masas para el análisis del proteoma o métodos basados en anticuerpos.

En un método, tal como se describe en el presente documento, necesita determinarse el nivel de expresión de sólo un número muy limitado de genes a efectos de evaluar el potencial de un compuesto de prueba particular para afectar el proceso de mineralización. En principio, la detección de un gen del grupo A y/o B, tal como se describe en el presente documento, es suficiente. De manera preferente, sin embargo, se determina el nivel de expresión de más de un gen. El número preferente de genes de los que se determina el nivel de expresión es de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 o incluso más genes. De la manera más preferente, se determina el nivel de expresión de 20, 21, 22 ó 23 genes.

Los genes de los que se determinan los niveles de expresión se seleccionan de los genes que codifican la trombospondina 1; colágeno de tipo V alfa 1; colágeno de tipo XVI alfa 1; colágeno de tipo VIII alfa 2; repetición de la triple hélice de colágeno que contiene 1; hialuronano y proteína 1 de unión a proteoglicanos; proteoglicano 2 de sulfato de condroitina (versicano); proteína 2 de unión al factor beta de crecimiento transformante latente; biglicano; metalopeptidasa 2 de matriz; periostina, factor específico de osteoblasto; fibulina 5; SPOCK1, Sparc/osteonectina, cwcv y proteoglicanos de dominios de tipo kazal (testicano); y metalopeptidasa ADAM con motivo de trombospondina de tipo 1 (juntos referidos en lo sucesivo como grupo A), y antígeno CD248, endosialina; agente de interfase 2 de microfibrillas de elastina; matrilina 2; distrobrevina, alfa; colágeno, tipo IV, alfa 6; nidógeno 2 (osteonidógeno); papilina, glicoproteína sulfatada de tipo proteoglicano; familia 3 de dominio de lectinas de tipo C, miembro B; colágeno tipo V, alfa 3; e inhibidor 4 de metalopeptidasa TIMP (juntos referidos en lo sucesivo como grupo A).

Un método para seleccionar un agente terapéutico candidato para controlar la mineralización de una matriz extracelular comprende además la etapa de determinar si la expresión de dicho, como mínimo, un gen en dicha célula está regulada como resultado directo de dicha exposición.

El término "regulada", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al hecho de que la expresión de los genes cambia como consecuencia directa o indirecta de la exposición de la célula al compuesto de prueba. El experto en la materia entenderá que es necesaria una medición de referencia a efectos de determinar si el compuesto de prueba induce el cambio en el nivel de expresión del gen de una manera directa o indirecta. El experto en la materia será capaz de idear las condiciones de ensayo correctas con las que se puede obtener una medición de referencia. Como guía, se puede tomar como medición de referencia un ensayo que utiliza el vehículo del compuesto de prueba. El término "vehículo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una sustancia de control adecuada, tal como el portador, disolvente o diluyente del compuesto de prueba (es decir, el blanco).

Cuando se regula la expresión como resultado de la exposición, el compuesto de prueba se identifica de manera positiva como un agente terapéutico candidato para el control de la mineralización de una matriz extracelular en un tejido de un paciente en estudio.

Las moléculas de activina A pueden ser activina A natural purificada y recombinante, y análogos funcionales de las mismas, que se caracterizan por la presencia de dominios únicos de unión a receptor y que poseen la actividad biológica de iniciar la señalización de activina en células que presentan los receptores de activina.

Las moléculas particulares inhibidoras de activina A que son el objeto de aspectos de la presente invención pueden ser proteínas inhibidoras de activina A naturales purificadas y recombinantes, y otras moléculas inhibidoras de activina A proteínicas o no proteínicas, y fragmentos biológicamente activos de las mismas, que se caracterizan por la presencia de un dominio único de unión a activina que posee la actividad biológica de ser capaz de secuestrar la activina A en una forma monomérica o dimérica o de provocar la desunión del homodímero o de cubrir los sitios de unión a receptor en la activina A libre o de bloquear la unión de activina A mediante la unión al receptor de señalización de activina. Los dominios individuales de unión a activina que poseen esta actividad biológica también se pueden producir mediante métodos sintéticos, enzimáticos, proteolíticos, químicos o de ADN recombinante.

En realizaciones de aspectos de la presente invención, se utilizan folistatina o fragmentos de la misma de unión a activina, y, por ejemplo, se proporcionan al paciente con necesidad de tratamiento según un método terapéutico de la presente invención.

En una realización, se administran niveles eficaces de compuestos inhibidores de activina para proporcionar las ventajas terapéuticas de mejorar la capacidad de la ECM de mineralizarse.

En los métodos de la presente invención, la perfusión de compuestos inhibidores de activina, es decir folistatina, o

fragmentos de la misma inhibidores de activina da lugar inicialmente a a) la unión a monómeros de activina para evitar su dimerización en activina A y/o b) la desunión de dímeros de activina A para dar lugar a la formación de monómeros de activina A inactivos y/o c) la depuración mejorada de dichos dímeros de activina A complejados a compuestos que inhiben la activina del medio de circulación o del tejido extracelular y/o d) la unión a dímeros de activina A para bloquear la función biológica de la activina A. Como resultado de esta inhibición de activina A, se evitará la señalización de activina en las células del tejido diana, lo cual conduce a una mineralización aumentada de la ECM que rodea las células diana.

En métodos tal como se describen en el presente documento, la perfusión de activina A o análogos funcionales de la misma da lugar a la señalización de activina en las células del tejido diana, evitando así que se desarrolle la ECM que rodea estas células hasta una etapa de maduración y manteniendo de manera eficaz la ECM en una etapa previa a la madurez, lo cual evita su mineralización.

De este modo, dependiendo de la terapia requerida, un compuesto terapéutico en los aspectos de la presente invención puede ser un inhibidor de activina A o activina A. Los compuestos terapéuticos se pueden conjugar, ya sea químicamente o mediante ingeniería genética, a fragmentos de otros agentes que permiten dirigir dichos compuestos a un sitio de acción deseado.

Las cantidades y regímenes de administración de compuestos terapéuticos se pueden determinar fácilmente por los expertos en el sector clínico del tratamiento de trastornos relacionados con la mineralización, defectos en la formación ósea y/o aterosclerosis. En general, la dosis del tratamiento variará dependiendo de diversas consideraciones, tales como: el tipo de compuesto utilizado; la edad; la salud; las patologías en tratamiento; el tipo de tratamiento concurrente, si lo hay, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado; grado de daño en el tejido; género; duración de los síntomas; y, contraindicaciones, si las hay, y otras variables a ajustar por el médico particular. La dosis se puede administrar en una o más aplicaciones para obtener los resultados deseados.

La dosis administrada se debe elegir, de manera preferente, de manera que las concentraciones locales se encuentran ente 2 y 100 ng/ml para la activina A y entre aproximadamente 50 y 500 ng/ml para folistatina. La administración, naturalmente, es dependiente del tipo de compuesto y de la eficacia del compuesto. Los compuestos que están dirigidos requerirán también, en general, la administración en formas de dosificación inferiores.

La dosis de folistatina como inhibidor de activina A puede ser, de manera adecuada, de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 ng/ml.

Los compuestos terapéuticos utilizados en los aspectos de la presente invención se pueden administrar en cualquier portador farmacológico apropiado para la administración. Se pueden administrar en cualquier forma eficaz en condiciones profilácticas, paliativas, preventivas o curativas de los defectos de mineralización en humanos y animales.

Los preparados de los compuestos terapéuticos para la administración parenteral incluyen disolventes estériles acuosos o no acuosos, suspensiones y emulsiones. Entre los ejemplos de disolventes no acuosos se encuentran el propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal, aceite de pescado y ésteres orgánicos inyectables. Entre los portadores acuosos se incluyen agua, soluciones de agua y alcohol, emulsiones o suspensiones; incluyendo solución salina y vehículos parenterales médicos tamponados que incluyen solución de cloruro de sodio, solución de dextrosa de Ringer, solución de dextrosa más cloruro de sodio, solución de Ringer que contiene lactosa o aceites fijos. Entre los vehículos intravenosos se incluyen reforzadores de fluidos y nutrientes, reforzadores de electrolitos, tales como aquellos basados en la dextrosa de Ringer, y similares.

Los compuestos terapéuticos también se pueden administrar mediante bombas o en forma de liberación prolongada, de manera especial, cuando el defecto de mineralización se prolonga o se retrasa en lugar de ser agudo. Un ejemplo en el que el defecto de mineralización a menudo se prolonga o retrasa en lugar de ser agudo es un defecto resultante de osteoporosis, o un defecto resultante de la aterosclerosis, en el que la calcificación de la placa esclerótica está ausente o es incompleta. Los compuestos terapéuticos también se pueden liberar a órganos específicos en una concentración elevada mediante catéteres insertados de manera adecuada o mediante la disposición de dichas moléculas como parte de una molécula química (o complejo) que se diseña para reconocer órganos específicos.

La administración en una forma de liberación prolongada es más conveniente para el paciente cuando se indican inyecciones repetidas para periodos prolongados de tiempo. Por ejemplo, es deseable administrar los compuestos terapéuticos en una forma de liberación prolongada cuando los métodos de la presente invención se utilizan para tratar una enfermedad genética o crónica basada en un trastorno relacionado con la mineralización para maximizar la comodidad del paciente.

Los compuestos terapéuticos se pueden utilizar en formas de dosificación, tales como comprimidos, cápsulas, sobres de polvos, soluciones líquidas para inyección parenteral en el cuerpo, o soluciones líquidas para administración entérica (oral) si la actividad biológica del compuesto terapéutico no es destruida por el proceso

digestivo y si las características del compuesto permiten que sea absorbido a través del tejido intestinal.

Las composiciones farmacéuticas para utilizar en los aspectos de la presente invención se pueden obtener mediante la mezcla del medicamento con un portador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas para utilizar en los aspectos de la presente invención se fabrican de una manera que en sí es conocida, por ejemplo, mediante procesos convencionales de mezclado, granulado, fabricación de grageas, disolución, liofilización o procesos similares. Las composiciones son útiles en el control de trastornos relacionados con la mineralización, ya sean crónicos o agudos. Las composiciones dirigen los propios mecanismos del cuerpo asociados con la mineralización de materiales de la matriz extracelular. En versiones de alta potencia, las composiciones utilizadas en los aspectos de la presente invención presentan un inicio de acción suficientemente rápido para ser útil en el tratamiento agudo de la mineralización de la ECM.

De manera adicional, una versión de baja potencia es útil en el tratamiento de trastornos leves o crónicos relacionados con la mineralización.

La activina A y proteínas inhibidoras de activina A u otros compuestos inhibidores de activina A que están libres de manera sustancial de contaminantes naturales se pueden aislar y purificar a partir de sus fuentes naturales o recombinantes según condiciones y técnicas convencionales de la técnica utilizadas previamente para aislar dichas proteínas y/o compuestos, tales como extracción, precipitación, cromatografía, cromatografía de afinidad, electroforesis, o similares.

Un experto en la materia puede identificar el dominio o dominios de unión a activina de un compuesto inhibidor de activina utilizando técnicas conocidas en el sector, sin una gran experimentación, y dichos dominios son preferentes en los métodos de la presente invención. Por ejemplo, los derivados de las proteínas inhibidoras de activina naturales o los derivados de proteínas inhibidoras de activina producidas recombinantemente se pueden producir mediante separación proteolítica de la proteína inhibidora de activina de longitud completa con proteasas habituales, tales como, por ejemplo, tripsina, quimiotripsina y subtilisina. Se puede utilizar la cromatografía de afinidad con resinas derivatizadas con activina para analizar dichos fragmentos por su capacidad de unirse a activina.

Además, los compuestos, tales como la activina A y la folistatina, están altamente conservados entre especies y se pueden aislar fácilmente en grandes cantidades a partir de fuentes no humanas y los fragmentos de estas proteínas se pueden preparar química o enzimáticamente mediante técnicas conocidas en el sector. De este modo, dichos compuestos se pueden administrar a un paciente con necesidad de los métodos terapéuticos de la presente invención sin provocar una respuesta inmunitaria severa.

En una realización, un método, tal como se describe en el presente documento, se puede realizar mediante la exposición de la célula que produce la ECM a una cantidad eficaz de activina A o un análogo funcional de la misma.

En otra realización, se puede realizar un método, tal como se describe en el presente documento, mediante el bloqueo de dicho receptor de activina de tipo II. Un bloqueador del receptor de activina de tipo II adecuado es Cripto (tal como se describe en Harrison y otros, Trends in endocrinology and metabolism ("Tendencias en endocrinología y metabolismo"), 2005, 16: 73-78. De manera alternativa, se pueden disponer de células con una forma truncada o una forma negativa dominante del receptor de activina de tipo II o tipo I, que es conocida por bloquear la señalización de activina.

En aún otra realización, se puede realizar un método de la presente invención mediante la inhibición de activina A, en el que el inhibidor de activina es folistatina. Sin embargo, también se pueden utilizar otros inhibidores. Ejemplos adecuados son anticuerpos de activina A que bloquean de manera eficaz la parte de unión al receptor de la proteína.

En el presente documento se describe un método en el que durante la formación de la matriz extracelular, las células se exponen a activina A o un inhibidor de activina A.

Debe entenderse que la matriz extracelular, producida por las células que producen ECM después del tratamiento según un método de la presente invención, es por sí misma parte de la presente invención. Dicho material de la matriz extracelular puede ser útil en aplicaciones en las que se requiere un material que no se mineraliza cuando se expone a un medio mineralizante. De manera alternativa, dicho material de matriz extracelular puede ser útil en aplicaciones en las que se requiere un material que mineraliza rápidamente cuando se expone a un medio mineralizante. De este modo, la modulación de proteínas específicas de la ECM identificadas por ser reguladas por la señalización de activina también se puede utilizar para controlar la mineralización de la ECM. Tal como se utiliza en el presente documento, un medio mineralizante se entiende normalmente como un medio celular, por ejemplo, un medio que comprende osteoblastos que depositan fosfato de calcio, aunque la presencia de células no es esencial, siempre que se proporcionen factores bioquímicos necesarios para la formación y deposición de fosfato de calcio, tales como osteocalcina, osteonectina, osteoprotegerina, y/o sialoproteína ósea (que pueden actuar como nucleador de la formación de fosfato de calcio) y una fuente de fosfato de calcio, a dicha matriz de tal manera que pueda tener lugar la mineralización.

Una aplicación muy adecuada de un método, tal como se describe en el presente documento, es la disposición de andamios de regeneración de tejidos que mineralizan rápidamente y en los que dicha mineralización puede tener lugar ya sea *in vivo* o *in vitro*. Dichos andamios se preparan de manera adecuada *in vitro* y, a continuación, se implantan en el sitio en el que se requiere la mineralización rápida. De manera alternativa, dichos andamios se preparan de manera adecuada y se mineralizan en el hueso *in vitro* y los andamios mineralizados se implantan a continuación en el sitio en el que se requiere dicho hueso. De este modo, se puede realizar un método, tal como se describe en el presente documento, en relación con la ingeniería de tejidos (TE) a efectos de aumentar la formación ósea en un andamio orgánico o inorgánico. El principio de TE implica el aislamiento y cultivo de células, y el sembrado de las células cultivadas sobre un andamio biológico o artificial *in vitro* antes del trasplante del andamio sembrado en la localización específica del cuerpo. De este modo, el andamio sirve como una matriz de unión y guía a las células durante la formación o regeneración del tejido. La regeneración de las células sembradas en un tejido puede tener lugar antes, durante o después del implante. Como materiales de andamio adecuados, se pueden utilizar materiales tanto orgánicos como inorgánicos, así combinaciones de los mismos.

Por lo tanto, se puede utilizar un método para controlar la mineralización de una ECM en relación con un método para preparar un andamio rápidamente mineralizable. Dicho método puede comprender disponer de un andamio adecuado, sembrar dicho andamio con células productoras de la ECM, tales como osteoblastos o células progenitoras de los mismos, tales como células madre. Las células madre, por ejemplo, se pueden aislar de fuentes autólogas (médula ósea de paciente) y expandir en un cultivo *in vitro*. Las células progenitoras preferentes son células madre mesenquimales (MSC) que pueden derivar de varias fuentes, que incluyen tejido adiposo, médula ósea, músculo cardíaco, etc. Estas células progenitoras pueden ser inducidas por moléculas bioactivas específicas para madurar en un tipo de célula requerido. Las MSC, por ejemplo, pueden ser inducidas por dexametasona para formar osteoblastos. Para la (re)generación ósea, las células madre mesenquimales se pueden inducir en osteoblastos *in vitro*, por ejemplo, mediante la utilización de dexametasona. Por ejemplo, las MSC pueden estar dirigidas por proteínas morfogenéticas óseas (BMP) para multiplicarse y convertirse en células especializadas que producen cartílago (condrocitos) o hueso (osteoblastos). Los osteoblastos se pueden someter a un periodo adicional de cultivo, por ejemplo, durante aproximadamente 1-30 días, de manera preferente durante aproximadamente 1-2 semanas a efectos de expandir adicionalmente dichas células. Los medios de cultivo adecuados son conocidos por los expertos en la materia y pueden comprender, por ejemplo, glicerofosfato y ácido ascórbico. A efectos de inducir la diferenciación osteogénica *in vitro* de MSC humanas, un medio adecuado puede comprender dexametasona (Dex) de 1 a 1000 nM, ácido L-ascórbico-2-fosfato (AsAP) de 0,01 a 4 mM o ácido ascórbico 0,25 mM y beta-glicerofosfato (beta GP) de 1 a 10 mM.

También se puede utilizar un método para controlar la mineralización de una ECM en relación con un método para preparar un andamio no mineralizable o un andamio en el que se reduce ampliamente la mineralización. Dichos andamios, por ejemplo, son de gran interés para servir como un andamio para condrocitos en las aplicaciones de ingeniería de tejido cartilaginoso y regeneración de cartílago.

A continuación, se puede dejar que las células formen una ECM en un cultivo de tejido o después de cargarse sobre un andamio, por ejemplo, mediante la utilización del medio descrito en el ejemplo descrito a continuación tal como se utiliza para osteoblasto SV-HFO u osteoblasto NHOst. La diferenciación osteogénica óptima, determinada mediante morfología osteoblástica, la expresión de fosfatasa alcalina (APasa), expresión de colágeno de tipo I, expresión de osteocalcina y/o mineralización de la ECM u otros marcadores de diferenciación de osteoblastos se pueden conseguir, por ejemplo, utilizando el medio descrito en el ejemplo siguiente tal como se utiliza para osteoblasto SV-HFO u osteoblasto NHOst. En un método, tal como se describe en el presente documento, para producir la ECM mineralizable, los osteoblastos se exponen a un inhibidor de activina A. Previa o posteriormente a dicha exposición al inhibidor de activina A, los osteoblastos se pueden sembrar sobre un andamio para producir la matriz extracelular. De manera alternativa, las células progenitoras se pueden sembrar sobre un andamio y, a continuación, se pueden inducir para formar osteoblastos, los cuales posteriormente se exponen a un inhibidor de activina A.

En aún otra alternativa, los osteoblastos se pueden exponer a un inhibidor de activina A y se deja que produzcan la ECM (de manera preferente madura) y, a continuación, la ECM, ya sea sola, o en combinación con los osteoblastos, se proporciona en el andamio. De este modo, la ECM se puede aislar también de los osteoblastos y se puede utilizar como matriz para una mineralización rápida. En una realización *in vitro* preferente, las células se siembran sobre un andamio y se exponen a un inhibidor de activina A. Además, las células pueden ser inducidas por otras moléculas bioactivas específicas, tales como factores de crecimiento, por transferencia génica *ex vivo* o por otros factores físicos para formar el neot Tejido requerido *in vitro*. De manera alternativa, el andamio puede comprender factores de crecimiento. A continuación, el andamio preparado *in vitro* y cargado se puede implantar en un defecto óseo en el que se inducen las células sembradas para mineralizar la ECM. Naturalmente, los tejidos u órganos también se pueden producir completamente *in vitro* y pueden transplantarse como materiales de sustitución preparados.

Se puede utilizar un método para controlar la mineralización de la ECM en varias aplicaciones de regeneración de tejidos. Por ejemplo, se puede aplicar un método en defectos relacionados con la osteoporosis, traumatismos, ortopedia, cavidades tumorales, Oído Nariz y Garganta, cirugía maxilofacial, cirugía periodontal, fracturas con defectos óseos, pseudoartrosis con o sin defectos óseos, artrodesis vertebral (fusión espinal), osteotomía de la tibia

y/o trasplante de válvulas cardíacas. Otras aplicaciones de TE pueden incluir la reparación, por ejemplo, del hueso. En el mecanismo de curación de fracturas óseas, los condrocitos producen un almacén de cartílago que finalmente es sustituido por hueso formado por los osteoblastos. Los métodos de la presente invención también se pueden aplicar aquí.

El método, tal como se describe en el presente documento, se refiere a la ECM de cualquier célula capaz de producir una ECM, en el que se requiere la mineralización del ECM, de manera especial la ECM de una célula de un paciente con necesidad de una mineralización aumentada de la ECM. Las ECM de ejemplo son aquellas de osteoblastos o condrocitos durante la osteoporosis, curación de fracturas o remodelación ósea. El método de la presente invención se refiere también a la ECM de cualquier célula capaz de producir una ECM, en el que tiene lugar la mineralización de la ECM, aunque no es deseable, de manera especial la ECM de una célula de un paciente con necesidad de la reducción o prevención de la mineralización de la ECM. Las ECM de ejemplo son aquellas de células vasculares de músculo liso durante o previas a la calcificación aterosclerótica. De este modo, en una realización preferente, la mineralización se refiere a la mineralización ósea, mientras que en otra realización preferente, la mineralización se refiere a la calcificación aterosclerótica.

Los métodos se pueden realizar *in vivo* o *in vitro*. Cuando se realizan *in vitro*, el método puede implicar, por ejemplo, el control del proceso de mineralización asociado con cultivos de tejido que comprenden ECM excretada o asociado con ECM aislada en un medio no celular. De manera muy adecuada, se utiliza un método *in vitro* para controlar la mineralización asociada con la ingeniería de tejidos o procesos de regeneración de tejidos, tales como la mineralización en un implante de reparación ósea.

Cuando se realiza *in vivo*, el método puede implicar, por ejemplo, el control del proceso de mineralización asociado con la curación de fracturas óseas o el tratamiento de la osteoporosis. De manera alternativa, cuando se realiza *in vivo*, el método puede implicar, por ejemplo, el control del proceso de mineralización asociado con calcificación aterosclerótica.

En el presente documento se describen métodos *in vivo* o *in vitro* para controlar la mineralización de una matriz extracelular de una célula implicada en procesos de calcificación patológica, que incluyen, aunque sin constituir limitación, la calcificación aterosclerótica, calcificación pulmonar metastásica, calcificación de las válvulas cardíacas y las calcificaciones en las articulaciones asociadas con la tendinitis; artritis; bursitis; espolones óseos; osificación cutánea; piedras en los riñones; miositis osificante; osificación pulmonar; cataratas; calcinosis estriopalidodentada bilateral; osificación heterotópica neurogénica y osteosarcoma; o para controlar la mineralización de una matriz extracelular de una célula implicada en procesos de calcificación fisiológica (por ejemplo, osificación y mineralización ósea), que incluyen, aunque sin constituir limitación, la curación ósea o la formación ósea y trastornos en los mismos, tales como la osteoporosis. Dichos métodos pueden referirse a métodos de tratamiento médico o a métodos de ingeniería médica, tales como la ingeniería de tejidos.

Controlar la mineralización de una matriz extracelular de una célula implicada en una calcificación patológica, que incluye, aunque sin constituir limitación, una célula vascular, de manera preferente una célula vascular de músculo liso, o un condrocito, implicará inhibir o prevenir la mineralización de dicha matriz extracelular, de cualquiera de las siguientes maneras:

i) activar un receptor de activina, de manera preferente el receptor de activina de tipo II, en la superficie de una célula que produce la matriz extracelular. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante la utilización de un ligando o un análogo funcional, un inductor y/o un agonista de dicho receptor. El ligando es, de manera preferente, la activina A, de la manera más preferente activina A exógena; o

ii) aumentar en dicha célula la expresión, como mínimo, de un gen seleccionado del grupo que comprende la trombospodina 1; colágeno de tipo V alfa 1; colágeno de tipo XVI alfa 1; colágeno de tipo VIII alfa 2; repetición de la triple hélice de colágeno que contiene 1; hialuronano y proteína 1 de unión a proteoglicanos; proteoglicano 2 de sulfato de condroitina (versicano); proteína 2 de unión al factor beta de crecimiento transformante latente; biglicano; metalopeptidasa 2 de matriz; periostina, factor específico de osteoblasto; fibulina 5; SPOCK1, Sparc/osteonectina, cwcv y proteoglicanos de dominios de tipo kazal (testicano); y metalopeptidasa ADAM con motivo de trombospodina de tipo 1, o controlar la actividad de un producto de expresión de dicho gen; o

iii) bloquear o inhibir en dicha célula la expresión, como mínimo, de un gen seleccionado del grupo que comprende el antígeno CD248, endosialina; agente de interfase 2 de microfibrillas de elastina; matrilina 2; distrobrevina, alfa; colágeno, tipo IV, alfa 6; nidógeno 2 (osteonidógeno); papilina, glicoproteína sulfatada de tipo proteoglicano; familia 3 de dominio de lectinas de tipo C, miembro B; colágeno tipo V, alfa 3; e inhibidor 4 de metalopeptidasa TIMP, o controlar la actividad de un producto de expresión de dicho gen.

Controlar la mineralización de una matriz extracelular de una célula implicada en una calcificación fisiológica, que incluye, aunque sin constituir limitación, un osteoblasto, implicará estimular la mineralización de dicha matriz extracelular, de cualquiera de las siguientes maneras:

iv) evitar la interacción entre un receptor de activina, de manera preferente el receptor de activina de tipo II, en

la superficie de una célula que produce dicha matriz extracelular y el ligando endógeno de dicho receptor. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante la utilización de un inhibidor de ligando, un inductor de dicho inhibidor de ligando y/o un antagonista de dicho receptor. El inhibidor de ligando es, de manera preferente, folistatina; o

v) bloquear o inhibir en dicha célula la expresión, como mínimo, de un gen seleccionado del grupo que comprende la trombospodina 1; colágeno de tipo V alfa 1; colágeno de tipo XVI alfa 1; colágeno de tipo VIII alfa 2; repetición de la triple hélice de colágeno que contiene 1; hialuronano y proteína 1 de unión a proteoglicanos; proteoglicano 2 de sulfato de condroitina (versicano); proteína 2 de unión al factor beta de crecimiento transformante latente; biglicano; metalopeptidasa 2 de matriz; periostina, factor específico de osteoblasto; fibulina 5; SPOCK1, Sparc/osteonectina, cwcv y proteoglicanos de dominios de tipo kazal (testicano); y metalopeptidasa ADAM con motivo de trombospodina de tipo 1, o controlar la actividad de un producto de expresión de dicho gen; o

vi) aumentar o estimular en dicha célula la expresión, como mínimo, de un gen seleccionado del grupo que comprende el antígeno CD248, endosialina; agente de interfase 2 de microfibrillas de elastina; matrilina 2; distrobrevina, alfa; colágeno, tipo IV, alfa 6; nidógeno 2 (osteonidógeno); papilina, glicoproteína sulfatada de tipo proteoglicano; familia 3 de dominio de lectinas de tipo C, miembro B; colágeno tipo V, alfa 3; e inhibidor 4 de metalopeptidasa TIMP, o controlar la actividad de un producto de expresión de dicho gen.

En el presente documento se describen métodos de tratamiento médico en los que el tratamiento comprende el control del proceso de mineralización de la matriz extracelular tal como se describe anteriormente. El método puede ser un método *in vivo* o un método *in vitro*.

En el presente documento se describe un método para tratar o prevenir calcificaciones patológicas, de manera preferente una calcificación patológica seleccionada del grupo que comprende la calcificación aterosclerótica, calcificación pulmonar metastásica, calcificación de las válvulas cardíacas y las calcificaciones en las articulaciones asociadas con la tendinitis; artritis; bursitis; espolones óseos; osificación cutánea; piedras en los riñones; miositis osificante; osificación pulmonar; cataratas; calcinosis estriopalidodentada bilateral; osificación heterotópica neurogénica y osteosarcoma, que comprende controlar la mineralización de una matriz extracelular mediante un método de la presente invención según las realizaciones i), ii) o iii) tal como se describen anteriormente.

La presente invención da a conocer un método para estimular la mineralización, la curación ósea, la formación ósea y/o para tratar la osteoporosis, que comprende controlar la mineralización de una matriz extracelular mediante un método de la presente invención según las realizaciones iv), v) o vi) tal como se describen anteriormente.

Como productos para utilizar en dicho tratamiento médico, en el presente documento se describe un medicamento para el tratamiento de calcificaciones patológicas, comprendiendo dicho medicamento un ligando del receptor de activina, o un agonista o un análogo funcional del mismo, de manera preferente activina A, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La presente invención da a conocer un medicamento para el tratamiento de la osteoporosis o fracturas óseas, comprendiendo dicho medicamento un inhibidor de activina A, folistatina y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En el presente documento se describen métodos no terapéuticos, tal como métodos de ingeniería médica (de manera preferente *ex vivo*), por ejemplo, ingeniería de tejidos. En una realización de ese aspecto, un método de producción de una matriz extracelular no mineralizante, comprende realizar un método para inhibir o prevenir la mineralización de una matriz extracelular tal como se describe anteriormente y, de manera opcional, aislar la matriz extracelular obtenida de este modo. Dicha matriz se puede utilizar, por ejemplo, para la producción del tejido cartilaginoso. En una realización alternativa de ese aspecto, la presente invención da a conocer un método de producción de una matriz extracelular mineralizante de forma rápida, que comprende realizar un método para estimular la mineralización de dicha matriz extracelular tal como se describe anteriormente y, de manera opcional, aislar la matriz extracelular obtenida de este modo. Dicha matriz se puede utilizar, por ejemplo, para la producción de tejido óseo.

También se describe en el presente documento un marcador para el diagnóstico de la osteoporosis en un paciente. El marcador, tal como se describe en el presente documento, es la proporción de la cantidad de activina A con respecto a la cantidad de folistatina secretada por los osteoblastos en el tejido óseo de dicho paciente. El experto en la materia es conocedor de métodos para determinar los niveles de dichos compuestos proteicos en los tejidos.

A continuación se proporcionan ejemplos de la presente invención.

EJEMPLO

El objetivo de los experimentos descritos a continuación fue evaluar la función de activinas en osteoblastos humanos. Se utilizaron osteoblastos humanos que forman una ECM mineralizada *in vitro*, en los que se analizó la regulación de la mineralización por activinas. La producción de activinas durante la diferenciación de osteoblastos se midió junto con la expresión de antagonistas de activina. Se realizó una obtención del perfil de expresión de todo el genoma para revelar los mediadores cascada debajo de la señalización de activina en osteoblastos. Además, se

estudió el efecto de las activinas en la calcificación vascular utilizando células vasculares de músculo liso humanas (VSMC).

Materiales y métodos

Cultivo celular

El protocolo de cultivo para células de la línea celular osteoblástica SV-HFO humana inmortalizada establecida a partir de la cúpula del cráneo fetal se describe en detalle en Eijken, M., y otros, Mol Endocrinol, 2005. 19(3): pág. 621-31. De forma breve, se cultivaron células SV-HFO entre el paso 9 y 13 en Medio Mínimo Esencial α (Gibco BRL, Paisley, Reino Unido) complementado con HEPES 20 mM pH 7,5 (Sigma St. Louis, MI, Estados Unidos), estreptomicina/penicilina (Gibco BRL), CaCl_2 1,8 mM (Sigma) y suero de ternera fetal (FCS) al 2% inactivada con el calor y tratada con carbón (Gibco BRL) a 37°C y CO_2 al 5% en una atmósfera humidificada. Las células se sembraron en una densidad de 10×10^3 células vitales por cm^2 en placas de 6 ó 12 pocillos (Corning, NY, Estados Unidos). Después del sembrado, las células se incubaron durante dos días antes de ponerse en medio mineralizante diferenciador (Medio Mínimo Esencial α complementado con HEPES 20 mM pH 7,5, estreptomicina/penicilina, CaCl_2 1,8 mM y FCS al 2% inactivada con el calor y tratada con carbón, β -glicerofosfato 10 mM y dexametasona 100 nM) (indicado como día 0). El medio se complementó con β -glicerofosfato (Sigma) 10 mM añadido fresco, dexametasona (DEX) (Sigma) 100 nM u otros aditivos (activina y folistatina) y se sustituyó cada 2-3 días. La folistatina se adquirió de PeproTech (Rocky Hill, NJ, Estados Unidos) y la activina A de R&D systems (Minneapolis, MN, Estados Unidos).

Se cultivaron osteoblastos humanos normales (NHOst) (Cambrex Bio Science, Verviers, Bélgica; CC-2538), células vasculares de músculo liso (VSMC) (células de músculo liso de arteria coronaria; Cambrex bioscience; CC-2583) y células madre mesenquimales humanas (hMSC); (Cambrex bioscience) de manera similar a las células SV-HFO tal como se describe anteriormente únicamente con los siguientes ajustes. Se utilizaron NHOst y hMSC entre los pasos 3 y 6 y se sembraron en una densidad de 5×10^3 células vitales por cm^2 . Se indujeron los cultivos de NHOst y hMSC para mineralizarse en un medio similar al de SV-HFO, a excepción de que se utilizó FCS (Gibco BRL) al 10% inactivada con el calor y tratada con carbón. Se utilizaron VSMC entre los pasos 3 y 7 y se sembraron en una densidad de 5×10^3 células vitales por cm^2 . La expansión de las VSMC se realizó en el medio de células de músculo liso (Cambrex Bio Science) complementado con Sm-GM-2 Bulletkit Clonetics™ (Cambrex Bio Science). Se indujeron las VSMC para mineralizarse en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL; con glucosa 4500 mg/l, L-glutamina y piruvato) complementado con DEX 100 nM, ácido ascórbico 0,1 mM (Sigma), insulina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma), CaCl_2 1 mM (concentración final de 2,8 mM), β -glicerofosfato 10 mM y FCS al 10%.

Desvitalización de cultivos de osteoblastos

En el día 12 del cultivo en medio mineralizante, se extrajo el medio de cultivo y los cultivos se lavaron una vez en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco BRL). Los cultivos se secaron al aire y se incubaron durante la noche a -20°C. A continuación, los cultivos desvitalizados se incubaron normalmente tal como se describe en los métodos de cultivo celular (indicado como día 0 para cultivos desvitalizados).

Ensayos de ADN, actividad de fosfatasa alcalina y mineralización

Los cultivos celulares se extrajeron del plato de cultivo en PBS que contenía Tritón X-100 al 0,1% y se almacenaron a -80°C. Antes del análisis, se sonicaron lisados celulares en hielo en un disruptor celular sonicador durante 2 x 15 segundos y se utilizaron para los ensayos de ADN, actividad de fosfatasa alcalina y mineralización, los cuales se describen en detalle en Eijken y otros, 2005 (supra). De forma breve, se midió el contenido de ADN de manera fluorimétrica utilizando una solución de bromuro de etidio. La actividad de fosfatasa alcalina se midió determinando la liberación de paranitrofenol a partir de paranitrofenilfosfato. El contenido de calcio se determinó de manera colorimétrica después de la adición de tampón de etanolamina 1 M (pH 10,6), complexona de o-cresoltaleína 0,35 mM, 8-hidroxiquinolina 19,8 mM y ácido clorhídrico 0,6 mM a 595 nm. Para la tinción con Rojo de Alizarina se fijaron cultivos celulares durante 60 min con etanol al 70% en hielo. Después de la fijación, las células se lavaron dos veces con PBS y se tiñeron durante 10 min con una solución de Rojo de Alizarina (Rojo de Alizarina saturada en agua desmaterializada ajustada hasta pH 4,2 utilizando hidróxido de amonio al 0,5%). Se extrajo el Rojo S de Alizarina y se lavaron los cultivos con agua desmineralizada.

Ensayos de informador de luciferasa

En el día 5 del cultivo, se transfectaron células con 200 ng de plásmidos informadores por pocillo (placa de 12 pocillos) utilizando Eugene6 (Roche, Basel, Suiza) según la descripción del fabricante. Después de 24 horas, el medio se sustituyó por medio fresco que contenía poco suero (FCS al 0,2%) y se incubó durante 3 horas. Después de 3 horas, el medio se renovó por segunda vez con medio que contenía poco suero, aunque ahora complementado con aditivos descritos en la sección de resultados. Después de 24 horas, las células se lisaron mediante la incubación durante 20 minutos en 100-200 μl de tampón de lisis (Promega, Madison, WI). Se midió la actividad de luciferasa utilizando 25 μl de lisado celular y el Sistema de Ensayo de Luciferasa Steady-Glo (Promega). Se midió la

señalización de activina utilizando pGL3(CAGA)12-lux (CAGA-Luc) (Dennler y otros, Embo J, 1998 17: 3091-100) y se midió la señalización de BMP utilizando pGL3-BRE-luc (BRE-Luc) (Korchynski y otros, J Biol Chem, 2002. 277: 4883-91.

5 Cuantificación de folistatina y activina A

En varios días durante el cultivo, se recogió medio para las mediciones de la activina A y la folistatina. El medio se recogió a partir de los cultivos después de una incubación de 48 horas. El medio se centrifugó (5 min, 500 g) y posteriormente se almacenó a -20°C para un análisis posterior. También se prepararon lisados celulares para analizar el contenido de ADN de los cultivos correspondientes. Para cuantificar la activina A y la folistatina, se analizó una cantidad de 100 µl de medio utilizando un kit ELISA DuoSet para activina A o un kit ELISA de cuantiquina para folistatina (R & D systems), respectivamente.

Inmunohistología

Se desacrilaron secciones de hueso plastificado en una mezcla 1:1 de xileno y cloroformo durante 30 minutos, a continuación se sumergieron en xileno, se rehidrataron y se enjuagaron dos veces con agua destilada. Los portamuestras se trataron previamente con tampón Tris-EDTA pH 9,0 durante 15 minutos a 100°C y se enfriaron durante 15 minutos seguido de un enjuagado con agua corriente. Se inhibió la actividad de peroxidada endógena mediante una mezcla 10:1 de PBS y H₂O₂ durante 10 minutos, seguido de dos lavados con agua y un lavado con Tris-HCl pH 8,0. Las siguientes etapas se llevaron a cabo en una cámara humidificada a temperatura ambiente. Se diluyeron 1:50 anticuerpos primarios en diluyente normal de anticuerpo (Skytek Laboratories, UT, Estados Unidos; referencia ABB999) y se incubaron durante 60 minutos. La inhibina βA, la inhibina α y el anticuerpo de control negativo IgG2b se adquirieron de Serotec (Serotec, Oxford, Reino Unido; MCA950 ST, MSA951S, MCA691). Los portamuestras se enjuagaron en dos veces Tris-HCl. Los portamuestras se detectaron con el sistema de detección Dako REALtm Envisiontm, Peroxidasa/DAB+, Conejo/Ratón (Dako, Glostrup, Dinamarca; Código K5007). Después de la detección de DAB, los portamuestras se enjuagaron con agua corriente y se contratiñeron en Hematoxilina de Harris durante 1 minuto, se enjuagaron con agua corriente durante 2 minutos, se deshidrataron en etapas ascendentes de etanol. Se enjuagaron con xileno y se cubrieron con un cubremuestras utilizando el medio de ensamblaje Pertex (Histolab, Gothenburg, Suecia).

Análisis PCR a tiempo real (qPCR)

El aislamiento de ARN, la síntesis de ADNc y la qPCR se describen en detalle en Eijken y otros, 2005 [supra]. De manera breve, la PCR de transcripción inversa a tiempo real cuantitativa (qPCR) se llevó a cabo utilizando un sistema de detección de secuencias ABI 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). La expresión génica se cuantificó utilizando verde SYBR o una sonda interna fluorescente (5'-FAM; 3'-TAMRA). Para el verde SYBR y el ensayo de sonda fluorescente, las reacciones de PCR contenían 20 ng de ADNc y se realizaron utilizando un kit qPCR para verde SYBR I o un kit central de qPCR (Eurogentec), respectivamente. La cantidad de ARNm de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana (GADPH) se utilizó como control interno para normalizar las posibles diferencias en la extracción y degradación de ARN, así como la eficacia de la síntesis de ADNc. Los datos se presentaron como los niveles de ARNm relativos calculados mediante la ecuación $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct$ del gen diana menos Ct de GAPDH). Para el análisis por qPCR, se utilizó ARN aislado de cultivos que no se utilizaron para el análisis con microchips.

Expresión génica basada en chips Affymetrix

La pureza y la calidad del ARN aislado se evaluó mediante el ensayo RNA 6000 Nano en un Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies). Ninguna de las muestras utilizadas mostró una degradación significativa o contaminación del ADN. Por condición analizada, el ARN total estaba formado de 3 muestras diferentes. La síntesis de la primera y segunda cadena de ADNc a partir del ARN total se realizó según el protocolo de marcaje dirigido de un ciclo ("One-Cycle Target Labeling") (Affymetrix; 701024 Rev. 3). En total, se transcribieron de forma inversa 4,0 µg de ARN total utilizando el kit de síntesis de ds-ADNc Superscript según la descripción del fabricante (Invitrogen). Posteriormente, se purificó el ADNc de doble cadena utilizando el módulo de limpieza de muestras de chips de genes ("GeneChip Sample Cleanup Module") (Affymetrix) y sirvió como plantilla en la reacción de transcripción *in vitro* utilizando el kit de marcaje de transcritos de ARN ("RNA Transcript Labeling") BioArray(tm) HighYield(tm) (Affymetrix). El ARN complementario (cARN) biotinilado amplificado se purificó utilizando el módulo de limpieza de muestras de chips de genes y se cuantificó de forma espectrofotométrica (1 DO260 nm = 40 µg/ml). En total, se fragmentaron 20 µg de cARN marcado con biotina mediante hidrólisis inducida con metales a una concentración final de 0,5 µg/µl durante 35 minutos a 94°C. La fragmentación se comprobó en un bioanalizador Agilent 2100 confirmando un tamaño promedio de aproximadamente 100 nucleótidos. En total, se hibridaron 15 µg de cARN biotinilado fragmentado a microchips de oligonucleótidos GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix) según el protocolo del fabricante (Affymetrix, 701025 Rev 5). Los procedimientos de tinción, lavado y rastreo se llevaron a cabo tal como se describe en el manual técnico del análisis de expresión de chips de genes ("GeneChip Expression Analysis") (Affymetrix). La obtención de datos se realizó en aproximadamente 12 minutos por chip

utilizando el GeneChip(r) Scanner 3000.

Análisis de datos con microchips

A efectos de examinar la calidad de los diferentes chips, se analizaron los valores de la intensidad medida utilizando el GeneChip Operating Software (GCOS, Affymetrix). El porcentaje de las llamadas presentes (aproximadamente el 40%), ruido, fondo y la proporción de GAPDH 3' con respecto a 5' (<1,4) indicaron la calidad elevada de las muestras y una comparabilidad general.

Los grupos de sondas que nunca estuvieron presentes (según el software MAS5.0 de Affymetrix) en cualquiera de los microchips se omitieron de un análisis posterior. Las intensidades sin tratar de los grupos de sondas restantes (30336) de cada chip se transformaron con log2 y se normalizaron utilizando normalización por cuantiles. Después de la normalización, los datos se volvieron a transformar hasta los valores de intensidad normales. Los análisis de datos se llevaron a cabo utilizando el software OmniViz, versión 3.6.0 (OmniViz, Maynard, MA).

Nomenclatura de los genes

Los nombres de los genes y los símbolos de los genes se utilizaron tal como se da a conocer por el Comité de Nomenclatura de Genes HUGO (Wain, H.M., y otros, Guidelines for human gene nomenclature ("Directrices para la nomenclatura de genes humanos"). Genomics ("Genómica"), 2002. 79(4): pág. 464-70).

Estadística

Los datos sólo se presentaron si múltiples experimentos independientes mostraron resultados similares. Los experimentos se realizaron, como mínimo, por triplicado. Los valores son la media $\pm$ SEM. La significancia se calculó utilizando el test t de Student. Para calcular la significancia para los análisis de GO, se utilizaron la tasa de descubrimiento falso de Benjamini y Hochberg (Young, A., y otros, OntologyTraverser: an R package for GO analysis ("OntologyTraverser: un paquete R para análisis de GO"). Bioinformatics ("Bioinformática"), 2005. 21(2): pág. 275-6).

Resultados

La activina A inhibe la mineralización en cultivos de osteoblastos humanos

Se estudió en detalle el papel de la señalización de activina en los osteoblastos utilizando el modelo de diferenciación de osteoblastos SV-HFO. Este modelo de osteoblastos humanos produce una matriz extracelular (ECM) durante el cultivo, la cual se mineraliza finalmente en un periodo de tiempo de 2 a 3 semanas. Utilizando estos osteoblastos humanos los presentes inventores demostraron que el tratamiento con activina A inhibía fuertemente el proceso de mineralización (figura 1 y figura 6). Este efecto era dependiente de la dosis, mostrando una reducción significativa de la mineralización después del tratamiento con concentraciones de activina A superiores a 5 ng/ml. El marcador de diferenciación de osteoblastos, fosfatasa alcalina (ALPL), también disminuía por la acción de la activina A de forma dependiente de la dosis (datos no mostrados), aunque la magnitud de la inhibición (10-30%) era menor en comparación con la de la mineralización. El tratamiento con activina A no presentaba efectos en el crecimiento celular tal como se demostraba por el contenido invariable del ADN (datos no mostrados).

Los osteoblastos producen activina A de una manera dependiente de la diferenciación

Para revelar si la activina actúa de una manera autocrina, los presentes inventores midieron los niveles de ARNm de las dos subunidades β de la inhibina junto con la proteína activina A en osteoblastos humanos. La QPCR demostró que la inhibina β A (INHBA) se expresaba de manera abundante en comparación con la subunidad de inhibina β B (INHBB). Por otro lado, el ARNm de la inhibina α (INHA) era casi indetectable (figura 2A). Esto sugiere que los osteoblastos producen principalmente activina A.

Las mediciones cuantitativas de la proteína activina A mostraron que los cultivos de osteoblastos secretan cantidades biológicas relevantes de activina A (hasta 5 ng/ml), mientras que la proteína inhibina A no se podía detectar (datos no mostrados). La producción de activina A corregida por el número de células (contenido de ADN) se midió en diferentes etapas de la diferenciación (día 5, 12 y 19). Esto demostró que la producción de activina A disminuía durante la diferenciación y era mínima durante las etapas de mineralización de la matriz (día 12 y 19) (figura 2B, osteoblastos mineralizantes).

Para explorar esta regulación dependiente de la diferenciación, se midió la producción de activina A en cultivos de osteoblastos que no experimentan diferenciación. Se crearon osteoblastos no diferenciados (osteoblastos de control) mediante la exclusión de glucocorticoides (DEX) del medio de cultivo, dando lugar a cultivos de osteoblastos que presentan una actividad de ALP baja y que no muestran una mineralización *in vitro*. De manera destacada, los osteoblastos de control presentaban una producción de activina A mucho más elevada en comparación con sus

homólogos mineralizantes (figura 2B), demostrando que los osteoblastos funcionales maduros presentan una producción de activina A suprimida.

Además, la inmunohistoquímica en biopsias de huesos humanos demostró que el tejido óseo humano estaba cargado con activina A. La subunidad INHBA se detectaba de manera clara en la matriz ósea mineralizada, mientras que la subunidad INHA no se podía detectar (figura 2C).

La activina A inhibe la mineralización de una manera autocrina

El impacto de las activinas producidas de manera endógena en la función de los osteoblastos se midió mediante la neutralización de la señalización de activina por el antagonista de activina, follistatina. En primer lugar, los presentes inventores midieron si la follistatina era capaz de neutralizar la señalización de activina en cultivos de osteoblastos. Se utilizó una construcción informadora de luciferasa para la señalización de activina/TGF β (CAGA-luciferasa) para medir la señalización de activina. El tratamiento con activina A incrementó de forma dependiente con la dosis la señalización de activina/TGF β , la cual se podía inhibir mediante coincubación con follistatina (figura 3A). Además, la follistatina también redujo la señalización basal de activina/TGF β en un 50%, lo cual apoya adicionalmente la observación de la señalización de activina endógena en los osteoblastos. En la bibliografía se sugiere que la follistatina también neutraliza la acción de la BMP. Para estudiar esto en los osteoblastos, se utilizó una construcción informadora de luciferasa para un elemento sensible a la BMP (BRE-luciferasa). La adición de BMP-2a 10 y 100 ng/ml indujo fuertemente la actividad de luciferasa con BRE. A diferencia de la señalización de activina, la señalización de BMP basal e inducida por BMP-2a no se pudo reducir por la presencia de follistatina (figura 3B). Esto demostró que bajo estas condiciones la follistatina neutraliza de manera específica la señalización de activina en los osteoblastos. Este efecto inhibidor de la follistatina se utilizó para estudiar el impacto de la señalización de activina endógena en la diferenciación y mineralización de osteoblastos. El tratamiento con follistatina (100 y 500 ng/ml) incrementó de manera clara la mineralización de la matriz (figura 3C) junto con un incremento menor en la actividad de ALP (datos no mostrados). Esto demostró que los osteoblastos secretan activina A que inhibe la mineralización y la actividad de ALP de una manera paracrina y/o autocrina.

La proporción de activina A con respecto a follistatina disminuye en cultivos mineralizantes

A parte de la producción de activina A por los osteoblastos, los presentes inventores demostraron también que los osteoblastos secretan cantidades biológicas relevantes de follistatina. En el día 12 del cultivo, se pudieron medir los niveles máximos de follistatina de 1-3 ng/ml en el sobrenadante de cultivo después de 2 días de incubación con el medio (datos no mostrados). Esto indica que en los osteoblastos la señalización de activina endógena está regulada por la expresión de la activina A, así como por la expresión de follistatina F. La producción de follistatina se calculó (niveles de follistatina corregidos para el contenido de ADN de los cultivos) a lo largo del cultivo en osteoblastos mineralizantes y de control (Figura 4A). Esto demostró que la producción de follistatina era superior al inicio del cultivo (día 5) en osteoblastos mineralizantes en comparación con osteoblastos de control y que la producción de follistatina disminuía durante el cultivo en ambas condiciones. A continuación, se calculó la proporción molar entre la activina A y la follistatina. Esto demostró que los cultivos mineralizantes presentan una proporción de activina A con respecto a follistatina reducida en comparación con los cultivos de control, indicando una señalización de activina suprimida en condiciones mineralizantes (figura 4B).

La señalización de activina es la más eficaz antes del inicio de la mineralización

Los presentes inventores investigaron si la señalización de activina inhibe la mineralización durante una ventana de tiempo específica de la diferenciación de osteoblastos. Se utilizaron varios protocolos de incubación en los que los cultivos de osteoblastos se trataron con activina A durante periodos de tiempo específicos. En primer lugar, los cultivos se trataron durante el periodo previo a la mineralización (hasta el día 10 del cultivo) o durante el periodo de mineralización (desde el día 10 del cultivo en adelante) con una dosis moderada de activina A (20 ng/ml) y se midió la posterior mineralización en el día 19 (figura 5A). Esto demostró que el tratamiento previo al periodo de mineralización era el más eficaz para inhibir la mineralización. Para centrarse más en este periodo previo de mineralización, se realizaron más incubaciones específicas tal como se representa en la figura 5B. Esto demostró que la activina A era la más eficaz cuando estaba presente en los 7 días finales antes del inicio de la mineralización. Incluso cuando la activina A estaba sólo presente durante los dos días finales (día 10-12) antes de la mineralización, se midió un descenso significativo en la mineralización.

Los presentes inventores realizaron la hipótesis de que la señalización de activina en esta fase previa de la mineralización conduce a una composición alterada de la matriz, manteniéndola en un estado inmaduro incapaz de mineralizar. Para demostrar esto, se explotó el hecho de que los osteoblastos producen una ECM en los primeros 12 días de cultivo que puede mineralizar posteriormente independientemente de la presencia adicional de osteoblastos vivos (figura 5, vehículo). (Fratzl-Zelman, N., y otros, Matrix mineralization in MC3T3-E1 cell cultures initiated by beta-glycerophosphate pulse ("Mineralización de matriz en cultivos de células MC3T3-E1 iniciada por pulsos de beta-glicerofosfato"). Bone ("Hueso"), 1998. 23(6): pág. 511-20). Esto se consiguió mediante la congelación de cultivos de osteoblastos hasta -20°C (para desvitalizar el cultivo) en el inicio de la mineralización (día 12). A continuación, estos cultivos que contenían células no vivas, pero una ECM intacta, se incubaron posteriormente

durante 7 días adicionales con medio de cultivo. La mineralización se cuantificó en el momento de la fijación (día 12 cultivos vivos = día 0 cultivos desvitalizados) y después de 3 y 7 días (véase esquema de la incubación en la figura 5C). No se midió mineralización en el inicio (día 0), aunque después de 3 y 7 días, se pudo medir mineralización de la ECM (figura 5C, vehículo). De manera destacada, en cultivos que se trataron previamente con activina A antes de la desvitalización, no se pudo detectar mineralización de la ECM. Esto apoya la hipótesis de los presentes inventores de que el impacto principal de la activina A es antes del inicio de la mineralización y sugiere un efecto en la composición y maduración de la matriz.

La activina suprime la mineralización osteoblástica, así como la mineralización ectópica.

Se trataron diferentes modelos de mineralización con activina A para demostrar que la inhibición de la mineralización inducida por activina A no era única para el modelo de osteoblastos humanos SV-HFO.

Se analizó la activina A en otro modelo de osteoblastos (NHOst) y en cultivos de células vasculares de músculo liso (VSMC). Estas VSMC se utilizan como modelo para la aterosclerosis (Shioi, A., y otros, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. 15(11): pág. 2003-9) y se pueden inducir para mineralizarse utilizando un medio osteogénico. Tal como se demuestra para cultivos SV-HFO, se expresaron (ARNm) los receptores de activina de tipo I (ACVRIB) y de tipo II (ACVR2A/2B) en NHOst, así como en cultivos de VSMC (datos no mostrados). De manera destacada, la activina A inhibía fuertemente el proceso de mineralización tanto en NHOst como en cultivos de VSMC (figura 6).

Análisis del perfil génico de cultivos tratados con folistatina y activina A

Se realizaron experimentos del perfil génico para saber el mecanismo y la acción molecular de la activina A en osteoblastos utilizando microchips HG U133 Plus 2.0 de Affymetrix. Se compararon los perfiles de expresión génica de osteoblastos tratados con folistatina, vehículo y activina A. Estos tratamientos crearon cultivos que presentaban una señalización de activina baja, moderada (endógena) o elevada, dando lugar a 3 niveles diferentes de mineralización de la matriz tal como se demuestra en la figura 3C. Además, se midió la expresión génica en 3 etapas fenotípicamente diferentes; 1) formación de la matriz, sin mineralización (día 5), 2) maduración de la matriz, inicio de la mineralización (día 12), y 3) mineralización completa (día 19).

Se diseñó una búsqueda basada en el fenotipo que se centraba en genes regulados por la señalización de activina en el periodo previo a la mineralización (día 5 y 12) que se observó que era importante para la inhibición de la mineralización por la activina A. Un aspecto importante en la búsqueda por selección era que los presentes inventores buscaron genes que eran regulados por células tratadas tanto por folistatina como por activina A, ya que ambas condiciones afectan a la mineralización. Se seleccionaron los genes que se regulaban por incremento en cultivos tratados con activina A (mineralización baja) y a la vez se regulaban por descenso en cultivos tratados con folistatina (mineralización elevada) en comparación con los cultivos de vehículos o viceversa tanto en el día 5 como en el día 12. Además, la diferencia en la expresión génica entre los cultivos tratados con activina A y los cultivos tratados con folistatina debe ser, como mínimo, de un factor de 2 en uno de estos dos días (figura 7). En total, se seleccionaron 520 ID de Affymetrix que representaban 397 genes únicos y 62 ID de Affymetrix no anotados. Los ID de Affymetrix seleccionados se presentan como una agrupación jerárquica en la figura 7; los colores rojo y verde indican la regulación por incremento o descenso en comparación con los cultivos de vehículo, respectivamente.

Análisis de ontología génica (GO)

A continuación, se utilizó el análisis de enriquecimiento GO para clasificar los 397 genes seleccionados por las categorías: Proceso Biológico GO, Función Molecular GO y Componente Celular GO (datos no mostrados) (Young, A., y otros, OntologyTraverser: an R package for GO analysis ("OntologyTraverser: un paquete R para análisis de GO"). Bioinformatics, 2005. 21(2): pág. 275-6). En total, los presentes inventores identificaron 47 procesos biológicos, 13 funciones moleculares y 4 componentes celulares sobrerrepresentados de manera significativa (corregido para el análisis múltiple) en comparación con lo que se esperaba si se analizaran 397 genes aleatorios. Varios términos de procesos biológicos GO compartían una similitud elevada y se identificaron mediante grupos similares de genes.

El análisis para el componente celular mostró que los genes localizados en la región, espacio o matriz extracelular se sobrerrepresentaban de manera significativa. Esto es lo más interesante ya que esta obtención imparcial del perfil de expresión génica y los análisis apoyan la hipótesis de que el efecto de la activina A es el más importante en el periodo de formación y maduración de la matriz extracelular (véase la figura 5). Los análisis por qPCR mostraron que la expresión de ARNm de las proteínas de la ECM conocidas y abundantes en hueso; colágeno tipo I, osteopontina y osteocalcina era invariable por la acción de la señalización de activina (datos no mostrados). Sin embargo, estos análisis de microchips identificaron numerosos genes localizados en la ECM que eran regulados por la señalización de activina (figura 8).

La señalización de activina altera la composición de la ECM en osteoblastos, así como en VSMC

Se analizó con más detalle una selección de genes de la ECM utilizando qPCR en osteoblastos tratados con

- folistatina, vehículo y activina junto con su expresión en VSMC (figura 9). La expresión de ALPL también se cuantificó como un control positivo. Esto demostró que CLEC3B, COL5A3, TIMP4, NID2 y ALPL, que fueron suprimidos por la activina A (5 paneles superiores) en osteoblastos también fueron suprimidos por la activina A en cultivos de VSMC. Se incrementó la POSTN de manera intensa mediante la señalización de activina en osteoblastos, lo cual también se demostró en VSMC. En cambio, la activina A incrementó la expresión de MMP2, FBLN5 y VCAN en los osteoblastos, pero la expresión de estos genes no permaneció invariable en VSMC.
- El tratamiento con folistatina no alteró la expresión génica en VSMC. Esto se ajusta con los datos de expresión de las subunidades INHBA e INHBB en VSMC, que se expresaron (ARNm) de manera baja en comparación con la expresión en osteoblastos (datos no mostrados). Además, no se pudo detectar la producción de activina A por los cultivos de VSMC (datos no mostrados). En VSMC solo la expresión de ARNm de POSTN fue regulada por folistatina (0,5 veces). Este gen fue inducido fuertemente por la señalización de activina y probablemente ya fue activado por concentraciones bajas de activinas (figura 8).
- Estos datos de expresión indican que la señalización de activina endógena o exógena altera la composición de la ECM en cultivos de osteoblastos, así como en cultivos de VSCM, evitando la mineralización de la ECM. No obstante, esta señalización de activina endógena es menos prominente en VSCM mineralizantes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Folistatina para su utilización en un tratamiento médico de un paciente humano de una patología en la que la mineralización es ventajosa para la fisiología de dicho paciente humano y/o en un método de tratamiento médico para estimular la curación ósea, la formación ósea y/o para tratar la osteoporosis en un paciente humano.
2. Folistatina para su utilización, según la reivindicación 1, en la que la folistatina se formula con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. Folistatina para su utilización, según la reivindicación 1, en la que dicha utilización comprende la administración parenteral, intravenosa, intraperitoneal o intracapsular de dicha folistatina.
4. Folistatina para su utilización, según la reivindicación 1, en la que dicha utilización comprende la impregnación de implantes quirúrgicos.
- 15 5. Folistatina para su utilización, según la reivindicación 4, en la que dicho material de implante puede formar o comprender una matriz de liberación lenta capaz de liberar el compuesto durante un periodo de tiempo en una localización predeterminada.
- 20 6. Folistatina para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha utilización comprende la administración de una dosis diaria de folistatina en el intervalo de 0,01-1000 µg/kg de peso corporal.
7. Folistatina para su utilización, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha utilización comprende la administración de una dosis elegida de manera que las concentraciones locales están entre 50 y 500 ng/ml.
- 25 8. Utilización de folistatina en un método no terapéutico *in vitro* para la producción sintética de huesos en cultivos celulares humanos y la osificación en la ingeniería de tejidos a efectos de aumentar la formación ósea en un andamio orgánico o inorgánico, o una combinación de los mismos.
- 30

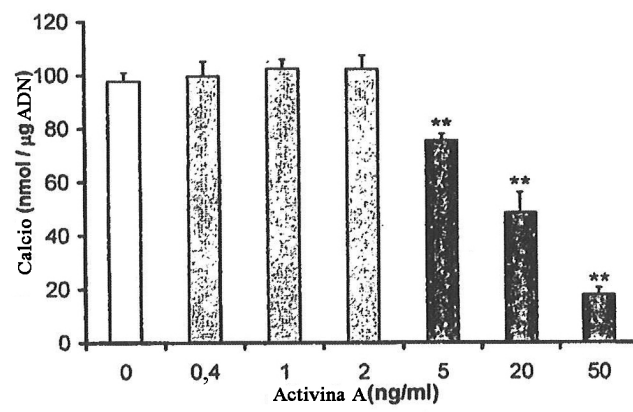


Figura 1

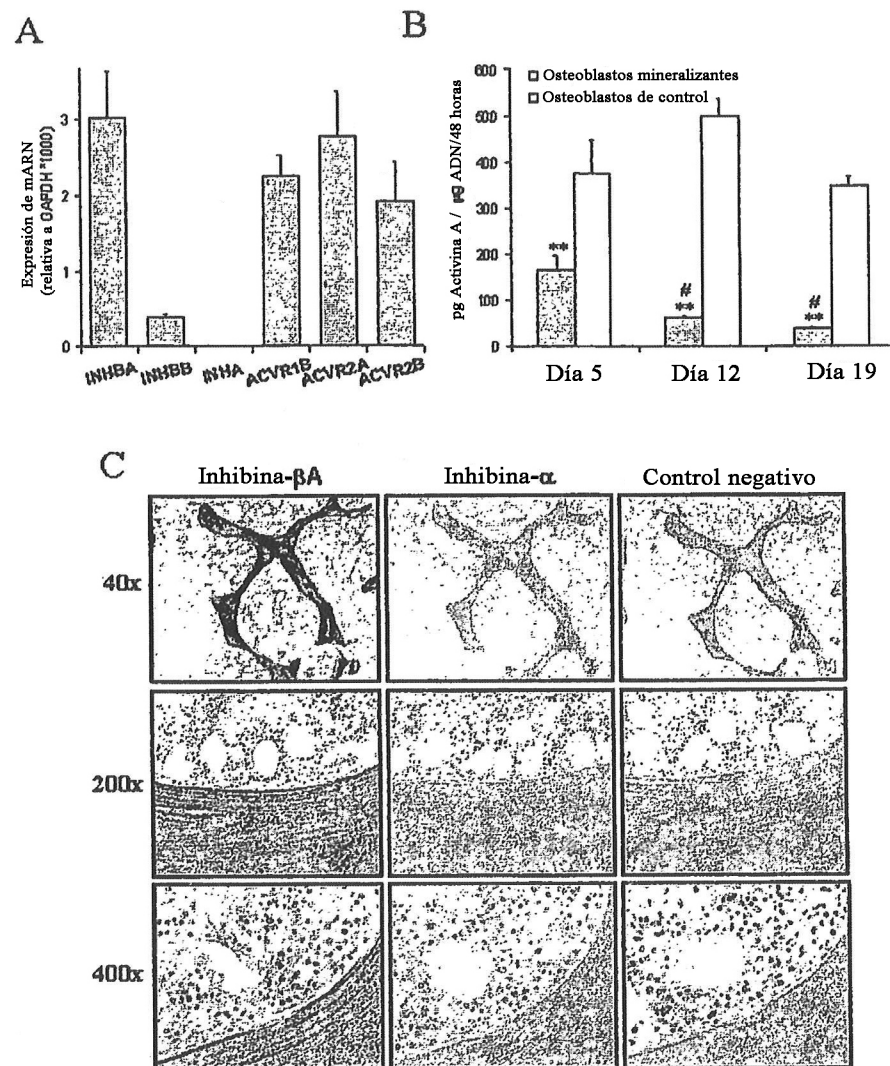


Figura 2

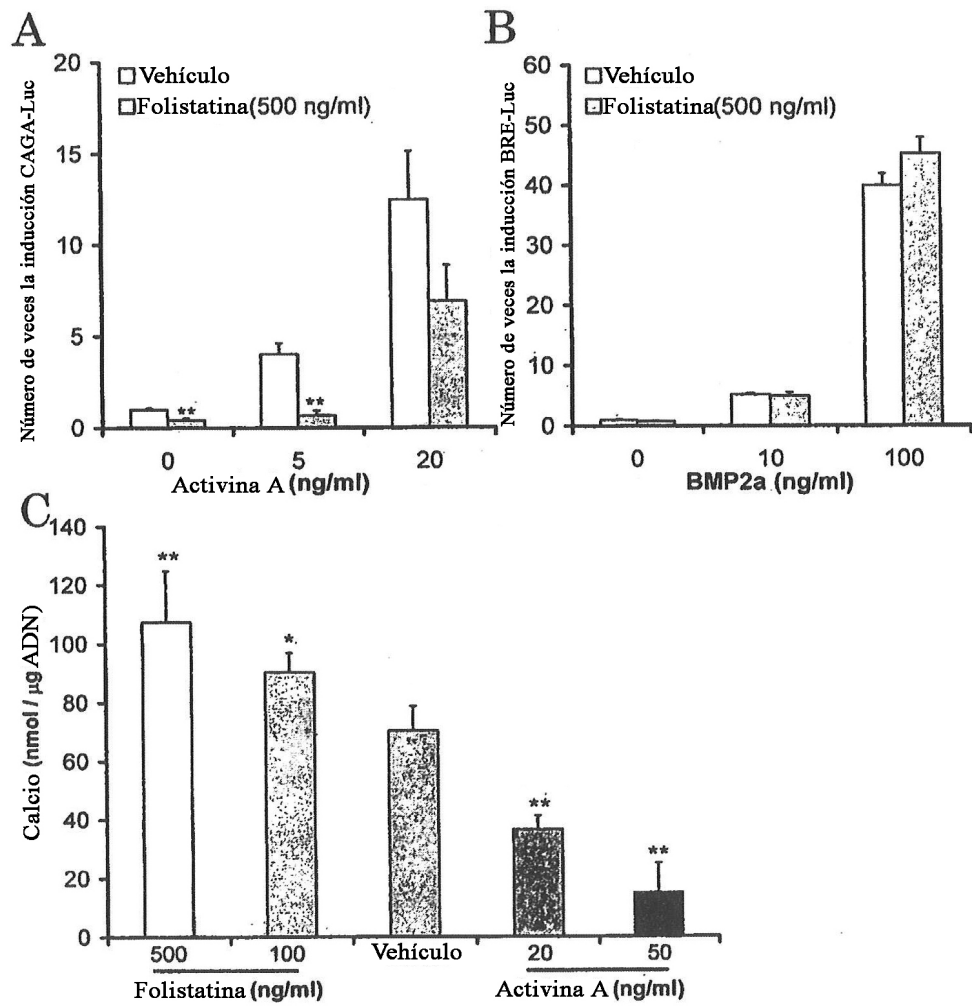


Figura 3

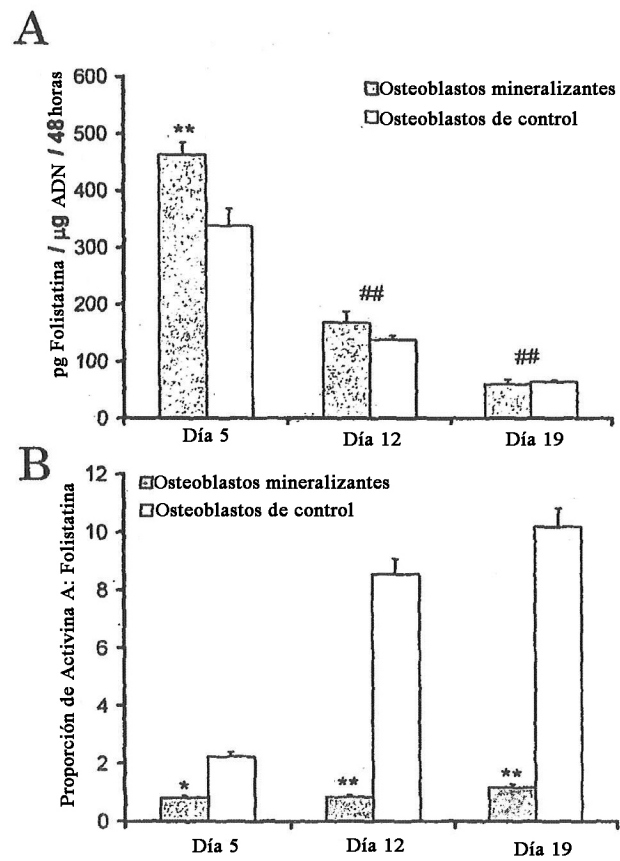


Figura 4

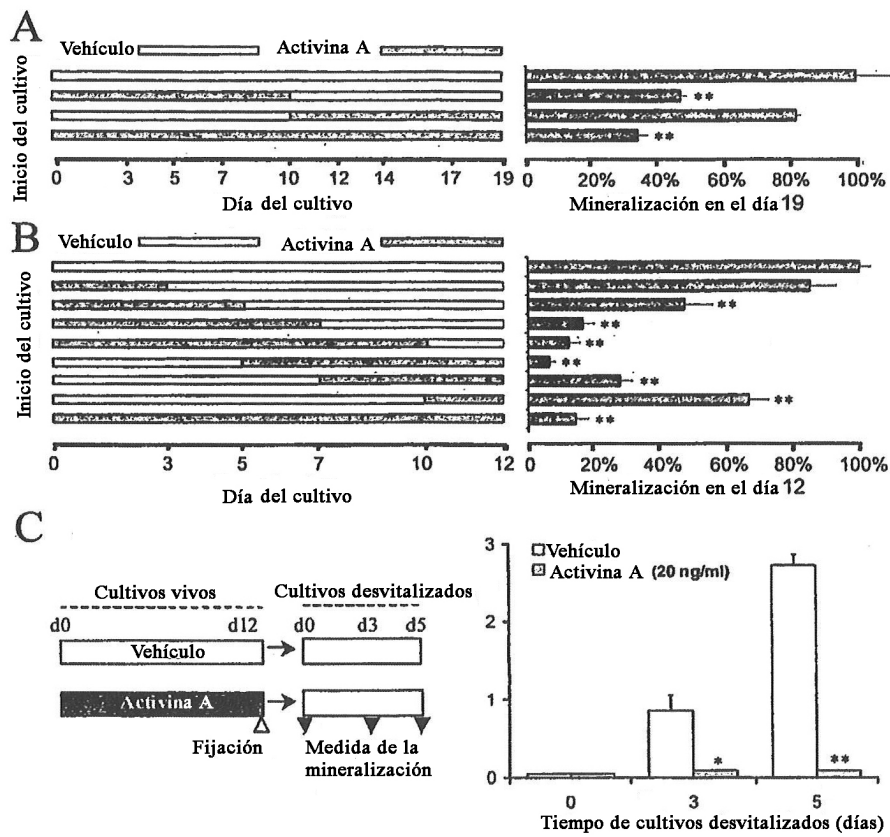


Figura 5

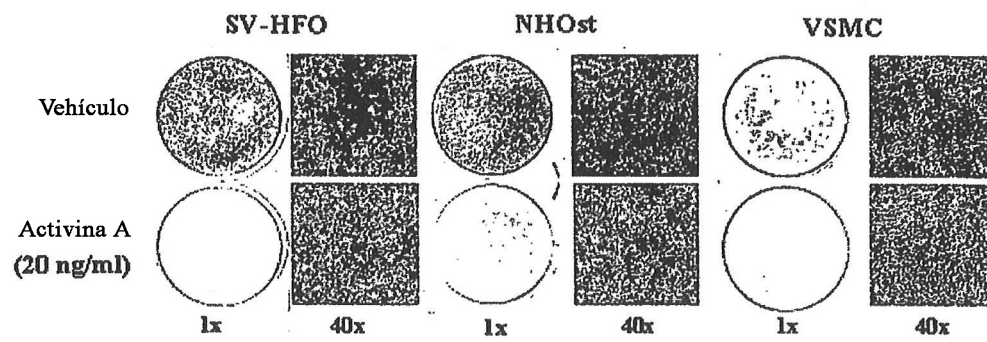


Figura 6

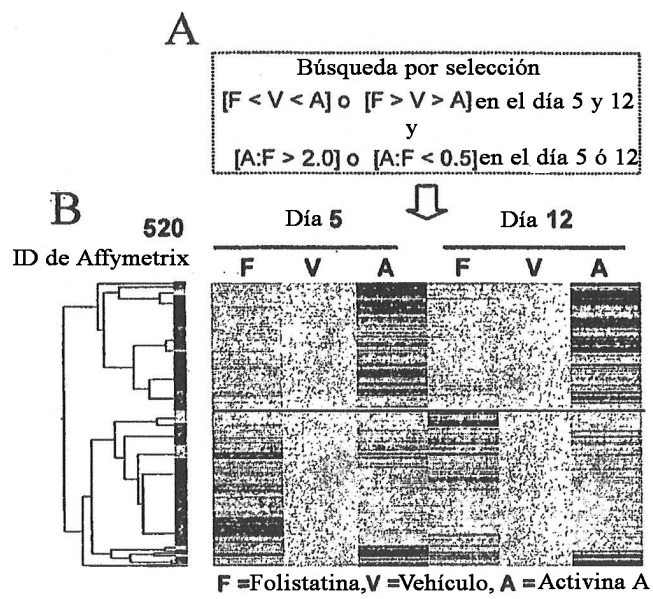


Figura 7

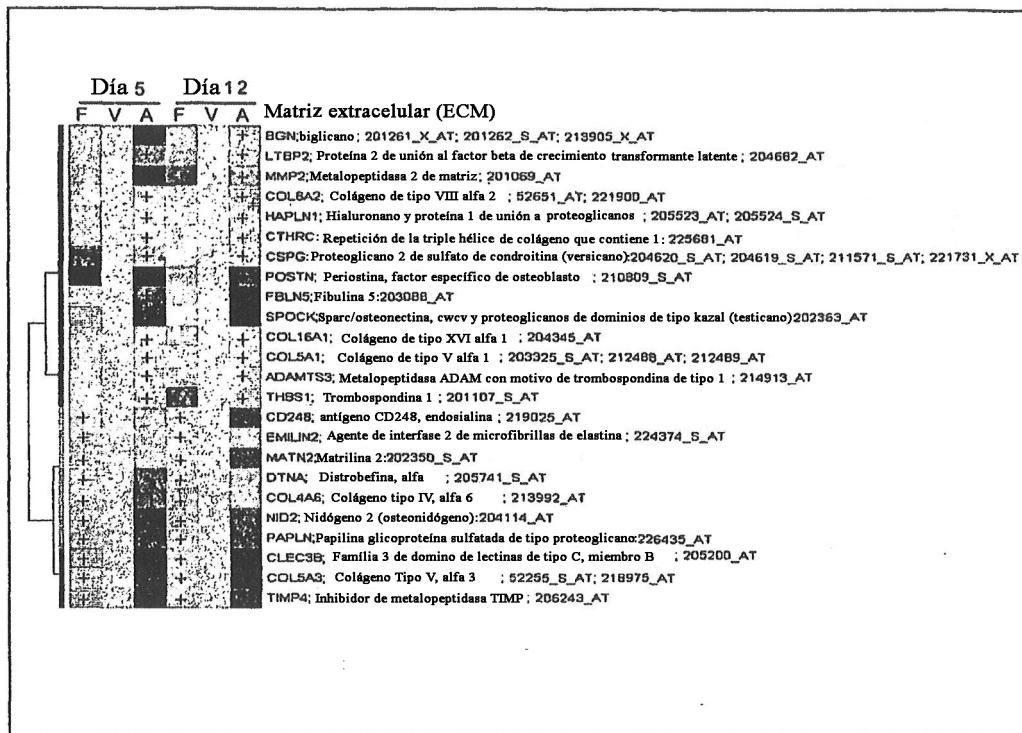


Figura 8

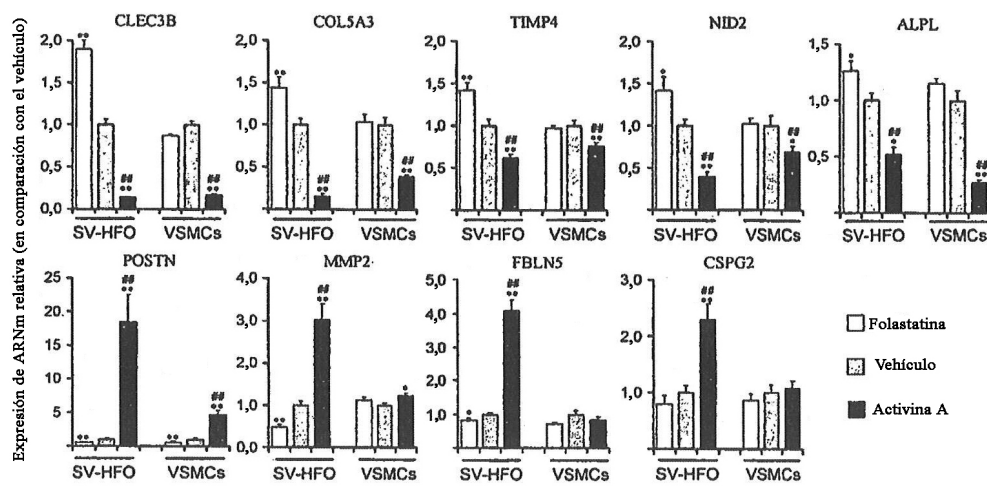


Figura 9