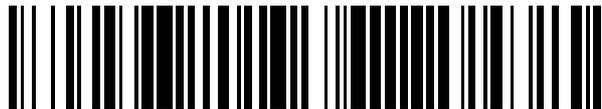


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 757**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/04</b>	(2006.01)
<b>C07K 7/04</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/11</b>	(2006.01)
<b>C12N 5/10</b>	(2006.01)
<b>A61P 19/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/EP2012/076729**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13093039**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12810302 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2812015**

54 Título: **Péptidos que se dirigen al receptor activador del factor nuclear kappa B (Rank) y sus aplicaciones**

30 Prioridad:

**23.12.2011 EP 11306766**  
**20.07.2012 EP 12305886**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.11.2016**

73 Titular/es:

**UNIVERSITE DE NANTES (50.0%)**  
**1 quai de Tourville**  
**44000 Nantes, FR y**  
**CHU NANTES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HEYMANN, DOMINIQUE;**  
**TELETCHÉA, STÉPHANE y**  
**STRESING, VERENA**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 590 757 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

Péptidos que se dirigen al receptor activador del factor nuclear kappa B (Rank) y sus aplicaciones.

5 La presente invención se refiere al campo de la prevención y el tratamiento de enfermedades relacionadas con la activación de la ruta de señalización de RANKL-RANK.

En particular, la invención se refiere a un polipéptido aislado útil para la prevención y el tratamiento de enfermedades de la resorción ósea.

10 El tejido óseo experimenta un remodelado constante para satisfacer las funciones principales de apoyo mecánico, mantenimiento de la homeostasis del calcio y como suministrador de células madre. Este proceso se encuentra mediado por dos linajes celulares: los osteoclastos hematopoyéticos de resorción ósea y los osteoblastos mesenquimales formadores de hueso y los osteocitos. Bajo condiciones fisiológicas, el equilibrio entre formación y resorción de hueso está estrechamente regulado y determina la densidad ósea. Este equilibrio está basado en la

15 ruta RANK/RANKL/OPG.

El activador receptor del factor nuclear  $\kappa$ B (RANK) es un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral expresado por los osteoclastos y precursores de los mismos. Se ha identificado la interacción de RANK con RANKL (su ligando) como la ruta común final a través de la que se regula la resorción ósea. Mediante la unión a su receptor RANK sobre los precursores osteoclasticos, RANKL controla la diferenciación, proliferación y supervivencia de los osteoclastos. La osteoprotegerina (OPG) es el inhibidor natural de RANKL. RANK y RANKL se expresan en muchos tipos celulares normales (Theoleyre et al., 2004) pero su actividad es más importante en el tejido óseo, la piel (Duheron et al., 2011) y las glándulas mamarias (González-Suárez et al., 2010; Schramek et al., 2010). La expresión de RANK-RANKL está severamente incrementada en células de cáncer no óseas, tales como los cánceres de mama o el melanoma, en las metástasis asociadas a los mismos (Jones et al., 2006) y en los cánceres óseos primarios, tal como en el osteosarcoma (Mori et al., 2007).

20

25

La alteración del equilibrio homeostático puede conducir a la pérdida patológica de hueso, tal como en la osteoporosis relacionada con la edad, la enfermedad periodontal o la artritis reumatoide inflamatoria, o con la formación excesiva de hueso, tal como en las malformaciones esqueléticas ligadas o no a mutaciones y/o polimorfismos genéticos (Whyte et al., 2009) o a la alteración en el remodelado óseo. Las perturbaciones en la proporción de OPG a RANKL se ha demostrado que se producen en la deficiencia de estrógenos, en el hiperparatiroidismo y en otros trastornos de estimulación de la resorción ósea. RANKL también es expresado por linfocitos y fibroblastos sinoviales y puede mediar en la pérdida ósea asociada a las condiciones inflamatorias.

30

35

El descubrimiento de la ruta RANK/RANKL/OPG y sus implicaciones en la patogénesis de las enfermedades óseas proporciona una diana molecular para las terapias de mejora de la salud ósea.

40 Se ha propuesto el desarrollo de moléculas pequeñas, miméticos de OPG que se dirigen a ("target") RANKL, para el desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades óseas, en particular enfermedades de la resorción ósea. Cheng y sus colaboradores (Cheng et al., 2004) han diseñado dichos péptidos derivados de OPG para bloquear RANKL. Su péptido más prometedor, OP3-4, era capaz de unirse directamente a RANKL con una interacción medible mediante resonancia del plasmón superficial. Esta interacción resulta suficiente para reducir *in vitro* la osteoclastogénesis y proteger a ratones *in vivo* de la pérdida ósea.

45

Otro enfoque iniciado por Takasaki en 1997 (Takasaki et al., 1997) fue diseñar moléculas biocompatibles capaces de focalizarse en RANKL basadas en péptidos derivados de la secuencia de RANK. Su trabajo, inicialmente con diana en la interacción FNT-alfa/RFNT, ha demostrado ser útil para bloquear la interacción RANKL/RANK de una manera independiente del FNT (Aoki et al., 2006). Su péptido más eficaz, denominado WP9QY, era capaz de inhibir *in vitro* la osteoclastogénesis de una manera dependiente de la dosis y de impedir la pérdida ósea *in vivo* en un modelo de osteoporosis inducida en el ratón.

50

Dichos péptidos se obtuvieron de la secuencia nativa de la pareja que era su diana, basándose en premisas construidas a partir de modelos basados en otros elementos de la familia de FNT/R-FNT. Es decir, se seleccionó OP3-4 de la interfaz putativa OPG-RANKL (el modelo para OPG utilizó estructuras cristalográficas de RFNT, Fas y TRAIL) y se seleccionó WP9QY de la interfaz putativa RANKL-RANK (los modelos se basaban en la estructura cristalográfica de R-FNT/FNT- $\beta$ ). Aunque su actividad biológica mostró resultados prometedores en modelos *in vitro* e *in vivo*, su interés terapéutico estaba potencialmente limitado por su afinidad de unión relativamente baja para RANKL, en comparación con la unión de RANKL a RANK.

55

60

Durante la última década, se han producido grandes avances en la gestión de los trastornos metabólicos del hueso, con la introducción de nuevos agentes quelantes de hueso (siendo el zoledronato el tratamiento actualmente más importante) y el desarrollo de un anticuerpo monoclonal (denosumab) dirigido contra RANKL (Baron et al., 2011). Aunque estas terapias han mostrado mejoras prometedoras en el tratamiento de las enfermedades óseas, en particular las enfermedades de la resorción ósea, su aplicación se ha visto limitada por la pobre biodisponibilidad y/o

65

estabilidad de las grandes macromoléculas, tales como anticuerpos o quimeras, el modo de administración, el elevado coste y el riesgo de efectos secundarios leves a graves y en ocasiones incluso potencialmente letales, tales como erupciones cutáneas, inmunogenicidad, osteonecrosis mandibular o densidad mineral incrementada del hueso trabecular que conduce a retardos en el crecimiento.

5 Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad significativa de nuevos compuestos mejorados para la prevención y/o el tratamiento de las enfermedades óseas, en particular de las enfermedades de resorción ósea, que resulten eficaces para inhibir la osteoclastogénesis, de producción económica, que presenten una elevada biodisponibilidad y que puedan administrarse con facilidad en el paciente sin presentar efectos secundarios severos. Los presentes  
10 inventores han dado un paso significativo con la invención dada a conocer en la presente memoria.

El objetivo de la invención es satisfacer dicha necesidad mediante la provisión de nuevos polipéptidos, que permitan resolver totalmente o en parte los problemas indicados anteriormente.

15 Los inventores han diseñado péptidos innovadores que son capaces de unirse específicamente al receptor RANK y que presentan un fuerte efecto inhibitor de la osteoclastogénesis. Al contrario que los péptidos desarrollados hasta hoy, las secuencias peptídicas de la invención no se derivan de las secuencias de aminoácidos de RANK, RANKL u OPG existentes y no se encuentran presentes en ninguna proteína o péptido conocido de la literatura.

20 En un aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado que consiste en una secuencia de hasta 20 aminoácidos, en el que dicha secuencia que comprende o que consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- SEC ID nº 32, y
- una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 80% respecto a SEC ID nº 32 en la totalidad de la longitud de la SEC ID nº 32,

en particular:

- SEC ID nº 33, y
- una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 80% respecto a SEC ID nº 33 en toda la longitud de SEC ID nº 33,

más particularmente:

- SEC ID nº 1 (LKLCS), y
- una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 80% respecto a SEC ID nº 1 en toda la longitud de SEC ID nº 1,

para la utilización como medicamento en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad ósea, en particular una enfermedad de la resorción ósea.

45 El polipéptido según la invención presenta en particular las ventajas siguientes:

- presenta un fuerte efecto inhibitor de la osteoclastogénesis,
- no presenta efectos secundarios severos. En particular, no presenta citotoxicidad evidente o actividades proapoptóticas,
- es de producción económica,
- presenta una elevada biodisponibilidad,
- presenta una elevada capacidad de penetrar en los tumores. Tal como se ilustra en el artículo de Lien et al. (2003), es bien conocido en la técnica que en el tratamiento del cáncer, una ventaja adicional de los péptidos sobre las proteínas de mayor tamaño, tales como los anticuerpos de longitud completa, es su capacidad superior de penetrar en los tumores,
- ha demostrado ser muy estable con el tiempo, posibilitando su administración en pacientes mediante cualquier técnica de administración existente.

65 A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto en la técnica relevante.

Por comodidad, se proporciona el significado de determinados términos y expresiones utilizados en la memoria, ejemplos y reivindicaciones.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “enfermedad de la resorción ósea” se refiere a cualquier enfermedad en la que la homeostasis ósea resulte alterada mediante la ruta de señalización RANK-RANKL. El desequilibrio de la homeostasis puede aparecer en las enfermedades de la resorción ósea no inflamatorias o en las inflamatorias, en enfermedades de la resorción ósea no oncológicas o en las oncológicas, tal como se indica en el artículo de Theoleyre et al. (2004).

10 En un contexto no inflamatorio, entre las enfermedades de la resorción ósea se incluyen enfermedades del metabolismo óseo, tales como la osteoporosis (incluyendo la osteoporosis de tipo I (postmenopáusica) y la de tipo II (senil)), las malformaciones esqueléticas ligadas o no a mutaciones y/o polimorfismos genéticos (Whyte et al., 2009), la deficiencia de vitamina D, tal como la observada en el raquitismo, cualquier enfermedad causada por cualquier tratamiento que presente como efecto secundario una alteración del remodelado óseo (incluyendo terapias endocrinas tales como el tamoxifeno o los inhibidores de aromataasa (Lee et al., 2011), la osteoporosis inducida por glucocorticoides (Hansen et al., 2011), la hipercalcemia de las neoplasias malignas), las enfermedades óseas osteolíticas (tumores benignos, tales como el mieloma múltiple o el tumor óseo de células gigantes (Croucher et al., 2001) o los sarcomas óseos (Dai et al., 2011)).

20 La osteoporosis postmenopáusica (también denominada OPM u osteoporosis de tipo I) se debe principalmente a la deficiencia de estrógenos.

25 La osteoporosis senil (también denominada osteoporosis de tipo II) se debe principalmente al envejecimiento esquelético y a la deficiencia de calcio.

30 La osteoporosis inducida por glucocorticoides es una forma de osteoporosis que está provocada por la ingestión de medicación glucocorticoidea, tal como la prednisona (deltasona, orasona, etc.), la prednisolona (prelona), la dexametasona (Decadron, Hexadrol) y la cortisona (acetato de cortona).

35 En un contexto inflamatorio, entre las enfermedades de la resorción ósea se incluyen todas las patologías artríticas, tales como la artritis reumatoide, las enfermedades óseas osteolíticas, las enfermedades periodontales y cualquier enfermedad cardiovascular en la que participe la ruta RANKL-RANK, tal como la aterosclerosis y las fracturas.

40 En el contexto oncológico, entre las enfermedades de la resorción ósea se incluyen:

- cánceres óseos primarios, tales como el osteosarcoma, el sarcoma de Ewing, el condrosarcoma y los cánceres óseos benignos tales como el mieloma múltiple o el tumor óseo de células gigantes (Dai et al., 2011; Croucher et al., 2001),
- cánceres primarios, en los que la ruta de señalización RANKL-RANK es un intensificador directo del crecimiento tumoral, tal como el cáncer de mama (Jones et al., 2006; Schramek et al., 2010; González-Suárez, 2010), el mieloma múltiple (Demchenko y Kuehl, 2010), el carcinoma, el neuroblastoma, el condroblastoma, el cáncer colorrectal, el cáncer renal, el cáncer esofágico, el cáncer hepático, el cáncer cervical y el cáncer de endometrio (Theoleyre et al., 2004; Santini et al., 2011),
- cánceres óseos secundarios también descritos como metástasis esqueléticas, tras un cáncer primario, incluyendo cáncer de próstata, cáncer de mama (Schramek et al., 2010; González-Suárez, 2010), cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer esofágico, cáncer de vejiga, cáncer hepático, cáncer cervical, cáncer de endometrio, cáncer de las glándulas salivales, cáncer escamoso y melanoma maligno (Smith, 2011; Santini et al., 2011).

55 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “cáncer óseo primario” se refiere a cualquier cáncer que se origina en un hueso. Entre los cánceres óseos primarios se incluyen, aunque sin limitación, el osteosarcoma (también denominado sarcoma osteogénico), el sarcoma de Ewing y el condrosarcoma.

60 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “cáncer óseo secundario” se refiere a cualquier metástasis esquelética tras un cáncer primario, incluyendo cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer esofágico, cáncer de vejiga, cáncer hepático, cáncer cervical, cáncer de endometrio, cáncer de las glándulas salivales, cáncer escamoso y melanoma maligno. El cáncer óseo secundario es el resultado de que las células de cáncer se extienden al hueso desde un tumor primario.

65 En particular, las enfermedades de la resorción ósea se seleccionan de entre el grupo que consiste en osteoporosis, enfermedad ósea osteolítica, cánceres óseos primarios, cánceres óseos secundarios, enfermedad periodontal y artritis reumatoide.

Más particularmente, las enfermedades óseas se seleccionan de entre el grupo que consiste en osteoporosis, cánceres óseos primarios, cánceres óseos secundarios y artritis reumatoide.

5 En particular, el polipéptido aislado según la invención consiste en una secuencia de hasta 19 aminoácidos, más particularmente de hasta 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 y todavía más particularmente hasta 9, 8, 7, 6 y 5 aminoácidos.

10 En particular, el polipéptido aislado según la invención consiste en una secuencia de hasta 20 aminoácidos y por lo menos 5 aminoácidos, más particularmente por lo menos 6 aminoácidos y todavía más particularmente de por lo menos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 aminoácidos.

15 En particular, el polipéptido aislado según la invención consiste en una secuencia de entre 5 y 20 aminoácidos, más particularmente de entre 5 y 19 aminoácidos y todavía más particularmente de entre 6 y 18, de entre 7 y 17, de entre 8 y 16, de entre 9 y 15, de entre 10 y 14 o de entre 11 y 13 aminoácidos.

20 En particular, el polipéptido aislado según la invención, más particularmente el polipéptido aislado que consiste en una secuencia que comprende o que consiste en una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 80% respecto a SEC ID nº 32, SEC ID nº 33 o SEC ID nº 1 en toda la longitud de SEC ID nº 32, SEC ID nº 33 o SEC ID nº 1, respectivamente, presenta la capacidad de inhibir la osteoclastogénesis inducida por RANKL.

25 La capacidad de un polipéptido de inhibir la osteoclastogénesis inducida por RANKL puede ser determinada por el experto en la materia mediante ensayos entre los que se incluyen la evaluación del efecto del polipéptido sobre la diferenciación de los osteoclastos, tal como se indica en los artículos de Baud'Huin et al., 2009, y Duplomb et al., 2008.

30 En particular, el polipéptido aislado según la invención consiste en una secuencia que comprende o que consiste en una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 80%, más particularmente de por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% y todavía más particularmente por lo menos 99% respecto a SEC ID nº 32, SEC ID nº 33 o SEC ID nº 1 en toda la longitud de SEC ID nº 32, SEC ID nº 33 o SEC ID nº 1, respectivamente.

35 En particular, el polipéptido aislado según la invención consiste en una secuencia que comprende o que consiste en una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 80%, más particularmente de por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% y todavía más particularmente por lo menos 99% respecto a SEC ID nº 1 en toda la longitud de SEC ID nº 1.

40 Los porcentajes de identidad a los que se hace referencia en la presentación de la presente invención se determinan basándose en una alineación global de las secuencias que deben compararse, es decir, basándose en la alineación de las secuencias en toda la longitud de las mismas, utilizando, por ejemplo, el algoritmo de Needleman y Wunsch, 1970. Esta comparación de secuencias puede llevarse a cabo, por ejemplo, utilizando el software Needle mediante la utilización de un parámetro "apertura de hueco" de 10,0, de "extensión de hueco" de 0,5 y una matriz "BLOSUM 62". El software, tal como Needle, se encuentra disponible en el sitio de internet ebi.ac.uk en todo el mundo, bajo el nombre "Needle".

45 En particular, el polipéptido aislado según la invención consiste en una secuencia que comprende o que consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- 50
- SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19, SEC ID nº 20, SEC ID nº 21, SEC ID nº 22, SEC ID nº 23, SEC ID nº 32 y SEC ID nº 33, más particularmente SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 9, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 16, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19, SEC ID nº 20, SEC ID nº 21, y SEC ID nº 23, todavía más particularmente SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 6, SEC ID nº 9, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 14, SEC ID nº 19, SEC ID nº 20 SEC ID nº 21 y SEC ID nº 23 todavía más particularmente SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 4, SEC ID nº 9, SEC ID nº 12 y SEC ID nº 20, todavía más particularmente SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 9 y SEC ID nº 20 y todavía más particularmente SEC ID nº 2.

55 En particular, el polipéptido aislado según la invención consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- 60
- SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8,

SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID Nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID Nº 19, SEC ID nº 20, SEC ID nº 21, SEC ID nº 22, SEC ID nº 23, SEC ID nº 32 y SEC ID nº 33, más particularmente SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 9, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 16, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19, SEC ID nº 20, SEC ID nº 21, y SEC ID nº 23, todavía más particularmente SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID Nº 4, SEC ID nº 6, SEC ID nº 9, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 14, SEC ID nº 19, SEC ID nº 20 SEC ID nº 21 y SEC ID nº 23 todavía más particularmente SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 4, SEC ID nº 9, SEC ID Nº 12 y SEC ID Nº 20, todavía más particularmente SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 9 y SEC ID Nº 20 y todavía más particularmente SEC ID nº 2.

En particular, el polipéptido aislado según la invención contiene por lo menos una modificación bioquímica seleccionada de entre el grupo que consiste en pegilación, acetilación, formilación, adición de ácido mirístico, palmitoilación, benciloxicarbonilación, amidación, succinilación, glucosilación, en particular pegilación.

En particular, el polipéptido aislado según la invención comprende por lo menos un grupo polietilenglicol, más particularmente por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9, por lo menos 10 grupos polietilenglicol, en una organización lineal, ramificada o más compleja.

La pegilación del polipéptido de la invención presenta la ventaja de que optimiza la solubilidad, biodisponibilidad y estabilidad del polipéptido y reduce la inmunogenicidad.

En particular, el polipéptido aislado según la invención comprende menos de 20 grupos polietilenglicol, más particularmente menos de 19, menos de 18, menos de 17, menos de 16, menos de 15, menos de 14, menos de 13, menos de 12 y todavía más particularmente menos de 11 grupos polietilenglicol.

En particular, el polipéptido aislado según la invención comprende 1 grupo polietilenglicol por cada aminoácido.

Dicho grupo polietileno puede unirse a cualquier aminoácido apropiado que resulte adecuado para la modificación del polipéptido de la invención. En particular, se une por lo menos un grupo polietilenglicol al aminoácido N-terminal o al extremo C-terminal de dicho polipéptido. Más particularmente, se une por lo menos un grupo polietilenglicol al aminoácido N-terminal de dicho polipéptido.

Particularmente, el polipéptido aislado según la invención comprende 5 o 8 grupos polietileno, en particular en una organización lineal, unidos al aminoácido N-terminal de dicho polipéptido.

La invención se refiere además a un polipéptido aislado según la invención tal como se ha indicado anteriormente. Las formas de realización ventajosas son las definidas anteriormente.

En particular, el polipéptido aislado según la invención consiste en la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID nº 2.

La presente invención comprende polipéptidos tal como se ha indicado anteriormente que presenta secuencias de aminoácidos modificadas. Entre las modificaciones pueden incluirse, aunque sin limitación, inserciones, deleciones, sustituciones, truncados, fusiones y ciclización de aminoácidos, formación de puentes disulfuro, sustitución de D-aminoácidos por L-aminoácidos o por beta-péptidos, modificaciones para mejorar el paso a través de la membrana celular (por ejemplo utilizando un péptido de señal o un fragmento del homeodominio Antennapaedia, Derossi et al., 1994; May et al., 2000), con la condición de que los polipéptidos conserven la capacidad de inhibir la osteoclastogénesis inducida por RANKL. Dichas modificaciones pueden realizarse para mejorar la semivida o actividad biológica del polipéptido.

Los polipéptidos según la invención pueden sintetizarse utilizando métodos convencionales, incluyendo la síntesis química y la síntesis utilizando moléculas de ácidos nucleicos codificantes de dichos polipéptidos.

La invención se refiere además a una molécula aislada de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido aislado según la invención.

En particular, la molécula de ácidos nucleicos según la invención puede unirse operativamente a un promotor de la ARN polimerasa dependiente de ADN eucariótico, preferentemente de la ARN polimerasa II. En el caso de que se utilicen promotores de la ARN polimerasa II específica de tejido, el polipéptido de la invención puede expresarse selectivamente en los tejidos/células diana.

Dicho promotor puede ser un promotor constitutivo o un promotor inducible bien conocido por el experto en la materia. El promotor puede estar regulado por el desarrollo, ser inducible o ser específico de tejido.

En particular, la molécula de ácidos nucleicos según la invención puede ligarse operativamente a una secuencia de señal extracelular. Dicha secuencia de señal extracelular puede codificar un péptido de señal que permite la secreción del polipéptido de la invención en el medio extracelular. Las secuencias de señal extracelulares son bien conocidas por el experto en la materia y pueden codificar, a título de ejemplo, un péptido de señal que presenta la secuencia siguiente: "MAPRARRRRPLFALLLLCALLARLQVALQ" (péptido de señal RANKh) (Petersen et al., 2011).

La invención se refiere además a un vector que comprende una molécula de ácidos nucleicos según la invención. Dicho vector puede resultar apropiado para la expresión semiestable o estable.

Particularmente, dicho vector según la invención es un vector de clonación o de expresión.

Los vectores pueden ser vectores víricos, tales como bacteriófagos o no víricos, tales como plásmidos.

La invención se refiere además a una célula hospedadora que comprende una molécula de ácidos nucleicos según la invención o un vector según la invención.

La célula hospedadora según la invención puede resultar útil para la producción de un polipéptido según la invención.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en un polipéptido aislado según la invención, una molécula de ácidos nucleicos aislada según la invención y un vector según la invención. Las formas de realización ventajosas son las definidas anteriormente.

Las expresiones "medicamento" y "composición farmacéutica" se utilizan intercambiamente y en su sentido más amplio en la presente memoria.

Dicho compuesto (en particular seleccionado de entre el grupo que consiste en un polipéptido aislado según la invención, una molécula de ácidos nucleicos aislada según la invención y un vector según la invención) puede encontrarse presente en la composición farmacéutica según la invención en una cantidad terapéuticamente eficaz (cantidad activa y no tóxica). Una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a aquella cantidad de compuesto que mejora los síntomas o la condición. La eficacia y toxicidad terapéuticas pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándares en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo la ED50 (la cantidad terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población). La proporción de cantidades con efecto tóxico y con efecto terapéutico es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción LD50/ED50. Las composiciones farmacéuticas que muestran grandes índices terapéuticos resultan preferidas.

Por ejemplo, el polipéptido según la invención, en particular el polipéptido que consiste en la secuencia indicada en SEC ID nº 2 puede administrarse en el paciente, en particular mediante inyección, en una cantidad comprendida en el intervalo de entre 0,1 y 100 mg/kg de peso corporal de dicho paciente diariamente, en particular dentro del intervalo de entre 0,5 y 50 mg/kg de peso corporal de dicho paciente diariamente y todavía más particularmente dentro del intervalo de entre 0,5 y 10 mg/kg de peso corporal de dicho paciente diariamente. Dichas dosis se ajustan para inducir una respuesta terapéutica aunque capaces de proteger frente a una potencial inmunogenicidad del péptido (Toes et al., 1998).

La composición farmacéutica según la invención puede administrarse mediante varias vías, incluyendo, aunque sin limitación, vías oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, entérica, tópica, sublingual o rectal.

Además de los ingredientes activos, la composición farmacéutica de la invención puede contener portadores farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y adyuvantes, que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden utilizarse farmacéuticamente. En particular, la composición farmacéutica según la invención se formula en un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por el experto en la materia. Puede encontrarse más información sobre técnicas para la formulación y administración en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

En particular, el portador farmacéuticamente aceptable es un biomaterial.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "biomaterial" se refiere a cualquier material que es biocompatible, en particular que ha sido diseñado para interactuar con sistemas biológicos.

El biomaterial presenta la ventaja de que puede determinar con precisión la zona de administración inicial del polipéptido de la invención, en particular el polipéptido que consiste en la secuencia indicada en SEC ID nº 2, con el fin de incrementar su eficacia y biodisponibilidad locales, de un modo controlada en el tiempo y/o por la dosis.

5 El biomaterial puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en cerámica fosfofáltica (por ejemplo hidroxiapatito (HAP) y fosfato beta-tricáltico), polímeros (por ejemplo copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico, hidrogeles), materiales de origen natural (por ejemplo celulosa y colágeno), particularmente cerámica fosfofáltica y todavía más particularmente, cerámica fosfofáltica que consiste en 40% de fosfato beta-tricáltico y 60% de hidroxiapatito.

10 Las cerámicas de hidroxiapatito HAP) y de fosfato tricáltico (en particular el fosfato beta-tricáltico) presentan la ventaja de ser bioresorbibles y osteoconductoras.

15 La composición farmacéutica adecuada para la administración parenteral puede formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como la solución de Hank, la solución de Ringer o la solución salina fisiológicamente tamponada. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que incrementen la viscosidad de la suspensión, tales como la carboximetilcelulosa sódica, el sorbitol y el dextrano. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse en forma de suspensiones para inyección aceitosas apropiadas. Entre los solventes o vehículos lipofílicos adecuados se incluyen los aceites grasos, tales como el aceite de sésamo o los ésteres de ácido graso sintéticos, tales como el oleato de etilo o los triglicéridos, o los liposomas. También pueden utilizarse polímeros amino policatiónicos no lipídicos para la administración. Opcionalmente, la suspensión puede contener además estabilizadores o agentes adecuados que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

20 La invención se refiere además a un polipéptido aislado según la invención para la utilización en un método para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad de la resorción ósea que comprende la etapa de administrar en un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en un polipéptido aislado según la invención, una molécula aislada de ácidos nucleicos según la invención y un vector según la invención. Las formas de realización ventajosas son las definidas anteriormente.

25 La presente exposición describe además un método para inhibir la osteoclastogénesis que comprende la etapa de administrar en un paciente que lo requiere, en particular en un paciente que presenta una enfermedad ósea y más particularmente en un paciente que presenta una enfermedad de la resorción ósea, una cantidad terapéuticamente eficaz de por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en un polipéptido aislado según la invención, una molécula aislada de ácidos nucleicos según la invención y un vector según la invención. Las formas de realización ventajosas son las definidas anteriormente.

30 La invención se refiere además a un polipéptido aislado según la invención para la utilización como medicamento. Las formas de realización ventajosas son las definidas anteriormente.

35 La invención se refiere además a una molécula aislada de ácidos nucleicos según la invención para la utilización como medicamento. Las formas de realización ventajosas son las definidas anteriormente.

40 La invención se refiere además a un vector según la invención para la utilización como medicamento. Las formas de realización ventajosas son las definidas anteriormente.

45 La invención se refiere además a la utilización de un polipéptido aislado según la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad ósea, en particular una enfermedad de la resorción ósea. Las formas de realización ventajosas son las definidas anteriormente.

50 La invención se refiere además a la utilización de una molécula aislada de ácidos nucleicos según la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad ósea, en particular una enfermedad de la resorción ósea. Las formas de realización ventajosas son las definidas anteriormente.

55 La invención se refiere además a la utilización de un vector según la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad ósea, en particular una enfermedad de la resorción ósea. Las formas de realización ventajosas son las definidas anteriormente.

La invención se refiere además a un producto de combinación que comprende:

60 - por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en un polipéptido aislado según la invención, una molécula aislada de ácidos nucleicos según la invención y un vector según la invención, y

65 - otro agente antirresorción ósea,  
para la utilización simultánea, separada o secuencial como medicamento.

Las formas de realización ventajosas son las definidas anteriormente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “agente antirresorción ósea” se refiere a cualquier agente capaz de inhibir la resorción ósea.

En particular, dicho otro agente antirresorción ósea se selecciona de entre el grupo que consiste en:

- intensificadores del anabolismo, en particular seleccionados de entre el grupo que consiste en hormona paratiroidea, BMP2, vitamina D, prostaglandina E2, agentes antiinflamatorios, e
- inhibidores del catabolismo, en particular seleccionados de entre el grupo que consiste en bisfosfonatos, inhibidores de la catepsina K, inhibidores de p38, inhibidores de JNK, inhibidores de IKK, inhibidores de NF-κB, inhibidores de calcineurina, inhibidor de NFAT e inhibidor de PI3K (Tanaka et al., 2005).

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “inhibidores de catabolismo” se refiere a cualquier agente capaz de proteger frente a la destrucción ósea (Xu et al., 2010).

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “intensificadores del anabolismo” se refiere a cualquier agente capaz de restaurar la densidad mineral ósea normal (Boyce et al., 2006).

La invención se refiere además a un producto de combinación que comprende:

- por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en un polipéptido aislado según la invención, una molécula aislada de ácidos nucleicos según la invención y un vector según la invención, y
- un agente antitumoral,

para la utilización simultánea, separada o secuencial como medicamento.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “agente antitumoral” se refiere a cualquier agente capaz de prevenir y/o tratar un cáncer, solo o en combinación con otro agente.

En particular, dicho agente antitumoral es capaz de prevenir y/o tratar un cáncer óseo primario y/o un cáncer óseo secundario.

En particular, dicho agente antitumoral puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en:

- actinomicina D, bleomicina, cisplatino, ciclofosfamida, dactinomicina, doxorubicina, etopósido, gemcitabina, ifosfamida, metotrexato (y dosis alta de metotrexato con leucovorina calcio de rescate), paclitaxel, vincristina (Dai et al., 2011; Wittig et al., 2002).

La invención se refiere además a un producto de combinación según la invención, para la utilización del mismo en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad de la resorción ósea, en particular una enfermedad de la resorción ósea seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- osteoporosis, enfermedad ósea osteolítica, cánceres óseos primarios, cánceres óseos secundarios, enfermedad periodontal y artritis reumatoide.

Las formas de realización ventajosas son las definidas anteriormente.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 (A-C) representa el desarrollo de polipéptidos pequeños que inhiben la actividad de RANK/RANKL. (A) Estructura tridimensional del dímero RANK-RANKL y zona principal de la interacción de polipéptidos del modelado molecular. (B) Efecto del polipéptido inhibidor con diana en RANK sobre la diferenciación de los osteoclastos. Los monocitos CD14+ se trataron con M-SCF (25 ng/ml) y RANKL humano (100 ng/ml) en presencia o en ausencia de cada polipéptido (50 μM). Al formarse los osteoclastos, las células se fijaron y se tiñeron para TRAP, y se contaron las células multinucleadas (CMN) TRAP+. Los resultados se expresan como porcentaje de las células TRAP+ en cultivos sin el polipéptido correspondiente. Los polipéptidos con diana en RANKL WP9QY y OP3-4, así como el receptor señuelo OPG de RANKL (50 ng/ml), se utilizaron como controles positivos. Los resultados se expresan como medias ± SD de tres experimentos realizados por triplicado. \*P<0,005 y #P<0,05. (C) La afinidad del polipéptido de unión a RANK (en la presente memoria, Pep1 (SEC ID nº 31)) se midió mediante análisis de resonancia del plasmón superficial (Biacore). El sensograma muestra la respuesta relativa en unidades de resonancia tras restar el fondo frente al tiempo en segundos. La unión de Pep1 a RANKh se muestra a las concentraciones indicadas en el gráfico. Pep1 se une a RANK con una  $K_d$  de 20,6 μM ( $k_{on}=1,35 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{off}=2,78 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ).

La figura 2 (A-C) muestra la inhibición de la osteoclastogénesis inducida por RANKL in vitro por Pep 8 (SEC ID nº 2).

(A) Se cultivaron monocitos humanos con M-CSF y RANKL humana en presencia o en ausencia de concentraciones crecientes de Pep8, tal como se indica. Se utilizó OPG (50 ng/ml) como inhibidor de referencia. Pep8 inhibió de manera dependiente de la dosis la formación de osteoclastos en células CD14<sup>+</sup> y CD11b<sup>+</sup>. Los resultados se expresan como medias  $\pm$  SD de por lo menos dos experimentos independientes realizados por triplicado frente a 5 tratadas con RANKL y M-CSF en ausencia de Pep8 (RANKL). \*P<0,05. (B) Imágenes microscópicas representativas de células TRAP<sup>+</sup> a diferentes concentraciones de Pep8. (C) Análisis de RT-PCR cuantitativa en tiempo real para la expresión relativa de genes específicos de osteoclastos, catepsina K, TRAP y factor nuclear de células T activadas c1 (NFATc1) demostró que Pep8 inhibía la expresión de ARNm de catepsina K, TRAP y NFATc1. Las células CD14<sup>+</sup> se trataron con M-CSF y sRANKL durante 24 h en presencia o en ausencia de Pep8 (50  $\mu$ M). Los niveles de los 10 marcadores se normalizaron respecto a la beta-2-microglobulina (B2M). El nivel de expresión de las células no diferenciadas (control) se fijó en 1. Se llevaron a cabo por lo menos tres experimentos independientes por cada marcador. La tabla muestra los resultados de un experimento representativo.

La figura 3 (A-C) muestra la inhibición con Pep8 de la señalización inducida por RANKL. (A) La inhibición de la 15 activación de Akt, p38 y ERK por Pep8 (50  $\mu$ M) se evaluó como inhibición de la fosforilación (p) en células RAW264.7 utilizando el análisis de transferencia western con anticuerpos contra fosfo-Akt, fosfo-p38 y fosfo-ERK. Se despojaron las inmunotransferencias y después se resondearon con anticuerpos contra Akt, p38 y ERK. La  $\beta$ -actina sirvió como control de carga. (B) Análisis de transferencia western de la distribución de NF- $\kappa$ B en presencia o en ausencia de Pep8 50  $\mu$ M. Tras el tratamiento con el polipéptido, las células RAW264.7 se fraccionaron en 20 porciones nuclear y citoplasmática. Las proteínas nucleares (45  $\mu$ g) se analizaron con anticuerpos anti-NF- $\kappa$ B p105, p50 y p65, mientras que las proteínas citoplasmáticas (30  $\mu$ g) se analizaron con anti-I $\kappa$ B $\alpha$ . Para la ruta de NF- $\kappa$ B no canónica, se analizó la expresión de RelB en ambas fracciones. La  $\beta$ -actina, HDAC1 e histona H3 sirvieron de controles de carga para las fracciones citoplasmática y nuclear, respectivamente. Se muestra un experimento representativo; el tiempo tras la estimulación con RANKL se indica entre paréntesis. (C) Estudio de semivida de 25 receptores. Se preincubaron células HEK-RANK durante 2 horas con 4  $\mu$ g/ml de cicloheximida (CHX) antes del tratamiento con RANKL (100 ng/ml) o Pep8 (200  $\mu$ M) durante los tiempos indicados. Se determinó la expresión de RANK con anti-RANK/TNFRSF11A.

La figura 4(A-B) muestra la inhibición con Pep8 de la pérdida ósea inducida por ovariectomía. El efecto de Pep8 30 sobre la densidad ósea in vivo se determinó en ratones ovariectomizados. Se sometieron a ovariectomía ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad y se trataron durante 35 días con 10 mg/kg/día de Pep8 o vehículo. Los ratones no ovariectomizados tratados con el vehículo se incluyeron como controles sanos. Se examinó la estructura 3-dimensional del hueso trabecular en tibias (A) y 4a vértebras lumbares (B) mediante tomografía microcomputerizada ( $\mu$ CT), tal como se indica en la sección de métodos. La cantidad de hueso trabecular en ratones 35 OVX era marcadamente inferior a la cantidad de hueso trabecular en los controles sanos (NOV). El tratamiento con Pep8 (10 mg/kg) evitó la pérdida de hueso trabecular. El análisis histomorfométrico muestra un incremento significativo de la proporción de volumen óseo (VO)/volumen de tejido (VT), grosor trabecular (GTb), número trabecular (NTb) y una reducción del espaciado trabecular (ETb) en ratones tratados con Pep8. Los valores son medias  $\pm$  SEM. <sup>a</sup>P<0,005 y <sup>b</sup>P<0,05 vs. OVX; <sup>c</sup>P<0,005 y <sup>d</sup>P<0,05 vs. NOV.

La figura 5 (A-C) ilustra la caracterización de los residuos de unión principales y la actividad inhibidora de una serie 40 de polipéptidos de la invención sobre la osteoclastogénesis. (A) Diferencia de transferencia de saturación (DTS) de Pep8 de unión a RANK. El motivo central, Leu-Lys-Leu-Cys-Ser (L<sub>3</sub>K<sub>4</sub>L<sub>5</sub>C<sub>6</sub>S<sub>7</sub>) recibe la parte más importante de la transferencia, lo que concuerda con la zona de unión predicha que define el modelado molecular. Debido a limitaciones experimentales, los aminoácidos N<sub>1</sub> (Asp) y V<sub>2</sub> (Val) no se observan en el experimento. Se detectan 45 ambos grupos NH del aminoácido N<sub>1</sub>, pero muestran transferencias de saturación inferiores que NH de G<sub>8</sub> (Gly) y E<sub>9</sub> (Glu). (B) Conformación tridimensional de Pep8 unido a RANK del modelado molecular. (C) Actividad de inhibición de una serie de polipéptidos de la invención (serie 800) sobre la osteoclastogénesis. Los polipéptidos son derivados de Pep8, que fueron generados basándose en los resultados del modelado molecular de las afinidades de unión 50 específicas de los aminoácidos clave para RANK.

La figura 6 representa la evaluación histomorfológica de la toxicidad orgánica tras el tratamiento con Pep8 durante 5 55 semanas. No se observó ninguna diferencia histomorfológica en comparación con los grupos de control.

La figura 7 (A-B) muestra la inhibición de la pérdida ósea inducida por ovariectomía por Pep8 pegilado 60 (Pep8-NPEG5, NPEG5) en comparación el péptido no pegilado. Se trataron ratones C57BL/6 ovariectomizados con dosis diarias de 10 mg/kg o 2,5 mg/kg de Pep8-NPEG5 o con 10 mg/kg de Pep8 no pegilado durante 35 días y se evaluó la densidad ósea tal como se ha indicado anteriormente. (A) Imágenes representativas de T $\mu$ C transversal tridimensional de la región proximal de tibias de ratones tratados con Pep8-NPEG5 (10 mg/kg/d, n=8 o 2,5 mg/kg/d, n=8), Pep8 (10 mg/kg/d, n=7) o vehículo (OVX, n=8). Algunos ratones simuladamente operados (n=5) sirvieron de 65 controles sanos. (B) El análisis histomorfométrico de tibias mostró un incremento significativo de la proporción de volumen óseo/volumen de tejido (VO/VT), grosor trabecular (GTb) y número trabecular (NTb), así como una reducción del espaciado trabecular (ETb) en ratones tratados con Pep8-NPEG5 o Pep8 no pegilados a una dosis de 10 mg/kg en comparación con ratones tratados con vehículo. El tratamiento de los ratones con Pep8-NPEG5 a una dosis menor (2,5 mg/kg) resultó prácticamente igual de eficaz, incrementando significativamente VO/VT y NTb, así como reduciendo el ETb en las tibias. Los valores son de medias  $\pm$  SEM; \*\* P<0,01; \* P<0,05.

La figura 8 (A-B) muestra la inhibición de la pérdida ósea inducida por ovariectomía por Pep8 pegilado (Pep8-NPEG8, NPEG8) en comparación con el péptido no pegilado. Se trataron ratones C57BL/6 ovariectomizados con dosis diarias de 10 mg/kg o 2,5 mg/kg de Pep8-NPEG8 o con Pep8 no pegilado a una dosis inferior de 2,5 mg/kg durante 35 días y se evaluó la densidad ósea tal como se ha indicado anteriormente. (A) Imágenes representativas de  $\mu$ C transversal tridimensional de la región proximal de tibias de ratones tratados con Pep8-NPEG8 (10 mg/kg/d, n=8 o 2,5 mg/kg/d, n=8), Pep8 (2,5 mg/kg/d, n=8) o vehículo (OVX, n=8). Algunos ratones simuladamente operados (n=8) sirvieron de controles sanos. (B) El análisis histomorfométrico de las tibias mostró un incremento significativo de la proporción de volumen óseo/volumen de tejido (VO/VT) y del grosor trabecular (GTb) en los grupos tratados con Pep8-NPEG8 a ambas dosis en comparación con los ratones tratados con vehículo, mientras que Pep8 a una dosis menor, de 2,5 mg/kg, resultó menos eficiente. Los valores son de medias  $\pm$  SEM; \*\* P<0,01.

La figura 9 muestra resultados representativos de anclaje de derivados de Pep8 unidos a RANK. Se muestra RANK como un volumen blando coloreado según las cargas de aminoácido interpoladas (en la figura original: rojo: negativo, azul: positivo, blanco: neutro). En la figura original las sustituciones de aminoácidos se muestran en amarillo y se muestran utilizando la representación CPK. En la figura original: E126 es rojo, R129 y K97 son azules, V2 y N9 son naranjas, L3 es verde pálido, K4 es verde, L5 es azul pálido, E1 es rosa, S7 es violeta pálido y C6 es violeta. Fila superior: se presenta la orientación y secuencia de Pep8 a modo de referencia con los volúmenes coloreados según los aminoácidos en la figura original; los aminoácidos principales de RANK que definen el surco de unión se señalan mediante flechas. La flecha grande representa la orientación peptídica en RANK. El aminoácido K4 se encuentra situado hacia RANK-E<sub>126</sub> en lugar de adoptar la orientación cabeza-a-cola con RANK-K<sub>97</sub> en el caso de que únicamente el motivo nuclear L<sub>3</sub>-K<sub>4</sub>-L<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>-S<sub>7</sub> se encuentre presente (Pep822). La orientación del péptido es inversa si los aminoácidos en la posición 1 y 9 son intercambiados (Pep813). Segunda fila: en el caso de que la longitud del péptido se incremente en posición N-terminal (Pep811) o C-terminal (Pep814, Pep805), el péptido resultante adopta una conformación más estirada, desplazando K4 de su posición óptima. Tercera fila: la modificación del estado conformacional de L<sub>3</sub> (Pep809) o el incremento del bloqueo posicional de C<sub>7</sub> o L<sub>5</sub> (Pep810 y 808) resulta en un desplazamiento del extremo N-terminal del péptido. La reducción adicional de la entropía del péptido C-terminal inducida por dichos cambios resulta compensada por la pérdida de unión en el extremo N-terminal, aunque se mantiene la orientación de K<sub>4</sub>. Fila inferior: la sustitución de K<sub>4</sub> puede compensarse con patrones de unión alternativos en los que las posiciones aminoácidas se encuentran desplazadas (Pep817), mediante la interrupción de la unión R<sub>129</sub>/R<sub>130</sub> con N<sub>1</sub> (Pep818) o conformaciones de unión alternativas (Pep820) similares a las observadas con Pep822.

La figura 10 muestra los resultados de anclaje de Pep8 sobre diversos elementos de FNT-R. Un árbol filogenético producido con Seaview (Galtier et al., 1996) muestra la proximidad relativa de RANK a otros elementos de la familia de FNT-R (parte superior izquierda). Se muestran imágenes de los elementos de FNT-R de estructuras experimentales (Liu et al., 2010; Banner et al., 1993; Mukai et al., 2010; Compaan et al., 2005; Zhan et al., 2011; Cha et al., 2000; Kuester et al., 2011; An et al., 2011; Compaan et al., 2006) y la estructura del modelo DR4 (nombre en gris) derivada de la estructura cristalográfica de DR5 (Picarda et al., 2012) acomplejada con Pep8. En la figura original: E9, G8 y S7 se muestran en violeta pálido, C6 se muestra en violeta, L5 se muestra en azul pálido, L3 se muestra en verde pálido, V2 se muestra en naranja, E126 de RANK, E109 de RFNT1, Q109 de RFNT2, D117 de OX40, E83 de DR4, E98 de DR5, N141 de DR6, E117 de CD40, E97 de DcR3 y D95 de HVEM se muestran en rojo. Al contrario que para RANK, no pudo definirse ninguna cavidad de unión extendida en otros elementos R-FNT. El equivalente aminoácido de RANK-E<sub>126</sub> (representación CPK en rojo en la figura original: E109 de RFNT1, Q109 de RFNT2, D117 de OX40, E83 de DR4, E98 de DR5, N141 de DR6, E117 de CD40, E97 de DcR3 y D95 de HVEM) se identificaron manualmente a partir de la estructura cristalina del complejo de receptor/ligando de FNT correspondiente. DR6 no presentaba ningún ligando unido y mostraba una conformación abierta, sin ningún surco de unión potencial para el péptido. Los experimentos de anclaje sugieren que ninguna conformación de Pep8 es capaz de envolverse correctamente en torno al aminoácido diana para bloquear la unión de ligandos. Únicamente algunos residuos de Pep8 son capaces de unirse no específicamente a un receptor. El motivo nuclear L<sub>3</sub>-K<sub>4</sub>-L<sub>5</sub>-C<sub>6</sub>-S<sub>7</sub>, responsable de la especificidad de RANK, con frecuencia se encuentra expuesto al solvente o participa en interacciones peptídicas internas y no en interacciones con la proteína.

La presente invención se explica en detalle mediante ejemplos en el texto a continuación, aunque el alcance técnico de la presente invención no se encuentra limitado a dichos ejemplos.

## Ejemplos

### I. Material y métodos

#### I.1 Generación de una gran colección de polipéptidos

Se generó una base de datos amplia de polipéptidos filtrados para solubilidad acuosa utilizando herramientas bioinformáticas del propio laboratorio. Brevemente, se generaron *in silico* secuencias de aminoácidos aleatorias de la longitud deseada (7 a 13 aminoácidos) y las secuencias polipeptídicas resultantes se filtraron según una

combinación de filtros bioquímicos y relacionados con la secuencia para garantizar que la mayoría de los polipéptidos resultantes eran solubles *in vitro* e *in vivo* en los solventes más comunes (H<sub>2</sub>O, PBS, DMSO/H<sub>2</sub>O). La colección resultante se procesó para proporcionar las coordenadas tridimensionales del polipéptido. Cada polipéptido se tipificó adicionalmente con un campo de fuerzas CHARMM (Brooks et al., 1983) para que resultase adecuado para el análisis adicional en Discovery Studio 2.5.5 (Accelrys Software Inc., San Diego, CA, USA).

## 1.2 Experimentos de anclaje y afinación de "poses" de anclaje

La estructura cristalina de la RANK-RANKL humana (PDB id: 3ME2; Liu et al., 2010) se utilizó como referencia para definir los sitios de unión putativos en el sitio de interacción RANK-RANKL. La unión de RANKL indujo un cambio de 36° de los dos dominios ricos en cisteína (DRC) en la parte N-terminal de RANK (Liu et al., 2010). Los inventores definieron la región bisagra entre los dos primeros y los dos últimos DRC en RANK como el bolsillo de unión más favorable para los estudios de anclaje ya que contienen contactos críticos para la unión de RANKL (Ta et al., 2010). Se llevaron a cabo experimentos de anclaje utilizando el módulo CDOCKER (Wu et al., 2003) de Discovery Studio 2.5.5. Se inspeccionaron visualmente las poses principales y las más prometedoras se afinaron para una mejor caracterización de las interacciones RANK-polipéptido más favorables.

## 1.3 Ensayos de unión de resonancia del plasmón superficial

Se llevaron a cabo experimentos de biosensor en un instrumento BIAcore 3000 (BIAcore) tal como se ha publicado anteriormente (Baud'Huin et al., 2009). Se inmovilizó covalentemente RANKL purificado recombinante (2 µg/ml en maleato 5 mM, pH 5,75) o RANK-Fc sin portador (5 µg/ml en tampón de acetato sódico, pH 5,0) a la matriz de dextrano de un chip sensor CM5 (BIAcore) a un caudal de 5 µl/min. Se obtuvieron niveles de inmovilización comprendidos entre 400 y 3.000 unidades de respuesta (UR) para RANKL o de 5.000 UR para RANK. Los ensayos de unión se llevaron a cabo a 25°C en tampón Hepes 10 mM, pH 7,4. La etapa de asociación fue de 180 segundos, seguida de una etapa de disociación en el mismo tampón. Los estudios de unión de los polipéptidos a RANK o RANKL se llevaron a cabo utilizando cinética de ciclo único, partiendo de 100 µM del polipéptido de interés seguido de diluciones en serie de 2 veces (comprendidas entre 100 y 0,78 µM). Se ajustaron los sensogramas para calcular las constantes de equilibrio de disociación utilizando el modelo 1:1 de Langmuir con el software BiaEval 4.1 (BIAcore). Se obtuvieron RANK-Fc CF, RANKL y OPG sin portador de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

## 1.4 Espectroscopía de RMN

Se llevaron a cabo experimentos de RMN a 500,13 MHz para <sup>1</sup>H en un espectrómetro Bruker AVANCE 500 con una estación de trabajo PC Linux utilizando tubos estándares de 5 mm o Shigemi de 3 mm con susceptibilidad correspondiente a tubos de muestra con solvente <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O/agua. Los espectros del polipéptido Pep8 a concentraciones de muestra de 0,1, 0,2, 0,4 o 1 mM se registraron en tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 7,4, se prepararon en 95% de H<sub>2</sub>O y 5% de <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O. Se registraron los espectros bidimensionales de RMN en el modo sensible a fase utilizando el método States-TPPI (States et al., 1982). Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando la secuencia de pulsos WATERGATE para la supresión de la señal del agua (Piotto et al., 1992) o utilizando la supresión de la señal del agua "excitation sculpting" (Hwang et al., 1995) para eliminar la señal del solvente en solución de H<sub>2</sub>O/<sup>2</sup>H<sub>2</sub>O 95:5. Se registraron los espectros bidimensionales de COSY, TOCSY y NOESY a 280 K. Se registraron los espectros de TOCSY utilizando una secuencia spin-lock MLEV-17 (Bax et al., 1985) con un tiempo de mezcla (τ<sub>m</sub>) de entre 35 y 70 ms, respectivamente. Se registraron experimentos de NOESY 2D con un tiempo de mezcla (τ<sub>m</sub>) de 100, 200 o 500 ms. Se registraron los espectros heteronucleares HSQC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C a 280 K bajo las mismas condiciones. Para los experimentos de RMN con Fc receptor de RANK soluble (R&D Systems), la proporción de ligando a proteína se encontraba comprendida entre 100:1 y 1000:1 (Pep8 0,1 a 1 mM, proteína Fc receptora de RANK 1 µM). Las asignaciones de desplazamiento químico se refieren a la referencia interna de ácido 3-(trimetilsilil)propiónico-2,2,3,3-d<sub>4</sub>, sal sódica (TSP-d<sub>4</sub>). Se registraron los espectros de efecto Overhauser nuclear transferido (TRNOESY) de Pep8 con proteína Fc receptora de RANK utilizando un tiempo de mezcla (τ<sub>m</sub>) de 100, 200 o 500 ms.

Los espectros de RMN DTS de <sup>1</sup>D <sup>1</sup>H de las mezclas de polipéptidos-proteínas se registraron a 500 MHz con 4.000 escaneos y saturación selectiva de las resonancias de las proteínas tal como se ha descrito anteriormente (Pons et al., 2011). La transferencia de saturación presenta una tendencia a reducirse debido a la baja eficiencia del efecto de difusión de espín en las proteínas de bajo peso molecular (48 kDa). Con el fin de conseguir una mejor eficiencia de transferencia de saturación, también se llevaron a cabo experimentos limpios de RMN-DTS (Xia et al., 2010) con valores de frecuencia de irradiación de RF a 0,4/10,1/60 ppm (f<sub>on1</sub>/f<sub>on2</sub>/f<sub>off</sub>). La altura de los pulsos de forma gaussiana se fijó en 200 Hz y las resonancias de ligandos próximos eran >500 Hz. El incremento de la sensibilidad en experimentos de DTS pudo conseguirse mediante pulso selectivo de excitación optimizada de 90° de tipo E-Burp-1 o mediante pulso selectivo con modulación coseno de 90° de tipo E-Burp-1 (Cutting et al., 2007). Resulta interesante que la combinación de la RMN-DTS limpia con pulsos selectivos con modulación coseno de 90° de tipo E-Burp-1 proporciona una mejor proporción de señal a ruido. Los valores de DTS relativos observados eran similares al experimento de RMN-DTS clásico.

La resta de los valores de FID con saturación de proteína resonante y fuera de resonancia se llevó a cabo mediante

ciclado de fases. Los valores de DTS relativos se calcularon dividiendo las intensidades de la señal de DTS por las intensidades de las señales correspondientes en un espectro de referencia de RMN-<sup>1</sup>H unidimensional de la misma muestra registrado con condiciones de parámetro similares.

## 5 I.5 Polipéptidos y reactivos

10 Todos los polipéptidos y polipéptidos pegilados (las pegilaciones se llevaron a cabo con dos longitudes de cadena lineal diferentes, (PEG)<sub>5</sub> y (PEG)<sub>6</sub>) administradas con una pureza >95% (HPLC) se obtuvieron de GeneCust EUROPE (Dudelange, Luxemburgo). Los polipéptidos se almacenaron a -20°C hasta la utilización. Para los experimentos in vitro, se prepararon soluciones madre 1 mM en solución salina tamponada con fosfato (PBS) o medio de cultivo celular y se almacenaron a -20°C durante hasta dos semanas. Para los polipéptidos hidrofóbicos, se prepararon soluciones madre que contenían 1% a 5% de DMSO (v/v). Para los experimentos in vivo con polipéptido Pep8 (Pep8), se preparó fresca una solución 2,5 mg/ml en PBS y se esterilizó mediante filtración antes de la utilización.

15

## I.6 Ensayos de diferenciación de osteoclastos

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) mediante centrifugación en un gradiente Ficoll (Sigma, Saint Quentin Fallavier, Francia). Las células CD14<sup>+</sup> se marcaron magnéticamente con microperlas CD14 y se seleccionaron positivamente mediante tecnología MACS (Miltenyi Biotec, Paris, Francia) tal como se ha descrito previamente (Duplomb et al., 2008). Los monocitos CD11b<sup>+</sup> se purificaron a partir de células de médula ósea murina obtenidas mediante enjuague de la médula ósea de fémures y tibias de ratones C57BL6 macho de 4 semanas de edad utilizando microperlas MACS (Baud'huin et al., 2010). La pureza de las preparaciones celulares era de aproximadamente 96% según el control mediante citometría de flujo. La generación de osteoclastos de monocitos CD14<sup>+</sup> humanos y CD11b<sup>+</sup> murinos se llevó a cabo tal como se ha descrito previamente (Duplomb et al., 2008; Baud'huin et al., 2010). Brevemente, se cultivaron células purificadas en medio  $\alpha$  esencial mínimo ( $\alpha$ -MEM, Gibco/Invitrogen, USA) con suero de feto bovino al 10% y 25 ng/ml de factor estimulante de colonias de macrófagos humano/murino (M-CSF, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido). Tras 3 días de cultivo, se sustituyó el medio celular por medio fresco que contenía M-CSF y RANKL humana recombinante (100 ng/ml, R&D Systems) complementado con o sin un polipéptido de interés (0,5 a 100  $\mu$ M) o 50 ng/ml de OPG humana (R&D Systems) utilizado como inhibidor de referencia. Se renovaron las citoquinas, receptor y polipéptidos solubles cada 3 días hasta la formación de osteoclastos multinucleados. Tras 12 días de cultivo de células CD14<sup>+</sup> y 15 días para células CD11b<sup>+</sup>, se visualizaron los osteoclastos mediante tinción TRAP (Sigma, Francia) y las células formadas con tres o más núcleos se contaron manualmente y se analizaron estadísticamente.

35

## I.7 Aislamiento de ARN y PCR en tiempo real

El ARN total de las células CD14<sup>+</sup> tratadas con Pep8 (25 o 50  $\mu$ M) en presencia o en ausencia de RANKL (100 ng/ml) se extrajo utilizando el kit Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células no tratadas que se habían cultivado con o sin RANKL sirvieron de controles. Se sintetizó ADNc de primera cadena a partir de 5  $\mu$ g de ARN CD14<sup>+</sup> total con RT ThermoScript<sup>TM</sup> (Invitrogen, Saint Aubin, Francia) y cebadores oligo(dT), según recomendaciones del fabricante. Se llevó a cabo una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) en un sistema Chromo4 TM (Biorad, Marnes-la-Coquette, Francia) con una mezcla de reacción que contenía 15 a 40 ng de ARN total transcrito inversamente, 300 nM de cebadores y 2x tampón verde SYBR (Biorad). El análisis se llevó a cabo según el método descrito por Vandesompele et al. (Vandesompele et al., 2002) utilizando GAPDH, B2M y  $\beta$ -actina (ACTB) como controles invariantes. Se utilizaron los cebadores específicos de gen siguientes, diseñados con el software Primer 0.5 (Whitehead Institute for Biomedical Research): cathepsina K (dir.) 5'-CCC AGA CTC CAT CGA CTA TCG-3', (inv.) 5'-CTG TAC CCT CTG CAC TTA GCT GCC-3'; TRAP (dir.) 5'-AAG ACT CAC TGG GTG GCT TTG-3', (inv.) 5'-GGC AGT CAT GGG AGT TCA GG-3'; NFATc1 (dir.) 5'-GGT CTT CGG GAG AGG AGA AA-3', (inv.) 5'-TGA CGT TGG AGG ATG CAT AG-3'; GAPDH (dir.) 5'-TGG GTG TGA ACC ATG AGA AGT ATG-3', (inv.) 5'-GGT GCA GGA GGC ATT GCT-3'; B2M (dir.) 5'-TTC TGG CCT GGA GGC TAT C-3', (inv.) 5'-TCA GGA AAT TTG ACT TTC CAT TC-3'; ACTB (dir.) 5'-CCA ACC GCG AGA AGA TGA-3', (inv.) 5'-CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG-3'. Las condiciones de la PCR eran las siguientes: preincubación de 30 s a 98°C seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C y 30 s a 60°C (CathK, NFATc1, GAPDH, B2M, ACTB) o 30 s a 60°C seguido de 30 s a 79°C (TRAP). Los productos de reacción se caracterizaron mediante determinación del punto de fusión (55°C a 95°C con 0,5°C/s).

55

## I.8 Análisis de transferencia western

60 Se cultivaron células RAW264.7 en medio completo y se sometieron a ayuno durante 2 horas antes del tratamiento con Pep8 (50  $\mu$ M) en presencia o en ausencia de RANKL (100 ng/ml). Tras el tratamiento durante 5, 10, 15, 30 o 60 minutos a 37°C, se obtuvieron lisados celulares totales y se determinaron las concentraciones de proteína tal como se ha descrito anteriormente (Duplomb et al., 2008). Para el análisis de ruta de NF- $\kappa$ B, se obtuvieron fracciones separadas de proteínas citoplasmáticas y nucleares utilizando el kit de extracción nuclear y citoplasmática NE-PER (Thermo Scientific, Reino Unido). Las proteínas (40  $\mu$ g) se hicieron migrar en un SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas Immobilon-P (Millipore, Billerica, MA, USA) que seguidamente se incubaron con

65

anticuerpos contra Akt, fosfo-Akt, ERK 1/2, fosfo-ERK 1/2, p38, fosfo-p38, I $\kappa$ B $\alpha$ , p105, p65, p50 y RelB (Cell Signalling, Danvers, MA, USA). Las proteínas marcadas se detectaron utilizando el reactivo ECL (Pierce, Rockford, IL, USA). Se utilizó  $\beta$ -actina (extracto de células totales o fracción citoplasmática), histona H3 y HDAC (fracción nuclear) como proteínas de mantenimiento celular (Cell Signalling).

### I.9 Líneas y construcciones celulares

Se cultivaron células RAW264.7 murinas (ATCC) en  $\alpha$ MEM (Invitrogen) complementadas con FBS al 10% (Hyclone). Las células 293 renales embrionarias humanas (ATCC) se transdujeron establemente con un clon listo para la expresión (Ex-O0007-Lv105, clon de expresión OmicsLink<sup>TM</sup>, GeneCopoeia<sup>TM</sup>) que contenía el ADNc del ORF de RANK/RFNSTF11A. Las células HEK-RANK se mantuvieron en DMEM (Lonza), FBS al 10% y 1  $\mu$ g/ml de puromicina.

### I.10 Modelo murino de osteoporosis

Se obtuvieron ratones C57BL6 hembra de ocho semanas de edad ovariectomizados (OVX) y no ovariectomizados de control de Janvier (Le Genest Saint Isle, Francia). Los ratones se alojaron bajo condiciones libres de patógenos en la Unidad de terapias experimentales (Facultad de Medicina, Universidad de Nantes, Francia) y los protocolos de cuidado animal y experimentales fueron aprobados por el Ministro de investigación francés y se llevaron a cabo de acuerdo con directrices institucionales del Comité Ético francés y bajo la supervisión de investigadores autorizados. Tras la recuperación de la cirugía de OVX durante 7 días y la aclimatación, los ratones fueron asignados aleatoriamente a los grupos de tratamiento, recibiendo inyecciones subcutáneas diarias de un péptido y un grupo de control que recibió inyecciones diarias de solo vehículo (PBS). Los ratones no ovariectomizados o los simuladamente operados se incluyeron en los estudios a modo de controles sanos. Se establecieron tres protocolos experimentales. Protocolo 1: los ratones ovariectomizados recibieron inyecciones s.c. diarias de 10 mg/kg de peso corporal de Pep8 (Pep8, n=8) o de solo vehículo (OVX, n=8). Los ratones no ovariectomizados (NOV, n=8) sirvieron de controles normales. Protocolo 2: los ratones ovariectomizados se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos (n=8) que recibieron tratamientos diarios con Pep8 pegilado (Pep8-NPEG5) a dosis de 10 mg/kg o de 2,5 mg/kg, o Pep8 no pegilado a una dosis de 10 mg/kg/d o de vehículo solo. Los ratones simuladamente operados (n=5) sirvieron de controles sanos. Protocolo 3: los ratones ovariectomizados recibieron tratamientos diarios de Pep8 pegilado (Pep8-NPEG8) a una dosis de 10 mg/kg o 2,5 mg/kg, tal como se ha indicado anteriormente, o Pep8 no pegilado a una dosis inferior, de 2,5 mg/kg/d o vehículo solo. Los ratones simuladamente operados (n=8) sirvieron de controles sanos.

Durante el periodo experimental, se monitorizó el peso corporal de los ratones. No se observaron diferencias significativas en el desarrollo del peso corporal en los ratones ovariectomizados durante el curso del estudio. Tras el tratamiento durante cinco semanas, los ratones fueron anestesiados con isoflurano (a 2%, 1 l/min.) y se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se recolectaron las vértebras lumbares y tibias para el análisis de micro-TC y se almacenaron a 4°C en paraformaldehído al 4% hasta el análisis posterior. Además, se recolectaron órganos internos (corazón, hígado, pulmones, riñones, bazo, intestinos y timo) de algunos ratones (n=3 de cada grupo) y se almacenaron para el cribado de toxicidad.

### I.11 Análisis de micro-TC de muestras óseas

El análisis de variables de la arquitectura de las tibias y vertebras de los ratones se llevó a cabo utilizando el sistema de micro-TC de rayos X de alta resolución para la obtención de imágenes de animales pequeños SkyScan-1072 (SkyScan, Bélgica). Tras el escaneo, los datos de imágenes se transfirieron a una estación de trabajo y la tibia proximal y la cuarta vértebra lumbar (L4) se utilizaron para la visualización 3-D y el cálculo de los índices estructurales (Parfitt et al., 1987) utilizando el sistema de análisis SkyScan (analyzer de TC, volumen de TC, SkyScan). Para los parámetros de hueso trabecular de las tibias, se obtuvieron secciones transversales de TC en la región de interés en la dirección axial del hueso trabecular aproximadamente 0,1 mm bajo la placa de crecimiento hasta la parte intermedia del fémur. Se definieron los contornos y se dibujaron próximos al hueso cortical. A continuación se eliminó el hueso trabecular y se analizó por separado. Para el análisis se utilizaron cincuenta secciones (1 mm) aproximadamente 0,4  $\mu$ m en dirección distal a la placa de crecimiento de los extremos proximales de las tibias. Para el análisis de la vértebra L4, se delinearon manualmente 120 secciones (2,4 mm) dentro del cuerpo vertebral para evitar la inclusión de las placas terminales superior e inferior. Se fijó el nivel umbral para las mediciones en 55 para los análisis. El análisis de los especímenes incluyó las mediciones siguientes de los huesos: fracción de volumen óseo (VO/VT, %), número trabecular (NTb), grosor trabecular (GTb) y espaciado trabecular (ETb).

### I.12 Evaluación histológica de la toxicidad orgánica

Tras el sacrificio, se conservaron los órganos y se fijaron en PFA al 4% a 4°C y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones (4  $\mu$ m) y se tiñeron con hematoxilina y eosina (Lamoureux et al., 2009; Baud'Huin et al., 2010). Se evaluó la morfología general de los órganos en cada sección utilizando un microscopio DMRXA (Leica, Nussloch, Alemania).

### I.13 Análisis estadístico

Se presentan datos *in vivo* como medias  $\pm$  SEM de ocho animales. La significancia de las diferencias entre ratones ovariectomizados y tratados con el polipéptido y los animales tratados con vehículo o los controles sanos se determinó utilizando ANOVA y pruebas de múltiples rangos de Dunnett. Para los datos *in vitro*, el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando una prueba de Student de dos colas; las comparaciones entre grupos se analizaron mediante pruebas t (2 colas) o ANOVA para experimentos con más de 2 subgrupos. Los valores de probabilidad de  $P < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## II. Resultados

### II.1 La unión de RANKL a RANK permite definir una región putativa de inhibición

Una característica inesperada revelada en la estructura de RANK-RANKL por el trabajo de Liu et al. (2010) es el importante cambio conformacional experimentado por RANK con la unión de RANKL. La mayoría de la parte inferior de la región extracelular de RANK permanece sin cambios; las unidades CRD1 y CRD2 realizan un cambio de  $36^\circ$ , estableciendo un estrecho contacto con RANKL (Liu et al., 2010). Aunque no existe ninguna cavidad estricta para definir un bolsillo de unión, puede utilizarse la división resultante del cambio en el dominio CRD2 para definir la región bisagra entre las dos conformaciones. Los inventores han utilizado este surco para definir su bolsillo de unión principal para el análisis de anclaje de los polipéptidos candidatos (fig. 1A).

### II.2 Los polipéptidos de la invención con diana en RANK inhiben la osteoclastogénesis inducida por RANKL

Se ha concebido varios polipéptidos inhibidores a partir del receptor RANK (Tabla 1) que a continuación se cribaron para la actividad biológica. Los polipéptidos purificados (GeneCust) se prepararon en forma de soluciones madre 1 mM en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) o medio celular. Debido a la naturaleza hidrófoba de algunos polipéptidos resultó necesario complementar el solvente con DMSO al 1% para conseguir la concentración deseada. Se han evaluado estos polipéptidos inhibidores a una concentración de  $50 \mu\text{M}$  sobre la osteoclastogénesis en monocitos  $\text{CD14}^+$  humanos aislados a partir de PBMC cultivados con  $25 \text{ mg/ml}$  de M-CSF y  $100 \text{ ng/ml}$  de RANKL (figura 1B). Como controles positivos se utilizaron polipéptidos miméticos derivados de OPG (OP3-4) y el receptor de FNT (WP9QY) con una actividad inhibidora conocida (Takasaki et al., 1997; Cheng et al., 2004), así como el receptor señuelo OPG a una concentración de  $50 \text{ ng/ml}$ . Algunos de los polipéptidos diseñados a una concentración de  $50 \mu\text{M}$  mostraron un efecto moderado sobre la formación de osteoclastos *in vitro* (Pep501 (SEC ID nº 24), PepA19 (SEC ID nº 29), PepA20 (SEC ID nº 30)), reduciendo la formación de células multinucleadas positivas para TRAP en aproximadamente 25% a 35% en comparación con las células tratadas con solo RANKL soluble.

Entre los 8 nuevos polipéptidos cribados en dicho ensayo, Pep8 (SEC ID nº 2) mostró una actividad de inhibición similar a la de los miméticos OP3-4 y WP9QY con diana en RANKL y, por consiguiente, se consideró el polipéptido inhibidor más prometedor de RANK del panel de polipéptidos.

Se obtuvieron nuevos polipéptidos a partir de la secuencia de Pep8 utilizando modelado molecular como soporte para la modificación. La totalidad de dichos polipéptidos derivados fueron capaces de inhibir la osteoclastogénesis *in vitro* y algunos de ellos presentó una actividad de inhibición más fuerte de Pep8 (figura 5C). La totalidad de dichos polipéptidos derivados presentaba una secuencia que comprendía o que consistía en una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 32 y una secuencia que presentaba una identidad de por lo menos 80% respecto a SEC ID nº 32 en toda la longitud de SEC ID nº 32, SEC ID nº 33 y una secuencia que presentaba una identidad de por lo menos 80% respecto a SEC ID nº 33 en toda la longitud de SEC ID nº 33, SEC ID nº 1 y una secuencia que presentaba una identidad de por lo menos 80% respecto a SEC ID nº 1 en toda la longitud de SEC ID nº 1, en particular SEC ID nº 1 y una secuencia que presentaba una identidad de por lo menos 80% respecto a SEC ID nº 1 en toda la longitud de SEC ID nº 1.

Dichos resultados demuestran la capacidad de los polipéptidos según la invención de inhibir la osteoclastogénesis inducida por RANKL *in vitro*.

Tabla 1: polipéptidos diseñados para la unión al surco de RANK. Serie P8 (Pep8 a Pep824) consistente de una secuencia de hasta 20 aminoácidos, en la que dicha secuencia comprendía o consistía de una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 32, SEC ID nº 33, SEC ID nº 1 y una secuencia que presenta una identidad de por lo menos 80% respecto a SEC ID nº 32, SEC ID nº 33 o SEC ID nº 1 en toda la longitud de SEC ID nº 32, SEC ID nº 33 o SEC ID nº 1, respectivamente.

ES 2 590 757 T3

Nombre del polipéptido	Secuencia de aminoácidos	Modificaciones*	% de identidad respecto a SEC ID nº 32 en toda la longitud de SEC ID nº 32, de una secuencia comprendida en el polipéptido	% de identidad respecto a SEC ID nº 33 en toda la longitud de SEC ID nº 33, de una secuencia comprendida en el polipéptido	% de identidad respecto a SEC ID nº 1, en toda la longitud de SEC ID nº 1, de una secuencia comprendida en el polipéptido	SEC ID nº
Pep822	LKLCS	N-(IPEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	100%	100%	100%	1
Pep8	NVLKLCSGE	N-(IPEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	100%	100%	100%	2
Pep801	ELANVLKLCSGE	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	100%	100%	100%	3
Pep802	NVLKLCSGEAY	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	100%	100%	100%	4
Pep803	ELANVLKLCSGEAY	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	100%	100%	100%	5
Pep804	NVLKLCSGEAYR	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	100%	100%	100%	6
Pep805	NVLKLACSGE	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	83%	83%	83%	7
Pep806	NVLKLCSE	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	100%	100%	100%	8
Pep808	NVLKFCSGE	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	100%	100%	80%	9
Pep809	NVIKLCSGE	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	80%	80%	80%	10
Pep810	NVLKLCHGE	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	80%	80%	80%	11
Pep811	ENVLKLCSGE	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	100%	100%	100%	12
Pep812	NALKLFCSGE	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	100%	100%	100%	13
Pep813	EVLKLCSGN	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	100%	100%	100%	14
Pep814	NALKLCSGEMR	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	100%	100%	100%	15
Pep815	NALKLFCSGE	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	83%	83%	83%	16
Pep816	NALKLFCSGE	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	83%	83%	83%	17
Pep817	NALRLCSGE	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	80%	80%	80%	18
Pep818	NALHLCSGE	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	80%	80%	80%	19
Pep819	NALFLCSGE	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	80%	80%	80%	20
Pep820	NALHLCSGE	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	80%	80%	80%	21
Pep823	YCNVLKLCSGECY	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	100%	100%	100%	22
Pep824	NALKHCSGE	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	100%	100%	80%	23
Pep501	ELASFLKISQLG	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	X**	X**	X**	24
Pep401	ELASFNKITQLG	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	X	X	X	25
Pep402	ELASFNRIQLG	N-(PEG) <sub>5</sub> / N-(PEG) <sub>8</sub>	X	X	X	26

Nombre del polipéptido	Secuencia de aminoácidos	Modificaciones*	% de identidad respecto a SEC ID nº 32 en toda la longitud de SEC ID nº 32, de una secuencia comprendida en el polipéptido	% de identidad respecto a SEC ID nº 33 en toda la longitud de SEC ID nº 33, de una secuencia comprendida en el polipéptido	% de identidad respecto a SEC ID nº 1, en toda la longitud de SEC ID nº 1, de una secuencia comprendida en el polipéptido	SEC ID nº
PepA17	WLETRLTNHMEIQ	N-(PEG) <sub>5</sub> /N-(PEG) <sub>8</sub>	X	X	X	27
PepA18	AKFHGELMADQWQ	N-(PEG) <sub>5</sub> /N-(PEG) <sub>8</sub>	X	X	X	28
PepA19	NEMDLPKKSCLMN	N-(PEG) <sub>5</sub> /N-(PEG) <sub>8</sub>	X	X	X	29
PepA20	WAARLGDPT	N-(PEG) <sub>5</sub> /N-(PEG) <sub>8</sub>	X	X	X	30
Pep1	ELASYIITQLG	N-(PEG) <sub>5</sub> /N-(PEG) <sub>8</sub>	X	X	X	31

\* Modificaciones evaluadas para mejorar la estabilidad y biodisponibilidad de los péptidos.

\*\* Datos no calculados.

5

### II.3 Capacidad cinética de unión de los polipéptidos inhibidores

Se estudió la unión de los polipéptidos a RANK utilizando la resonancia del plasmón superficial (figura 1C). Varios polipéptidos se unieron a RANK inmovilizado de una manera dependiente de la dosis; en la presente memoria se proporciona Pep1 (SEC ID nº 33). Basándose en la cinética de asociación y disociación obtenida utilizando un modelo de Langmuir 1:1 para las interacciones bimoleculares simples, la afinidad de unión medida ( $K_d$ ) de Pep1 (figura 1) a RANKh fue de 20,6  $\mu\text{M}$  ( $k_{\text{on}}=1,35 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{\text{off}}=2,78 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ). El polipéptido de la invención Pep8 se unió a RANK con una  $K_d$  de 10,5  $\mu\text{M}$  y se estimaron las constantes aparentes de asociación ( $k_{\text{on}}$ ) y de disociación ( $k_{\text{off}}$ ) en  $4,95 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y  $5,20 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente.

15

Dichos resultados demuestran que la afinidad de unión ( $K_d$ ) del polipéptido de la invención, Pep8, a RANKh es mayor que la de otros polipéptidos sometidos a ensayo, tales como Pep1.

20

### II.4 Pep8 inhibe la formación de osteoclastos inducida por RANKL

A continuación se examinó la actividad inhibidora del polipéptido de la invención, Pep8, más en detalle sobre la formación de osteoclastos inducida por RANKL en  $\text{CD14}^+$  humanas, así como en células  $\text{CD11b}^+$  murinas de ratones C57/bl6. RANK de ratón y humana mostraba una identidad de secuencia de aminoácidos de 77%; por lo tanto, los inventores predijeron que los polipéptidos generados sobre RANK humana también inhibirían el homólogo de receptor de ratón y por lo tanto podrían someterse a ensayo en modelos de ratón de pérdida ósea.

25

Pep8 provocó una reducción dependiente de la dosis del número de células multinucleadas positivas para TRAP formadas en células  $\text{CD14}^+$  humanas (figuras 2A y B), así como en cultivos celulares murinos (datos no mostrados). En presencia de Pep8 100  $\mu\text{M}$ , el número de células multinucleadas positivas para TRAP era de 39% y 28% del número formado en cocultivos humanos o murinos, respectivamente, realizados sin el polipéptido. La  $\text{IC}_{50}$  de Pep8 era de 40  $\mu\text{M}$  para las  $\text{CD14}^+$  humanas y de 30  $\mu\text{M}$  para las células  $\text{CD11b}^+$  murinas. Pep8 solo, en ausencia de RANKL, no moduló el desarrollo de los osteoclastos (datos no mostrados).

30

Pep8 no presentaba toxicidad intrínseca, ya que no se observó efecto citotóxico de Pep8 100  $\mu\text{M}$  sobre los monocitos o células RAW264.7 de tipo macrófago murinas (datos no mostrados), ni el polipéptido a 100  $\mu\text{M}$  mostró ningún efecto sobre la mineralización de las células madre mesenquimales (CMM), tal como puso de manifiesto la tinción de rojo Alizarin (datos no mostrados).

35

De esta manera, estos datos sugieren que Pep8 anula la osteoclastogénesis inducida por RANKL sin producir citotoxicidad.

40

Con el fin de elucidar adicionalmente la función de Pep8 sobre la diferenciación de los osteoclastos, los inventores examinaron su efecto sobre la expresión génica de la catepsina K, TRAP y el factor nuclear de las células T

activadas c1 (NFATc1), la totalidad de los cuales son genes marcadores de osteoclastos. Los monocitos CD14<sup>+</sup> se trataron con M-CSF (25 ng/ml) y RANKLh (100 ng/ml) en ausencia o en presencia de Pep8 seguido del aislamiento del ARN total.

- 5 La RT-PCR mostró que la expresión de ARNm de los marcadores osteogénicos catepsina K, TRAP y NFATc1 se encontraba marcadamente reducida en presencia de Pep8 tres días después de la estimulación con RANKL, y que dicha reducción de la expresión de marcador se mantenía hasta el día 11 (figura 2C), siendo esta observación consistente con un efecto inhibitor de Pep8 de la osteoclastogénesis.
- 10 Estos resultados demuestran la capacidad del polipéptido de la invención Pep8 de inhibir la expresión de genes marcadores de los osteoclastos. Se obtuvieron resultados similares con Pep8 pegilado (Pep8-N(PEG)<sub>5</sub> y Pep8-N(PEG)<sub>8</sub>).

### 15 **II.5 Pep8 inhibe la señalización inducida por RANKL**

Con el fin de explorar adicionalmente rutas mediante las que Pep8 regula la diferenciación y función de los osteoclastos, se examinó el efecto del polipéptido sobre la fosforilación inducida por RANKL de Akt, p38 y ERK en células RAW264.7 que habían sido expuestas a Pep8 50 µM. Los análisis de transferencia western demostraron la fosforilación de Akt tras 5 minutos de tratamiento con RANKL, y Pep8 mostró un efecto inhibitor de la fosforilación de Akt inducida por RANKL (figura 3A). De manera similar, Pep8 inhibió la fosforilación de p38 y ERK tras 15 minutos de tratamiento con RANKL. Los niveles basales de pAkt y pERK no cambiaron en presencia de Pep8; sin embargo, Pep8 redujo la fosforilación de p38 incluso en ausencia de la estimulación con RANKL (datos no mostrados).

25 Asimismo se evaluó si Pep8 era capaz de inhibir la rápida activación inducida por RANKL de NF-κB en células RAW264.7. Se descubrió que la presencia de Pep8 a una concentración de 50 µM bloqueaba la degradación inducida por RANKL de IκBα y la posterior traslocación nuclear de p50 y p65 (figura 3B). Estos resultados indican que Pep8 inhibe la activación inducida por RANKL de la ruta clásica de NF-κB. En contraste, el tratamiento con Pep8 50 µM no presentó ningún efecto sobre los niveles de expresión de RelB tanto en la fracción citoplasmática como en la fracción nuclear (figura 3B).

Se confirmó la especificidad de Pep8 sobre la señalización de RANK en células renales embrionarias humanas que sobreexpresaban RANK. Pep8 inhibió fuertemente la activación de p38 tras la estimulación con RANKL (figura 3C). Además, el tratamiento con RANKL estimuló la degradación de RANK con el tiempo en presencia del inhibidor de la síntesis de proteínas llamado cicloheximida (CHX), mientras que CHX por sí solo no lo hizo. De manera similar, el tratamiento con CHX y Pep8 condujo a la degradación de RANK, aunque en un grado algo menor (figura 3C).

En conclusión, el polipéptido de la invención Pep8 aparentemente inhibió la actividad inducida por RANKL de la ruta de señalización de RANK.

### 40 **II.6 El polipéptido Pep8 protege a los ratones frente a la pérdida ósea asociada a la ovariectomía**

Dada la capacidad de Pep8 de inhibir la diferenciación y señalización *in vitro* de los osteoclastos inducidas por RANKL, los inventores investigaron si Pep8 podría prevenir la pérdida ósea *in vivo*. La deficiencia de estrógenos en ratones ovariectomizados conduce a una resorción ósea acelerada y a una densidad mineral ósea reducida (Sato et al., 1997). Por lo tanto, los inventores examinaron si Pep8 *in vivo* es capaz de proteger frente a la pérdida ósea inducida por OVX, que requiere la señalización de RANKL (Cenci et al., 2000; Roggia et al., 2001).

Los ratones C57BL/6 hembra se sometieron a ovariectomía a las 8 semanas de edad y se permitió que se recuperasen de la cirugía durante una semana antes de iniciar el tratamiento. Los ratones recibieron inyecciones subcutáneas diarias de Pep8 durante 35 días a una dosis de 10 mg/kg de peso corporal al día. *In vitro*, Pep8 inhibió activamente la formación de osteoclastos CD11b<sup>+</sup> con una IC<sub>50</sub> de 30 µM (0,029 mg/ml). Los ratones de control OVX y ratones sanos de edades correspondientes (NOV) se trataron con vehículo (PBS) solo. La histomorfometría y el análisis de TµC demostraron que el tratamiento con Pep8 a una dosis biológicamente activa de 10 mg/kg/d indujo un incremento global de la densidad del hueso trabecular en ratones ovariectomizados en comparación con el grupo de control OVX tratado con vehículo (figura 4). La eficacia del procedimiento de OVX se confirmó por una reducción de parámetros óseos tales como la fracción de volumen óseo (VO/VT), el grosor trabecular (GTb) y el número trabecular (NTb), así como por un incremento del espaciado trabecular (ETb) en ratones OVX tratados con vehículo en comparación con ratones NOV sanos (figura 4).

En la tibia proximal, el tratamiento con Pep8 incrementó significativamente la VO/VT trabecular en el 93% (P<0,01) en ratones ovariectomizados. El GTb se incrementó en 14% (P<0,01) y el NTb en 71% (P<0,01). Los ratones tratados con Pep8 también mostraron una caída del ETb (P<0,01) en comparación con los ratones tratados con vehículo (figura 4A).

Se obtuvieron resultados similares en las vértebras lumbares (figura 4B). La VO/VT vertebral trabecular era inferior

en ratones OVX que en ratones tratados con Pep8 ( $P < 0,05$ ). De manera similar, el tratamiento con Pep8 incremento el NTb ( $P < 0,05$ ) y redujo el ETb ( $P < 0,05$ ). El GTb también era ligeramente, aunque de manera no estadísticamente significativa, superior en los ratones tratados con Pep8 en comparación con los ratones de control OVX.

- 5 Pep8 no presentó ningún efecto sobre el peso corporal en los ratones OVX, indicando que un tratamiento a esta dosis no presentaba efectos tóxicos sobre los animales, y lo anterior se confirmó mediante una evaluación histopatológica de los órganos principales (corazón, pulmones, hígado, riñones, bazo y piel) (figura 6).

10 Conjuntamente estos resultados proporcionan pruebas de que el polipéptido de la invención Pep8 puede, por lo menos parcialmente, prevenir la pérdida ósea postmenopáusica en un modelo animal in vivo (mediante el tratamiento focalizado de RANK), sin producir efectos tóxicos.

15 Un motivo importante de preocupación con la utilización de los péptidos terapéuticos sigue siendo su pobre biodisponibilidad debido al rápido aclaramiento renal (McGregor, 2008). Aunque el péptido utilizado en los estudios in vivo (Pep8) ha demostrado estar activo a la concentración sometida a ensayo (10 mg/kg/día), los inventores investigaron si la semivida del péptido podía incrementarse adicionalmente mediante pegilación N-terminal del péptido. La pegilación de péptidos es bien conocida para la optimización de la solubilidad, biodisponibilidad y estabilidad de los péptidos y reduce la inmunogenicidad. Por lo tanto, se sometió a ensayo Pep8 portador de grupos polietilenglicol de dos longitudes de cadena diferentes en el aminoácido N-terminal (Pep8-N(PEG)<sub>5</sub> y Pep8-N(PEG)<sub>8</sub>) en un modelo de ratón ovariectomizado, tal como se ha indicado anteriormente.

20 Los ratones recibieron inyecciones subcutáneas diarias de Pep8-NPEG5 a dos dosis diferentes, 10 mg/kg y 2,5 mg/kg de peso corporal. La Pep8 no pegilado a una dosis de 10 mg/kg sirvió como control positivo. Se trataron ratones de control OVX y ratones simuladamente operados (Sham) con el vehículo (PBS) solo. El análisis de T<sub>μ</sub>C de las tibias demostró que el tratamiento con Pep8-NPEG5 a una dosis de 10 mg/kg/d atenuó la pérdida ósea en ratones OVX en el mismo grado que el tratamiento con el péptido no pegilado (figura 7), tal como demuestra un incremento significativo de parámetros estructurales, entre ellos la VO/VT trabecular, el GTb y el NTb con una reducción del ETb. Sin embargo, Pep8-NPEG5 a una dosis 4 veces inferior, de 2,5 mg/kg/d, resultó prácticamente igual de eficaz que tanto Pep8 pegilado como Pep8 no pegilado a una dosis de 10 mg/kg/d, incrementando significativamente la VO/VT y el NTb y reduciendo el ETb en la tibia proximal (figura 7).

25 En un segundo experimento, se asignaron aleatoriamente ratones ovariectomizados a diferentes grupos de tratamiento que recibieron tratamientos diarios de Pep8-NPEG8 a una dosis de 2,5 o 10 mg/kg o Pep8 no pegilado a una dosis inferior, de 2,5 mg/kg de peso corporal. Tal como se esperaba, Pep8-NPEG8 mostró una actividad similar a ambas dosis sometidas a ensayo, incrementando significativamente la VO/VT trabecular y el NTb en comparación con los animales tratados con vehículo (figura 8). En contraste, Pep8 a la dosis inferior de 2,5 mg/kg resultó menos eficiente, sólo ligeramente, pero sin incrementar significativamente la VO/VT y el NTb, indicando un efecto dependiente de la dosis del péptido.

35 Conjuntamente, estos resultados indican que la pegilación incrementa la biodisponibilidad del péptido, permitiendo de esta manera una reducción significativa de la dosis y consiguiendo simultáneamente el mismo efecto protector frente a la pérdida ósea.

## 40 II.7 Estudio de RMN-DTS de la interacción entre Pep8 y RANK

45 Se llevó a cabo un experimento de diferencia de transferencia de saturación (RMN-DTS) con RANKh y Pep8 en un tampón de fosfato (figura 5A). Se midieron los espectros de Pep8 en primer lugar sin proteína y el polipéptido se mantuvo estable bajo las condiciones experimentales de la RMN durante la totalidad del experimento (2 semanas). También se estudio RANKh en el mismo tampón de fosfato y se añadieron concentraciones crecientes de Pep8 (con una proporción de concentraciones de entre 100:1 y 1.000:1) al tubo de la RMN para analizar la interacción Pep8-RANKh. Los espectros de Pep8 unido a RANK difirieron significativamente de los de Pep8 no unido soluble, de una manera dependiente de la dosis, proporcionalmente a la adición de Pep8 al tubo de RMN. La interacción Pep8/RANKh se analizó más de dos semanas después de la adición del polipéptido a la mezcla y no se observaron desplazamientos visibles adicionales en los espectros unidos, aparte de los inducidos por la unión de Pep8 a su diana RANK. El experimento de DTS reveló que los 5 aminoácidos centrales de Pep8 presentaban una interacción directa con RANKh (L<sub>3</sub>K<sub>4</sub>L<sub>5</sub>C<sub>6</sub>S<sub>7</sub>), con tres de ellos recibiendo el 100% de la saturación (L<sub>3</sub>K<sub>4</sub>L<sub>5</sub>). C<sub>6</sub>S<sub>7</sub> presentaba una proporción de transferencia relativa de 60% y G<sub>8</sub>E<sub>9</sub> recibía transferencias inferiores. N<sub>1</sub>V<sub>2</sub> no eran visibles en los espectros, lo que resulta típico en este tipo de experimento, aunque ambos NH terminales de N<sub>1</sub> eran detectables con una señal próxima a la señal de G<sub>8</sub>E<sub>9</sub>. Estos resultados indican que Pep8 establece una estrecha interacción con RANKh y que la mayoría de estas interacciones se concentra en los 5 aminoácidos nucleares (L<sub>3</sub>K<sub>4</sub>L<sub>5</sub>C<sub>6</sub>S<sub>7</sub>, por lo menos para el NH del esqueleto). Estas interacciones definen un área continua de interacciones en todo RANKh, concordando perfectamente con las posiciones inferidas del análisis de modelaje molecular (figuras 1A y 5B).

60 Estos resultados proporcionan evidencia clara de la interacción directa del polipéptido de la invención Pep8 con RANKh en una conformación que concuerda con la interacción del modelaje.

**Referencias bibliográficas**

- An H-J et al. (2011) Crystallographic and mutational analysis of the CD40-CD154 complex and its implications for receptor activation. *J Biol Chem.* 286(13):11226-11235.
- 5 Aoki K, Saito H, Itzstein C, et al. (2006). A TNF receptor loop peptide mimic blocks RANK ligand-induced signaling, bone resorption, and bone loss. *J Clin Invest* 116: 1525-1534.
- 10 Banner DW et al. (1993) Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell.* 73(3):431-45. Baron R, Ferrari S, and Russell R. (2011). Denosumab and bisphosphonates: Different mechanisms of action and effects. *Bone* 48: 677-692.
- 15 Baud'Huin M, Duplomb L, Téletchéa S, et al (2009). Factor VIII-von Willebrand factor complex inhibits osteoclastogenesis and controls cell survival *J Biol Chem* 284: 31704-13.
- Baud'Huin M, Renault R, Charrier C, et al (2010). Interleukin-34 is expressed by giant cell tumours of bone and plays a key role in RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Pathol* 221 (1): 77-86.
- 20 Bax A and Davis DG (1985). MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy, *J Magn Reson* 65: 355-60.
- Boyce BF, Xing L, Yao Z, et al. (2006). Future Anti-Catabolic Therapeutic Targets in Bone Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1068: 447-457.
- 25 Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, et al (1983). CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations, *J Comp Chem* 4: 187-217.
- Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, et al (2000). Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- $\alpha$ . *J Clin Invest* 106: 1229-37.
- 30 Cha S-S et al. (2000) Crystal structure of TRAIL-DR5 complex identifies a critical role of the unique frame insertion in conferring recognition specificity. *J Biol Chem.* 275(40):31171-31177.
- 35 Cheng X, Kinoshita M, Takami M, et al (2004). Disabling of Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B (RANK) Receptor Complex by Novel Osteoprotegerin-like Peptidomimetics Restores Bone Loss in Vivo. *J Biol Chem* 279 (9): 8269-77. Compaan DM, Gonzalez LC, Tom I, Loyet KM, Eaton D, and Hymowitz SG. (2005) Attenuating lymphocyte activity: the crystal structure of the TLA-HVEM complex. *J Biol Chem.* 280(47):39553-39561.
- 40 Compaan DM, and Hymowitz SG. (2006) The crystal structure of the costimulatory OX40-OX40L complex. *Structure.* 14(8):1321-1330.
- Cutting B, Shelke SV, Dragic Z, et al (2007). Sensitivity enhancement in saturation transfer difference (STD) experiments through optimized excitation schemes. *Magn Reson Chem* 45 (9): 720-24.
- 45 Dai X, Ma W, He X, et al. (2011). Review of therapeutic strategies for osteosarcoma, chondrosarcoma, and Ewing's sarcoma. *Med. Sci. Monit.* 17: RA177-RA190.
- 50 Demchenko YN, and Kuehl WM. (2010). A critical role for the NF $\kappa$ B pathway in multiple myeloma. *Oncotarget* 1: 59-68.
- Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, and Prochiantz A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *Journal of Biological Chemistry* 269: 10444-10450.
- 55 Duplomb L, Baud'huin M, Charrier C, et al. (2008). Interleukin-6 inhibits receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage: key role of Serine727 phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3. *Endocrinology* 149: 3688-97.
- 60 Duheron V, Hess E, Duval M, et al. (2011). Receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK) stimulates the proliferation of epithelial cells of the epidermo-pilosebaceous unit. *PNAS* 108: 5342-5347.
- Galtier N, Gouy M, and Gautier C. (1996) SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci.* 12(6):543-548.
- 65 Gonzalez-Suarez E, Jacob AP, Jones J, et al. (2010). RANK ligand mediates progesterin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. *Nature* 468: 103-107.

- Hansen KE, Wilson HA, Zapalowski C, et al. (2011). Uncertainties in the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 26: 1989-1996.
- 5 Hwang TL and Shaka AJ (1995). Water Suppression That Works - Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients, *J Magn Reson Ser A* 112: 275-79.
- Kuester M, Kemmerzehl S, Dahms SO, Roeser D, and Than ME. (2011) The crystal structure of Death Receptor 6 (DR6): a potential receptor of the Amyloid Precursor Protein (APP). *J Mol Biol.* 409(2):189-201.
- 10 Lamoureux F, Picarda G, Garrigue L, et al (2009). Glycosaminoglycans as potential regulators of osteoprotegerin therapeutic activity in osteosarcoma. *Cancer Res* 69: 526-36.
- Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, et al. (2006). Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 440: 692-696.
- 15 Lee BL, Higgins MJ, and Goss PE. (2011). Denosumab and the current status of bone-modifying drugs in breast cancer. *Acta Oncologica*, 1-11.
- Lien S, and Lowman HB. (2003). Therapeutic peptides. *Trends in Biotechnology* 21: 556-562.
- 20 Liu C, Walter TS, Huang P, et al (2010). Structural and Functional Insights of RANKL-RANK Interaction and Signaling. *J Immunol* 184: 6910-19.
- McGregor DP (2008) Discovering and improving novel peptide therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology* 8:616-619.
- 25 May MJ, D'Acquisto F, Madge LA, et al. (2000). Selective Inhibition of NF- $\kappa$ B Activation by a Peptide That Blocks the Interaction of NEMO with the I $\kappa$ B Kinase Complex. *Science* 289: 1550-1554.
- 30 Mori K, Berreur M, Blanchard F, et al. (2007). Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) directly modulates the gene expression profile of RANK-positive Saos-2 human osteosarcoma cells. *Oncol Rep* 18: 1365-1371.
- Mukai Y et al. (2010) Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex. *Sci Signal.* 3(148):ra83.
- 35 Needleman SB, and Wunsch CD. (1970). A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of Molecular Biology* 48: 443-453.
- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al (1997). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2 (6): 595-610.
- 40 Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, et al. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Meth* 8: 785-786.
- 45 Picarda G et al. (2012) A functional, new short isoform of Death Receptor 4 in Ewing's sarcoma cell lines may be involved in TRAIL sensitivity/resistance mechanisms. *Mol Cancer Res.* 10(3):336-346.
- Piotto M, Saudek V and Sklenar V (1992). Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR* 2 (6): 661-65.
- 50 Pons J, Tanchou V, Girault JP, Bertho G, Evrard-Todeschi N (2011). NMR applications for identifying  $\beta$ -TrCP protein-ligand interactions. *Med Chem* 11 (4): 283-97. Review.
- Roggia C, et al. (2001). Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13960-65.
- 55 Sato M, Zeng GQ and Turner CH (1997). Biosynthetic human parathyroid hormone (1-34) effects on bone quality in aged ovariectomized rats. *Endocrinology* 138: 4330-4337.
- 60 Santini D, Perrone G, Roato I, et al. (2011). Expression pattern of receptor activator of NF $\kappa$ B (RANK) in a series of primary solid tumors and related bone metastases. *Journal of Cellular Physiology* 226: 780-784.
- Schramek D, Leibbrandt A, Sigl V, et al. (2010). Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer. *Nature* 468: 98-102.
- 65 Smith HS. (2011). Painful osseous metastases. *Pain Physician* 14: E373-E403.

- States DJ, Haberkorn RA, Ruben DJ (1982). A two-dimensional nuclear Overhauser experiment with pure absorption phase in four quadrants. *J Magn Res* 48: 286-92.
- 5 Ta HM, Nguyena GTT, Jinb HM, et al (2010). Structure-based development of a receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) inhibitor peptide and molecular basis for osteopetrosis. *PNAS* 107 (47): 20281-86.
- Takasaki W, Kajino Y, Kajino K, et al (1997). Structure-based design and characterization of exocyclic peptidomimetics that inhibit TNF $\alpha$  binding to its receptor. *Nat Biotech* 15: 1266-70.
- 10 Tanaka S, Nakamura K, Takahasi N, et al.. (2005). Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting the RANKL-RANK signaling system. *Immunological Reviews* 208: 30-49.
- Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, et al. (2004). The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 457-475.
- 15 Toes REM, van der Voort EIH, Schoenberger SP, et al. (1998). Enhancement of Tumor Outgrowth Through CTL Tolerization After Peptide Vaccination Is Avoided by Peptide Presentation on Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 160: 4449-4456.
- 20 Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.
- Whyte LS, Ryberg E, Sims NA, et al. (2009). The putative cannabinoid receptor GPR55 affects osteoclast function in vitro and bone mass in vivo. *PNAS* 106: 16511-16516.
- 25 Wittig JC, Bickels J, Priebe D, et al. (2002). Osteosarcoma: a multidisciplinary approach to diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 65: 1123-1132.
- 30 Wu G, Robertson DH, Brooks CL, et al (2003). Detailed analysis of grid-based molecular docking: A case study of CDOCKER-A CHARMM-based MD docking algorithm. *J Comp Chem* 24 (13): 1549-62.
- Xia Y, Zhu Q, Jun KY, Wang J, Gao X (2010). Clean STD-NMR spectrum for improved detection of ligand-protein interactions at low concentration of protein. *Magn Reson Chem* 48 (12): 918-24.
- 35 Xu M, Choudhary S, Voznesensky O, et al (2010). Basal bone phenotype and increased anabolic responses to intermittent parathyroid hormone in healthy male COX-2 knockout mice. *Bone* 47 : 341-352.
- Zhan C et al. (2011) Decoy strategies: the structure of TL1A:DcR3 complex. *Structure*. 19(2):162-171.

40 **Listado de secuencias**

- <110> UNIVERSITE DE NANTES  
CHU NANTES
- 45 <120> PÉPTIDOS QUE SE DIRIGEN A RANK Y APLICACIONES DE LOS MISMOS
- <130> 362145D30383
- 50 <150> EP 11306766.4  
<151> 2011-12-23
- <150> EP 10305886.9  
<151> 2012-07-20
- 55 <160> 45
- <170> PatentIn versión 3.5
- 60 <210> 1  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>  
<223> Pep822 de unión al surco de RANK

<400> 1  
**Leu Lys Leu Cys Ser**  
 1 5

5 <210> 2  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Pep8 binding to the RANK cleft

<400> 2  
**Asn Val Leu Lys Leu Cys Ser Gly Glu**  
 1 5

15 <210> 3  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Pep801 de unión al surco de RANK

<400> 3  
**Glu Leu Ala Asn Val Leu Lys Leu Cys Ser Gly Glu**  
 25 1 5 10

<210> 4  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Pep802 de unión al surco de RANK

35 <400> 4  
**Asn Val Leu Lys Leu Cys Ser Gly Glu Ala Tyr**  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 14  
 40 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Pep803 de unión al surco de RANK

45 <400> 5  
**Glu Leu Ala Asn Val Leu Lys Leu Cys Ser Gly Glu Ala Tyr**  
 1 5 10

<210> 6  
 <211> 12  
 50 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 55 <223> Pep804 de unión al surco de RANK

<400> 6  
**Asn Val Leu Lys Leu Cys Ser Gly Glu Ala Tyr Arg**  
 1 5 10

60 <210> 7

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Pep805 de unión al surco de RANK

<400> 7  
**Asn Val Leu Lys Leu Ala Cys Ser Gly Glu**  
 1 5 10

10 <210> 8  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Pep806 de unión al surco de RANK

<400> 8  
**Asn Val Leu Lys Leu Cys Ser Glu**  
 1 5

20 <210> 9  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Pep808 de unión al surco de RANK

30 <400> 9  
**Asn Val Leu Lys Phe Cys Ser Gly Glu**  
 1 5

<210> 10  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Pep809 de unión al surco de RANK

40 <400> 10  
**Asn Val Ile Lys Leu Cys Ser Gly Glu**  
 1 5

45 <210> 11  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Pep810 de unión al surco de RANK

<400> 11  
**Asn Val Leu Lys Leu Cys His Gly Glu**  
 1 5

55 <210> 12  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Pep811 de unión al surco de RANK

<400> 12  
**Glu Asn Val Leu Lys Leu Cys Ser Gly Glu**  
**1 5 10**

5 <210> 13  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Pep812 de unión al surco de RANK

<400> 13  
**Asn Ala Leu Lys Leu Cys Ser Gly Glu**  
**1 5**

15 <210> 14  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Pep813 de unión al surco de RANK

25 <400> 14  
**Glu Val Leu Lys Leu Cys Ser Gly Asn**  
**1 5**

30 <210> 15  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Pep814 de unión al surco de RANK

<400> 15  
**Asn Ala Leu Lys Leu Cys Ser Gly Glu Met Arg**  
**1 5 10**

40 <210> 16  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Pep815 de unión al surco de RANK

<400> 16  
**Asn Ala Leu Lys Leu Ala Cys Ser Gly Glu**  
**1 5 10**

50 <210> 17  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Pep816 de unión al surco de RANK

<400> 17

**Asn Ala Leu Lys Leu Phe Cys Ser Gly Glu**  
**1 5 10**

5 <210> 18  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Pep817 de unión al surco de RANK

15 <400> 18  
**Asn Ala Leu Arg Leu Cys Ser Gly Glu**  
**1 5**

20 <210> 19  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Pep818 de unión al surco de RANK

30 <400> 19  
**Asn Ala Leu His Leu Cys Ser Gly Glu**  
**1 5**

35 <210> 20  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Pep819 de unión al surco de RANK

45 <400> 20  
**Asn Ala Leu Phe Leu Cys Ser Gly Glu**  
**1 5**

50 <210> 21  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Pep820 de unión al surco de RANK

60 <400> 21  
**Asn Ala Leu Asn Leu Cys Ser Gly Glu**  
**1 5**

65 <210> 22  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

70 <220>  
 <223> Pep823 de unión al surco de RANK

75 <400> 22  
**Tyr Cys Asn Val Leu Lys Leu Cys Ser Gly Glu Cys Tyr**  
**1 5 10**

80 <210> 23  
 <211> 9

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Pep824 de unión al surco de RANK

<400> 23  
**Asn Ala Leu Lys His Cys Ser Gly Glu**  
**1 5**

10 <210> 24  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Pep501 de unión al surco de RANK

<400> 24  
**Glu Leu Ala Ser Phe Leu Lys Ile Ser Gln Leu Gly**  
**1 5 10**

20 <210> 25  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Pep401 de unión al surco de RANK

<400> 25  
**Glu Leu Ala Ser Phe Asn Lys Ile Thr Gln Leu Gly**  
**1 5 10**

30 <210> 26  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Pep402 de unión al surco de RANK

40 <400> 26  
**Glu Leu Ala Ser Phe Asn Arg Ile Thr Gln Leu Gly**  
**1 5 10**

45 <210> 27  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> PepA17 de unión al surco de RANK

50 <400> 27  
**Trp Leu Glu Thr Arg Leu Thr Asn His Met Glu Leu Gln**  
**1 5 10**

55 <210> 28  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> PepA18 de unión al surco de RANK

<400> 28  
**Ala Lys Phe His Gly Glu Leu Met Ala Asp Gln Trp Gln**  
**1 5 10**

5 <210> 29  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> PepA19 de unión al surco de RANK

<400> 29  
**Asn Glu Met Asp Leu Pro Lys Lys Ser Cys Leu Met Asn**  
**1 5 10**

15 <210> 30  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> PepA20 de unión al surco de RANK

25 <400> 30  
**Trp Ala Ala Arg Leu Gly Asp Pro Thr**  
**1 5**

30 <210> 31  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Pep1 de unión al surco de RANK

<400> 31  
**Glu Leu Ala Ser Tyr Ile Ile Ile Thr Gln Leu Gly**  
**1 5 10**

40 <210> 32  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Pep de unión al surco de RANK

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa is Asp, Phe, His, Ile, Lys, Leu, Gln, Arg, Val, Trp o Tyr

50 <400> 32  
**Leu Lys Xaa Cys Ser**  
**1 5**

55 <210> 33  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Pep de unión al surco de RANK  
  
 <220>  
 5 <221> VARIANTE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa is Phe, His, Ile, Leu, Gln, Arg o Trp  
  
 <400> 33  
**Leu Lys Xaa Cys Ser**  
 10 **1** **5**  
  
 <210> 34  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador directo de la catepsina K  
  
 20 <400> 34  
 cccagactcc atcgactatc g 21  
  
 <210> 35  
 <211> 24  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador inverso de la catepsina K  
 30  
 <400> 35  
 ctgtaccctc tgcacttagc tgcc 24  
  
 <210> 36  
 35 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 40 <223> cebador directo de TRAP  
  
 <400> 36  
 aagactcact ggggtggcttt g 21  
  
 45 <210> 37  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50 <220>  
 <223> cebador inverso de TRAP  
  
 <400> 37  
 55 ggcagtcatg ggagttcagg 20  
  
 <210> 38  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <220>  
 <223> cebador directo de NFATc1  
  
 <400> 38

ggtcttcggg agaggagaaa 20  
 <210> 39  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador inverso de NFATc1  
 10  
 <400> 39  
 tgacgttga ggatgcatag 20  
 <210> 40  
 15 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> cebador directo de GAPDH  
 <400> 40  
 tgggtgtgaa ccatgagaag tatg 24  
 25 <210> 41  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> cebador inverso de GAPDH  
 <400> 41  
 35 ggtgcaggag gcattgct 18  
 <210> 42  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> cebador directo de B2M  
 <400> 42  
 45 ttctggcctg gaggctatc 19  
 <210> 43  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador inverso de B2M  
 55 <400> 43  
 tcaggaatt tgacttcca ttc 23  
 <210> 44  
 <211> 18  
 60 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador directo de ACTB  
 65 <400> 44

# ES 2 590 757 T3

ccaaccgcga gaagatga 18

<210> 45  
<211> 20  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> cebador inverso de ACTB

<400> 45  
ccagagcggt acaggatag 20

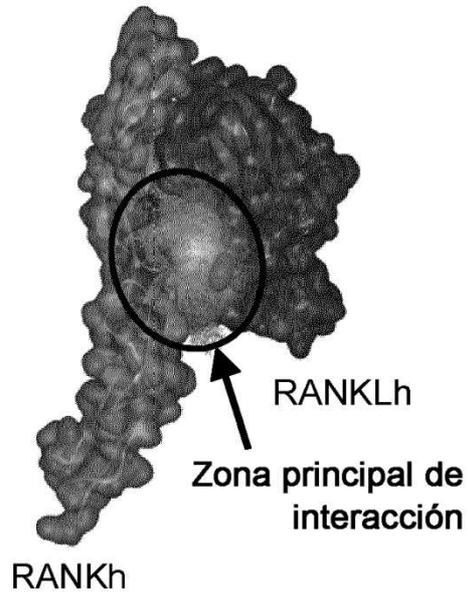
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Polipéptido aislado que consiste en una secuencia de hasta 20 aminoácidos, en el que dicha secuencia comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en:
- SEC ID nº 32; y
  - una secuencia que presenta por lo menos 80% de identidad con SEC ID nº 32 a lo largo de la longitud total de SEC ID nº 32;
- 10 para la utilización como un medicamento en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad de resorción ósea.
- 15 2. Polipéptido aislado para la utilización según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido consiste en una secuencia que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en:
- SEC ID nº 33; y
  - una secuencia que presenta por lo menos 80% de identidad con SEC ID nº 33 a lo largo de la longitud total de SEC ID nº 33.
- 20 3. Polipéptido aislado para la utilización según la reivindicación 2, en el que dicho polipéptido consiste en una secuencia que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en:
- SEC ID nº 1; y
  - una secuencia que presenta por lo menos 80% de identidad con SEC ID nº 1 a lo largo de la longitud total de SEC ID nº 1.
- 25 4. Polipéptido aislado para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha enfermedad de resorción ósea se selecciona de entre el grupo que consiste en:
- osteoporosis, enfermedad ósea osteolítica, cánceres óseos primarios, cánceres óseos secundarios, enfermedad periodontal y artritis reumatoide.
- 30 5. Polipéptido aislado para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho polipéptido consiste en una secuencia que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en:
- SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19, SEC ID nº 20, SEC ID nº 21, SEC ID nº 22, SEC ID nº 23, SEC ID nº 32 y SEC ID nº 33.
- 35 6. Polipéptido aislado para la utilización según la reivindicación 5, en el que dicho polipéptido consiste en una secuencia que comprende o consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en:
- SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19, SEC ID nº 20, SEC ID nº 21, SEC ID nº 22 y SEC ID nº 23.
- 40 7. Polipéptido aislado para la utilización según la reivindicación 5, en el que dicho polipéptido consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en:
- SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19, SEC ID nº 20, SEC ID nº 21, SEC ID nº 22, SEC ID nº 23, SEC ID nº 32 y SEC ID nº 33.
- 45 8. Polipéptido aislado para la utilización según la reivindicación 7, en el que dicho polipéptido consiste en una secuencia que consiste en:
- SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 7, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10, SEC ID nº 11, SEC ID nº 12, SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15, SEC ID nº 16, SEC ID nº 17, SEC ID nº 18, SEC ID nº 19, SEC ID nº 20, SEC ID nº 21, SEC ID nº 22 y SEC ID nº 23.
- 50 55 60 65

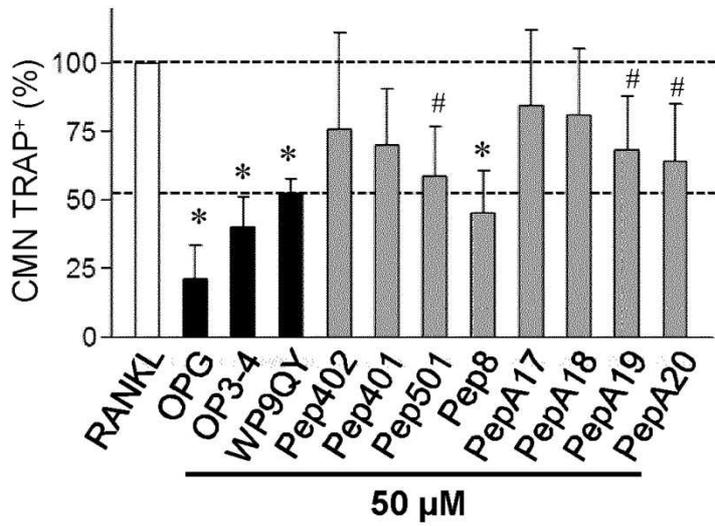
- 5 9. Polipéptido aislado para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho polipéptido contiene por lo menos una modificación bioquímica seleccionada de entre el grupo que consiste en pegilación, acetilación, formilación, adición de ácido mirístico, palmitoilación, benciloxicarbonilación, amidación, succinilación, glucosilación, en particular pegilación.
- 10 10. Polipéptido aislado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.
11. Polipéptido aislado según la reivindicación 10, en el que dicho polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID nº 2.
12. Molécula de ácidos nucleicos aislados que codifica un polipéptido aislado como se define en la reivindicación 10 u 11.
13. Vector que comprende una molécula de ácidos nucleicos como se define en la reivindicación 12.
14. Célula hospedadora que comprende una molécula de ácidos nucleicos como se define en la reivindicación 12 o un vector como se define en la reivindicación 13.
- 15 15. Composición farmacéutica que comprende por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en un polipéptido aislado como se define en la reivindicación 10 u 11, una molécula de ácidos nucleicos aislados como se define en la reivindicación 12 y un vector como se define en la reivindicación 13.
- 20 16. Polipéptido aislado como se define en la reivindicación 10 u 11 o molécula de ácidos nucleicos aislados como se define en la reivindicación 12 o vector como se define en la reivindicación 13 para la utilización como un medicamento.
- 25 17. Producto de combinación que comprende:
- 30 - por lo menos un compuesto seleccionado de entre el grupo que consiste en un polipéptido aislado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, una molécula de ácidos nucleicos aislados que codifica dicho polipéptido y un vector que comprende dicha molécula de ácidos nucleicos; y
- 35 - otro agente antiresorción ósea;
- para la utilización simultánea, separada o secuencial como un medicamento.
18. Producto de combinación para la utilización según la reivindicación 17, en el que dicho otro agente antiresorción ósea se selecciona de entre el grupo que consiste en:
- 40 - potenciadores del anabolismo, seleccionados en particular de entre el grupo que consiste en hormona paratiroidea, BMP2, vitamina D, agentes antiinflamatorios; y
- 45 - inhibidores del catabolismo, seleccionados en particular de entre el grupo que consiste en bisfosfonatos, inhibidores de la catépsina K, inhibidores de p38, inhibidores de JNK, inhibidores de IKK, inhibidores de NF-κB, inhibidores de calcineurina, inhibidor de NFAT, inhibidor de PI3K.
19. Producto de combinación según la reivindicación 17 o 18, para la utilización en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad de resorción ósea.

Figura 1

**A**



**B**



**C**

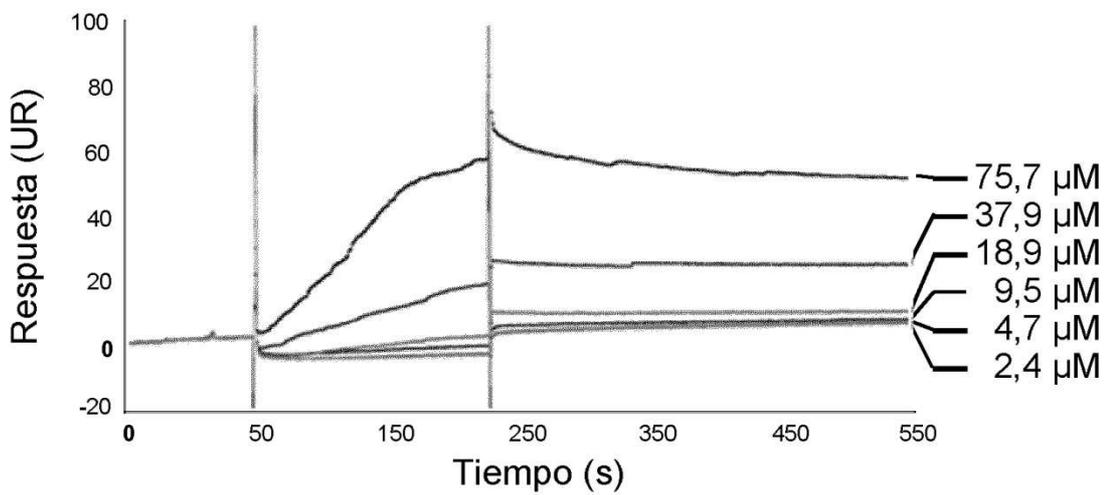


Figura 2

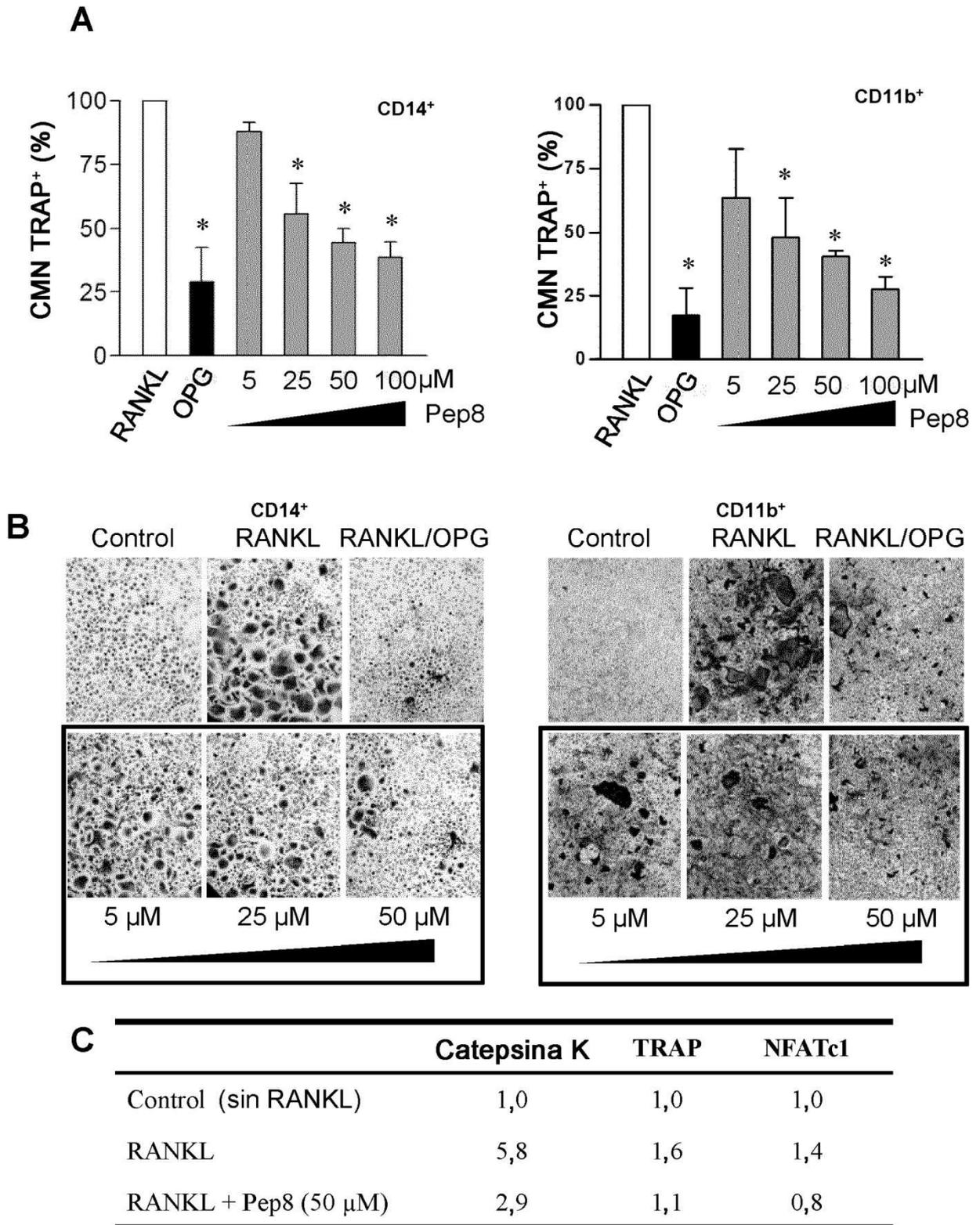


Figura 3

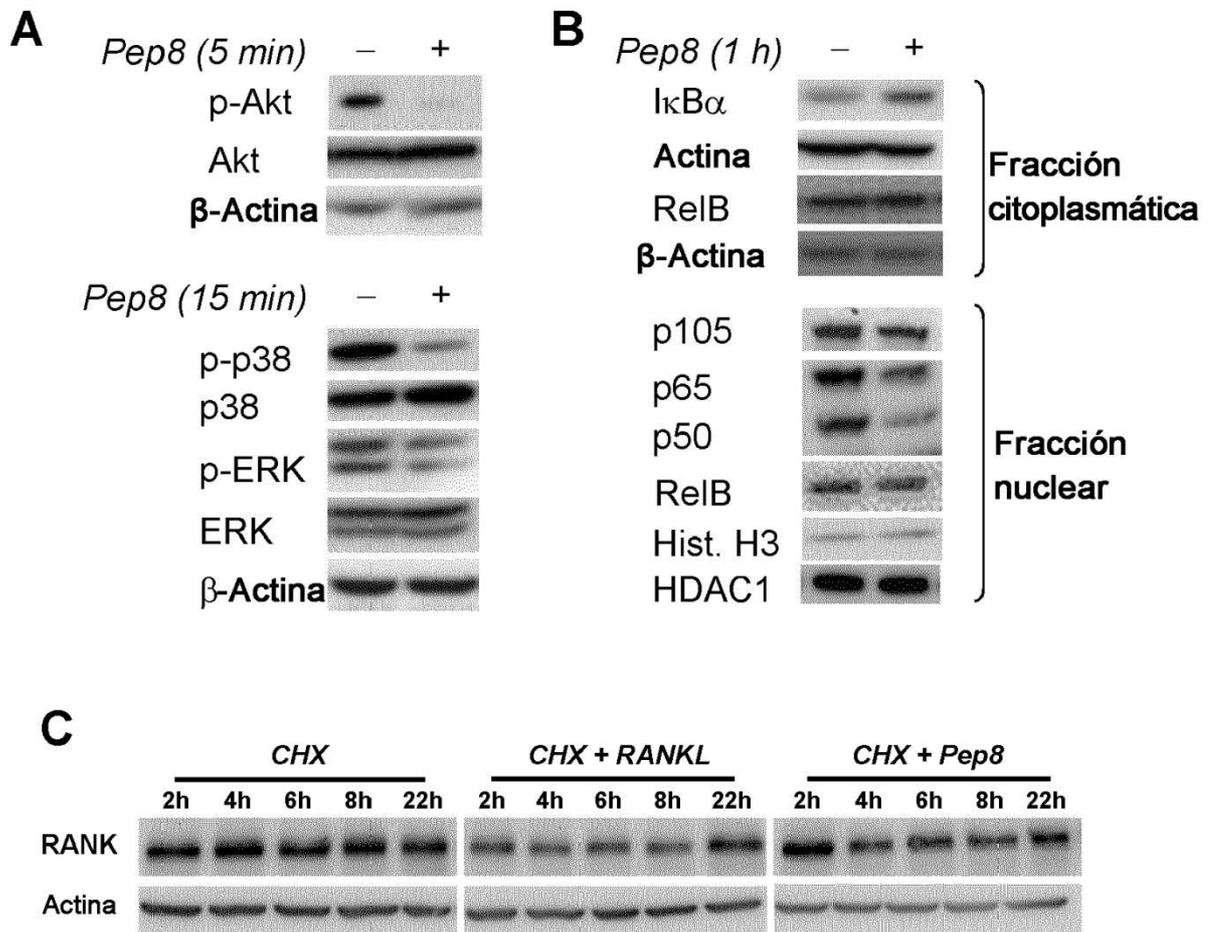


Figura 4

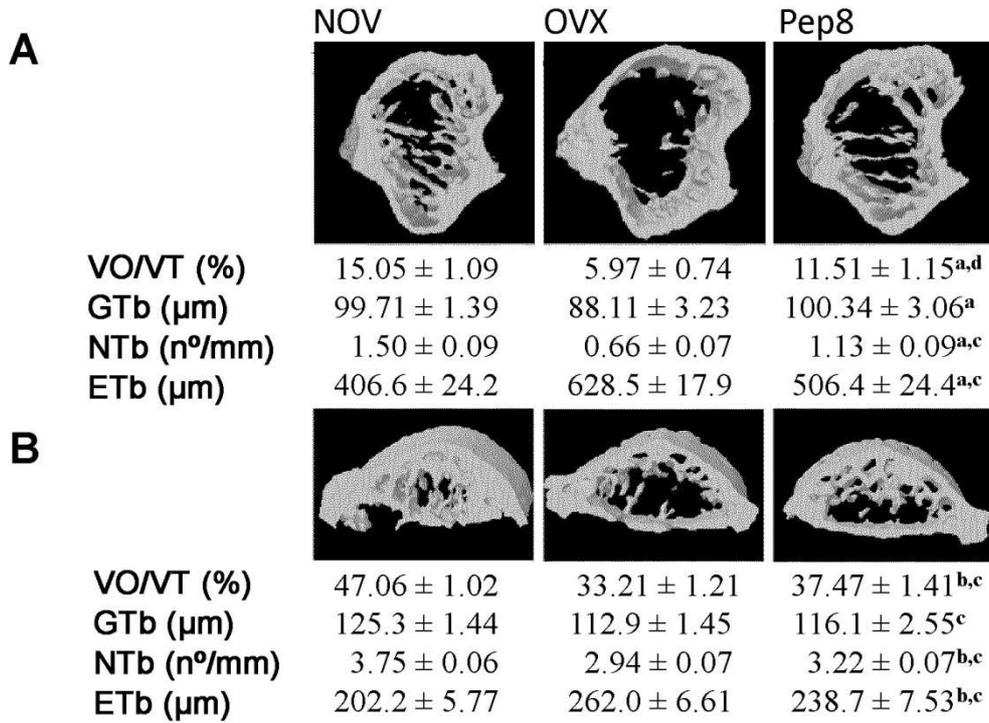


Figura 5

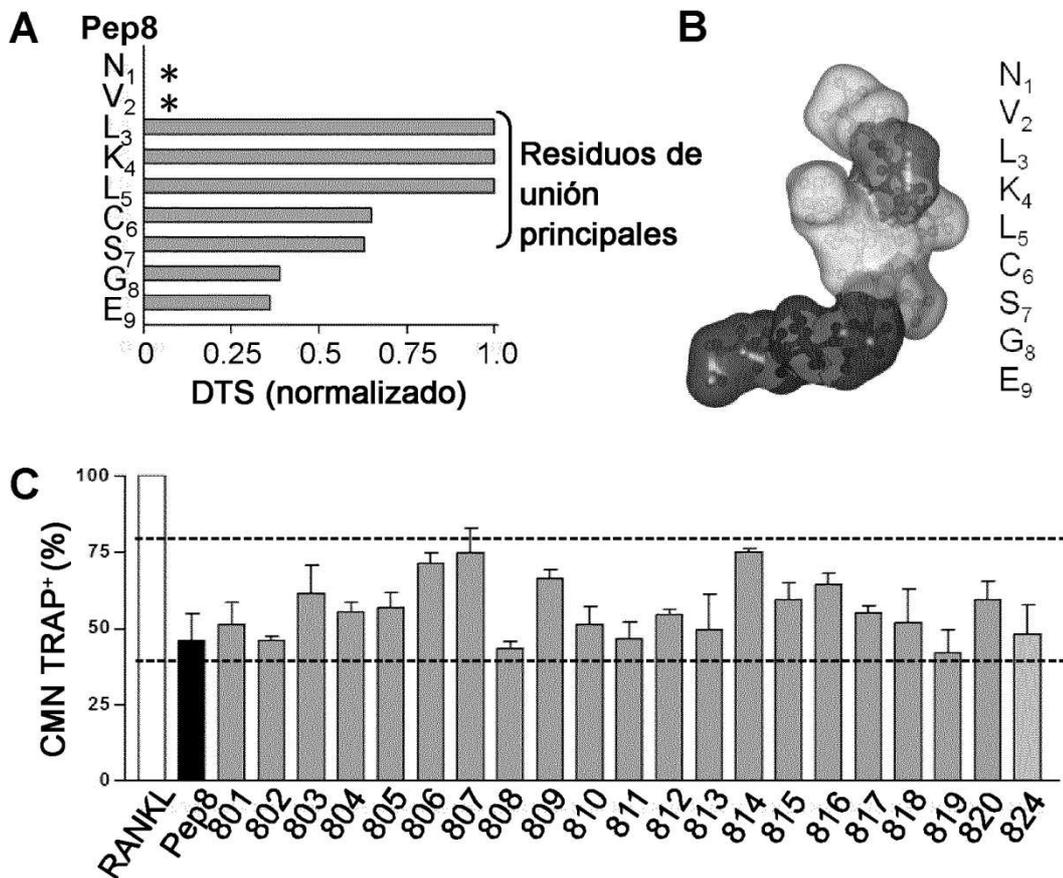


Figura 6

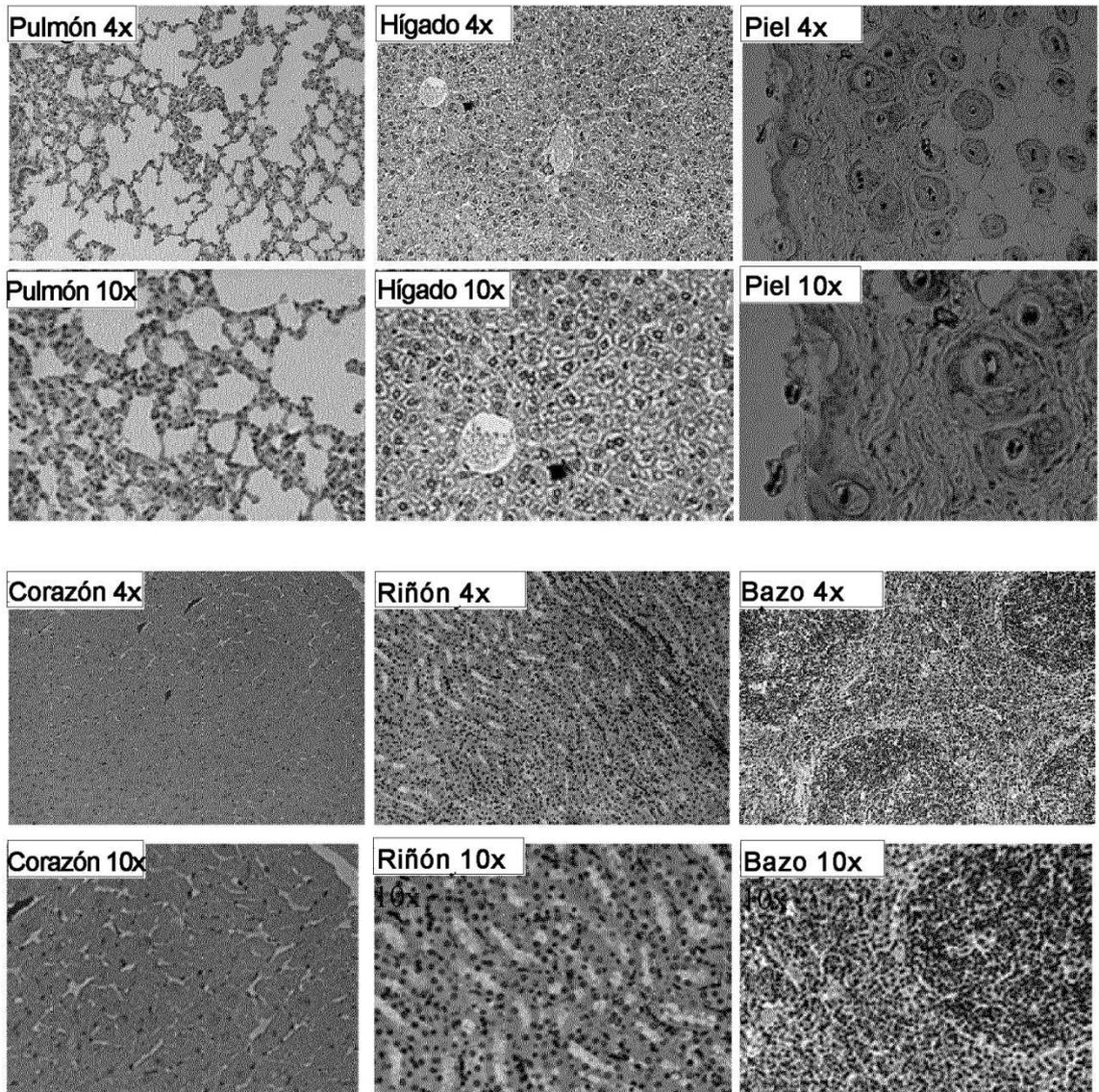


Figura 7

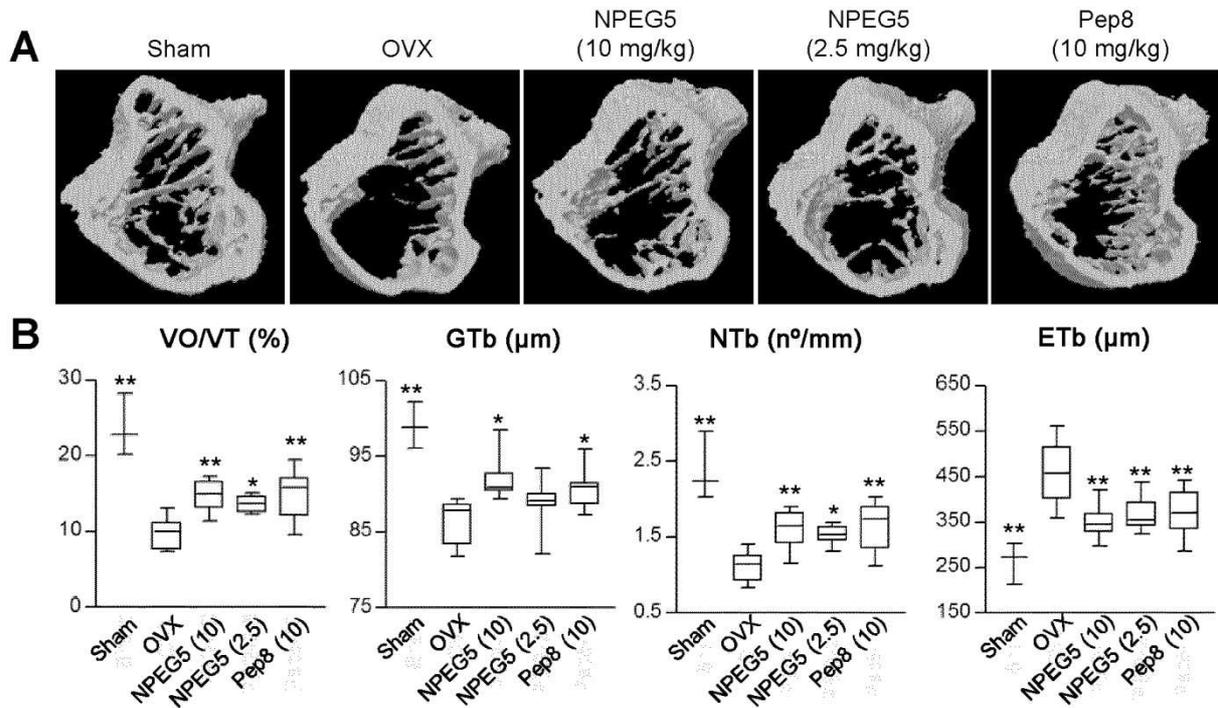


Figura 8

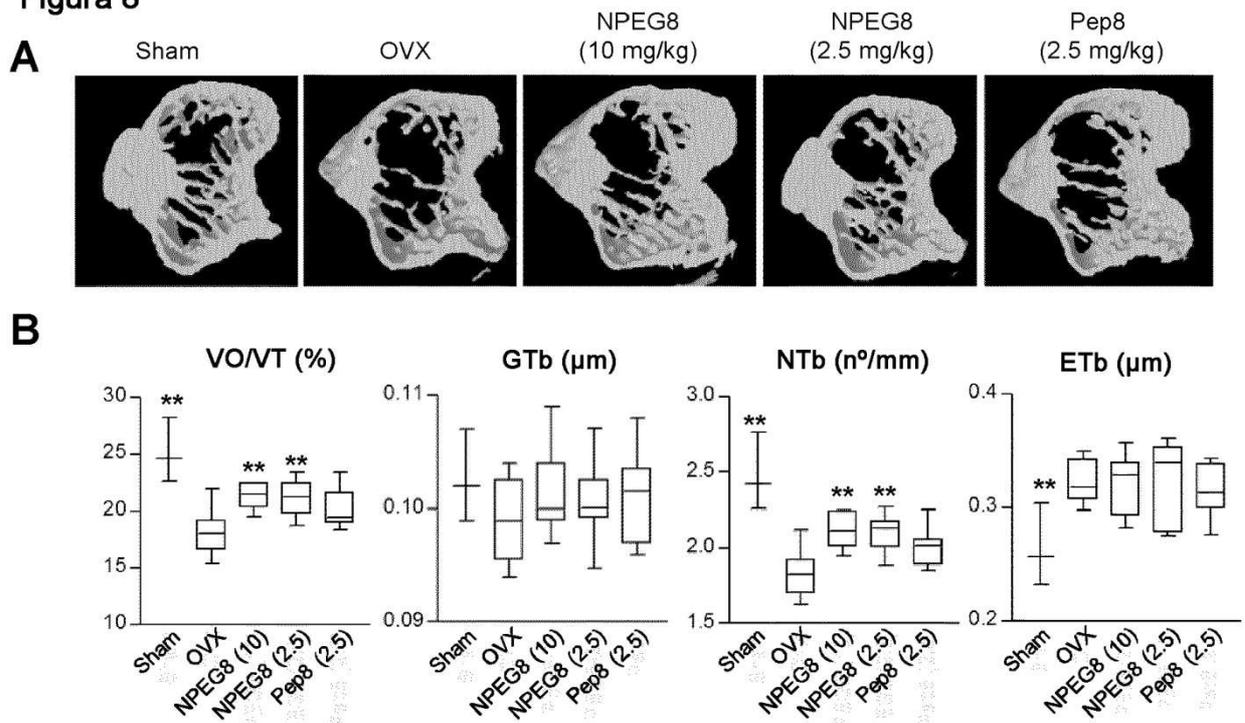


Figura 9

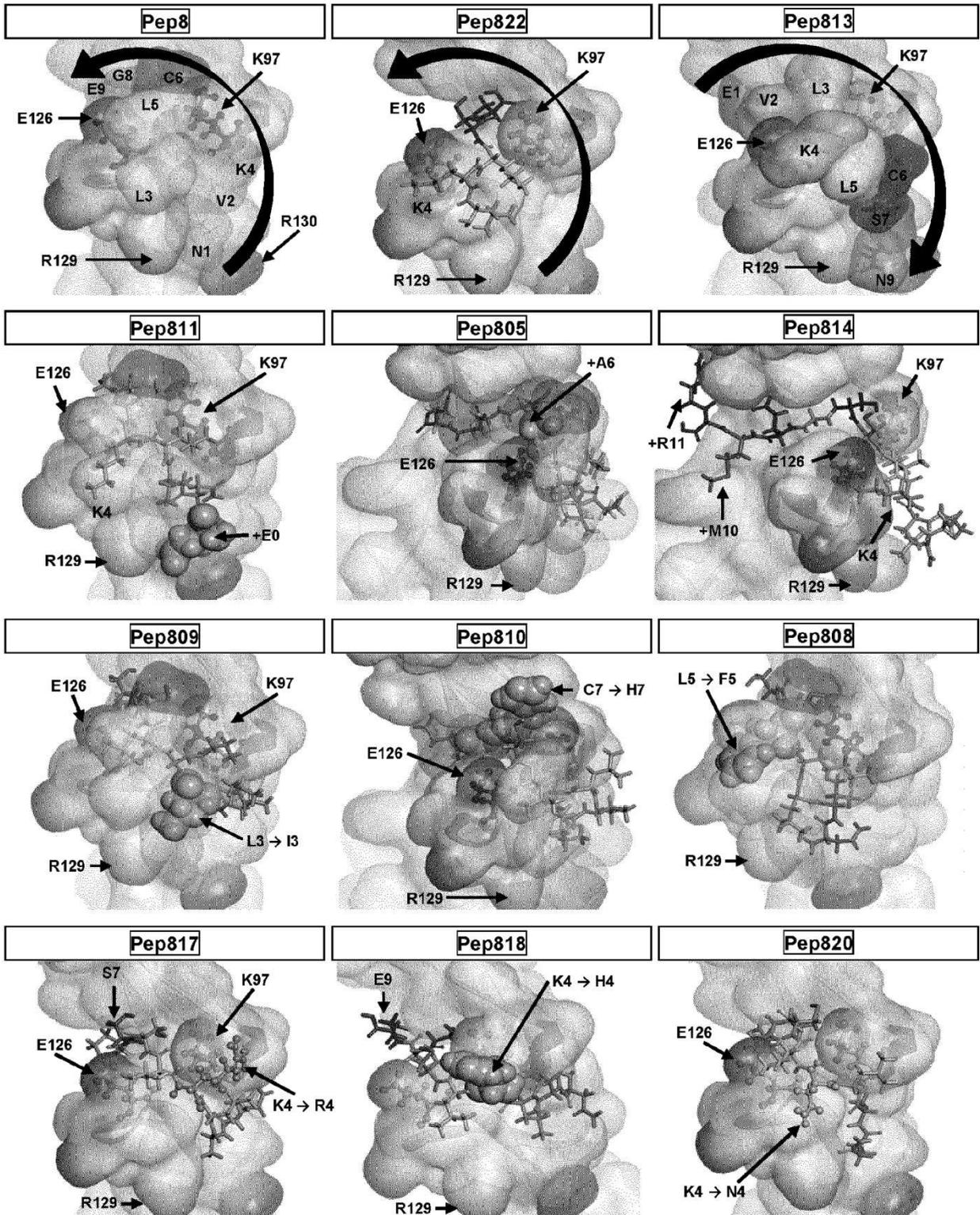


Figura 10

