

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 196**

51 Int. Cl.:

A61P 19/10 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2007** **E 07712838 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013** **EP 2001499**

54 Título: **Uso de TSG-6 para el tratamiento de la osteoporosis**

30 Prioridad:

06.03.2006 GB 0604460

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.10.2013

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF MANCHESTER (100.0%)
Oxford Road
Manchester M13 9PL, GB

72 Inventor/es:

SABOKBAR, AFSIE;
DAY, ANTHONY y
MILNER, CAROLINE

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 426 196 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

Uso de TSG-6 para el tratamiento de la osteoporosis.

5 **Campo de la Invención**

[0001] La presente invención se refiere a tratar o prevenir la osteoporosis.

Antecedentes de la Invención

10

[0002] El gen 6 estimulado por el factor de la necrosis tumoral (TNF) (TSG-6) es una proteína inducida por inflamación con funciones protectoras en la artritis. TSG-6, el producto secretado ~35 kDa del gen 6 estimulado por TNF, se expresa en respuesta a mediadores inflamatorios y factores de crecimiento, donde se cree que tiene poca o ninguna expresión constitutiva de la proteína en tejido sanos (Milner & Day (2003) J. Cell Sci. 116, 1863-1873).

15

[0003] Hay una creciente evidencia de que TSG-6, mientras que se induzca en respuesta a la inflamación, tiene propiedades antiinflamatorias y condroprotectoras, convirtiéndola en un inhibidor endógeno de la destrucción articular. A este respecto, se ha descubierto que TSG-6 tiene diversas actividades biológicas, tales como la inhibición de la migración de neutrófilos, la regulación por disminución de la actividad de la plasmina, y la reticulación de las cadenas de hialuronano (HA), que suelen contribuir a sus propiedades condroprotectores (Wisniewski y col. (1996) J. Immunol. 156, 1609-1615; y Milner y col., (2006) Biochem. Soc. Trans. 34, 446-450).

20

[0004] TSG-6, que está compuesta casi en su totalidad de dominios Link y CUB_C contiguos, se une a una diversidad de proteínas y ligandos de glicosaminoglicanos (incluyendo HA, condroitin-4-sulfato, agregano, inter- α -inhibidor (α I), pentraxina 3, trombospondina-1, fibronectina y heparina/sulfato de heparano), donde la mayoría de estas interacciones están mediadas a través de su dominio del módulo Link. Estudios sobre mutagénesis han revelado que hay presentes al menos tres superficies de unión a ligando no solapantes en el módulo Link (Mahoney y col. (2005) J. Biol. Chem. 280, 27044-27055; y Kuznetsova y col. (2005) J. Biol. Chem. 280, 30899-30908). Hasta la fecha, el único ligando identificado para el dominio CUB_C es la fibronectina (DJ Mahoney & AJ Day, datos no publicados). Además, este dominio contiene un sitio de unión a catión divalente (Rugg y col. (2005) J. Biol. Chem. 280, 25674-25686).

25

30

[0005] Se ha detectado TSG-6 en el contexto de enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide (AR), donde está presente en el líquido sinovial, el cartílago y la sinovia. Es probable que TSG-6 se produzca localmente en tejidos articulares, ya que su expresión puede inducirse en condrocitos humanos cultivados por TNF, IL-1, IL-6, TGF- β y PDGF y se expresa constitutivamente por los sinoviocitos de pacientes con AR, donde su producción se potencia adicionalmente por el tratamiento con IL-1, TNF y IL-17 (Milner y col., (2006) Biochem. Soc. Trans. 34, 446-450).

35

40

[0006] De forma importante, varios estudios recientes han revelado que TSG-6 tiene una función protectora en modelos experimentales de artritis. Por ejemplo, en un modelo de artritis inducida por colágeno (AIC; una poliartrosis autoinmune con una histopatología similar a la AR humana), hubo una aparición tardía de los síntomas y una reducción de tanto la incidencia de la enfermedad como de la inflamación/destrucción articular en ratones transgénicos TSG-6 o ratones no manipulados tratados sistémicamente con TSG-6 humana recombinante (Mindrescu y col. (2000) Arthritis Rheum. 43, 2668-2677; y Mindrescu y col. (2002) Arthritis Rheum. 46, 2453-2464). En animales transgénicos TSG-6, se observó un efecto de mejora comparable a un tratamiento con anticuerpos anti-TNF. Además, en ratones transgénicos TSG-6 específico de cartílago, la instigación de artritis inducida por antígeno (AIA; un modelo de artritis monoarticular) dio como resultado un daño del cartílago tardío comparado con los controles, con una degradación reducida de agregano por MMP y agreganasa, y hubo evidencia de regeneración del cartílago, 4-5 semanas después de la aparición de la enfermedad en estos animales (Glant y col. (2002) Arthritis Rheum. 46, 2207-2218). Se observaron efectos condroprotectores similares en ratones no manipulados en los que se inyectó TSG-6 murina recombinante TSG-6 directamente en la articulación afectada en AIA o por vía intravenosa en artritis inducida por proteoglicano (AIP; un modelo de AR humana) (Bardos y col. (2001) Am. J. Pathol. 159, 1711-1721).

45

50

55

[0007] Los efectos antiinflamatorios y condroprotectores de TSG-6 observados en estos estudios se deben probablemente a más de un mecanismo. Sobre todo, TSG-6 es un potente inhibidor de la extravasación de neutrófilos *in vivo* y también está implicado en la inhibición de la red de proteasa a través de su potenciación de la actividad anti-plasmina de α I, donde la plasmina es un regulador clave de la proteólisis durante la inflamación, por ejemplo, a través de su activación de MMP (Wisniewski y col. (1996) J. Immunol. 156, 1609-1615; y Getting y col.

60

(2002) J. Biol. Chem. 277, 51068-51076). A este respecto, los ratones que carecen de TSG-6 desarrollan una forma acelerada y mucho más grave de AIP, con una degradación del cartílago y erosión ósea rápida y extensa (Szántó y col. (2004) Arthritis Rheum. 50, 3012-3022). Se sugirió el aumento de la infiltración de neutrófilos y la actividad de la plasmina para tener en cuenta estos efectos en los ratones TSG-6^{-/-}.

5

Resumen de la invención

[0008] Los presentes inventores han mostrado que TSG-6 inhibe la resorción ósea por osteoclastos. Los osteoclastos son células multinucleadas grandes que se obtienen a partir del linaje de monocitos/macrófagos y degradan la matriz ósea y los minerales en el proceso de resorción ósea. Los presentes inventores también han mostrado que la ausencia de TSG-6 en ratones con genes manipulados TSG-6 conduce a un aumento de la resorción ósea por osteoclastos. Los presentes inventores han mostrado que TSG-6 es útil en el tratamiento y la prevención de una enfermedad o afección ósea asociada con la resorción ósea por osteoclastos. Los presentes inventores también han demostrado que la administración de osteoprotegerina (OPG) en combinación con TSG-6 da como resultado un efecto sinérgico. Una combinación de TSG-6 y OPG inhibe la resorción ósea por osteoclastos en mayor medida que la suma de cada factor en solitario.

[0009] De acuerdo con la presente invención, se proporciona de este modo un polipéptido TSG-6, o un polinucleótido que codifica un polipéptido TSG-6, para su uso en un procedimiento para el tratamiento o prevención de la osteoporosis en el que el polipéptido TSG-6 o polinucleótido no se administra con pentraxina larga 3 (PTX3). En una realización preferida, el polipéptido TSG-6 o polinucleótido se administra en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un polipéptido OPG, un polinucleótido que codifica un polipéptido OPG o un mimético OPG.

[0010] La presente invención también proporciona el uso de un polipéptido TSG-6, o un polinucleótido que codifica un polipéptido TSG-6, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la osteoporosis, en el que el polipéptido TSG-6 o polinucleótido no se administra con pentraxina larga 3 (PTX3). En una realización preferida, el medicamento se administra al sujeto en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un polipéptido OPG, un polinucleótido que codifica un polipéptido OPG o un mimético OPG.

30

[0011] La invención proporciona adicionalmente:

- un polipéptido TSG-6, o un polinucleótido que codifica un polipéptido TSG-6, y un polipéptido OPG, un polinucleótido que codifica un polipéptido OPG o un mimético OPG para su uso en un procedimiento para el tratamiento o prevención de la osteoporosis; y

35

- un producto que contiene:

(a) un polipéptido TSG-6, o un polinucleótido que codifica un polipéptido TSG-6; y

40

(b) un polipéptido OPG, un polinucleótido que codifica un polipéptido OPG o un mimético OPG;

para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento o prevención de la osteoporosis.

[0012] Una ventaja de la presente invención es que el polipéptido TSG-6 o polinucleótido puede tener efectos antiinflamatorios y/o condroprotectores además de inhibir la resorción ósea por osteoclastos. Estos efectos antiinflamatorios y/o condroprotectores pueden resultar de la inhibición de la migración de neutrófilos, la regulación por disminución de la actividad de la plasmina y/o la reticulación mediada por TSG-6 de cadenas de HA.

Breve Descripción de las Figuras

[0013]

La figura 1 muestra el efecto de TSG-6 en la osteoclastogénesis. Se determinó la formación de osteoclastos humanos mediada por sRANKL/M-CSF en ausencia (barras claras en el lado derecho) y en presencia (barras oscuras en el lado izquierdo) de TSG-6 humana recombinante (25 ng/ml (0,8 nM)). Los datos (n = 8 láminas de dentina) se expresan como los valores medios \pm E.S. de 2 experimentos independientes, de 4 réplicas cada uno.

La figura 2 muestra el efecto inhibitorio de TSG-6 sobre la resorción lacunar en un intervalo de concentraciones de TSG-6. Los datos (n = 8 láminas de dentina) se expresan como los valores medios \pm E.S. de 2 experimentos independientes, de 4 réplicas cada uno.

60

La figura 3 muestra una comparación de las actividades resorptivas óseas de los osteoclastos derivados de la médula ósea de ratones no manipulados (NM, barras del lado izquierdo) y TSG-6^{-/-} (KO, barras del lado derecho). Los datos (n = 4 láminas de dentina) se expresan como los valores medios ± E.S. de 2 experimentos independientes, de 4
5 réplicas.

La figura 4 muestra la interacción de TSG-6 con sRANKL. TSG-6 de longitud completa, Link_TSG6 o CUB_C_TSG6 se cubrieron en placas de microtitulación a un intervalo de concentraciones y se determinó la unión de sRANKL (5 pmol/pocillo) usando un anticuerpo específico de RANKL. Todos los datos se representan como los valores de
10 absorbancia media (405 nm) (n = 8) ± E.S.

La figura 5 muestra la cuantificación de TSG-6 y OPG en el líquido sinovial de pacientes con diversos trastornos óseos. Los niveles de proteínas en diversos trastornos óseos se determinaron usando ensayos ELISA "diseñados en el laboratorio". Los niveles de TSG-6 se muestran en las barras claras en el lado izquierdo. Los niveles de OPG se
15 muestran en las barras oscuras en el lado derecho. Esta figura indica la variación en los niveles de TSG-6 y OPG dependiendo de la gravedad y fase de las enfermedades óseas osteoartritis (OA), artropatía por pirofosfato (PPA), artritis reumatoide (AR) y gota. Cada muestra se evaluó por triplicado y se proporciona el número de muestras de líquido sinovial para cada afección (número N). Los valores se expresan como la media ± error típico de la media para cada grupo.
20

La figura 6 muestra una comparación entre los niveles de TSG-6 y OPG en las muestras de líquido sinovial de pacientes con osteoartritis (OA) (n = 20). Estos datos demuestran que la variabilidad en los niveles de TSG-6, en comparación con los niveles de OPG, podría contribuir a la extensión y la gravedad de la enfermedad.

25 **Breve Descripción de las Secuencias**

[0014] La SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la variante alotípica Q144 de longitud completa de TSG-6 humana.

30 **[0015]** La SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia aminoacídica de variante alotípica Q144 de longitud completa de TSG-6 humana. Esta variante alotípica tiene un residuo de glutamina (Q) en la posición 144. Es la variante alotípica más común y se encuentra en aproximadamente el 86% de la población caucásica (Nentwich y col. (2002) **277**, 15354-15362).

35 **[0016]** La SEQ ID NO: 3 (residuos 18-277 de la SEQ ID NO: 2) muestra la secuencia aminoacídica de la variante alotípica Q144 de TSG-6 humana sin la secuencia señal.

[0017] La SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la variante alotípica R144 de longitud completa de TSG-6 humana.
40

[0018] La SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia aminoacídica de variante alotípica R144 de longitud completa de TSG-6 humana. Esta variante alotípica tiene un residuo de arginina (R) en la posición 144. Es la variante alotípica menos común y se encuentra en aproximadamente el 14% de la población caucásica (Nentwich y col. (2002) **277**, 15354-15362).
45

[0019] La SEQ ID NO: 6 (residuos 18-277 de la SEQ ID NO: 5) muestra la secuencia aminoacídica de la variante alotípica R144 de TSG-6 humana sin la secuencia señal.

[0020] La SEQ ID NO: 7 (residuos 37-128 de las SEQ ID NOs: 2 y 5) muestra la secuencia aminoacídica de el
50 módulo Link de TSG-6 humana.

[0021] La SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el Link_TSG6 usado en los Ejemplos (Day y col. (1996) Protein Expr. Pruif. 8, 1-16).

55 **[0022]** La SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia aminoacídica del Link_TSG6 usado en los Ejemplos. Los residuos 3-95 de la SEQ ID NO: 9 corresponden a la SEQ ID NO: 7 (residuos 37-128 de las SEQ ID NOs: 2 y 5). La metionina de iniciación (Met-1) se elimina en la expresión de Link_TSG6 (Day y col. (1996) Protein Expr. Pruif. 8, 1-16).

[0023] La SEQ ID NO: 10 (residuos 129-277 de la SEQ ID NO: 2) muestra la secuencia aminoacídica del dominio
60 CUB_C de la variante alotípica Q144 de TSG-6 humana.

[0024] La SEQ ID NO: 11 (residuos 129-277 de la SEQ ID NO: 5) muestra la secuencia aminoacídica del dominio CUB_C de la variante alotípica R144 de TSG-6 humana.

[0025] La SEQ ID NO: 12 muestra la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el CUB_C_TSG6 usado en los Ejemplos.

[0026] La SEQ ID NO: 13 muestra la secuencia aminoacídica del CUB_C_TSG6 usado en los Ejemplos. Los residuos 2-150 de la SEQ ID NO: 13 corresponden a la SEQ ID NO: 11 (residuos 129-277 de la SEQ ID NO: 5). La metionina de iniciación (Met-1) se elimina en la expresión de CUB_C_TSG6 (AJ Day, datos no publicados).

[0027] La SEQ ID NO: 14 muestra la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la OPG humana de longitud completa.

[0028] La SEQ ID NO: 15 muestra la secuencia aminoacídica de OPG humana de longitud completa.

Descripción Detallada de la Invención

[0029] La presente invención proporciona un polipéptido TSG-6, o un polinucleótido que codifica un polipéptido TSG-6, para su uso en un procedimiento para el tratamiento o prevención de la osteoporosis, en el que el polipéptido TSG-6 o polinucleótido no se administra con pentraxina larga 3 (PTX3). En una realización preferida, la invención comprende adicionalmente administrar al sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un polipéptido OPG, un polinucleótido que codifica un polipéptido OPG o un mimético OPG.

Polipéptidos TSG-6

[0030] El polipéptido TSG-6 es preferiblemente TSG-6 humana, o una variante o fragmento de TSG-6 humana que retiene la actividad de unión a RANKL. El polipéptido TSG-6 tiene la capacidad de inhibir la resorción ósea por osteoclastos. La variante puede ser un polipéptido TSG-6 de otro organismo, tal como un primate, un ratón o una rata.

[0031] El polipéptido TSG-6 comprende preferiblemente:

(a) la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 2 ó 5;

(b) una variante de la misma que tiene al menos el 50% de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 2 ó 5 y que tiene un receptor activador de la actividad de unión del ligando NFκB (RANKL); o

(c) un fragmento de (a) o (b) que tiene actividad de unión a RANKL.

[0032] Preferiblemente, el polipéptido comprende, o consiste en, la secuencia de SEQ ID NO: 2 ó 5.

[0033] El polipéptido TSG-6 puede carecer adicionalmente de una secuencia señal. Por consiguiente, el polipéptido TSG-6 comprende preferiblemente:

(a) la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 3 ó 6;

(b) una variante de la misma que tiene al menos el 50% de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 3 ó 6 y que tiene actividad de unión a RANKL; o

(c) un fragmento de (a) o (b) que tiene actividad de unión a RANKL.

[0034] El polipéptido TSG-6 consiste preferiblemente en la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3 ó 6.

[0035] El polipéptido TSG-6 puede carecer adicionalmente del dominio CUB_C. El dominio CUB_C corresponde a los residuos 129-277 de las SEQ ID NOs: 2 y 5. El polipéptido TSG-6 puede comprender únicamente el módulo Link de TSG-6 humana. El módulo Link corresponde a los residuos 37-128 de las SEQ ID NOs: 2 y 5 y se muestra en la SEQ ID NO: 7. El módulo Link es responsable de la actividad de unión a hialuronano (HA), actividad de unión a condroitin-4-sulfato, actividad de unión a agregano, actividad de unión a inter-α-inhibidor (IαI), actividad de unión a bicunina, actividad de unión a versicano, actividad de unión a dermatán sulfato, actividad de unión a pentraxina 3, actividad de unión a trombospodina-1, actividad de unión a heparina/sulfato de heparano y la actividad de unión a RANKL de TSG-6. Por consiguiente, el polipéptido TSG-6 comprende preferiblemente:

(a) la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 7;

(b) una variante de la misma que tiene al menos el 50% de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 7 y que tiene actividad de unión a RANKL; o

(c) un fragmento de (a) o (b) que tiene actividad de unión a RANKL.

[0036] El polipéptido TSG-6 consiste preferiblemente en la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 7.

10

[0037] La SEQ ID NO: 9 muestra un polipéptido recombinante que incluye el módulo Link de TSG-6 (Link_TSG6). Por consiguiente, el polipéptido TSG-6 usado en la invención comprende preferiblemente:

(a) la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 9;

15

(b) una variante de la misma que tiene al menos el 50% de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 9 y que tiene actividad de unión a RANKL; o

(c) un fragmento de (a) o (b) que tiene actividad de unión a RANKL.

20

[0038] El polipéptido TSG-6 consiste preferiblemente en la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 9.

[0039] El polipéptido TSG-6 puede carecer adicionalmente del módulo Link. El módulo Link corresponde a los residuos 37-128 de las SEQ ID NOs: 2 y 5. El polipéptido TSG-6 puede comprender únicamente el dominio CUB_C de TSG-6 humana. El dominio CUB_C corresponde a los residuos 129-277 de las SEQ ID NOs: 2 y 5 y se muestra en las SEQ ID NOs: 10 y 11. El módulo CUB también es responsable de la actividad de unión a fibronectina de TSG-6 y de la actividad de unión a RANKL de TSG-6. Por consiguiente, el polipéptido TSG-6 comprende preferiblemente:

(a) la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 10 u 11;

30

(b) una variante de la misma que tiene al menos el 50% de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 10 u 11 y que tiene actividad de unión a RANKL; o

(c) un fragmento de (a) o (b) que tiene actividad de unión a RANKL.

35

[0040] El polipéptido TSG-6 consiste preferiblemente en la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 10 u 11.

[0041] La SEQ ID NO: 13 muestra un polipéptido recombinante que incluye el dominio CUB_C de TSG-6 (CUB_C_TSG-6). Por consiguiente, el polipéptido TSG-6 usado en la invención comprende preferiblemente:

40

(a) la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 13;

(b) una variante de la misma que tiene al menos el 50% de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 13 y que tiene actividad de unión a RANKL; o

45

(c) un fragmento de (a) o (b) que tiene actividad de unión a RANKL.

[0042] El polipéptido TSG-6 consiste preferiblemente en la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 13.

[0043] Los polipéptidos variantes son aquellos para los que la secuencia aminoacídica varía de la que hay en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13, pero que retiene la función de TSG-6. Por lo tanto, los polipéptidos variantes inhiben la resorción ósea por osteoclastos. Los polipéptidos variantes se unen a RANKL.

[0044] Los polipéptidos variantes típicamente también se unen a HA, condroitin-4-sulfato, agregano, inter- α -inhibidor ($\alpha 1$), bicunina, versicano, dermatán sulfato, pentraxina 3, trombospondina-1, heparina/sulfato de heparano y/o fibronectina. Los polipéptidos variantes también pueden tener efectos antiinflamatorios y/o condroprotectores.

[0045] La activación de unión de los polipéptidos variantes puede modificarse para producir diferentes efectos en un sujeto tratado de acuerdo con la invención. Por ejemplo, un polipéptido variante que es incapaz de unirse al inter- α -inhibidor ($\alpha 1$) puede no producir efectos antiinflamatorios en el sujeto. Como alternativa, un polipéptido variante

que es incapaz de unirse a HA puede no producir efectos condroprotectores en el sujeto.

[0046] Típicamente, los polipéptidos con más de aproximadamente el 50%, 55% o el 65% de identidad, preferiblemente al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% y particularmente preferiblemente al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% de identidad, con la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13 se consideran variantes de la proteína TSG-6. Dichas variantes incluyen variantes alélicas y la delección, modificación o adición de aminoácidos individuales o grupos de aminoácidos en la secuencia de la proteína, siempre que el péptido mantenga la funcionalidad básica de TSG-6. La identidad de variantes de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13 puede medirse sobre una región de al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 150, al menos 200 o al menos 250 o más aminoácidos contiguos de la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13, o más preferiblemente sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13.

[0047] Las variantes de la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9 contienen preferiblemente los residuos que se muestran esenciales para la unión a hialuronano en Mahoney y col. (2001) J. Biol. Chem. 276, 22764-22771 y Blundell y col. (2003) J. Biol. Chem. 278, 49261-49270. Las variantes de la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 2 ó 5 contienen preferiblemente los residuos Lys-46 y/o Tyr-47 y/o Tyr-94 y/o Phe-105 y/o Tyr-113 de SEQ ID NO: 2 ó 5. Mucho más preferiblemente, la variante de SEQ ID NO: 2 ó 5 contiene cada uno de los residuos Lys-46, Tyr-47, Tyr-94, Phe-105 y Tyr-113 de SEQ ID NO: 2 ó 5.

[0048] Las variantes de la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 3 ó 6 contienen preferiblemente los residuos Lys-29 y/o Tyr-30 y/o Tyr-77 y/o Phe-88 y/o Tyr-96 de SEQ ID NO: 3 ó 6. Mucho más preferiblemente, la variante de SEQ ID NO: 3 ó 6 contiene cada uno de los residuos Lys-29, Tyr-30, Tyr-77, Phe-88 y Tyr-96 de SEQ ID NO: 3 ó 6.

[0049] Las variantes de la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 7 contienen preferiblemente los residuos Lys-10 y/o Tyr-11 y/o Tyr-58 y/o Phe-69 y/o Tyr-77 de SEQ ID NO: 7. Mucho más preferiblemente, la variante de SEQ ID NO: 7 contiene cada uno de los residuos Lys-10, Tyr-11, Tyr-58, Phe-69 y Tyr-77 de SEQ ID NO: 7.

[0050] Las variantes de la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 9 contienen preferiblemente los residuos Lys-12 y/o Tyr-13 y/o Tyr-60 y/o Phe-71 y/o Tyr-79 de SEQ ID NO: 9. Mucho más preferiblemente, la variante de SEQ ID NO: 9 contiene cada uno de los residuos Lys-12, Tyr-13, Tyr-60, Phe-71 y Tyr-79 de SEQ ID NO: 9.

[0051] La identidad aminoacídica puede calcularse usando cualquier algoritmo adecuado. Por ejemplo, el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede usarse para calcular la homología (por ejemplo usado en su configuración predeterminada) (Devereux y col. (1984) Nucleic Acids Research 12, 387-395). Los algoritmos PILEUP y BLAST pueden usarse para calcular la homología o alinear secuencias (tal como identificando secuencias equivalentes o correspondientes (típicamente en su configuración predeterminada), por ejemplo, como se describe en Altschul (1993) J Mol Evol 36, 290-300; Altschul, y col. (1990) J Mol Biol 215, 403-10).

[0052] El software para realizar análisis BLAST está a disposición del público a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica en primer lugar identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de búsqueda que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral de valor positivo T al alinearse con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de una palabra vecina (Altschul y col., anteriormente). Estos aciertos de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP que las contengan. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en la medida en que la puntuación de alineación acumulativa pueda aumentarse. Las extensiones para los éxitos de palabras en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineación acumulativa está dentro de la cantidad X de su valor máximo conseguido; la puntuación acumulativa va hasta cero o menor, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se llega al final de cada secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915-10919) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4, y una comparación de ambas hebras.

[0053] El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias, véase, por ejemplo,

Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5873-5787. Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor probabilidad de suma (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que tendrá lugar por casualidad una correspondencia entre dos secuencia de de polinucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a la otra secuencia si la menor probabilidad de suma en la comparación de la primera secuencia con respecto a la segunda secuencia es menos de aproximadamente 1, preferiblemente menos de aproximadamente 0,1, más preferiblemente menos de aproximadamente 0,01, y mucho más preferiblemente menos de aproximadamente 0,001.

[0054] Las secuencias variantes típicamente difieren en al menos 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50 o más mutaciones (que pueden ser sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos). Por ejemplo, pueden hacerse de 1 a 50, de 2 a 30, de 3 a 20 o de 5 a 10 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos. El polipéptido modificado generalmente retiene la unión a RANKL. Las sustituciones son preferiblemente sustituciones conservativas, por ejemplo de acuerdo con la siguiente Tabla. Los aminoácidos del mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

ALIFÁTICO	No Polar	GAP
		ILV
	Polar - descargado	CSTM
		NQ
Polar - cargado	D E	
	KR	
AROMÁTICO		HFVY

[0055] El fragmento del polipéptido TSG-6 usado en la invención retiene la función de TSG-6. Por lo tanto, los polipéptidos de fragmentos inhiben la resorción ósea por osteoclastos. Los polipéptidos de fragmentos se unen a RANKL.

[0056] Los polipéptidos de fragmentos típicamente también se unen a HA, condroitin-4-sulfato, agregano, inter- α -inhibidor ($I\alpha I$), bicunina, versicano, dermatán sulfato, pentraxina 3, trombospondina-1, heparina/sulfato de heparano y/o fibronectina. Los polipéptidos de fragmentos también pueden tener efectos antiinflamatorios y/o condroprotectores.

[0057] La actividad de unión de los polipéptidos de fragmentos puede modificarse para producir diferentes efectos en un sujeto tratado de acuerdo con la invención. Por ejemplo, un polipéptido de fragmento que es incapaz de unirse a inter- α -inhibidor ($I\alpha I$) puede no producir efectos antiinflamatorios en el sujeto. Como alternativa, un polipéptido de fragmentos que es incapaz de unirse a HA puede no producir efectos condroprotectores en el sujeto.

[0058] El fragmento del polipéptido TSG-6 usado en la invención es típicamente al menos 10, por ejemplo al menos 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o más aminoácidos de longitud, hasta 100, 150, 200 ó 250 aminoácidos de longitud, siempre que retenga la actividad de unión a RANKL de TSG-6. Preferiblemente, el fragmento del polipéptido TSG-6 incluye la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 7. Los fragmentos de la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9 contienen preferiblemente los residuos que se muestra que son esenciales para la unión de hialuronano en Mahoney y col. (2001) J. Biol. Chem. 276, 22764-22771 y Blundell y col. (2003) J. Biol. Chem. 278, 49261-49270. Los fragmentos de la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 2 ó 5 contienen preferiblemente los residuos Lys-46 y/o Tyr-47 y/o Tyr-94 y/o Phe-105 y/o Tyr-113 de SEQ ID NO: 2 ó 5. Mucho más preferiblemente, el fragmento de la SEQ ID NO: 2 ó 5 contiene cada uno de los residuos Lys-46, Tyr-47, Tyr-94, Phe-105 y Tyr-113 de SEQ ID NO: 2 ó 5.

[0059] Los fragmentos de la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 7 contienen preferiblemente los residuos Lys-10 y/o Tyr-11 y/o Tyr-58 y/o Phe-69 y/o Tyr-77 de SEQ ID NO: 7. Mucho más preferiblemente, el fragmento de la SEQ ID NO: 7 contiene cada uno de los residuos Lys-10, Tyr-11, Tyr-58, Phe-69 y Tyr-77 de SEQ ID NO: 7.

[0060] Los fragmentos de la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 9 contienen preferiblemente los residuos Lys-12 y/o Tyr-13 y/o Tyr-60 y/o Phe-71 y/o Tyr-79 de SEQ ID NO: 9. Mucho más preferiblemente, el fragmento de la SEQ ID NO: 9 contiene cada uno de los residuos Lys-12, Tyr-13, Tyr-60, Phe-71 y Tyr-79 de SEQ ID NO: 9.

[0061] Un fragmento preferido para su uso en la invención es los residuos 36-133 de la SEQ ID NO: 1.

[0062] Los polipéptidos TSG-6 usados en la invención pueden modificarse químicamente, por ejemplo, modificarse

postraduccionalmente. Por ejemplo, pueden glicosilarse, fosforilarse o pueden comprender residuos aminoacídicos modificados. Pueden modificarse por la adición de residuos de histidina para facilitar su purificación o mediante la adición de una secuencia señal para promover la inserción en la membrana celular. Dichos polipéptidos modificados entran dentro del alcance del término "polipéptido" usado en este documento.

5

[0063] La actividad de unión a RANKL puede determinarse por medio de un ensayo adecuado. Por ejemplo, la actividad de unión a RANKL de un polipéptido TSG-6 puede determinarse usando el procedimiento que se describe en los Ejemplos. Se conocen bien en la técnica ensayos adecuados para determinar la capacidad de un polipéptido TSG-6 para unirse a HA, condroitin-4-sulfato, agregano, inter- α -inhibidor ($I\alpha I$), bicunina, versicano, dermatán sulfato, pentraxina 3, trombospondina-1, heparina/sulfato de heparano y fibronectina (Getting y col. (2002) J. Biol. Chem. 277, 51068-51076; Mahoney y col. (2005) J. Biol. Chem. 280, 27044-27055; Salustri y col. (2004) Development 131, 1577-1586; Parkar y col. (1997) FEBS Lett. 410, 413-417; Parkar y col. (1998) FEBS Lett. 428, 171-176; Mahoney y col. (2001) J. Biol. Chem. 276, 22764-22771; Nentwich y col. (2002) J. Biol. Chem. 277, 15354-15362; y Kuznetsova y col. (2005) J. Biol. Chem. 280, 30899-30908).

10

[0064] Los polipéptidos TSG-6 para su uso de acuerdo con la invención muestran la capacidad de inhibir la resorción ósea por osteoclastos. La actividad inhibidora osteoclástica puede determinarse por medio de un ensayo adecuado. Por ejemplo, la actividad inhibidora osteoclástica de un polipéptido TSG-6 puede determinarse usando cualquiera de los procedimientos descritos en el Ejemplo que se indica a continuación.

15

[0065] Los polipéptidos TSG-6 para su uso en la invención pueden estar en una forma sustancialmente aislada. Se entenderá que el polipéptido puede mezclarse con vehículos o diluyentes que no interferirán con los fines pretendidos del polipéptido y aún se considerarán como sustancialmente aislados. Un polipéptido para su uso en la invención también puede estar en una forma sustancialmente purificada, en cuyo caso comprenderá generalmente el polipéptido en una preparación en la que más del 50%, por ejemplo más del 80%, 90%, 95% o el 99%, en peso del polipéptido en la preparación es un polipéptido de la invención.

20

[0066] Los polipéptidos TSG-6 para su uso en la presente invención pueden ser polipéptidos naturales. Los polipéptidos pueden aislarse a partir de cualquier organismo adecuado que exprese un polipéptido TSG-6. El polipéptido TSG-6 puede aislarse a partir de un ser humano u otro mamífero adecuado, tal como primates, ratas o ratones. Los polipéptidos para su uso en la invención también pueden prepararse en forma de fragmentos de dichos polipéptidos aislados.

25

[0067] Adicionalmente, los polipéptidos TSG-6 también pueden prepararse sintéticamente o por medios recombinantes. Por ejemplo, un polipéptido TSG-6 recombinante puede producirse transfectando células en un cultivo con un vector de expresión que comprende una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido unido de forma operativa a secuencias de control adecuadas, cultivando las células, extrayendo y purificando el polipéptido TSG-6 producido por las células. Se conocen bien en la técnica procedimientos para la producción recombinante de polipéptidos (por ejemplo, Sambrook y col., 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual, 3ª edición, Cold Harbour Laboratory Press).

30

[0068] La secuencia aminoacídica de polipéptidos TSG-6 para su uso en la invención puede modificarse para incluir aminoácidos sintéticos o para aumentar la estabilidad del compuesto. Cuando los polipéptidos se producen por medios sintéticos, dichos aminoácidos pueden introducirse durante la producción. Los polipéptidos también pueden modificarse siguiendo una producción sintética o recombinante.

35

[0069] Los polipéptidos TSG-6 para su uso en la invención también pueden producirse usando D-aminoácidos. En tales casos, los aminoácidos se unirán en la secuencia inversa en la orientación C a N. Esto es habitual en la técnica para producir dichos polipéptidos.

40

[0070] Se conocen en la técnica varias modificaciones de cadenas laterales y pueden hacerse a las cadenas laterales de los polipéptidos TSG-6, con la condición de que los polipéptidos retengan la actividad inhibidora osteoclástica.

45

55 Polinucleótidos TSG-6

[0071] De acuerdo con la invención, se usa un polinucleótido que codifica un polipéptido TSG-6, una variante o fragmento para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con la resorción ósea por osteoclastos. En particular, el polinucleótido preferiblemente comprende o consiste en: (a) la secuencia codificante de SEQ ID NO: 1, 4, 8 ó 12; (b) una secuencia que se degenera como resultado del código genético con respecto a la secuencia como se define en (a); (c) una secuencia que tiene al menos el 60% de identidad con respecto a una secuencia como se

50

- define en (a) o (b) y que codifica un polipéptido que tiene actividad de unión a RANKL; o (d) un fragmento de una cualquiera de las secuencias como se define en (a), (b) o (c) que codifica un polipéptido que tiene actividad de unión a RANKL. El polinucleótido preferiblemente comprende o consiste en: (a) la secuencia codificante de SEQ ID NO: 1, 4, 8 ó 12; (b) una secuencia que se degenera como resultado del código genético con respecto a la secuencia como se define en (a); (c) una secuencia que tiene al menos el 60% de identidad con respecto a una secuencia como se define en (a) o (b) y que codifica un polipéptido que tiene la capacidad de inhibir la resorción ósea por osteoclastos; o (d) un fragmento de una cualquiera de las secuencias como se define en (a), (b) o (c) que codifica un polipéptido que tiene la capacidad de inhibir la resorción ósea por osteoclastos.
- 10 **[0072]** Típicamente, el polinucleótido TSG-6 es ADN. Sin embargo, el polinucleótido puede ser un polinucleótido de ARN. El polinucleótido puede ser monocatenario o de doble cadena, y puede incluir en su interior nucleótidos sintéticos o modificados.
- [0073]** Un polinucleótido de la invención puede hibridar típicamente con la secuencia codificante o el complemento de la secuencia codificante de SEQ ID NO: 1, 4, 8 ó 12 a un nivel significativamente por encima del nivel de fondo. Por ejemplo, la hibridación de fondo puede tener lugar debido a otros ADN presentes en una biblioteca de ADN. El nivel de señal generado por la interacción entre un polinucleótido de la invención y la secuencia codificante o complemento de la secuencia codificante de SEQ ID NO: 1, 4, 8 ó 12 es típicamente al menos 10 veces, preferiblemente al menos 100 veces, tan intensa como las interacciones entre otros polinucleótidos y la secuencia codificante de SEQ ID NO: 1, 4, 8 ó 12. La intensidad de la interacción puede medirse, por ejemplo, radiomarcando la sonda, por ejemplo con ³²P. La hibridación selectiva se consigue típicamente usando condiciones de media a alta rigurosidad. Sin embargo, dicha hibridación puede realizarse bajo cualquier condición adecuada conocida en la técnica (véase, Sambrook y col., 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual, 3ª edición, Cold Harbour Laboratory Press). Por ejemplo, si se requiere una alta rigurosidad, las condiciones adecuadas incluyen de 0,1 a 0,2 x SSC a 60 °C hasta 65 °C. Si se requiere una rigurosidad inferior, las condiciones adecuadas incluyen 2 x SSC a 60 °C.
- [0074]** La secuencia codificante de SEQ ID NO: 1, 4, 8 ó 12 puede modificarse por sustituciones de nucleótidos, por ejemplo de 1, 2 ó 3 a 10, 25, 50, 100, 150 ó 200 sustituciones. El polinucleótido de SEQ ID NO: 1, 4, 8 ó 12 puede modificarse alternativa o adicionalmente por una o más inserciones y/o deleciones y/o por una extensión en uno o ambos extremos. También pueden incluirse secuencias adicionales, tales como secuencias señal. El polinucleótido modificado codifica un polipéptido que tiene la capacidad de inhibir la resorción ósea por osteoclastos. El polinucleótido modificado codifica un polipéptido que tiene actividad de unión a RANKL. El polinucleótido modificado puede codificar cualquiera de las variantes o fragmentos que se han analizado anteriormente. Pueden hacerse sustituciones degeneradas y/o pueden hacerse sustituciones que darán como resultado una sustitución aminoacídica conservativa cuando la secuencia modificada se traduzca, por ejemplo como se muestra en la Tabla que se ha indicado anteriormente.
- [0075]** Una secuencia nucleotídica que es capaz de hibridar selectivamente con el complemento de la secuencia codificante de ADN de SEQ ID NO: 1, 4, 8 ó 12 tendrá generalmente al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia codificante de SEQ ID NO: 1, 4, 8 ó 12 sobre una región de al menos 20, preferiblemente al menos 30, por ejemplo al menos 40, al menos 60, más preferiblemente al menos 100 nucleótidos contiguos, o mucho más preferiblemente sobre la longitud completa de SEQ ID NO: 1, 4, 8 ó 12, o la longitud de SEQ ID NO: 1, 4, 8 ó 12 que codifica un polipéptido que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, 5, 9 ó 13. La identidad de secuencia puede determinarse mediante cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo como se ha descrito anteriormente.
- [0076]** Puede usarse cualquier combinación de los grados de identidad de secuencia y los tamaños mínimos que se han mencionado anteriormente para definir polinucleótidos de la invención, siendo preferidas las condiciones más rigurosas (es decir, una identidad de secuencia superior sobre longitudes mayores). Por lo tanto, por ejemplo, un polinucleótido que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia sobre 20, preferiblemente sobre 30 nucleótidos, forma un aspecto de la invención, al igual que un polinucleótido que tiene al menos el 95% de identidad de secuencia sobre 40 nucleótidos.
- 55 **[0077]** Los fragmentos de polinucleótidos tendrán preferiblemente al menos 10, preferiblemente al menos 15 o al menos 20, por ejemplo al menos 25, al menos 30 o al menos 40 nucleótidos de longitud. Típicamente tendrán hasta 40, 50, 60, 70, 100 ó 150 nucleótidos de longitud. Los fragmentos pueden ser mayores de 150 nucleótidos de longitud, por ejemplo hasta 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ó 1000 nucleótidos de longitud, o incluso hasta unos pocos nucleótidos, tales como cinco, diez o quince nucleótidos, cortos de la secuencia codificante de SEQ ID NO: 1, 4, 8 ó 12.

[0078] Los polinucleótidos para su uso en la invención pueden producirse de forma recombinante, sintéticamente o mediante cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. También pueden clonarse mediante técnicas convencionales. Los polinucleótidos se proporcionan típicamente de forma aislada y/o purificada.

5 **[0079]** En general, se producirán polinucleótidos cortos por medios sintéticos, que implica una fabricación paso a paso de la secuencia de ácidos nucleicos deseada, un nucleótido a la vez. Las técnicas para realizar esto usando técnicas automatizadas están fácilmente disponibles en la técnica.

10 **[0080]** Los polinucleótidos más grandes generalmente se producirán usando medios recombinantes, por ejemplo, usando técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto implicará elaborar un par de cebadores (por ejemplo de 15-30 nucleótidos) para una región del gen TSG-6 que se desea clonar, poner en contacto los cebadores con el ADN obtenido de una célula bacteriana, realizar una reacción en cadena de la polimerasa en condiciones que dan lugar a la amplificación de la región deseada, aislar el fragmento amplificado (por ejemplo mediante purificación de la mezcla de reacción sobre un gel de agarosa) y recuperar el ADN
15 amplificado. Los cebadores pueden diseñarse para contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados de manera que el ADN amplificado pueda clonarse en un vector de clonación adecuado.

20 **[0081]** Dichas técnicas pueden usarse para obtener toda o parte de la secuencia del gen TSG-6 que se describe en este documento. Aunque en general las técnicas que se mencionan en este documento se conocen bien en la técnica, puede hacerse referencia en particular a Sambrook y col., 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual, 3ª edición, Cold Harbour Laboratory Press.

25 **[0082]** Los polinucleótidos TSG-6 como se describe en este documento, tienen utilidad en la producción de los polipéptidos para su uso en la presente invención, que puede tener lugar *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Los polinucleótidos pueden usarse en forma de agentes terapéuticos en su propio derecho o pueden estar implicados en la síntesis de proteínas recombinantes.

30 **[0083]** Los polinucleótidos para su uso en la invención se incorporan típicamente en un vector replicable recombinante. El vector puede usarse para replicar el ácido nucleico en una célula huésped compatible. Por lo tanto, pueden elaborarse polinucleótidos para su uso en la invención introduciendo un polinucleótido TSG-6 en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula huésped compatible y madurando la célula huésped en condiciones que dan lugar a la replicación del vector.

35 **[0084]** Preferiblemente, el vector es un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido TSG-6. Dichos vectores de expresión se construyen rutinariamente en la técnica de la biología molecular y pueden, por ejemplo, implicar el uso de ADN plasmídico e iniciadores, promotores, potenciadores y otros elementos adecuados, tales como, por ejemplo, señales de poliadenilación, que pueden ser necesarias y que se posicionan en la orientación correcta con el fin de permitir la expresión de la proteína. Otros vectores adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica. A modo de ejemplo adicional a este respecto,
40 se hace referencia a Sambrook y col., 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual, 3ª edición, Cold Harbour Laboratory Press.

45 **[0085]** Preferiblemente, un polinucleótido para su uso en la invención en un vector está unido de forma operativa a una secuencia de control que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia codificante por la célula huésped, es decir, el vector es un vector de expresión. La expresión "unido de forma operativa" se refiere a la una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que los permite funcionar en su forma pretendida. Una secuencia reguladora, tal como un promotor, "unida de forma operativa" a una secuencia codificante se posiciona de tal forma que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con la secuencia reguladora.

50 **[0086]** Los vectores pueden ser, por ejemplo, vectores plasmídicos, víricos o de fagos dotados de un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión de dicho polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. El vector se adapta típicamente a su uso *in vivo*.

55 **[0087]** Pueden seleccionarse promotores y otras señales de regulación de la expresión que sean compatibles con la célula huésped para cuya expresión está diseñada. Pueden usarse promotores de mamífero, tales como promotores de β -actina. Se prefieren especialmente promotores específicos de tejidos. También pueden usarse promotores virales, por ejemplo repetición terminal larga del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV LTR), el promotor LTR del virus del sarcoma de rous (RSV), el promotor SV40, el promotor IE del citomegalovirus humano
60 (CMV), adenovirus, promotores HSV (tal como el promotor IE HSV), o promotores HPV, particularmente la región reguladora en la dirección 5' de HPV (URR). Están disponibles fácilmente en la técnica promotores virales.

5 **[0088]** El vector puede incluir adicionalmente secuencias que flanquean el polinucleótido dando lugar a polinucleótidos que comprenden secuencias homólogas a las secuencias genómicas eucariotas, preferiblemente genómicas de mamíferos. Esto permitirá la introducción de los polinucleótidos de la invención dentro del genoma de células eucariotas mediante recombinación homóloga. En particular, se puede utilizar un vector plásmido que comprende el casete de expresión flanqueado por secuencias virales para preparar un vector viral adecuado para liberar los polinucleótidos de la invención en células de mamífero. Otros ejemplos de vectores virales adecuados incluyen vectores del virus herpes simplex y de retrovirus, que incluyen lentivirus, adenovirus, virus adeno-asociados y virus HPV. Las técnicas de transferencia genética utilizando estos virus son bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden utilizar vectores de retrovirus para integrar de forma estable al polinucleótido dando lugar al polinucleótido en el genoma del huésped. En contraste, los vectores de adenovirus de replicación defectuosa permanecen episomales y, por lo tanto, permiten la expresión transitoria.

Polipéptidos OPG

15 **[0089]** En una realización preferida de la invención, un polipéptido OPG se administra en combinación con TSG-6 para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con la resorción ósea por osteoclastos. El polipéptido OPG es preferiblemente OPG humana, o una variante o fragmento de OPG humana que retiene la actividad de unión a RANKL. El polipéptido OPG tiene la capacidad de inhibir la resorción ósea por osteoclastos. La variante puede ser un polipéptido OPG de otro organismo, tal como un primate, un ratón o una rata.

[0090] El polipéptido OPG comprende preferiblemente:

- 25 (a) la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 15;
- (b) una variante de la misma que tiene al menos el 50% de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 15 y que tiene un receptor activador de actividad de unión a RANKL; o
- 30 (d) un fragmento de (a) o (b) que tiene actividad de unión a RANKL.

[0091] Preferiblemente, el polipéptido OPG comprende, o consiste en, la secuencia de SEQ ID NO: 15.

35 **[0092]** Típicamente, los polipéptidos con más de aproximadamente el 50%, 55% o el 65% de identidad, preferiblemente al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% y particularmente preferiblemente al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 99% de identidad, con la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 15 se consideran variantes de la proteína OPG. Dichas variantes incluyen variantes alélicas, y la delección, modificación o adición de aminoácidos individuales o grupos de aminoácidos en la secuencia de la proteína, siempre que el péptido mantenga la funcionalidad básica de OPG. La identidad de variantes de SEQ ID NO: 15 puede medirse sobre varias regiones de la SEQ ID NO: 15 como se ha analizado anteriormente para TSG-6. Las secuencias variantes típicamente difieren de la SEQ ID NO: 15 en una o más mutaciones, como se ha analizado anteriormente para TSG-6.

45 **[0093]** El fragmento del polipéptido OPG usado en la invención retiene la función de OPG. Por lo tanto, los polipéptidos de fragmentos inhiben la resorción ósea por osteoclastos. Los polipéptidos de fragmentos se unen a RANKL.

[0094] La actividad de unión de los polipéptidos de fragmentos puede modificarse como se ha analizado anteriormente para TSG-6.

50 **[0095]** El fragmento del polipéptido OPG usado en la invención es típicamente de al menos 10 aminoácidos de longitud como se ha analizado anteriormente para TSG-6.

[0096] Los polipéptidos OPG usados en la invención pueden modificarse químicamente como se ha analizado anteriormente para TSG-6.

55 **[0097]** La actividad de unión a RANKL y la actividad inhibidora osteoclástica del polipéptido OPG pueden determinarse como se ha analizado anteriormente para TSG-6.

60 **[0098]** Los polipéptidos OPG para su uso en la invención pueden estar en una forma sustancialmente aislada como se ha analizado anteriormente para TSG-6. Pueden ser polipéptidos naturales o estar hechos sintéticamente o mediante medios recombinantes como se ha analizado anteriormente para TSG-6.

[0099] La secuencia aminoacídica de los polipéptidos OPG para su uso en la invención puede modificarse como se ha analizado anteriormente para TSG-6.

5 Polinucleótidos OPG

[0100] En una realización preferida de la invención, un polinucleótido que codifica un polipéptido OPG, una variante o fragmento se administra en combinación con TSG-6 para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con la resorción ósea por osteoclastos. En particular, el polinucleótido preferiblemente comprende o
 10 consiste en: (a) la secuencia codificante de SEQ ID NO: 14; (b) una secuencia que se degenera como resultado del código genético con respecto a la secuencia como se define en (a); (c) una secuencia que tiene al menos el 60% de identidad con respecto a una secuencia como se define en (a) o (b) y que codifica un polipéptido que tiene actividad de unión a RANKL; o (d) un fragmento de una cualquiera de las secuencias como se define en (a), (b) o (c) que
 15 codifica un polipéptido que tiene actividad de unión a RANKL. El polinucleótido preferiblemente comprende o consiste en: (a) la secuencia codificante de SEQ ID NO: 14; (b) una secuencia que se degenera como resultado del código genético con respecto a la secuencia como se define en (a); (c) una secuencia que tiene al menos el 60% de identidad con respecto a una secuencia como se define en (a) o (b) y que codifica un polipéptido que tiene la capacidad de inhibir la resorción ósea por osteoclastos; o (d) un fragmento de una cualquiera de las secuencias como se define en (a), (b) o (c) que codifica un polipéptido que tiene la capacidad de inhibir la resorción ósea por
 20 osteoclastos.

[0101] Típicamente, el polinucleótido OPG es ADN. Sin embargo, el polinucleótido puede ser un polinucleótido de ARN. El polinucleótido puede ser monocatenario o de doble cadena, y puede incluir en ésta nucleótidos sintéticos o modificados.

25

[0102] Un polinucleótido OPG puede hibridar típicamente con la secuencia codificante o el complemento de la secuencia codificante de SEQ ID NO: 14 como se ha analizado anteriormente para TSG-6. La secuencia codificante de SEQ ID NO: 14 puede modificarse como se ha analizado anteriormente para TSG-6.

[0103] Una secuencia nucleotídica que es capaz de hibridar selectivamente con el complemento de la secuencia codificante de ADN de SEQ ID NO: 14 tendrá generalmente al menos el 60% de identidad con respecto a la secuencia codificante de SEQ ID NO: 14 sobre una región de al menos 20 nucleótidos contiguos, o mucho más preferiblemente sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 14 o la longitud de la SEQ ID NO: 14 que codifica un polipéptido que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 15 como se ha analizado anteriormente para TSG-6.

35

[0104] Los fragmentos de polinucleótidos serán preferiblemente de al menos 10 nucleótidos de longitud como se ha analizado anteriormente para TSG-6.

[0105] Los polinucleótidos OPG para su uso en la invención pueden producirse mediante cualquier medio que se ha analizado anteriormente para TSG-6. También pueden usarse para producir polipéptidos OPD como se ha analizado anteriormente para TSG-6.

40

Miméticos OPG

[0106] En una realización preferida de la invención, un mimético OPG se administra en combinación con TSG-6 para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con la resorción ósea por osteoclastos. Un mimético OPG es un factor que inhibe la resorción ósea por osteoclastos mediante la unión a e inhibiendo RANKL.

[0107] El mimético OPG puede ser un polipéptido, tal como un anticuerpo. El mimético OPG es preferiblemente
 50 AMG-162, que es un anticuerpo monoclonal de Amgen que se une a e inhibe RANKL. Como alternativa, el mimético OPG puede ser un polinucleótido que codifica un polipéptido que inhibe la resorción ósea por osteoclastos mediante la unión a e inhibiendo RANKL.

Enfermedades y Afecciones

55

[0108] De acuerdo con la invención, el polipéptido TSG-6, o polinucleótido, se usa para tratar o prevenir la osteoporosis. La resorción ósea por osteoclastos es la destrucción de la matriz y el mineral óseo por células de osteoclastos. Una enfermedad o afección asociada con la resorción ósea por osteoclastos es una enfermedad o afección en la que la velocidad de resorción ósea por osteoclastos es anormal. Una enfermedad o afección asociada
 60 con la resorción ósea por osteoclastos es una enfermedad o afección en la que los osteoclastos reabsorben (destruyen) el hueso a mayor velocidad que la velocidad de la resorción ósea (destrucción) observada en sujetos

comparables en ausencia de la enfermedad o afección. La enfermedad o afección implica un aumento de la velocidad de resorción ósea por osteoclastos.

5 **[0109]** La enfermedad o afección puede implicar una velocidad de resorción ósea que sea mayor que la velocidad de la formación ósea en el mismo sujeto. Por lo tanto, la enfermedad o afección puede implicar una pérdida ósea neta. Como alternativa, la enfermedad o afección puede implicar una velocidad de resorción ósea que sea la misma o menor que la velocidad de la formación ósea en el mismo sujeto. La enfermedad o afección puede implicar que no haya pérdida ósea neta. La enfermedad o afección puede implicar una ganancia ósea neta. La enfermedad o afección puede implicar una velocidad menor de la ganancia ósea neta en comparación con la velocidad de la ganancia ósea neta observada en sujetos comparables sin la enfermedad o afección.
10

[0110] Otras enfermedades o afecciones desveladas en este documento son osteoartritis, cáncer óseo, una lesión ósea asociada con cáncer metastásico, enfermedad de Paget, enfermedad de Gorham Stout, hiperparatiroidismo primario, enfermedad periodontal, una fractura de hueso y/o aflojamiento aséptico de prótesis articulares. El cáncer óseo puede ser sarcoma de Ewing, mieloma múltiple, osteosarcoma (tumor gigante del hueso) y/o osteoclastoma. El cáncer metastásico que da como resultado una lesión ósea puede ser cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de pulmón y/o leucemia de linfocitos T del adulto.
15

[0111] El sujeto es típicamente un sujeto mamífero, tal como un ratón, una rata o un primate (por ejemplo, un tití o mono). El sujeto puede ser un ser humano o un animal no humano. Cuando el sujeto es un animal de laboratorio, tal como un ratón, una rata o un primate, el animal puede tratarse para inducir una enfermedad o afección asociada con la resorción ósea por osteoclastos. La siguiente Tabla resume si existe un modelo de animal para una enfermedad o afección asociada con la resorción ósea por osteoclastos o cómo puede inducirse una enfermedad o afección asociada con la resorción ósea por osteoclastos en un modelo animal.
20

(Tabla sigue en página siguiente)

[0112]

Enfermedad o afección	Modelo/Inducción
Osteoartritis	Meniscectomía lateral parcial en las rodillas de conejos/ratones o modelo de ratón STR/ort
Osteoporosis	Ovariectomización de roedores, tales como ratas
Sarcoma de Ewing	Inyección de células tumorales primarias en ratones inmunodeprimidos, por ejemplo NOD o SCID
Mieloma múltiple	Modelo de ratón 52TMM
Osteosarcoma	Inyección de la línea celular de osteosarcoma TE-85 en tibias de ratones atímicos
Cáncer de mama	Implantación de células de cáncer de ratón 4T1/luc en la almohadilla de grasa mamaria, o inyección de la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 humana en ratones sin pelo
Riñón	Inyección de la línea celular de cáncer renal RBM1 en ratones sin pelo
Pulmón	Inyección de la línea celular POS-1 en ratones C3H/He
Próstata	Inyección de células de cáncer de próstata 22Rv1 en ratones SCID
Leucemia de linfocitos T del adulto	Modelo de ratón transgénico HTLV-1 Tax
Hiperparatiroidismo primario	Expresión en exceso dirigida a PTH de ciclina D1 en ratones transgénicos
Enfermedades periodontales	Modelo de perro Beagle de periodontitis de origen natural
Fractura ósea	Modelo de rata Wistar de fractura femoral
Aflojamiento aséptico de prótesis articulares	Modelo de chincheta de rata con peso sostenido

Terapia y Profilaxis

5 [0113] La presente invención proporciona el uso de polipéptidos TSG-6 y polinucleótidos para tratar o prevenir la osteoporosis. El tratamiento puede ser terapéutico o profiláctico.

[0114] El polipéptido TSG-6 o polinucleótido puede administrarse a un individuo para prevenir la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad o afección. En esta realización, el sujeto puede ser asintomático. El sujeto puede tener una predisposición genética a la enfermedad. Se administra una cantidad profilácticamente eficaz del polipéptido o el polinucleótido a tal individuo. Una cantidad profilácticamente eficaz es una cantidad que impide la aparición de uno o más síntomas de una enfermedad o afección.

15 [0115] Una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido TSG-6 o polinucleótido es una cantidad eficaz para mejorar uno o más síntomas de una enfermedad o afección. Preferiblemente, el individuo a tratar es un ser humano.

[0116] El polipéptido TSG-6 o polinucleótido puede administrarse al sujeto mediante cualquier medio adecuado. El polipéptido o polinucleótido puede administrarse por vía enteral o parenteral, tal como por vía oral, bucal, anal, pulmonar, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal, intraarticular, tópica u otras vías de administración apropiadas.

25 [0117] El polipéptido TSG-6 o polinucleótido puede administrarse al sujeto de tal forma que se dirija la terapia a un sitio particular. Por ejemplo, el polipéptido TSG-6 puede inyectarse por vía local sobre la superficie del hueso. El polipéptido TSG-6 puede conjugarse con reactivos que se unen al hueso o los osteoclastos específicamente. Para los polinucleótidos TSG-6, pueden usarse vectores de expresión que codifican el polipéptido TSG-6 para dirigir la expresión de TSG-6 a un tejido particular, por ejemplo usando promotores específicos de tejidos o ARNi.

30 [0118] La formulación de cualquiera de los polipéptidos y polinucleótidos mencionados en este documento dependerá de factores tales como la naturaleza del polipéptido o el polinucleótido y la afección a tratar. El polipéptido o polinucleótido puede administrarse en una diversidad de formas de dosificación. Puede administrarse por vía oral (por ejemplo, comprimidos, trociscos, grageas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos dispersables o gránulos), por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal, transdérmica o por técnicas de infusión. El polipéptido o polinucleótido también puede administrarse en forma de supositorios. Un especialista podrá determinar la vía de administración requerida para cada paciente particular.

35 [0119] Típicamente, el polipéptido o polinucleótido se formula para su uso con un vehículo o diluyente

farmacéuticamente aceptable, y puede realizarse usando procedimientos rutinarios en la técnica farmacéutica. El vehículo o diluyente farmacéutico puede ser, por ejemplo, una solución isotónica. Por ejemplo, las formas orales sólidas pueden contener, junto con el ingrediente activo, diluyentes, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, celulosa, almidón de maíz o almidón de patata; lubricantes, por ejemplo, sílice, talco, ácido esteárico, estearato magnésico o cálcico, y/o polietilenglicoles; agentes aglutinantes; por ejemplo, almidones, gomas arábicas, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polivinilpirrolidona; agentes disgregantes, por ejemplo, almidón, ácido algínico, alginatos o glicolato sódico de almidón; mezclas efervescentes; pigmentos; edulcorante; agentes humectantes, tales como lecitina, polisorbatos, laurilsulfatos; y, en general, sustancias no tóxicas y farmacológicamente inactivas usadas en formulaciones farmacéuticas. Dichas preparaciones pueden fabricarse de una manera conocida, por ejemplo, por medio de procesos de mezcla, granulado, compresión, revestimiento con azúcar o revestimiento con película.

[0120] Las dispersiones líquidas para administración oral pueden ser jarabes, emulsiones y suspensiones. Los jarabes pueden contener como vehículos, por ejemplo, sacarosa o sacarosa con glicerina y/o manitol y/o sorbitol.

[0121] Las suspensiones y emulsiones pueden contener como vehículo, por ejemplo, una goma natural, agar, alginato sódico, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o alcohol polivinílico. Las suspensiones o soluciones para inyecciones intramusculares pueden contener, junto con el ingrediente activo, un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, agua estéril, aceite de oliva, oleato de etilo, glicoles, por ejemplo, propilenglicol y, si se desea, una cantidad adecuada de clorhidrato de lidocaína.

[0122] Las soluciones para administración intravenosa o infusiones pueden contener como vehículo, por ejemplo, agua estéril o, preferiblemente, pueden estar en forma de soluciones estériles, acuosas, salinas isotónicas.

[0123] Para los supositorios, los aglutinantes y vehículos convencionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; dichos supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el intervalo del 0,5% al 10%, preferiblemente del 1% al 2%.

[0124] Las formulaciones orales incluyen tales excipientes empleados normalmente como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contienen del 10% al 95% de ingrediente activo, preferiblemente del 25% al 70%. Cuando la composición farmacéutica se liofiliza, el material liofilizado puede reconstituirse antes de la administración, por ejemplo, una suspensión. La reconstitución se realiza preferiblemente en un tampón.

[0125] Las cápsulas, comprimidos y píldoras para administración oral a un paciente pueden proporcionarse con un revestimiento entérico que comprende, por ejemplo, Eudragit "S", Eudragit "L", acetato de celulosa, acetato ftalato de celulosa o hidroxipropilmetil celulosa.

[0126] También pueden usarse composiciones farmacéuticas adecuadas para administración por inyección sin aguja, por ejemplo, por vía transdérmica.

[0127] Se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de polipéptido o polinucleótido. La dosis puede determinarse de acuerdo con diversos parámetros, especialmente de acuerdo con el polipéptido o polinucleótido usado; la edad, el peso y la condición del paciente que se va a tratar; la ruta de administración; y el régimen requerido. De nuevo, un especialista podrá determinar la ruta de administración requerida y la dosificación para cualquier paciente particular. Una dosis diaria típica es de aproximadamente 0,1 a 50 mg por kg, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal, de acuerdo con la actividad del inhibidor específico, la edad y las condiciones del sujeto que se va a tratar, el tipo y gravedad de la enfermedad y la frecuencia y ruta de administración. Preferiblemente, los niveles de dosificación diarios son de 5 mg a 2 g.

[0128] Las secuencias nucleotídicas TSG-6 que se han descrito anteriormente y los vectores de expresión que contienen dichas secuencias también pueden usarse como formulaciones farmacéuticas como se ha representado anteriormente. Preferiblemente, el ácido nucleico, tal como ARN o ADN, en particular ADN, se proporciona en forma de un vector de expresión, que puede expresarse en las células del individuo que se va a tratar. Las vacunas pueden comprender secuencias nucleotídicas al desnudo o estar en combinación con lípidos catiónicos, polímeros o sistemas de dirección. Las vacunas pueden administrarse mediante cualquier técnica disponible. Por ejemplo, el ácido nucleico puede introducirse por inyección con aguja, preferiblemente por vía intradérmica, por vía subcutánea o por vía intramuscular. Como alternativa, el ácido nucleico puede administrarse directamente a través de la piel usando un dispositivo de administración de ácido nucleico, tal como una entrega del gen mediada por partículas. El ácido nucleico puede administrarse por vía tópica a la piel, o a las superficies mucosales, por ejemplo, mediante

administración intranasal, oral, intravaginal o intra-rectal.

- [0129]** La captación de construcciones de ácido nucleico puede mejorarse mediante varias técnicas de transfección conocidas, por ejemplo las que incluyen el uso de agentes de transfección. Los ejemplos de estos 5 agentes incluyen agentes catiónicos, por ejemplo, fosfato cálcico y DEAE-Dextrano y lipofectantes, por ejemplo, lipofectam y transfectam. La dosificación del ácido nucleico que se va a administrar puede alterarse. Típicamente, el ácido nucleico se administra en el intervalo de 1 pg a 1 mg, preferiblemente de 1 pg a 10 µg de ácido nucleico por administración del gen mediada por partículas y de 10 µg a 1 mg para otras rutas.
- 10 **[0130]** También se describe en este documento un procedimiento de tratamiento, *ex vivo*, de sangre tomada de un paciente que padece una enfermedad o afección asociada con la resorción ósea por osteoclastos que comprende poner en contacto la sangre con un polipéptido TSG-6. Por lo tanto, TSG-6 puede usarse para un tratamiento extracorpóreo de sangre. La TSG-6 puede usarse para tratar uno o más componentes de la sangre, tales como plasma o suero. El procedimiento *ex vivo* que se describe en este documento puede practicarse en sangre que ya se 15 ha extraído del cuerpo de un paciente. La sangre o el producto de sangre puede devolverse opcionalmente al paciente después de estar en contacto con un polipéptido TSG-6.

Terapia de combinación

- 20 **[0131]** El polipéptido TSG-6 o polinucleótido puede administrarse solo o en combinación con otros agentes farmacéuticamente activos. En una realización, el polipéptido TSG-6 o polinucleótido no se administra en combinación con pentraxina larga 3 (PTX3). En la misma realización, el medicamento fabricado de acuerdo con la invención no comprende PTX3.
- 25 **[0132]** En una realización preferida, el procedimiento comprende adicionalmente administrar al sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un polipéptido OPG, un polinucleótido que codifica un polipéptido OPG o un mimético OPG. En la misma realización, el medicamento se administra en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un polipéptido OPG, un polinucleótido que codifica un polipéptido OPG o un mimético OPG. 30
- [0133]** El TSG-6 y el OPG actúan sinérgicamente. En otras palabras, la administración de TSG-6 y OPG en combinación tiene un mayor efecto en la inhibición de la resorción ósea por osteoclastos que la suma del efecto de cada uno en solitario.
- 35 **[0134]** A cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido OPG, polinucleótido o un mimético OPG es una cantidad eficaz para mejorar uno o más síntomas de una enfermedad o afección. Una cantidad profilácticamente eficaz es una cantidad que impide la aparición de uno o más síntomas de una enfermedad o afección.
- [0135]** El TSG-6 y el OPG pueden administrarse simultáneamente, por separado o secuencialmente. Si se 40 administran simultáneamente, el TSG-6 y el OPG pueden estar presentes en el mismo medicamento o en diferentes medicamentos. Si se administran por separado o secuencialmente, el TSG-6 y el OPG pueden administrarse en cualquier orden.
- [0136]** Típicamente, un polipéptido TSG-6 y un polipéptido OPG se administran juntos, o un polinucleótido TSG-6 y 45 un polinucleótido OPG se administran juntos. Sin embargo, en algunas realizaciones, el TSG-6 puede ser un polipéptido, mientras que el OPG es un polinucleótido, y viceversa.
- [0137]** El polipéptido OPG, el polinucleótido OPG o el mimético OPG pueden administrarse al sujeto por cualquier medio, en cualquier formulación y a cualquier dosis que se ha analizado anteriormente para TSG-6. 50
- [0138]** Los siguientes Ejemplos ilustran la invención:

Ejemplos

- 55 **[0139]** Los siguientes estudios muestran que TSG-6 es un inhibidor novedoso de la resorción ósea.

Ejemplo 1 - Inhibición de osteoclastos por TSG-6

- 60 **[0140]** El alotipo Q144 de la proteína TSG-6 humana de longitud completa (como se muestra en la SEQ ID NO: 1) se expresó en células S2 de *Drosophila* como se describe en Nentwich y col. (2002) J. Biol. Chem. 277, 15354-15362. Se determinó el efecto de esta proteína recombinante sobre la diferenciación de osteoclastos *in vitro*. Se

diferenciaron monocitos humanos en osteoclastos y se desarrollo un fenotipo de resorción ósea durante un periodo de 21 días. La actividad osteoclástica se midió determinando el alcance de la resorción lacunar sobre láminas de dentina. Se cultivaron monocitos humanos en presencia de sRANKL (receptor activador soluble del ligando NF κ B; 30 ng/ml) y/o M-CSF (25 ng/ml) y la actividad resortiva ósea se midió en presencia o ausencia de TSG-6 recombinante. La adición de TSG-6 a este sistema de cultivo medió una reducción sustancial en la erosión de la dentina (figura 1), y este efecto es dependiente de la dosis (figura 2). Por lo tanto, TSG-6 inhibe la resorción ósea por osteoclastos.

Ejemplo 2 - Actividad osteoclástica en ratones con genes inactivados de TSG-6

10 **[0141]** También se realizó el mismo experimento que en el Ejemplo 1 usando precursores de osteoclastos de huesos largos de ratones *TSG-6^{-/-}*. Cuando se cultivaron en presencia de sRANKL o M-CSF y sRANKL, los osteoclastos mostraron un marcado aumento de la resorción lacunar *in vitro* en comparación con las células procedentes de animales de control no manipulados (figura 3). Estos resultados son coherentes con los síntomas más graves (por ejemplo, la erosión ósea) observados en animales con deficiencia de TSG-6 tras la inducción de PGIA. Estos estudios indican que TSG-6 es un inhibidor novedoso e importante de la osteoclastogénesis y/o la activación de osteoclastos.

Ejemplo 3 - Unión de TSG-6 a RANKL

20 **[0142]** RANKL y su receptor RANK son reguladores clave de la remodelación ósea y se han implicado específicamente en la pérdida ósea que tiene lugar en la AR. RANKL es un ligando de la superfamilia de TNF unido a membrana que se produce por los osteoblastos y otras células estromales, mientras que RANK, una molécula de señalización transmembrana, se expresa sobre las superficies de los precursores de los osteoclastos mononucleares. RANKL se une a RANK, en respuesta a factores calciotrópicos, tales como PGE₂, IL-1 y TNF, donde esta interacción no sólo induce la diferenciación osteoclástica, sino que también estimula la actividad resortiva ósea de osteoclastos maduros (revisado en Tanake y col. (2005) Immunol. Rev. 208, 30-49). De hecho, RANKL (en combinación con M-CSF), es el factor principal que regula la diferenciación osteoclástica (Quinn y col. (1998) Endocrinology 139, 4424-4427).

30 **[0143]** En el presente, la osteoprotegerina (OPG), un receptor señuelo soluble para RANKL, es el único inhibidor de la interacción RANKL/RANK que puede inhibir de forma eficaz la maduración y la activación osteoclástica *in vitro* (Simonet y col. (1997) Cell 89, 309-319), y un imitador de la actividad OPG (AMG 162) está actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de la osteoporosis.

35 **[0144]** RANKL también se expresa sobre las superficies de los linfocitos T efectores sinoviales de pacientes con AR y estudios en ratas con AIA (que tiene muchas características en común con la AR humana) mostraron que RANKL era el mediador clave del daño articular y la erosión ósea debido a la acumulación de osteoclastos, donde el tratamiento con OPG proporcionó protección frente a estos efectos (Kong y col. (1999) Nature 402, 304-309).

40 **[0145]** Dados los efectos de TSG-6 en la resorción ósea que se han descrito en los Ejemplos 1 y 2 anteriores, se investigó la interacción de TSG-6 directamente con RANKL. El TSG-6 recombinante de longitud completa se expresó como se ha descrito en el Ejemplo 1. El dominio del módulo Link aislado (Link_TSG-6; SEQ ID NO: 9) se expresó en *E. coli* como se describe en Day y col. (1996) Protein Express. Purif. 8, 1-16. El dominio CUB_C (CUB_C_TSG6; SEQ ID NO: 13) se expresó en *E. coli* (DJ Mahoney y AJ Day, no publicado). TSG-6 de longitud completa, Link_TSG6 o CUB_C_TSG6 se cubrieron en placas de microtitulación a un intervalo de concentraciones y la unión de sRANKL (5 pmol/pocillo) se determinó usando un anticuerpo específico de RANKL.

50 **[0146]** Los resultados de los ensayos de unión en placas indican que TSG-6 de longitud completa, si dominio del módulo Link aislado (Link_TSG6; SEQ ID NO: 9) y el dominio CUB_C aislado (CUB_C_TSG6; SEQ ID NO: 13) se unen a sRANKL, pero que el TSG-6 de longitud completa tiene una afinidad de unión mayor que los dominios aislados (figura 4). Estos datos sugieren que TSG-6 puede inhibir la osteoclastogénesis inducida por RANKL/activación osteoclástica mediante su unión directa a RANKL, potencialmente de una manera similar a OPG.

Ejemplo 4 - Sinergia entre TSG-6 y OPG

60 **[0147]** Los datos (no mostrados) indican que TSG-6 en combinación con OPG (un inhibidor conocido de RANKL) tiene un efecto sinérgico sobre la inhibición de la formación osteoclástica según se determina por el número de osteoclastos multinucleados con fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP+) formados en el cultivo (es decir, hay más inhibición de la formación osteoclástica en presencia tanto de TSG-6 como de OPG en comparación con los experimentos en los que están presentes las proteínas individuales). Un posible mecanismo que podría explicar la

acción sinérgica de TSG-6 y OPG es que estas dos proteínas pueden unirse simultáneamente a RANKL formando un complejo ternario estable.

Ejemplo 5 - Los dominios Link y CUB_C de TSG-6 inhiben la osteoclastogénesis

5

[0148] Además, los datos (no mostrados) también muestran que los dominios Link y CUB_C aislados son inhibidores de la osteoclastogénesis, aunque con menos actividad que la proteína de longitud completa. Esto indica que estos fragmentos de TSG-6 pueden usarse como la base para el diseño de inhibidores de la resorción ósea.

10 Ejemplo 6 - Niveles de TSG-6 y OPG en el líquido sinovial.

[0149] Se han medido altos niveles de TSG-6 (que varían de 0-200 ng/ml) en el líquido sinovial de pacientes con diversos trastornos óseos [por ejemplo, osteoartritis (OA), artritis reumatoide (AR), artropatía por gota y pirofosfato (PPA); véase la figura 5). Los análisis ELISA de los niveles de TSG-6 y OPG en muestras sinoviales de OA han mostrado que hay más variación de paciente a paciente en los niveles de proteína TSG-6 en comparación con OPG (véase la figura 6). Esto sugiere que la ausencia/niveles bajos de TSG-6 podría contribuir a la extensión y gravedad de las enfermedades osteolíticas.

LISTA DE SECUENCIAS

20

[0150]

<110> ISIS INNOVATION LIMITED

25 <120> TRATAMIENTO

<130> N.97312A

<160> 15

30

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 1440

35

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

40

<222> (77)..(910)

<400> 1

cagtcacatt tcagccactg ctctgagaat ttgtgagcag cccctaacag gctgttactt	60
cactacaact gacgat atg atc atc tta att tac tta ttt ctc ttg cta tgg	112
Met Ile Ile Leu Ile Tyr Leu Phe Leu Leu Leu Trp	
1 5 10	
gaa gac act caa gga tgg gga ttc aag gat gga att ttt cat aac tcc	160
Glu Asp Thr Gln Gly Trp Gly Phe Lys Asp Gly Ile Phe His Asn Ser	
15 20 25	
ata tgg ctt gaa cga gca gcc ggt gtg tac cac aga gaa gca cgg tct	208
Ile Trp Leu Glu Arg Ala Ala Gly Val Tyr His Arg Glu Ala Arg Ser	
30 35 40	
ggc aaa tac aag ctc acc tac gca gaa gct aag gcg gtg tgt gaa ttt	256
Gly Lys Tyr Lys Leu Thr Tyr Ala Glu Ala Lys Ala Val Cys Glu Phe	
45 50 55 60	
gaa ggc ggc cat ctc gca act tac aag cag cta gag gca gcc aga aaa	304
Glu Gly Gly His Leu Ala Thr Tyr Lys Gln Leu Glu Ala Ala Arg Lys	
65 70 75	
att gga ttt cat gtc tgt gct gct gga tgg atg gct aag ggc aga gtt	352
Ile Gly Phe His Val Cys Ala Ala Gly Trp Met Ala Lys Gly Arg Val	
80 85 90	
gga tac ccc att gtg aag cca ggg ccc aac tgt gga ttt gga aaa act	400
Gly Tyr Pro Ile Val Lys Pro Gly Pro Asn Cys Gly Phe Gly Lys Thr	
95 100 105	
ggc att att gat tat gga atc cgt ctc aat agg agt gaa aga tgg gat	448
Gly Ile Ile Asp Tyr Gly Ile Arg Leu Asn Arg Ser Glu Arg Trp Asp	
110 115 120	
gcc tat tgc tac aac cca cac gca aag gag tgt ggt ggc gtc ttt aca	496
Ala Tyr Cys Tyr Asn Pro His Ala Lys Glu Cys Gly Gly Val Phe Thr	
125 130 135 140	
gat cca aag caa att ttt aaa tct cca ggc ttc cca aat gag tac gaa	544
Asp Pro Lys Gln Ile Phe Lys Ser Pro Gly Phe Pro Asn Glu Tyr Glu	
145 150 155	

ES 2 426 196 T3

```

gat aac caa atc tgc tac tgg cac att aga ctc aag tat ggt cag cgt      592
Asp Asn Gln Ile Cys Tyr Trp His Ile Arg Leu Lys Tyr Gly Gln Arg
      160                      165                      170

att cac ctg agt ttt tta gat ttt gac ctt gaa gat gac cca ggt tgc      640
Ile His Leu Ser Phe Leu Asp Phe Asp Leu Glu Asp Asp Pro Gly Cys
      175                      180                      185

ttg gct gat tat gtt gaa ata tat gac agt tac gat gat gtc cat ggc      688
Leu Ala Asp Tyr Val Glu Ile Tyr Asp Ser Tyr Asp Asp Val His Gly
      190                      195                      200

ttt gtg gga aga tac tgt gga gat gag ctt cca gat gac atc atc agt      736
Phe Val Gly Arg Tyr Cys Gly Asp Glu Leu Pro Asp Asp Ile Ile Ser
      205                      210                      215                      220

aca gga aat gtc atg acc ttg aag ttt cta agt gat gct tca gtg aca      784
Thr Gly Asn Val Met Thr Leu Lys Phe Leu Ser Asp Ala Ser Val Thr
      225                      230                      235

gct gga ggt ttc caa atc aaa tat gtt gca atg gat cct gta tcc aaa      832
Ala Gly Gly Phe Gln Ile Lys Tyr Val Ala Met Asp Pro Val Ser Lys
      240                      245                      250

tcc agt caa gga aaa aat aca agt act act tct act gga aat aaa aac      880
Ser Ser Gln Gly Lys Asn Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Asn Lys Asn
      255                      260                      265

ttt tta gct gga aga ttt agc cac tta taa aaaaaaaaaa aaggatgatc      930
Phe Leu Ala Gly Arg Phe Ser His Leu
      270                      275

aaaaaaaaaa gtgtttatgt tggaaatcttt tggaaactcct ttgatctcac tgttattatt      990

aacatttatt tattatTTTT ctaaagtga aagcaataca taatttaggg aaaattggaa      1050

aatataggaa actttaaacg agaaaatgaa acctctcata atcccactgc atagaaataa      1110

caagcgtaa cattttcata tttttttctt tcagtcattt ttctatttgt ggtatatgta      1170

tatatgtacc tatatgtatt tgcatttgaa attttggaaat cctgetctat gtacagtttt      1230

gtattatact ttttaaatct tgaactttat aacattttc tgaaatcatt gattattcta      1290

caaaaacatg attttaaacg gctgtaaaat attctatgat atgaatgttt tatgcattat      1350

ttaagcctgt ctctattggt ggaatttcag gtcattttca taaatattgt tgcaataaat      1410

atccttgaac acaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      1440

```

<210> 2
 <211> 277
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 2

ES 2 426 196 T3

Met Ile Ile Leu Ile Tyr Leu Phe Leu Leu Leu Trp Glu Asp Thr Gln
 1 5 10 15
 Gly Trp Gly Phe Lys Asp Gly Ile Phe His Asn Ser Ile Trp Leu Glu
 20 25 30
 Arg Ala Ala Gly Val Tyr His Arg Glu Ala Arg Ser Gly Lys Tyr Lys
 35 40 45
 Leu Thr Tyr Ala Glu Ala Lys Ala Val Cys Glu Phe Glu Gly Gly His
 50 55 60
 Leu Ala Thr Tyr Lys Gln Leu Glu Ala Ala Arg Lys Ile Gly Phe His
 65 70 75 80
 Val Cys Ala Ala Gly Trp Met Ala Lys Gly Arg Val Gly Tyr Pro Ile
 85 90 95
 Val Lys Pro Gly Pro Asn Cys Gly Phe Gly Lys Thr Gly Ile Ile Asp
 100 105 110
 Tyr Gly Ile Arg Leu Asn Arg Ser Glu Arg Trp Asp Ala Tyr Cys Tyr
 115 120 125
 Asn Pro His Ala Lys Glu Cys Gly Gly Val Phe Thr Asp Pro Lys Gln
 130 135 140
 Ile Phe Lys Ser Pro Gly Phe Pro Asn Glu Tyr Glu Asp Asn Gln Ile
 145 150 155 160
 Cys Tyr Trp His Ile Arg Leu Lys Tyr Gly Gln Arg Ile His Leu Ser
 165 170 175
 Phe Leu Asp Phe Asp Leu Glu Asp Asp Pro Gly Cys Leu Ala Asp Tyr
 180 185 190
 Val Glu Ile Tyr Asp Ser Tyr Asp Asp Val His Gly Phe Val Gly Arg
 195 200 205
 Tyr Cys Gly Asp Glu Leu Pro Asp Asp Ile Ile Ser Thr Gly Asn Val
 210 215 220
 Met Thr Leu Lys Phe Leu Ser Asp Ala Ser Val Thr Ala Gly Gly Phe
 225 230 235 240
 Gln Ile Lys Tyr Val Ala Met Asp Pro Val Ser Lys Ser Ser Gln Gly
 245 250 255
 Lys Asn Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Asn Lys Asn Phe Leu Ala Gly
 260 265 270
 Arg Phe Ser His Leu
 275

5 <210> 3
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

```

Trp Gly Phe Lys Asp Gly Ile Phe His Asn Ser Ile Trp Leu Glu Arg
1          5          10          15
Ala Ala Gly Val Tyr His Arg Glu Ala Arg Ser Gly Lys Tyr Lys Leu
20          25          30
Thr Tyr Ala Glu Ala Lys Ala Val Cys Glu Phe Glu Gly Gly His Leu
35          40          45
Ala Thr Tyr Lys Gln Leu Glu Ala Ala Arg Lys Ile Gly Phe His Val

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

```

5

<210> 4
 <211> 1440
 <212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<220>

ES 2 426 196 T3

<221> CDS
 <222> (77)..(910)

<400> 4

5

```

cagtcacatt tcagccactg ctctgagaat ttgtgagcag ccctaacag gctgttactt      60
cactacaact gacgat atg atc atc tta att tac tta ttt ctc ttg cta tgg      112
      Met Ile Ile Leu Ile Tyr Leu Phe Leu Leu Leu Trp
      1           5           10
gaa gac act caa gga tgg gga ttc aag gat gga att ttt cat aac tcc      160
Glu Asp Thr Gln Gly Trp Gly Phe Lys Asp Gly Ile Phe His Asn Ser
      15           20           25
ata tgg ctt gaa cga gca gcc ggt gtg tac cac aga gaa gca cgg tct      208
Ile Trp Leu Glu Arg Ala Ala Gly Val Tyr His Arg Glu Ala Arg Ser
  
```

ES 2 426 196 T3

30	35	40	
ggc aaa tac aag ctc acc tac gca gaa gct aag gcg gtg tgt gaa ttt			256
Gly Lys Tyr Lys Leu Thr Tyr Ala Glu Ala Lys Ala Val Cys Glu Phe			
45	50	55	60
gaa ggc ggc cat ctc gca act tac aag cag cta gag gca gcc aga aaa			304
Glu Gly Gly His Leu Ala Thr Tyr Lys Gln Leu Glu Ala Ala Arg Lys			
	65	70	75
att gga ttt cat gtc tgt gct gct gga tgg atg gct aag ggc aga gtt			352
Ile Gly Phe His Val Cys Ala Ala Gly Trp Met Ala Lys Gly Arg Val			
	80	85	90
gga tac ccc att gtg aag cca ggg ccc aac tgt gga ttt gga aaa act			400
Gly Tyr Pro Ile Val Lys Pro Gly Pro Asn Cys Gly Phe Gly Lys Thr			
	95	100	105
ggc att att gat tat gga atc cgt ctc aat agg agt gaa aga tgg gat			448
Gly Ile Ile Asp Tyr Gly Ile Arg Leu Asn Arg Ser Glu Arg Trp Asp			
	110	115	120
gcc tat tgc tac aac cca cac gca aag gag tgt ggt ggc gtc ttt aca			496
Ala Tyr Cys Tyr Asn Pro His Ala Lys Glu Cys Gly Gly Val Phe Thr			
	125	130	135
gat cca aag cgg att ttt aaa tct cca ggc ttc cca aat gag tac gaa			544
Asp Pro Lys Arg Ile Phe Lys Ser Pro Gly Phe Pro Asn Glu Tyr Glu			
	145	150	155
gat aac caa atc tgc tac tgg cac att aga ctc aag tat ggt cag cgt			592
Asp Asn Gln Ile Cys Tyr Trp His Ile Arg Leu Lys Tyr Gly Gln Arg			
	160	165	170
att cac ctg agt ttt tta gat ttt gac ctt gaa gat gac cca ggt tgc			640
Ile His Leu Ser Phe Leu Asp Phe Asp Leu Glu Asp Asp Pro Gly Cys			
	175	180	185
ttg gct gat tat gtt gaa ata tat gac agt tac gat gat gtc cat ggc			688
Leu Ala Asp Tyr Val Glu Ile Tyr Asp Ser Tyr Asp Asp Val His Gly			
	190	195	200
ttt gtg gga aga tac tgt gga gat gag ctt cca gat gac atc atc agt			736
Phe Val Gly Arg Tyr Cys Gly Asp Glu Leu Pro Asp Asp Ile Ile Ser			
	205	210	215
aca gga aat gtc atg acc ttg aag ttt cta agt gat gct tca gtg aca			784
Thr Gly Asn Val Met Thr Leu Lys Phe Leu Ser Asp Ala Ser Val Thr			
	225	230	235
gct gga ggt ttc caa atc aaa tat gtt gca atg gat cct gta tcc aaa			832
Ala Gly Gly Phe Gln Ile Lys Tyr Val Ala Met Asp Pro Val Ser Lys			
	240	245	250
tcc agt caa gga aaa aat aca agt act act tct act gga aat aaa aac			880
Ser Ser Gln Gly Lys Asn Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Asn Lys Asn			
	255	260	265
ttt tta gct gga aga ttt agc cac tta taa aaaaaaaaaa aaggatgac			930
Phe Leu Ala Gly Arg Phe Ser His Leu			
	270	275	
aaaacacaca gtgtttatgt tggaaactctt tggaaactctt ttgatctcac tgttattatt			990
aacatttatt tattattttt ctaaagtga aagcaataca taatttaggg aaaattggaa			1050

ES 2 426 196 T3

```
aatataggaa actttaaacg agaaaatgaa acctctcata atcccactgc atagaaataa 1110
caagegtaa cattttcata ttttttctt tcagtcattt ttctatttgt ggtatatgta 1170
tatatgtacc tatatgtatt tgcatttgaa attttggaa cctgctctat gtacagtttt 1230
gtattatact ttttaaatct tgaactttat aaacattttc tgaaatcatt gattattcta 1290
caaaaacatg attttaaca gctgtaaaat attctatgat atgaatgttt tatgcattat 1350
ttaagcctgt ctctattggt ggaatttcag gtcattttca caaatattgt tgcaataaat 1410
atccttgaac acaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1440
```

<210> 5

<211> 277

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 426 196 T3

Met Ile Ile Leu Ile Tyr Leu Phe Leu Leu Leu Trp Glu Asp Thr Gln
 1 5 10 15
 Gly Trp Gly Phe Lys Asp Gly Ile Phe His Asn Ser Ile Trp Leu Glu
 20 25 30
 Arg Ala Ala Gly Val Tyr His Arg Glu Ala Arg Ser Gly Lys Tyr Lys
 35 40 45
 Leu Thr Tyr Ala Glu Ala Lys Ala Val Cys Glu Phe Glu Gly Gly His
 50 55 60
 Leu Ala Thr Tyr Lys Gln Leu Glu Ala Ala Arg Lys Ile Gly Phe His
 65 70 75 80
 Val Cys Ala Ala Gly Trp Met Ala Lys Gly Arg Val Gly Tyr Pro Ile
 85 90 95
 Val Lys Pro Gly Pro Asn Cys Gly Phe Gly Lys Thr Gly Ile Ile Asp
 100 105 110
 Tyr Gly Ile Arg Leu Asn Arg Ser Glu Arg Trp Asp Ala Tyr Cys Tyr
 115 120 125
 Asn Pro His Ala Lys Glu Cys Gly Gly Val Phe Thr Asp Pro Lys Arg
 130 135 140
 Ile Phe Lys Ser Pro Gly Phe Pro Asn Glu Tyr Glu Asp Asn Gln Ile
 145 150 155 160
 Cys Tyr Trp His Ile Arg Leu Lys Tyr Gly Gln Arg Ile His Leu Ser
 165 170 175
 Phe Leu Asp Phe Asp Leu Glu Asp Asp Pro Gly Cys Leu Ala Asp Tyr
 180 185 190
 Val Glu Ile Tyr Asp Ser Tyr Asp Asp Val His Gly Phe Val Gly Arg
 195 200 205
 Tyr Cys Gly Asp Glu Leu Pro Asp Asp Ile Ile Ser Thr Gly Asn Val
 210 215 220
 Met Thr Leu Lys Phe Leu Ser Asp Ala Ser Val Thr Ala Gly Gly Phe
 225 230 235 240
 Gln Ile Lys Tyr Val Ala Met Asp Pro Val Ser Lys Ser Ser Gln Gly
 245 250 255
 Lys Asn Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Asn Lys Asn Phe Leu Ala Gly
 260 265 270
 Arg Phe Ser His Leu
 275

5 <210> 6
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 6

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

 Asn Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Asn Lys Asn Phe Leu Ala Gly Arg
 245 250 255

 Phe Ser His Leu
 260

- 5 <210> 7
- <211> 93
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 10 <400> 7

```

Val Tyr His Arg Glu Ala Arg Ser Gly Lys Tyr Lys Leu Thr Tyr Ala
1           5           10           15

Glu Ala Lys Ala Val Cys Glu Phe Glu Gly Gly His Leu Ala Thr Tyr
          20           25           30

Lys Gln Leu Glu Ala Ala Arg Lys Ile Gly Phe His Val Cys Ala Ala
          35           40           45

Gly Trp Met Ala Lys Gly Arg Val Gly Tyr Pro Ile Val Lys Pro Gly
          50           55           60

Pro Asn Cys Gly Phe Gly Lys Thr Gly Ile Ile Asp Tyr Gly Ile Arg
65           70           75           80

Leu Asn Arg Ser Glu Arg Trp Asp Ala Tyr Cys Tyr Asn
          85           90
    
```

- <210> 8
- <211> 319
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Link_TSG-6
- 10
- <220>
- <221> CDS
- <222> (14)..(313)
- 15 <400> 8

```

aggagatata cat atg ggt gtg tac cac cgt gaa gca cgg tct ggc aaa      49
          Met Gly Val Tyr His Arg Glu Ala Arg Ser Gly Lys
          1           5           10

tac aag ctc acc tac gca gaa gct aag gcg gtg tgt gaa ttt gaa ggc      97
Tyr Lys Leu Thr Tyr Ala Glu Ala Lys Ala Val Cys Glu Phe Glu Gly
          15           20           25

ggc cat ctc gca act tac aag cag cta gag gca gcc cgt aaa att gga      145
Gly His Leu Ala Thr Tyr Lys Gln Leu Glu Ala Ala Arg Lys Ile Gly
          30           35           40

ttt cat gtc tgt gct gct gga tgg atg gct aag ggc cgt gtt gga tac      193
Phe His Val Cys Ala Ala Gly Trp Met Ala Lys Gly Arg Val Gly Tyr
          45           50           55           60

ccc att gtg aag cca ggg ccc aac tgt gga ttt gga aaa act ggc att      241
Pro Ile Val Lys Pro Gly Pro Asn Cys Gly Phe Gly Lys Thr Gly Ile

          65           70           75

att gat tat gga atc cgt ctc aat agg agt gaa cgt tgg gat gcc tat      289
Ile Asp Tyr Gly Ile Arg Leu Asn Arg Ser Glu Arg Trp Asp Ala Tyr
          80           85           90

tgc tac aac cca cac gca aag taa gaattc      319
Cys Tyr Asn Pro His Ala Lys
          95
    
```

<210> 9
 <211> 99
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Link_TSG-6

10 <400> 9

```

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

His Ala Lys
    
```

<210> 10
 15 <211> 149
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 20

ES 2 426 196 T3

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

- <210> 11
- <211> 149
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 11

ES 2 426 196 T3

```

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

```

<210> 12

<211> 471

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CUB_C_TSG6

10

<220>

<221> CDS

<222> (14)..(463)

15 <400> 12

ES 2 426 196 T3

```

aggagatata cat atg aac cca cac gca aag gag tgt ggt ggc gtc ttt      49
      Met Asn Pro His Ala Lys Glu Cys Gly Gly Val Phe
      1          5          10

aca gat cca aag cga att ttt aaa tct cca ggc ttc cca aat gag tac      97
Thr Asp Pro Lys Arg Ile Phe Lys Ser Pro Gly Phe Pro Asn Glu Tyr
      15          20          25

gaa gat aac caa atc tgc tac tgg cac att aga ctc aag tat ggt cag      145
Glu Asp Asn Gln Ile Cys Tyr Trp His Ile Arg Leu Lys Tyr Gly Gln
      30          35          40

cgt att cac ctg agt ttt tta gat ttt gac ctt gaa gat gac cca ggt      193
Arg Ile His Leu Ser Phe Leu Asp Phe Asp Leu Glu Asp Asp Pro Gly
      45          50          55          60

tgc ttg gct gat tat gtt gaa ata tat gac agt tac gat gat gtc cat      241
Cys Leu Ala Asp Tyr Val Glu Ile Tyr Asp Ser Tyr Asp Asp Val His
      65          70          75

ggc ttt gtg gga aga tac tgt gga gat gag ctt cca gat gac atc atc      289
Gly Phe Val Gly Arg Tyr Cys Gly Asp Glu Leu Pro Asp Asp Ile Ile
      80          85          90

agt aca gga aat gtc atg acc ttg aag ttt cta agt gat gct tca gtg      337
Ser Thr Gly Asn Val Met Thr Leu Lys Phe Leu Ser Asp Ala Ser Val
      95          100          105

aca gct gga ggt ttc caa atc aaa tat gtt gca atg gat cct gta tcc      385
Thr Ala Gly Gly Phe Gln Ile Lys Tyr Val Ala Met Asp Pro Val Ser
      110          115          120

aaa tcc agt caa gga aaa aat aca agt act act tct act gga aat aaa      433
Lys Ser Ser Gln Gly Lys Asn Thr Ser Thr Ser Thr Gly Asn Lys
      125          130          135          140

aac ttt tta gct gga aga ttt agc cac tta taa attcg      471
Asn Phe Leu Ala Gly Arg Phe Ser His Leu
      145          150

```

<210> 13

<211> 150

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CUB_C_TSG6

10

<400> 13

```

Met Asn Pro His Ala Lys Glu Cys Gly Gly Val Phe Thr Asp Pro Lys
1          5          10          15

Arg Ile Phe Lys Ser Pro Gly Phe Pro Asn Glu Tyr Glu Asp Asn Gln
20          25          30

Ile Cys Tyr Trp His Ile Arg Leu Lys Tyr Gly Gln Arg Ile His Leu
35          40          45

```

ES 2 426 196 T3

```

Ser Phe Leu Asp Phe Asp Leu Glu Asp Asp Pro Gly Cys Leu Ala Asp
 50                               55                               60

Tyr Val Glu Ile Tyr Asp Ser Tyr Asp Asp Val His Gly Phe Val Gly
 65                               70                               75                               80

Arg Tyr Cys Gly Asp Glu Leu Pro Asp Asp Ile Ile Ser Thr Gly Asn
 85                               90                               95

Val Met Thr Leu Lys Phe Leu Ser Asp Ala Ser Val Thr Ala Gly Gly
 100                              105                              110

Phe Gln Ile Lys Tyr Val Ala Met Asp Pro Val Ser Lys Ser Ser Gln
 115                              120                              125

Gly Lys Asn Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Asn Lys Asn Phe Leu Ala
 130                              135                              140

Gly Arg Phe Ser His Leu
 145                              150

```

- <210> 14
- <211> 1356
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens

- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (95)..(1300)

- <400> 14

ES 2 426 196 T3

gtatatataa	cgtgatgagc	gtacgggtgc	ggagacgcac	cggagcgcctc	gcccagcgcg	60
cgycctccaag	ccccctgaggt	ttccgggggac	caca atg aac aag ttg ctg tgc tgc	115		
			Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys			
			1	5		
gcg ctc gtg ttt ctg gac atc tcc att aag tgg acc acc cag gaa acy	163					
Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr						
	10	15	20			
ttt cct cca aag tac ctt cat tat gac gaa gaa acc tct cat cag ctg	211					
Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu						
	25	30	35			
ttg tgt gac aaa tgt cct cct ggt acc tac cta aaa caa cac tgt aca	259					
Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr						
	40	45	50	55		
gca aag tgg aag acc gtg tgc gcc cct tgc cct gac cac tac tac aca	307					
Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr						
	60	65	70			
gac agc tgg cac acc agt gac gag tgt cta tac tgc agc ccc gtg tgc	355					
Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys						
	75	80	85			
aag gag ctg cag tac gtc aag cag gag tgc aat cgc acc cac aac cgc	403					
Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg						
	90	95	100			
gtg tgc gaa tgc aag gaa ggg cgc tac ctt gag ata gag ttc tgc ttg	451					
Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu						

ES 2 426 196 T3

105	110	115	
aaa cat agg agc tgc cct cct gga ttt gga gtg gtg caa gct gga acc Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr 120 125 130 135			499
cca gag cga aat aca gtt tgc aaa aga tgt cca gat ggg ttc ttc tca Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser 140 145 150			547
aat gag acg tca tct aaa gca ccc tgt aga aaa cac aca aat tgc agt Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn Cys Ser 155 160 165			595
gtc ttt ggt ctc ctg cta act cag aaa gga aat gca aca cac gac aac Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn 170 175 180			643
ata tgt tcc gga aac agt gaa tca act caa aaa tgt gga ata gat gtt Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val 185 190 195			691
acc ctg tgt gag gag gca ttc ttc agg ttt gct gtt cct aca aag ttt Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe 200 205 210 215			739
acg cct aac tgg ctt agt gtc ttg gta gac aat ttg cct ggc acc aaa Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys 220 225 230			787
gta aac gca gag agt gta gag agg ata aaa cgg caa cac agc tca caa Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Gln His Ser Ser Gln 235 240 245			835
gaa cag act ttc cag ctg ctg aag tta tgg aaa cat caa aac aaa gcc Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Ala 250 255 260			883
caa gat ata gtc aag aag atc atc caa gat att gac ctc tgt gaa aac Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn 265 270 275			931
agc gtg cag cgg cac att gga cat gct aac ctc acc ttc gag cag ctt Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu 280 285 290 295			979
cgt agc ttg atg gaa agc tta ccg gga aag aaa gtg gga gca gaa gac Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp 300 305 310			1027
att gaa aaa aca ata aag gca tgc aaa ccc agt gac cag atc ctg aag Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys 315 320 325			1075
ctg ctc agt ttg tgg cga ata aaa aat ggc gac caa gac acc ttg aag Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys 330 335 340			1123
ggc cta atg cac gca cta aag cac tca aag acg tac cac ttt ccc aaa Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys 345 350 355			1171
act gtc act cag agt cta aag aag acc atc agg ttc ctt cac agc ttc Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe 360 365 370 375			1219

ES 2 426 196 T3

```

aca atg tac aaa ttg tat cag aag tta ttt tta gaa atg ata ggt aac      1267
Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn
                380                      385                      390

cag gtc caa tca gta aaa ata agc tgc tta taa ctggaaatgg ccattgagct    1320
Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu
                395                      400

gtttcctcac aattggcgag atcccatgga tgataa                                1356

```

<210> 15

<211> 401

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

ES 2 426 196 T3

				245					250					255	
Trp	Lys	His	Gln	Asn	Lys	Ala	Gln	Asp	Ile	Val	Lys	Lys	Ile	Ile	Gln
			260					265					270		
Asp	Ile	Asp	Leu	Cys	Glu	Asn	Ser	Val	Gln	Arg	His	Ile	Gly	His	Ala
		275					280					285			
Asn	Leu	Thr	Phe	Glu	Gln	Leu	Arg	Ser	Leu	Met	Glu	Ser	Leu	Pro	Gly
	290					295					300				
Lys	Lys	Val	Gly	Ala	Glu	Asp	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Lys	Ala	Cys	Lys
305					310					315					320
Pro	Ser	Asp	Gln	Ile	Leu	Lys	Leu	Leu	Ser	Leu	Trp	Arg	Ile	Lys	Asn
			325						330					335	
Gly	Asp	Gln	Asp	Thr	Leu	Lys	Gly	Leu	Met	His	Ala	Leu	Lys	His	Ser
			340					345					350		
Lys	Thr	Tyr	His	Phe	Pro	Lys	Thr	Val	Thr	Gln	Ser	Leu	Lys	Lys	Thr
		355					360					365			
Ile	Arg	Phe	Leu	His	Ser	Phe	Thr	Met	Tyr	Lys	Leu	Tyr	Gln	Lys	Leu
	370					375					380				
Phe	Leu	Glu	Met	Ile	Gly	Asn	Gln	Val	Gln	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys
385					390					395					400
Leu															

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido TSG-6, o un polinucleótido que codifica un polipéptido TSG-6, para su uso en un procedimiento para el tratamiento o prevención de la osteoporosis, en el que el polipéptido TSG-6 o polinucleótido no se administra con pentraxina larga 3 (PTX3).
2. Un polipéptido TSG-6 o polinucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido TSG-6 comprende:
- 10 (a) la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 2 ó 5;
- (b) una variante de la misma que tiene al menos el 50% de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 2 ó 5 y el receptor activador de la actividad de unión del ligando NFκB (RANKL); o
- 15 (c) un fragmento de (a) o (b) que tiene actividad de unión a RANKL.
3. Un polipéptido TSG-6 o polinucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho polipéptido consiste en la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2, 5, 9, 10 u 11.
- 20 4. Un polipéptido TSG-6 o polinucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polinucleótido comprende:
- (a) la secuencia codificante de SEQ ID NO: 1, 4, 8 ó 12;
- 25 (b) una secuencia que se degenera como resultado del código genético con respecto a la secuencia como se define en (a);
- (c) una secuencia que tiene al menos el 60% de identidad con respecto a una secuencia como se define en (a) o (b) y que codifica un polipéptido que tiene actividad de unión a RANKL; o
- 30 (d) un fragmento de una cualquiera de las secuencias como se define en (a), (b) o (c) que codifica un polipéptido que tiene actividad de unión a RANKL.
5. Un polipéptido TSG-6 o polinucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho polinucleótido consiste en la secuencia de ácido nucleico mostrada en la SEQ ID NO: 1, 4, 8 ó 12.
- 35 6. Un polipéptido TSG-6 o polinucleótido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido TSG-6 o polinucleótido se administra en combinación con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un polipéptido de osteoprotegerina (OPG), un polinucleótido que codifica un polipéptido OPG o un mimético OPG.
- 40 7. Un polipéptido TSG-6 o polinucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el polipéptido OPG:
- 45 (a) comprende, o consiste en, la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 15;
- (b) comprende una variante de la misma que tiene al menos el 50% de identidad con respecto a la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 15 y que tiene actividad de unión a RANKL; o
- 50 (c) comprende un fragmento de (a) o (b) que tiene actividad de unión a RANKL.
8. Un polipéptido TSG-6 o polinucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el polinucleótido OPG comprende:
- 55 (a) la secuencia codificante de SEQ ID NO: 14;
- (b) una secuencia que se degenera como resultado del código genético con respecto a la secuencia como se define en (a);
- 60 (c) una secuencia que tiene al menos el 60% de identidad con respecto a una secuencia como se define en (a) o (b) y que codifica un polipéptido que tiene actividad de unión a RANKL; o

(d) un fragmento de una cualquiera de las secuencias como se define en (a), (b) o (c) que codifica un polipéptido que tiene actividad de unión a RANKL.

5 9. Un polipéptido TSG-6, o un polinucleótido que codifica un polipéptido TSG-6, y un polipéptido OPG, un polinucleótido que codifica un polipéptido OPG o un mimético OPG para su uso en un procedimiento para el tratamiento o prevención de la osteoporosis.

10. Un polipéptido TSG-6 o polinucleótido para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que (a) el
10 polipéptido TSG-6 o el polinucleótido y (b) el polipéptido, polinucleótido o mimético OPG se administran simultáneamente, por separado o secuencialmente.

11. Uso de un polipéptido TSG-6, o un polinucleótido que codifica un polipéptido TSG-6, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la osteoporosis, en el que el polipéptido TSG-6 o
15 polinucleótido no se administra con pentraxina larga 3 (PTX3).

12. Un producto que contiene:

(a) un polipéptido TSG-6, o un polinucleótido que codifica un polipéptido TSG-6; y

20

(b) un polipéptido OPG, un polinucleótido que codifica un polipéptido OPG o un mimético OPG;

para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento o prevención de la osteoporosis.

Figura 1

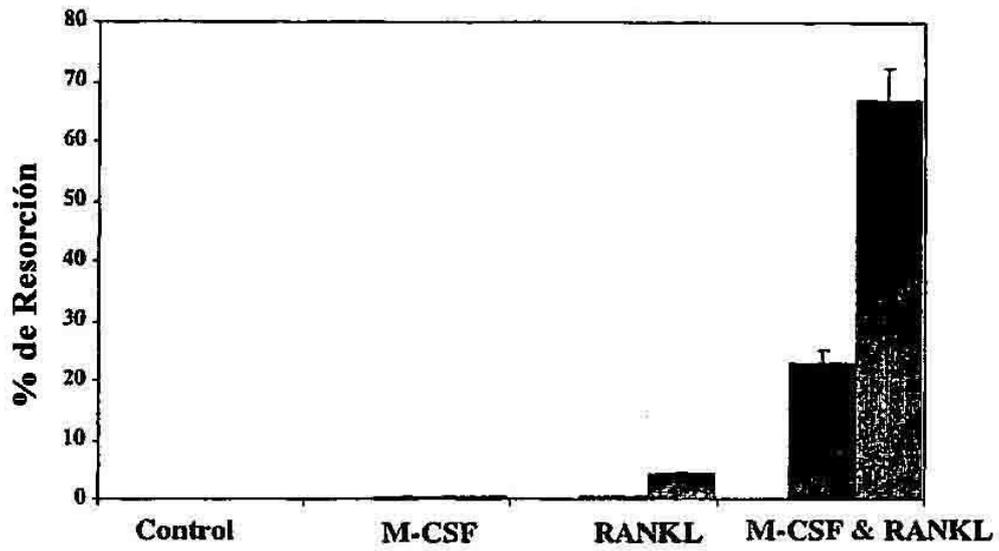


Figura 2

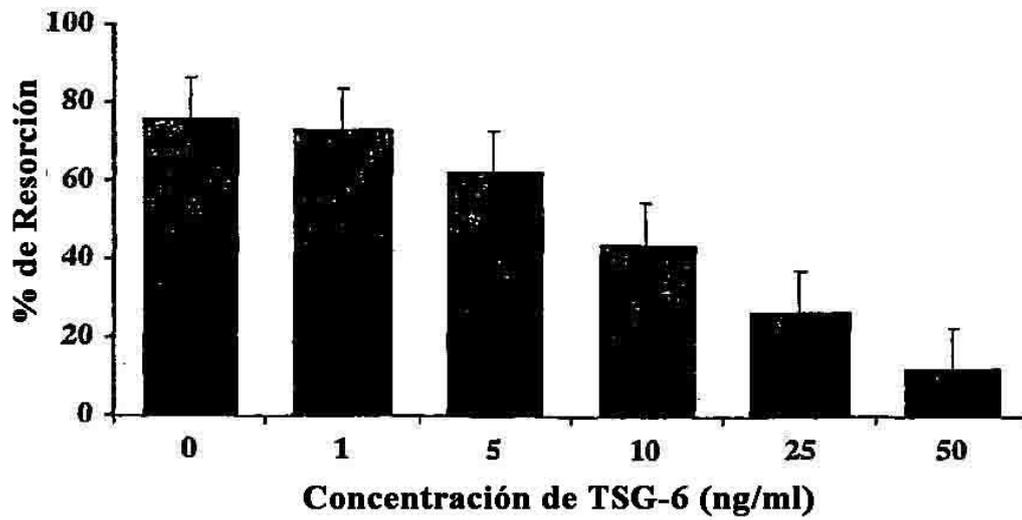


Figura 3

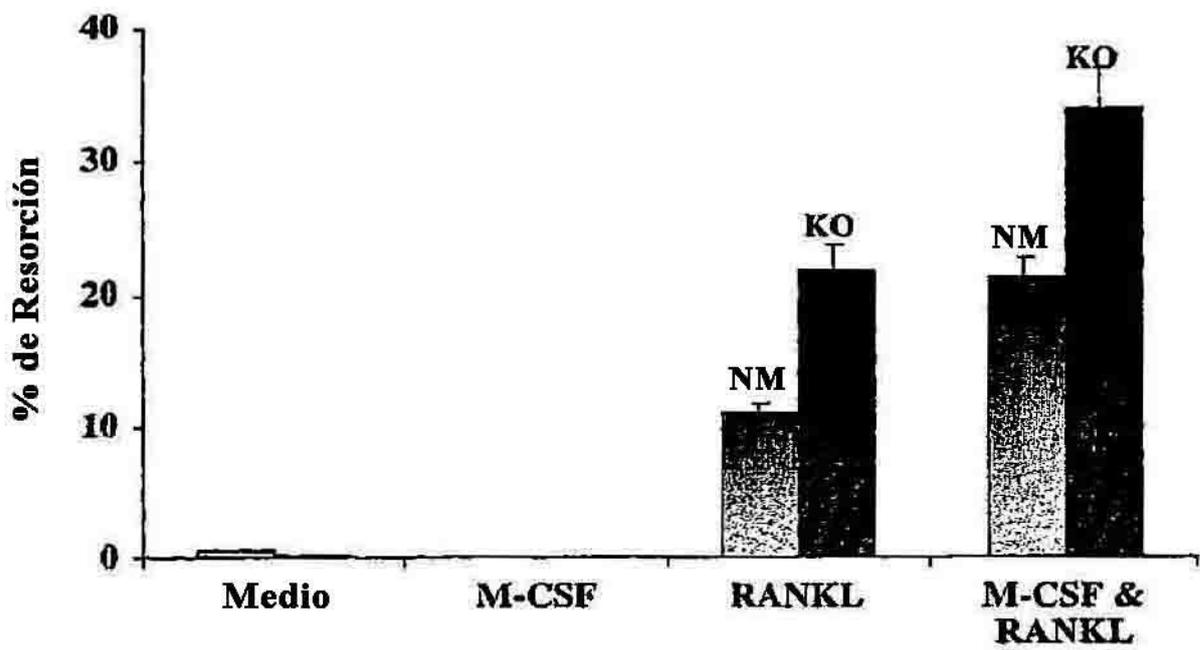


Figura 4

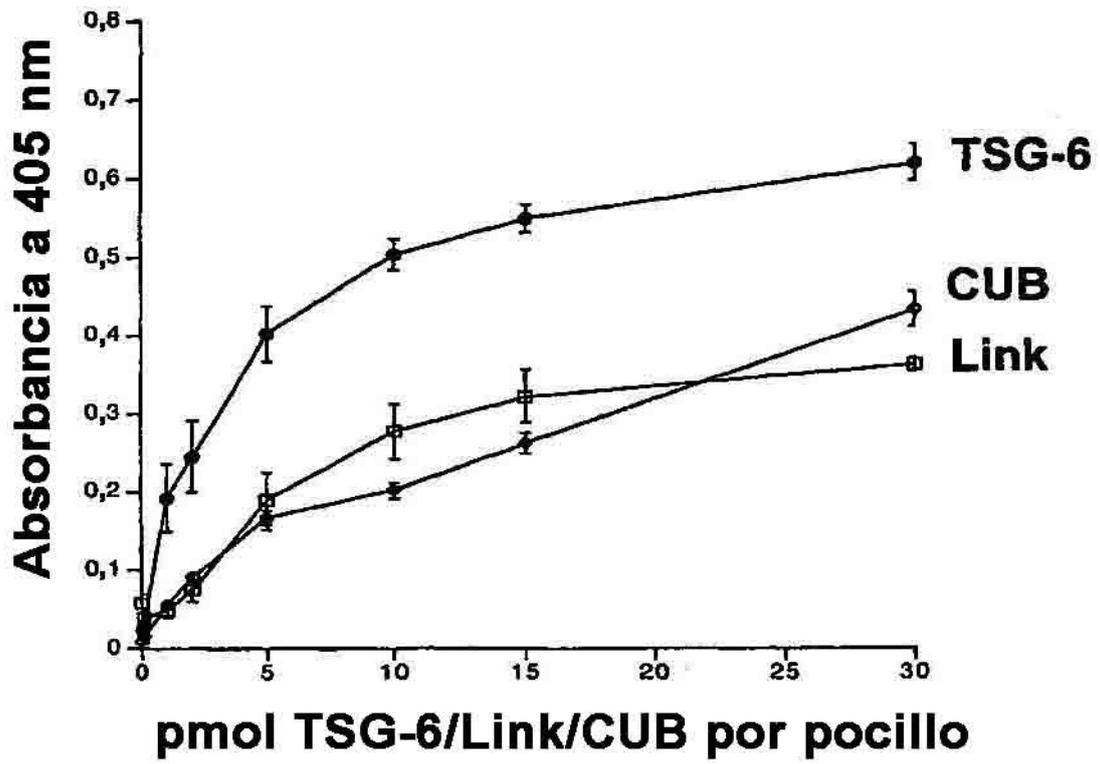


Figura 5

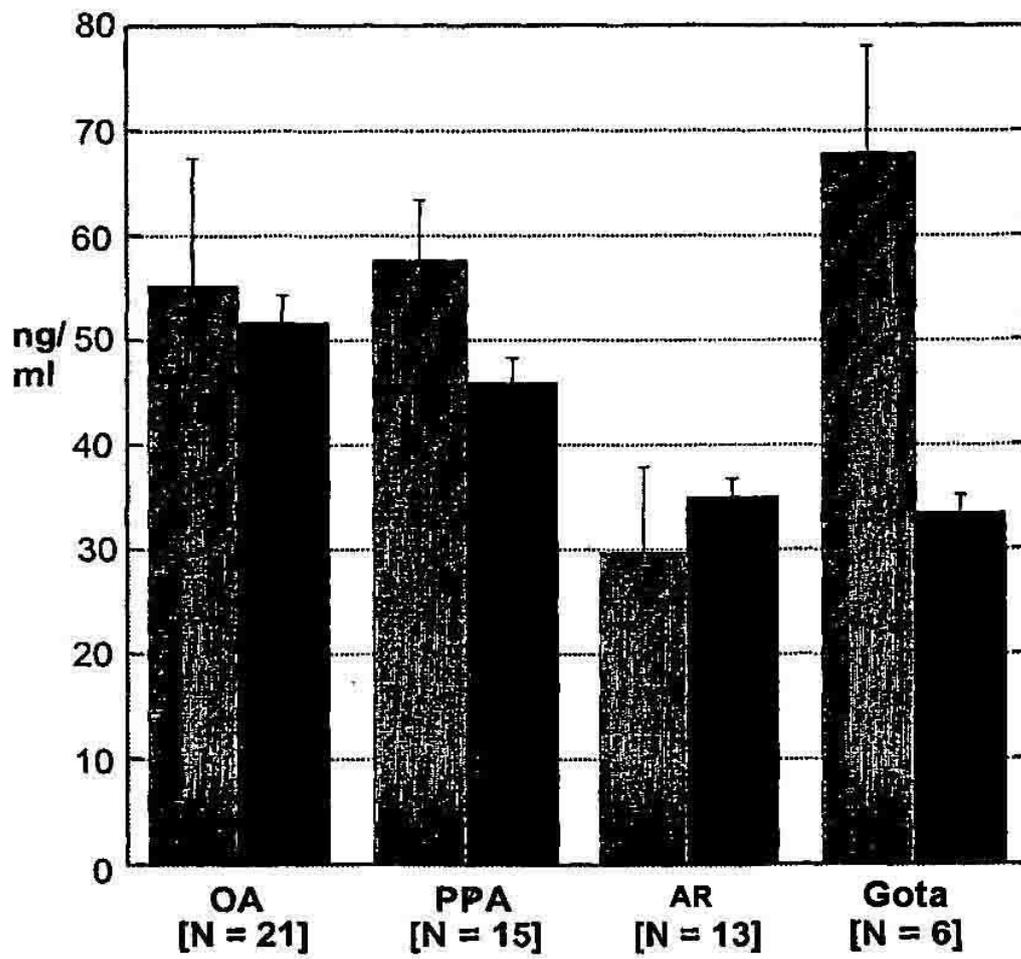


Figura 6

