

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 507**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28	(2006.01)	A61K 39/00	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)	A61K 38/00	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)		
A61K 31/7088	(2006.01)		
G01N 33/68	(2006.01)		
G01N 33/577	(2006.01)		
G01N 33/53	(2006.01)		
A61P 19/02	(2006.01)		
A61P 37/00	(2006.01)		
C07K 14/705	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2000** **E 10174749 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016** **EP 2267029**

54 Título: **Métodos y composiciones para el tratamiento de enfermedad inflamatoria mediante el uso de agentes moduladores de cadherina-11**

30 Prioridad:

03.09.1999 US 152456 P
13.09.1999 US 153490 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.11.2016

73 Titular/es:

THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(100.0%)
75 Francis Street
Boston, MA 02115, US

72 Inventor/es:

BRENNER, MICHAEL y
VALENCIA, XAVIER

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 592 507 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para el tratamiento de enfermedad inflamatoria mediante el uso de agentes moduladores de cadherina-11

Campo de la Invención

5 Esta invención se refiere a métodos y composiciones para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de las articulaciones, tales como aquellas que implican hiperplasia sinovial y sobreproducción de factores biológicamente activos. Los métodos implican administrar un agente modulador de cadherina-11 a un sujeto para modular la función de cadherina-11 en áreas de lesión articular. También se proporcionan ensayos de cribado para la identificación de agentes moduladores de cadherina-11.

Antecedentes de la Invención

10 Se cree que las interacciones adhesivas entre células y entre las células y la matriz extracelular desempeñan papeles críticos en una amplia variedad de procesos, incluyendo, por ejemplo, la modulación del sistema inmunitario, la regulación de procesos de desarrollo y la progresión y metástasis tumorales. Estas interacciones están mediadas por moléculas de adhesión que transducen la información desde la matriz extracelular a la intracelular.

15 Se han identificado cuatro familias de moléculas de adhesión que median estas interacciones: las integrinas, las cadherinas, las selectinas, y las moléculas relacionadas con inmunoglobulinas. En general, las moléculas de adhesión son proteínas transmembránicas que contienen un dominio extracelular para interactuar con una matriz extracelular o componente celular, un dominio transmembránico que se extiende por la membrana celular, y un dominio citoplásmico para interactuar con uno o más componentes citoesqueléticos o citoplásmicos.

20 Las cadherinas desempeñan un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de conexiones intercelulares entre células del mismo tipo (revisado en Geiger B. et al. (1992) Annual Review of Cell Biology 8:307; Kemler R. (1993) Trends in Gastroenterology 9:317; Takeichi M. (1990) Annual Review of Biochem. 59:237; Takeichi M. (1991) Science 251: 1451). Las cadherinas son una superfamilia de moléculas estructuralmente relacionadas que funcionan en la adhesión homófila dependiente de Ca^{+2} . Las cadherinas son expresadas en células que forman tejidos sólidos, y son responsables de segregar y clasificar células durante la embriogénesis, de establecer la polaridad celular, y de mantener la morfología tisular. Estructuralmente, las cadherinas son polipéptidos monocatenarios que se sintetizan como precursores y se escinden durante el procesamiento post-traduccional. Tienen grandes regiones extracelulares formadas por 5 dominios homólogos, un segmento transmembránico individual y una cola citoplásmica.

25 Las cadherinas son sintetizadas como precursores, que se escinden durante el procesamiento post-traduccional. Las cadherinas maduras son moléculas monocatenarias que incluyen un dominio extracelular relativamente grande (dividido típicamente en cinco secciones o "ectodominios"), una única región transmembránica y una cola citoplásmica. Entre las cadherinas clásicas (es decir, la cadherina P (de la placenta), E (epitelial) y N (neural)), el dominio citoplásmico contiene el grado más elevado de homología. El elevado grado de homología observado para el dominio citoplásmico dado a conocer es un reflejo de la asociación de cadherinas con un grupo de proteínas intracelulares, denominadas cateninas, que estabilizan la conformación activa de cadherina (Kemler R. (1993) Trends in Gastroenterology 9:317). Se cree generalmente que las secuencias en el dominio extracelular son necesarias para mediar la unión homófila (es decir, cadherina a cadherina). Un repaso de la bibliografía indica que la investigación dirigida a comprender la adhesión mediada por cadherinas se ha centrado en los esfuerzos para elucidar el mecanismo subyacente a la adhesión celular homófila mediada por cadherinas. Se ha prestado poca atención a comprender qué papel, si lo hay, desempeñan las cadherinas en la adhesión heterófila. Mientras que se ha sabido desde hace cierto tiempo que las integrinas y otras moléculas de adhesión funcionan en la modulación del sistema inmunitario, por ejemplo desempeñando un papel en la adhesión de linfocitos periféricos al endotelio y devolviéndolos a los nódulos linfáticos, se sabe relativamente poco con respecto al mecanismo mediante el cual los linfocitos regresan y transmigran a través del endotelio vascular para dirigirse específicamente a ciertas localizaciones tisulares, tales como el sinovio.

30 La secuencia más altamente conservada compartida por cadherinas se encuentra en el dominio citoplásmico. Es esta región la que media la interacción con las proteínas catenínicas citoplásmicas (Hirano S. et al. Cell 70:293-301, 1992). La presencia del dominio citoplásmico es esencial para el funcionamiento de la cadherina, puesto que supresiones en esta región suprimen la unión a catenina así como la adhesión de célula a célula (Hulsken J, et al. J Cell Biol 127:1375-80, 1994). Las cateninas (α , 102 kDa; β , 88-93 kDa, y γ , 80-83 kDa) comienzan a asociarse con cadherinas casi inmediatamente con la biosíntesis de una manera estable que no es interrumpida en detergente TX-100 (Takeichi M. Curr Opin Cell Biol 7:619-27, 1995), y se piensa que median el anclaje de las cadherinas al citoesqueleto (Yap AS. et al. Annu Rev Cell Dev Biol 13:11946, 1997). Funcionalmente, la α -catenina es necesaria para la adhesión homófila mediada por cadherinas. Las células tumorales que expresan cadherina E en la superficie celular, pero que carecen de la expresión de α -catenina, no forman contactos de célula con célula excepto que se restaure la expresión de α -catenina a través de la transfección (Chen H. et al. J Cell Sci 114:1345-56, 1997; y

Knudsen KA. et al. J Cell Biol 130:67-77, 1995). La β -catenina es homóloga a la proteína de polaridad de segmento de *Drosophila* armadillo, así como a la proteína asociada a cadherina placoglobina. Placoglobina, también denominada γ -catenina, interacciona más débilmente con el complejo cadherina/catenina, y no siempre se observa en precipitados de cadherina.

- 5 Se ha aislado un número de clones de ADNc de cadherina recientemente identificados usando oligonucleótidos de consenso que corresponden a secuencias del dominio citoplásmico que están muy conservadas entre cadherinas y clonándolos mediante PCR (Suzuki S. et al. Cell Reg 2:261-70, 1991).

Aunque la función de las cadherinas implica clásicamente la adhesión homófila de célula a célula (es decir, la cadherina E se une a la cadherina E típicamente en otra célula del mismo tipo), sin embargo la cadherina E murina expresada en queratinocitos epidérmicos también media la adhesión a cadherina E de células de Langerhans (Tang A. et al. Nature 361:82-5, 1993). Recientemente, se ha identificado otro contrarreceptor para cadherina E, a saber, la integrina $\alpha^E\beta_7$, que es expresada en células T intraepiteliales (Cepek KL. et al. Nature 372:190-3, 1994 y patente U.S. nº 5.610.281). Esto representa un ejemplo de unión heterófila de cadherina E al contrarreceptor de integrina $\alpha^E\beta_7$.

15 La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad autoinmunitaria sistémica crónica de etiología desconocida que afecta a 1-2% de la población. Está dominada por la destrucción articular progresiva, que puede dar como resultado una discapacidad notable. Histológicamente, las articulaciones revelan hiperplasia sinovial principalmente de sinoviocitos tipo A, pero también de sinoviocitos tipo B, infiltración linfocelular de células T y B, y neovascularización. Estos procesos conducen a la secreción de factores destructivos y al crecimiento invasivo de la membrana sinovial (paño) en el cartílago adyacente y hueso, con la destrucción consiguiente de la articulación.

20 El documento WO99/35166 describe un método para utilizar agentes moduladores con el fin de potenciar o inhibir la adhesión celular mediada por la ocludina en varios contextos *in vivo* e *in vitro*, por ejemplo, la artritis reumatoide. Se describen agentes moduladores multifuncionales que incluyen una cadherina-VE o cadherina-OB para la disrupción de la adhesión celular.

25 **Sumario de la Invención**

La presente invención proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de ácido nucleico inhibidora de cadherina-11, en la fabricación de un medicamento para tratar un sujeto que tiene un trastorno inflamatorio de las articulaciones, en el que la molécula de ácido nucleico inhibidora de cadherina-11 se selecciona del grupo que consiste en:

30 (1) un oligonucleótido que es un oligorribonucleótido, oligodesoxirribonucleótido, oligorribonucleótido modificado, u oligodesoxirribonucleótido modificado que se hibrida en condiciones fisiológicas a un ácido desoxirribonucleico (ADN) que comprende un gen de cadherina-11 e inhibe la transcripción del gen de cadherina-11; y

35 (2) un oligonucleótido que es un oligorribonucleótido, oligodesoxirribonucleótido, oligorribonucleótido modificado, u oligodesoxirribonucleótido modificado que se hibrida en condiciones fisiológicas a un transcrito de ARN mensajero (ARNm) de un gen de cadherina-11 e inhibe la traducción del transcrito de ARNm.

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de la expresión de ARNm y de la proteína de cadherina-11 en células, a saber, sinoviocitos tipo B humanos, recuperados del sinovio de pacientes con trastornos inflamatorios de las articulaciones. Antes del presente descubrimiento, no se había dado a conocer la expresión de cadherina-11 en el sinovio. Aunque no se pretende estar atados por ninguna teoría particular, se postula que la expresión de cadherina-11 en células del sinovio está implicada en el alojamiento, retención y activación de células (tales como células T y B) en esta área. Además, también se postula que la adhesión mediada por cadherina-11 media la invasión del sinovio en el cartílago y el hueso durante algunos trastornos inflamatorios de las articulaciones. El contacto de sinoviocito-sinoviocito también puede estar implicado en algunos de estos trastornos. La adhesión mediada por cadherina-11 se puede caracterizar como homófila (unión de cadherina-11 a cadherina-11) o heterófila (unión de cadherina-11 a un contrarreceptor que no es cadherina-11). En consecuencia, algunas de las composiciones y métodos que se describen aquí se dirigen a inhibir la adhesión mediada por cadherina-11 que se produce entre éstas y otros tipos de células. Todavía otros métodos y composiciones que se describen aquí implican la modulación de funciones celulares que están mediadas por cadherina-11, tales como, por ejemplo, la señalización celular, la proliferación, la apoptosis y la secreción de factores.

50 De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de ácido nucleico inhibidora de cadherina-11 en la fabricación de un medicamento para tratar un sujeto que tiene un trastorno inflamatorio de las articulaciones. El uso implica administrar a un sujeto que necesite de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de ácido nucleico inhibidora de cadherina-11. En realizaciones preferidas, el sujeto es un ser humano. En realizaciones más preferidas, el sujeto no tiene una adhesión anormal mediada por cadherina-11 que se produce en el hígado o el cerebro. La adhesión mediada por cadherina-11 es la unión de cadherina-11 a su contrarreceptor.

En una realización, el trastorno inflamatorio de las articulaciones es sinovitis crónica. En otra realización, el trastorno

inflamatorio de las articulaciones es una enfermedad autoinmunitaria. En una realización preferida, la enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide.

En realizaciones preferidas, el ácido nucleico inhibidor de cadherina-11 se administra localmente a un sinovio o al líquido sinovial de un sujeto.

5 Los agentes inhibidores de cadherina-11 descritos aquí pueden ser cadherina-11 que se une a un contrarreceptor de cadherina-11 de muchas maneras. En una realización, el agente inhibidor de cadherina-11 se une selectivamente a cadherina-11. En otra realización, el agente inhibidor de cadherina-11 se une selectivamente a un contrarreceptor de cadherina-11. Los agentes inhibidores ejemplares se describen en la descripción detallada. En todas estas realizaciones, el agente inhibidor de cadherina-11 funciona inhibiendo la adhesión mediada por cadherina-11.

10 La cadherina-11 y el contrarreceptor de cadherina-11 pueden ser expresados por el mismo tipo de células o por diferentes tipos celulares. El contrarreceptor de cadherina-11 no necesita estar sobre la superficie celular, sino más bien puede ser parte de un material intersticial, o puede ser un material segregado que se une a cualquier otra molécula o superficie. Como ejemplo de esta última realización, el contrarreceptor de cadherina-11 es un
 15 componente de una matriz extracelular de un tejido, un cartílago o un hueso. El contrarreceptor de cadherina-11 también puede ser una molécula segregada por una célula. La cadherina-11 puede ser expresada por una célula, y el contrarreceptor de cadherina-11 puede ser expresado por otra célula distinta. Las células que expresan cadherina-11 se pueden seleccionar del grupo que consiste en un sinoviocito tipo A o un sinoviocito tipo B, un fibroblasto derivado del sinovio, una célula de revestimiento de la membrana sinovial, un osteoblasto, una célula derivada de cartílago, y una célula derivada del paño invasivo. Las células que expresan el contrarreceptor de
 20 cadherina-11 se pueden seleccionar del grupo que consiste en un linfocito T, un linfocito B, una célula del plasma, un macrófago, una célula dendrítica, una célula asesina natural (NK), un mastocito, un sinoviocito tipo A o un sinoviocito tipo B, un fibroblasto derivado del sinovio, un osteoblasto, una célula derivada de cartílago, una célula de revestimiento de la membrana sinovial, y una célula derivada del paño invasivo.

25 Los agentes moduladores de cadherina-11 descritos aquí, tales como, por ejemplo, los agentes inhibidores de cadherina-11, no son anticuerpos, tales como por ejemplo anticuerpos monoclonales.

Los agentes de la invención no incluyen los anticuerpos descritos en la patente U.S. 5.597.725 y en la Solicitud PCT PCT/US93/03681 (documento WO/93/21302). De este modo, en ciertas realizaciones relacionadas, los agentes de la invención no abarcan los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas designados como 30Q8A (HB11316), 30Q4H (HB11317), 45A5G (HB 11318), 30S2F (HB11319), 45C6A (HB 11320), 30T11G (HB 11324),
 30 64G11F (HB 11527).

También se describe aquí un método para cribar una librería molecular para identificar un agente (por ejemplo, un compuesto líder farmacéutico) que module la adhesión mediada por cadherina-11 entre una primera célula que expresa cadherina-11 y una segunda célula que expresa un contrarreceptor de cadherina-11. El agente puede inhibir
 35 la adhesión mediada por cadherina-11, en cuyo caso es un agente inhibidor de cadherina-11. El método implica llevar a cabo un primer ensayo de adhesión entre la primera célula y la segunda célula, para obtener un primer resultado del ensayo de adhesión, llevar a cabo un segundo ensayo de adhesión entre la primera célula y la segunda célula en presencia de al menos un miembro de la librería molecular, para obtener un segundo resultado del ensayo de adhesión, y comparar los resultados primero y segundo del ensayo de adhesión para determinar si el
 40 al menos un miembro de la librería molecular modula la adhesión mediada por cadherina-11 entre la primera célula y la segunda célula. Los tipos celulares, las moléculas de cadherina y los agentes inhibidores son como se describen anteriormente y en la descripción detallada.

La primera célula puede ser seleccionada del grupo que consiste en un sinoviocito, tal como un sinoviocito tipo A, un sinoviocito tipo B, un fibroblasto derivado del sinovio, una célula de revestimiento de la membrana sinovial, y un osteoblasto. La segunda célula se puede seleccionar del grupo que consiste en un sinoviocito tipo A, un sinoviocito
 45 tipo B, un fibroblasto derivado del sinovio, una célula de revestimiento de la membrana sinovial, un osteoblasto, un linfocito T, un linfocito B, una célula del plasma, un macrófago, una célula dendrítica, una célula asesina natural, y un mastocito. La primera célula puede ser derivada del paño invasivo, y la segunda célula puede ser derivada de cartílago. La primera célula puede ser derivada del paño invasivo, y la segunda célula puede ser un osteoblasto.

Según el método de cribado descrito, una diferencia en los resultados primero y segundo del ensayo de adhesión indica la presencia de al menos un elemento de la librería molecular que modula la adhesión mediada por cadherina-
 50 11 entre la primera célula y la segunda célula. El ensayo se puede diseñar para identificar agentes que inhiben o potencian la adhesión mediada por cadherina-11.

La librería molecular se puede producir recombinantemente, o se puede sintetizar químicamente. La librería molecular puede ser una librería peptídica.

55 También se describe aquí un otro método para cribar una librería molecular para identificar un compuesto líder farmacéutico que module la adhesión mediada por cadherina-11. El método implica llevar a cabo un primer ensayo de adhesión entre cadherina-11 y un contrarreceptor de cadherina-11, para obtener un primer resultado del ensayo de adhesión, llevar a cabo un segundo ensayo de adhesión entre cadherina-11 y el contrarreceptor de cadherina-11

en presencia de al menos un miembro de la librería molecular, para obtener un segundo resultado del ensayo de adhesión, y comparar los resultados primero y segundo de los ensayos de adhesión para determinar si el al menos un miembro de la librería molecular modula la adhesión mediada por cadherina-11.

5 El contrarreceptor de cadherina-11 puede ser seleccionado del grupo que consiste en una cadherina, una integrina, una subunidad de integrina, un miembro de la familia de inmunoglobulinas, y un hidrato de carbono. La cadherina puede ser cadherina-11. El contrarreceptor de cadherina-11 puede ser un polipéptido de fusión de cadherina-11. El contrarreceptor de cadherina-11 puede ser un anticuerpo que se une selectivamente a cadherina-11.

La cadherina-11 y/o el contrarreceptor de cadherina-11 se pueden aislar. La cadherina-11 y/o el contrarreceptor de cadherina-11 también pueden ser solubles.

10 La cadherina-11 puede ser presentada por una célula. El contrarreceptor de cadherina-11 puede ser presentado por una célula. La célula que expresa cadherina-11 se puede seleccionar del grupo que consiste en un sinoviocito de tipo A o un sinoviocito de tipo B, un fibroblasto derivado del sinovio, una célula de revestimiento de la membrana sinovial, un osteoblasto, una célula derivada de cartílago, y una célula derivada del paño invasivo. La célula que expresa el contrarreceptor de cadherina-11 se puede seleccionar del grupo que consiste en un sinoviocito, un fibroblasto derivado del sinovio, una célula de revestimiento de la membrana sinovial, un osteoblasto, una célula derivada de cartílago, una célula derivada del paño invasivo, un linfocito T, un linfocito B, una célula del plasma, un macrófago, una célula dendrítica, un mastocito, y una célula asesina natural. El contrarreceptor de cadherina-11 puede ser un componente de una matriz extracelular de tejido, cartílago o hueso, o puede ser una molécula segregada por una célula y encontrada en cualquier parte en un tejido.

20 También se describe aquí un método para tratar un sujeto que tiene un trastorno inflamatorio de las articulaciones, que comprende administrar a un sujeto que necesite de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que modula una función celular en una célula que expresa cadherina-11, preferiblemente una función celular distinta de la adhesión mediada por cadherina-11. El agente puede modular la actividad interaccionando directamente cadherina-11 (por ejemplo, un agente de unión que se une selectivamente a cadherina-11 y modula de ese modo su actividad), o indirectamente interaccionando con otro componente celular, el cual modula entonces la actividad de cadherina-11. La función celular se puede seleccionar del grupo que consiste en proliferación celular, secreción de factores, apoptosis, migración, y/o unión. El agente que modula una función celular en una célula que expresa cadherina-11 puede no inhibir la unión de cadherina-11 a un contrarreceptor de cadherina-11. La función celular puede no ser la unión de cadherina-11 a un contrarreceptor de cadherina-11 (es decir, la función celular puede no ser la adhesión mediada por cadherina-11).

35 Se describe además un método para cribar una librería molecular para identificar un compuesto líder farmacéutico que modula una función celular en una célula que expresa cadherina-11 (preferiblemente, una función celular distinta de la adhesión mediada por cadherina-11). El método comprende determinar un primer valor de la función celular para una célula que expresa cadherina-11 en ausencia de un miembro de la librería molecular, determinar un segundo valor de la función celular para una célula que expresa cadherina-11 en presencia de al menos un miembro de la librería molecular, y comparar el primer valor y el segundo valor para determinar si el al menos un miembro de la librería molecular modula una función celular en una célula que expresa cadherina-11. La función celular se puede seleccionar del grupo que consiste en proliferación celular, secreción de factores, apoptosis, migración y/o unión.

40 También se describe aquí un método similar para cribar una librería molecular para identificar un compuesto líder farmacéutico que modula la secreción de factores en una célula que expresa cadherina-11. La secreción de factores se puede seleccionar del grupo que consiste en la secreción de estromelina, secreción de colágeno, secreción de colagenasa y secreción de IL-6.

45 De manera similar, el método de cribado se puede usar para identificar compuestos líder farmacéuticos que modulan una función celular en una célula que expresa el contrarreceptor de cadherina-11. El compuesto líder farmacéutico se puede cribar según su capacidad para inhibir la unión de cadherina-11 a un contrarreceptor de cadherina-11. El compuesto líder farmacéutico puede no inhibir la unión de cadherina-11 a su contrarreceptor. De este modo, la función celular que se modula puede no ser la unión de cadherina-11 a un contrarreceptor de cadherina-11.

50 Se describe además una composición farmacéutica (es decir, una preparación farmacéutica) que comprende una cantidad eficaz de un agente modulador de cadherina-11 (por ejemplo, un agente inhibidor de cadherina-11) y un vehículo farmacéuticamente aceptable, así como un método para obtener tal comparación. El agente modulador de cadherina-11 está presente en una cantidad eficaz para modular la función de cadherina-11. Si el agente es un agente inhibidor de cadherina-11, entonces puede estar presente en una cantidad eficaz para inhibir la adhesión mediada por cadherina-11 (tal como, por ejemplo, aquella que se produce en el sinovio). La composición puede estar contenida en una jeringuilla para inyección localmente al sinovio, líquido sinovial, articulación o cápsula articular de un sujeto.

También se describe aquí un método para obtener una composición farmacéutica, una preparación farmacéutica y/o un medicamento, es decir, colocando el agente modulador de cadherina-11 (por ejemplo, un agente inhibidor de cadherina-11) en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición o preparación farmacéutica puede

contener uno o más agentes moduladores de cadherina-11, y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos que son útiles en el tratamiento del trastorno descrito aquí (por ejemplo, NSAID).

Estos y otros aspectos de la invención, así como diversas ventajas y utilidades, serán más manifiestos con referencia a la descripción detallada de las realizaciones preferidas y a los dibujos que se acompañan.

5 **Breve Descripción de los Dibujos**

Los Ejemplos se refieren e incluyen una breve descripción de diversas figuras. Se entenderá que los dibujos o figuras son solamente ilustrativos y no se requieren para permitir las invenciones descritas aquí.

10 La Figura 1 ilustra productos de PCR separados mediante electroforesis en gel. En la línea 1 se muestra el control negativo, y en la línea 2 se muestra el producto de tamaño de 385 pb esperado obtenido en ADNc de sinoviocitos de tipo B.

15 La Figura 2 ilustra resultados procedentes de un análisis Northern de ARNm a partir de la estirpe 16E6.A5 EpC (línea 1), sinoviocitos tipo B (línea 2), células Jurkat (línea 3) y la estirpe celular de neuroblastoma SKNSH (línea 4), hibridada con el fragmento de 385 pb de cadherina-11 (panel superior), y una sonda de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Clontech) (panel inferior) como control. En la izquierda se indican los marcadores de masa molecular.

20 La Figura 3 es un esquema de la estructura de la proteína de fusión humana de cadherina-11 con Fc. Se muestra la secuencia de la región yuxtamembránica extracelular de cadherina-11 de tipo salvaje y las alteraciones que resultan de la fusión con la región Fc humana. Las regiones que corresponden a la porción Fc se muestran en negrita.

25 La Figura 4 es una serie de histogramas de citometría de flujo que muestran la expresión de cadherina-11 sobre la superficie celular en células L transfectadas con ADNc de cadherina-11. Se muestran las células L transfectadas con pLK-neo (columna izquierda) o con pLK-neo/C11 (columna derecha). La tinción con el mAb de control P3 se muestra no sombreada. La tinción con α Cad-11, 3H10, 5H6, y 2G4 se muestra sombreada.

30 La Figura 5 es una fotocopia de una fotografía que ilustra la tinción inmunohistoquímica de células de revestimiento sinoviales y algunas células por debajo del revestimiento en sinovitis de RA, usando el mAb 2G4. Secciones tisulares congeladas de sinovio de RA humana (panel A y B) se tiñeron mediante el método de inmunoperoxidasa indirecta, usando el mAb 2G4, y se contratiñeron con hematoxilina (aumento 20x [panel A] y 60x [panel B]). La mayoría de las células del revestimiento, y unas pocas en el subrevestimiento, fueron 2G4+ (panel B).

35 La Figura 6 ilustra un análisis citométrico de flujo de la expresión de cadherina-11 por la estirpe 5 de células T sinoviales (panel izquierdo) y células CP-B (panel derecho).

La Figura 7 es una gráfica del porcentaje de células de la estirpe 5 de células T sinoviales y de células CP-B unidas a proteínas de control o cadherina-11.

Listado de Secuencias

35 SEC ID NO: 1 es la secuencia nucleotídica de ADNc de cadherina-11 humana.

SEC ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de proteína cadherina-11 humana.

SEC ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de restos 753-762 de cadherina E humana.

SEC ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de restos 840-847 de cadherina E humana.

SEC ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de restos 853-859 de cadherina E humana.

40 SEC ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de restos 865-875 de cadherina E humana.

SEC ID NO: 7 es la secuencia nucleotídica de un cebador sentido degenerado.

SEC ID NO: 8 es la secuencia nucleotídica de un cebador antisentido degenerado.

SEC ID NO: 9 es la secuencia nucleotídica del cebador XV14.

SEC ID NO: 10 es la secuencia nucleotídica del cebador XV15.

45 SEC ID NO: 11 es la secuencia nucleotídica del cebador XVCad11A.

SEC ID NO: 12 es la secuencia nucleotídica del cebador XVCad11E.

Descripción Detallada de la Invención

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que ARNm y proteína de cadherina-11 son expresados en células del sinovio de pacientes con trastornos inflamatorios de las articulaciones. El descubrimiento se hizo coprecipitando cadherina-11 con un antisuero para catenina en sinoviocitos humanos tipo B. La demostración de la expresión de una cadherina, a saber, cadherina-11, en el sinovio de un paciente con artritis reumatoide proporciona una oportunidad previamente no reconocida para seleccionar terapias que mejoren la artritis reumatoide así como otras artritis inflamatorias en las que la hiperplasia sinovial y la sobreproducción de factores tóxicos y biológicamente activos median el daño articular.

La cadherina-11 es una molécula transmembránica que, *entre otros*, media la unión de células entre sí a través de la interacción consigo mismas o sus contrarreceptores. Al igual que otras cadherinas, se propone que la cadherina-11 media la adhesión de células similares entre sí, así como la adhesión de células de diferentes estirpes entre sí. De acuerdo con el descubrimiento en el que se basa la presente invención, se propone que la cadherina-11, *entre otros*, media la adhesión entre células similares, tales como sinoviocitos, así como entre células diferentes, tales como sinoviocitos y linfocitos (por ejemplo, células T y B).

Los genes de cadherina-11 humanos y de ratón se han aislado y secuenciado previamente Suzuki S. et al. Cell Reg 2:261-70, 1991). Véase también el número de acceso Genbank NM_001797, (SEC ID NO: 1 y SEC ID NO: 2) para el ADNc de cadherina-11 humana y secuencias de aminoácidos predichas, respectivamente.

Los linfocitos tienen la capacidad para circular a lo largo de los vasos sanguíneos y entonces detectar antígenos o proporcionar protección inmunitaria en todos los tejidos. Se cree que moléculas de adhesión específicas (por ejemplo, selectinas e integrinas) y sus contrarreceptores median el alojamiento y trans migración linfocítica a través del endotelio vascular a sitios de inflamación (Springer TA. Cell 76:301-314, 1994). Cada integrina es un complejo heterodímero $\alpha\beta$ asociado no covalentemente. Se han definido subfamilias de integrinas mediante el uso de cadenas β particulares que a menudo se emparejan con una de varias cadenas α diferentes. Sólo las integrinas seleccionadas son expresadas en células T. Los miembros de la subfamilia β_1 y β_3 ($\alpha^1\beta_1$, $\alpha^2\beta_1$, $\alpha^4\beta_1$, $\alpha^5\beta_1$ y $\alpha^v\beta_3$) están implicados principalmente en la adhesión de linfocitos a la matriz extracelular, excepto para $\alpha^4\beta_1$, heterodímero (VLA-4) que se une a la molécula 1 de adhesión de células vasculares (VCAM-1), un contrarreceptor en endotelio vascular activado (Elices MJ. et al. Cell 60:577-584, 1990). De la subfamilia α , LFA-1 ($\alpha^L\beta_2$) es expresada en células T, y media la unión a contrarreceptores ICAM-1 (Marlin SD. et al. Cell 51:813-819, 1987), ICAM-2 (deFourgerolles AR. et al. J Exp Med 174:253-267, 1991) e ICAM-3 (deFourgerolles AR. et al. J Exp Med 175:185-190, 1992; Fawcett J. et al. Nature 360:481-484, 1992; y Vazeux R. et al. Nature 1992; 360:481-488). LFA-1 también media la unión a endotelio vascular inflamado, permitiendo la unión firme de los linfocitos T antes de su trans migración fuera del torrente sanguíneo. La migración de linfocitos hacia sitios inflamatorios implica un proceso de múltiples etapas en el que las selectinas (tales como selectina L en las células T) median la rodadura, tras lo cual la activación mediante integrinas da como resultado la unión firme mediada por LFA-1 y VLA-4, seguido de la trans migración a los tejidos. Este tráfico de linfocitos es un requisito para la acumulación de linfocitos en sitios de infección, o anormalmente en sitios de inflamación crónica, tales como sinovio reumatoide.

De este modo, la invención abarca el uso de agentes moduladores de cadherina-11 de las reivindicaciones en el tratamiento de trastornos inflamatorios de las articulaciones. Adicionalmente, se describen métodos de cribado para la identificación de agentes moduladores de cadherina-11 que poseen las características descritas aquí.

Los métodos y composiciones descritos aquí se refieren a agentes moduladores de cadherina-11. Un agente modulador de cadherina-11, como se usa aquí, abarca agentes que inhiben la unión de cadherina-11 a su contrarreceptor (es decir, agentes inhibidores de cadherina-11), y agentes que modulan funciones celulares en células que expresan cadherina-11 (por ejemplo, agentes que disparan, o aquellos que inhiben, la señalización asociada con cadherina-11). Los agentes moduladores de cadherina-11 son capaces de modular (1) la proliferación celular, (2) la secreción de moléculas tales como, pero sin limitarse a, estromelina, colágeno, colagenasa e IL-6, (3) la apoptosis, (4) la migración, y/o (5) la unión, de células que expresan cadherina-11. Tales agentes conducen a una disminución en la proliferación celular, una disminución en la secreción de moléculas tales como, pero sin limitarse a, citocinas, y un incremento en la apoptosis en células que expresan cadherina-11. En efecto, estos agentes funcionan preferiblemente para ralentizar la velocidad de crecimiento de, o en último caso exterminar, células de cadherina-11 tales como sinoviocitos. Se ha dado a conocer previamente en otros tipos celulares que la pérdida de cadherina E puede conducir a un fenotipo canceroso o metastásico.

La invención de este modo abarca también agentes inhibidores de cadherina-11 de las reivindicaciones, y su método de uso. Excepto que se señale de otro modo, se entenderá que estas dos categorías de agentes, es decir, agentes que modulan la adhesión mediada por cadherina-11 (es decir, agentes inhibidores de cadherina-11) y agentes que modulan otras funciones de cadherina-11, tales como la proliferación, la secreción de factores, y la apoptosis, no necesitan ser mutuamente excluyentes ni necesitan solaparse completamente. Por ejemplo, se espera que algunos agentes identificados en los ensayos de cribado descritos aquí funcionarán solamente como agentes inhibidores de cadherina-11 (es decir, que tienen la capacidad para bloquear la unión de cadherina-11 a su contrarreceptor), otros funcionarán modulando (por ejemplo, potenciando o inhibiendo) funciones celulares, tales como la proliferación,

secreción, apoptosis, unión y migración, mientras que todavía otros agentes serán capaces de ambas funciones. De este modo, algunos agentes serán capaces de inhibir la unión de cadherina-11 a su contrarreceptor, aunque no tendrán ningún impacto sobre otras funciones mediadas por cadherina-11, tales como la señalización celular. De forma similar, otros agentes potenciarán o inhibirán las funciones mediadas por cadherina-11, tales como la proliferación, por ejemplo, aunque no tendrán ningún efecto sobre la unión de cadherina-11 a su contrarreceptor.

En un aspecto, la invención se dirige a un método para tratar un sujeto que tiene un trastorno inflamatorio de las articulaciones. Como se usa aquí, un trastorno inflamatorio de las articulaciones es aquel en el que la hiperplasia sinovial y/o la sobreproducción de factores biológicamente activos median el daño articular. En trastornos inflamatorios de las articulaciones, el sinovio se inflama y se hace más grueso, y, en casos avanzados, esto es seguido por una invasión del sinovio en el cartílago y hueso. El sinovio es la membrana que reviste la cápsula de una articulación. La sinovitis (es decir, inflamación del sinovio) se puede manifestar en formas aguda o crónica. En la sinovitis aguda, el comienzo del dolor y malestar es habitualmente repentino y de corta duración, como también es el caso en la sinovitis vellonodular pigmentada. Por el contrario, en la sinovitis crónica, el dolor y el malestar son recurrentes y persistentes. En cualquier caso, los síntomas pueden ser provocados por artritis, lesión, sobreuso de la articulación, e infección.

El agente modulador, tal como el agente inhibidor, se administra preferiblemente de forma local al sinovio del sujeto. Las articulaciones afectadas que pueden ser tratadas son aquellas que existen por todo el cuerpo, en áreas tales como los hombros, espalda, muñecas, manos, codos, rodillas, caderas, tobillos y pies, y están revestidas por una membrana sinovial.

Las afecciones ejemplares que resultan de o provocan trastornos inflamatorios de las articulaciones incluyen sinovitis crónica, enfermedades autoinmunitarias, artritis psoriásica, artritis de la enfermedad de Lyme crónica, artritis asociada con enfermedad inflamatoria del intestino, artritis asociada con espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter, artritis asociada con lupus eritematoso sistémico, artritis asociada con artritis crónica juvenil, artritis asociada con infección, artritis asociada con respuesta inmunitaria a agentes infecciosos y sinovitis no específica de etiología desconocida. Un trastorno autoinmunitario es aquel en el que el sistema inmunitario del organismo reacciona contra uno o más tejidos corporales y de este modo ataca al tejido como si fuese un antígeno o patógeno extraño. La artritis reumatoide es un ejemplo de un trastorno autoinmunitario, en el que los componentes del sistema inmunitario perpetúan la inflamación de una articulación, dando como resultado daño al sinovio, cartílago, hueso, y tejidos articulares asociados.

Un método descrito aquí implica administrar a un sujeto que necesite de tal tratamiento un agente inhibidor de cadherina-11. Un agente inhibidor de cadherina-11 es un agente que inhibe la unión de cadherina-11 a un contrarreceptor de cadherina-11. El agente inhibidor de cadherina-11 se administra al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una dosis del agente inhibidor de cadherina-11 suficiente para proporcionar un resultado médicamente deseable. En el método de tratamiento, la cantidad terapéuticamente eficaz del agente inhibidor de cadherina-11 puede ser aquella cantidad que es suficiente para reducir la inflamación o hinchamiento de la articulación, o para aliviar el dolor en la articulación. Como se usa aquí, tratamiento abarca el uso de los agentes inhibidores de cadherina-11 para reducir la afección médica adversa que está mediada por la unión de cadherina-11 a su contrarreceptor in vivo, así como el tratamiento profiláctico de sujetos con riesgo de desarrollar un trastorno inflamatorio de las articulaciones.

Como se menciona de forma temprana, los métodos de tratamiento descritos aquí abarcan el uso de agentes inhibidores de cadherina-11 o agentes que modulan funciones celulares (por ejemplo, señalización, proliferación, apoptosis, etc.) de cadherina-11 distintas de la unión de cadherina-11 a un contrarreceptor de cadherina-11, o el uso de ambos. De este modo, como se describe aquí, el método de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno inflamatorio de las articulaciones, puede comprender como alternativa administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente que modula una o más funciones celulares de cadherina-11. La una o más funciones celulares pueden no incluir la unión de cadherina-11 a su contrarreceptor.

Un sujeto, como se usa aquí, se refiere a cualquier mamífero susceptible de tener o que actualmente tiene un trastorno inflamatorio de las articulaciones. Preferiblemente, el sujeto es aquel que tiene un trastorno inflamatorio de las articulaciones. En realizaciones más preferidas, el sujeto es un ser humano. En ciertas realizaciones, el sujeto no tiene adhesión anormal mediada por cadherina-11 en el cerebro y/o hígado.

En general, los agentes inhibidores de cadherina-11 son agentes que inhiben la adhesión mediada por cadherina-11. Adhesión mediada por cadherina-11, como se usa aquí, se refiere a la unión de un polipéptido de cadherina-11, denominado aquí en lo sucesivo como cadherina-11, a un contrarreceptor de cadherina-11. Un contrarreceptor de cadherina-11 es una molécula que se une selectivamente a cadherina-11, y, en algunos casos, es expresada en la superficie de una célula. En otros casos, el contrarreceptor de cadherina-11 no está unido a la célula sino que más bien es un componente de una matriz intersticial, tal como una matriz extracelular de tejido, cartílago o hueso. El contrarreceptor de cadherina-11 también puede ser una molécula segregada por una célula. Las células ejemplares que expresan un contrarreceptor de cadherina-11 incluyen sinoviocitos tipo A y tipo B, fibroblastos derivados del sinovio, células derivadas de cartílago, osteoblastos, linfocitos T y B, células del plasma, macrófagos, células dendríticas, células NK, mastocitos, células de revestimiento sinoviales, y células derivadas del paño invasivo. Un

contrarreceptor de cadherina-11 abarca cadherina-11, miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas, epítomos de hidratos de carbono de una glucoproteína o glucolípido, una selectina, un ligando que contiene lectina, y una integrina. Se han identificado al menos 21 integrinas diferentes compuestas de ocho cadenas β diferentes asociadas con 15 cadenas α diferentes. Las integrinas útiles en la invención incluyen $\alpha^1\beta_1$, $\alpha^2\beta_1$, $\alpha^3\beta_1$, $\alpha^4\beta_1$, $\alpha^5\beta_1$, $\alpha^6\beta_1$, $\alpha^7\beta_1$, $\alpha^8\beta_1$, $\alpha^9\beta_1$, $\alpha^L\beta_2$, $\alpha^M\beta_2$, $\alpha^X\beta_2$, $\alpha^{Lb}\beta_3$, $\alpha^V\beta_3$, $\alpha^6\beta_1$, $\alpha^V\beta_5$, $\alpha^4\beta_7$, $\alpha^E\beta_7$, $\alpha^2\beta_7$. En algunas realizaciones, las integrinas preferidas son $\alpha^1\beta_1$, $\alpha^2\beta_1$, $\alpha^3\beta_1$, $\alpha^4\beta_1$, $\alpha^5\beta_1$, $\alpha^6\beta_1$, $\alpha^L\beta_2$, $\alpha^M\beta_2$, $\alpha^V\beta_3$, $\alpha^4\beta_7$ y $\alpha^E\beta_7$.

La invención se basa, en parte, en la observación de que las células T y las células B, que previamente no se ha dado a conocer que ambas expresan cadherina-11, son capaces de unirse in vitro a cadherina-11 recombinante inmovilizada. De este modo, este hallazgo sugiere que las células T y B expresan un contrarreceptor de cadherina-11 que no es cadherina-11. Este es el primer informe de un contrarreceptor de cadherina-11 que no es cadherina-11 expresado por células T y B. Comparando células que se unen a cadherina-11 purificada o aislada (y que se sabe que no expresan cadherina-11) con células que son incapaces de tal unión, se pueden identificar contrarceptores de cadherina-11 que no son cadherina-11. Los métodos ejemplares para comparación de estos dos tipos celulares incluyen, por ejemplo, cribado genético que usa técnicas tales como presentación diferencial, así como la hibridación sustractiva para identificar transcritos que son expresados por las células que se unen a cadherina-11 y no son expresados por las células que no se unen a cadherina-11. Estas técnicas se practican habitualmente por los expertos normales en la técnica. Estas técnicas permiten el aislamiento rápido de ácido nucleico que codifica un contrarreceptor de cadherina-11. Una vez que se han identificado las células que se unen a cadherina-11 pero que no expresan cadherina-11, las preparaciones de membranas celulares se pueden analizar, por ejemplo, mediante purificación por afinidad, para aislar el contrarreceptor de cadherina-11. Por ejemplo, se puede usar una proteína de fusión de GST con cadherina-11, inmovilizada en una columna, para extraer contrarceptores de cadherina-11 a partir de una preparación celular bruta. Se pueden generar anticuerpos monoclonales frente a células que expresan un contrarreceptor de cadherina-11, y los anticuerpos resultantes se pueden cribar para determinar su capacidad para bloquear la unión de cadherina-11 a tales células.

Los agentes moduladores de cadherina-11 descritos aquí, incluyendo los agentes inhibidores de cadherina-11, abarcan moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, hidratos de carbono, y moléculas producidas sintéticamente.

El agente modulador de cadherina-11 puede ser un polipéptido (es decir, un polipéptido modulador de cadherina-11). Como tal, el agente modulador, incluyendo el agente inhibidor de cadherina-11, puede ser (1) un polipéptido de cadherina-11 o un fragmento (preferiblemente único) del mismo, o (2) un polipéptido del contrarreceptor de cadherina-11 o un fragmento (preferiblemente único) del mismo; (3) un "péptido de unión" a cadherina-11 (distinto de un contrarreceptor de cadherina-11); y (4) un "péptido de unión" a contrarreceptor de cadherina-11 (distinto de un polipéptido de cadherina-11). Como se usa aquí, un péptido de unión a cadherina-11 se refiere a péptidos que se unen selectivamente a cadherina-11. De forma similar, un péptido de unión a contrarreceptor de cadherina-11 se refiere a un péptido que se une selectivamente a un contrarreceptor de cadherina-11.

El péptido de unión a cadherina-11 puede no inhibir la unión de cadherina-11 a un contrarreceptor de cadherina-11. Es decir, el péptido de unión puede no ser un agente inhibidor de cadherina-11, sino que todavía puede modular otras funciones mediadas por cadherina-11, tales como la proliferación. Lo mismo puede ser cierto para los péptidos del contrarreceptor de cadherina-11.

Los péptidos de unión pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpos ("polipéptidos de unión"), que tienen la capacidad para unirse selectivamente a polipéptidos de cadherina-11 o de un contrarreceptor de cadherina-11. Los anticuerpos incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales que se pueden preparar según metodología convencional. Los péptidos de unión y los polipéptidos de unión también pueden derivar de fuentes distintas de la tecnología de anticuerpos. Por ejemplo, tales péptidos de unión pueden ser proporcionados por librerías peptídicas degeneradas que se pueden preparar fácilmente en disolución, en forma inmovilizada, como librerías de presentación de péptidos de flagelos bacterianos, o como librerías de presentación de fagos. También se pueden sintetizar librerías combinatorias de péptidos que contienen uno o más aminoácidos. Además, se pueden sintetizar librerías de péptidos y restos sintéticos no peptídicos. Los péptidos de unión a cadherina-11 ejemplares que son anticuerpos y proteínas de fusión se describen en los Ejemplos. (Véanse también la patente USP n° 5.639.634 y 5.597.725 y la Solicitud de Patente PCT WO 93/21302).

Los polipéptidos inhibidores de cadherina-11 pueden ser moléculas de adhesión celular tales como integrinas y cadherinas.

Los péptidos inhibidores de cadherina-11 son útiles para inhibir la unión de cadherina-11 a su contrarreceptor. Como se usa aquí, un fragmento de un polipéptido se refiere a aquel que es capaz de unirse a cadherina-11 o al contrarreceptor de cadherina-11, según pueda ser el caso. Los polipéptidos inhibidores de cadherina-11 preferidos descritos aquí tienen la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO. 2, o un fragmento funcionalmente equivalente de SEC ID NO. 2. De este modo, los péptidos inhibidores de cadherina-11 abarcan fragmentos funcionalmente equivalentes, variantes, y análogos de SEC ID NO. 2, con la condición de que los fragmentos, variantes, y análogos se unan a cadherina-11 o a un contrarreceptor de cadherina-11 y, de ese modo, reduzcan o prevengan la adhesión de cadherina-11 a su contrarreceptor.

Un fragmento único de un polipéptido de cadherina-11 tiene, en general, los rasgos y características de fragmentos únicos como se describe aquí en relación con ácidos nucleicos. Como reconocerán los expertos en la técnica, el tamaño del fragmento único dependerá de factores tales como si el fragmento constituye una porción de un dominio proteico conservado. De este modo, algunas regiones de SEC ID NO:2 requerirán que segmentos más largos sean
 5 únicos, mientras que otras requerirán sólo segmentos cortos, típicamente entre 5 y 12 aminoácidos (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 aminoácidos de longitud o más, incluyendo cada número entero hasta el polipéptido de longitud completa). Virtualmente, cualquier segmento de SEC ID NO:2 que tenga una longitud de 9 o más aminoácidos y que no sea común a otros polipéptidos distintos será único. Los fragmentos únicos de un polipéptido son preferiblemente aquellos fragmentos que retienen una capacidad funcional distinta del polipéptido. Las
 10 capacidades funcionales que se pueden retener en un fragmento único del polipéptido de cadherina-11 incluyen la capacidad para unirse a un contrarreceptor de cadherina-11. De forma similar, un fragmento único de un polipéptido de un contrarreceptor de cadherina-11 poseerá la capacidad para unirse a un polipéptido de cadherina-11.

Como se usa aquí con respecto a polipéptidos, el término "aislado" significa separado de su entorno nativo en forma suficientemente pura de forma que se pueden manipular o usar para uno cualquiera de los fines de la invención. De
 15 este modo, aislado significa suficientemente puro para ser usado (i) para generar y/o aislar anticuerpos, (ii) como un reactivo en un ensayo, o (iii) para secuenciación, etc.

La presentación de fagos puede ser particularmente eficaz a la hora de identificar péptidos de unión. De forma breve, se prepara una librería de fagos (usando por ejemplo el fago m13, fl, o lambda), que presenta insertos de 4 a
 20 alrededor de 80 restos de aminoácidos, usando procedimientos convencionales. Los insertos pueden representar, por ejemplo, una matriz completamente degenerada o sesgada. Entonces se pueden seleccionar insertos que poseen el fago, los cuales se unen al polipéptido de cadherina-11 o de un contrarreceptor de cadherina-11. Este proceso se puede repetir a través de varios ciclos de reelección de fago que se une al polipéptido de cadherina-11 o de un contrarreceptor de cadherina-11. Rondas repetidas conducen al enriquecimiento del fago que posee secuencias particulares. La secuencia peptídica presentada puede variar en tamaño. A medida que aumenta el
 25 tamaño, aumenta la complejidad de la librería. Se prefiere que el tamaño total de la secuencia peptídica presentada (los aminoácidos aleatorios más cualesquiera aminoácidos espaciadores) no debería de ser mayor que alrededor de 100 aminoácidos de longitud, más preferiblemente no mayor que alrededor de 50 aminoácidos de longitud, y lo más preferible no mayor que alrededor de 25 aminoácidos de longitud. Las librerías pueden tener al menos una restricción impuesta a la secuencia peptídica presentada. Una restricción incluye, pero no se limita a, una carga
 30 positiva o negativa, hidrofobia, hidrofilia, un enlace escindible y los restos necesarios que rodean a ese enlace, y sus combinaciones. Puede estar presente más de una restricción en cada una de las secuencias peptídicas de la librería.

Se puede llevar a cabo un análisis de secuencias de ADN para identificar las secuencias de los polipéptidos expresados. Se puede determinar la porción lineal mínima de la secuencia que se une al polipéptido de cadherina-
 35 11 o de un contrarreceptor de cadherina-11. Se puede repetir el procedimiento usando una librería sesgada que contiene insertos que contienen parte o toda la porción lineal mínima más uno o más restos degenerados adicionales en dirección 5' o en dirección 3' de la misma. También se puede usar los métodos de cribado de dos híbridos en levadura, para identificar polipéptidos que se unen a los polipéptidos de cadherina-11 o de un
 40 contrarreceptor de cadherina-11. De este modo, los polipéptidos de cadherina-11 o de un contrarreceptor de cadherina-11 descritos aquí, o un fragmento de los mismos, se pueden usar para cribar librerías peptídicas, incluyendo librerías de presentación de fagos, para identificar y seleccionar parejas de unión a péptidos de los polipéptidos de cadherina-11 o de un contrarreceptor de cadherina-11. Tales moléculas se pueden usar, según se describe, para ensayos de cribado, para protocolos de purificación, para interferir directamente con el funcionamiento de cadherina-11 o del contrarreceptor de cadherina-11, y para otros fines que serán manifiestos para
 45 los expertos normales en la técnica.

Un polipéptido de cadherina-11 o de un contrarreceptor de cadherina-11, o un fragmento del mismo, también se puede usar para aislar otras parejas de unión (por ejemplo, contrarreceptores de cadherina-11 de origen natural). El
 50 aislamiento de las parejas de unión se puede llevar a cabo según métodos bien conocidos. Por ejemplo, los polipéptidos aislados de cadherina-11 o de un contrarreceptor de cadherina-11 se pueden unir a un sustrato, y después se puede aplicar al sustrato una disolución que se sospecha que contiene una pareja de unión a cadherina-11 o a un contrarreceptor de cadherina-11. Si la pareja de unión para los polipéptidos de cadherina-11 o de un contrarreceptor de cadherina-11 está presente en la disolución, entonces se unirá al polipéptido de cadherina-11 o de un contrarreceptor de cadherina-11 unido al sustrato. Entonces se puede aislar la pareja de unión.

El agente inhibidor de cadherina-11 puede ser un análogo peptídico funcionalmente equivalente de cadherina-11 o
 55 un contrarreceptor de cadherina-11. Como se usa aquí, la expresión análogo peptídico funcionalmente equivalente se refiere a un análogo peptídico que es capaz de inhibir la unión de cadherina-11 al contrarreceptor de cadherina-11 compitiendo con cadherina-11 por la unión a un contrarreceptor de cadherina-11, o con un contrarreceptor de cadherina-11 por la unión a cadherina-11. Los análogos peptídicos funcionalmente equivalentes de cadherina-11 se identifican, por ejemplo, en ensayos de adhesión in vitro, como se describe más abajo y en los Ejemplos, que miden
 60 la capacidad del análogo peptídico para inhibir la adhesión, mediada por cadherina-11, entre células que expresan cadherina-11 y su contrarreceptor, o entre cadherina-11 aislada y un contrarreceptor de cadherina-11 aislado, o alguna combinación de los mismos. En consecuencia, análogos peptídicos funcionalmente equivalentes ejemplares

de cadherina-11 incluyen el dominio extracelular de cadherina-11, fragmentos del dominio extracelular y análogos peptídicos del dominio extracelular (por ejemplo, péptidos que contienen sustituciones conservativas de aminoácidos), con la condición de que los fragmentos peptídicos y los análogos sean capaces de inhibir la adhesión entre cadherina-11 y su contrarreceptor cuando estas moléculas están presentes en forma aislada o en el contexto de una membrana celular in vivo y/o in vitro. Igualmente, un análogo peptídico funcionalmente equivalente de contrarreceptor de cadherina-11 incluye el dominio extracelular del contrarreceptor de cadherina-11, fragmentos del dominio extracelular y análogos peptídicos del dominio extracelular (por ejemplo, péptidos que contienen sustituciones conservativas de aminoácidos), con la condición de que los fragmentos peptídicos y los análogos sean capaces de inhibir la adhesión entre cadherina-11 y su contrarreceptor cuando estas moléculas están presentes en forma aislada o en el contexto de una membrana celular in vivo y/o in vitro. Preferiblemente, los fragmentos peptídicos y/o análogos contienen entre alrededor de tres y alrededor de cien aminoácidos. Más preferiblemente, los análogos peptídicos contienen entre alrededor de diez y alrededor de veinticinco aminoácidos.

Los agentes inhibidores descritos aquí incluyen anticuerpos y proteínas de fusión que inhiben la unión de cadherina-11 a su contrarreceptor. De este modo, los péptidos de la invención pueden ser específicamente reactivos con un anticuerpo (preferiblemente un anticuerpo monoclonal) que se une selectivamente a cadherina-11, o un anticuerpo que se une selectivamente a un contrarreceptor de cadherina-11, y de ese modo inhibe la adhesión entre cadherina-11 y un contrarreceptor de cadherina-11.

Un polipéptido de fusión, como se usa aquí, es un polipéptido que contiene regiones peptídicas procedentes de al menos dos proteínas diferentes. Por ejemplo, un polipéptido de cadherina-11 de fusión se puede formar fusionando, habitualmente a nivel nucleotídico, la secuencia codificante de cadherina-11 a la secuencia codificante de otra proteína distinta. Como se describe más abajo, se puede sintetizar una proteína de fusión de cadherina-11 con GST, y es útil para cribar agentes que se unen a cadherina-11. También como se describe en los Ejemplos, una proteína de fusión de cadherina-11 con Fc se ha sintetizado uniendo los dominios extracelulares de cadherina-11 a la porción Fc de inmunoglobulina. Dependiendo de su naturaleza, algunas proteínas de fusión son adecuadas para uso in vitro, mientras que otras son más adecuadas para uso in vivo.

El agente modulador de cadherina-11 puede ser un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo que tiene la capacidad para unirse selectivamente a polipéptidos de cadherina-11 o de un contrarreceptor de cadherina-11. Los anticuerpos incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, preparados según metodología convencional.

De forma significativa, como es bien conocido en la técnica, sólo una pequeña porción de una molécula de anticuerpo, el paratopo, está implicada en la unión del anticuerpo a su epítipo (véase, en general, Clark, W. R. (1986) *The Experimental Foundations of Modern Immunology* Wiley & Sons, Inc., New York; Roitt, I. (1991) *Essential Immunology*, 7^a ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford). Las regiones pFc' y Fc, por ejemplo, son efectoras de la cascada del complemento, pero no están implicadas en la unión al antígeno. Un anticuerpo del cual se ha escindido enzimáticamente la región pFc', o que se ha producido sin la región pFc', denominado un fragmento F(ab')₂, retiene los dos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo intacto. De forma similar, un anticuerpo del que se ha escindido enzimáticamente la región Fc, o que se ha producido sin la región Fc, denominado un fragmento Fab, retiene uno de los sitios de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo intacto. Siguiendo más allá, los fragmentos Fab consisten en una cadena ligera de anticuerpo unida covalentemente y una porción de la cadena pesada del anticuerpo representada por Fd. Los fragmentos Fd son el determinante principal de la especificidad del anticuerpo (un único fragmento Fd se puede asociar con hasta diez cadenas ligeras diferentes sin alterar la especificidad del anticuerpo), y los fragmentos Fd retienen la capacidad de unión al epítipo en el aislamiento.

Dentro de la porción de unión al antígeno de un anticuerpo, como es bien sabido en la técnica, hay regiones determinantes de la complementariedad (CDR), que interaccionan directamente con el epítipo del antígeno, y regiones del marco (FR), que mantienen la estructura terciaria del paratopo (véase, en general, Clark, 1986; Roitt, 1991). Tanto en el fragmento Fd de cadena pesada como la cadena ligera de inmunoglobulinas IgG, hay cuatro regiones de marco (FR1 a FR4) separadas respectivamente por tres regiones que determinan la complementariedad (CDR1 a CDR3). Las CDR, y en particular las regiones CDR3, y más particularmente la CDR3 de cadena pesada, son tremendamente responsables de la especificidad del anticuerpo.

Ahora está bien establecido en la técnica que las regiones no CDR de un anticuerpo de mamífero se pueden sustituir por regiones similares de anticuerpos conespecíficos o heteroespecíficos a la vez que retienen la especificidad epitópica del anticuerpo original. Esto se manifiesta de forma más clara en el desarrollo y uso de anticuerpos "humanizados", en los que las CDR no humanas se unen covalentemente a regiones FR y/o Fc/pFc' humanas, para producir un anticuerpo funcional. De este modo, por ejemplo, la Publicación Internacional PCT número WO 92/04381 enseña la producción y uso de anticuerpos humanizados anti-RSV murinos, en los que al menos una porción de las regiones FR murinas se han sustituido por regiones FR de origen humano. Tales anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos intactos con la capacidad para unirse a antígenos, se denominan a menudo como anticuerpos "quiméricos".

De este modo, también se describen aquí fragmentos F(ab')₂, Fab, Fv y Fd; anticuerpos quiméricos, en los que las regiones Fc y/o FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han sustituido por secuencias humanas o no humanas homólogas; anticuerpos del fragmento F(ab')₂ quiméricos, en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2

y/o CDR3 de cadena ligera se han sustituido por secuencias humanas o no humanas homólogas; anticuerpos del fragmento Fab quiméricos, en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera se han sustituido por secuencias humanas o no humanas homólogas; y anticuerpos del fragmento Fd quiméricos, en los que las regiones FR y/o CDR1 y/o CDR2 se han sustituido por secuencias humanas o no humanas homólogas.

- 5 Para los usos de inoculación o profilácticos, los anticuerpos son preferiblemente moléculas de anticuerpos intactos que incluyen la región Fc. Tales anticuerpos intactos tendrán semividas más prolongadas que los anticuerpos de fragmentos más pequeños (por ejemplo Fab), y son más adecuados para la administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavidad, subcutánea, o transdérmica.

10 Se prefieren los fragmentos Fab, incluyendo fragmentos Fab quiméricos, en métodos en los cuales los péptidos de la invención se administran directamente a un entorno de tejido local. Por ejemplo, los fragmentos Fab se prefieren cuando el péptido de la invención se administra directamente a la articulación afligida o al sinovio inflamado. Los Fab ofrecen varias ventajas con respecto a los $F(ab')_2$ y todas las moléculas inmunoglobulínicas para esta modalidad terapéutica. En primer lugar, debido a que los Fab sólo tienen un sitio de unión para su antígeno cognado, se excluye la formación de complejos inmunitarios en tanto que tales complejos se pueden generar cuando los $F(ab')_2$ bivalentes y todas las moléculas inmunoglobulinas encuentran su antígeno diana. Esto es de cierta importancia
15 debido a que la deposición de complejos inmunitarios en tejidos puede producir reacciones inflamatorias adversas. En segundo lugar, debido a que los Fab carecen de una región Fc, no pueden provocar reacciones inflamatorias adversas que son activadas por Fc, tales como la activación de la cascada del complemento. En tercer lugar, es probable que la penetración tisular de la pequeña molécula Fab sea mucho mejor que la del anticuerpo completo más grande. En cuarto lugar, los Fab se pueden producir fácilmente y de forma barata en bacterias, tales como *E. coli*, mientras que las moléculas de anticuerpos inmunoglobulínicos completas requieren células de mamíferos para su producción en cantidades útiles. La producción de los Fab en *E. coli* hace posible producir estos fragmentos de anticuerpo en grandes fermentadores, que son más baratos que los productos derivados del cultivo celular.

25 Un agente modulador de cadherina-11 también puede ser una molécula de ácido nucleico (es decir, una molécula de ácido nucleico que modula cadherina-11). Una molécula de ácido nucleico que modula cadherina-11 es una molécula de ácido nucleico que funciona para modular una función celular de cadherina-11, tal como, por ejemplo, la proliferación celular, la secreción de factores, la apoptosis, la migración y la unión. Una molécula de ácido nucleico inhibidora de cadherina-11 es una molécula de ácido nucleico que funciona para inhibir la adhesión mediada por cadherina-11. Estas moléculas de ácido nucleico pueden funcionar directamente (por ejemplo, como moléculas de ácido nucleico antisentido) o indirectamente (por ejemplo, vía los péptidos y/o polipéptidos que codifican). Una molécula de ácido nucleico que modula cadherina-11 y una molécula de ácido nucleico inhibidora de cadherina-11 se pueden seleccionar del grupo que consiste en moléculas de ácido nucleico que (1) codifican un polipéptido de cadherina-11 o un fragmento (preferiblemente único) del mismo; (2) codifican un polipéptido de un contrarreceptor de cadherina-11 o un fragmento (preferiblemente único) del mismo; o (3) son moléculas antisentido de cadherina-11
30 o del contrarreceptor de cadherina-11 que inhiben la transcripción o traducción de las moléculas de ácido nucleico anteriores.

35 En una realización, un ácido nucleico que modula cadherina-11 según las reivindicaciones, es decir, un ácido nucleico inhibidor de cadherina-11, (1) se hibrida en condiciones restrictivas a un ácido nucleico que tiene una secuencia de SEC ID NO: 1, y (2) codifica un polipéptido de cadherina-11 o un fragmento (preferiblemente único) del mismo que es capaz de unirse específicamente a cadherina-11 o a un contrarreceptor de cadherina-11. En una realización, el polipéptido de cadherina-11, o su fragmento, se une a un contrarreceptor de cadherina-11 sobre la superficie de otra célula, y de ese modo inhibe la unión de cadherina-11 a su contrarreceptor, y opcionalmente inhibe la unión de una célula a otra. También se prevé la inhibición de la unión de una célula a la matriz extracelular. La molécula de ácido nucleico inhibidora de cadherina-11 preferida tiene una secuencia nucleotídica de SEC ID NO: 1.
40 Las moléculas de ácido nucleico moduladoras de cadherina-11 de la invención también incluyen homólogos y alelos de una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de SEC ID NO: 1.

45 Las moléculas de ácido nucleico moduladoras de cadherina-11, y preferiblemente las moléculas de ácido nucleico inhibidoras de cadherina-11, pueden codificar polipéptidos que son polipéptidos de cadherina-11 solubles o polipéptidos unidos a la membrana. Los polipéptidos solubles de cadherina-11 carecen de un dominio transmembránico, y, óptimamente, contienen además aminoácidos que hacen soluble al polipéptido (por ejemplo, proteínas de fusión, que contienen toda o parte de la cadherina-11, que inhiben la unión de cadherina-11 a su contrarreceptor). Los agentes moduladores de cadherina-11 que están unidos a la membrana (o asociados a la membrana) contienen preferiblemente un dominio transmembránico.
50

55 Las moléculas de ácido nucleico moduladoras de cadherina-11, y preferiblemente las moléculas de ácido nucleico inhibidoras de cadherina-11, abarcan además moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de cadherina-11 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2, pero que pueden diferir de la secuencia de SEC ID NO: 1, debido a la degeneración del código genético.

60 Los ácidos nucleicos que modulan la función celular de cadherina-11 no codifican preferiblemente un polipéptido o un fragmento del mismo de cadherina-11 o del contrarreceptor de cadherina-11 que es capaz de inhibir la unión de cadherina-11 a un contrarreceptor de cadherina-11.

Las moléculas de ácido nucleico moduladoras de cadherina-11 de la invención se pueden identificar mediante técnicas convencionales, por ejemplo identificando secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido de cadherina-11 y que se hibridan a una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de SEC ID NO: 1, en condiciones restrictivas. La expresión "condiciones restrictivas", como se usa aquí, se refiere a parámetros con los que la técnica está familiarizada. Más específicamente, las condiciones restrictivas, como se usa aquí, se refieren a hibridación a 65°C en tampón de hibridación (3,5 x SSC, 0,02% de formamida, 0,02% de polivinilpirrolidona, 0,02% de seroalbúmina bovina, 2,5 mM de NaH₂PO₄ (pH 7), 0,5% de SDS, 2 mM de EDTA). SSC es cloruro de sodio 0,15 M/citrato de sodio 0,15 M, pH 7; SDS es dodecilsulfato de sodio; y EDTA es ácido etilendiaminotetraacético. Tras la hibridación, la membrana a la que se transfiere el ADN se lava a 2 x SSC a temperatura ambiente, y después a 0,1 x SSC/0,1 x SDS a 65°C.

Existen otras condiciones, reactivos, y demás que se pueden usar, que dan como resultado un grado similar de restricción. El experto estará familiarizado con tales condiciones, y, de este modo, no se dan aquí. Se entenderá, sin embargo, que el experto será capaz de manipular las condiciones de manera que permitan la identificación clara de homólogos y alelos de las moléculas de ácido nucleico de la invención. El experto también está familiarizado con la metodología para cribar células y librerías para la expresión de moléculas, tales como moléculas de ácido nucleico inhibitoras de cadherina-11, que se pueden aislar y secuenciar. Por ejemplo, en el cribado en busca de secuencias de cadherina-11, se puede llevar a cabo una transferencia Southern usando las condiciones anteriores, junto con una sonda radioactiva. Tras lavar la membrana a la que finalmente se transfiere el ADN, la membrana se puede colocar frente a una película de rayos X para detectar la señal radioactiva.

En general, los homólogos y alelos de cadherina-11 compartirán típicamente al menos un 70% de identidad nucleotídica con SEC. ID. NO: 1; y en algunos casos, compartirán al menos 75% de identidad nucleotídica; y todavía en otros casos, compartirán al menos un 80% de identidad nucleotídica. También se engloban en la invención complementos de Watson-Crick de los ácidos nucleicos anteriores. Los homólogos de cadherina-11 preferidos tienen al menos un 85% de homología de secuencia con SEC. ID. NO: 1. Más preferiblemente, los homólogos de cadherina-11 tienen al menos 90%, y más preferiblemente al menos 95% de homología de secuencia con SEC. ID. NO: 1. La homología se puede calcular usando diversas herramientas de software públicamente disponibles, desarrolladas por NCBI (Bethesda, Maryland), que se pueden obtener a través de Internet (<http://ncbi.nlm.nih.gov/pub/>). Las herramientas ejemplares incluyen el sistema BLAST, disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Los alineamientos en forma de parejas y de ClustalW (ajuste de matriz BLOSUM30), así como el análisis hidropático de Kyte-Doolittle, se pueden obtener usando el software de análisis de secuencias MacVetor (Oxford Molecular Group).

La invención incluye también ácidos nucleicos degenerados que incluyen codones alternativos a los presentes en el ácido nucleico de origen natural que codifica, por ejemplo, el polipéptido de cadherina-11 humano. Como es bien conocido en la técnica, y como ejemplo, los restos de serina son codificados por los codones TCA, AGT, TCC, TCG, TCT y AGC. Cada uno de los seis codones es equivalente para los fines de la codificación de un resto de serina. De este modo, será manifiesto para una persona experta normal en la técnica que se puede emplear cualquiera de los codones nucleotídicos que codifican serina para dirigir el aparato de la síntesis proteica, *in vitro* o *in vivo*, para incorporar un resto de serina. De forma similar, los tripletes de secuencia nucleotídica que codifican otros restos de aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, CCA, CCC, CCG y CCT (codones de prolina); CGA, CGC, CGG, CGT, AGA y AGG (codones de arginina); ACA, ACC, ACG y ACT (codones de treonina); AAC y AAT (codones de asparagina); y ATA, ATC y ATT (codones de isoleucina). Otros restos de aminoácidos pueden ser codificados de forma similar por múltiples secuencias nucleotídicas.

Se debería entender que también se engloban en la invención homólogos y alelos y degenerados de moléculas de ácido nucleico que codifican un contrarreceptor de cadherina-11, y se pueden identificar usando los mismos tipos de técnicas y procedimientos descritos aquí con referencia a homólogos y alelos de cadherina-11 y degenerados de moléculas de ácido nucleico que codifican una cadherina-11.

Como se usa aquí con respecto a ácidos nucleicos, el término "aislado" significa: (i) amplificados *in vitro* mediante, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR); (ii) producidos recombinantemente mediante clonación; (iii) purificados, tal como mediante escisión y separación en gel; o (iv) sintetizados, por ejemplo, mediante síntesis química. Un ácido nucleico aislado es aquel que es fácilmente manipulable mediante técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. De este modo, una secuencia nucleotídica contenida en un vector en la que se conocen los sitios de restricción 5' y 3' o para la cual se han descrito secuencias cebadoras de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se considera aislada, pero una secuencia de ácido nucleico que existe en su estado nativo en su hospedante natural no. Un ácido nucleico aislado puede ser purificado sustancialmente, pero no necesita serlo. Por ejemplo, un ácido nucleico que se aísla en un vector de clonación o de expresión no es puro por cuanto puede comprender sólo un porcentaje pequeño del material en la célula en la que reside. Sin embargo, tal ácido nucleico está aislado, como se usa el término aquí, debido a que es fácilmente manipulable mediante técnicas estándar conocidas por los expertos normales en la técnica.

La molécula de ácido nucleico de la invención (es decir, la molécula de ácido nucleico inhibitora de cadherina-11), en una realización, está operablemente enlazada a una secuencia de expresión génica que dirige la expresión de la molécula de ácido nucleico inhibitora de cadherina-11 en una célula eucariota. La "secuencia de expresión génica"

es cualquier secuencia nucleotídica reguladora, tal como una secuencia promotora o una combinación de promotor-potenciador que facilita la transcripción y traducción eficaces de la molécula de ácido nucleico inhibidora de cadherina-11 a la que está operablemente enlazada. La secuencia de expresión génica puede ser, por ejemplo, un promotor de mamífero o vírico, tal como un promotor constitutivo o inducible. Los promotores de mamífero constitutivos incluyen, pero no se limitan a, los promotores para los siguientes genes: hipoxantina fosforribosil transferasa (HPTR), adenosina desaminasa, piruvato cinasa, el promotor de β -actina y otros promotores constitutivos. Los promotores víricos ejemplares que funcionan constitutivamente en células eucariotas incluyen, por ejemplo, promotores del virus del simio, virus del papiloma, adenovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus del sarcoma de Rous, citomegalovirus, las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de la leucemia de Moloney y otros retrovirus, y el promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. Otros promotores constitutivos son conocidos por aquellos expertos normales en la técnica. Los promotores útiles como secuencias de expresión génica de la invención también incluyen promotores inducibles. Los promotores inducibles son expresados en presencia de un agente inductor. Por ejemplo, el promotor de metalotioneína es inducido para promover la transcripción y traducción en presencia de ciertos iones metálicos. Otros promotores inducibles son conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica.

En general, la secuencia de expresión génica deberá incluir, según sea necesario, secuencias no transcriptoras en 5' y no traductoras en 5', implicadas con la iniciación de la transcripción y traducción, respectivamente, tales como una caja TATA, secuencia de protección de los extremos, secuencia CAAT, y similares. Especialmente, tales secuencias no transcriptoras en 5' incluirán una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional de la molécula de ácido nucleico inhibidora de cadherina-11 operablemente unida. Las secuencias de expresión génica incluyen opcionalmente secuencias potenciadoras, o secuencias activadoras en dirección 5', según se desee.

Se describen aquí moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de cadherina-11 y fragmentos de los mismos, polipéptidos del contrarreceptor de cadherina-11 y fragmentos de los mismos, y agentes inhibidores de cadherina-11 como se describe aquí. Estas moléculas de ácido nucleico se pueden usar tanto en métodos de tratamiento in vivo como en ensayos de cribado in vitro. Cuando se prefiere la expresión del ácido nucleico (en oposición a algunas realizaciones de métodos de tratamiento antisentido), la molécula de ácido nucleico se enlaza a una secuencia de expresión génica que permite la expresión de la molécula de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico se pueden introducir en una célula in vitro, seguido de la transferencia de la célula al sitio de inflamación. La célula en la que se introduce la molécula de ácido nucleico se puede recoger del sitio de inflamación (por ejemplo, un linfocito, tal como una célula T, un sinoviocito, tal como un sinoviocito tipo B, un mastocito, un macrófago, una célula dendrítica, una célula del plasma, un fibroblasto derivado del sinovio, una célula de revestimiento de la membrana sinovial, un osteoblasto, una célula derivada de cartílago, o una célula derivada del paño invasivo), o puede ser una célula que normalmente no está presente en el sitio de inflamación. Una secuencia que permite la expresión del ácido nucleico en una célula situada en una articulación, tal como, por ejemplo, un sinoviocito, es aquella que es selectivamente activa de forma transcripcional en la célula y provoca de ese modo la expresión del ácido nucleico en tal célula. Los expertos normales en la técnica serán capaces de identificar fácilmente promotores alternativos que son capaces de expresar tal molécula de ácido nucleico en un sinoviocito, un osteoblasto, una célula derivada de cartílago, un linfocito o cualquier otro tipo celular mencionado aquí. Como alternativa, la célula transducida se puede cultivar in vitro a fin de producir un agente modulador de cadherina-11 (por ejemplo, agente inhibidor de cadherina-11), o se puede usar en ensayos de cribado in vitro. Por ejemplo, la secuencia de expresión génica se puede usar para expresar una molécula de ácido nucleico de cadherina-11 en una célula que no expresa inherentemente cadherina-11. La molécula de ácido nucleico de cadherina-11 también se puede expresar en una célula que no expresa inherentemente ni cadherina-11 ni el contrarreceptor de cadherina-11.

Se afirma que las secuencias de las moléculas de ácido nucleico de la invención (es decir, moléculas de ácido nucleico inhibidoras de cadherina-11) y la secuencia de expresión génica están "operablemente enlazadas" cuando están covalentemente enlazadas de una manera tal para colocar la transcripción y/o traducción de la secuencia de las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia que codifica cadherina-11) bajo la influencia o control de la secuencia de expresión génica. Si se desea que la molécula de ácido nucleico se traduzca en una proteína funcional, se afirma que dos secuencias de ADN están operablemente enlazadas si la inducción de un promotor en la secuencia de expresión génica en 5' da como resultado la transcripción de la molécula de ácido nucleico y si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN no (1) da como resultado la introducción de una mutación de desplazamiento del marco, (2) interfiere con la capacidad de la región promotora para dirigir la transcripción de la molécula de ácido nucleico, o (3) interfiere con la capacidad del transcrito de ARN correspondiente para ser traducido en un polipéptido. De este modo, una secuencia de expresión génica estaría operablemente enlazada a una molécula de ácido nucleico si la secuencia de expresión génica fuese capaz de efectuar la transcripción de esa molécula de ácido nucleico de forma que el transcrito resultante puede ser traducido en el polipéptido deseado.

En todavía otras realizaciones, el agente modulador de cadherina-11 es una molécula de ácido nucleico que, en lugar de codificar un polipéptido, funciona como una molécula antisentido. Se describen oligonucleótidos antisentido que se unen selectivamente a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de cadherina-11, o un fragmento del mismo, o un contrarreceptor de cadherina-11 (por ejemplo, una integrina o una o más de sus subunidades), o un fragmento del mismo, para disminuir la adhesión mediada por cadherina-11. Cuando se usan

preparaciones antisentido, se prefiere la administración local al sinovio o al líquido sinovial.

Como se usa aquí, la expresión "oligonucleótido antisentido" o "antisentido" describe un oligonucleótido que es un oligorribonucleótido, oligodesoxirribonucleótido, oligorribonucleótido modificado, u oligodesoxirribonucleótido modificado que se hibrida en condiciones fisiológicas a ADN que comprende un gen particular, o a un transcrito de ARNm de ese gen y, de ese modo, inhibe la transcripción de ese gen y/o la traducción de ese ARNm. Las moléculas antisentido se diseñan para interferir con la transcripción o traducción de un gen diana al hibridarse con el gen o transcrito diana. Los expertos en la técnica reconocerán que la longitud exacta del oligonucleótido antisentido y su grado de complementariedad con su diana dependerá de la diana específica seleccionada, incluyendo la secuencia de la diana y las bases particulares que comprenden esa secuencia. Se prefiere que el oligonucleótido antisentido se construya y se disponga para unirse selectivamente con la diana en condiciones fisiológicas, es decir, para hibridarse sustancialmente más a la secuencia diana que a cualquier otra secuencia en la célula diana en condiciones fisiológicas. Basándose en SEC ID NO:1 o en secuencias alélicas u homólogas genómicas y/o de ADNc, el experto en la técnica puede elegir fácilmente y sintetizar cualquiera de un número de moléculas antisentido apropiadas, para uso según la presente invención. A fin de ser suficientemente selectivos y potentes para la inhibición, tales oligonucleótidos antisentido deberían de comprender al menos 10, y más preferiblemente al menos 15, bases consecutivas, que son complementarias a la diana, aunque en ciertos casos se han usado con éxito como oligonucleótidos antisentido oligonucleótidos modificados con una longitud tan corta como 7 bases (Wagner et al., Nat. Med 1(11):1116-1118, 1995). Lo más preferible, los oligonucleótidos antisentido comprenden una secuencia complementaria de 20-30 bases.

Aunque se pueden elegir oligonucleótidos que son antisentido a cualquier región del gen o transcritos de ARNm, en realizaciones preferidas los oligonucleótidos antisentido corresponden a sitios N-terminales o en dirección 5', tales como sitios de iniciación de la traducción, iniciación de la transcripción o promotores. Además, se pueden seleccionar las regiones no traducidas de 3' mediante oligonucleótidos antisentido. También se ha usado en la técnica la selección de sitios de corte y empalme de ARNm, pero puede ser menos preferido si se produce un corte y empalme de ARNm alternativo. Además, el antisentido se dirige, preferiblemente a sitios en los que no se espera la estructura secundaria del ARNm (véase, por ejemplo, Sainio et al., Cell Mol. Neurobiol. 14(5):439-457, 1994), y en los cuales no se espera que se unan proteínas. Finalmente, aunque SEC ID NO:1 describe una secuencia de ADNc, el experto normal en la técnica puede derivar fácilmente el ADN genómico que corresponde a esta secuencia. De este modo, la presente invención también proporciona oligonucleótidos antisentido que son complementarios al ADN genómico que corresponde a SEC ID NO:1. De forma similar, también se permiten sin experimentación excesiva los antisentido a los ADNc de cadherina-11 alélica u homóloga, o, como alternativa, del contrarreceptor de cadherina-11, y los ADN genómicos.

En un conjunto de realizaciones, los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden estar compuestos de desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, "naturales", o cualquier combinación de los mismos. Esto es, el extremo 5' de un nucleótido nativo, y el extremo 3' de otro nucleótido nativo, pueden estar enlazados covalentemente, como en sistemas naturales, vía un enlace internucleosídico de fosfodiéster. Estos oligonucleótidos se pueden preparar mediante métodos reconocidos en la técnica, los cuales se pueden llevar a cabo manualmente o mediante un sintetizador automatizado. También se pueden producir recombinantemente mediante vectores.

En realizaciones preferidas, sin embargo, los oligonucleótidos antisentido de la invención también pueden incluir oligonucleótidos "modificados". Esto es, los oligonucleótidos se pueden modificar de muchas maneras que no eviten que se hibriden a su diana, pero que potencien su estabilidad o selección de dianas, o que de otro modo potencien su eficacia terapéutica.

La expresión "oligonucleótido modificado", como se usa aquí, describe un oligonucleótido en el que (1) al menos dos de sus nucleótidos están enlazados covalentemente vía un enlace internucleosídico sintético (es decir, un enlace distinto de un enlace de fosfodiéster entre el extremo 5' de un nucleótido y el extremo 3' de otro nucleótido), y/o (2) un grupo químico no asociado normalmente con ácidos nucleicos se ha unido covalentemente al oligonucleótido. Los enlaces internucleosídicos sintéticos preferidos son fosforotioatos, alquilfosfonatos, fosforoditioatos, ésteres de fosfato, alquilfosfonotioatos, fosforamidatos, carbamatos, carbonatos, triésteres de fosfato, acetamidatos, ésteres carboximetílicos y péptidos.

La expresión "oligonucleótido modificado" también engloba oligonucleótidos con una base y/o azúcar covalentemente modificado. Por ejemplo, los oligonucleótidos modificados incluyen oligonucleótidos que tienen azúcares de cadena principal que están unidos covalentemente a grupos orgánicos de bajo peso molecular distintos de un grupo hidroxilo en la posición 3', y distintos de un grupo fosfato en la posición 5'. De este modo, los oligonucleótidos modificados pueden incluir un grupo de ribosa 2'-O-alkilado. Además, los oligonucleótidos modificados pueden incluir azúcares tales como arabinosa, en lugar de ribosa.

La presente invención contempla así preparaciones farmacéuticas que contienen moléculas antisentido modificadas que son complementarias a y que se pueden hibridar con, en condiciones fisiológicas, ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de cadherina-11 o del contrarreceptor de cadherina-11, junto con vehículos farmacéuticamente aceptables. Los oligonucleótidos antisentido se pueden administrar como parte de una composición farmacéutica. Tal composición farmacéutica puede incluir los oligonucleótidos antisentido en combinación con vehículos fisiológica

y/o farmacéuticamente aceptables estándar, que son conocidos en la técnica. Las composiciones deberían de ser estériles, y deberían de contener una cantidad terapéuticamente eficaz de los oligonucleótidos antisentido en una unidad de peso o volumen adecuada para la administración a un paciente.

5 Los ácidos nucleicos de la invención se pueden suministrar, por ejemplo, al sinovio y a las células de la articulación solos o en asociación con un vector. En el sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar: (1) el suministro de una molécula de ácido nucleico a una célula diana, y/o (2) la captación de una molécula de ácido nucleico con una célula diana. Preferiblemente, los vectores transportan a la molécula de ácido nucleico moduladora de cadherina-11 al interior de la célula diana con una degradación reducida con relación al grado de degradación que daría como resultado la ausencia del vector. Opcionalmente, se puede unir al vector un "ligando seleccionador de dianas", para suministrar selectivamente el vector a una célula que expresa sobre su superficie el receptor cognado para el ligando seleccionador de dianas. De esta manera, el vector (que contiene, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico inhibidora de cadherina-11) se puede suministrar selectivamente al revestimiento sinovial en una cápsula articular. Las metodologías para seleccionar dianas incluyen conjugados, tales como los descritos en la patente U.S. 5.391.723. Preferiblemente, las moléculas de ácido nucleico de la invención se seleccionan para el suministro a una célula localizada en una cápsula articular, tal como un sinoviocito o un linfocito.

10 En general, los vectores útiles en la invención se dividen en dos clases: vectores biológicos y vectores químicos/físicos. Los vectores biológicos son útiles para el suministro/captación de ácidos nucleicos a/por una célula diana. Los vectores biológicos incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes víricas o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o incorporación de las secuencias de ácido nucleico de la invención y fragmentos de ácidos nucleicos adicionales (por ejemplo, potenciadores, promotores) que se pueden unir a las secuencias de ácido nucleico de la invención. Los vectores víricos son un tipo preferido de vector biológico, e incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico procedentes de los siguientes virus: adenovirus; virus adenoasociados; retrovirus, tal como el virus de la leucemia murina de Moloney; virus del sarcoma murino de Harvey; virus de tumor mamario murino; virus del sarcoma de Rous; virus del tipo SV40; los virus de polio; virus de Epstein-Barr; virus de papiloma; virus del herpes; virus vacunal, virus de la polio; y virus de ARN, tal como un retrovirus. Se pueden emplear fácilmente otros vectores no nombrados pero conocidos en la técnica.

20 Un virus particularmente preferido para ciertas aplicaciones es el virus adenoasociado, un virus de ADN bicatenario. El virus adenoasociado es capaz de infectar un amplio intervalo de tipos celulares y especies, y se puede manipular mediante ingeniería para que sea deficiente en la replicación. Además tiene ventajas tales como estabilidad térmica y a disolventes lipídicos, elevadas frecuencias de transducción en células de diversas estirpes, incluyendo células hematopoyéticas, y carece de inhibición de la superinfección, permitiendo así múltiples series de transducciones. Según se da a conocer, los virus adenoasociados se pueden integrar en el ADN celular humano de una manera específica del sitio, minimizando de ese modo la posibilidad de mutagénesis de inserción y variabilidad de la expresión del gen insertado. Además, las infecciones por virus adenoasociados de tipo salvaje se han seguido en cultivo de tejidos durante más de 100 pasadas en ausencia de presión selectiva, implicando que la integración genómica de los virus adenoasociados es un suceso relativamente estable. El virus adenoasociado también puede funcionar de una manera extracromosómica.

30 En general, otros vectores víricos preferidos se basan en virus eucariotas no citopáticos, en los que los genes no esenciales se han sustituido por el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus, cuyo ciclo de vida implica la transcripción inversa de ARN vírico genómico en ADN, con la integración provírica subsiguiente en ADN celular del hospedante. Los adenovirus y retrovirus han sido aprobados para ensayos de terapia génica humana. En general, los retrovirus son deficientes en la replicación (es decir, capaces de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Tales vectores de la expresión retrovírica genéticamente alterados tienen utilidad general para la transducción de genes in vivo con eficiencia elevada. Los protocolos estándar para producir retrovirus deficientes en la replicación (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una estirpe celular de empaquetamiento con plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la estirpe celular de empaquetamiento, recogida de partículas víricas a partir de medios de cultivos de tejidos, e infección de las células diana con partículas víricas) se proporcionan en Kriegler, M., "Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual", W.H. Freeman C.O., New York (1990) y Murry, E.J. Ed. "Methods in Molecular Biology", vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey (1991). Otro vector retrovírico preferido es el vector derivado del virus de la leucemia murina de Moloney, como se describe en Nabel, E.G., et al., Science, v. 249, p. 1285-1288 (1990).

40 Además de los vectores biológicos, los vectores químicos/físicos son útiles para el suministro/captación de ácidos nucleicos o polipéptidos a/por una célula diana. Como se usa aquí, un "vector químico/físico" se refiere a una molécula natural o sintética, distinta de aquellas derivadas de fuentes bacteriológicas o víricas, capaz de suministrar el agente modulador de cadherina-11 a una célula.

50 Un vector químico/físico preferido de la invención es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen sistemas a base de lípidos, que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, y liposomas. Un sistema coloidal preferido de la invención es un liposoma. Los liposomas son vesículas membranosas artificiales que son útiles como un vector de suministro in vivo o in vitro. Se ha demostrado que grandes vesículas

unilaminares (LUV), cuyo tamaño oscila de 0,2 a 4,0 μm , pueden encapsular grandes macromoléculas. El ARN, ADN, y los viriones intactos pueden ser encapsulados en el interior acuoso, y se pueden suministrar a células en una forma biológicamente activa (Fraley, et al., Trends Biochem. Sci., v. 6, p. 77 (1981)). A fin de que un liposoma sea un vector de transferencia génica eficiente, deberían de estar presentes una o más de las siguientes características: (1) encapsulamiento del gen de interés a elevada eficiencia con retención de la actividad biológica; (2) unión preferente y sustancial a una célula diana, en comparación con células que no son diana; (3) suministro de los contenidos acuosos de la vesícula al citoplasma de la célula diana a una eficiencia elevada; y (4) la expresión exacta y eficaz de la información genética.

Los liposomas pueden ser dirigidos contra un tejido particular, acoplado el liposoma a un ligando específico, tal como un anticuerpo monoclonal, azúcar, glucolípido, o proteína específica para el tejido particular o tipo celular (por ejemplo, proteínas de la superficie específicas de sinoviocitos). Adicionalmente, el vector se puede acoplar a un péptido nuclear seleccionador de dianas, que dirigirá la molécula de ácido nucleico moduladora de cadherina-11 al núcleo de la célula hospedante.

Los liposomas están comercialmente disponibles de Gibco BRL, por ejemplo, como LIPOFECTINTM y LIPOFECTACETM, que están formados de lípidos catiónicos tales como cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) y bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB). Los métodos para obtener liposomas son bien conocidos en la técnica, y se han descrito en muchas publicaciones. Los liposomas se han repasado por Gregoriadis, G. en Trends in Biotechnology, V. 3, p. 235-241 (1985).

En general, las moléculas de ácido nucleico moduladoras de cadherina-11 se pueden administrar al sujeto (cualquier receptor mamífero) usando los mismos modos de administración que se usan actualmente para la terapia génica en seres humanos (por ejemplo, terapia génica mediada por adenovirus). En la patente U.S. 5.399.346, y en los documentos presentados en la historia documentada de esa patente, todos los cuales son documentos disponibles públicamente, se esquematiza un procedimiento patentado para llevar a cabo la terapia génica ex vivo. En general, la terapia génica ex vivo implica introducir in vitro una copia funcional de un gen o fragmento del mismo en una célula o células de un sujeto, y devolver la célula o células genéticamente manipuladas al sujeto. La copia funcional del gen o fragmento del mismo está bajo el control operable de elementos reguladores que permiten la expresión del gen en la célula o células genéticamente manipuladas. En consecuencia, los ácidos nucleicos de la invención, es decir las moléculas de ácido nucleico inhibitoras de cadherina-11, se pueden suministrar a sinoviocitos o linfocitos u otras células de la cápsula articular ex vivo o in vivo, para tratar un trastorno inflamatorio de las articulaciones. Numerosas técnicas de transfección y transducción, así como los vectores de expresión apropiados, son bien conocidos por los expertos normales en la técnica, algunos de los cuales se describen en la Solicitud PCT WO 95/00654.

Como ejemplo ilustrativo, se suministra un vector que contiene una molécula de ácido nucleico a un sitio de inflamación articular en un sujeto que es un candidato para tal terapia génica. Después, el vector modifica genéticamente los sinoviocitos, osteoblastos, células hematopoyéticas tales como macrófagos y células NK, y/o linfocitos in vivo con ADN que codifica, por ejemplo, un polipéptido de la invención inhibidor de cadherina-11. Se espera que tales células de la articulación genéticamente modificadas interfieran in vivo con la unión de cadherina-11 a su contrarreceptor.

Se pueden obtener sinoviocitos humanos primarios a partir de un sujeto que es un candidato para tal terapia génica. Después, tales células se pueden manipular genéticamente ex vivo con ADN que codifica, por ejemplo, un polipéptido inhibidor de cadherina-11.

Se espera que tales células recombinantes inhiban in vivo la adhesión mediada por cadherina-11. En todavía otro ejemplo, otro tipo celular que no expresa ni cadherina-11 ni el contrarreceptor de cadherina-11 se puede manipular genéticamente in vitro para expresar un agente inhibidor de cadherina-11, y después se puede introducir en el sitio de inflamación.

Las composiciones ejemplares que se pueden usar para facilitar la captación in vitro de las moléculas de ácido nucleico por una célula diana incluyen fosfato de calcio y otros mediadores químicos del transporte intracelular, composiciones para microinyección, composiciones para electroporación y recombinación homóloga (por ejemplo, para integrar un ácido nucleico en una localización preseleccionada dentro del cromosoma de la célula diana).

También se describen aquí fragmentos únicos aislados de una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO:1. Un fragmento de ácido nucleico único es aquel que es un "rasgo distintivo" del ácido nucleico más grande. Por ejemplo, el fragmento único es suficientemente largo para asegurar que su secuencia precisa no se encuentra en moléculas dentro del genoma humano fuera de las moléculas de ácido nucleico de cadherina-11 definidas aquí. Los expertos de pericia normal en la técnica pueden aplicar procedimientos que no van más allá de lo habitual para determinar si un fragmento es único dentro del genoma humano.

También se describe aquí una composición farmacéutica (es decir, una preparación farmacéutica) para modular en un sujeto una función mediada por cadherina-11. La composición incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente modulador de cadherina-11 (por ejemplo, un agente inhibidor de cadherina-11).

Las preparaciones farmacéuticas, como se describen anteriormente, se administran en cantidades eficaces. Para aplicaciones terapéuticas, generalmente es aquella cantidad suficiente para lograr un resultado médicamente deseable. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz es aquella cantidad necesaria para retrasar el comienzo de, inhibir la progresión de, o detener todo junto la afección particular que se está tratando. Como ejemplo, la cantidad eficaz es generalmente aquella cantidad que sirve para aliviar los síntomas (por ejemplo, dolor, inflamación, etc.) de los trastornos descritos aquí. La cantidad eficaz dependerá del modo de administración, de la afección particular que se está tratando, y del resultado deseado. También dependerá de la etapa de la afección, la gravedad de la afección, la edad y estado físico del sujeto a tratar, la naturaleza de la terapia concurrente, si la hay, la duración del tratamiento, la vía específica de administración, y factores similares dentro del conocimiento y pericia del médico. Para aplicaciones profilácticas, es aquella cantidad suficiente para retrasar el comienzo de, inhibir la progresión de, o detener todo junto la afección particular que se previene, y se puede medir por la cantidad requerida para prevenir el comienzo de los síntomas.

Generalmente, las dosis de los compuestos activos de la presente invención serían desde alrededor de 0,01 mg/kg por día a 1000 mg/kg por día, preferiblemente desde alrededor de 0,1 mg/kg hasta 200 mg/kg, y lo más preferible desde alrededor de 0,2 mg/kg hasta alrededor de 20 mg/kg, en una o más administraciones diarias de la dosis, durante uno o más días. Es de esperar que serán adecuadas dosis que oscilan desde 1-500 mg/kg, y preferiblemente dosis que oscilan desde 1-100 mg/kg, e incluso más preferiblemente dosis que oscilan desde 1-50 mg/kg. La cantidad preferida puede ser determinada por una persona con pericia normal en la técnica según la práctica estándar para determinar niveles óptimos de dosificación del agente. Generalmente se prefiere usar una dosis máxima de un agente modulador de cadherina-11 que es la dosis segura más alta según el juicio médico.

Los agentes moduladores de cadherina-11 se pueden administrar a un sujeto que necesite de tal tratamiento en combinación con terapia concurrente para tratar un trastorno inflamatorio de las articulaciones. La terapia concurrente puede ser invasiva, tal como la eliminación de líquido de la cápsula articular, o puede implicar terapia con fármacos, tal como la administración de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, fármacos antirreumáticos (por ejemplo, oro y pencilamina), fármacos moduladores del sistema inmunitario (por ejemplo, ciclosporina) y fármacos corticosteroides. Estas terapias con fármacos son bien conocidas para las personas con pericia normal en la técnica, y se administran por modos conocidos por los expertos con tal pericia. Las terapias con fármacos se administran en cantidades que son eficaces para lograr los objetivos fisiológicos (por ejemplo, para reducir inflamación en una articulación), en combinación con, por ejemplo, el agente inhibidor de cadherina-11 de la invención. De este modo, se contempla que las terapias con fármacos se pueden administrar en cantidades que no son capaces de prevenir o reducir las consecuencias fisiológicas de un trastorno inflamatorio de las articulaciones cuando las terapias con fármacos se administran solas, pero que son capaces de reducir las consecuencias cuando se administran en combinación con los agentes moduladores de cadherina-11.

El agente modulador de cadherina-11 se puede administrar solo o en combinación con las terapias con fármacos descritas anteriormente como parte de una composición farmacéutica. Tal composición farmacéutica puede incluir el agente modulador de cadherina-11 en combinación con cualquier vehículo fisiológica y/o farmacéuticamente aceptable estándar conocido en la técnica. Las composiciones deberían de ser estériles y contener una cantidad terapéuticamente eficaz del agente modulador de cadherina-11 en una unidad de peso o volumen adecuada para la administración a un paciente.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa aquí, significa una o más cargas sólidas o líquidas compatibles, diluyentes o sustancias encapsulantes, que son adecuados para la administración a un ser humano u otro animal. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos. Farmacéuticamente aceptable significa además un material no tóxico que es compatible con un sistema biológico tal como una célula, cultivo celular, tejido, u organismo. El término "vehículo" representa un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Las características del vehículo dependerán de la vía de administración. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también se pueden mezclar a conciencia con los agentes de la presente invención, y entre sí, de manera tal que no hay ninguna interacción que altere sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada. El vehículo farmacéuticamente aceptable debe ser estéril para la administración in vivo. Los vehículos fisiológica y farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes, y otros materiales que son bien conocidos en la técnica.

Las composiciones adecuadas para la administración parenteral comprenden convenientemente una preparación acuosa estéril de los agentes moduladores de cadherina-11, que es preferiblemente isotónica con la sangre del receptor. Esta preparación acuosa se puede formular según métodos conocidos usando agentes dispersantes o humectantes adecuados, y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua, disolución de Ringer, y disolución isotónica de cloruro sódico. Además, como disolvente o medio de suspensión, se emplean convencionalmente aceites fijos estériles. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo blando, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables, se pueden usar ácidos grasos tales como ácido oleico. Las formulaciones de vehículos adecuadas para las administraciones oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc., se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack

Publishing Co., Easton, PA.

5 Existe una variedad de vías de administración. El modo particular seleccionado dependerá, por supuesto, del fármaco particular seleccionado, la gravedad de la afección que se esté tratando, y la dosis requerida para la eficacia terapéutica. Los métodos de la invención, generalmente hablando, se pueden poner en práctica usando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, queriendo decir cualquier modo que produzca niveles eficaces de los compuestos activos sin provocar efectos secundarios clínicamente inaceptables. Tales modos de administración incluyen las vías oral, rectal, tópica, nasal, intradérmica, o parenteral. El término "parenteral" incluye subcutánea, intravenosa, intramuscular, o por infusión. Las vías intravenosa o intramuscular no son particularmente adecuadas para una terapia y profilaxis a largo plazo. Sin embargo, podrían ser preferidas en situaciones de emergencia. Para el tratamiento profiláctico, se preferirá la administración oral, por comodidad para el paciente así como el calendario de dosificación. La composición farmacéutica puede ser administrada directamente al sinovio, líquido sinovial o cápsula articular mediante inyección, preferiblemente con una jeringuilla.

10 Las formulaciones para uso de acuerdo con los métodos descritos aquí incluyen una jeringuilla que contiene un agente modulador de cadherina-11, tal como un agente inhibidor de cadherina-11, y un vehículo farmacéuticamente aceptable que es adecuado para inyección en el líquido sinovial.

15 Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en forma farmacéutica unitaria, y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar los agentes moduladores de cadherina-11 con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan asociando uniforme e íntimamente los agentes moduladores de cadherina-11 con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto. Las composiciones adecuadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas, tales como cápsulas, comprimidos, tabletas, conteniendo cada una una cantidad predeterminada del agente modulador de cadherina-11. Otras composiciones incluyen suspensiones en líquidos acuosos o líquidos no acuosos, tales como un jarabe, elixir o una emulsión.

20 El vehículo preferido para el suministro de los agentes moduladores de cadherina-11 puede ser una micropartícula o implante biocompatible que es adecuado para el implante en una articulación o en la vecindad de una articulación aflagida en el receptor. Los implantes bioerosionables ejemplares que son útiles de acuerdo con este método se describen en la Solicitud Internacional PCT n° PCT/US/03307 (Publicación n° WO 95/24929, titulada "Sistema de Suministro Génico Polimérico", que reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente U.S. serie n° 213.668, presentada el 15 de marzo de 1994). El documento PCT/US/0307 describe una matriz polimérica biocompatible, preferiblemente biodegradable, para contener un gen exógeno bajo el control de un promotor apropiado. La matriz polimérica se usa para lograr una liberación sostenida del gen exógeno en el sujeto. De acuerdo con la actual invención, los agentes moduladores de cadherina-11 descritos aquí se encapsulan o dispersan dentro de la matriz polimérica biocompatible, preferiblemente biodegradable, descrita en el documento PCT/US/03307. La matriz polimérica está preferiblemente en forma de una micropartícula, tal como una microesfera (en la que, por ejemplo, el agente inhibidor de cadherina-11 se dispersa a lo largo de una matriz polimérica sólida) o una microcápsula (en la que, por ejemplo, el agente inhibidor de cadherina-11 se almacena en el núcleo de una corteza polimérica). Otras formas de la matriz polimérica para contener el agente modulador de cadherina-11 incluyen películas, revestimientos, geles, implantes, y endoprótesis vasculares. El tamaño y composición del dispositivo de la matriz polimérica se seleccionan para dar como resultado una cinética favorable de liberación en el tejido en el que se implanta el dispositivo de la matriz. El tamaño del dispositivo de la matriz polimérica se selecciona además según el método de suministro que se va a usar, típicamente inyección en un tejido, tal como la articulación, cápsula articular, membrana sinovial o líquido sinovial, o administración de una suspensión mediante aerosol en las áreas nasal y/o pulmonar. La composición de la matriz polimérica se puede seleccionar para que tenga tanto velocidades favorables de degradación como también para que esté formada de un material que sea bioadhesivo, para incrementar adicionalmente la eficacia de transferencia cuando el dispositivo se administra al sinovio de una articulación. La composición de la matriz también se puede seleccionar no para que se degrade sino más bien para que se libere mediante difusión a lo largo de un período de tiempo prolongado.

25 Se pueden usar matrices poliméricas tanto no biodegradables como biodegradables para suministrar los agentes moduladores de cadherina-11, incluyendo los agentes inhibidores de cadherina-11 descritos aquí, al sujeto. Se prefieren las matrices biodegradables. Tales polímeros pueden ser polímeros naturales o sintéticos. Se prefieren los polímeros sintéticos. El polímero se selecciona basándose en el período de tiempo a lo largo del cual se desea la liberación, generalmente del orden de unas pocas horas a un año o más. Típicamente, es muy deseable la liberación a lo largo de un período que oscila desde entre unas pocas horas y tres a doce meses. El polímero está opcionalmente en forma de un hidrogel, que puede absorber hasta alrededor de 90% de su peso en agua, y además está opcionalmente reticulado con iones multivalentes o con otros polímeros.

30 En general, los agentes moduladores de cadherina-11 se suministran usando el implante bioerosionable por medio de difusión, o más preferiblemente mediante degradación de la matriz polimérica. Los polímeros sintéticos ejemplares que se pueden usar para formar el sistema de suministro biodegradable incluyen: poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polialquilenglicoles, polióxidos de alquileno, politereftalatos de alquileno, polialcoholes vinílicos, poliéteres vinílicos, poliésteres vinílicos, polihaluros vinílicos, polivinilpirrolidona, poliglicolidas,

5 polisiloxanos, poliuretanos y sus copolímeros, alquilcelulosa, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato-butirato de celulosa, acetato-ftalato de celulosa, carboxietilcelulosa, triacetato de celulosa, sal
 5 sódica de sulfato de celulosa, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo), polietileno, polipropileno, poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(alcoholes vinílicos), poliacetato de vinilo, policloruro de vinilo, poliestireno y polivinilpirrolidona.

10 Los ejemplos de polímeros biodegradables incluyen polímeros sintéticos tales como polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto)ésteres, poliuretanos, poli(ácido bórico), poli(ácido valérico), y poli(lactida-co-caprolactona), y polímeros naturales tales como alginato y otros polisacáridos, incluyendo dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de los mismos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo alquilo, alquileo, hidroxilaciones, oxidaciones, y otras modificaciones realizadas de forma habitual por los expertos en la
 15 técnica), albúmina y otras proteínas hidrófilas, ceína y otras prolaminas y proteínas hidrófobas, copolímeros y sus mezclas. En general, estos materiales se degradan ya sea mediante hidrólisis enzimática o mediante exposición a agua in vivo, por erosión superficial o masiva.

20 Los polímeros bioadhesivos de particular interés incluyen hidrogeles bioerosionables (descritos por H.S. Sawhney, C.P. Pathak y J.A. Hubell en *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587, cuyo contenido se incorpora aquí), poliácidos hialurónicos, gelatina, glutina, polianhídridos, poliácido acrílico, alginato, quitosano, poli(metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), y poli(acrilato de octadecilo).

25 Los ejemplos de polímeros no biodegradables incluyen etileno-acetato de vinilo, poliácido (met)acrílico, poliamidas, copolímeros y sus mezclas.

Otros sistemas de suministro pueden incluir sistemas de suministro de liberación con el tiempo, de liberación
 30 retrasada o de liberación sostenida. Tales sistemas pueden evitar las administraciones repetidas de los agentes moduladores de cadherina-11 descritos anteriormente, aumentando la comodidad para el paciente y el médico. Existen muchos tipos de sistemas de suministro de liberación, y son conocidos por las personas de pericia normal en la técnica. Incluyen los sistemas poliméricos descritos anteriormente, así como sistemas a base de polímeros
 35 tales como poli(lactida-glicolida), copolioxalatos, policaprolactonas, poliésteramidas, poliortoésteres, poliácido hidroxibutírico, y polianhídridos. Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos se describen, por ejemplo, en la patente U.S. 5.075.109. Los sistemas de suministro también incluyen sistemas no poliméricos que son: lípidos, incluyendo esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol, y ácidos grasos o
 40 grasas neutras, tales como mono-, di- y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas a base de péptidos; revestimientos de cera; comprimidos prensados que usan aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas que se erosionan, en los que el agente modulador de cadherina-11 está contenido en forma dentro de una matriz tal como los descritos en las patentes U.S. n^{os} 4.452.775, 4.675.189 y 5.736.152, y (b) sistemas
 45 de difusión, en los que un componente activo permea a una velocidad controlada desde un polímero, tal como se describe en las patentes U.S. n^{os} 3.854.480, 5.133.974 y 5.407.686. Además, se pueden usar sistemas de suministro con un hardware a base de bomba, algunos de los cuales están adaptados para el implante.

El uso de un implante de liberación sostenida a largo plazo puede ser particularmente adecuado para el tratamiento
 45 de afecciones crónicas. La liberación a largo plazo, como se usa aquí, significa que el implante está construido y montado para suministrar niveles terapéuticos del ingrediente activo durante al menos 30 días, y preferiblemente 60 días. Los implantes de liberación sostenida a largo plazo son bien conocidos por las personas de pericia normal en la técnica, e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos anteriormente.

Otro aspecto de la invención incluye un método de ensayo de cribado para determinar si un agente inhibidor de
 cadherina-11 putativo modula la adhesión mediada por cadherina-11.

50 Se puede usar un ensayo de adhesión in vitro como ensayo de cribado para medir la capacidad de un agente, por ejemplo un compuesto líder farmacéutico, un anticuerpo o un fragmento del mismo, un miembro de una librería o un análogo peptídico, para inhibir in vitro la adhesión mediada por cadherina-11 entre una primera célula que expresa
 cadherina-11 y una segunda célula que expresa un contrarreceptor de cadherina-11. El ensayo sirve de pronóstico de la capacidad del agente para inhibir in vivo la actividad mediada por cadherina-11.

55 Las parejas de unión en los ensayos de adhesión son los ligandos y receptores particulares implicados en la adhesión mediada por cadherina-11. En consecuencia, se pueden llevar a cabo ensayos de adhesión en los que las parejas de unión son: (1) una célula que expresa una cadherina, tal como cadherina-11 (por ejemplo, sinoviocitos, fibroblastos derivados del sinovio, osteoblastos y células transfectadas con cadherina-11), y una célula que expresa un contrarreceptor de cadherina-11 (por ejemplo, sinoviocitos, fibroblastos derivados del sinovio, osteoblastos,

linfocitos T y B, células del plasma, macrófagos, células dendríticas, mastocitos, células NK y células transfectadas con el contrarreceptor de cadherina-11); (2) una cadherina-11 aislada y una célula que expresa el contrarreceptor; (3) un contrarreceptor de cadherina-11 aislado y una célula que expresa cadherina-11; y (4) un polipéptido de cadherina-11 aislado y su contrarreceptor aislado. Cuando se usan cadherina-11 aislada o un contrarreceptor de cadherina-11 aislado, estos pueden estar presentes en forma inmovilizada (por ejemplo, inmovilizados sobre una superficie sólida), o en forma soluble.

Como se usa aquí con respecto a ensayos de adhesión, un contrarreceptor de cadherina-11 puede estar presente como un contrarreceptor de cadherina-11 aislado, un fragmento peptídico o análogo funcionalmente equivalente del contrarreceptor de cadherina-11 aislado, o una célula que expresa extracelularmente el contrarreceptor o su fragmento peptídico o análogo funcionalmente equivalente. De forma similar, la cadherina-11 puede estar presente como un polipéptido de cadherina-11 aislado, un fragmento peptídico o análogo funcionalmente equivalente de cadherina-11, o una célula que expresa extracelularmente cadherina-11 o su fragmento peptídico o análogo funcionalmente equivalente. La cadherina-11 o su contrarreceptor se puede inmovilizar sobre soportes, tales como placas de microtitulación o perlas, usando procedimientos conocidos por la persona de pericia normal en la técnica.

De este modo, se puede llevar a cabo un ensayo de cribado de alto rendimiento para seleccionar compuestos líder farmacéuticos, en el que, por ejemplo, (1) se inmoviliza cadherina-11 o el contrarreceptor de cadherina-11 sobre la superficie de un pocillo de microtitulación, (2) se añaden a los pocillos alícuotas de una librería molecular que contiene miembros de la librería, (3) se añaden a los pocillos células que expresan un contrarreceptor de cadherina-11 o cadherina-11 (según pueda ser el caso), y (4) se deja incubar los componentes de los pocillos durante un período de tiempo que es suficiente para que las células se unan a la cadherina-11 inmovilizada. Preferiblemente, las células se marcan (por ejemplo, se preincuban con ⁵¹Cr o un colorante fluorescente) antes de su adición al pocillo de microtitulación. Tras el período de incubación, los pocillos se lavan para eliminar las células no adherentes, y se determina la señal (atribuible al marcador en las células que se adhieren). Para establecer el valor de adhesión máximo, se usa un control positivo (por ejemplo, no está presente ningún miembro de la librería) en la misma placa de microtitulación. Para establecer los niveles máximos de inhibición de la adhesión, se usa un control negativo (por ejemplo, cadherina-11 soluble añadida al pocillo de microtitulación) en la misma placa de microtitulación. Como ejemplo, se puede inmovilizar cadherina-11 a la superficie, y las células añadidas pueden ser células T.

El ensayo de cribado de alto rendimiento también puede usar una cadherina-11 y/o un contrarreceptor de cadherina-11 aislados, los cuales pueden estar en forma inmovilizada o soluble.

Los agentes a cribar pueden ser compuestos líder farmacéuticos sintetizados en librerías moleculares. Estas librerías pueden producir péptidos (es decir, librerías peptídicas) o pequeñas moléculas orgánicas o inorgánicas. Los agentes a cribar también pueden ser análogos peptídicos de cadherina-11 o del contrarreceptor de cadherina-11. Preferiblemente, el péptido o análogo peptídico de cadherina-11 o del contrarreceptor de cadherina-11 corresponde a la porción del polipéptido responsable de la unión con su pareja de unión. Para ambos polipéptidos, esta porción es extracelular.

Según todavía otro aspecto de la invención, se proporciona un método para cribar una librería molecular para identificar moléculas líder farmacéuticas que inhiben la adhesión in vitro entre una primera célula que expresa cadherina-11 y una segunda célula que expresa un contrarreceptor de cadherina-11. Por ejemplo como ensayo de cribado, se puede usar la capacidad de una molécula para inhibir la unión de una célula sinovial a un linfocito T, o la unión de una célula sinovial a otra célula sinovial in vitro, para identificar compuestos líder que inhiben la unión de cadherina-11 a su contrarreceptor. Tales ensayos de adhesión son bien conocidos en la técnica, y se ilustran mediante el ensayo proporcionado en los Ejemplos.

Un método de cribado preferido implica llevar a cabo un ensayo de adhesión entre una primera célula y una segunda célula en presencia o ausencia de al menos un miembro de la librería molecular, para determinar si el miembro de la librería modula la adhesión entre la primera célula y la segunda célula in vitro. Preferiblemente, la primera célula expresa cadherina-11, y la segunda célula expresa un contrarreceptor de cadherina-11. Esto implica: (1) llevar a cabo un primer ensayo de adhesión entre la primera célula y la segunda célula, para obtener un primer resultado del ensayo de adhesión; (2) llevar a cabo un segundo ensayo de adhesión entre la primera célula y la segunda célula en presencia del miembro de la librería, para obtener un segundo resultado del ensayo de adhesión; y (3) comparar los resultados primero y segundo del ensayo de adhesión, para determinar si el miembro de la librería modula la adhesión entre la primera célula y la segunda célula. Una diferencia entre el resultado primero y segundo del ensayo de adhesión indica la capacidad del miembro de la librería para modular la unión entre la primera célula y la segunda célula, y de este modo la unión de cadherina-11 a su contrarreceptor. De este modo, por ejemplo, un resultado del ensayo de adhesión que muestra una unión reducida entre la primera célula y la segunda célula cuando el ensayo se realiza en presencia de un miembro de la librería, en comparación con el resultado del ensayo obtenido cuando el ensayo se realiza en ausencia del miembro de la librería, indica que el miembro de la librería inhibe la unión de la primera célula y la segunda célula. En los Ejemplos se proporciona un ensayo de adhesión ejemplar. Otros de tales ensayos de adhesión son bien conocidos en la técnica y se pueden desarrollar y llevar a cabo usando una experimentación no más allá de lo habitual. De este modo, por ejemplo, el ensayo de adhesión se puede llevar a cabo sustituyendo la primera célula y la segunda célula por una cadherina-11 aislada y su contrarreceptor aislado.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona un ensayo de cribado para la búsqueda de compuestos líder farmacéuticos que modulan la función celular a través de cadherina-11. Estos ensayos de cribado implican determinar un primer valor para un parámetro celular (por ejemplo, la proliferación celular) de una célula que expresa cadherina-11 (por ejemplo, un sinoviocito) en ausencia de un miembro de la librería molecular, determinar un
 5 segundo valor para el mismo parámetro celular en una célula que expresa cadherina-11 en presencia de un miembro de la librería molecular, y comparar el primer y segundo valor del parámetro celular como una medida del efecto del miembro de la librería molecular sobre ese parámetro celular particular. Como ejemplo, un segundo valor que es menor que el primer valor indica una reducción en la proliferación celular. La proliferación celular se puede medir de muchas maneras, bien conocidas por el experto normal, incluyendo, pero sin limitarse a, la incorporación
 10 de nucleótidos radioactivos (por ejemplo, ensayos de captación de timidina) y contando las células. En la patente U.S. 6.077.833 se describe un ejemplo de un ensayo de proliferación de células T. En estos ensayos, las células a usar pueden estar adheridas a una superficie sólida, o pueden estar presentes en una suspensión.

Igualmente, el ensayo también se puede llevar a cabo midiendo otros parámetros celulares, tales como la apoptosis, migración, unión y/o secreción de factores (por ejemplo, factor inflamatorio). Para ensayos de cribado de la apoptosis, se pueden usar los recuentos celulares como una lectura de la cantidad de apoptosis. En la patente U.S.
 15 nº 6.107.088 se describen otros ensayos de apoptosis. Para ensayos de secreción de factores, se puede ensayar el sobrenadante en el que existen las células en busca de la presencia de factores, usando otros ensayos funcionales o ensayos inmunológicos (por ejemplo, ensayos ELISA, bioensayos, transferencias Western, ensayos RIA, etc., para detectar citocinas particulares). Por ejemplo, se puede medir la secreción de IL-6 usando el sobrenadante en un ensayo que mide el crecimiento celular de células dependientes de IL-6. También se puede medir la activación de
 20 células inmunitarias generales, usando ensayos tales como los descritos en la patente U.S. nº 5.569.585.

La función celular puede ser una función distinta de la unión de cadherina-11 a un contrarreceptor de cadherina-11. De este modo, el compuesto líder farmacéutico preferible, según este aspecto de la invención, es aquel que potencia o inhibe una función celular mediada por cadherina-11, tal como proliferación, señalización, apoptosis, producción o secreción de factores, migración o unión, aunque no inhibe la unión de cadherina-11 a un contrarreceptor de
 25 cadherina-11. Preferiblemente, los agentes moduladores de cadherina-11 que no inhiben la unión de cadherina-11 a su contrarreceptor se seleccionan de librerías de pequeñas moléculas, tales como librerías de química combinatoria.

En todos los ensayos mencionados anteriormente, opcionalmente se lleva a cabo inicialmente un cribado de unión preliminar antes de los ensayos de cribado descritos aquí. Tal cribado de unión preliminar enriquecería y en algunos casos identificaría compuestos líder farmacéuticos que se unen a cadherina-11 o a su contrarreceptor. Estos
 30 ensayos preliminares no medirían necesariamente la capacidad inhibidora o moduladora de la señal de los compuestos identificados, sino más bien servirían para reducir el número de compuestos a cribar posteriormente. De este modo, como ejemplo, inicialmente se puede poner en contacto una librería molecular con cadherina-11 o un contrarreceptor de cadherina-11 (preferiblemente inmovilizada), y los miembros de la librería que se unen a
 35 cadherina-11 o a un contrarreceptor de cadherina-11 se cribarían posteriormente en busca de su capacidad para inhibir la unión de cadherina-11 a su contrarreceptor, o para modular la función celular de células que expresan cadherina-11. Puesto que los agentes que modulan la función celular lo hacen en células que expresan cadherina-11, el cribado preliminar apropiado para estos agentes sería la unión a cadherina-11. Para agentes inhibidores de la invención, el cribado preliminar puede ensayar la unión a cadherina-11 o a un contrarreceptor de cadherina-11.

Los agentes moduladores de cadherina-11 descritos aquí se pueden sintetizar a partir de péptidos u otras biomoléculas, incluyendo pero sin limitarse a, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, isoprenoides, purinas, pirimidinas, derivados o análogos estructurales de los anteriores, o combinaciones de los mismos y similares. Se pueden usar
 40 librerías de presentación de fagos y librerías combinatorias químicas para desarrollar y seleccionar compuestos sintéticos que son agentes moduladores y/o inhibidores de cadherina-11. También se prevé el uso de agentes obtenidos a partir de peptoides, biooligómeros al azar (patente U.S. 5.650.489), benzodiazepinas, diversómeros tales como didantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos, peptidomiméticos no peptídicos con un armazón de beta-D-glucosa, oligocarbamatos o peptidilfosfonatos.

Los agentes descritos aquí se pueden producir en masa usando tecnología de librería. En algunos aspectos, los métodos de la invención utilizan esta tecnología de librerías para generar e identificar subsiguientemente pequeñas
 50 moléculas, incluyendo pequeños péptidos, que se unen a una cadherina-11 o a un contrarreceptor de cadherina-11. Una ventaja del uso de las librerías es la manipulación fácil de millones de diferentes candidatos putativos de pequeño tamaño en volúmenes de reacción pequeños (es decir, en reacciones de síntesis y de cribado). Otra ventaja de las librerías es la capacidad para sintetizar agentes que de otro modo pueden no ser obtenibles usando fuentes de origen natural, particularmente en el caso de restos no peptídicos.

Una "librería molecular" se refiere a una colección de moléculas estructuralmente diversas. Las librerías moleculares se pueden sintetizar químicamente o se pueden producir recombinantemente. Como se usa aquí, un "miembro de una librería molecular" se refiere a una molécula que está presente en la librería molecular. En general, una librería molecular contiene de dos a 10^{12} moléculas, y cualquier número entero entre ellos, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , etc., como si todos y cada número entero se ha citado aquí.

Los métodos para preparar librerías de moléculas son bien conocidos en la técnica, y existen comercialmente

muchas librerías. Las librerías de interés en la invención incluyen librerías peptídicas, librerías oligonucleotídicas aleatorizadas, librerías combinatorias orgánicas sintéticas, y similares. Las librerías peptídicas degeneradas se pueden preparar fácilmente en disolución, en forma inmovilizada como librerías de presentación de péptidos de flagelos bacterianos, o como librerías de presentación de fagos. Se pueden seleccionar ligandos peptídicos a partir de librerías combinatorias de péptidos que contienen al menos un aminoácido. Las librerías se pueden sintetizar de peptoides y restos sintéticos no peptídicos. Además, se pueden sintetizar tales librerías que contienen restos sintéticos no peptídicos que están menos sometidos a degradación enzimática en comparación con sus contrapartes de origen natural. Las librerías también incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, péptido en librerías plasmídicas, librerías polisómicas, librerías de aptámeros, librerías de péptidos sintéticos, librerías de pequeñas moléculas sintéticas y librerías químicas. Las librerías también pueden comprender una estructura de carbono cíclica o una estructura heterocíclica y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales identificados anteriormente.

Muchos de estos agentes descritos aquí se pueden sintetizar usando enfoques de librerías recombinantes o químicas. Se puede generar un vasto conjunto de agentes a partir de librerías de compuestos sintéticos o naturales. Existen, o se pueden producir fácilmente, librerías de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales. Las librerías y compuestos naturales y producidos sintéticamente se pueden modificar fácilmente a través de medios químicos, físicos, y bioquímicos convencionales. Las parejas de unión conocidas de cadherina-11 se pueden someter a modificaciones químicas dirigidas o al azar tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc. para producir análogos estructurales de estas parejas de unión, que pueden funcionar como agonistas o antagonistas.

Las librerías incluyen librerías producidas recombinantemente de proteínas de fusión. Una librería ejemplar producida recombinantemente se prepara ligando fragmentos de ADNc de cadherina-11 en, por ejemplo, el vector pGEX-2T (Pharmacia, Piscataway, NJ). Este vector contiene el término carboxi de glutatona S-transferasa (GST) procedente de *Schistosoma japonicum*. El uso del vector que contiene GST facilita la purificación de proteínas de fusión de GST con cadherina-11 a partir de lisados bacterianos mediante cromatografía de afinidad sobre glutatona-sefarosa. Tras la elución desde la columna de afinidad, las proteínas de fusión de cadherina-11 con GST se evalúan en busca de la actividad, por ejemplo poniendo en contacto al menos una proteína de fusión con una célula que expresa cadherina-11 antes (o concurrentemente) de poner en contacto la célula que expresa el contrarreceptor de cadherina-11 con una célula que expresa cadherina-11. Las proteínas de fusión que inhiben la unión entre las células que expresan el contrarreceptor de cadherina-11 y las células que expresan cadherina-11 se seleccionan como compuestos líder farmacéuticos. Estas proteínas también son útiles en la caracterización adicional de la porción de cadherina-11 a la que se une el contrarreceptor. Véase, por ejemplo, Koivunen E. et al. (1993) J. Biol. Chem. 268(27):20205 que describe la selección de péptidos que se unen a la integrina $\alpha^5\beta_1$ desde una librería de presentación de fagos.

También se usan habitualmente en la técnica las librerías de ADN y ARN sintéticas. Por ejemplo, Ellington y Szostak describen el uso de librerías nucleotídicas al azar para identificar nuevos ligandos (Ellington y Szostak, Nature, 346, 818-822 (1990)). Como ejemplo, se pueden realizar modificaciones que crean variantes de cadherina-11 a nivel de la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de cadherina-11. Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos mediante mutación dirigida por PCR, mutagénesis dirigida al sitio según el método de Kunkel (Kunkel, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 82: 488-492, 1985), o mediante síntesis química de las moléculas de ácido nucleico que codifican cadherina-11 o un contrarreceptor de cadherina-11.

Como se describe en el documento U.S. 5.908.609, los compuestos de librerías ejemplares también incluyen, pero no se limitan a, péptidos tales como, por ejemplo, péptidos solubles, incluyendo pero sin limitarse a miembros de librerías peptídicas al azar (véase, por ejemplo, Lam, K.S. et al. 1991, Nature 354:82-84; Houghten, R et al. 1991, Nature 354:84-86), y librerías moleculares derivadas de química combinatoria obtenidas a partir de aminoácidos de configuración D y/o L, fosfopéptidos (incluyendo, pero sin limitarse a, miembros de librerías de fosfopeptídicas al azar o parcialmente degeneradas, dirigidas (véase, por ejemplo, Songyang, Z. et al. 1993, Cell 72: 767-778), anticuerpos (incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, antiidiotípicos, quiméricos o de una sola cadena, o fragmentos de librerías de expresión de Fab, F(ab')₂ y Fab (y sus fragmentos que se unen a epítopos), y pequeñas moléculas orgánicas o inorgánicas. Otros compuestos que se pueden cribar incluyen pero no se limitan a moléculas orgánicas pequeñas.

Los compuestos que se pueden diseñar para satisfacer los criterios anteriores incluyen polipéptidos y peptidomiméticos. El peptidomimético puede ser una molécula híbrida que incluye componentes tanto de aminoácidos como no de aminoácidos, por ejemplo el mimético puede incluir componentes de aminoácidos para las regiones cargadas positivamente y cargadas negativamente, y un no aminoácido (por ejemplo, piperidina) que tiene el mismo tamaño aproximado y dimensión de un aminoácido hidrófobo (por ejemplo, fenilalanina) como componente hidrófobo.

También se pueden generar librerías combinatorias de pequeñas moléculas. Una librería combinatoria de pequeños compuestos orgánicos es una colección de análogos estrechamente relacionados que difieren entre sí en uno o más puntos de diversidad, y son sintetizados mediante técnicas orgánicas usando procesos de múltiples etapas. Las librerías combinatorias incluyen un vasto número de pequeños compuestos orgánicos. Un tipo de librería

combinatoria se prepara por medio de métodos de síntesis paralela, para producir un conjunto de compuestos. Un "conjunto de compuestos", como se usa aquí, es una colección de compuestos identificable por sus direcciones espaciales en coordenadas cartesianas y dispuestos de forma que cada compuesto tiene un núcleo molecular común y uno o más elementos de diversidad estructural variable. Los compuestos en tal conjunto de compuestos se producen en paralelo en vasijas de reacción separadas, identificándose y siendo seguido cada compuesto por su dirección espacial. Los ejemplos de mezclas de síntesis paralela y métodos de síntesis paralela se proporcionan en el documento U.S.S.N. 08/177.497, presentado el 5 de enero de 1994, y su Solicitud de Patente Publicada PCT W095/18972 correspondiente, publicada el 13 de julio de 1995, y la patente U.S. nº 5.712.171, concedida el 27 de enero de 1998, y la Solicitud de Patente Publicada PCT W0 96/22529 correspondiente.

De este modo, se describen aquí compuestos de bajo peso molecular que modulan las funciones mediadas por cadherina-11. Estos compuestos se pueden usar para modular la función de cadherina-11, o se pueden usar como compuestos líder para el diseño de mejores compuestos usando los métodos de diseño de fármacos racionales a base de ordenador.

Un experto en la técnica estará familiarizado con métodos para predecir el efecto sobre la conformación proteica de un cambio en la secuencia proteica, y puede de este modo "diseñar" una variante que funciona como agente modulador según métodos conocidos. Un ejemplo de tal método es descrito por Dahiyat y Mayo en Science 278:82-87, 1997, que describen el diseño de proteínas de novo. El método se puede aplicar a una proteína conocida para variar sólo una porción de la secuencia polipeptídica. Aplicando los métodos computacionales de Dahiyat y Mayo, se pueden proponer y ensayar variantes específicas de cadherina-11 o un contrarreceptor de cadherina-11, para determinar si la variante retiene una conformación deseada. De forma similar, Blake (patente U.S. nº 5.565.325) enseña el uso de estructuras de ligandos conocidos para predecir y sintetizar variantes con una función similar o modificada.

En la técnica se conocen otros métodos para preparar o identificar péptidos que se unen a una diana particular. Por ejemplo, se puede usar la impresión molecular para la construcción de novo de estructuras macromoleculares, tales como péptidos, que se unen a una molécula particular. Véase, por ejemplo, Kenneth J. Shea, Molecular Imprinting of Synthetic Network Polymers: The De Novo synthesis of Macromolecular Binding and Catalytic Sites, TRIP Vol. 2, nº 5, mayo de 1994; Klaus Mosbach, Molecular Imprinting, Trends in Biochem. Sci., 19(9) enero de 1994; y Wulff, G., en Polymeric Reagents and Catalysts (Ford, W. T., Ed.) ACS Symposium Series nº 308, p. 186-230, American Chemical Society (1986). Como ejemplo, un método para preparar miméticos de contrarreceptores de cadherina-11 implica las etapas de (i) polimerizar monómeros funcionales alrededor de un sustrato conocido (el molde, o, en este caso, el dominio de unión al contrarreceptor de cadherina-11) que muestra una actividad deseada; (ii) eliminar la molécula molde; y entonces (iii) polimerizar una segunda clase de monómeros en el espacio vacío dejado por el molde, para proporcionar una nueva molécula que muestra una o más propiedades deseadas que son similares a las del molde. Además de preparar péptidos de esta manera, también se pueden preparar otras moléculas de unión tales como polisacáridos, nucleósidos, fármacos, nucleoproteínas, lipoproteínas, hidratos de carbono, glucoproteínas, esteroides, lípidos, y otros materiales biológicamente activos. Este método es útil para diseñar una amplia variedad de miméticos biológicos que son más estables que sus contrapartes naturales, debido a que se preparan típicamente mediante la polimerización de monómeros funcionales mediante radicales libres, dando como resultado un compuesto con una cadena principal no biodegradable. Otros métodos para diseñar tales moléculas incluyen, por ejemplo, el diseño de fármacos basándose en relaciones de actividad de las estructuras, que requieren la síntesis y evaluación de un número de compuestos y la formación de modelos moleculares.

Además se describen aquí agentes que comprenden restos peptidomiméticos, incluyendo aminoácidos que no son de origen natural. Tales variantes se pueden sintetizar sustituyendo restos de aminoácidos implicados en funciones mediadas por cadherina-11 por restos peptidomiméticos. Por ejemplo, los restos de glutamina (Glu) se pueden sustituir por moléculas de α -aminoadipato, y las posiciones de tirosina se pueden sustituir por 4-carboximetil-Phe. En las variantes se pueden usar análogos a base de fósforo y que no son de fósforo, tales como miméticos de fosfortirosina. Los análogos de tirosina que se pueden usar en lugar de los restos de tirosina incluyen fenilalanina (Phe), pentafluorofenilalanina (Pfphe), 4-carboximetil-L-fenilalanina (cmPhe), 4-carboxidifluorometil-L-fenilalanina (F₂cmPhe), 4-fosfonometilfenilalanina (Pmp), (difluorofosfonometil)fenilalanina (F₂Pmp), O-malonil-L-tirosina (malTyr o OMT), y fluoro-O-maloniltirosina (FOMT). También se pueden incorporar en agonistas y antagonistas sintéticos miméticos a base de fosfonatos, que sustituyen una unidad metilénica por el enlace de éster de tiosilfosfato. Adicionalmente, los restos de ácido glutámico se pueden modificar para que posean un grupo metilénico adicional, o simplemente se pueden sustituir por α -amino-adipato (Adi). Otros restos que se pueden usar incluyen el aminoácido no de origen natural ácido 1-aminociclohexilcarboxílico (Ac₆C) y el ácido 3-(2-hidroxinaftalen-1-il)-propil, o 2-azetidincarboxílico o ácido piperídico (que tienen estructuras anulares de 6 miembros y de 4 miembros, respectivamente) para restos de prolina, S-etilisotiurea, 2-NH₂-tiazolina y 2-NH₂-tiazol. También es útil en la síntesis de variantes el uso de sustitutos de restos de asparagina, tales como 3-indolil-propilo.

Otras modificaciones potenciales previstas por la invención incluyen modificaciones de cisteínas, histidinas, lisinas, argininas, tirosinas, glutaminas, asparaginas, prolinas, y grupos carboxílicos, como son bien conocidas en la técnica y se describen en la patente US 6.037.134. La síntesis de las variantes mencionadas anteriormente se describe en las citadas referencias, y están perfectamente dentro del campo de la persona de pericia normal en la técnica.

Las variantes también se pueden modificar para introducir o estabilizar ciertos rasgos estructurales. Como ejemplo, se pueden incorporar flexiones β en las variantes, preferiblemente peptídicas, o las variantes se pueden sintetizar como péptidos cíclicos, por ejemplo incorporando enlaces de tioéter.

5 Los métodos de cribado descritos aquí proporcionan información útil para el diseño farmacéutico racional de nuevos agentes que son capaces, por ejemplo, de modular una respuesta del sistema inmunitario. En Saragovi, H. et al., (1992) *Biotechnology* 10:773; Haber E., (1983) *Biochem. Pharmacol.* 32(13): 1967; y Connolly Y., (1991) *Methods of Enzymology* 203, Cap. 29 "Computer-Assisted Rational Drug Design" p. 587-616, se proporcionan procedimientos ejemplares para el diseño farmacéutico racional.

10 De este modo, se puede usar el conocimiento de las estructuras primaria, secundaria o terciaria de ligandos de origen natural y de receptores para elegir o diseñar racionalmente moléculas que se unirán con el ligando o el receptor. En particular, se puede usar el conocimiento de las regiones de unión de los ligandos y receptores para elegir y diseñar racionalmente compuestos que son más potentes que los ligandos de origen natural a la hora de provocar su respuesta normal, o que son inhibidores competitivos de la interacción ligando-receptor.

15 Una vez elegidos o diseñados racionalmente y seleccionados, los miembros de la librería se pueden alterar, por ejemplo en la secuencia primaria, para producir péptidos nuevos y diferentes. Estos fragmentos se pueden producir mediante mutagénesis dirigida al sitio, o se pueden sintetizar in vitro. Estos nuevos fragmentos se pueden ensayar entonces en busca de su capacidad para unirse al receptor o ligando, y, variando sus secuencias primarias y observando los efectos, se pueden producir péptidos con una capacidad de unión o inhibidora incrementada.

20 Como alternativa, las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de los agentes moduladores de cadherina-11 descritos aquí, por ejemplo aquellas que corresponden al dominio extracelular de cadherina-11, se pueden usar en sistemas de formación de modelos a base de ordenador, para predecir la estructura secundaria y terciaria del dominio extracelular. Tales sistemas a base de ordenador son bien conocidos por aquellos de pericia normal en la técnica del diseño racional de fármacos. Basándose en la estructura terciaria de una proteína receptora, a menudo es posible identificar una región de unión que está implicada en su actividad biológica. A partir de esta información, se pueden diseñar racionalmente péptidos u otros compuestos que incluyen o imitan esta estructura, y/o que son capaces de unirse a ella. De esta manera, se pueden diseñar nuevos compuestos que imitan la actividad del receptor o ligando, o que actuarán como inhibidores competitivos del receptor o ligando.

25 Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden realizar diversas modificaciones de los análogos peptídicos anteriores sin separarse de la naturaleza esencial de la invención. En consecuencia, se pretende que los péptidos que incluyen sustituciones conservativas y proteínas acopladas en las que un péptido de la invención se acopla a un soporte sólido, tal como una perla polimérica, una molécula portadora, tal como hemocianina de lapa californiana, o un grupo informador, tal como un radiomarcador u otra etiqueta, también estén abarcados dentro de las enseñanzas de la invención.

30 Como se usa aquí, "sustitución de aminoácidos conservativa" se refiere a una sustitución de aminoácidos que no altera las características de carga relativa o tamaño del péptido en el que se realiza la sustitución de aminoácidos. Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen sustituciones hechas entre aminoácidos dentro de los siguientes grupos: (a) MILV; (b) FYW; (c) KRH; (d) AG; (e) ST; (f) QN; y (g) ED.

35 Los anticuerpos monoclonales que inhiben la unión de cadherina-11 a su contrarreceptor también son útiles en ensayos de cribado para identificar compuestos líder farmacéuticos en librerías moleculares. Los anticuerpos se unen específicamente a una cadherina o a un contrarreceptor de cadherina, y de ese modo inhiben la unión de estas dos moléculas entre sí. De este modo, los ensayos de cribado que usan anticuerpos monoclonales también son útiles para evaluar la capacidad de una molécula de librería para inhibir la unión de cadherina-11 a su contrarreceptor. Tales ensayos de cribado a base de anticuerpos se realizan poniendo en contacto un anticuerpo (que se une específicamente a cadherina-11 y, por ejemplo, inhibe la adhesión entre un linfocito T y una célula que expresa cadherina-11) con cadherina-11 en presencia y ausencia de al menos un miembro de la librería molecular, y determinar si el miembro de la librería modula la unión entre el anticuerpo y cadherina-11.

La cadherina-11 puede ser presentada como una célula que expresa cadherina-11, una cadherina-11 aislada, o un péptido aislado relacionado con, o derivado de, el dominio extracelular de cadherina-11. De forma similar, el contrarreceptor de cadherina-11 se puede presentar en una cualquiera de estas formas.

40 En un ejemplo en el que el anticuerpo es un anticuerpo anti-cadherina-11, el método de cribado con anticuerpos implica: (1) llevar a cabo un primer ensayo con anticuerpos en presencia del anticuerpo y cadherina-11 y en ausencia de una molécula de librería, para obtener un primer resultado del ensayo con anticuerpos; (2) llevar a cabo un segundo ensayo con anticuerpos en presencia del anticuerpo, cadherina-11 y la molécula de librería, para obtener un segundo resultado del ensayo con anticuerpos; y (3) comparar los resultados primero y segundo de los ensayos con anticuerpos, para determinar si el miembro de la librería molecular modula la unión entre el anticuerpo y cadherina-11. Según este ejemplo, una unión reducida entre el anticuerpo y cadherina-11 en presencia del miembro de la librería indica que el miembro de la librería ha inhibido la unión del anticuerpo a cadherina-11. Los ensayos de unión con anticuerpos también se pueden usar para evaluar la capacidad relativa de un miembro de la

librería molecular para bloquear la unión entre un anticuerpo específico para el contrarreceptor de cadherina-11 y el contrarreceptor, usando una experimentación no más allá de lo habitual.

Estos y otros ensayos de cribado también se pueden usar para identificar los análogos peptídicos de cadherina-11 funcionalmente equivalentes que son útiles para inhibir la unión de cadherina-11 a su contrarreceptor.

- 5 Los agentes moduladores de cadherina-11 también se pueden usar, por ejemplo, para dirigir una toxina (por ejemplo, ricina) o un agente detectable (por ejemplo, un radiomarcador, un marcador fluorescente, un marcador enzimático) a células que expresan contrarreceptores de cadherina-11 o cadherina-11. Los métodos para acoplar tales toxinas y/o agentes a proteínas y/o anticuerpos para aplicaciones in vivo e in vitro se describen, por ejemplo, en Killen y Lindstrom (1984), "Specific killing of lymphocytes that cause experimental Autoimmune Myasthenia Gravis by toxin-acetylcholine receptor conjugates", J. Immunol. 133:1335; Jansen, F.K., et al. (1982), "Immunotoxins: Hybrid molecules combining high specificity and potent cytotoxicity", Immunolog. Rev. 62: 185-216, véase también las patentes U.S. N^{os} 3.652.761; 4.478.946 y 4.554.088.

- 15 La invención se entenderá de forma más completa haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos están destinados simplemente a ilustrar las realizaciones de la invención y no se deben de interpretar como limitantes del alcance de la invención. También se entiende que las figuras de las referencias son solamente ilustrativas y no son esenciales para realizar la invención reivindicada.

Ejemplos

- 20 La importancia de cateninas en la mediación de la adhesión célula a célula dependiente de cadherinas sugiere que se pueden usar como sondas para identificar nuevas cadherinas. De este modo, para estos estudios, se obtuvieron antisueros frente a tanto α - como β -catenina humana, y se usaron para identificar proteínas coprecipitantes en sinoviocitos humanos tipo B, ya que no se sabía que este tipo celular expresaba una cadherina. Además, basándose en los alineamientos de la cadherina E, P y N humana, se pudieron apreciar cuatro regiones de identidad. Usando estas regiones, se sintetizaron oligonucleótidos sentido y antisentido, y se llevó a cabo una PCR en condiciones de restricción normal usando como molde ARN procedente de sinoviocitos humanos tipo B. Los clones derivados de la PCR se secuenciaron entonces para identificar aquellos que eran secuencias de cadherina auténticas. Tales clones candidatos se usaron entonces como sondas en el análisis de transferencia Northern usando ARN de sinoviocitos.

- 25 Antes de la presente invención, no se había informado que las cadherinas se expresasen en sinoviocitos. La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que células de tipo fibroblastos derivadas de sinovio y células de revestimiento de la membrana sinovial expresan una cadherina. Se clonó el gen que codifica esta cadherina, se obtuvieron anticuerpos monoclonales frente a él, y se demostró su expresión en células transfectantes, sinoviocitos humanos cultivados y en sinovio reumatoide humano recientemente aislado.

Ejemplo 1

Material y Métodos:

- 35 **Anticuerpos.** Los antisueros para catenina P se describieron previamente (Cepek KL. et al. Proc Natl Acad Sci USA 93: 6567-71, 1996). El antisuero para pan-cadherina dirigido contra los 24 aminoácidos C-terminales de N-cadherina de pollo se describió previamente (Geiger B. et al. J Cell Sci 97:607-14, 1990) y se obtuvo de Sigma (St. Louis, MO). Los anticuerpos monoclonales (mAbs) de ratón específicos contra cadherina E humana (E4.6, IgG₁) se obtuvieron en este laboratorio (Cepek KL. et al. Nature 372:190-3, 1994), el anti-cadherina N humana (13A9, IgG₁) fue suministrado amablemente por M. Wheelock (Departamento de Biología, Toledo University, Toledo OH), el anti-cadherina VE humana (BV9, IgG1) fue un regalo de M.G. Lampugnani (Laboratory of Vascular Biology, Mario Negri Institute, Milano, Italia), y el anti-cadherina P humana (NCC-CAD-299, IgG₁) lo proporcionó S. Hirohashi (División de Patología, National Cancer Research Institute, Tokio, Japón), Leu 4 (anti-CD3) de Becton Dickinson (Mountain View, CA), OKT4 (anti-CD4), OKT8 (anti-CD8) de Ortho Pharmaceutical Corp. (Raritan, NJ), y anti-CD68 de Dako (Carpenteira, CA).

- 45 **Cultivo celular.** Las membranas sinoviales procedentes de pacientes con RA diagnosticados basándose en los criterios actuales (Arnett FC. et al. Arthritis Rheum 31:315-324, 1988) se obtuvieron durante procedimientos quirúrgicos de sinovectomía de la mano y de la muñeca, y de sustitución articular. El tejido sinovial se preparó picando, y se trató con 1 mg/ml de colagenasa (tipo 1, Worthington Biochemicals, Freehold, NJ), 0,15 mg/ml de Dnase I (Sigma, St. Louis, MO) y 5 nM de CaCl₂ en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) (Gibco, Grand Island, NY), y se agitó a 37°C durante 1 hora. La suspensión celular se hizo pasar a través de un tamiz metálico de malla 40, y se colocó en un matraz de cultivo tisular de 75 cm² (BD Labware, Lincoln Park, NJ). Las células liberadas del tejido sinovial se sembraron en matraces en DME suplementado con 10% de suero fetal de ternera y 10% de suero humano, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de sulfato de estreptomycin, y 50 µM de 2-mercaptoetanol, y se mantuvieron en CO₂ al 10%. Se encontró que las monocapas confluentes estaban compuestas principalmente de los sinoviocitos tipo II (similares a fibroblastos) tras la tercera pasada.

La estirpe celular fibroblástica L murina (ATCC CCL1.3) se hizo crecer en DMEM, alto contenido de glucosa con

10% de suero de ternera bovina (Hyclone), 10 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 10 μ M de aminoácidos no esenciales (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de sulfato de estreptomycin, y 50 μ M de 2-mercaptoetanol, y se mantuvo en CO₂ al 10%. Se hicieron crecer transfectantes de células L en el medio anterior con G418 (Gibco), a 1 mg/ml.

- 5 Células renales embrionarias humanas HEK293 (obtenidas de ATCC) se mantuvieron en 10% (vol/vol) de FBS inactivado por calor (Hyclone Labs Inc., Logan, UT) y medio DME (Gibco BRL) a 37°C en CO₂ al 10%.

Se hicieron crecer células Cos-7 en DMEM, alto contenido de glucosa con 10% de suero Nu-Serum (Collaborative Research, Inc., Bedford, MA), 10 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml sulfato de estreptomycin, y 50 μ M de 2-mercaptoetanol, y se mantuvieron en CO₂ al 10%.

- 10 Células epiteliales de mama humanas 16E6.A5 se mantuvieron como se describe (Cepek KL. et al. Proc Natl Acad Sci USA 93:6567-71, 1996).

Los linfocitos T se aislaron de PMBC derivadas de gradiente de densidad Ficoll-Hypaque, usando anti-CD3 (o mAb anti-CD2) y perlas magnéticas. Se pueden usar directamente después de la liberación usando Detach-a-bead, o se pueden estimular con PHA y cultivar en medio que contiene IL-2, como estirpes de células T a largo plazo. Los linfocitos recientes aislados se usarán en ensayos de adhesión a monocapas de sinoviocitos. La adhesión se examinará en ensayos estáticos de célula a célula en placas de 96 pocillos usando linfocitos marcados fluorescentemente. El porcentaje de células T marcadas fluorescentemente que se unen a monocapas de sinoviocitos se determina usando un lector de placas mediante fluorescencia, y se pueden determinar los efectos del bloqueo de mAb específico.

- 20 *Marcado e Inmunoprecipitación.* 1 x 10⁷ monocapas de sinoviocitos confluentes se marcaron en la superficie con 2 mCi de Na¹²⁵I (Du Pont-New England Nuclear, Boston, MA) usando lactoperoxidasa y peróxido de hidrógeno en 0,5 ml de PBS como se describe previamente (Brenner, et al. 1987). Las células se solubilizaron en tampón de lisis que contiene disolución salina tamponada con Tris (TBS, 50 mM de base Tris, pH 7,6, 140 mM de NaCl) con 1% de Triton X-100, 8 mM de yodoacetamida (IAA) y 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, Sigma, St. Louis, MO)
- 25 1 mM de CaCl₂, durante 1 h a 4°C. El material insoluble en el detergente se eliminó mediante centrifugación durante 20 minutos a 8.000 g, a 4°C. El sobrenadante se preclaró con 6 μ l de suero de conejo normal y 300 μ l de mAb 187.1 como sobrenadante de cultivo durante 30 minutos, seguido de dos rondas (1 h y 12 h) de 200 μ l de una suspensión celular al 10% (peso/volumen) de la cepa I de Cowen de Staphylococcus aureus fija (PANSCORBIN, Calbiochem, San Diego, CA). Los lisados que contienen el equivalente a 2 x 10⁶ células se inmunoprecipitaron con
- 30 10-15 μ l de antisuero de conejo o 15 μ l de antisuero anti-catenina β o 1 μ l de ascitis E4.6, y 100 μ l de cada uno de los sobrenadantes de mAb 13A9, BV9, Cad-299, 2G4, 5H6, 3H10 más 100 μ l de sobrenadante de cultivo de mAb 187.1 anti-cadena K de ratón de rata, para la unión óptima a proteína A. Entonces, los complejos inmunitarios se incubaron con proteína A-Sepharose (Pharmacia Biotechnology Inc., Piscataway, NJ) durante 1 h a 4°C con agitación. Los inmunoprecipitados se lavaron tres veces con 0,5% (vol/vol) de Tritón X-100 en 0,5 M de NaCl con 50 mM, 1 mM de CaCl₂. El pelete de la resina se hirvió en tampón de muestra (10% de glicerol, 3% de SDS, 0,5 M de Tris, pH 6,8) que contiene 2-mercaptoetanol (concentración final 5%, condiciones reductoras), y se analizó mediante
- 35 7,5% de SDS-PAGE como se describe (Laemmli UK. Nature 227:680-5, 1970), y se sometió a procedimientos fluorográficos estándar.

- 40 *Clonación Molecular del Gen que Codifica la Cadherina Sinovial.* Se ha aislado un número de nuevos clones de ADNc de cadherina usando oligonucleótidos de consenso a base de PCR que corresponden a secuencias del dominio citoplásmico que están muy conservadas entre cadherinas (Suzuki S. et al. Cell Reg 2:261-70, 1991). Basándose en los alineamientos de las cadherinas humanas, se pueden apreciar cuatro regiones de identidad, que corresponden a los restos 753-762 (EEGGGEEDQD) (SEC ID NO:3), restos 840-847 (SLSSLNNS) (SEC ID NO:4), restos 853-859 (QDYDYLN) (SEC ID NO:5), Y restos 865-875 (FKKLADMYGGG) (SEC ID NO:6) de la cadherina E humana, los cuales en cada caso son idénticos a las cadherinas E, P y N. Usando estas regiones, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos degenerados sentido: 5'-GCGGGATCCGAIGARGGIGGNGGA-3' (SEC ID NO:7) y antisentido: 5'GGGGAGCTCTCIGCIARYTTYTTRAA-3' (N = A, T, G, C; I = Inosina; Y = C, T y R = A, G) (SEC ID NO:8). Se extrajo ARNm de sinoviocitos reumatoides, y se transcribieron de forma inversa y se usaron como un molde para la amplificación mediante PCR usando 0,5 U/reacción de Taq polimerasa y las siguientes condiciones:
- 50 desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación a 60°C durante 1 minuto, extensión a 72°C durante 1 minuto, durante 30 ciclos. Los productos de la PCR del tamaño esperado de 385 pb se clonaron en el plásmido pCRII usando el sistema de clonación TA (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), y se secuenciaron subsiguientemente con el kit Sequenase (United States Biochemical Corp., Cleveland, OH) para identificar aquellos que parecen ser secuencias de cadherina auténticas. Se buscó en la base de datos GenBank usando el programa FASTA/BLAST.

- 55 *Transferencia Northern.* Para confirmar la expresión en sinoviocitos de la cadherina clonada, se llevó a cabo un análisis de transferencia Northern. Se hibridó ARNm, aislado de sinoviocitos tipo B, células 16A5, células Jurkat y un SKNSH, con el fragmento de 385 pb de la cadherina clonada por PCR, y con gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa como control, ambos marcados con [³²P] dCTP/dGTP mediante cebado al azar. La hibridación se llevó a cabo a 43°C durante 16 h. Después de la hibridación, la membrana se lavó a una restricción final de 0,1 x SSC con 2% (p/v) de SDS a 56°C, y se autorradiografió en una película Kodak MS a -70°C.
- 60

Construcción del Clon de Longitud Completa. Se construyó cadherina-11 de longitud completa mediante PCR usando los siguientes cebadores XV14 (5'-CCAAAAATGAAGGAGAACTACT-3') (SEC ID NO:9) y XV15 (5'-GGGGGATCCATTGTTAAGAATCGTCATCAAA-3') (SEC ID NO:10), que comprenden la región codificante de cadherina-11. El producto de ~2,4 kb se subclonó en los sitios Hind III/Bam HI de pBluescript SK, y se secuenció para confirmar que no se introdujeron mutaciones durante la PCR.

Construcción del Vector de Expresión de Cadherina-11-Fc. Se produjo un adaptador de ADN bicatenario, que contiene un extremo romo en Msc I en 5', y los cinco codones finales de la región extracelular de cadherina-11 humana, y un extremo cohesivo Xho I en 3', hibridando los oligonucleótidos complementarios XVCad11A (5'-GCTGGCACCGTGGTTGGGAGAGT-3') (SEC ID NO: 11) y XVCad11 E (5'-GGGGGGCTCGAGGTAGGCCTCTGCGTTGCAGG-3') (SEC ID NO:12) usando *Pyrococcus furiosus* (PFU) (Stratagene, La Jolla, CA) según las recomendaciones del fabricante. Este adaptador se ligó entonces al extremo 3' de un fragmento Hind III-Msc I que codifica el resto de la región extracelular de cadherina-11 humana a partir del clon de longitud completa de cadherina-11 generado previamente. El fragmento de Hind III-Xho I resultante se introdujo en el marco, en dirección 5' de la codificación de la región bisagra y Fc de IgG₁ humana, en un derivado de pCDM8 (pCDMBFc), también escindido con Hind III-Xho I. En la Figura 3 se muestra la secuencia de la región de unión. El constructo se secuenció para confirmar su integridad en la región de unión usando un secuenciador de ADN automatizado (Perkin Elmer). Finalmente, el ADNc de cadherina-11-Fc se cortó a partir de pCDM8 usando Hind III y Not I, y se insertó en el vector de expresión pCEP4 (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA), escindido con Hind III y Not I.

Producción de proteínas de Cadherina-11-Fc. Se transfectaron de forma estable células HEK293 (10⁶ células por matraz de 75 cm²) con 20 µg de ADN plasmídico, usando el kit de transfección de mamíferos (Stratagene). Después de hacer crecer durante 24 h en medio no selectivo, las células se transfirieron a placas de cultivo tisular de 96 pocillos y se incubaron en medio selectivo que contiene 200 µg/ml de higromicina B. Después de 15 días, los sobrenadantes procedentes de pocillos que contienen colonias resistentes se evaluaron en busca de proteínas de fusión mediante ELISA.

Para producir la proteína de cadherina-11-Fc, se hicieron crecer clones positivos en matraces de 500 cm² de capa triple (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en 10% (v/v) de Ultralow Ig FBS (GIBCO BRL), 200 µg/ml de higromicina B y DMEM. Después de 7-10 días de cultivo, el sobrenadante se cosechó y se filtró a través de una membrana de 0,2 µm. La proteína de fusión de cadherina-11-Fc se purificó entonces en una columna GammaBind G-Sepharose (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) no usada previamente. La columna se lavó con TBS y 1 mM de CaCl₂, pH 7,4, y después se eluyó con 0,2 M de glicina y 1 mM de CaCl₂, pH 2,3. Las fracciones que contienen proteína de fusión purificada se dializaron en TBS y 1 mM de CaCl₂, pH 7,4, y después se almacenaron a -20°C. La pureza de lay tinción con azul de Coomassie, y la concentración se determinó mediante el ensayo de Bradford usando BSA como patrón (BioRad Labs., Hercules, CA).

Generación de Transfectantes Estables de Cadherina-11 con Células L. Para producir células que expresan cadherina-11 en la superficie, se transfectaron células L con 20 µg de pLK/Cad11 o con el vector pLK neo solo, usando el kit de transfección de mamíferos (Stratagene). Después, las células transfectadas se seleccionaron mediante cultivo en 1 mg/ml de G418.

Generación de Anticuerpos Monoclonales de Ratón Frente a Cadherina-11. Los mAb 2G4, 5H6 y 3H10 se produjeron inmunizando ratones BALB/c con tres inyecciones intraperitoneales de 20 µg de cadherina-11-Fc purificada. La inyección inicial fue en CFA, y las 2 subsiguientes fueron en IFA, a intervalos de 2 semanas, seguido de una revacunación final IV de 30 µg. Tres días después de la inmunización intravenosa, los esplenocitos se aislaron y se fusionaron con células de mieloma murino NS1, en presencia de PEG (peso molecular 1450), como se describe previamente (Lerner EA. Yale J Biol Med 54:387-402. 1981). Los hibridomas se seleccionaron con medio que contiene aminopterina, y los sobrenadantes de los hibridomas se cribaron mediante ELISA diferencial en placas revestidas con 301-Fc, E-cad-Fc e IgG₁ humana. El cribado subsiguiente se realizó en los clones seleccionados mediante FACS en células que expresan cadherina-11, en comparación con células positivas a cadherina E. Los hibridomas seleccionados se subclonaron tres veces mediante dilución limitante. Los isotipos de 2G4 (IgG₁), 5H6 (IgG₁) y 3H10 (IgG₁) se determinaron mediante ELISA usando mAb específico del isotipo murino (Jackson Immunoresearch Lab).

Inmunohistoquímica. Se obtuvieron muestras de tejido humano normales y se congelaron rápidamente en compuesto OCT (Ames Co., Elkart, IN) enfriado con nitrógeno líquido a alrededor de -140°C. Las secciones tisulares congeladas se seleccionaron (6 µm) con un criostato CM 10800 (Leica Inc. Deerfield, IL), y después se fijaron en acetona durante 10 minutos, se secaron de forma breve en aire, y se tiñeron mediante un método de inmunoperoxidasa indirecta, usando el complejo de avidina-biotina-peroxidasa (Vector Labs, Burlingame, CA) y 3-amino-9-etilcarbazol (Sigma, St. Louis, MO) como cromógeno.

Resultados

Clonación de la Cadherina de Sinoviocitos. La clonación a base de PCR de oligonucleótidos degenerados de una cadherina en ADNc de sinoviocitos tipo B mostró un producto específico en sinoviocitos que estaba ausente en el

control negativo (Figura 1). Este producto se identificó como un fragmento de cadherina-11 cuando se secuenció y se comparó con la base de datos de GenBank. Entonces se confirmó mediante transferencia Northern la expresión de cadherina-11 en ARN derivado de sinovio, usando como sonda el fragmento de 385 pb clonado por PCR. La Figura 2 muestra la hibridación positiva de la sonda de cad-11 en sinoviocitos tipo B y en un control positivo, una estirpe celular de neuroblastoma (SKNSH), y estaba ausente en células epiteliales (16EA5) y células Jurkat. A fin de obtener el gen de longitud completa, se generó mediante PCR un clon que comprende toda la secuencia codificante de cadherina-11 humana. El producto de la PCR obtenido se secuenció para confirmar la falta de mutaciones.

Producción de Proteína de Fusión de Cadherina-11-Fc Humana. Un constructo que codifica la porción extracelular de cadherina-11 humana se ligó en el marco a un constructo que codifica la región Fc de IgG₁ (incluyendo los dominios de bisagra, C_H2, y C_H3). La transfección de células HEK293 y la selección con higromicina B condujo a la generación de estirpes estables que expresan la proteína de fusión soluble de cadherina-11-Fc. Se espera que la proteína de fusión de cadherina-11-Fc sea dímera, debido a la presencia de enlaces de disulfuro en la (Figura 3), posiblemente similar a los dímeros de cadherina sobre la superficie celular (Shapiro L. et al. Nature 374:327-37, 1995; Nagar BM. et al. 380:360-4, 1996). Después de la purificación en proteína G-Sepharose, SDS-PAGE reveló la presencia de una proteína del tamaño esperado (~123 kD), tras la reducción.

Generación de Anticuerpos Monoclonales Anti-Cadherina-11. Para producir mAb que reconocen específicamente la región extracelular de cadherina-11, se inmunizaron ratones BALB/c con la proteína de fusión purificada de cadherina-11-Fc. Los mAb que reaccionaron preferentemente con cadherina-11-Fc pero no con IgG₁ humana ni con cadherina E-Fc mediante ELISA se seleccionaron para el estudio posterior. Tres de estos anticuerpos mAb 3H10, 5H6 y 2G4 reconocieron específicamente cadherina-11-Fc en ELISA. También, estos mAb tiñen cadherina-11 expresada sobre la superficie de células L transfectadas con cadherina-11 de longitud completa, como se muestra en la Figura 4. Estos tres mAb también precipitaron una proteína de 123 kD a partir de los sinoviocitos marcados en la superficie.

A fin de estudiar el patrón de distribución de la proteína en el tejido, se llevó a cabo una inmunohistoquímica directa en secciones tisulares congeladas. Se observó el notable patrón de tinción, en el que mAb anti-cadherina-11 tiñó preferentemente las células de revestimiento en el sinovio de RA. Esto sugiere que cadherina-11 desempeña un papel importante en la determinación de la adhesión de las células del revestimiento sinovial entre sí, y de ese modo en la determinación de la arquitectura tisular del sinovio. Este papel puede ser crítico para el crecimiento y proliferación así como para la activación de las células de la membrana sinovial. Obsérvese que las membranas sinoviales carecen de una capa epitelial, y en su lugar tienen la capa de revestimiento sinovial. De forma interesante, estos mAb anti-cadherina-11 también reconocieron unas pocas células en el subrevestimiento adyacente a las áreas de células T que infiltran el sinovio (Figura 6, paneles A y B).

Ejemplo 2: Ensayos de Adhesión

Se hicieron crecer monocapas de células adherentes (es decir, sinoviocitos humanos) en placas de cultivo de tejidos Linbro de 96 pocillos de fondo plano. Se añadieron por pocillo 10⁴ células adherentes en 100 µl de medio completo, y se dejó crecer durante dos a tres días hasta que alcanzaron la confluencia. Justo antes de la adición de células T o células COS-7 transfectadas con el contrarreceptor de cadherina-11, las monocapas de células adherentes se lavaron con medio de ensayo. Para marcar las células T o células COS-7, se diluyeron 25 µg de 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5 (y 6)-carboxifluoresceína (BCECF-AM, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) en 5 µl de DMSO, y se añadieron a una suspensión de 5 X 10⁶/ml de células T o células COS-7 en medio completo. Las células se incubaron a 37°C durante 25 minutos, y después se lavaron dos veces en medio de ensayo (PBS que contiene 1 mM de CaCl₂, 2 mM de MgCl₂ y 10 mM de HEPES). Después de lavar, se añadieron 50.000 células T de células COS-7 marcadas, en 100 µl de medio de ensayo, a las monocapas de células adherentes. Se dejó que las células T de células COS-7 se sedimentaran sobre monocapas de células adherentes durante 25 ó 40 minutos a 37°C. Las células no unidas se eliminaron cambiando el medio de la placa. Las células unidas se detectaron usando un lector de placas por fluorescencia (IDEXX Co., Portland, ME). Si se llevó a cabo el bloqueo con el anticuerpo, las células T, las células COS-7, o las monocapas de células de sinoviocitos se preincubaron con una dilución 1:250 de fluido ascítico o 10 µg/ml de mAb purificado durante cinco minutos a 37°C antes del encuentro con el segundo tipo de células. Se llevaron a cabo al menos cuatro réplicas. El % de células unidas se calcula leyendo las unidades de fluorescencia obtenidas después de que se eliminaron por lavado las células no unidas, dividiendo este número entre las unidades de fluorescencia de entrada, y multiplicando por 100. Las diluciones en serie de células marcadas mostraron que se detectan en el intervalo lineal tan pocas como 1000 células.

Ejemplo 3: Un ensayo de adhesión para seleccionar miembros de la librería como compuestos líder farmacéuticos.

El ensayo de adhesión descrito aquí se basa en el ensayo descrito por Cepek, K., et al., en J. Immunol. 150(8):3459-3470 (1993).

Para cribar una librería molecular u otra mezcla para determinar la presencia de un análogo peptídico funcionalmente equivalente o un miembro de la librería capaz de inhibir la adhesión mediada por cadherina-11, se lavan células T con HBSS (disolución salina tamponada de Hank, Gibco) y se preequilibraban con diluciones en serie,

que contienen HBSS, de la disolución de la librería o de otra disolución que contiene péptidos o que contiene pequeñas moléculas (a lo largo de un amplio intervalo de concentraciones (por ejemplo, 1 ng/ml a 100 ug/ml) para tiempos seleccionados (por ejemplo, 30 min., 1 hora, 2 horas, 6 horas) a 37°C antes de la incubación con monocapas sinoviales que se han lavado con HBSS. Los análogos peptídicos funcionalmente equivalentes o los agentes inhibidores de cadherina-11 se identifican en busca de su capacidad para inhibir la unión de células T a la monocapa sinovial.

Ejemplo 4: Contrarreceptor de cadherina-11 en células T y B

Se llevó a cabo un ensayo citométrico de flujo de la estirpe 5 de células T sinoviales y células CP-B con un anticuerpo monoclonal 2G4 anti-cadherina-11. La tinción de control se llevó a cabo con el anticuerpo monoclonal de control P3. La Figura 6 demuestra la falta de tinción de la estirpe celular T o B con el anticuerpo monoclonal específico de cadherina-11.

Para ensayar la unión de cadherina-11 a células T y B, se usaron la estirpe 5 de células T sinoviales y células CP-B. Las placas se trataron con cadherina-11-Fc o ICAM-1-Fc e IgG1. Ambas estirpes celulares se marcaron con un colorante fluorescente y se añadieron a las placas, y se determinó la fluorescencia de entrada en un lector de placas mediante fluorescencia. Se dejó que las células se adhiriesen durante 30 minutos a 37°C, se lavaron subsiguientemente, y se determinó la relación de células unidas a la fluorescencia. El porcentaje de células unidas se determinó usando la ecuación: fluorescencia tras el lavado/fluorescencia de entrada x 100. La unión a cadherina-11-Fc pero no a las proteínas de control ICAM-1-Fc e IgG1 se bloquea mediante el anticuerpo monoclonal 7D3 anti-cadherina-11. Los resultados se expresan como la media + 1 SD (n = 4), como se muestra en la Figura 7.

Varias líneas de prueba apoyan la posibilidad de que la cadherina-11 se une a un contrarreceptor expresado en linfocitos B y T. En primer lugar, el análisis inmunohistoquímico de RA de sinovio demostró la expresión de cadherina-11 en células del subrevestimiento en estrecho contacto con linfocitos. En segundo lugar, algunas estirpes de células T derivadas de sinovio con RA y células B derivadas de sangre periférica se unen específicamente a cadherina-11-Fc, y esta interacción es bloqueada por los mAb anti-cadherina-11. En tercer lugar, la cadherina-11 no fue expresada en estas estirpes leucocíticas, sugiriendo que la interacción no está mediada por la unión homófila sino por una unión heterófila a un receptor de cadherina-11 (C11CR) expresado en células B y T.

Discusión

Se describe aquí por primera vez la presencia de una cadherina expresada en sinoviocitos. Las cadherinas son expresadas en todas las células que forman tejidos sólidos, y son responsables de segregar y clasificar células durante la morfogénesis de tejidos. Desempeñan un papel estableciendo la polaridad celular y manteniendo la morfología tisular en tejidos adultos. Aunque las cadherinas funcionan clásicamente para mediar la adhesión homófila de célula a célula, algunas veces se unen a cadherinas no idénticas o a integrinas, tales como la integrina $\alpha^E\beta_7$.

Los hallazgos de la expresión preferente de cadherina-11 en el revestimiento del sinovio con RA sugiere que esta molécula de adhesión podría ser la molécula clave usada por el paño invasivo para unirse al cartílago y eventualmente erosionar el hueso, particularmente puesto que se ha dado a conocer que esta cadherina es expresada por osteoblastos. Esto es de particular relevancia debido a que se puede interferir con el proceso destructivo crónico, característico de la RA, si se puede modular la función adhesiva de cadherina-11.

La identificación de cadherina-11 a partir de sinoviocitos tipo B humanos se considera un hallazgo importante, y su distribución tisular en el sinovio con RA apoya este papel relevante en la invasión y eventualmente erosión del hueso adyacente.

Se debe sobreentender que lo precedente es meramente una descripción detallada de ciertas realizaciones preferidas.

También se describen aquí las siguientes cláusulas numeradas:

1. Un método para tratar un sujeto que tiene un trastorno inflamatorio de las articulaciones que comprende administrar a un sujeto que necesite de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de cadherina-11, en el que el agente inhibidor de cadherina-11 inhibe la unión de cadherina-11 a un contrarreceptor de cadherina-11.

2. El método de la cláusula 1, en el que el trastorno inflamatorio de las articulaciones es sinovitis crónica.

3. El método de la cláusula 1, en el que el trastorno inflamatorio de las articulaciones es una enfermedad autoinmunitaria.

4. El método de la cláusula 3, en el que la enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide.

5. El método de la cláusula 1, en el que el agente inhibidor de cadherina-11 se administra localmente a un sinovio del sujeto.

6. El método de la cláusula 1, en el que el agente inhibidor de cadherina-11 se une selectivamente a cadherina-11.
7. El método de la cláusula 1, en el que el agente inhibidor de cadherina-11 se une selectivamente a un contrar receptor de cadherina-11.
8. El método de la cláusula 1, en el que el agente inhibidor de cadherina-11 es un anticuerpo.
- 5 9. El método de la cláusula 1, en el que el agente inhibidor de cadherina-11 es un polipéptido de cadherina-11.
10. El método de la cláusula 1, en el que el agente inhibidor de cadherina-11 es un polipéptido de cadherina-11 soluble.
11. El método de la cláusula 10, en el que el polipéptido de cadherina-11 soluble se une selectivamente al contrar receptor de cadherina-11.
- 10 12. El método de la cláusula 10, en el que el polipéptido de cadherina-11 soluble se une selectivamente a cadherina-11.
13. El método de la cláusula 1, en el que el agente inhibidor de cadherina-11 es una molécula de ácido nucleico.
14. El método de la cláusula 13, en el que la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido de cadherina-11 soluble.
- 15 15. El método de la cláusula 13, en el que la molécula de ácido nucleico es una molécula antisentido.
16. El método de la cláusula 1, en el que el contrar receptor de cadherina-11 se selecciona del grupo que consiste en una cadherina, una integrina, un hidrato de carbono y un miembro de la familia de inmunoglobulinas.
17. El método de la cláusula 1, en el que la cadherina-11 y el contrar receptor de cadherina-11 son expresados por célula independientes.
- 20 18. El método de la cláusula 1, en el que la cadherina-11 es expresada por una célula seleccionada del grupo que consiste en un sinoviocito de tipo A, un sinoviocito de tipo B, un fibroblasto derivado del sinovio, una célula de revestimiento de la membrana sinovial, un osteoblasto, una célula derivada de cartílago y una célula derivada del paño invasivo.
- 25 19. El método de la cláusula 1, en el que el contrar receptor de cadherina-11 es expresado por una célula seleccionada del grupo que consiste en un sinoviocito de tipo A, un sinoviocito de tipo B, un fibroblasto derivado del sinovio, una célula de revestimiento de la membrana sinovial, un osteoblasto, una célula derivada de cartílago, una célula derivada del paño invasivo, un linfocito T, un linfocito B, un mastocito, un macrófago, una célula del plasma, una célula dendrítica y una célula asesina natural.
- 30 20. El método de la cláusula 1, en el que el contrar receptor de cadherina-11 es un componente de una matriz extracelular de un tejido, un cartílago o un hueso.
21. El método de la cláusula 1, en el que el contrar receptor de cadherina-11 es una molécula segregada por una célula.
22. Un método para cribar una librería molecular para identificar un compuesto líder farmacéutico que modula la adhesión mediada por cadherina-11 entre una primera célula que expresa cadherina-11 y una segunda célula que expresa un contrar receptor de cadherina-11, donde el método comprende
- 35 llevar a cabo un primer ensayo de adhesión entre la primera célula y la segunda célula para obtener un primer resultado del ensayo de adhesión,
- llevar a cabo un segundo ensayo de adhesión entre la primera célula y la segunda célula en presencia de al menos un miembro de la librería molecular para obtener un segundo resultado del ensayo de adhesión, y
- 40 comparar los resultados de adhesión primero y segundo para determinar si el al menos un miembro de la librería molecular modula la adhesión mediada por cadherina-11 entre la primera célula y la segunda célula.
23. El método de la cláusula 22, en el que el contrar receptor de cadherina-11 se selecciona del grupo que consiste en una cadherina, una integrina, un hidrato de carbono y un miembro de la familia de inmunoglobulinas.
- 45 24. El método de la cláusula 22, en el que la primera célula se selecciona del grupo que consiste en un sinoviocito de tipo A, un sinoviocito de tipo B, un fibroblasto derivado del sinovio, una célula de revestimiento de la membrana sinovial y un osteoblasto.
25. El método de la cláusula 22, en el que la segunda célula se selecciona del grupo que consiste en un sinoviocito de tipo A, un sinoviocito de tipo B, un fibroblasto derivado del sinovio, una célula de revestimiento de la membrana

- sinovial, un osteoblasto, un linfocito T, un linfocito B, una célula del plasma, una célula dendrítica, un macrófago, un mastocito y una célula asesina natural.
26. El método de la cláusula 22, en el que la primera célula deriva del paño invasivo y la segunda célula deriva de cartílago.
- 5 27. El método de la cláusula 22, en el que la librería molecular se produce recombinantemente.
28. El método de la cláusula 22, en el que la librería molecular se sintetiza químicamente.
29. El método de la cláusula 22, en el que la librería molecular es una librería de péptidos.
30. Un método para cribar una librería molecular para identificar un compuesto líder farmacéutico que modula la adhesión mediada por cadherina-11, donde el método comprende
- 10 llevar a cabo un primer ensayo de adhesión entre cadherina-11 y un contrarreceptor de cadherina-11 para obtener un primer resultado del ensayo de adhesión,
- llevar a cabo un segundo ensayo de adhesión entre cadherina-11 y un contrarreceptor de cadherina-11 en presencia de al menos un miembro de la librería molecular para obtener un segundo resultado de adhesión, y
- 15 comparar los resultados primero y segundo del ensayo de adhesión para determinar si el al menos un miembro de la librería molecular modula la adhesión mediada por cadherina-11.
31. El método de la cláusula 30, en el que la cadherina-11 está aislada.
32. El método de la cláusula 30, en el que la cadherina-11 es presentada por una célula.
33. El método de la cláusula 32, en el que la célula se selecciona del grupo que consiste en un sinoviocito de tipo A, un sinoviocito de tipo B, un fibroblasto derivado del sinovio, una célula de revestimiento de la membrana sinovial, un osteoblasto, una célula derivada de cartílago y una célula derivada del paño invasivo.
- 20 34. El método de la cláusula 30, en el que el contrarreceptor de cadherina-11 se selecciona del grupo que consiste en una cadherina, una integrina, una subunidad de integrina, un hidrato de carbono y un miembro de la familia de inmunoglobulinas.
35. El método de la cláusula 30, en el que el contrarreceptor de cadherina-11 es un polipéptido de fusión de cadherina-11.
- 25 36. El método de la cláusula 30, en el que el contrarreceptor de cadherina-11 está aislado.
37. El método de la cláusula 30, en el que el contrarreceptor de cadherina-11 es presentado por una célula.
38. El método de la cláusula 37, en el que la célula se selecciona del grupo que consiste en un sinoviocito de tipo A, un sinoviocito de tipo B, un fibroblasto derivado del sinovio, una célula de revestimiento de la membrana sinovial, un osteoblasto, un linfocito T, un linfocito B, una célula asesina natural, una célula del plasma, un mastocito, una célula dendrítica, un macrófago, una célula derivada de cartílago y una célula derivada del paño invasivo.
- 30 39. El método de la cláusula 30, en el que la cadherina-11 es soluble.
40. El método de la cláusula 30, en el que el contrarreceptor de cadherina-11 es soluble.
41. El método de la cláusula 30, en el que la librería molecular se produce recombinantemente.
- 35 42. El método de la cláusula 30, en el que la librería molecular se sintetiza químicamente.
43. El método de la cláusula 30, en el que la librería molecular es una librería de péptidos.
44. Un método para tratar un sujeto que tiene un trastorno inflamatorio de las articulaciones que comprende administrar a un sujeto que necesite de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que modula una función celular en una célula que expresa cadherina-11.
- 40 45. El método de la cláusula 44, en el que la función celular se selecciona del grupo que consiste en proliferación celular, secreción de factores, apoptosis, migración y unión.
46. Un método para cribar una librería molecular para identificar un compuesto líder farmacéutico que modula una función celular en una célula que expresa cadherina-11, donde el método comprende
- 45 determinar un primer valor de la función celular para una célula que expresa cadherina-11 en ausencia de un miembro de la librería molecular,

determinar un segundo valor de la función celular para una célula que expresa cadherina-11 en presencia de al menos un miembro de la librería molecular, y

comparar el primer valor y el segundo valor para determinar si el al menos un miembro de la librería molecular modula una función celular en una célula que expresa cadherina-11.

5 47. El método de la cláusula 46, en el que la función celular se selecciona del grupo que consiste en proliferación celular, secreción de factores, apoptosis, migración y unión.

48. Un método para cribar una librería molecular para identificar un compuesto líder farmacéutico que modula la secreción de factores en una célula que expresa cadherina-11, donde el método comprende

10 determinar un primer valor de la secreción de factores para una célula que expresa cadherina-11 en ausencia de un miembro de la librería molecular,

determinar un segundo valor de la secreción de factores para una célula que expresa cadherina-11 en presencia de al menos un miembro de la librería molecular, y

comparar el primer valor y el segundo valor para determinar si el al menos un miembro de la librería molecular modula la secreción de factores en una célula que expresa cadherina-11.

15 49. El método de la cláusula 48, en el que la secreción de factores se selecciona del grupo que consiste en la secreción de estromelisina, secreción de colágeno, secreción de colagenasa y secreción de IL-6.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Brigham and Women's Hospital, Inc.

<120> Métodos y composiciones para el tratamiento de enfermedad inflamatoria mediante el uso de agentes moduladores de cadherina-11

5 <130> B0801/7187W0/ERP/MAT

<150> US 60/152.456

<151> 1999-09-03

<150> US 60/153.490

<151> 1999-09-13

10 <160> 12

<170> FastSEQ para Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 2625

<212> ADN

15 <213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (156)...(2546)

<400> 1

```

cggcagccct gacgtgatga gctcaaccag cagagacatt ccatcccaag agaggtctgc      60
gtgacgcgtc cgggaggcca ccctcagcaa gaccaccgta cagtgggtgg aaggggtgac      120
agctgcattc tcctgtgcct accacgtaac caaaa atg aag gag aac tac tgt          173
                               Met Lys Glu Asn Tyr Cys
                               1           5

tta caa gcc gcc ctg gtg tgc ctg ggc atg ctg tgc cac agc cat gcc      221
Leu Gln Ala Ala Leu Val Cys Leu Gly Met Leu Cys His Ser His Ala
                10                15                20

ttt gcc cca gag cgg cgg ggg cac ctg cgg ccc tcc ttc cat ggg cac      269
Phe Ala Pro Glu Arg Arg Gly His Leu Arg Pro Ser Phe His Gly His
                25                30                35

cat gag aag ggc aag gag ggg cag gtg cta cag cgc tcc aag cgt ggc      317
His Glu Lys Gly Lys Glu Gly Gln Val Leu Gln Arg Ser Lys Arg Gly
                40                45                50

tgg gtc tgg aac cag ttc ttc gtg ata gag gag tac acc ggg cct gac      365
Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe Val Ile Glu Glu Tyr Thr Gly Pro Asp
                55                60                65                70

ccc gtg ctt gtg ggc agg ctt cat tca gat att gac tct ggt gat ggg      413
Pro Val Leu Val Gly Arg Leu His Ser Asp Ile Asp Ser Gly Asp Gly
                75                80                85

```

20

ES 2 592 507 T3

aac att aaa tac att ctc tca ggg gaa gga gct gga acc att ttt gtg Asn Ile Lys Tyr Ile Leu Ser Gly Glu Gly Ala Gly Thr Ile Phe Val 90 95 100	461
att gat gac aaa tca ggg aac att cat gcc acc aag acg ttg gat cga Ile Asp Asp Lys Ser Gly Asn Ile His Ala Thr Lys Thr Leu Asp Arg 105 110 115	509
gaa gag aga gcc cag tac acg ttg atg gct cag gcg gtg gac agg gac Glu Glu Arg Ala Gln Tyr Thr Leu Met Ala Gln Ala Val Asp Arg Asp 120 125 130	557
acc aat cgg cca ctg gag cca ccg tcg gaa ttc att gtc aag gtc cag Thr Asn Arg Pro Leu Glu Pro Pro Ser Glu Phe Ile Val Lys Val Gln 135 140 145 150	605
gac att aat gac aac cct ccg gag ttc ctg cac gag acc tat cat gcc Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Glu Phe Leu His Glu Thr Tyr His Ala 155 160 165	653
aac gtg cct gag agg tcc aat gtg gga acg tca gta atc cag gtg aca Asn Val Pro Glu Arg Ser Asn Val Gly Thr Ser Val Ile Gln Val Thr 170 175 180	701
gct tca gat gca gat gac ccc act tat gga aat agc gcc aag tta gtg Ala Ser Asp Ala Asp Asp Pro Thr Tyr Gly Asn Ser Ala Lys Leu Val 185 190 195	749
tac agt atc ctc gaa gga caa ccc tat ttt tcg gtg gaa gca cag aca Tyr Ser Ile Leu Glu Gly Gln Pro Tyr Phe Ser Val Glu Ala Gln Thr 200 205 210	797
ggt atc atc aga aca gcc cta ccc aac atg gac agg gag gcc aag gag Gly Ile Ile Arg Thr Ala Leu Pro Asn Met Asp Arg Glu Ala Lys Glu 215 220 225 230	845
gag tac cac gtg gtg atc cag gcc aag gac atg ggt gga cat atg ggc Glu Tyr His Val Val Ile Gln Ala Lys Asp Met Gly Gly His Met Gly 235 240 245	893
gga ctc tca ggg aca acc aaa gtg acg atc aca ctg acc gat gtc aat Gly Leu Ser Gly Thr Thr Lys Val Thr Ile Thr Leu Thr Asp Val Asn 250 255 260	941
gac aac cca cca aag ttt ccg cag agg cta tac cag atg tct gtg tca Asp Asn Pro Pro Lys Phe Pro Gln Arg Leu Tyr Gln Met Ser Val Ser 265 270 275	989
gaa gca gcc gtc cct ggg gag gaa gta gga aga gtg aaa gct aaa gat Glu Ala Ala Val Pro Gly Glu Glu Val Gly Arg Val Lys Ala Lys Asp 280 285 290	1037
cca gac att gga gaa aat ggc tta gtc aca tac aat att gtt gat gga Pro Asp Ile Gly Glu Asn Gly Leu Val Thr Tyr Asn Ile Val Asp Gly 295 300 305 310	1085
gat ggt atg gaa tcg ttt gaa atc aca acg gac tat gaa aca cag gag	1133

ES 2 592 507 T3

Asp Gly Met Glu Ser Phe Glu Ile Thr Thr Asp Tyr Glu Thr Gln Glu	
315	320 325
ggg gtg ata aag ctg aaa aag cct gta gat ttt gaa acc gaa aga gcc	1181
Gly Val Ile Lys Leu Lys Lys Pro Val Asp Phe Glu Thr Glu Arg Ala	
330	335 340
tat agc ttg aag gta gag gca gcc aac gtg cac atc gac ccg aag ttt	1229
Tyr Ser Leu Lys Val Glu Ala Ala Asn Val His Ile Asp Pro Lys Phe	
345	350 355
atc agc aat ggc cct ttc aag gac act gtg acc gtc aag atc tca gta	1277
Ile Ser Asn Gly Pro Phe Lys Asp Thr Val Thr Val Lys Ile Ser Val	
360	365 370
gaa gat gct gat gag ccc cct atg ttc ttg gcc cca agt tac atc cac	1325
Glu Asp Ala Asp Glu Pro Pro Met Phe Leu Ala Pro Ser Tyr Ile His	
375	380 385 390
gaa gtc caa gaa aat gca gct gct ggc acc gtg gtt ggg aga gtg cat	1373
Glu Val Gln Glu Asn Ala Ala Ala Gly Thr Val Val Gly Arg Val His	
395	400 405
gcc aaa gac cct gat gct gcc aac agc ccg ata agg tat tcc atc gat	1421
Ala Lys Asp Pro Asp Ala Ala Asn Ser Pro Ile Arg Tyr Ser Ile Asp	
410	415 420
cgt cac act gac ctc gac aga ttt ttc act att aat cca gag gat ggt	1469
Arg His Thr Asp Leu Asp Arg Phe Phe Thr Ile Asn Pro Glu Asp Gly	
425	430 435
ttt att aaa act aca aaa cct ctg gat aga gag gaa aca gcc tgg ctc	1517
Phe Ile Lys Thr Thr Lys Pro Leu Asp Arg Glu Glu Thr Ala Trp Leu	
440	445 450
aac atc act gtc ttt gca gca gaa atc cac aat cgg cat cag gaa gcc	1565
Asn Ile Thr Val Phe Ala Ala Glu Ile His Asn Arg His Gln Glu Ala	
455	460 465 470
caa gtc cca gtg gcc att agg gtc ctt gat gtc aac gat aat gct ccc	1613
Gln Val Pro Val Ala Ile Arg Val Leu Asp Val Asn Asp Asn Ala Pro	
475	480 485
aag ttt gct gcc cct tat gaa ggt ttc atc tgt gag agt gat cag acc	1661
Lys Phe Ala Ala Pro Tyr Glu Gly Phe Ile Cys Glu Ser Asp Gln Thr	
490	495 500
aag cca ctt tcc aac cag cca att gtt aca att agt gca gat gac aag	1709
Lys Pro Leu Ser Asn Gln Pro Ile Val Thr Ile Ser Ala Asp Asp Lys	
505	510 515
gat gac acg gcc aat gga cca aga ttt atc ttc agc cta ccc cct gaa	1757
Asp Asp Thr Ala Asn Gly Pro Arg Phe Ile Phe Ser Leu Pro Pro Glu	
520	525 530
atc att cac aat cca aat ttc aca gtc aga gac aac cga gat aac aca	1805
Ile Ile His Asn Pro Asn Phe Thr Val Arg Asp Asn Arg Asp Asn Thr	
535	540 545 550

ES 2 592 507 T3

gca ggc gtg tac gcc cgg cgt gga ggg ttc agt cgg cag aag cag gac Ala Gly Val Tyr Ala Arg Arg Gly Gly Phe Ser Arg Gln Lys Gln Asp 555 560 565	1853
ttg tac ctt ctg ccc ata gtg atc agc gat ggc ggc atc ccg ccc atg Leu Tyr Leu Leu Pro Ile Val Ile Ser Asp Gly Gly Ile Pro Pro Met 570 575 580	1901
agt agc acc aac acc ctc acc atc aaa gtc tgc ggg tgc gac gtg aac Ser Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Lys Val Cys Gly Cys Asp Val Asn 585 590 595	1949
ggg gca ctg ctc tcc tgc aac gca gag gcc tac att ctg aac gcc ggc Gly Ala Leu Leu Ser Cys Asn Ala Glu Ala Tyr Ile Leu Asn Ala Gly 600 605 610	1997
ctg agc aca ggc gcc ctg atc gcc atc ctc gcc tgc atc gtc att ctc Leu Ser Thr Gly Ala Leu Ile Ala Ile Leu Ala Cys Ile Val Ile Leu 615 620 625 630	2045
ctg gtc att gta gta ttg ttt gtg acc ctg aga agg caa aag aaa gaa Leu Val Ile Val Val Leu Phe Val Thr Leu Arg Arg Gln Lys Lys Glu 635 640 645	2093
cca ctc att gtc ttt gag gaa gaa gat gtc cgt gag aac atc att act Pro Leu Ile Val Phe Glu Glu Glu Asp Val Arg Glu Asn Ile Ile Thr 650 655 660	2141
tat gat gat gaa ggg ggt ggg gaa gaa gac aca gaa gcc ttt gat att Tyr Asp Asp Glu Gly Gly Gly Glu Glu Asp Thr Glu Ala Phe Asp Ile 665 670 675	2189
gcc acc ctc cag aat cct gat ggt atc aat gga ttt atc ccc cgc aaa Ala Thr Leu Gln Asn Pro Asp Gly Ile Asn Gly Phe Ile Pro Arg Lys 680 685 690	2237
gac atc aaa cct gag tat cag tac atg cct aga cct ggg ctc cgg cca Asp Ile Lys Pro Glu Tyr Gln Tyr Met Pro Arg Pro Gly Leu Arg Pro 695 700 705 710	2285
gcg ccc aac agc gtg gat gtc gat gac ttc atc aac acg aga ata cag Ala Pro Asn Ser Val Asp Val Asp Asp Phe Ile Asn Thr Arg Ile Gln 715 720 725	2333
gag gca gac aat gac ccc acg gct cct cct tat gac tcc att caa atc Glu Ala Asp Asn Asp Pro Thr Ala Pro Pro Tyr Asp Ser Ile Gln Ile 730 735 740	2381
tac ggt tat gaa ggc agg ggc tca gtg gcc ggg tcc ctg agc tcc cta Tyr Gly Tyr Glu Gly Arg Gly Ser Val Ala Gly Ser Leu Ser Ser Leu 745 750 755	2429
gag tcg gcc acc aca gat tca gac ttg gac tat gat tat cta cag aac Glu Ser Ala Thr Thr Asp Ser Asp Leu Asp Tyr Asp Tyr Leu Gln Asn 760 765 770	2477
tgg gga cct cgt ttt aag aaa cta gca gat ttg tat ggt tcc aaa gac	2525

Trp Gly Pro Arg Phe Lys Lys Leu Ala Asp Leu Tyr Gly Ser Lys Asp
 775 780 785 790

act ttt gat gac gat tct taa caataacgat acaaatttgg cottaagaac 2576
 Thr Phe Asp Asp Asp Ser *
 795

tgtgtctggc gttctcaaga atctagaaga tgtgtaacag gtatttttt 2625

<210> 2
 <211> 796
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

5

<400> 2

Met Lys Glu Asn Tyr Cys Leu Gln Ala Ala Leu Val Cys Leu Gly Met
 1 5 10 15
 Leu Cys His Ser His Ala Phe Ala Pro Glu Arg Arg Gly His Leu Arg
 20 25 30
 Pro Ser Phe His Gly His His Glu Lys Gly Lys Glu Gly Gln Val Leu
 35 40 45
 Gln Arg Ser Lys Arg Gly Trp Val Trp Asn Gln Phe Phe Val Ile Glu
 50 55 60
 Glu Tyr Thr Gly Pro Asp Pro Val Leu Val Gly Arg Leu His Ser Asp
 65 70 75 80
 Ile Asp Ser Gly Asp Gly Asn Ile Lys Tyr Ile Leu Ser Gly Glu Gly
 85 90 95
 Ala Gly Thr Ile Phe Val Ile Asp Asp Lys Ser Gly Asn Ile His Ala
 100 105 110
 Thr Lys Thr Leu Asp Arg Glu Glu Arg Ala Gln Tyr Thr Leu Met Ala
 115 120 125
 Gln Ala Val Asp Arg Asp Thr Asn Arg Pro Leu Glu Pro Pro Ser Glu
 130 135 140
 Phe Ile Val Lys Val Gln Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Glu Phe Leu
 145 150 155 160
 His Glu Thr Tyr His Ala Asn Val Pro Glu Arg Ser Asn Val Gly Thr
 165 170 175
 Ser Val Ile Gln Val Thr Ala Ser Asp Ala Asp Asp Pro Thr Tyr Gly
 180 185 190
 Asn Ser Ala Lys Leu Val Tyr Ser Ile Leu Glu Gly Gln Pro Tyr Phe
 195 200 205
 Ser Val Glu Ala Gln Thr Gly Ile Ile Arg Thr Ala Leu Pro Asn Met
 210 215 220
 Asp Arg Glu Ala Lys Glu Glu Tyr His Val Val Ile Gln Ala Lys Asp
 225 230 235 240
 Met Gly Gly His Met Gly Gly Leu Ser Gly Thr Thr Lys Val Thr Ile
 245 250 255
 Thr Leu Thr Asp Val Asn Asp Asn Pro Pro Lys Phe Pro Gln Arg Leu
 260 265 270
 Tyr Gln Met Ser Val Ser Glu Ala Ala Val Pro Gly Glu Glu Val Gly
 275 280 285
 Arg Val Lys Ala Lys Asp Pro Asp Ile Gly Glu Asn Gly Leu Val Thr
 290 295 300
 Tyr Asn Ile Val Asp Gly Asp Gly Met Glu Ser Phe Glu Ile Thr Thr
 305 310 315 320
 Asp Tyr Glu Thr Gln Glu Gly Val Ile Lys Leu Lys Lys Pro Val Asp
 325 330 335
 Phe Glu Thr Glu Arg Ala Tyr Ser Leu Lys Val Glu Ala Ala Asn Val

			340					345					350			
His	Ile	Asp	Pro	Lys	Phe	Ile	Ser	Asn	Gly	Pro	Phe	Lys	Asp	Thr	Val	
			355					360					365			
Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Val	Glu	Asp	Ala	Asp	Glu	Pro	Pro	Met	Phe	Leu	
			370				375						380			
Ala	Pro	Ser	Tyr	Ile	His	Glu	Val	Gln	Glu	Asn	Ala	Ala	Ala	Gly	Thr	
			385				390						395			400
Val	Val	Gly	Arg	Val	His	Ala	Lys	Asp	Pro	Asp	Ala	Ala	Asn	Ser	Pro	
			405						410						415	
Ile	Arg	Tyr	Ser	Ile	Asp	Arg	His	Thr	Asp	Leu	Asp	Arg	Phe	Phe	Thr	
			420						425						430	
Ile	Asn	Pro	Glu	Asp	Gly	Phe	Ile	Lys	Thr	Thr	Lys	Pro	Leu	Asp	Arg	
			435						440						445	
Glu	Glu	Thr	Ala	Trp	Leu	Asn	Ile	Thr	Val	Phe	Ala	Ala	Glu	Ile	His	
			450				455						460			
Asn	Arg	His	Gln	Glu	Ala	Gln	Val	Pro	Val	Ala	Ile	Arg	Val	Leu	Asp	
			465				470						475			480
Val	Asn	Asp	Asn	Ala	Pro	Lys	Phe	Ala	Ala	Pro	Tyr	Glu	Gly	Phe	Ile	
			485							490						495
Cys	Glu	Ser	Asp	Gln	Thr	Lys	Pro	Leu	Ser	Asn	Gln	Pro	Ile	Val	Thr	
			500						505						510	
Ile	Ser	Ala	Asp	Asp	Lys	Asp	Asp	Thr	Ala	Asn	Gly	Pro	Arg	Phe	Ile	
			515						520						525	
Phe	Ser	Leu	Pro	Pro	Glu	Ile	Ile	His	Asn	Pro	Asn	Phe	Thr	Val	Arg	
			530				535							540		
Asp	Asn	Arg	Asp	Asn	Thr	Ala	Gly	Val	Tyr	Ala	Arg	Arg	Gly	Gly	Phe	
			545				550						555			560
Ser	Arg	Gln	Lys	Gln	Asp	Leu	Tyr	Leu	Leu	Pro	Ile	Val	Ile	Ser	Asp	
			565							570					575	
Gly	Gly	Ile	Pro	Pro	Met	Ser	Ser	Thr	Asn	Thr	Leu	Thr	Ile	Lys	Val	
			580						585						590	
Cys	Gly	Cys	Asp	Val	Asn	Gly	Ala	Leu	Leu	Ser	Cys	Asn	Ala	Glu	Ala	
			595					600						605		
Tyr	Ile	Leu	Asn	Ala	Gly	Leu	Ser	Thr	Gly	Ala	Leu	Ile	Ala	Ile	Leu	
			610					615						620		
Ala	Cys	Ile	Val	Ile	Leu	Leu	Val	Ile	Val	Val	Leu	Phe	Val	Thr	Leu	
			625				630						635			640
Arg	Arg	Gln	Lys	Lys	Glu	Pro	Leu	Ile	Val	Phe	Glu	Glu	Glu	Asp	Val	
			645											650		655
Arg	Glu	Asn	Ile	Ile	Thr	Tyr	Asp	Asp	Glu	Gly	Gly	Gly	Glu	Glu	Asp	
			660						665							670
Thr	Glu	Ala	Phe	Asp	Ile	Ala	Thr	Leu	Gln	Asn	Pro	Asp	Gly	Ile	Asn	
			675					680							685	
Gly	Phe	Ile	Pro	Arg	Lys	Asp	Ile	Lys	Pro	Glu	Tyr	Gln	Tyr	Met	Pro	
			690					695							700	
Arg	Pro	Gly	Leu	Arg	Pro	Ala	Pro	Asn	Ser	Val	Asp	Val	Asp	Asp	Phe	
			705				710					715				720
Ile	Asn	Thr	Arg	Ile	Gln	Glu	Ala	Asp	Asn	Asp	Pro	Thr	Ala	Pro	Pro	
			725												730	
Tyr	Asp	Ser	Ile	Gln	Ile	Tyr	Gly	Tyr	Glu	Gly	Arg	Gly	Ser	Val	Ala	
			740						745							750
Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Ala	Thr	Thr	Asp	Ser	Asp	Leu	Asp	
			755					760								765
Tyr	Asp	Tyr	Leu	Gln	Asn	Trp	Gly	Pro	Arg	Phe	Lys	Lys	Leu	Ala	Asp	
			770					775								780
Leu	Tyr	Gly	Ser	Lys	Asp	Thr	Phe	Asp	Asp	Asp	Ser					
			785				790									795

<210> 3
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 3

Glu Glu Gly Gly Gly Glu Glu Asp Gln Asp
1 5 10

<210> 4

5 <211> 8

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 4

Ser Leu Ser Ser Leu Asn Ser Ser
1 5

<210> 5

10 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 5

Gln Asp Tyr Asp Tyr Leu Asn
1 5

15 <210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

20 <400> 6

Phe Lys Lys Leu Ala Asp Met Tyr Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 7

<211> 26

<212> ADN

25 <213> Homo Sapiens

<220>

<221> variación

<222> (12)...(12)

<223> N = inosina

30 <221> variación

<222> (18)...(18)

<223> N = isosina

<221> variación

<222> (21)... (21)

35 <223> N = A, C, G, T

<221> variación

<222> (24)...(24)

<223>N = A, C, G, T

<400> 7

40 gcgggatccg angarggnng ngngnga

26

<210> 8

<211> 26

<212> ADN

	<213> Homo Sapiens	
	<220>	
	<221> variación	
	<222> (12)...(12)	
5	<223> N = inosina	
	<221> variación	
	<222> (15)...(15)	
	<223> N = inosina	
	<400> 8	
10	ggggagctct cngcnarytt ytraa	26
	<210> 9	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
15	<400> 9	
	ccaaaaatga aggagaacta ct	22
	<210> 10	
	<211> 31	
	<212> ADN	
20	<213> Homo Sapiens	
	<400> 10	
	gggggatcca ttgtaagaa tcgcatcaa a	31
	<210> 11	
	<211> 23	
25	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 11	
	gctggcaccg tggtagggag agt	23
	<210> 12	
30	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 12	
	ggggggctcg agtaggcct ctgcgttgca gg	32
35		

REIVINDICACIONES

1. Uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de ácido nucleico inhibidora de cadherina-11, en la fabricación de un medicamento para tratar un sujeto que tiene un trastorno inflamatorio de las articulaciones, en el que la molécula de ácido nucleico inhibidora de cadherina-11 se selecciona del grupo que consiste en:
- 5 (1) un oligonucleótido que es un oligorribonucleótido, oligodesoxirribonucleótido, oligorribonucleótido modificado, u oligodesoxirribonucleótido modificado que se hibrida en condiciones fisiológicas a un ácido desoxirribonucleico (ADN) que comprende un gen de cadherina-11 e inhibe la transcripción del gen de cadherina-11; y
- 10 (2) un oligonucleótido que es un oligorribonucleótido, oligodesoxirribonucleótido, oligorribonucleótido modificado, u oligodesoxirribonucleótido modificado que se hibrida en condiciones fisiológicas a un transcrito de ARN mensajero (ARNm) de un gen de cadherina-11 e inhibe la traducción del transcrito de ARNm.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico inhibidora de cadherina-11 inhibe la unión de cadherina-11 a sí misma o a un contrarreceptor de cadherina-11 que se selecciona del grupo que consiste en una cadherina, una integrina, una subunidad de integrina, un miembro de la familia de inmunoglobulinas, y un hidrato de carbono.
- 15 3. Uso según la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico inhibidora de cadherina-11 codifica un polipéptido de cadherina-11 o un fragmento del mismo y se se hibrida en condiciones restrictivas a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de SEC ID NO: 1.
4. Uso según la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico inhibidora de cadherina-11 inhibe la transcripción de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de cadherina-11.
- 20 5. Uso según la reivindicación 1 o 4, en el que el ácido nucleico que codifica un polipéptido de cadherina-11 es SEC ID NO: 1.
6. Uso según la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico inhibidora de cadherina-11 es una molécula de ácido nucleico antisentido.
- 25 7. Uso según la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico inhibidora de cadherina-11 inhibe la traducción de ARNm de cadherina-11.
8. Uso según la reivindicación 1 o 7, en el que el oligonucleótido de (1) o (2) es un oligorribonucleótido.
9. Uso según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido de (1) o (2) es un oligodesoxirribonucleótido.
10. Uso según la reivindicación 1, 4, 8 o 9, en el que el oligonucleótido de (1) o (2) tiene una longitud de 20-30 bases.
- 30 11. Uso según la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico inhibidora de cadherina-11 se suministra a un sinoviocito del sujeto.
12. Uso según la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico inhibidora de cadherina-11 inhibe o potencia la secreción de factores y en el que la secreción de factores se selecciona del grupo que consiste en la secreción de estromelina, secreción de colágeno, secreción de colagenasa y secreción de IL-6.
- 35 13. Uso según la reivindicación 12, en el que la secreción de factores es secreción de IL-6.
14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el trastorno inflamatorio de las articulaciones es sinovitis crónica.
15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el trastorno inflamatorio de las articulaciones es un trastorno autoinmunitario.
- 40 16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el trastorno autoinmunitario es artritis reumatoide.
17. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la molécula de ácido nucleico inhibidora de cadherina-11 se ha de administrar localmente a un sinovio del sujeto.

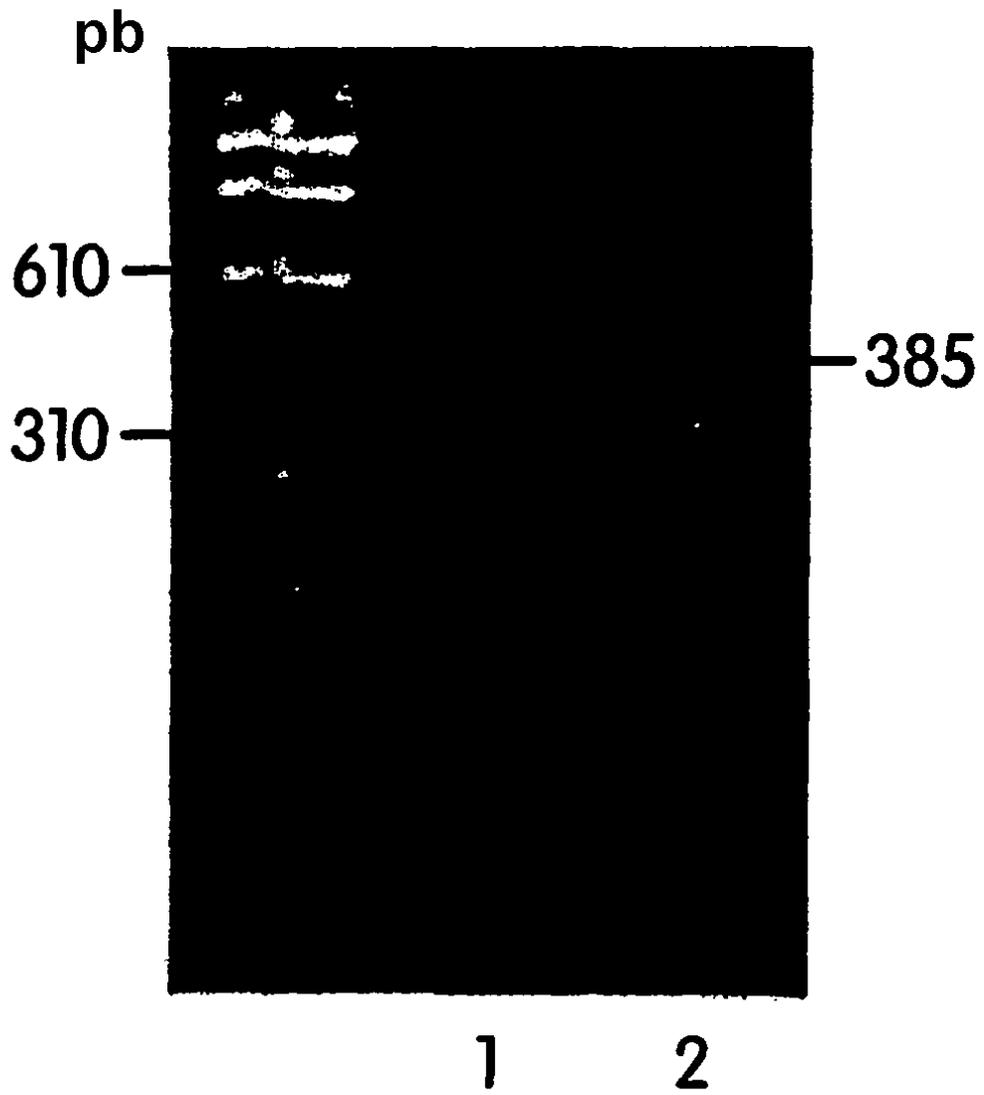


Fig. 1

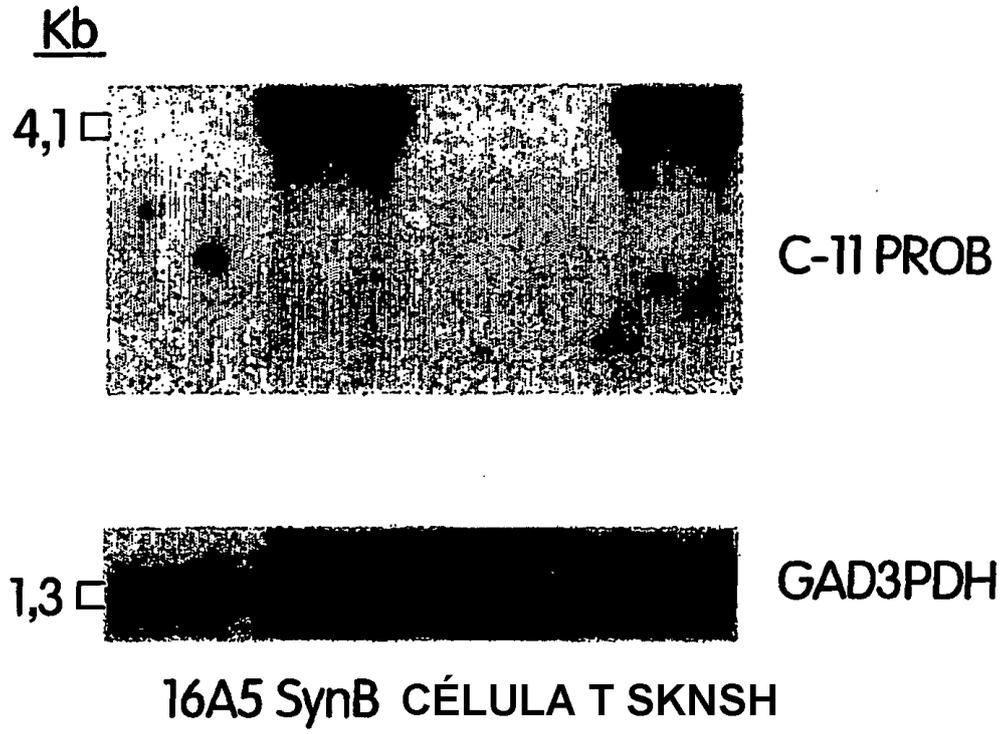


Fig. 2

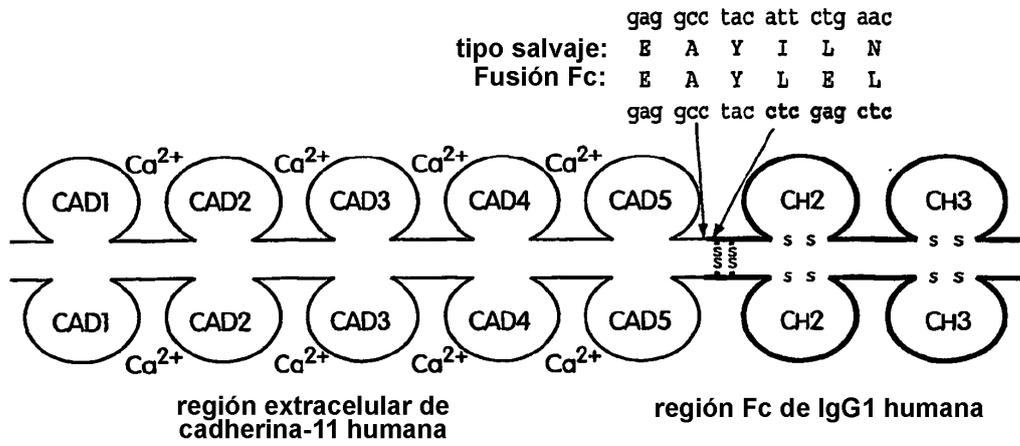


Fig. 3

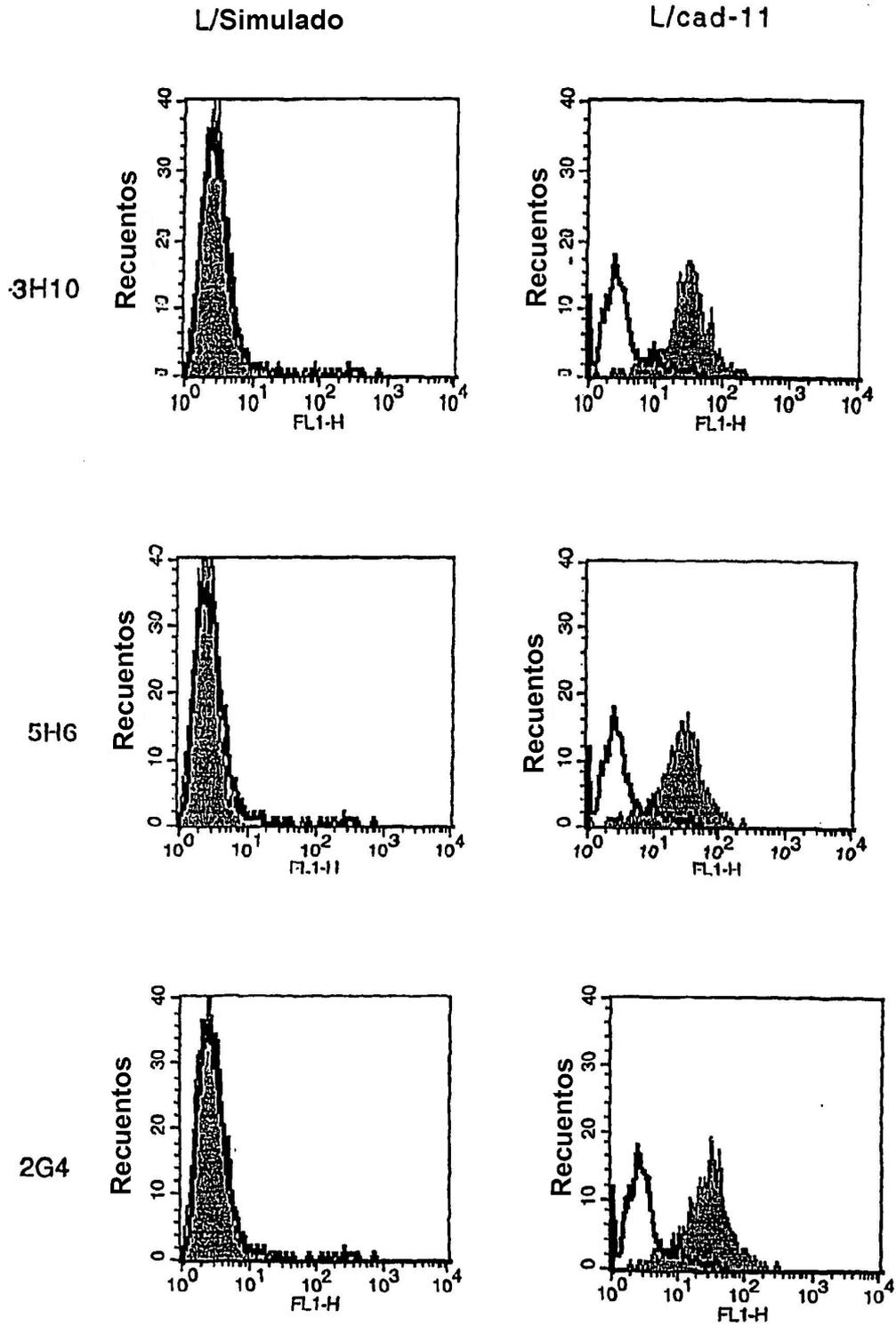


Figura 4

Figura 5A

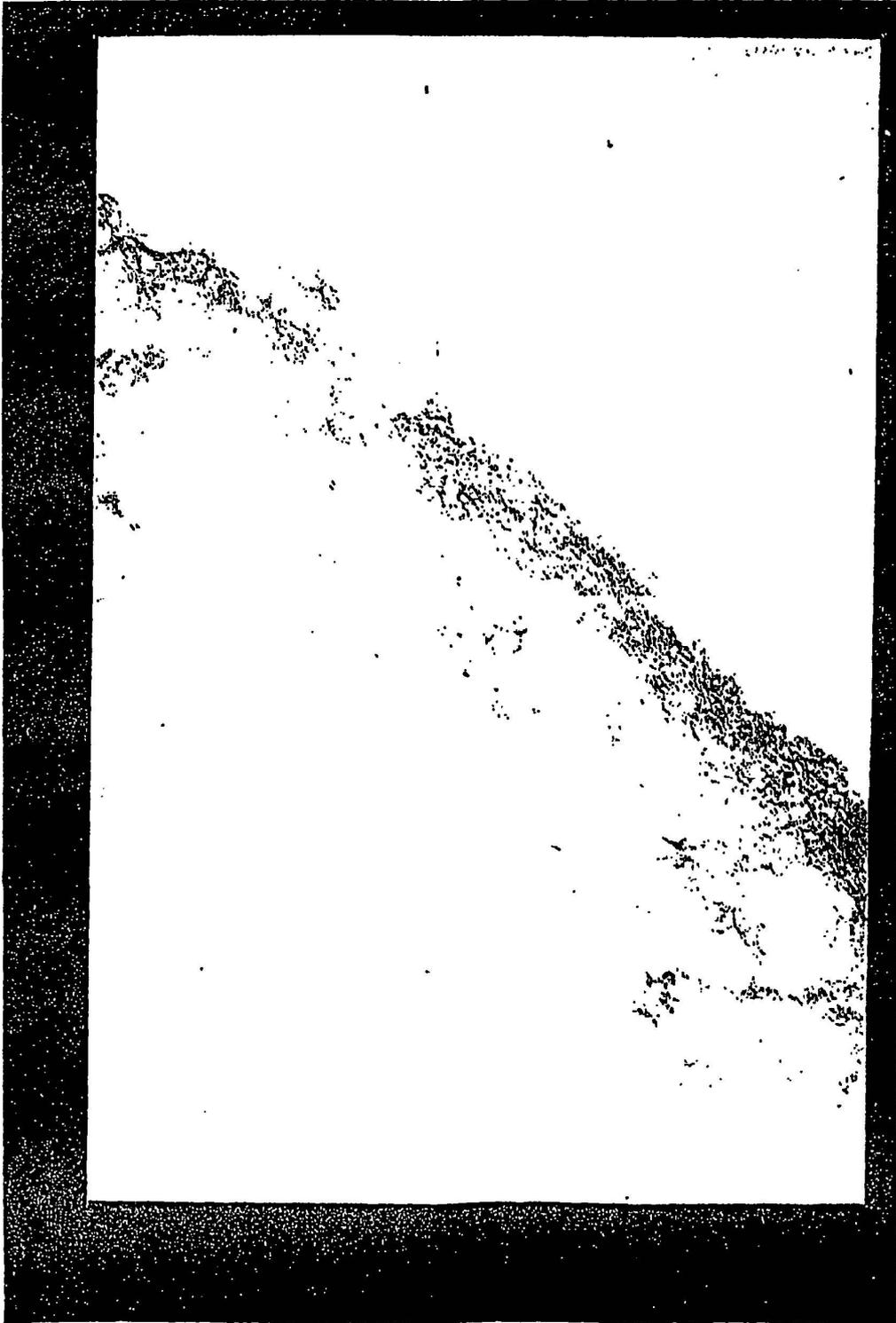
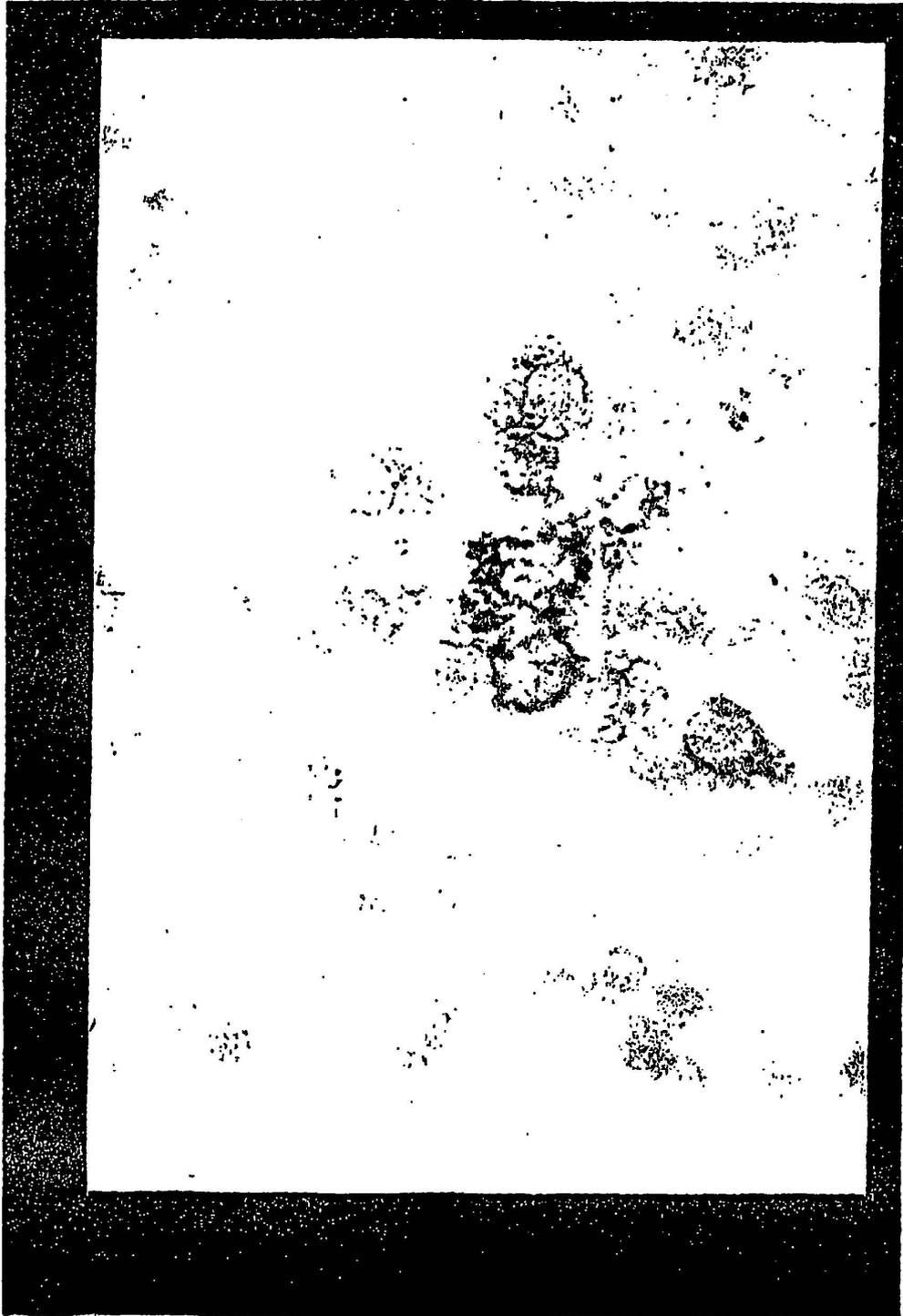


Figura 5B



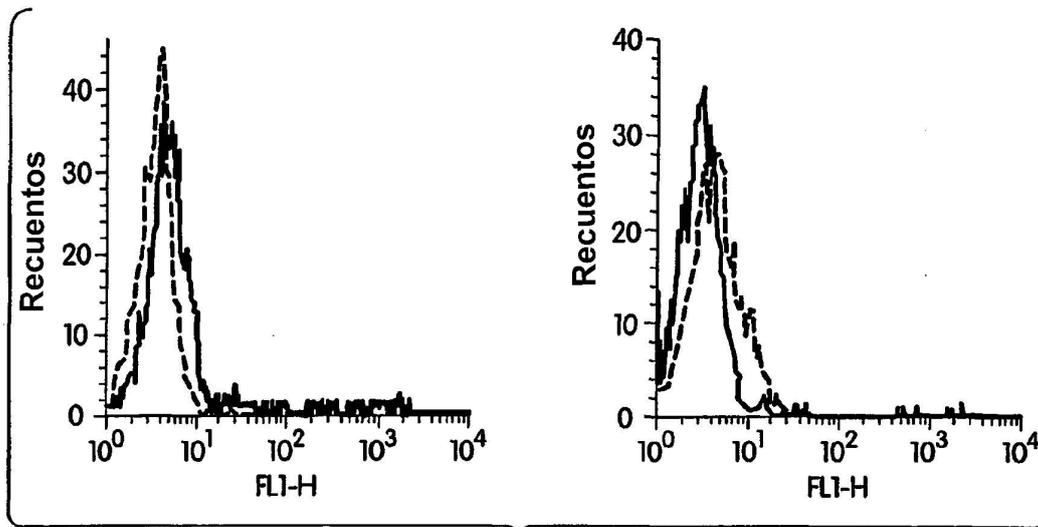


Fig. 6

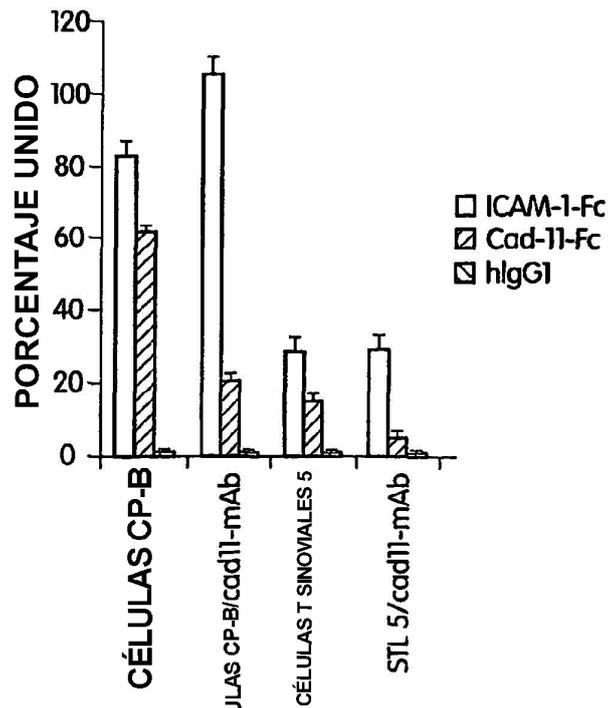


Fig. 7