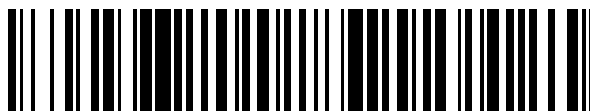


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 096**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61P 19/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2006 E 06726785 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 1874331**

54 Título: **Uso de bip contra la pérdida ósea y osteoporosis**

30 Prioridad:

**19.04.2005 GB 0507874**

**20.04.2005 GB 0507986**

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

**17.12.2014**

73 Titular/es:

**KINGS COLLEGE LONDON (100.0%)  
THE STRAND  
LONDON WC2R 2LS, GB**

72 Inventor/es:

**PANAYI, GABRIEL STAVROS y  
CORRIGAL, VALERIE MARY**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 525 096 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 bip contra la pérdida ósea y osteoporosis

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al uso de BiP en la fabricación de una composición para la prevención o el tratamiento de pérdida ósea o resorción ósea. La presente invención se refiere también a métodos, tales como métodos diagnósticos y métodos de ensayo, composiciones farmacéuticas, animales transgénicos y métodos para prepararlos.

**Antecedentes de la invención**

10 La remodelación ósea desregulada es una parte importante de la patología de una serie de enfermedades. En dichas afecciones, la producción y activación aceleradas de la población de osteoclastos que resorben los huesos es causada por una red de mediadores aberrante todavía no identificada. En los últimos diez años, se han identificado las vías de señalización principales y los factores de transcripción que controlan el compromiso y la diferenciación de células madre hematopoyéticas y los precursores de monocitos/macrófagos al linaje de osteoclastos, proliferación y activación de osteoclastos (1-5). Se reconoce ahora que la señalización mediante el activador del receptor de NF- $\kappa$ B (RANK) constitutivamente expresado en precursores de osteoclastos después de la unión al ligando RANK (RANKL), junto con la activación por el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), produce una compleja serie de eventos que conducen a la producción de osteoclastos maduros. *In vivo*, tanto M-CSF como RANKL son provistos por los osteoblastos que, junto con el receptor señuelo osteoprotegerina (OPG)(6-7), sirven para regular la diferenciación de osteoclastos y la resorción ósea. Es a través del componente de los osteoblastos que las hormonas sistémicas y las citocinas actúan indirectamente para influir en este proceso, donde la relación relativa de RANKL a OPG controla de manera crítica la osteoclastogénesis. En los estados patológicos (como artritis reumatoidea (AR)), no obstante, RANKL puede proveerse adicionalmente por las células T activadas, sinoviocitos de tipo fibroblastos y otras células estromales (8-10). La unión RANKL-RANK activa las cascadas de señalización celular a través de varias etapas clave. El proceso depende del reclutamiento de proteínas del factor asociado al receptor de TNF (TRAF), cascadas de proteína cinasa activadas por mitógenos (ERIC, JNK y p38) además de la activación mediada por Src y fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) de Akt, y todas estas vías de señalización de RANK convergen en última instancia para activar varias familias de factores de transcripción, tales como NF- $\kappa$ B (11), proteína activadora 1 (AP-1) (12), particularmente c-Fos (13), y factor nuclear de células T activadas (NFAT), específicamente NFATc1 (1;5;14;15). El hecho de que estas moléculas de señalización y factores de transcripción tienen roles esenciales en la diferenciación y activación de osteoclastos se ha demostrado inequívocamente en mutantes de ratones con pérdida de la función *in vivo* (5).

Se han notificado las propiedades antiinflamatorias de una chaperona molecular humana que se conoce como proteína de unión a inmunoglobulina (BiP) o proteína regulada por glucosa (Grp)78 (17). El gen que codifica BiP se ha clonado y expresó la proteína humana recombinante (rhu) (documento WO 00/21995).

35 La administración de rhuBiP a ratones con artritis inducida por colágeno (CIA), previno la inducción de artritis experimental (17). Una indicación del mecanismo de acción antiinflamatorio de BiP fue el hallazgo de que los clones de células T sensibles a rhuBiP produjeron las citocinas, IL-10, IL-4 y IL-5 (18) y que las células mononucleares (MC) de sangre periférica (PB) estimuladas por BiP produjeron altas concentraciones de IL-10 con atenuación recombinante de la producción de TNF- $\alpha$ . PBMC también produjo cantidades en aumento del agonista de IL-1R y TNFRII soluble (19). Las citocinas liberadas de PBMC en respuesta a BiP regulan la osteoclastogénesis (20; 21).

40 Para reforzar el hecho de que estas funciones extracelulares de BiP tienen relevancia biológica, el inmunoensayo de fluidos sinoviales ha revelado que la mayoría de aquellos pacientes con AR presentan BiP soluble (19). También se sabe que la función de presentación de antígenos de los monocitos (MO) se reduce después de la disminución de expresión de CD86 y HLA-DR (19), y que BiP demora y previene la maduración de PBMC purificadas en células dendríticas inmaduras (iDC) (22).

El uso de BiP en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de respuesta inmunitaria no deseada se describe en el documento W002/072133.

50 El hueso es continuamente formado o digerido por células especiales llamadas osteoblastos u osteoclastos respectivamente. Hay muchas enfermedades en las que ocurre la erosión o el afinamiento óseo debido a un desequilibrio entre la formación ósea y la disolución ósea. Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica de desarrollar fármacos que modulen (p. ej., prevengan) este proceso.

**Compendio de la invención**

55 La presente invención se basa, en parte, en el sorprendente hallazgo de que BiP inhibe, previene o disminuye la resorción ósea y la maduración de osteoclastos. Sin desear estar influenciados por ninguna teoría en particular, se cree que esta inhibición es eficaz a través de la modulación de vías de señalización esenciales, que son activadas

durante el proceso de diferenciación. Por consiguiente, BiP posee aplicación terapéutica, entre otros, en la pérdida ósea.

En el documento W002/072133, se describe que BiP tiene propiedades inmunomoduladoras y se describe el uso de BiP para tratar o prevenir una respuesta inmunitaria indeseada. Asimismo, se describe el uso de BiP para tratar enfermedades autoinmunitarias. A modo de ejemplo, esta cita describe que las células mononucleares de sangre humana cultivadas con BiP liberan IL-10, que puede reducir las enfermedades autoinmunitarias que se describen allí, tal como artritis reumatoidea (AR). Asimismo, Corrigan *et al.* (17) describen que BiP se puede usar para inhibir el desarrollo de artritis reumatoidea y es candidata para la inmunoterapia de este trastorno. Por lo tanto, si bien se han descrito las propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias de BiP, no se describe en la técnica anterior el hallazgo sorprendente presentado en este documento de que BiP puede modular directamente la resorción ósea y la maduración de osteoclastos.

Ensayos de diferenciación de osteoclastos *in vitro*, que usan macrófagos de médula ósea de ratón (BMM) y PBMC humanas cultivadas en presencia de M-CSF y RANKL. Los resultados demuestran que en ensayos de diferenciación, tanto en ratones como en seres humanos, el número de osteoclastos visualizados por tinción para fosfatasa ácida resistente a fosfato (TRAP), receptor de vitronectina (VnR,  $\alpha v\beta 3$ ) o presencia de anillos de actina F se redujo, y esto se correspondió con reducciones en la actividad de resorción (Figura 3). Asimismo, la adición de BiP a osteoclastos maduros redujo el número de osteoclastos (Figura 4). Además, en otra serie de experimentos que se describen en este documento, se han investigado cambios globales en la expresión génica en PBMO purificados en respuesta a BiP. Los experimentos que usan la tecnología de matriz génica Affymetrix han demostrado que el tratamiento con BiP de PBMO purificados causa reducción y aumento de muchos genes, en comparación con PBMO sin estimulación. BiP reduce la expresión de VnR (24), CD44 (25), osteopontina (26), IKK (14) y c-Fos (13), los cuales tienen todas funciones importantes, o son esenciales para la diferenciación de osteoclastos (Figura 5).

#### Aspectos compendiados de la presente invención

En un primer aspecto, se da a conocer el uso de BiP o su variante, homólogo, derivado o fragmento en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de pérdida ósea.

En un segundo aspecto, se da a conocer el uso de BiP o su variante, homólogo, derivado o fragmento para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de resorción ósea.

También se describe el uso de BiP en la modulación de la maduración de osteoclastos.

También se describe un método para prevenir o tratar pérdida ósea, que comprende administrar BiP o su variante, homólogo, derivado o fragmento para causar un efecto preventivo o terapéutico beneficioso.

También se describe un método para prevenir o tratar resorción ósea, que comprende administrar BiP o su variante, homólogo, derivado o fragmento para causar un efecto preventivo o terapéutico beneficioso.

También se describe un método para modular el desarrollo de osteoclastos, que comprende poner en contacto un osteoclasto con BiP o su variante, homólogo, derivado o fragmento.

En un tercer aspecto, se da a conocer un método de diagnóstico de una enfermedad o síndrome causado por o asociado con pérdida ósea, que comprende las etapas de: (a) detectar la actividad de BiP en un sujeto; (b) comparar la actividad de BiP con aquella de un control no afectado; y (c) comparar el valor obtenido del control con el valor obtenido del sujeto; en donde una diferencia entre el valor obtenido del control y el valor obtenido del sujeto es indicativa de que el sujeto padece la enfermedad o el síndrome.

También se describe un método de ensayo para identificar un agente que modula la destrucción ósea o la pérdida ósea, que comprende las etapas de: (i) seleccionar un agente que modula la actividad de BiP; y (ii) medir la maduración de osteoclastos en presencia de dicho agente; en donde una diferencia entre la maduración de osteoclastos en ausencia del agente y la maduración de osteoclastos en presencia del agente es indicativa de un agente que modula la destrucción ósea o la pérdida ósea. También se describe un proceso que comprende las etapas de: (a) efectuar el ensayo anteriormente descrito; (b) identificar uno o más agentes que modulan la destrucción ósea o la pérdida ósea; y (c) preparar una cantidad de ese o esos agentes identificados. También se describe un agente obtenido mediante el método de ensayo anteriormente descrito.

En un cuarto aspecto, se da a conocer un método para determinar el efecto(s) de BiP o su variante, homólogo, derivado o fragmento sobre la diferenciación de osteoclastos, que comprende las etapas de: (a) añadir BiP a uno o más osteoclastos que están en una o más etapas diferentes de la diferenciación de osteoclastos; y (b) determinar el efecto(s) de BiP sobre la osteoclastogénesis.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un método para identificar una o más proteínas que son moduladas por BiP durante la diferenciación de osteoclastos, que comprende las etapas de: (a) diferenciar un osteoclasto en presencia y ausencia de BiP; y (b) identificar una o más proteínas que están expresadas de manera

diferente en un osteoclasto diferenciado en presencia de BiP en comparación con un osteoclasto diferenciado en ausencia de BiP.

En un sexto aspecto, la presente invención se refiere al uso de BiP o su variante, homólogo, derivado o fragmento en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la osteoporosis.

**5 Realizaciones preferidas**

Preferiblemente, la invención se refiere al uso de BiP para la elaboración de un medicamento para pérdida ósea.

Preferiblemente, la invención se refiere al uso de BiP para la elaboración de un medicamento para resorción ósea.

Preferiblemente, la invención se refiere a BiP para uso en el tratamiento de pérdida ósea.

Preferiblemente, la invención se refiere a BiP para uso en el tratamiento de resorción ósea.

10 Preferiblemente, la pérdida ósea o la resorción ósea es la destrucción ósea asociada con cáncer o metástasis de cáncer. Esta destrucción ósea tiene la misma base biológica que las otras formas de pérdida ósea analizadas en el presente documento.

Preferiblemente, la pérdida ósea o la resorción ósea están asociadas con enfermedad musculoesquelética. Preferiblemente, la enfermedad musculoesquelética es osteoporosis.

15 Preferiblemente, la modulación es inhibición, reducción o prevención de maduración o desarrollo de osteoclastos.

Preferiblemente, la modulación de maduración de osteoclastos se realiza *in vivo* o *in vitro*.

Preferiblemente, el osteoclasto es un precursor de osteoclastos, un precursor multi-nucleado o un osteoclasto maduro.

20 Preferiblemente, en el método de acuerdo con el séptimo aspecto de la presente invención, la actividad de BiP disminuye en comparación con los valores obtenidos de un control.

Preferiblemente, el método de acuerdo con el séptimo aspecto de la presente invención comprende la etapa opcional de medir el desarrollo de osteoclastos o la resorción ósea.

Preferiblemente, el agente(s) descrito en este documento aumenta o incrementa la actividad de BiP.

25 Preferiblemente, en el método de acuerdo con el décimo primer aspecto de la presente invención, se añade BiP en una concentración de 0,02-20 µg/ml.

Preferiblemente, el número de osteoclastos se cuantifica midiendo la actividad de TRAP, VnR y/o anillos de actina F.

Preferiblemente, el método de acuerdo con el décimo primer aspecto de la presente invención comprende la etapa opcional de cuantificar la resorción ósea.

30 Preferiblemente, la diferenciación de osteoclastos se confirma usando PCR para medir la expresión de uno o más marcadores específicos de osteoclastos.

Preferiblemente, el marcador o los marcadores específicos de osteoclastos consisten en el gen receptor de calcitonina o el gen de catepsina K.

Preferiblemente, la proteína(s) identificada de acuerdo con el décimo segundo aspecto de la presente invención es una molécula de señalización o un factor de transcripción.

35 Preferiblemente, se añade BiP durante un periodo de 24-72 horas, o bien al comienzo del cultivo o hacia el final del cultivo cuando los osteoclastos multinucleados están presentes en el método de acuerdo con el décimo segundo aspecto de la presente invención.

Preferiblemente, el ácido nucleico codifica la proteína(s) o la proteína(s) se detecta usando qt-RT-PCR y/o inmunotransferencia.

**40 Descripción de las figuras**

Figura 1

Unión de BiP.FITC a monocitos de sangre periférica. Se usaron albúmina de suero humana.FITC (sólido) o BiP.FITC (abierto) para teñir monocitos humanos durante 20 min a 4° C y se midió la fluorescencia por citometría de flujo. Se generó el histograma FACscan usando el software Cellquest.

## Figura 2

BiP inhibe la resorción ósea en el modelo de bóveda craneal murina. Se añadió BiP (1-1000ng/ml) a una bóveda craneal de ratón incubada con RANKL durante 5 días. Se determinó la resorción ósea por liberación de calcio.

## Figura 3

- 5 Efecto de BiP sobre la diferenciación de osteoclastos cuando se añade con M-CSF y RANKL. Se utilizó TRITC-faloidina para detectar células positivas con anillos de actina F después de 14 días de cultivo de monocitos humanos con BiP (0,02-20 µg/ml) y M-CSF + RANKL en comparación con cultivos control con M-CSF + RANKL solo. La resorción ósea se midió por tinción con azul de toluidina de lagunas de resorción en porciones de dentina. \* p< 0,03.

## Figure 4

- 10 Adición de BiP a osteoclastos maduros. Se añadió BiP (2-50 µg/ml) a osteoclastos humanos maduros en el día 10. En el día 14, las células positivas para anillos de actina F se midieron usando TRITC-faloidina.

## Figura 5

- 15 Coeficiente de aumento de la actividad génica, inducida por BiP, medido por la matriz génica Affymetrix. Se analizaron por duplicado chips de la matriz génica Affymetrix usando monocitos humanos purificados preparados por selección inmunomagnética negativa y se cultivaron o bien en ausencia o en presencia de BiP (20 µg/ml) durante 24 horas. La diferencia en veces en la expresión se calculó por la diferencia en la expresión génica entre células tratadas con BiP y células en reposo. Todos los datos se analizaron con el software GeneSpring.

## Figura 6

- 20 Análisis con matriz génica Affymetrix. Monocitos purificados o bien se estimularon con BiP o no se estimularon, y se midió y comparó la activación génica en muestras por duplicado. Aquellos genes que también se registraron como con aumento o reducción similar en la matriz génica de citocinas R&D (\*) o que se han verificado por citometría de flujo y/o producción de proteínas (✓) se marcan como tales. Un coeficiente de reducción de -20 es una indicación esquemática de la ausencia de actividad génica en los monocitos tratados con BiP.

**Descripción detallada de la invención**

## 25 BIP

- Tal como se emplea en este documento, el término "BiP" se refiere a la proteína chaperona del retículo endoplasmático de 78 kD descrita en el documento WO 00/21995. Preferiblemente, el polipéptido de BiP tiene la secuencia de aminoácidos que se indica en el anexo 2 del documento WO 00/21995, en la página 23. Preferiblemente, la proteína BiP tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en el documento WO 00/21995 como SEC ID NÚM. 1 o SEC ID NÚM. 2. Preferiblemente, las secuencias de BiP utilizadas en esta memoria carecen de etiquetas tales como las etiquetas 6His presentes en los polipéptidos a los que se hizo referencia más arriba. Tal como se emplea en este documento, la expresión "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "polipéptido" y/o del término "proteína". En algunos casos, la expresión "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "péptido". En algunos casos, la expresión "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "proteína".

- 35 Preferiblemente, la proteína BiP está codificada por la secuencia de nucleótidos que se expone en el documento WO 00/21995 como SEC ID NÚM. 3. La secuencia de nucleótidos puede ser DNA o RNA de origen genómico, sintético o recombinante, p. ej., cDNA. La secuencia de nucleótidos puede ser bicatenaria o monocatenaria, ya sea que represente la cadena sentido o antisentido o sus combinaciones. La secuencia de nucleótidos puede prepararse con el uso de técnicas de DNA recombinantes (p.ej., DNA recombinante). En particular, los métodos para la expresión de BiP en *E. coli* y purificación de la proteína recombinante se describen en el documento WO 00/21995. La secuencia de nucleótidos puede ser la misma forma que ocurre naturalmente o puede ser su fragmento, homólogo, variante o derivado.

Tal como se emplea en este documento, la expresión "actividad de BiP" se refiere al nivel y/o patrón de expresión y/o actividad de BiP.

## 45 Osteoclastos

Tal como se emplea en este documento, el término "osteoclasto" se refiere a una célula que reabsorbe activamente el hueso de modo que el hueso nuevo puede reemplazarse por células de osteoblastos. Este término abarca por lo menos precursores de osteoclastos, precursores de osteoclastos multinucleados y osteoclastos maduros.

- 50 Para enfermedades en las que los osteoclastos resorben el hueso en niveles anormales (p. ej., niveles anormalmente altos) y en las que los osteoblastos forman hueso en niveles normales, como por ejemplo en enfermedades musculoesqueléticas, el osteoclasto es una diana terapéutica. A modo de ejemplo, la estrategia terapéutica puede depender de reducir el número de osteoclastos o la actividad de resorción de los osteoclastos.

Esta estrategia se puede usar para restaurar el equilibrio entre la resorción y la formación ósea. En el contexto de la presente invención, la diana terapéutica es la modulación (p. ej., la inhibición) del desarrollo de osteoclastos, preferiblemente la maduración de osteoclastos, usando BiP.

5 En el contexto de la presente invención, la maduración de osteoclastos también incluye la diferenciación y el desarrollo de osteoclastos, como se describe en los Ejemplos anejos. La maduración de osteoclastos incluye, aunque sin limitarse a ello, la maduración (p. ej., diferenciación) de un precursor de osteoclastos o un precursor multinucleado en un osteoclasto maduro.

10 Para una revisión de la función de los osteoblastos y osteoclastos en los proceso de formación y resorción ósea, se puede hacer referencia a H. Fleisch, Bisphosphonates In Bone Disease, From The Laboratory To The Patient, 3ª edición, Parthenon Publishing (1997).

A modo de información antecedente, los osteoclastos son células que resorben el hueso implicadas en la remodelación ósea. Son células fagocíticas multinucleadas, ricas en la enzima fosfatasa de ácido resistente a tartrato, formadas por fusión de precursores derivados de células de linaje de monocitos/macrófagos. Se han identificado varias moléculas que son de importancia clave en la regulación de la diferenciación de osteoclastos (*Br Med J* 1997; 315:469-472). El factor de transcripción *PU-1* que se expresa en los precursores de osteoclastos tempranos es necesario para las etapas iniciales de diferenciación de osteoclastos y monocitos, mientras que otros factores de transcripción, incluidos *c-fos* y *NF-κB*, cumplen una función esencial en estimular la diferenciación de precursores comprometidos con osteoclastos maduros. La formación y activación de los osteoclastos también depende del contacto cercano entre los precursores de osteoclastos y las células estromales de médula ósea. Las células estromales segregan la citocina *M-CSF*, que es esencial para la diferenciación tanto de osteoclastos como macrófagos a partir de un precursor común. Las células estromales también expresan una molécula llamada ligando *RANK* (*RANKL*) en la superficie celular, que interactúa con otro receptor de superficie celular presente en los precursores de osteoclastos llamado *RANK* (Activador del receptor del factor nuclear  $\kappa$ B) para promover la diferenciación de precursores de osteoclastos para osteoclastos maduros. La interacción *RANK-RANKL* es bloqueada por otra molécula llamada Osteoprotegerina (*OPG*), que es un ligando "señuelo" para *RANK* y que actúa como un inhibidor potente de la formación de osteoclastos. Los osteoclastos maduros forman una firme obturación sobre la superficie del hueso y resorben el hueso segregando ácido clorhídrico y enzimas proteolíticas a través del "borde plegado" hacia un espacio debajo del osteoclasto (laguna de Howship). La formación de este borde plegado depende críticamente de la presencia de *c-src*, una membrana celular asociada con la proteína de señalización. El ácido clorhídrico segregado por los osteoclastos disuelve hidroxapatita y permite que las enzimas proteolíticas (principalmente Catepsina K y metaloproteinasas de matriz) degraden el colágeno y otras proteínas de matriz. Las moléculas que se han identificado como importantes en la regulación de la actividad de los osteoclastos incluyen anhidrasa carbónica II (Ca-II), que cataliza la formación de iones de hidrógeno dentro de los osteoclastos; *TCIRG1*, que codifica una subunidad de la bomba de protones de osteoclastos, y Catepsina K, que degrada colágeno y otras proteínas no colaginosas. Una vez que se completa la resorción, los osteoclastos experimentan muerte celular programada (apoptosis), en la llamada fase inversa que anuncia el inicio de la formación ósea.

#### Pérdida ósea

40 Los trastornos asociados o relacionados con la pérdida ósea incluyen, aunque sin limitarse a ello, enfermedad de Paget, osteoporosis primaria y secundaria, osteoporosis posmenopáusica, osteoporosis senil, osteoporosis inducida por glucocorticoides, enfermedad periodontal, pérdida ósea alveolar, pérdida ósea post-osteotomía e idiopática infantil, complicaciones a largo plazo de la osteoporosis tales como curvatura de la columna vertebral y pérdida de estatura, y cirugía protésica, como también aflojamiento de articulaciones protésicas tales como caderas, rodillas y similares.

45 La pérdida ósea se puede caracterizar por destrucción ósea, erosión ósea, afinamiento óseo o digestión ósea. Como será obvio en la presente memoria, esto puede aparejar un cambio patológico en el equilibrio entre el depósito óseo y la resorción ósea.

50 En otra realización, se puede usar BiP en el tratamiento de una o más afecciones asociadas con poca masa ósea. Dichas afecciones serán obvias si el nivel de masa ósea es inferior al normal específico para la edad, según lo definido por las normas de evaluación del riesgo de fracturas y su aplicación a detección de osteoporosis posmenopáusica (World Health Organization Assessment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis) (1994) de la Organización Mundial de la Salud, Report of a World Health Organization Study Group. World Health Organization Technical Series 843. La frase "afección/afecciones que presentan poca masa ósea" también se refiere a vertebrados, p. ej., un mamífero conocido por tener una probabilidad significativamente mayor que el promedio de desarrollar enfermedades, tales como osteoporosis (p. ej., mujeres posmenopáusicas, hombres mayores de 50 años de edad). Otros usos que aumentan o potencian la masa ósea pueden incluir restauración ósea, aumento de la tasa de curación de la fractura ósea, cirugía de injerto óseo total, aumento del índice de injertos óseos exitosos, curación ósea después de una reconstrucción facial o reconstrucción maxilar o reconstrucción mandibular, crecimiento protésico, sinostosis vertebral o extensión de hueso largo.

5 En una realización altamente preferida, se usa BiP para la prevención o el tratamiento de resorción ósea. En el contexto de la presente invención, la resorción ósea se previene o se trata modulando (p. ej., previniendo) la resorción ósea o la alteración directa o indirecta de la formación o actividad de los osteoclastos. La resorción ósea puede modularse inhibiendo la eliminación de hueso existente o bien de la fase mineral y/o de la fase de la matriz orgánica, a través de alteración directa o indirecta de la formación o la actividad de los osteoclastos. Una diversidad de trastornos en seres humanos y otros mamíferos implican o están asociados con resorción ósea anormal. Dichos trastornos incluyen, aunque sin limitarse a ello, osteoporosis, osteoporosis inducida por glucocorticoides, enfermedad de Paget, aumento anormal del recambio óseo, enfermedad periodontal, pérdida de dientes, fracturas, osteólisis periprotésica, osteogénesis imperfecta, enfermedad ósea metastásica, hipercalcemia de malignidad y mieloma múltiple.

10 Preferiblemente, la pérdida ósea o la resorción ósea se asocia con enfermedad musculoesquelética tal como osteoporosis o enfermedad de Paget.

Preferiblemente, la pérdida ósea o la resorción ósea subyacen a la enfermedad musculoesquelética tal como osteoporosis o enfermedad de Paget.

15 En una realización altamente preferida, la afección asociada con pérdida ósea y resorción ósea es la osteoporosis.

La osteoporosis es un problema de salud importante en la sociedad y si bien hay otras enfermedades que producen la reducción de la masa ósea, por ejemplo enfermedad de Paget, la osteoporosis es por mucho la más frecuente y la más costosa en términos de asistencia sanitaria. Dado que el estrógeno es una hormona que regula el metabolismo óseo directa o indirectamente, la reducción de la producción de estrógenos en mujeres posmenopáusicas y la decadencia producida por la edad en la producción de andrógeno, que se convierte enzimáticamente a estrógeno en los hombres) es responsable del riesgo de osteoporosis, que se estima es de 85% en la mujer y de 15% en el hombre mayor de 45 años de edad. En la osteoporosis, hay una reducción en la formación ósea por osteoblastos, que normalmente ocurre debido al proceso de envejecimiento. Uno de los malos entendidos desafortunados acerca de la osteoporosis es la amplia creencia de que es prácticamente una enfermedad exclusiva del envejecimiento. Si bien la osteoporosis posmenopáusica es una de las enfermedades más frecuentes del envejecimiento en las mujeres, el proceso que conduce a inhabilitar la pérdida ósea comienza mucho antes, de hecho, se ha estimado que un segmento sorprendentemente mayor de la población femenina entre los 25 y 35 sufre de pérdida ósea acelerada. Tanto como la mitad de la pérdida ósea en la vida de una mujer ocurre antes de que comience a experimentar los síntomas de la menopausia.

30 Los métodos para tratar "osteoporosis secundaria" también se describen en la invención. La "osteoporosis secundaria" incluye, aunque sin limitarse a ello, osteoporosis inducida por glucocorticoides, osteoporosis inducida por hipertiroidismo, osteoporosis inducida por inmovilización, osteoporosis inducida por heparina y osteoporosis inducida por inmunosupresión en un vertebrado, p. ej., un mamífero (incluido un ser humano).

35 La presencia de pérdida ósea o resorción ósea se puede determinar usando diversos métodos conocidos en la técnica tales como una Evaluación de Resorción Ósea. Ésta es una evaluación no invasiva de los marcadores bioquímicos de pérdida ósea. También se puede usar para medir el índice de pérdida ósea mucho antes de que puedan detectarse los problemas usando otras mediciones, tales como densidad ósea. A medida que el marco de la matriz de hueso experimenta resorción – las reticulaciones que estabilizan las moléculas de colágeno, tales como desoxipiridinio (D-pyd) y/o piridinio (Pyd), se segregan en la orina, y sus niveles en relación con los niveles normales son una indicación de cuán rápido se está perdiendo el hueso.

40 Cuando estos marcadores están altos, es una indicación de que el hueso se está perdiendo a una velocidad mayor que la capacidad del cuerpo para reemplazarlo.

Alternativamente, la pérdida o resorción ósea se puede determinar por técnicas clínicas como exploración de absorción de rayos X por energía dual (DEXA) de la columna vertebral y/o el cuello del fémur.

45 El crecimiento óseo puede incluso promoverse en un mamífero. Las afecciones en las que la promoción del crecimiento óseo es beneficiosa incluyen fortalecimiento de un injerto óseo, inducción de sinostosis vertebral, potenciación de extensión de hueso largo, potenciación de la curación ósea después de una reconstrucción facial, reconstrucción maxilar y/o reconstrucción mandibular en un vertebrado, p. ej., un mamífero (incluido un ser humano) y similares.

50 Diagnóstico

En otro aspecto, la presente invención se puede utilizar para diagnosticar una enfermedad o un síndrome causado por asociado con pérdida ósea o resorción ósea.

55 Con el fin de proporcionar una base para el diagnóstico de enfermedad, se deben establecer niveles o patrones normales o estándar de expresión y/o actividad de BiP. Esto se puede lograr ensayando los niveles o patrones de expresión y/o actividad de BiP en una muestra de uno o más sujetos normales, tal como animales o sujetos normales humanos. Los niveles y/o patrones estándar de expresión y/o actividad de BiP en la muestra se pueden

cuantificar comparándolos con una serie de dilución de controles positivos en donde los niveles o patrones de expresión y/o actividad de BiP se encuentran en una cantidad conocida. Luego, los valores estándar obtenidos de las muestras normales pueden compararse con los valores obtenidos de las muestras de sujetos potencialmente afectados por una enfermedad causada por o asociada con pérdida ósea o resorción ósea. La desviación entre el control y los valores de los sujetos se puede usar para establecer la presencia de un estado de enfermedad. Típicamente, esta desviación será una reducción en el nivel o patrón de expresión y/o actividad de BiP en la muestra del sujeto potencialmente afectado por una enfermedad en comparación con el control.

Para llegar a un diagnóstico, puede ser necesario cuantificar osteoclastos y osteoblastos, especialmente en enfermedades en las que los osteoclastos resorben el hueso a niveles anormales (p. ej., niveles anormalmente altos) y los osteoblastos forman hueso a niveles normales, como por ejemplo en enfermedades musculoesqueléticas, tales como osteoporosis. Al cuantificar tanto osteoclastos como osteoblastos, puede ser posible determinar el equilibrio entre la resorción y la formación ósea, y determinar si está presente una enfermedad o un síndrome asociado con un desequilibrio entre este equilibrio.

Un polinucleótido de BiP o su fragmento, variante, homólogo o derivado puede proveer la base para una prueba de diagnóstico. Para propósitos diagnósticos, una secuencia polinucleotídica de BiP o cualquier parte de ésta se puede usar para detectar y cuantificar la expresión y/o actividad génica de BiP. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos tales como la SEC ID NÚM. 3 del documento WO 00/21995, que codifican BiP, se pueden usar en ensayos de hibridación o PCR de muestras para detectar anomalías en la expresión de BiP. La forma de dichos métodos cualitativos y cuantitativos puede incluir análisis Southern o Northern, membrana de transferencia puntual (dot blot) u otras tecnologías basadas en membranas; tecnologías de PCR; tiras reactivas, tecnologías de pin o chip; y ELISA u otras tecnologías de múltiples muestras. Todas estas técnicas se conocen en el campo y son de hecho la base de muchos kits diagnósticos comercialmente disponibles.

Por ejemplo, el ensayo diagnóstico se puede efectuar tomando una muestra de un sujeto, tal como un ser humano. Se extrae ácido nucleico, tal como DNA, cDNA o RNA, de la muestra. La expresión de BiP se puede detectar usando PCR, tal como PCR en tiempo real cualitativa (qRT-PCR). Se pueden diseñar cebadores de PCR para detectar BiP. Los ejemplos de dichos cebadores se exponen en el documento WO 00/21995.

Los ensayos diagnósticos para BiP pueden también incluir métodos que utilizan anticuerpos, preferiblemente, condensados a una etiqueta, para detectar el polipéptido en una muestra que contiene, por ejemplo, fluidos corporales, células, tales como células de o derivadas de hueso (p. ej., osteoclastos), tejidos, cortes o extractos de dichos tejidos. Los polipéptidos y anticuerpos se pueden utilizar con o sin modificación. Frecuentemente, los polipéptidos y anticuerpos se etiquetarán uniéndolos, o bien en forma covalente o no covalente, con una molécula indicadora. Los expertos en la técnica conocen una diversidad de moléculas indicadoras. Los anticuerpos específicos de BiP también son útiles para el diagnóstico de las enfermedades descritas en esta memoria. Se conoce en la técnica una diversidad de protocolos para ensayos de unión competitiva o ensayos inmunoradiométricos que usan anticuerpos policlonales o monoclonales con especificidades establecidas. Dichos inmunoensayos por lo general implican la formación de complejos entre BiP y su anticuerpo específico (o molécula de unión al receptor similar) y la medición de la formación del complejo. El inmunoensayo puede ser un inmunoensayo monoclonal basado en dos sitios que emplea anticuerpos monoclonales reactivos a dos epítomos que no interfieren en BiP. También se puede emplear un ensayo de unión competitiva. Los ejemplos de dichos ensayos se describen en Maddox DE *et al* (1983, J Exp Med 158:121 1).

Los ensayos diagnósticos pueden incluso adaptarse para evaluar la eficacia de un régimen de tratamiento terapéutico particular y pueden usarse en estudios animales, en ensayos clínicos o en el monitoreo del tratamiento de un paciente individual. Con el fin de proveer una base para el diagnóstico de una enfermedad, se debe establecer un perfil normal, estándar o control para la expresión de BiP, como se mencionó anteriormente. La desviación entre los valores estándar y los del sujeto establece la presencia del estado de enfermedad. Si se establece uno o más estados de enfermedad, se puede administrar un agente terapéutico existente, y se pueden generar el perfil o los valores del tratamiento. Finalmente, el ensayo puede repetirse regularmente para evaluar si los valores progresan o retornan al patrón normal o estándar. Los perfiles de tratamiento sucesivos se pueden utilizar para demostrar la eficacia del tratamiento en un periodo de varios días o varios meses.

Por consiguiente, en otro aspecto, se da a conocer un método (preferiblemente un método *in vitro*) para determinar la eficacia de por lo menos un fármaco o régimen médico para prevenir o tratar la destrucción ósea o la pérdida ósea, donde dicho método comprende: (a) medir la actividad de BiP en presencia de dicho fármaco o régimen médico; y (b) por lo menos determinar si dicho fármaco o régimen médico es eficaz para prevenir o tratar la destrucción ósea o la pérdida ósea en comparación con un control.

Preferiblemente, el nivel o patrón de expresión y/o actividad de BiP en sujetos potencialmente afectados por una enfermedad causada por o asociada con destrucción ósea o pérdida ósea se reduce en comparación con los valores estándar obtenidos del control.

El método diagnóstico puede incluso comprender la etapa opcional de detectar la maduración de osteoclastos o resorción ósea.



## Muestra

Tal como se emplea en este documento, el término “muestra” tiene su significado natural.

Una muestra puede ser cualquier entidad física ensayada para el nivel y/o patrón de expresión y/o actividad de BiP de acuerdo con los métodos de la presente invención. Una muestra puede ser cualquier entidad física en la que se mide el desarrollo de osteoclastos o la resorción ósea.

La muestra puede ser o puede derivar de material biológico tal como tejidos, células (p. ej., osteoclastos) o fluidos. Los tejidos, células o fluidos pueden ser o derivar de hueso.

La muestra puede ser o puede derivar de una biopsia o de una autopsia.

## Método de ensayo

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un ensayo para identificar un agente que modula la destrucción ósea o la pérdida ósea.

Adecuadamente, el método de ensayo se puede utilizar para identificar uno o más agentes que son un antagonista de BiP que disminuye o reduce el nivel o patrón de expresión y/o actividad de BiP.

Preferiblemente, el método de ensayo de la presente invención se usa para identificar uno o más agentes que son agonistas de BiP que potencian, mejoran o aumentan el nivel y/o patrón de expresión y/o actividad de BiP. Potenciando, mejorando o aumentando la expresión y/o actividad de BiP, el agonista puede modular trastornos asociados con pérdida ósea o digestión ósea, como pérdida ósea o resorción ósea asociada con o causada por osteoporosis. Al potenciar, mejorar o aumentar la expresión y/o actividad de BiP, el agonista inhibe, disminuye o reduce ventajosamente la maduración de osteoclastos.

Se pueden emplear proteínas de fusión para ensayos de detección de alto rendimiento a fin de identificar agentes que modulan la actividad y/o expresión de BiP (véanse D. Bennett *et al.*, *J Mol Recognition*, 8: 52-58 (1995); y K. Johanson *et al.*, *J Biol Chem*, 270(16): 9459- 9471 (1995)). Otra técnica para detección ofrece la detección de alto rendimiento (HTS) de agentes que tienen afinidad de unión adecuada y se basa en el método descrito en detalle en el documento WO 84/03564. Para una referencia general sobre detección, véase Handbook of Drug Screening, editado por Ramakrishna Seethala, Prabhavathi B. Fernandes. New York, NY, Marcel Deldcer, 2001 (ISBN 0-8247-0562-9).

Se espera que los métodos de ensayo de la presente invención sean adecuados para detección de agentes a pequeña y gran escala, como también para ensayos cuantitativos.

El método de detección puede medir la unión de un agente a BiP mediante una etiqueta directa o indirectamente asociada con el agente. Alternativamente, el método de selección puede implicar la competencia con un competidor etiquetado.

Se puede detectar una pluralidad de agentes.

Si los compuestos candidatos son proteínas, p. ej., anticuerpos o péptidos, se pueden detectar bibliotecas de compuestos candidatos usando técnicas de exhibición de fagos. La exhibición de fagos es un protocolo de detección molecular que utiliza bacteriófago recombinante. La tecnología implica transformar el bacteriófago con uno que codifica la biblioteca de compuestos candidatos, de modo tal que cada fago o fagémido expresa un compuesto candidato particular. El bacteriófago transformado (que preferiblemente se sujeta a un soporte sólido) expresa el compuesto candidato apropiado y lo exhibe en su recubrimiento de fago. Los compuestos candidatos específicos que son capaces de interactuar con la BiP se enriquecen por estrategias de selección basadas en la interacción de afinidad. Los agentes candidatos exitosos luego se caracterizan. La exhibición de fagos tiene ventajas sobre las tecnologías de detección de ligandos de afinidad estándar. La superficie del fago exhibe el agente candidato en una configuración tridimensional, que se asemeja en mayor medida a su conformación natural. Esto permite unión más específica y de mayor afinidad para propósitos de detección.

Otro método para detectar una biblioteca de compuestos utiliza células hospedantes eucariotas o procariotas, que se transforman establemente con moléculas de DNA recombinantes que expresan la biblioteca de compuestos. Dichas células, o bien en forma viable o fija, se pueden usar para ensayos de ligandos estándar. Véanse también Parce *et al.* (1989) *Science* 246:243-247; y Owicki *et al.* (1990) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87:4007-4011, que describen métodos sensibles para detectar respuestas celulares. Los ensayos competitivos son particularmente útiles, en donde las células que expresan la biblioteca de compuestos se incuban con un anticuerpo etiquetado, tal como un anticuerpo <sup>125</sup>I, y una muestra de ensayo tal como un compuesto candidato cuya afinidad de unión hacia la composición de unión se está midiendo. Los ligandos etiquetados unidos y libres luego se separan para evaluar el grado de unión. La cantidad de muestra de ensayo unida es inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpo etiquetado unido.

Se puede usar cualquiera de numerosas técnicas para separar ligandos unidos de libres a fin de evaluar el grado de unión. Esta etapa de separación podría típicamente implicar un procedimiento tal como la adhesión a filtros seguida de lavado, adhesión a plástico seguida de lavado o centrifugación de las membranas celulares.

5 Otra técnica para detectar compuestos candidatos implica un planteamiento que proporciona detección de alto rendimiento para compuestos nuevos que tienen afinidad de unión adecuada, y se describe en detalle en el documento WO 84/03564. En primer lugar, se sintetizan grandes cantidades de diferentes agentes peptídicos pequeños en un sustrato sólido, p. ej., pins plásticos o alguna otra superficie adecuada. Luego todos los pins se someten a reacción con proteína solubilizada y se lavan. La siguiente etapa implica detectar la proteína unida. La detección puede lograrse usando un anticuerpo monoclonal. Por ende, pueden identificarse los compuestos que interactúan específicamente con la proteína.

10 El diseño racional de compuestos candidatos que probablemente son capaces de interactuar con BiP se puede basar en estudios estructurales de las formas moleculares de la proteína y/o sus ligandos *in vivo*. Un medio para determinar qué sitios interactúan con otras proteínas específicas es la determinación de una estructura física, p. ej., cristalografía de rayos X o técnicas de RMN bidimensionales. Éstas brindan lineamientos en cuanto a qué residuos de aminoácidos forman las regiones de contacto molecular. Para una descripción detallada de la determinación estructural de proteínas, véase, p. ej., Blundell and Johnson (1976) *Protein Crystallography*, Academic Press, New York.

15 Una vez que el agente que modula la actividad y/o expresión de BiP ha sido identificado, se puede medir la maduración de osteoclastos o la resorción ósea en presencia de dicho agente usando, por ejemplo, los métodos descritos en esta memoria. Una diferencia entre a) maduración de osteoclastos o resorción ósea en ausencia del agente y b) maduración de osteoclasto o resorción ósea en presencia del agente es indicativa de que el agente puede modular la destrucción ósea.

Preferiblemente, la diferencia es una reducción o una inhibición de la maduración de osteoclastos en presencia del agente.

25 Preferiblemente, la diferencia es una reducción o una inhibición de la resorción ósea en presencia del agente.

A modo de ejemplo solamente, la maduración de osteoclastos o la resorción ósea se pueden evaluar usando estudios del pulso, en donde se añade BiP durante, por ejemplo, las etapas tempranas de diferenciación de precursores, o después de la formación de células multinucleadas. En el momento adecuado, los cultivos se fijan y tiñen histoquímicamente para, p. ej., actividad de TRAP, o se tiñen para anillos de actina F y VnR por inmunolocalización usando un anticuerpo, tal como el anticuerpo 23C6 (p. ej., número de catálogo 14-0519 de eBioscience Inc.), y TRITC-faloidina, respectivamente, y el número de osteoclastos se cuantifica. La resorción se puede cuantificar después de la eliminación de osteoclastos de porciones de dentina y tiñendo con azul de toluidina. Se puede obtener confirmación adicional de diferenciación de osteoclastos por técnicas moleculares, por ejemplo PCR en tiempo real, para medir la expresión de genes de marcadores específicos de osteoclastos tales como el receptor de calcitonina y catepsina K.

#### Modulación

En el contexto de BiP y la modulación de resorción ósea y maduración de osteoclastos, el término "modular" preferiblemente se refiere a prevenir, suprimir, aliviar, reducir, inhibir o prevenir la resorción ósea y la maduración de los osteoclastos usando BiP.

40 Por consiguiente, la presente invención se refiere, entre otros, a métodos de ensayo, procedimientos y agentes que modulan o efectúan la modulación del nivel y/o patrón de expresión y/o actividad de BiP. A modo de ejemplo, si el nivel y/o patrón de expresión y/o actividad de BiP se previene, suprime, alivia, reduce, inhibe o evita, entonces la maduración de los osteoclastos y la resorción ósea se restauran, elevan o aumentan. Preferiblemente, el nivel y/o patrón de expresión y/o actividad de BiP se restaura, eleva o aumenta y entonces la maduración de los osteoclastos y la resorción ósea se previenen, suprimen, alivian, reducen, inhiben o evitan.

#### Agente

El agente puede ser un compuesto orgánico u otra sustancia química. El agente puede ser un compuesto obtenible o producido por cualquier fuente, o bien natural o artificial. El agente puede ser una molécula de aminoácidos, un polipéptido o su derivado químico, o una combinación de éstos. El agente puede incluso ser una molécula de polinucleótidos que puede ser una molécula sentido antisentido, o un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo monoclonal humanizado.

55 Se han desarrollado diversas estrategias para producir anticuerpos monoclonales con carácter humano, que desvían la necesidad de producir una línea celular humana que produzca anticuerpos. Por ejemplo, se han "humanizado" anticuerpos monoclonales útiles enlazando regiones variables de roedores y regiones constantes humanas (Winter, G. y Milstein, C. (1991) *Nature* 349, 293-299). Esto reduce la inmunogenicidad antirratón humana del anticuerpo, pero se retiene la inmunogenicidad residual en virtud del marco de la región V exógena. Además, la especificidad de

unión al antígeno es esencialmente aquella del donante murino. La manipulación del injerto CDR y del marco (EP 0239400) ha mejorado y refinado la manipulación de anticuerpos hasta el punto en que es posible producir anticuerpos murinos humanizados aceptables para uso terapéutico en seres humanos. Los anticuerpos humanizados pueden obtenerse usando otros métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, como se describe en el documento US-A-239400).

Los agentes pueden unirse a una entidad (p. ej., una molécula orgánica) con un enlazador que puede ser un enlazador bifuncional hidrolizable.

La entidad se puede diseñar u obtener de una biblioteca de compuestos, que puede comprender péptidos, además de otros compuestos, tales como moléculas orgánicas pequeñas.

A modo de ejemplo, la entidad puede ser una sustancia natural, una macromolécula biológica o un extracto hecho a partir de materiales biológicos tales como células o tejidos de bacterias, hongos o animales (particularmente mamíferos), una molécula orgánica o inorgánica, un agente sintético, un agente semisintético, un mimético estructural o funcional, un péptido, un péptido-mimético, un péptido escindido de una proteína entera o un péptido sintetizado sintéticamente (tal como, a modo de ejemplo, o bien usando un sintetizador de péptidos o por técnicas recombinantes o sus combinaciones, un agente recombinante, un anticuerpo, un agente natural o no natural, una proteína de fusión o su equivalente y mutantes, derivados o sus combinaciones).

Típicamente, la entidad será un compuesto orgánico. Para algunos casos, los compuestos orgánicos comprenderán dos o más grupos hidrocarbilo. Aquí, la expresión "grupo hidrocarbilo" significa un grupo que comprende por lo menos C y H, y puede comprender opcionalmente uno o más de otros sustituyentes adecuados. Los ejemplos de dichos sustituyentes pueden incluir halo-, alcoxi-, nitro-, un grupo alquilo, un grupo cíclico, etc. Además de la posibilidad de los sustituyentes de ser un grupo cíclico, una combinación de sustituyentes puede formar un grupo cíclico. Si el grupo hidrocarbilo comprende más de un C, entonces los carbonos no deben necesariamente estar enlazados entre sí. Por ejemplo, por lo menos dos de los carbonos pueden estar unidos mediante un elemento o grupo adecuado. Por lo tanto, el grupo hidrocarbilo puede contener heteroátomos. Los heteroátomos adecuados serán obvios para aquellos con experiencia en la técnica e incluyen, por ejemplo, azufre, nitrógeno y oxígeno. Para algunas aplicaciones, preferiblemente la entidad comprende por lo menos un grupo cíclico. El grupo cíclico puede ser un grupo policíclico, tal como un grupo policíclico no condensado. Para algunas aplicaciones, la entidad comprende por lo menos uno de los grupos cíclicos mencionados enlazado a otro grupo hidrocarbilo.

La entidad puede contener grupos halo tales como grupos fluoro, cloro, bromo o yodo.

La entidad puede contener uno o más grupos alquilo, alcoxi, alqueno, alqueno y alqueno, que pueden ser de cadena no ramificada o ramificada.

Como se describió anteriormente, el agente puede ser un anticuerpo.

Se pueden utilizar procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos a BiP. Dichos anticuerpos incluyen, aunque sin limitarse a ello, fragmentos policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla, Fab, y fragmentos producidos por bibliotecas de expresión de Fab. Los anticuerpos neutralizadores, es decir, aquellos que pueden modular BiP de la actividad biológica, se prefieren especialmente para fines diagnósticos y terapéuticos.

Para la producción de anticuerpos, se pueden inmunizar diversos hospedantes que incluyen cabras, conejos, ratas, ratones, etc. por inyección con uno o más de los polipéptidos que se describen en esta memoria o cualquiera de sus porciones, variantes, homólogos, fragmentos o derivados, o con oligopéptido que retiene las propiedades inmunogénicas. Dependiendo de la especie hospedante, se pueden usar diversos adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica. Dichos adyuvantes incluyen, aunque sin limitarse a ello, Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, y sustancias activas superficiales tales como lisolecitina, polioles pluxónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol. BCG (*Bacilli Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum* son adyuvantes humanos potencialmente útiles que se pueden emplear.

Preferiblemente, el anticuerpo es anticuerpo monoclonal.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando cualquier técnica que ofrezca la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Esto, incluye, a título enunciativo, la técnica de hibridoma originalmente descrita por Kohler y Milstein (1975 Nature 256:495-497), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor *et al* (1983) Immunol Today 4:72; Cote *et al* (1983) Proc Natl Acad Sci 80:2026-2030) y la técnica de EBV-hibridoma (Cole *et al* (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss Inc, pág 77-96). A su vez, se pueden usar las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", el empalme de genes de anticuerpo de ratón a genes de anticuerpo humano para obtener una molécula con especificidad al antígeno y actividad biológica adecuada (Morrison *et al* (1984) Proc Natl Acad Sci 81:6851-6855; Neuberger *et al* (1984) Nature 312:604-608; Talceda *et al* (1985) Nature 314:452-454). Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (documento US-A-4946779) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla específicos de un inhibidor.

Los anticuerpos también se pueden producir induciendo la producción *in vivo* en la población de linfocitos o detectando bibliotecas de inmunoglobulina recombinantes o paneles de reactivos de unión altamente específicos, como se describe en Orlandi *et al* (1989, Proc Natl Acad Sci 86: 3833-3837), y Winter G y Milstein C (1991; Nature 349:293-299).

5 También se pueden generar fragmentos de anticuerpos que contienen sitios de unión específica para BiP. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, aunque sin limitarse a ello, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> que pueden producirse por digestión de pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Alternativamente, se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse WD  
10 *et al* (1989) Science 256:1275-128 1).

Una técnica alternativa implica detectar bibliotecas de exhibición de fagos, en donde por ejemplo, el fago expresa fragmentos scFv sobre la superficie de su recubrimiento con una gran variedad de regiones determinantes de complementaridad (CDR). Esta técnica se conoce en el campo.

Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

15 Los anticuerpos humanizados se han obtenido reemplazando la región constante de un anticuerpo de ratón con una proteína humana, pero también reemplazando porciones de la región variable del anticuerpo con proteína humana. En general, los anticuerpos humanizados son 5-10% de ratón y 90-95% humanos. Los anticuerpos humanizados se desarrollaron para combatir las respuestas inmunitarias observadas con anticuerpos murinos y quiméricos. Los datos de anticuerpos humanizados utilizados en ensayos clínicos demuestran que los anticuerpos humanizados exhiben respuesta mínima o no exhiben ninguna respuesta del sistema inmunitario humano contra ellos.  
20

Un planteamiento más sofisticado para los anticuerpos humanizados implica no solamente proveer regiones constantes derivadas de seres humanos, sino además modificar también las regiones variables. Esto permite que los anticuerpos sean reconfigurados de la manera más parecida posible a la forma humana. Las regiones variables de ambas cadenas pesada y ligera contienen tres regiones determinantes de complementaridad (CDR) que varían en respuesta a los antígenos en cuestión y determinan la capacidad de unión, flanqueada por cuatro regiones marco (FR) que están relativamente conservadas en una especie determinada y que proporcionan de manera putativa un andamio para las CDR. Cuando se preparan anticuerpos no humanos con respecto a un antígeno particular, las regiones variables pueden "reconfigurarse" o "humanizarse" injertando las CDR derivadas de anticuerpo no humano en las FR presentes en el anticuerpo humano que se ha de modificar. Este planteamiento se ha descrito, por ejemplo, en Cancer Res (1993) 53:851-856, Nature (1988) 332:323-327, Science (1988) 239:1534-1536, Proc Natl Acad Sci USA (1991) 88:4181-4185 y en J Immunol (1992) 148:1149-1154.  
25  
30

De acuerdo con la presente invención, el agente puede unirse a la secuencia de nucleótidos que codifica BiP, o controlar regiones asociadas con la secuencia que codifica nucleótidos, o su correspondiente transcrito de RNA para modular (p. ej., aumentar) el índice de transcripción o traducción de BiP. Por ejemplo, la expresión de BiP puede modularse modulando la transcripción de mRNA de BiP, o modulando el procesamiento de mRNA, etc. La traducción de mRNA de BiP puede también regularse como medio de modular la expresión de la proteína. Dicha modulación puede hacer uso de métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de agentes que afectan la transcripción o traducción.  
35

Dichos agentes pueden incluso modular la actividad de otra entidad.

40 Se prefiere especialmente que el agente aumente, potencie o incremente la expresión y/o actividad de BiP. En este sentido, el agente puede ser una secuencia reguladora, tal como un promotor o un potenciador, que aumente, potencie o incremente la expresión de BiP, insertado por ejemplo, mediante recombinación homóloga. Preferiblemente, después de la inserción de la secuencia reguladora, BiP y la secuencia reguladora están operativamente unidas. Una secuencia reguladora "operativamente unida" a una secuencia codificante de BiP se liga de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.  
45

#### Profármaco

Los expertos en la técnica apreciarán que la entidad puede derivar de un profármaco. Los ejemplos de profármacos incluyen cierto grupo(s) protector que puede no poseer actividad farmacológica como tal, pero que puede, en ciertos casos, administrarse (tal como por vía oral o parenteral) y de allí en más metabolizarse en el cuerpo para formar una entidad que sea farmacológicamente activa.  
50

Los profármacos adecuados pueden incluir, aunque sin limitarse a ello, Doxorubicina, Mitomicina, Mostaza de Fenol, Metotraxato, Antifolatos, Cloranfenicol, Camptotecina, 5-Fluorouracil, Cianuro, Quinina, Dipiridamol y Paclitaxel. Los agentes (p. ej., un anticuerpo o su fragmento) pueden enlazarse químicamente a una enzima de interés. Alternativamente, el conjugado puede ser una proteína de fusión producida por técnicas de DNA recombinante con los genes de región variable del anticuerpo y el gen que codifica la enzima.  
55

Preferiblemente, el profármaco debe ser no tóxico, resistente a la acción de enzimas endógenas, y ser convertido en fármaco activo solamente por la enzima diana. La activación selectiva de profármacos anticáncer por conjugados mAb-enzima se revisa en Senetr & Springer (2001) *Advanced Drug Delivery Reviews* 53, 247-264.

- 5 Se ha de apreciar además que ciertos restos conocidos como "pro-restos", por ejemplo como se describe en "Design of Prodrugs" por H. Bundgaard, Elsevier, 1985, pueden disponerse en funcionalidades apropiadas de los agentes. Dichos profármacos también se incluyen dentro del alcance de la invención.

El agente puede estar en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable, tal como una sal de adición de ácido o una sal de base, o su solvato, incluido su hidrato. Para una revisión sobre sales adecuadas véase Berge *et al*, *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66, 1-19.

- 10 El agente de la presente invención puede ser capaz de exhibir otras propiedades terapéuticas.

El agente se puede usar en combinación con uno o más de otros agentes farmacéuticamente activos.

Si se administran combinaciones de agentes activos, entonces las combinaciones de agentes activos se pueden administrar simultánea, separada o secuencialmente.

Estéreoisómeros e isómeros geométricos

- 15 La entidad puede existir como estereoisómeros y/o isómeros geométricos, p. ej., la entidad puede poseer uno o más centros asimétricos y/o geométricos y entonces puede existir en dos o más formas estereoisoméricas y/o geométricas. La presente invención contempla el uso de todos los estereoisómeros individuales e isómeros geométricos de esas entidades, y sus mezclas.

Sal farmacéutica

- 20 Los agentes de la presente invención pueden administrarse en la forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

El experto en la técnica conoce las sales farmacéuticamente aceptables y, por ejemplo, incluyen aquellas mencionadas por Berge *et al*, en *J.Pharm.Sci.*, 66, 1-19 (1977). Las sales de adición de ácido adecuadas se forman a partir de ácidos que forman sales no tóxicas e incluyen las sales de hidrocloreto, hidrobromuro, hidroyoduro, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, hidrógeno-fosfato, acetato, trifluoroacetato, gluconato, lactato, salicilato, citrato, tartrato, ascorbato, succinato, maleato, fumarato, gluconato, formiato, benzoato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato y p-toluenosulfonato.

- 25 Cuando están presentes uno o más restos ácidos, las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables adecuadas se pueden formar a partir de bases que forman sales no tóxicas e incluyen las sales de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, zinc y aminas farmacéuticamente activas tales como sales de dietanolamina.

- 30 Una sal farmacéuticamente aceptable de un agente puede prepararse fácilmente mezclando disoluciones del agente entre sí y el ácido o la base deseada, según sea apropiado. La sal puede precipitar de la disolución y recogerse por filtración, o puede recuperarse por evaporación del disolvente.

El agente puede existir en forma polimórfica.

- 35 El agente de la presente invención puede contener uno o más átomos de carbono asimétricos y por lo tanto existe en dos o más formas estereoisoméricas. Si un agente contiene un grupo alqueno o alqueno, puede también ocurrir isomería *cis* (E) y *trans* (Z). La presente invención incluye los estereoisómeros individuales del agente y, si es apropiado, sus formas tautoméricas individuales, junto con sus mezclas.

- 40 La separación de diastereoisómeros o isómeros *cis* y *trans* se puede lograr por técnicas convencionales, p. ej., cristalización fraccionada, cromatografía o H.P.L.C. de una mezcla estereoisomérica del agente o su sal o derivado adecuado. También se puede preparar un enantiómero individual del agente a partir de un correspondiente intermedio ópticamente puro, o por resolución, tal como por H.P.L.C. del correspondiente racemato, usando un soporte quiral adecuado o por cristalización fraccionada de las sales diastereoisoméricas formadas por reacción del correspondiente racemato con un ácido o base ópticamente activo adecuado, según corresponda.

- 45 El agente puede también incluir todas las variaciones isotópicas adecuadas del agente o su sal farmacéuticamente aceptable. Una variación isotópica de un agente o su sal farmacéuticamente aceptable se define como una en la que por lo menos un átomo se reemplaza por un átomo que tiene el mismo número atómico pero una masa atómica distinta de la masa atómica usualmente encontrada en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en el agente y sus sales farmacéuticamente aceptables incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro, tales como  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$  y  $^{36}\text{Cl}$ , respectivamente. Ciertas variaciones isotópicas del agente y sus sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, aquellas en las que se incorpora un isótopo radiactivo tal como  $^3\text{H}$  o  $^{14}\text{C}$ , son útiles en estudios de distribución de tejido de sustrato y/o fármacos. Los isótopos tritados, es decir,  $^3\text{H}$ , y carbono-14, es decir, isótopos  $^{14}\text{C}$ , se prefieren particularmente por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos tales como

- deuterio, es decir,  $^2\text{H}$ , puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, mayor semivida *in vivo* o menores requerimientos de dosis y, en consecuencia, pueden preferirse en algunas circunstancias. Las variaciones isotópicas del agente y sus sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden en general prepararse por procedimientos convencionales usando variaciones isotópicas apropiadas de reactivos adecuados.
- 5 Sal farmacéuticamente activa
- El agente puede administrarse como una sal farmacéuticamente activa. En general, una sal farmacéuticamente activa puede prepararse fácilmente usando un ácido o una base deseada, según corresponda. La sal puede precipitar de la disolución y recogerse por filtración, o puede recuperarse por evaporación del disolvente.
- 10 Métodos de síntesis química
- El agente puede prepararse por técnicas de síntesis química.
- Será obvio para aquellos con experiencia en la técnica que los grupos funcionales sensibles pueden necesitar ser protegidos y desprotegidos durante la síntesis de un compuesto de la invención. Esto se puede lograr por técnicas convencionales, por ejemplo, como se describe en "Protective Groups in Organic Synthesis" por T W Greene y P G M Wuts, John Wiley and Sons Inc. (1991), y por P.J.Kocienski, en "Protecting Groups", Georg Thieme Verlag (1994).
- 15 Es posible durante algunas de las reacciones que cualquiera de los estereocentros presentes puedan, bajo ciertas condiciones, racemizarse, por ejemplo, si se usa una base en una reacción con un sustrato que tiene un centro óptico que comprende un grupo sensible a una base. Esto es posible durante, p. ej., una etapa de guanilación. Sería posible evitar problemas potenciales tales como este por elección de una secuencia de reacción, condiciones, reactivos, esquemas de protección/desprotección, etc. como se conoce en la técnica.
- 20 Los compuestos y sales pueden separarse y purificarse por métodos convencionales.
- La separación de diastereómeros se puede lograr por técnicas convencionales, p. ej., cristalización fraccionada, cromatografía o H.P.L.C. de una mezcla estereoisomérica de un compuesto de fórmula (I) o su sal o derivado adecuado. Un enantiómero individual de un compuesto de fórmula (I) puede también prepararse a partir de un correspondiente intermedio ópticamente puro o por resolución, tal como por H.P.L.C. del correspondiente racemato usando un soporte quiral adecuado, o por cristalización fraccionada de las sales diastereoméricas formadas por reacción del correspondiente racemato con un ácido o base ópticamente activo adecuado.
- 25 El agente o sus variantes, homólogos, derivados, fragmentos o miméticos puede producirse usando métodos químicos para sintetizar el agente en todo o en parte. Por ejemplo, si el agente comprende un péptido, entonces el péptido puede sintetizarse por técnicas de fase sólida, escindirse de la resina y purificarse por cromatografía de líquidos de alta resolución preparativa (p. ej., Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, New York NY). La composición de los péptidos sintéticos puede confirmarse por análisis o secuenciación de aminoácidos (p. ej., el procedimiento de degradación de Edman; Creighton, *supra*).
- 30 La síntesis de los agentes inhibidores de péptidos (o sus variantes, homólogos, derivados, fragmentos o miméticos) se puede efectuar usando diversas técnicas de fase sólida (Roberge JY *et al* (1995) Science 269: 202-204) y la síntesis automatizada se puede lograr, por ejemplo, usando el Sintetizador de Péptidos ABI 431 A (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones provistas por el fabricante. Adicionalmente, las secuencias de aminoácidos que comprenden el agente pueden alterarse durante la síntesis directa y/o combinarse usando métodos químicos con una secuencia de otras subunidades, o cualquiera de sus partes, para producir un agente variante.
- 35 Derivado químico
- El término "derivado" o "derivatizado" tal como se emplea en esta memoria incluye la modificación química de un agente. Ejemplos de dichas modificaciones químicas serían el reemplazo de hidrógeno por un grupo halo, un grupo alquilo, un grupo acilo o un grupo amino.
- Modificación química
- 45 El agente puede ser un agente modificado tal como, aunque sin limitarse a ello, un agente químicamente modificado.
- La modificación química de un agente puede o bien potenciar o reducir la interacción de enlace de hidrógeno, la interacción de la carga, la interacción hidrófoba, la interacción de Van Der Waals o la interacción dipolo.
- En un aspecto, el agente puede actuar como un modelo (por ejemplo, un molde) para el desarrollo de otros compuestos.
- 50 Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de BiP.

- 5 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente y BiP.

10 Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso humano o animal en medicina humana o veterinaria y típicamente comprenden cualquiera de uno o más diluyentes, vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables para uso terapéutico se conocen en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). La opción del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la ruta intencionada de administración y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como el vehículo, excipiente o diluyente o en adición a éste, cualquier aglutinante(s), lubricante(s), agent(es) de suspensión, agent(es) de recubrimiento, agent(es) solubilizantes adecuado.

- 15 Se pueden proveer conservantes, estabilizantes, tintes e incluso saporíferos en la composición farmacéutica. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido ascórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión.

20 Puede haber diferentes requerimientos de composición/formulación dependientes de los distintos sistemas de administración. A modo de ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención se puede formular para administrarse usando una mini-bomba o por ruta mucosa, por ejemplo, como un spray o aerosol nasal para inhalación o como disolución para ingerir, o por vía parenteral en la que la composición se formula en forma inyectable, para administración, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Alternativamente, la formulación puede diseñarse para administrarse por una serie de rutas.

- 25 Si el agente se ha de administrar por vía mucosa a través de la mucosa gastrointestinal, deberá ser capaz de permanecer estable durante el tránsito a través del tubo digestivo; por ejemplo, deberá ser resistente a degradación proteolítica, estable a pH ácido y resistente a los efectos del detergente de la bilis.

30 Si corresponde, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por inhalación, en la forma de supositorio u óvulo, tópicamente en la forma de una loción, disolución, crema, ungüento o polvo, por uso de un parche dérmico, oralmente en la forma de comprimidos que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos o bien solos o en mezcla con excipientes, o en la forma de elixires, disoluciones o suspensiones que contienen saporíferos o colorantes, o las composiciones farmacéuticas pueden inyectarse parenteralmente, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para administración parenteral, las composiciones se pueden utilizar en forma óptima en la forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o monosacáridos para tornar la disolución isotónica con la sangre. Para administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en la forma de comprimidos o grageas que se pueden formular en un modo convencional.

40 Los agentes se pueden usar en combinación con una ciclodextrina. Se sabe que las ciclodextrinas forman complejos de inclusión y no inclusión con moléculas del fármaco. La formación de un complejo fármaco-ciclodextrina puede modificar la solubilidad, el índice de disolución, la biodisponibilidad y/o la propiedad de estabilidad de una molécula del fármaco. Los complejos fármaco-ciclodextrina son en general útiles para la mayoría de las formas de administración y rutas de administración. Como una alternativa a la complejización directa con el fármaco, la ciclodextrina se puede utilizar como un aditivo auxiliar, p. ej., como un vehículo, diluyente o solubilizante. Las ciclodextrinas alfa, beta y gamma se utilizan más comúnmente y los ejemplos adecuados se describen en los documentos WO-A-91/11172, WO-A-94/02518 y WO-A-98/55148.

- 45 Si el agente es una proteína, entonces dicha proteína se puede preparar *in situ* en el sujeto que se esté tratando. En este respecto, las secuencias de nucleótidos que codifican dicha proteína pueden administrarse mediante el uso de técnicas no víricas (p. ej., mediante el uso de liposomas) y/o técnicas víricas (p. ej., mediante el uso de vectores retrovíricos) de modo tal que dicha proteína se exprese a partir de dicha secuencia de nucleótidos, como se describe a continuación.

50 Administración

Tal como se emplea en este documento, el término "administración" incluye la administración por técnicas víricas y no víricas.

55 Los mecanismos de administración no víricos incluyen, aunque sin limitarse a ello, transfección, transfección mediada por lípidos, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, anfillos faciales catiónicos (CFA) y sus combinaciones.

La inyección física de ácido nucleico en las células representa el sistema de administración de genes más simple (Vile & Hart (1994) *Ann. Oncol.*, supl. 5, 59). Por consiguiente, los vectores que comprenden secuencias de nucleótidos se pueden administrar directamente como “un constructo de ácido nucleico desnudo” y pueden además comprender secuencias flanqueadoras homólogas al genoma de la célula hospedante. Después de la inyección, el ácido nucleico se absorbe en las células y se transloca al núcleo, en donde puede expresarse transitoriamente desde una ubicación episomal o establemente si ha sucedido la integración en el genoma del hospedante. El gen que codifica BiP puede disponerse bajo el control de promotores. Las intervenciones físicas pueden aumentar la eficiencia de la transfección, por ejemplo, el ultrasonido focalizado. La eficiencia de la transfección de células *in vivo* puede aumentarse inyectando partículas de oro recubiertas con DNA con una pistola génica (Fyan et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11478).

Los liposomas son vesículas compuestas por membranas bicapa de fosfolípidos que pueden abarcar diversas sustancias, incluido ácido nucleico. Las mezclas de lípidos y ácido nucleico forman complejos (lipoplejos) que pueden transfectar células *in vitro* e *in vivo*. La administración génica mediada por lípidos tiene la capacidad de transfectar varias células distintas sin la necesidad de interacción con receptores específicos, inmunogenicidad mínima de los componentes de lípidos para facilitar la administración múltiple, vectores de alta capacidad con la capacidad de administrar grandes secuencias de DNA y facilidad de producción. La inserción de derivados de polietilenglicol en la membrana de lípidos o la pegilación pueden aumentar la semivida de circulación de los liposomas después de la administración. La farmacocinética, biodistribución y fusogenicidad de los liposomas puede variarse alterando la composición de la membrana de lípido. En particular, la incorporación de ciertos lípidos catiónicos, por ejemplo, DMRIE, DOSPA y DOTAP con colípidos neutros o cooperadores, tales como colesterol o DOPE, en liposomas puede aumentar su capacidad de condensarse con membranas celulares y suministrar sus contenidos a las células.

Una serie de polímeros policatiónicos no lipídicos forman complejos con ácido nucleico, lo que promueve la administración a las células (Li y Huang (2000) *Gene Ther.* 7, 31). Preferiblemente, los polímeros policatiónicos no lipídicos incluyen, aunque sin limitarse a ello, poli-L-lisina, polietilenimina, poliglucosaminas y péptidos. La polietilenimina puede proteger ácidos nucleicos que forman complejos de degradación dentro de endosomas y también proporciona un medio para promover la liberación de ácido nucleico del compartimiento endosomal y su translocación subsiguiente al núcleo (Boussif et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7297). Los polímeros de polietilenimina pegilada pueden reducir la interacción con las proteínas del suero, extender la semivida de la circulación y administrar genes a las células sin toxicidad significativa.

Se puede utilizar el trasplante de células, por ejemplo, células autólogas, alogeneicas y xenogeneicas, que son genéticamente modificadas para liberar moléculas bioterapéuticas. Las células trasplantadas pueden estar rodeadas por una membrana permeoselectiva que las contiene y protege totalmente del ataque del sistema inmunitario hospedante. Este método de encapsulación permite el trasplante neural de células primarias o líneas celulares de ambas fuentes, alogeneica y xenogeneica. Se conocen en la técnica diversos tipos de técnicas de encapsulación. El método de microencapsulación permite atrapar pequeños grupos de células dentro de una membrana delgada, esférica, semipermeable, típicamente hecha de polielectrolitos.

Los mecanismos de administración vírica son vehículos atractivos para la administración de genes, ya que han desarrollado medios específicos y eficientes para ingresar en las células humanas y expresar sus genes. Preferiblemente, el genoma vírico se modifica para eliminar secuencias requeridas para la replicación vírica y la patogenicidad. Más preferiblemente, las secuencias codificantes víricas se reemplazan con genes exógenos, tales como BiP.

Los mecanismos de administración vírica incluyen, aunque sin limitarse a ello, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, herpes virus simplex, poxvirus, vectores lentivíricos, baculovirus, reovirus, virus de enfermedad de Newcastle, alfavirus y vectores víricos de estomatitis vesicular.

Los retrovirus son virus de RNA monocatenario, diploide, que ingresan en las células uniéndose a las proteínas de envoltura superficial, codificados por el gen *env*. Después de ingresar en una célula, la transcriptasa inversa codificada por el gen *pol* transcribe el genoma vírico a una copia del DNA bicatenaria que ingresa en el núcleo de las células divisoras y se integra aleatoriamente en el genoma hospedante. Preferiblemente, los retrovirus utilizados para la administración vírica se manipulan para tornar la replicación deficiente, eliminando sus genes *gag*, *pol* y *env*. Por consiguiente, las partículas de retrovirus infecciosas pero no replicativas se producen en líneas celulares empaquetadoras que expresan los genes de los retrovirus *gag*, *pol* y *env* de plásmidos que carecen de una secuencia empaquetadora.

Los lentivirus, un subtipo de retrovirus, pueden representar una alternativa a los retrovirus. Los lentivirus, tales como el VIH, virus de inmunodeficiencia simia y felina, pueden infectar células no divisoras e integrarse de la misma manera que otros retrovirus. Los vectores lentivíricos defectuosos de replicación atenuados han demostrado liderar la expresión a largo plazo de varios transgenes en el SNC tanto de roedores como de primates (Bensadoun et al. (2000) *Exp. Neurol.* 164, 15-24; Kordower et al. (2000) *Exp. Neurol.* 160, 1-16). Los vectores lentivíricos se diseminan 2-3 mm del sitio de inyección, lo que permite la transducción de un número significativo de neuronas con un expresión génica de hasta por lo menos un año.



Incluso otros virus son adenovirus, que comprenden virus de DNA bicatenario. Se han identificado más de 40 serotipos de adenovirus en 6 grupos (A a F). Los virus del grupo C (serotipos Ad2 y Ad5) se han evaluado ampliamente como candidatos para la administración génica (Zhang (1999) *Cancer Gene Ther.* 6, 11). Los adenovirus ingresan en las células uniéndose al receptor de coxsackievirus y adenovirus, que facilita la interacción de secuencias víricas de arginina-glicina-aspartato (RGD) con integrinas celulares. Después de la internalización, el virus escapa de los endosomas celulares, se desarma parcialmente y se transloca al núcleo, en donde comienza la expresión de genes víricos. Preferiblemente, el adenovirus es incapaz de replicación. Esto se puede lograr eliminando uno o más de los genes de adenovirus, tal como los genes de adenovirus tempranos E1 a E4. Esto puede extenderse para eliminar toda la secuencia codificante del genoma de adenovirus. Dichos virus se pueden utilizar para empaquetar genes de BiP pero deben desarrollarse en líneas celulares productoras en presencia de virus cooperadores que suministren todas las funciones génicas y víricas necesarias a fin de facilitar el empaquetado del adenovirus infeccioso, incompetente de replicación que contiene el gen de BiP.

Los virus adeno-asociados son virus de DNA monocatenarios que son virus humanos nativos que se conoce que no causan ninguna enfermedad. Ingresan en las células uniéndose a sulfato de heparán, pero requieren la coinfección con un virus cooperador, tal como adenovirus o herpes virus, para replicarse. Los vectores de virus adeno-asociados tienen una serie de ventajas potenciales. Infeccionan células no divisoras y están establemente integrados y se mantienen en el genoma hospedante; la integración ocurre preferencialmente en un locus dependiente del sitio en el cromosoma 19, reduciendo el riesgo de mutagénesis de inserción. No obstante, en vectores de virus adeno-asociados, esta integración característica se pierde debido a la eliminación de proteínas rep en un intento de reducir el riesgo de emergencia de virus adeno-asociados competentes de replicación.

Los virus de herpes simplex son virus grandes con un genoma de DNA bicatenario lineal de aproximadamente 150 kbp que codifica más de 70 proteínas víricas. Estos virus ingresan en las células por unión de glucoproteínas víricas a residuos de heparán sulfato en la superficie celular. Preferiblemente, los virus del herpes simplex se tornan defectuosos a replicación inactivando un pequeño número de genes, tal como los genes tempranos intermedios ICPD, ICP4, 10P22 y ICP27. Dado que un gran número de genes de virus de herpes simplex puede eliminarse sin afectar la capacidad de producir vectores víricos, grandes secuencias de ácido nucleico que contienen múltiples genes y sus elementos reguladores pueden empaquetarse dentro de vectores del virus del herpes simplex.

Los poxvirus son virus de DNA bicatenarios que incluyen vaccinia y viruela del canario o ALVAC. Preferiblemente, el poxvirus es un poxvirus recombinante que contiene el gen BiP.

Los componentes pueden administrarse solos, pero en general se administrarán como una composición farmacéutica, p. ej., cuando los componentes están en mezcla con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéutico adecuado, seleccionado con respecto a la ruta de administración intencionada y a la práctica farmacéutica estándar.

Por ejemplo, los componentes se pueden administrar en la forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, disoluciones o suspensiones, que pueden contener saporíferos o colorantes, para aplicaciones de liberación intermedia demorada, modificada, sostenida, pulsada o controlada.

Si el producto farmacéutico es un comprimido, entonces el comprimido pueden contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina, desintegrantes tales como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato de almidón de sodio, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga. Además, se pueden incluir agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, gliceril behenato y talco.

Las composiciones sólidas de un tipo similar pueden también emplearse como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos en este sentido incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de la leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para suspensiones acuosas y/o elixires, el agente puede combinarse con distintos edulcorantes o saporíferos, materia colorante o tintes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y sus combinaciones.

Las rutas para administración pueden incluir, aunque sin limitarse a ello, una o más de oral (p. ej., un comprimido, cápsula o una disolución para ingestión), tópica, mucosa (p. ej., como un pulverizador nasal o aerosol para inhalación), nasal, parenteral (p. ej., en forma inyectable), gastrointestinal, intraespinal, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intrauterina, intraocular, intradérmica, intracraneal, intratraqueal, intravaginal, intracerebroventricular, intracerebral, subcutánea, oftálmica (incluida intravítrea o intracameral), transdérmica, rectal, bucal, vaginal, epidural, sublingual.

#### Niveles de dosificación

Por lo general, un médico determinará la dosis real que será la más adecuada para un sujeto individual. El nivel de dosificación específico y la frecuencia de la administración para un paciente en particular pueden variar y dependerán de una diversidad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la

estabilidad metabólica y la longitud de acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el modo y el tiempo de administración, el índice de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular y la terapia individual. Esta cantidad puede determinarse por experimentación de rutina y está dentro del criterio del médico. En general, una dosis eficaz oscilará entre 0,01 mg/kg y 50 mg/kg, más preferiblemente, entre 0,01 mg/kg y 40 mg/kg; más preferiblemente, entre 0,01 mg/kg y 30 mg/kg, más preferiblemente, entre 0,01 mg/kg y 20 mg/kg, más preferiblemente, entre 0,01 mg/kg y 10 mg/kg, lo más preferiblemente, entre 0,05 mg/kg y 10 mg/kg.

#### Formulación

El componente(s) se puede formular en una composición farmacéutica, tal como mezclando con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes adecuados, usando técnicas conocidas en el campo.

#### Fragmentos/Variantes/Homólogos/Derivados

La presente invención abarca el uso de fragmentos, variantes, homólogos y derivados de BiP.

El término "variante" se utiliza para significar secuencias de polipéptidos o nucleótidos que ocurren naturalmente, que difieren de una secuencia de tipo salvaje.

El término "fragmento" indica que una secuencia de polipéptidos o nucleótidos comprende una fracción de una secuencia de tipo salvaje. Puede comprender una o más secciones contiguas grandes de la secuencia o una pluralidad de secciones pequeñas. La secuencia puede además comprender otros elementos de secuencia, por ejemplo, puede ser una proteína de fusión con otra proteína. Preferiblemente, la secuencia comprende por lo menos 50%, más preferiblemente por lo menos 65%, más preferiblemente por lo menos 80%, lo más preferiblemente por lo menos 90% de la secuencia de tipo salvaje.

El término "homólogo" significa una entidad que tiene cierta homología con las secuencias de aminoácidos del sujeto y con las secuencias de nucleótidos del sujeto. En consecuencia, el término "homología" puede igualarse "identidad".

En el presente contexto, una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos, que puede ser por lo menos 75, 85 o 90% idéntica, preferiblemente por lo menos 95, 96, 97 o 98% idéntica a la secuencia del sujeto. De forma típica, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos, etc. que la secuencia de aminoácidos del sujeto. Si bien la homología también puede considerarse en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades químicas/funciones similares), en el contexto de la presente invención, se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

En el presente contexto, una secuencia homóloga incluye una secuencia de nucleótidos, que puede ser por lo menos 75, 85 o 90% idéntica, preferiblemente por lo menos 95, 96, 97 o 98% idéntica a la secuencia del sujeto. De forma típica, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican los sitios activos, etc. como la secuencia del sujeto. Si bien la homología también se puede considerar en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades químicas/funciones similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de homología pueden llevarse a cabo a simple vista, o más usualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas de ordenador comercialmente disponibles pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología se puede calcular sobre secuencias contiguas, es decir, una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, de a un residuo por vez. Esto se denomina alineación "sin interrupciones". Usualmente, dichas alineaciones sin interrupciones se efectúan solamente en un número de residuos relativamente corto.

Si bien éste es un método muy simple y consistente, no puede tomar en consideración que, por ejemplo, en un par de secuencias de otro modo idénticas, una inserción o eliminación causará que los siguientes residuos de aminoácidos queden fuera de alineación, produciendo así una gran reducción potencial en el % de homología cuando se efectúa una alineación global. En consecuencia, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineaciones óptimas que toman en cuenta posibles inserciones y eliminaciones sin penalizar indebidamente la puntuación total de homología. Esto se logra insertando "interrupciones" en la alineación de la secuencia para intentar maximizar la homología local.

No obstante, estos métodos más complejos asignan "penalizaciones de interrupciones" a cada interrupción que ocurre en la alineación, de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una alineación de secuencia con la menor cantidad de interrupciones posible, que refleje una relación más alta entre las dos secuencias comparadas, logrará una puntuación más alta que una con muchas interrupciones. Típicamente se utilizan "alineamientos con costo de interrupciones variables que cargan un costo relativamente alto para la existencia de una interrupción y una penalidad más pequeña para cada residuo subsiguiente en la interrupción. Éste es el sistema de puntuación de interrupciones más comúnmente utilizado. Las altas penalidades de interrupción producirán, desde luego,

alineaciones optimizadas con menos interrupciones. La mayoría de los programas de alineación permiten modificar las penalidades de interrupción. No obstante, se prefiere usar los valores que vienen configurados cuando se usa dicho software para comparación de secuencias. Por ejemplo, cuando se usa el paquete GCG Wisconsin Bestfit, la penalidad de interrupción ya configurada para secuencias de aminoácidos es -12 para una interrupción y -4 para cada extensión.

El cálculo del % de homología máxima requiere entonces en primer lugar la producción de una alineación óptima, tomando en consideración penalidades de interrupción. Un programa de ordenador adecuado para llevar a cabo dicha alineación es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, EE. UU.; Devereux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Research* 12:387). Los ejemplos de otro software que puede efectuar comparaciones incluyen, aunque sin limitarse a ello, el paquete BLAST (véase Ausubel *et al.*, 1999 *ibid* – Capítulo 18), FASTA (Atschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.*, 403-410) y el paquete GENWORKS de herramientas de comparación. Tanto BLAST como FASTA están disponibles en búsquedas en internet y fuera de internet (véase Ausubel *et al.*, 1999 *ibid*, páginas 7-58 a 7-60). No obstante, para algunas aplicaciones, se prefiere usar el programa GCG Bestfit. Una nueva herramienta, llamada BLAST 2 Sequences, están también disponible para comparar secuencias de proteínas y nucleótidos (véase *FEMS Microbiol Lett* 1999 174(2): 247-50; *FEMS Microbiol Lett* 1999 177(1): 187-8).

Si bien el % de homología final se puede medir en términos de identidad, el proceso de alineación propiamente dicho por lo general no se basa en una comparación por emparejamiento todo o nada. En cambio, por lo general se utiliza una matriz de puntuación de similitud en escala que asigna puntuaciones a cada comparación de pares en base a una similitud química o distancia evolucionaria. Un ejemplo de dicha matriz comúnmente utilizada es la matriz BLOSUM62, la matriz configurada para el paquete de programas BLAST. Los programas GCG Wisconsin en general usan o bien los valores configurados públicos o una tabla de comparación de símbolos personalizada, si se provee (véase el manual del usuario para más detalles). Para algunas aplicaciones, se prefiere usar los valores configurados públicos del paquete GCG, o en el caso de otro software, la matriz configurada, tal como BLOSUM62.

Una vez que el software ha producido una alineación óptima, es posible calcular el % de homología, preferiblemente el % de identidad de secuencia. El software típicamente hace esto como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

Las secuencias pueden tener también eliminaciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos, que producen un cambio silencioso y resultan en una sustancia de funcionalidad equivalente. Las sustituciones de aminoácidos intencionales pueden llevarse a cabo en base a similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos, siempre y cuando se retenga la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos negativamente cargados incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos positivamente cargados incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polar no cargados que tienen valores de hidrofiliidad similar incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

Las sustituciones conservadoras se pueden efectuar, por ejemplo, de acuerdo con la siguiente tabla. Los aminoácidos en el mismo bloque de la segunda columna y preferiblemente en la misma línea de la tercera columna se pueden sustituir unos por otros:

ALIFÁTICA	No polar	INTERRUPCIÓN
		ILV
	Polar –sin carga	CSTM
		NQ
	Polar –con carga	DE
		ICR
AROMÁTICA		HFWY

La presente invención abarca también sustitución homóloga (sustitución y reemplazo en este documento significan ambos el intercambio de un residuo de aminoácido existente, con un residuo alternativo), que puede ocurrir, por ejemplo, sustitución comparable, tal como básica por básica, polar por polar, etc. La sustitución no homóloga puede también ocurrir, es decir, de una clase de residuo a otra o alternativamente implicando la inclusión de aminoácidos no naturales – tales como ornitina (en lo sucesivo denominada Z), ornitina de ácido diaminobutírico (en lo sucesivo

denominada B), norleucina ornitina (en lo sucesivo denominada O), piriilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

5 Los reemplazos también se pueden efectuar por aminoácidos no naturales e incluyen: aminoácidos alfa\* y alfadisustituidos\*, N-alkil aminoácidos\*, ácido láctico\*, derivados de haluro de aminoácidos naturales tales como trifluorotirosina\*, p-C1-fenilalanina\*, p-Br-fenilalanina\*, p-I-fenilalanina\*, L-alil-glicina\*, β-alanina\*, ácido L-α-amino  
 10 butírico\*, ácido L-γ-amino butírico\*, ácido L-α-amino isobutírico\*, ácido L-□-amino caproico #, ácido 7-amino heptanoico\*, L-metionina sulfona\*\*, L-norleucina\*, L-norvalina\*, p- nitro-L-fenilalanina\*, L-hidroxi prolina#, L-tioprolina\*,  
 15 derivados de metilo de fenilalanina (Phe) tales como 4-metil-Phe\*, pentametil-Phe\*, L-Phe (4-amino)#, L- Tyr (metilo)\*, L-Phe (4-isopropilo)\*, L-Tic (1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-ácido carboxilo)\*, ácido L-diaminopropiónico# y L-Phe (4-becilo)\*. La notación \* se ha utilizado para el propósito del análisis anterior (en relación con la sustitución  
 20 homóloga y no homóloga), para indicar la naturaleza hidrófoba del derivado, mientras que # se ha utilizado para indicar la naturaleza hidrófila del derivado, \*\* indica características anfipáticas.

Las secuencias de aminoácidos variantes pueden incluir grupos espaciadores adecuados que pueden insertarse  
 15 entre cualquiera de dos residuos de aminoácidos de la secuencia, incluidos grupos alquilo tales como grupos metilo, etilo o propilo, además de espaciadores de aminoácidos tales como residuos glicina o β-alanina. Otra forma de variación que implica la presencia de uno o más residuos de aminoácidos en forma peptóide serán bien entendidas por el experto en la técnica. Para evitar dudas, "la forma peptóide" se usa para referirse a residuos de aminoácidos  
 20 variantes en donde el grupo sustituyente de α-carbono está en el átomo de nitrógeno en lugar del α-carbono. Los procedimientos para preparar péptidos en la forma peptóide se conocen en la técnica, por ejemplo, Simon RJ *et al.*, PNAS (1992) 89(20), 9367-9371 y Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134.

Las secuencias de nucleótidos para uso en la presente invención pueden incluir dentro de ellas nucleótidos  
 25 sintéticos o modificados. Se conoce en la técnica una serie de tipos distintos de modificación para oligonucleótidos. Éstos incluyen cadenas principales de metilfosfonato y fosforotioato y/o la adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los fines de la presente invención, se ha de entender que las secuencias de nucleótidos pueden modificarse por cualquier método disponible en la técnica. Dichas modificaciones  
 30 pueden llevarse a cabo para potenciar la actividad o el periodo de vida *in vivo* de las secuencias de nucleótidos útiles en la presente invención.

Preferiblemente, el fragmento es un fragmento funcional. Tal como se emplea en esta memoria, la expresión  
 35 "fragmento funcional" se refiere a un fragmento de BiP capaz de producir por lo menos una actividad de la proteína BiP de longitud total. En particular, el fragmento funcional puede tener por lo menos una de las siguientes funciones: causa que las células CD 14+ liberen IL-10; estimula las células CD8+ para proliferar y liberar IL-10; inhibe la respuesta del antígeno memoria; activa la expresión de una matriz de genes antiinflamatorios en monocitos, incluido el factor inhibidor de migración (MIF), el receptor de TNF soluble II y TIMP; inhibe la maduración de osteoclastos; inhibe la resorción ósea.

Preferiblemente, el fragmento funcional tiene por lo menos 20 aminoácidos, más preferiblemente por lo menos 50  
 40 aminoácidos y lo más preferiblemente por lo menos 100 aminoácidos de longitud. Los fragmentos particularmente preferidos comprenden una región conservada que se ha hallado homóloga a un número de proteínas BiP que ocurren naturalmente. Se considera que dichas regiones conservadas tienen una función específica.

La expresión "homólogo funcional", tal como se emplea en esta memoria, se refiere a un homólogo que retiene por  
 45 lo menos parte de una actividad de la proteína BiP de longitud total. En particular, se prefiere que el homólogo funcional tenga por lo menos una de las siguientes funciones: cause que las células CD 14+ liberen IL-10; estimule las células CD8+ para proliferar y liberar IL-10; inhiba la respuesta del antígeno memoria; o active la expresión de una matriz de genes antiinflamatorios en monocitos, incluido el factor inhibidor de migración (MEF), el receptor de TNF soluble II y TIMP; inhiba la maduración de osteoclastos; inhiba la resorción ósea.

#### 45 Terapia génica

La presente invención se refiere a terapia génica en la que las secuencias de nucleótidos que codifican BiP se  
 50 regulan *in vivo*. Por ejemplo, la regulación de la expresión se puede lograr administrando agentes que se unen a la secuencia codificante de nucleótidos, o que controlan regiones asociadas con la secuencia codificante de nucleótidos para BiP, o su correspondiente transcrito de RNA para modificar, preferiblemente incrementar el índice de transcripción o traducción.

A modo de ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica BiP puede estar bajo el control de un elemento  
 55 regulador de expresión homólogo o heterólogo, tal como un promotor o un potenciador. El potenciador y/o promotor puede incluso ser activo en tejidos particulares, de forma tal que la secuencia de nucleótidos que codifica BiP se exprese preferencialmente. El elemento potenciador u otros elementos que confieren expresión regulada pueden estar presentes en múltiples copias. Asimismo, o además, el potenciador y/o promotor puede ser preferencialmente activo en uno o más tipos de células, tal como uno o más tipos de células de hueso, p. ej., osteoclastos.

El nivel de expresión de codificación de la secuencia de nucleótidos puede modularse manipulando la región promotora. Por ejemplo, diferentes dominios dentro de una región promotora pueden poseer distintas actividades reguladoras de genes. Las distintas regiones típicamente se evalúan usando constructos de vectores que tienen distintas variantes del promotor con regiones específicas eliminadas (es decir, análisis de eliminación).

5 Técnicas generales de metodología de DNA recombinante

La presente invención emplea, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, DNA recombinante e inmunología, que están dentro de las capacidades de la persona con experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 y suplementos periódicos); *Current Protocols in Molecular Biology*, cáp.. 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; y, D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press.

15 Otras aplicaciones

Preferiblemente, la invención se aplica a la prevención o inhibición del desarrollo de osteoclastos y/o a la función de los osteoclastos.

La invención se describirá ahora mediante los Ejemplos, que tienen como fin ayudar al experto en la técnica a llevar a cabo la invención, y no tienen como fin limitar el alcance de la invención en modo alguno.

20 **Ejemplos**

Ejemplo 1

La estimulación de BiP induce un perfil de activación de genes antiinflamatorios en monocitos.

Introducción

25 BiP, la proteína regulada por glucosa 78 (grp78) es una chaperona del retículo endoplasmático (ER) funcionalmente responsable del correcto pliegue de las proteínas. El incremento de BiP se induce cuando la función del ER se altera, por agotamiento de glucosa, hipoxia o especies de oxígeno reactivo, causando una acumulación de proteínas no plegadas. Éstos también son factores prevalentes en la articulación inflamada que influye en la patogénesis de la artritis reumatoidea (AR).

30 Aislamos e identificamos BiP como un autoantígeno en AR usando proteínómica. Posteriormente, demostramos que las células mononucleares (MC) aisladas de líquido sinovial (SF) de pacientes con AR proliferaron en presencia de BiP recombinante humana (rhu), en contraste con MC de sangre periférica (PB) de AR, y tanto PB como SFMC de OIJD. Estas células produjeron poco o nada de IFN $\gamma$ . El análisis de citocinas de sobrenadantes de PBMC estimuladas por BiP exhibió altas concentraciones de IL-10 y poco TNF $\alpha$ ; IFN $\gamma$  y IL- 1 $\beta$ , y nada de IL-2 o IL-15.

35 En animales roedores de AR, la inmunización previa con BiP demostró prevenir el inicio de artritis inducida por colágeno (CIA) en ratones. La administración o bien intravenosa o subcutánea de BiP también fue terapéutica para ratones en las etapas tempranas de CIA.

Para investigar el mecanismo de acción de BiP se llevaron a cabo otros estudios *in vitro* a fin de analizar el perfil de citocinas de monocitos purificados estimulados con rhu BiP por dos técnicas de matriz génica diferentes.

Métodos

40 Los monocitos se purificaron por aislamiento negativo usando perlas inmunomagnéticas. Se aisló RNA total de estas células que no fueron estimuladas o que fueron estimuladas con BiP (20  $\mu$ g/ml) durante 24 horas. Se usó luego el RNA en la matriz génica Affymetrix (U95 versión 2) o la matriz génica de citocinas R&D de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron muestras por duplicado de un sujeto en la matriz Affymetrix y para dos sujetos control normales en la matriz génica R&D.

45 Resultados

Los resultados se exponen en la Tabla 1 y en la Figura 6.

Conclusión

BiP indujo la reducción que activaron muchos genes en monocitos en la respuesta inflamatoria. Éstos incluyen aquellos implicados en la presentación de antígenos, adhesión y migración celular, señalización celular y

diferenciación de osteoclastos. Hubo acuerdo entre los resultados hallados usando la matriz de activación génica de citocinas R&D y la matriz Affymetrix.

En general, estos cambios en la activación de genes de monocitos indujeron un perfil antiinflamatorio

Compendio

- 5 Se ha demostrado que BiP se une a monocitos humanos mediante una molécula de tipo receptora, distinta de aquellas utilizadas por HSP60 o 70 y grp94. Con el fin de investigar la consecuencia de la activación de monocitos por BiP, se emplearon dos clases de matrices génicas.

10 Se utilizó una matriz génica limitada de 375 citocinas/quimiocinas y sus receptores en monocitos (no estimulados o estimulados con BiP durante 24h) de dos individuos normales. Después de esto, se utilizó una matriz génica Affymetrix por duplicado en una sola muestra y se analizó usando el software Genespring.

15 La matriz Affymetrix demostró que se efectuaron 900 genes por BiP en donde en >75% de estos hubo una reducción. Los resultados de las tres matrices demostraron que se redujo IL-1beta mientras que el antagonista del receptor de IL-1 aumentó. HLA-DR, CD40 y CD86 se redujeron, al igual que c-fos, IKKalfa, y las moléculas de adhesión CD54, alfav beta3, CD18 y CD11c. Las quimiocinas GRO alfa, beta y gamma se potenciaron tal como IL-6, MCP-1 y RANTES, aunque varios receptores de quimiocinas disminuyeron de manera concomitante (CCR1, CCR2 y CXCR4).

Cambios en la activación de genes después de la estimulación de monocitos humanos con BiP, presentación de antígenos, migración celular y producción de citocinas inflamatorias.

Ejemplo 2

- 20 Confirmación y optimización de la inhibición del modelo *in vitro* de citocinas promovido por osteoclastogénesis por BiP en sistemas humano y de ratón.

25 Todos los experimentos *in vitro* se llevaron a cabo usando células humanas y de ratón. Las células humanas se aislaron de sangre periférica por centrifugación de densidad (27) para aislar células mononucleares. Las células de ratón se aíslan de fémures y tibias de ratones adultos de 5 a 8 semanas de vida, como se describió previamente (28). En ambos sistemas, la diferenciación de osteoclastos se evalúa por el número de células contadas positivas para TRAP (ratón), o expresión de receptores de vitronectina (VnR) y/o anillos de actina F (humana). La función de resorción en ambos sistemas se evalúa cuantificando la formación de lagunas de resorción después del cultivo de células en porciones de dentina. Bajo condiciones experimentales, los cultivos de osteoclastos se cosechan después de 4-5 días (ratón) o 10-12 días (seres humanos), y los ensayos de resorción se realizan después de 7 y 14 días para osteoclastos de ratón y ser humano, respectivamente.

30 Se prepara PBMC (humana) o BMM (ratón) después de cultivar durante toda la noche en M-CSF (25 ng/ml). Para generar osteoclastos, las células no adherentes dependientes de M-CSF se cultivan posteriormente con M-CSF (25 ng/ml) y RANKL (10 ng/ml) en presencia y ausencia continua de BiP en un intervalo de concentraciones (0,02- 20 µg/ml). Los estudios de pulso, en donde BiP se añade durante las etapas tempranas de la diferenciación del precursor, o después de la formación de células multinucleadas, también se llevan a cabo para determinar los efectos de BiP sobre las distintas etapas de la diferenciación de osteoclastos. En el momento adecuado, los cultivos se fijan y tiñen histoquímicamente para actividad de TRAP (ratón), o se tiñen para anillo de actina F y VnR por inmunolocalización usando el anticuerpo 23C6, y TRITC-faloidina, respectivamente (humanos), y se cuantifica el número de osteoclastos. La resorción se cuantifica después de la eliminación de los osteoclastos de las porciones de dentina y tiñendo con azul de toluidina. La confirmación adicional de los datos de diferenciación de osteoclastos, particularmente en células de ratón, se confirma por técnicas moleculares usando PCR en tiempo real para medir la expresión de genes del marcador específico de osteoclastos, como el receptor de calcitonina y catepsina K.

35 Ya que la BiP estimula la producción de IL-10 en PBMC (19), y que IL-10 inhibe la diferenciación de osteoclastos (29), la producción de IL-10 por los precursores de osteoclastos de ratón y humanos se mide después de 24 h de cultivo, al nivel de la proteína por ELISA o al nivel del mRNA por PCR en tiempo real. Experimentos adicionales, que usan anticuerpos monoclonales neutralizantes del receptor anti-IL-10 o anti-IL-10 proporcionan una evaluación de si cualquier efecto inhibitor observado con BiP se debe a IL-10 solo o a otros factores. La posibilidad de que la cantidad de osteoclastos se reduzca por apoptosis también se aborda, y las células tratadas con BiP se examinan para apoptosis morfológicamente usando tinción de DAPI, y bioquímicamente usando ensayos TUNEL.

- 50 Ejemplo 3

Interferencia de BiP con las vías de señalización principales implicadas en osteoclastogénesis y resorción ósea.

Esto se investiga directamente, mediante la inhibición de la fosforilación y la activación de moléculas de la superficie celular a través de factores de transcripción (p. ej., RANK y c-Fms, TRAFs, c-Fos, NFATc1, MAPK [p38, jun y ERK1/2], IKK y NF-κB y Akt), o indirectamente, por liberación de citocinas inhibitoras, tales como IL-10.

Todos los experimentos *in vitro* se llevan a cabo usando células humanas y de ratón. Las células humanas se aíslan de sangre periférica por centrifugación de densidad (27) para aislar células mononucleares. Las células de ratón se aíslan de fémures y tibias de ratones adultos de 5 a 8 semanas de vida como se describió previamente (28). En ambos sistemas, la diferenciación de osteoclastos se evalúa por el número de células contadas positivas para TRAP (ratón), o expresión de receptores de vitronectina (VnR) y/o anillos de actina F (humanos). La función de resorción en ambos sistemas se evalúa cuantificando la formación de lagunas de resorción tras cultivar las células en porciones de dentina. Bajo condiciones experimentales, los cultivos de osteoclastos se cosechan después de 4-5 días (ratón) o 10-12 días (ser humano), y los ensayos de resorción se realizan después de 7 y 14 días para osteoclastos de ratón y ser humano, respectivamente.

Se estudia la expresión de varias proteínas pivotaes en la cascada de señalización celular en dirección 3' de unión de RANKL/RANK y M-CSF/c-Fms. Éstas incluyen, por ejemplo, RANK y c-Fms, TRAF6, c-Fos y NFATc1, MAPK, IKK y NF- $\kappa$ B y Akt. Se ha demostrado recientemente que son de primordial importancia en la osteoclastogénesis y en consecuencia proveen un punto de partida para analizar los mecanismos subyacentes a los efectos inhibidores de BiP. Sin desear estar influenciados por ninguna teoría en particular, se anticipa que BiP tiene el potencial de ejercer sus efectos inhibidores tanto en precursores de osteoclastos como en osteoclastos maduros. Por lo tanto, los cultivos de BMM y PBMC se preparan en presencia de M-CSF y RANKL, y se añade BiP en una concentración eficaz máxima (según lo determinado a partir del Ejemplo 2) por un periodo de 24-72 h al comienzo del cultivo, es decir, precursores de osteoclastos, o hacia el final del cultivo cuando los osteoclastos multinucleados están claramente presentes. Los cultivos se cosechan en el momento apropiado y o bien se preparan extractos de RNA o proteína para análisis PCR en tiempo real cuantitativo y Western blotting para expresión de moléculas de señalización/factores de transcripción, incluidos c-Fms, RANK, c-Fos, NFATc1, TRAF6, IKK y Alct. En algunos casos, los anticuerpos fosfo-específicos contra pERK1/2, pp38, y pJNK se usan para mirar los efectos en estos miembros de la familia MAPK después de la exposición a BiP durante 5-60 min. Se usan controles positivos y negativos apropiados para PCR en tiempo real, y se diseñan y usan cebadores específicos y sondas fluorescentes para todos los genes. Los lisados de proteínas para Western blotting se preparan usando los inhibidores de proteinasa descritos anteriormente (30; 31). Se mide el contenido de proteína de modo que pueda asegurarse una carga equivalente del gel de poliacrilamida y las muestras puedan someterse a electroforesis bajo condiciones de desnaturalización. Las proteínas se manchan en nitrocelulosa y se colocan en sondas con anticuerpos primarios y secundarios específicos, y se visualizan por quimiluminiscencia potenciada. Todos los anticuerpos están disponibles de Chemicon, Santa Cruz y Sigma.

Estos experimentos se pueden utilizar para determinar cuáles de las vías de señalización principales que han demostrado una función importante en la diferenciación y activación de osteoclastos son moduladas por BiP. Asimismo, estos estudios revelarán si el mecanismo de acción de BiP es distinto en regular la diferenciación de células precursoras frente a activación de osteoclastos maduros.

#### Ejemplo 4

Eficacia del tratamiento de BiP *in vivo* en la formación de osteoclastos y la resorción ósea usando un modelo animal diseñado para promover la diferenciación de osteoclastos

Los ratones sometidos a ovariectomía CD1 producen espontáneamente osteoclastos en exceso y desarrollan enfermedad de tipo osteoporosis que se tratará con BiP en distintas etapas de la enfermedad.

El mecanismo de acción de BiP *in vivo* se determina usando modelos de enfermedad humana. En el estudio de pérdida ósea en modelos animales de células inflamatorias de AR, los linfocitos T y los fibroblastos activos, etc (9;10) que pueden expresar RANKL e inducir resorción ósea, y la producción de citocinas – tales como TNF $\alpha$  y IL-1 $\beta$ (32), que promueven la osteoclastogénesis, pueden complicar los experimentos. Además, la citocina de las células T, IL-17 (7), puede potenciar esta actividad. El material de ratón del estudio de BiP original de prevención y terapia de CIA se examina en detalle en presencia de osteoclastos. Las secciones para TRAP se tiñen y se evalúa el número de osteoclastos/sección en cada grupo, o los osteoclastos por hibridación *in situ* de los genes marcadores de osteoclastos, tal como Cathepsina K o MMP-9 identificados usando técnicas de rutina que conoce el experto en la técnica. Esto aporta datos para el desarrollo de osteoclastos en un modelo de artritis promovida por antígenos en donde las células inmunitarias y las citocinas cumplen una función similar en AR.

En un modelo independiente de activación de osteoclastos y pérdida ósea que es independiente de una respuesta inflamatoria, se usa un modelo que promueve la destrucción ósea y la maduración de osteoclastos – el ratón sometido a ovariectomía (33). En el primer caso, se usa el protocolo para la prevención de BiP de CIA en el que una sola dosis de BiP antes de la inducción de la enfermedad previno los síntomas medidos un mes después de la inducción (17). Por consiguiente, en el modelo de ovariectomía (ovx), se administra BiP por vía intravenosa en tres puntos de tiempo, para separar grupos de 6 ratones: o bien 1 semana antes de la ovx, al momento de la ovx o después de la ovx en intervalos semanales para determinar si BiP puede prevenir la inducción de resorción ósea osteoclastica después de la privación de estrógenos. Los ratones son sacrificados y los huesos se examinan en intervalos de una semana post-ovx hasta 6 semanas. Se usan grupos paralelos de ratones control tratados con vehículo o con una proteína irrelevante, tal como albúmina de suero humano, así como también controles quirúrgicos. La densidad mineral ósea y la resorción ósea se evalúan y cuantifican por microCT y análisis

histológicos, y se usa tinción TRAP para elucidar el número de osteoclastos. Estos experimentos se usan para investigar más la función de BiP en la prevención de pérdida ósea inducida por ovariectomía.

Compendio

- 5 BiP es una nueva terapia biológica para enfermedades reumáticas en las que se produce activación de los osteoclastos. Se dan a conocer pruebas experimentales *in vitro* e *in vivo* que respaldan la afirmación de que la BiP inhibe la osteoclastogénesis en sistemas de osteoclastogénesis en seres humanos y murinos *in vitro*.

Tabla 1: Datos de matriz génica de citocinas analizados por densitometría.

Aumento			Reducción		
	MO + BiP	MO		MO+BiP	MO
			ENA-78	4,2 ± 16,2	55
			GRO $\gamma$	35,6 ± 25	47
L-1Ra	26,7 ± 19,7	12,2	IL-8	57,8 ± 20,4	80
L6	17 ± 18,2	6,7	IL-1 $\beta$	189	204
AMAC	18,3 ± 5,3	ND	LDGF	5,4 ± 0,7	52
TNF RII	4,1 ± 2,2	ND	Integrina		
			$\beta$ 1, $\beta$ 2, $\beta$ 4	ND/ND/24	22/56/35
			IFN $\gamma$ R1	ND	23

- 10 Se aislaron monocitos de sangre periférica y se estimularon o bien con (20 mg/ml)(MO+BiP) o se dejaron sin estimular (MO) durante 24 h. Las autorradiografías de la matriz génica de citocinas se analizaron por densitometría y se normalizaron para dar una expresión en porcentaje de máxima (100%) o la activación génica no se detectó (ND). Los resultados expuestos son de dos sujetos para monocitos estimulados con BiP y un sujeto para monocitos no estimulados. Los resultados se muestran o bien como aumento o como reducción de mRNA de citocinas
- 15 estimuladas con BiP, en ambas muestras, al compararse con las células control.



REFERENCIAS

- (1) Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423(6937):337-342.
- (2) Chambers TJ. Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J Pathol* 2000; 192(1):4-13.
- (3) Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 1999; 27(8):1229-1241.
- (4) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999; 20(3):345-357.
- (5) Wagner EF, Karsenty G. Genetic control of skeletal development. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11(5):527-532.
- (6) Degli-Esposti M. To die or not to die--the quest of the TRAIL receptors. *J Leukoc Biol* 1999; 65(5):535-542.
- (7) Lubberts E, van den BL, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK et al. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol* 2003; 170(5):2655-2662.
- (8) Udagawa N. The mechanism of osteoclast differentiation from macrophages: possible roles of T lymphocytes in osteoclastogenesis. *J Bone Miner Metab* 2003; 21(6):337-343.
- (9) Rifas L, Arackal S, Weitzmann MN. Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts. *J Cell Biochem* 2003; 88(4):650-659.
- (10) Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, Nakagawa T, Yamamoto A, Miyazaki T et al. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(2):259-269.

- (11) Jimi E, Aoki K, Saito H, D'Acquisto F, May MJ, Nakamura I et al. Selective inhibition of NF-kappaB blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction in vivo. *Nat Med* 2004; 10(6):617-624.
- (12) Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(11):859-868.
- (13) Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA et al. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 1994; 266(5184):443-448.
- (14) Lee ZH, Kim HH. Signal transduction by receptor activator of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305(2):211-214.
- (15) Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 2002; 3(6):889-901.
- (16) Walsh NC, Gravallese EM. Bone loss in inflammatory arthritis: mechanisms and treatment strategies. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16(4):419-427.
- (17) Corrigan VM, Bodman-Smith MD, Fife MS, Canas B, Myers LK, Wooley P et al. The human endoplasmic reticulum molecular chaperone BiP is an autoantigen for rheumatoid arthritis and prevents the induction of experimental arthritis. *J Immunol* 2001; 166(3):1492-1498.
- (18) Bodman-Smith MD, Corrigan VM, Kemeny DM, Panayi GS. BiP, a putative autoantigen in rheumatoid arthritis, stimulates IL-10-producing CD8-positive T cells from normal individuals. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42(5):637-644.
- (19) Corrigan VM, Bodman-Smith MD, Brunst M, Cornell H, Panayi GS. The stress protein, BiP, stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express an anti-inflammatory cytokine profile and to inhibit antigen presenting cell function: relevance to the treatment of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1167-1171.
- (20) Miossec P, Chomarat P, Dechanet J, Moreau JF, Roux JP, Delmas P et al. Interleukin-4 inhibits bone resorption through an effect on osteoclasts and proinflammatory cytokines in an ex vivo model of bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994; 37(12):1715-1722.

- (21) Yang SY, Wu B, Mayton L, Mukherjee P, Robbins PD, Evans CH et al. Protective effects of IL-1Ra or vIL-10 gene transfer on a murine model of wear debris-induced osteolysis. *Gene Ther* 2004; 11(5):483-491.
- (22) Vittecoq O, Corrigan VM, Bodman-Smith MD, Panayi GS. The molecular chaperone BiP (GRP78) inhibits the differentiation of normal human monocytes into immature dendritic cells. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42 suppl:43.
- (23) Nair SP, Meghji S, Reddi K, Poole S, Miller AD, Henderson B. Molecular chaperones stimulate bone resorption. *Calcif Tissue Int* 1999; 64(3):214-218.
- (24) Teti A, Migliaccio S, Baron R. The role of the alphaVbeta3 integrin in the development of osteolytic bone metastases: a pharmacological target for alternative therapy? *Calcif Tissue Int* 2002; 71(4):293-299.
- (25) Vignery A. Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int J Exp Pathol* 2000; 81(5):291-304.
- (26) Sodek J, Zhu B, Huynh MH, Brown TJ, Ringuette M. Novel functions of the matricellular proteins osteopontin and osteonectin/SPARC. *Connect Tissue Res* 2002; 43(2-3):308-319.
- (27) Corrigan VM, Solau-Gervais E, Panayi GS. Lack of CD80 expression by fibroblast-like synoviocytes leading to anergy in T lymphocytes. *Arthritis Rheum* 2000; 43(7):1606-1615.
- (28) Li X, Udagawa N, Takami M, Sato N, Kobayashi Y, Takahashi N. p38 Mitogen-activated protein kinase is crucially involved in osteoclast differentiation but not in cytokine production, phagocytosis, or dendritic cell differentiation of bone marrow macrophages. *Endocrinology* 2003; 144(11):4999-5005.
- (29) Hong MH, Williams H, Jin CH, Pike JW. The inhibitory effect of interleukin-10 on mouse osteoclast formation involves novel tyrosine-phosphorylated proteins. *J Bone Miner Res* 2000; 15(5):911-918.
- (30) Corrigan VM, Arastu M, Khan S, Shah C, Fife M, Smeets T et al. Functional IL-2 receptor beta (CD122) and gamma (CD132) chains are expressed by fibroblast-like synoviocytes: activation by IL-2 stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production. *J Immunol* 2001; 166(6):4141-4147.

- (31) Sunter A, Thomas DP, Yeudall WA, Grigoriadis AE. Accelerated cell cycle progression in osteoblasts overexpressing the c-fos proto-oncogene: induction of cyclin A and enhanced CDK2 activity. *J Biol Chem* 2004; 279(11):9882-9891.
- (32) Zwerina J, Hayer S, Tohidast-Akrad M, Bergmeister H, Redlich K, Feige U et al. Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1, and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis: effects on synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 2004; 50(1):277-290.
- (33) Libouban H, Moreau MF, Basle MF, Bataille R, Chappard D. Increased bone remodeling due to ovariectomy dramatically increases tumoral growth in the 5T2 multiple myeloma mouse model. *Bone* 2003; 33(3):283-292.

5 Si bien la invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, se ha de entender que la invención según se reivindica no debe limitarse en forma indebida a dichas realizaciones específicas. De hecho, se tiene como fin que diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención, que son obvios para el experto bioquímica y biología molecular y campos relacionados, estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

- (1) Uso de BiP (proteína de unión a inmunoglobulina) o su variante, homólogo, que tiene por lo menos 75, 85 o 90% de identidad de secuencia, derivado o fragmento, que tiene el efecto terapéutico o preventivo de BiP en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de pérdida ósea.
- 5 (2) Uso de BiP o su variante, homólogo, derivado o fragmento en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de resorción ósea.
- (3) Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la pérdida ósea o la resorción ósea se asocia con enfermedad musculoesquelética.
- (4) Uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la enfermedad musculoesquelética es osteoporosis.
- 10 (5) Un método *in vitro* de diagnóstico de una enfermedad o síndrome causado o asociado con pérdida ósea, que comprende las etapas de:
- (a) detectar la actividad de BiP en una muestra de un sujeto;
- (b) comparar la actividad de BiP con aquella de un control no afectado; y
- (c) comparar el valor obtenido del control con el valor obtenido del sujeto;
- 15 en donde una diferencia entre el valor obtenido del control y el valor obtenido del sujeto es indicativo de que el sujeto sufre la enfermedad o el síndrome.
- (6) El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la actividad de BiP se reduce en comparación con los valores obtenidos del control.
- (7) El método según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, que comprende la etapa opcional de medir el desarrollo de osteoclastos o la resorción ósea
- 20 (8) Un método *in vitro* para determinar el efecto(s) de BiP o su variante, homólogo que tiene por lo menos 75, 85 o 90% de identidad de secuencia, derivado o fragmento que tiene el efecto preventivo o terapéutico de BiP sobre la diferenciación de osteoclastos, que comprende las etapas de:
- (a) añadir BiP a uno o más osteoclastos que están en una o más etapas distintas de la diferenciación de osteoclastos; y
- 25 (b) determinar el efecto(s) de BiP sobre la osteoclastogénesis.
- (9) Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que BiP se añade en una concentración de 0,02-20 µg/ml.
- (10) Un método de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que el número de osteoclastos se cuantifica midiendo la actividad de TRAP, VnR y/o anillos de actina F.
- 30 (11) Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende la etapa opcional de cuantificar la resorción ósea.
- (12) Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que la diferenciación de osteoclastos se confirma usando PCR para medir la expresión de uno o más marcadores específicos de osteoclastos.
- 35 (13) Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el marcador(es) específico de osteoclastos es el gen receptor de calcitonina o el gen de catepsina K.
- (14) Un método para identificar una o más proteínas moduladas por BiP durante la diferenciación de osteoclastos, que comprende las etapas de:
- (a) diferenciar un osteoclasto en presencia y ausencia de BiP; y
- 40 (b) identificar una o más proteínas que se expresan de manera diferencial en un osteoclasto diferenciado en presencia de BiP en comparación con un osteoclasto diferenciado en ausencia de BiP.
- (15) Un método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la proteína(s) comprende una molécula de señalización o un factor de transcripción.
- 45 (16) Un método de acuerdo con la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en el que se añade BiP durante un periodo de 24-72 h o bien al comienzo del cultivo o hacia el final del cultivo cuando están presentes los osteoclastos multinucleados.

(17) Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que el ácido nucleico codifica la proteína(s), o la proteína(s) es detectada usando qt-RT-PCR y/o Western blotting.

(18) Uso de BiP o su variante, homólogo que tiene por lo menos 75, 85 o 90% de identidad de secuencia, derivado o fragmento que tiene el efecto terapéutico o preventivo de BiP en la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la osteoporosis.

5

FIGURA 1

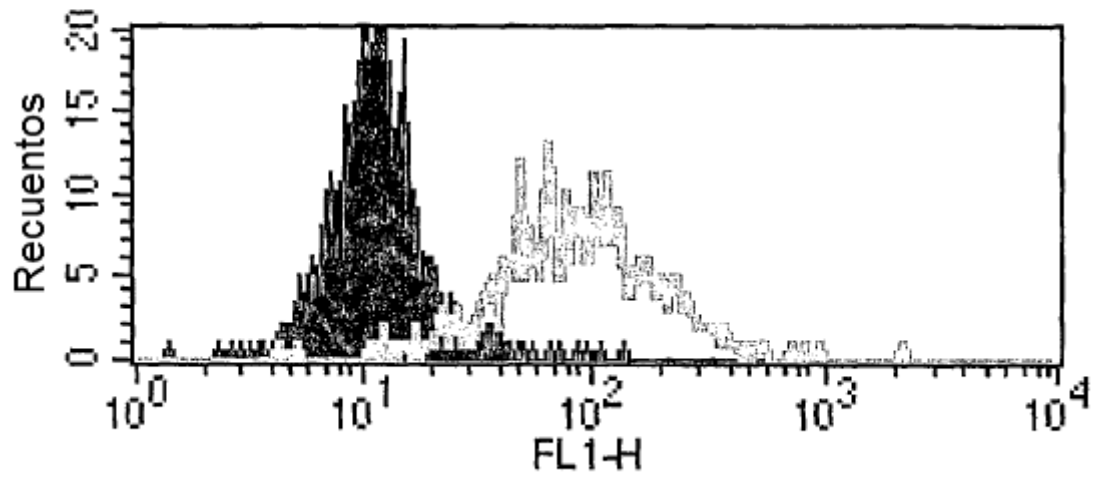


FIGURA 2

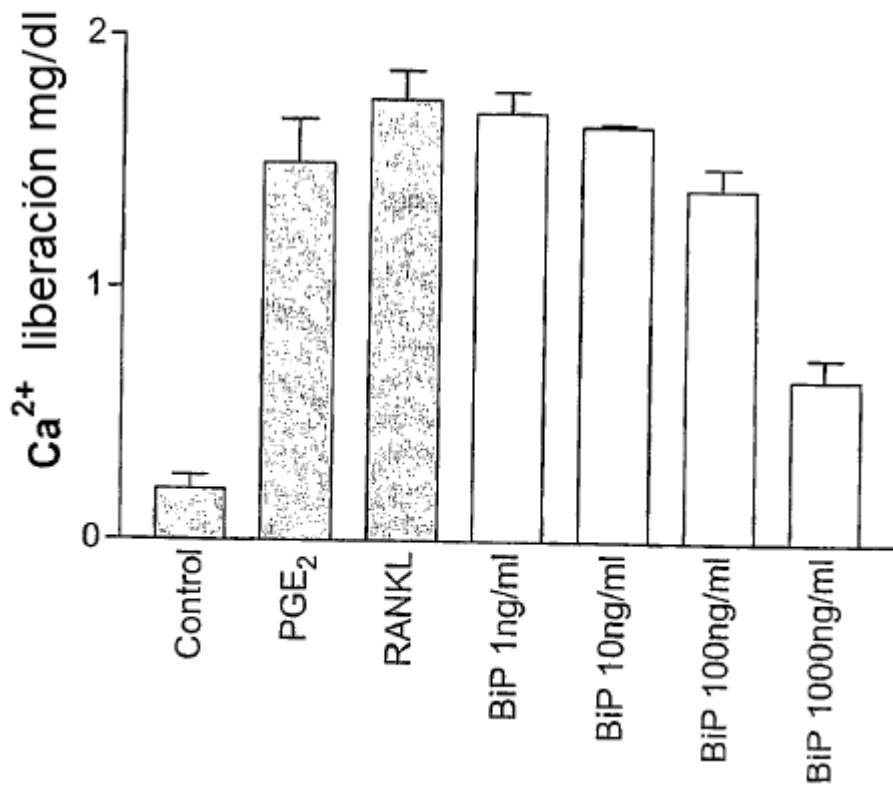




FIGURA 3

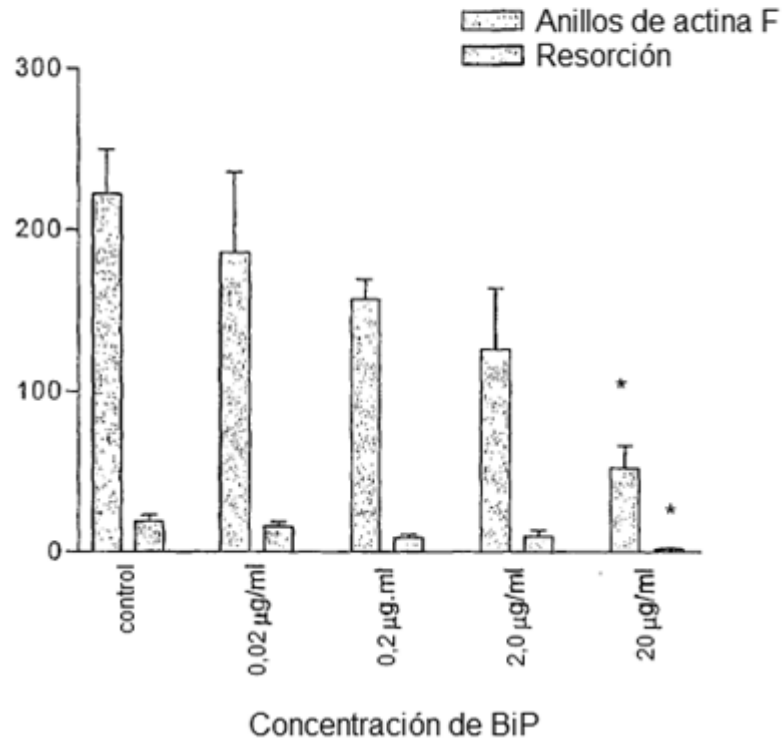


FIGURA 4

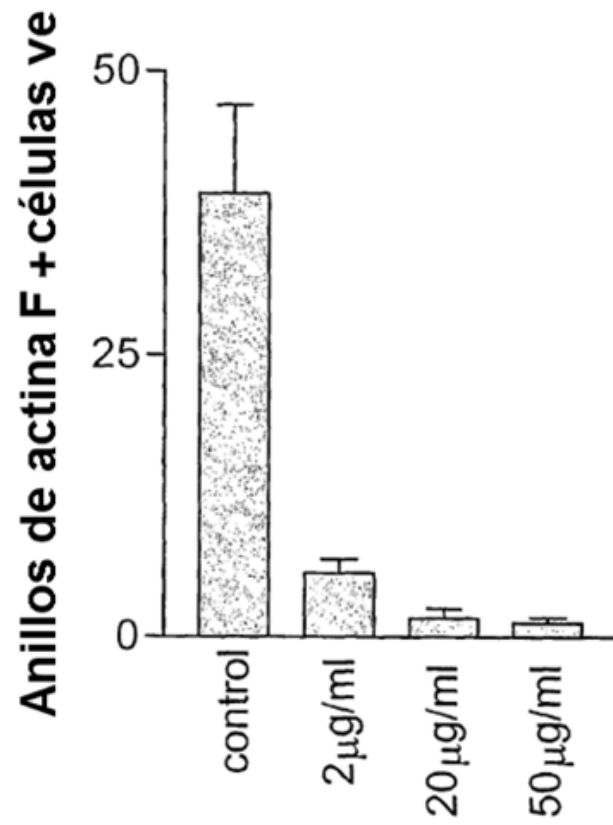


FIGURA 5

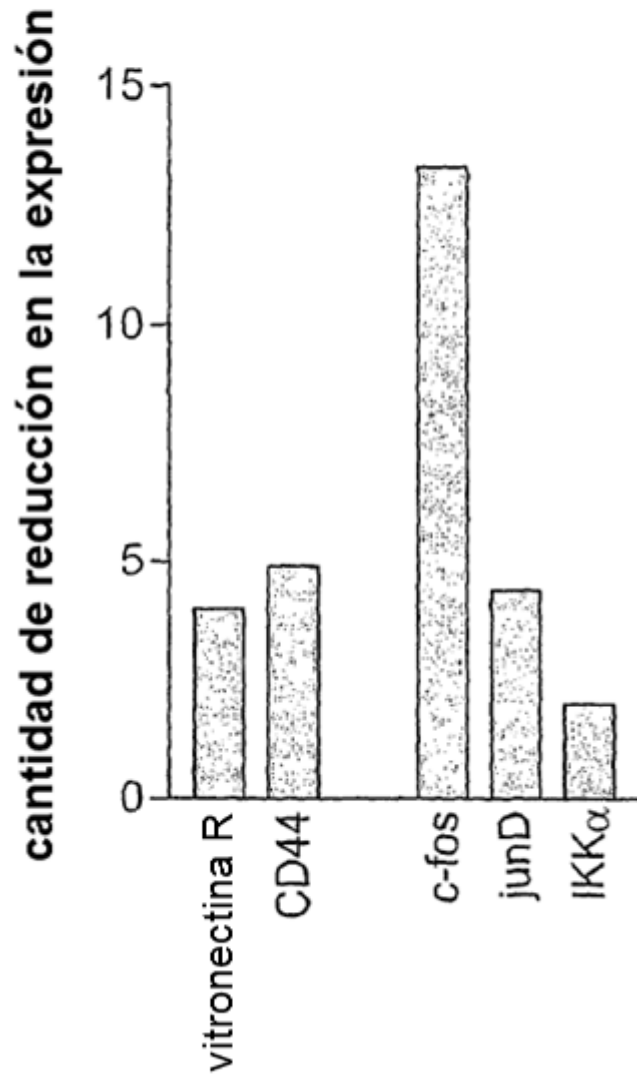


FIGURA 6

