

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 209**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2008 PCT/EP2008/066880**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2009 WO09071661**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2008 E 08856341 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2227560**

54 Título: **Métodos para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades relacionadas con la densidad mineral ósea**

30 Prioridad:

07.12.2007 EP 07301643

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

19.02.2018

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75654 Paris Cedex, FR;
UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (33.3%) y
ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS (AP-HP) (33.3%)**

72 Inventor/es:

**CORMIER-DAIRE, VALÉRIE y
MUNNICH, ARNOLD**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 655 209 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades relacionadas con la densidad mineral ósea

5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere a métodos para el tratamiento y diagnóstico de trastornos relacionados con la densidad mineral ósea. Más particularmente, la presente invención se basa en el descubrimiento de que la tromboxano sintasa desempeña un papel en la variación de la densidad mineral ósea.

10

Estado de la técnica

La calidad del hueso vertebral es esencial para la resistencia vertebral. Un factor importante de la calidad del hueso es la densidad mineral ósea y su distribución en todo el hueso y diversos datos muestran ahora que la densidad mineral ósea afecta a varias dolencias humanas.

15

La osteoporosis, o hueso poroso, es una enfermedad caracterizada por una baja densidad mineral ósea, que conduce a la fragilidad ósea y a una mayor susceptibilidad a las fracturas, especialmente de la cadera, columna y muñeca, aunque cualquier hueso se puede ver afectado. Si no se previene o si se deja sin tratamiento, la osteoporosis puede progresar sin dolor hasta que un hueso se rompe. Se estima que la osteoporosis es responsable de más de 1,5 millones de fracturas anualmente, incluyendo más de 300.000 fracturas de cadera; y aproximadamente 700.000 fracturas vertebrales; 250.000 fracturas de muñeca; y 300.000 fracturas en otros sitios. Los factores genéticos juegan un papel importante en la patogénesis de la osteoporosis y varios estudios sugieren que entre el 50 % y el 85 % de la varianza de la densidad mineral ósea está determinada genéticamente (Gueguen et al 1995; Arden y Spector, 1997). Sin embargo, los genes responsables de estos efectos no están completamente definidos. La mayoría de los agentes usados para tratar la osteoporosis, tales como estrógenos y bifosfonatos, no son muy eficaces. Estos agentes retardan la resorción ósea, pero no mejoran la conectividad. Por lo tanto existe una necesidad permanente de proporcionar nuevos objetivos para el tratamiento de la osteoporosis.

20

25

30

Por el contrario, se ha demostrado que la densidad mineral ósea aumenta en otras patologías o dolencias. Por ejemplo, el aumento de la densidad mineral ósea se ha demostrado en las mujeres posmenopáusicas con hipoparatiroidismo post-tiroidectomía. Además, varios fármacos han demostrado que inducen el aumento de la densidad mineral ósea. Por ejemplo, los resultados de doce meses de un estudio de fase IIB con odanacatib, (anteriormente MK-0822), un inhibidor selectivo experimental de la catepsina-K, han demostrado aumentos en la densidad mineral ósea dependientes de la dosis y un recambio óseo reducido en comparación con placebo en mujeres posmenopáusicas (29 Reunión anual de la Sociedad Americana de Investigación ósea y Mineral (ASBMR)). Otro ejemplo incluye el síndrome de displasia hematodifisaria de Ghosal (GHDD) que es un trastorno autosómico recesivo poco frecuente, caracterizado por el aumento de la densidad mineral ósea con afectación predominante diafisaria, anemia corticosensible arregenerativa e inflamación biológica crónica (Ghosal et al., 1988).

35

40

Por lo tanto, existe una necesidad de identificar los factores que influyan sobre la densidad mineral ósea con el fin de prever métodos para diagnosticar, predecir, prevenir y tratar enfermedades relacionadas con la densidad mineral ósea.

45

Hasta el momento se han estudiado una amplia variedad de genes candidatos en relación con la densidad mineral ósea, incluyendo el receptor de la vitamina D (Kelly PJ et al., 1997) y el receptor de estrógenos (Kobayashi et al., 1996). Sin embargo, la evidencia actual sugiere que la variación alélica en estos genes representa solo una pequeña parte de la varianza en la densidad mineral ósea (Rubin et al., 1999) lo que indica que la mayoría de los genes que regulan la densidad mineral ósea quedan por descubrir. La identificación y la determinación del genotipo de los polimorfismos asociados con la regulación de la densidad mineral ósea es útil, para definir marcadores de masa ósea y por lo tanto, por ejemplo, la susceptibilidad a enfermedades relacionadas con la densidad mineral ósea.

50

ISIDOR B ET AL: "A gene responsible for Ghosal hemato-diaphyseal dysplasia maps to chromosome 7q33-34". HUMAN GENETICS APR 2007, vol. 121, no. 2, April 2007(2007-04), páginas 269-273, divulga un gen responsable de la displasia hematodifisaria de Ghosal displasia que se asigna al cromosoma 7q33-34.

55

El documento WO 97/05275A divulga un método de predicción de la densidad ósea.

El documento WO 2006/100213A divulga un método de tratamiento de trastornos dependientes de la ciclooxigenasa.

60

Objeto de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones.

65

Descripción detallada de la invención

Definiciones

5 Una "secuencia codificante" o una secuencia "que codifica" un producto de expresión, tal como un ARN, polipéptido, proteína o enzima, es una secuencia de nucleótidos que, cuando se expresa, da como resultado la producción de ese ARN, polipéptido, proteína o enzima, es decir, la secuencia de nucleótidos codifica una secuencia de aminoácidos para ese polipéptido, proteína o enzima. Una secuencia codificante de una proteína puede incluir un codón de inicio (habitualmente ATG) y un codón de parada.

10 El término "gen" significa una secuencia de ADN que codifica o corresponde a una secuencia particular de aminoácidos que comprende toda o parte de una o más proteínas o enzimas, y puede o no incluir secuencias reguladoras de ADN, tales como secuencias promotoras, que determinan, por ejemplo, las condiciones en las que se expresa el gen. Algunos genes, que no son genes estructurales, pueden transcribirse a partir de ADN a ARN, pero no se traducen en una secuencia de aminoácidos. Otros genes pueden funcionar como reguladores de genes estructurales o como reguladores de la transcripción del ADN. En particular, el término gen puede estar destinado a la secuencia genómica que codifica una proteína, es decir, una secuencia que comprende las secuencias del regulador, promotor, intrón y exón. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "gen TBXAS1" indica el gen de la tromboxano sintasa de cualquier especie, especialmente humana, pero también de otros mamíferos o vertebrados a los que se puede aplicar los métodos de la invención. El gen TBXAS1 codifica una tromboxano sintasa transmembrana ("TXAS") de 60 kDa. El gen TBXAS1 de Homo sapiens se localiza en el cromosoma 7 (localización 7q34-q35), cuya secuencia está depositada en Genebank con el número de acceso NC_000007.12.

25 El gen TBXAS1 codifica una transcripción depositada en GeneBank con el número de acceso NM_001061, que contiene el marco de lectura abierto como se expone en la SEQ ID No:1. La secuencia de aminoácidos correspondiente está depositada en la base de datos GenPept con el número de acceso NP_001052 y se expone en la SEQ ID No: 2.

30 Una molécula de ácido nucleico es "hibrizable" con otra molécula de ácido nucleico, tal como un ADNc, ADN genómico, o ARN, cuando una forma monocatenaria de la molécula de ácido nucleico puede hibridar con la otra molécula de ácido nucleico en las condiciones apropiadas de temperatura y solución de fuerza iónica (véase Sambrook et al., 1989).

35 Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan la "rigurosidad" de la hibridación. Para la selección preliminar de ácidos nucleicos homólogos, las condiciones de hibridación de rigurosidad baja, correspondientes a una Tm (temperatura de fusión) de 55 °C, se puede utilizar, por ejemplo, 5x SSC, SDS 0,1 %, leche 0,25 % y sin formamida; o formamida 30 %, 5x SSC, SDS 0,5 %). Las condiciones de hibridación de rigurosidad moderada corresponden a una Tm superior, por ejemplo, formamida 40 %, con 5x o 6x SCC. Las condiciones de hibridación de alta rigurosidad corresponden a la mayor Tm, por ejemplo, formamida 50 %, 5x o 6x SCC. SCC es NaCl 0,15 M, Nacitrato 0,015 M. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo de la rigurosidad de la hibridación, son posibles desapareamientos entre bases. La rigurosidad apropiada para la hibridación de ácidos nucleicos depende de la longitud de los ácidos nucleicos y del grado de complementación, variables bien conocidas en la técnica. Cuanto mayor sea el grado de similitud u homología entre dos secuencias de nucleótidos, mayor será el valor de Tm para los híbridos de ácidos nucleicos que tienen esas secuencias. La estabilidad relativa (correspondiente a la mayor Tm) de las hibridaciones de ácidos nucleicos disminuye en el siguiente orden: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. Para híbridos de más de 100 nucleótidos de longitud, se han derivado las ecuaciones para calcular la Tm (véase Sambrook et al., 1989, 9,50-9,51). Para la hibridación con ácidos nucleicos más cortos, es decir, oligonucleótidos, la posición de los desapareamientos se vuelve más importante, y la longitud del oligonucleótido determina su especificidad (véase Sambrook et al., 1989 11/07 a 11/08). Una longitud mínima para un ácido nucleico hibridable es al menos aproximadamente 10 nucleótidos, preferiblemente al menos aproximadamente 15 nucleótidos, y más preferiblemente la longitud es al menos aproximadamente 20 nucleótidos.

55 En una realización específica, la expresión "condiciones de hibridación estándar" se refiere a una Tm de 55 °C, y utiliza condiciones como se ha expuesto anteriormente. En una realización preferida, la Tm es de 60 °C. En una realización más preferida, la Tm es de 65 °C. En una realización específica, "alta rigurosidad" se refiere a condiciones de hibridación y/o lavado a 68 °C en 0,2 X SSC, a 42 °C en formamida al 50 %, 4 X SSC, o en condiciones que proporcionen niveles de hibridación equivalentes a los observados en cualquiera de estas dos condiciones.

60 Como se usa en la presente memoria, un cebador de amplificación es un oligonucleótido para la amplificación de una secuencia diana mediante la extensión del oligonucleótido después de la hibridación con la secuencia diana o mediante ligación de múltiples oligonucleótidos que están adyacentes cuando se hibrida con la secuencia diana. Al menos una porción del cebador de amplificación se hibrida con la diana. Esta porción se conoce como la secuencia de unión a la diana y determina la especificidad del cebador por la diana. Además de la secuencia de unión a la diana, ciertos métodos de amplificación requieren secuencias que no son de unión a la diana especializadas en el

5 cebador de amplificación. Estas secuencias especializadas son necesarias para que se produzca la reacción de amplificación y generalmente sirven para anexar la secuencia especializada a la diana. Por ejemplo, los cebadores de amplificación usados en la amplificación por desplazamiento de la hebra (SDA) incluyen un sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción 5' a la secuencia de unión a la diana (Patente US-5.455.166 y Patente US-5.270.184). La amplificación de secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), la replicación de secuencia autosostenida (3SR) y los cebadores de amplificación basados en la transcripción requieren un promotor de ARN polimerasa unido a la secuencia de unión a la diana del cebador. La unión de tales secuencias especializadas a una secuencia de unión a la diana para su uso en una reacción de amplificación seleccionada es de rutina en la técnica. Por el contrario, los métodos de amplificación tales como PCR que no requieren secuencias especializadas en los extremos de la diana, generalmente emplean cebadores de amplificación que consisten solo en la secuencia de unión a la diana.

15 Tal como se usa en la presente memoria, los términos “cebador” y “sonda” se refieren a la función del oligonucleótido. Un cebador es generalmente extendido por la polimerasa o ligadura después de la hibridación con la diana pero una sonda generalmente no. Un oligonucleótido hibridado puede funcionar como una sonda si se utiliza para capturar o detectar una secuencia diana, y el mismo oligonucleótido puede funcionar como un cebador, cuando se emplea como una secuencia de unión a la diana en un cebador de amplificación. Por lo tanto, se apreciará que se pueden utilizar cualquiera de las secuencias de unión a la diana divulgadas en la presente memoria para la amplificación, detección o cuantificación de TBXAS1 ya sea como sondas de hibridación o como secuencias de unión a la diana en cebadores para la detección o amplificación, opcionalmente unidas a una secuencia especializada requerida por la reacción de amplificación seleccionada o para facilitar la detección.

25 Los términos “mutantes” y “mutación” significan cualquier cambio detectable en el material genético, por ejemplo, ADN, ARN, ADNc, o cualquier proceso, mecanismo o resultado de dicho cambio. Esto incluye mutaciones genéticas, en las que se altera la estructura (por ejemplo secuencia de ADN) de un gen, cualquier gen o ADN que surja de cualquier proceso de mutación, y cualquier producto de expresión (por ejemplo, proteína o enzima) expresado por un gen o secuencia de ADN modificados. En general, una mutación se identifica en un sujeto mediante la comparación de la secuencia de un ácido nucleico o polipéptido expresado por dicho sujeto con el correspondiente ácido nucleico o polipéptido expresados en una población de control. Una mutación en el material genético también puede ser “silenciosa”, es decir, la mutación no tiene como resultado una alteración de la secuencia de aminoácidos del producto de expresión.

35 En el contexto de la presente solicitud, las mutaciones identificadas en el gen TBXAS1 se designan de conformidad con la nomenclatura de Dunnen y Antonarakis (2000). Tal como se define por Dunnen y Antonarakis a nivel de ácido nucleico, las sustituciones se designan por “>”, por ejemplo, “1463T> C” indica que en el nucleótido 1463 de la secuencia de referencia se cambia una T por una C. Cuando la secuencia genómica de longitud completa se conoce, la mutación se designa mejor por el número de nucleótidos de las referencias genómicas. Las mutaciones de ácido nucleico se designan por referencia al número de nucleótidos en la SEQ ID No: 1

40 La expresión “similitud de secuencia” en todas sus formas gramaticales se refiere al grado de identidad o correspondencia entre las secuencias de ácido nucleico o aminoácidos de proteínas que pueden o no compartir un origen evolutivo común. Preferiblemente, el grado de identidad de secuencia se calcula en comparación con la totalidad de una secuencia de referencia.

45 En una realización específica, dos secuencias de ADN son “sustancialmente homólogas” o “sustancialmente similares” cuando al menos 70 %, preferiblemente al menos 75 % o 80 % o 85 % o 90 % o 95 % o 99 %, de los nucleótidos coinciden a lo largo la longitud definida de las secuencias de ADN, tal como se determina mediante algoritmos de comparación de secuencias, tales como BLAST, FASTA, DAN Strider, etc. Un ejemplo de tal secuencia es una variante alélica o de especie del gen TBXAS1. Las secuencias que son sustancialmente homólogas pueden identificarse comparando las secuencias usando software estándar disponible en los bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación Southern, por ejemplo, en condiciones rigurosas como se definen para ese sistema en particular.

55 Del mismo modo, en una realización particular, dos secuencias de aminoácidos son “sustancialmente similares” cuando más del 80 %, preferiblemente más del 85 % o 90 % o 95 % o 99 %, de los aminoácidos son similares (funcionalmente idénticos). Los polipéptidos “funcionalmente idéntico” son aquellos en los que un resto de aminoácido dado se ha cambiado sin alterar la conformación global y la función del polipéptido, incluyendo, pero sin limitarse a, la sustitución de un aminoácido con uno que tenga propiedades similares (tales como, por ejemplo, polaridad, potencial del enlace de hidrógeno, ácido, básico, hidrófobo, aromático y similares). Los aminoácidos con propiedades similares son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, arginina, histidina y lisina son aminoácidos hidrófilos-básicos y pueden ser intercambiables. De manera similar, la isoleucina, un aminoácido hidrófobo, puede ser sustituido por leucina, metionina o valina. Se espera que tales cambios tengan poco o ningún efecto sobre el peso molecular aparente o punto isoelectrico de la proteína o polipéptido. Preferiblemente, las secuencias similares se identifican por alineamiento usando, por ejemplo, el programa Pileup de GCG (Genetics Computer Group, Manual de programa para el paquete GCG, Versión 7, Madison, Wisconsin) o cualquiera de los programas descritos anteriormente (BLAST, FASTA, etc.).

“Inhibidor de tromboxano” incluye compuestos que son los llamados antagonistas del receptor de tromboxano A2, antagonistas de tromboxano A2, antagonistas de tromboxano A2/prostaglandina-endoperóxido, antagonistas del receptor de tromboxano (TP), antagonistas de tromboxano, inhibidores de la tromboxano sintasa y los inhibidores de doble acción de la tromboxano sintasa y antagonistas del receptor de tromboxano.

“Antagonista del receptor de tromboxano A2” se refiere a cualquier compuesto que reversible o irreversiblemente bloquea la activación de cualquier receptor de tromboxano A2.

“Inhibidor de la tromboxano sintasa” se refiere a cualquier compuesto que inhibe reversible o irreversiblemente la enzima tromboxano sintasa reduciendo de este modo la formación de tromboxano A2.

“Antagonista de doble acción del receptor de tromboxano e inhibidor de la tromboxano sintasa” se refiere a cualquier compuesto que actúa simultáneamente como un antagonista del receptor de tromboxano A2 y un inhibidor de la tromboxano sintasa.

La expresión “enfermedades relacionadas con la densidad mineral ósea” abarca todos los trastornos que están asociados con, causados por, o que resultan de la variación de la densidad mineral ósea: una disminución o un aumento en comparación con una población de control. Más particularmente, una “enfermedad asociada con una disminución de la densidad mineral ósea” se refiere a una enfermedad que se asocia con, está causada por, es el resultado de una disminución de la densidad mineral ósea. Más particularmente, una “enfermedad asociada con un aumento de la densidad mineral ósea” se refiere a una enfermedad que está asociada con, causada por, es el resultado de un aumento en la densidad mineral ósea.

En el contexto de la invención, el término “tratar” o “tratamiento”, como se usa en la presente memoria, significa invertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o afección al que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de tal trastorno o afección. Una “cantidad terapéuticamente eficaz” indica una cantidad mínima de agente activo (por ejemplo, polinucleótido TBXAS1 o tromboxano sintasa), que es necesaria para impartir beneficio terapéutico a un sujeto. Por ejemplo, una “cantidad terapéuticamente eficaz” a un mamífero es una cantidad tal que induce, aminora o de otro modo provoca una mejora en los síntomas patológicos, progresión de la enfermedad o condiciones fisiológicas asociadas con o resistencia a sucumbir a un trastorno.

El término “muestra biológica” indica cualquier muestra biológica derivada de un paciente. Ejemplos de tales muestras incluyen fluidos, tejidos, muestras celulares, órganos, biopsias, etc. Muestras biológicas preferidas son una muestra de células o tejido. Las muestras biológicas preferidas son sangre completa, suero, plasma u orina.

Como se usa en la presente memoria, el término “sujeto” se refiere a un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferiblemente, un sujeto de acuerdo con la invención es un ser humano.

La expresión “mutación en el gen TBXAS1 asociada con una disminución de la actividad de tromboxano sintasa” abarca las mutaciones que dan como resultado una disminución del nivel de expresión del gen TBXAS1 y las mutaciones que dan como resultado la síntesis de TXAS que muestran una disminución de la actividad enzimática, es decir, una disminución de la conversión de las prostaglandinas (PG) H2 en tromboxano A2 (TXA2)

La expresión “mutación en el gen TBXAS1 asociada con un aumento de la actividad de la tromboxano sintasa” abarca las mutaciones que dan como resultado un aumento del nivel de expresión del gen TBXAS1 y las mutaciones que dan como resultado la síntesis de TXAS que muestran un aumento de la actividad enzimática, es decir, un aumento de la conversión de las prostaglandinas (PG) H2 en tromboxano A2 (TXA2)

Mutaciones en el gen TBXAS

Los inventores identificaron varias mutaciones en el gen TBXAS1. Como se muestra en el ejemplo, la secuenciación directa del gen TBXAS1 ha dado lugar a la detección de distintas mutaciones de sentido contrario homocigotas en las cuatro familias GHDD de Ejemplo: 1463T>C, 248T>C, 1444G>T y 1238G>A, en referencia a los números de nucleótidos de la SEQ ID No1.

Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos TBXAS1, o un fragmento del mismo, que lleva una mutación tal como se define anteriormente es parte de la invención.

En consecuencia, la descripción se refiere a un ácido nucleico aislado que codifica la TXAS, cuyo ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia del gen TBXAS1 que contiene una mutación seleccionada de entre el grupo que consiste en 1463T>C, 248T>C, 1444G>T y 1238G>A. Dicho ácido nucleico puede contener una o más de las mutaciones anteriores.

La divulgación se refiere además al polipéptido codificado por dicho ácido nucleico. Más específicamente, las mutaciones 1463T>C, 248T>C, 1444G>T y 1238G>A en el gen TBXAS1 dan como resultado mutantes Leu488Pro, Leu83Pro, Gly482Trp y Arg413Glu de TXAS respectivamente. Las posiciones de los aminoácidos se indican por

referencia a las secuencias de polipéptido que se exponen en la SEQ ID No:2

5 Por consiguiente, la divulgación proporciona además un polipéptido aislado que comprende o consiste en la secuencia de polipéptido de TXAS que contiene una mutación seleccionada del grupo que consiste en un Leu488Pro, Leu83Pro, Gly482Trp y Arg413Glu. Dicho polipéptido puede contener una o más de las mutaciones anteriores.

Métodos de diagnóstico de la invención:

10 Los inventores han demostrado además que las mutaciones encontradas en el gen TBXAS1 asociadas con una disminución de la actividad de la tromboxano sintasa están asociadas con una enfermedad asociada con un aumento en la densidad mineral ósea, en particular con el síndrome de displasia-hematodifisaria de Ghosal (GHDD).

15 Por lo tanto, la invención proporciona un método para diagnosticar o predecir el síndrome de displasia-hematodifisaria de Ghosal, o un riesgo de síndrome de displasia-hematodifisaria de Ghosal, en un sujeto, cuyo método comprende detectar una mutación en el gen TBXAS1, en comparación con una población de control, en el que la presencia de una mutación es indicativa de un síndrome de displasia-hematodifisaria de Ghosal o de un riesgo de síndrome de displasia-hematodifisaria de Ghosal.

20 Sin estar ligado por ninguna teoría, los inventores creen que el gen TBXAS1 juega un papel en la patogénesis de las enfermedades relacionadas con la densidad mineral ósea.

25 Por consiguiente, un objeto de la invención se refiere a un método para diagnosticar o predecir una enfermedad relacionada con la densidad mineral ósea, o un riesgo de una enfermedad relacionada con la densidad mineral ósea, en un sujeto, cuyo método comprende detectar una mutación en el gen TBXAS1, en comparación con una población de control, en el que la presencia de una mutación es indicativa de una enfermedad relacionada con la densidad mineral ósea o de un riesgo de una enfermedad relacionada con la densidad mineral ósea, y en el que la enfermedad relacionada con la densidad mineral ósea es el síndrome de displasia-hematodifisaria de Ghosal.

30 De acuerdo con una primera realización, dicha mutación puede detectarse mediante el análisis de una molécula de ácido nucleico TBXAS1. En el contexto de la invención, las moléculas de ácido nucleico TBXAS1 incluyen ARNm, ADN genómico y ADNc derivado de ARNm. El ADN o ARN pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena. Estos pueden ser utilizados por ejemplo para la detección por amplificación y/o hibridación con una sonda.

35 Así, la invención proporciona un método para diagnosticar o predecir una enfermedad relacionada con la densidad mineral ósea, o un riesgo de una enfermedad relacionada con la densidad mineral ósea, en un sujeto, cuyo método comprende detectar una mutación en el gen TBXAS1, en el que la presencia de dicha mutación es indicativa de una enfermedad relacionada con la densidad mineral ósea o de un riesgo de una enfermedad relacionada con la densidad mineral ósea, en el que dicho método comprende la etapa de detectar una mutación TBXAS1 en una muestra de ácido nucleico obtenida de dicho sujeto, y en el que la enfermedad relacionada con la densidad mineral ósea es síndrome de displasia-hematodifisaria de Ghosal.

45 La muestra de ácido nucleico se puede obtener de cualquier fuente celular o biopsia de tejido. Los ejemplos no limitantes de fuentes de células disponibles incluyen sin limitación las células sanguíneas, células bucales, células epiteliales, fibroblastos, o cualquier célula presentes en un tejido obtenido mediante biopsia. Las células también pueden obtenerse a partir de fluidos corporales, tales como sangre, plasma, suero, linfa, etc. El ADN puede ser extraído por medio de cualquier método conocido en la técnica, tal como se describe en Sambrook et al., 1989. El ARN se puede aislar también, por ejemplo, de biopsia de tejido, utilizando métodos estándar bien conocidos por el experto en la materia, tales como extracción con tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo.

50 Una mutación TBXAS1 de acuerdo con la invención puede encontrarse en una región reguladora del gen TBXAS1 (por ejemplo, una secuencia promotora, o un sitio de unión para el factor de transcripción), en intrones del gen TBXAS1 o en los exones que codifican TXAS.

55 Preferiblemente, una mutación del gen TBXAS1 de acuerdo con la invención se selecciona del grupo que consiste en 1463T>C, 248T>C, 1444G>T y 1238G>A.

60 Las mutaciones de TBXAS1 pueden ser detectadas en una muestra de ARN o ADN, preferiblemente después de la amplificación. Por ejemplo, el ARN aislado se puede someter a transcripción inversa acoplada y amplificación, tales como transcripción inversa y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), usando cebadores de oligonucleótidos específicos que son específicos de un sitio mutado o que permiten la amplificación de una región que contiene el sitio mutado. De acuerdo con una primera alternativa, las condiciones para la hibridación del cebador pueden ser elegidas para asegurar la transcripción inversa específica (en su caso) y la amplificación; de manera que la aparición de un producto de amplificación sea un diagnóstico de la presencia de una mutación TBXAS1 particular. De lo contrario, el ARN puede ser transcrito de forma inversa y amplificado, o el ADN se puede amplificar después

de lo cual un sitio mutado se puede detectar en la secuencia amplificada por hibridación con una sonda adecuada o por secuenciación directa, o cualquier otro método apropiado conocido en la técnica. Por ejemplo, un ADNc obtenido a partir de ARN puede ser clonado y secuenciado para identificar una mutación en la secuencia TBXAS1.

5 Actualmente existen numerosas estrategias para el análisis del genotipo (Antonarakis et al, 1989; Cooper et al, 1991; Grompe, 1993). Brevemente, la molécula de ácido nucleico puede ser probada para determinar la presencia o ausencia de un sitio de restricción. Cuando una mutación de sustitución de base crea o suprime el sitio de reconocimiento de una enzima de restricción, esto permite un simple análisis de PCR directo para la mutación. Otras estrategias incluyen, pero no se limitan a, secuenciación directa, análisis de los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP); hibridación con oligonucleótidos específicos de alelo (ASO) que son sondas sintéticas cortos que se hibridan únicamente con una secuencia perfectamente emparejada en condiciones de hibridación suficientemente rigurosas; PCR específica de alelo; PCR usando cebadores mutagénicos; ligasa-PCR, escisión HOT; electroforesis en gel desnaturizante en gradiente (DGGE), electroforesis en gel de gradiente de temperatura de desnaturalización (TGGE), polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) y cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturizante (Kuklin et al., 1997). La secuenciación directa puede realizarse por cualquier método, incluyendo, sin limitación la secuenciación química, utilizando el método de Maxam-Gilbert; mediante secuenciación enzimática, utilizando el método de Sanger; secuenciación de espectrometría de masas; secuenciación usando una tecnología basada en chips; y PCR cuantitativa en tiempo real. Preferiblemente, el ADN de un sujeto se somete primero a amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores de amplificación específicos. Sin embargo, existen otros métodos que permiten el estudio del ADN independientemente de la PCR, tales como la amplificación por círculo rodante (RCA), el Invader™ Massay, o el ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA). El OLA se puede utilizar para revelar mutaciones de sustitución de base. De acuerdo con este método, se construyen dos oligonucleótidos que hibridan con las secuencias adyacentes en el ácido nucleico diana, con la unión situada en la posición de la mutación. La ADN ligasa se unirá covalentemente a los dos oligonucleótidos solo si están perfectamente hibridados.

Por lo tanto, las moléculas de ácidos nucleicos útiles, en particular, sondas de oligonucleótidos o cebadores, de acuerdo con la presente invención incluyen aquellas que se hibridan específicamente con las regiones donde se localizan las mutaciones.

Las sondas de oligonucleótidos o cebadores pueden contener al menos 10, 15, 20 o 30 nucleótidos. Su longitud puede ser más corta que 400, 300, 200 o 100 nucleótidos.

De acuerdo con una segunda realización, dicha mutación en el gen TBXAS1 puede ser detectada a nivel de proteínas.

En consecuencia, una mutación de TXAS acuerdo con la invención se selecciona del grupo que consiste en mutaciones que tienen como resultado mutantes de TXAS Leu488Pro, Leu83Pro, Gly482Trp y Arg413Glu.

Dicha mutación puede ser detectada de acuerdo con cualquier método apropiado conocido en la técnica. En particular, una muestra, tal como una biopsia de tejido, obtenida de un sujeto puede ponerse en contacto con anticuerpos específicos de la forma mutada de TXAS, es decir, anticuerpos que son capaces de distinguir entre una forma mutada de TBXAS1 y la proteína de tipo silvestre (o cualquier otra proteína), para determinar la presencia o ausencia de un TBXAS1 especificado por el anticuerpo.

Los anticuerpos que reconocen específicamente un TXAS mutado también forman parte de la invención. Los anticuerpos son específicos de TXAS mutado, es decir que no reaccionan de forma cruzada con el TXAS de tipo silvestre.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales, de cadena sencilla o de doble cadena, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, o porciones de una molécula de inmunoglobulina, incluyendo aquellas porciones conocidas en la técnica como fragmentos de unión al antígeno Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v). También pueden ser inmunoconjugados, por ejemplo con una toxina, o anticuerpos marcados.

Aunque se pueden usar anticuerpos policlonales, los anticuerpos monoclonales son preferidos porque son más reproducibles a largo plazo.

Los procedimientos para obtener "anticuerpos policlonales" también son bien conocidos. Los anticuerpos policlonales se pueden obtener a partir de suero de un animal inmunizado contra el antígeno apropiado, que puede ser producido por ingeniería genética, por ejemplo, de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos por un experto en la materia. Generalmente, dichos anticuerpos se pueden obtener mediante la administración de TXAS mutado administrado por vía subcutánea a conejos blancos New Zealand que primero han sido sangrados para obtener suero pre-inmune. Los antígenos pueden ser inyectados en un volumen total de 100 µl por sitio en seis sitios diferentes. Cada material inyectado puede contener adyuvantes, con o sin gel de acrilamida pulverizado que contiene la proteína o polipéptido después de la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Los conejos se sangraron a continuación dos semanas después de la primera inyección y se reforzaron periódicamente con el

mismo antígeno tres veces cada seis semanas. Una muestra de suero se recoge 10 días después de cada refuerzo. Los anticuerpos policlonales se recuperan a continuación a partir del suero por cromatografía de afinidad usando el antígeno correspondiente para capturar el anticuerpo. Este y otros procedimientos para obtener anticuerpos policlonales se divulgan en Harlow et al., (1988), los cuales se incorporan en las referencias.

Un "anticuerpo monoclonal" en sus diversas formas gramaticales se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contiene solo una especie de sitio de combinación con el anticuerpo capaz de inmunorreaccionar con un epítipo particular. Por lo tanto, normalmente un anticuerpo monoclonal muestra una única afinidad de unión por cualquier epítipo con el que inmunorreacciona. Por tanto, un anticuerpo monoclonal puede contener una molécula de anticuerpo que tiene una pluralidad de sitios de combinación con el anticuerpo, cada uno inmunoespecífico para un epítipo diferente, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal biespecífico. Aunque históricamente un anticuerpo monoclonal es producido por inmortalización de una línea de células secretoras de inmunoglobulina clonalmente pura, una población monoclonalmente pura de moléculas de anticuerpo también se puede preparar por los métodos de la presente invención.

Los métodos de laboratorio para la preparación de anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow et al., 1988). Los anticuerpos monoclonales (mAb) se pueden preparar mediante la inmunización de TXAS mutado purificado en un mamífero, por ejemplo, un ratón, rata, ser humano y otros mamíferos. Las células productoras de anticuerpos en el mamífero inmunizado se aíslan y se fusionan con células de mieloma o heteromieloma para producir células híbridas (hibridomas). Las células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales se utilizan como fuente del anticuerpo monoclonal deseado. Este método estándar de cultivo de hibridoma se describe en Kohler y Milstein (1975).

Aunque los mAbs pueden ser producidos por cultivo de hibridoma la invención no debe ser limitada. También se contempla el uso de mAb producidos por un ácido nucleico que expresa clonado a partir de un hibridoma de esta invención. Es decir, el ácido nucleico que expresa las moléculas secretadas por un hibridoma de esta invención puede ser transferido a otra línea celular para producir un transformante. El transformante es genotípicamente distinto del hibridoma original, pero también es capaz de producir moléculas de anticuerpo de esta invención, incluyendo fragmentos inmunológicamente activos de moléculas de anticuerpo completas, que corresponden a las secretadas por el hibridoma. Véase, por ejemplo, la Patente US-4.642.334 concedida a Reading; la Publicación PCT N.º; las Publicaciones de Patente Europea N.º 0239400 concedida a Winter et al., y N.º 0125023 concedida a Cabilly et al.

Las técnicas de generación de anticuerpos que no implican la inmunización también se contemplan, como por ejemplo la utilización de la tecnología de presentación en fagos para examinar bibliotecas obtenidas a partir de animales no inmunizados; ver Barbas et al. (1992), y Waterhouse et al. (1993).

Los anticuerpos producidos contra TXAS mutado pueden presentar reacción cruzada con TXAS de tipo silvestre. Por consiguiente se requiere una selección de anticuerpos específicos del TXAS mutado. Esto puede conseguirse por el agotamiento de la reserva de anticuerpos de los que son reactivos con TXAS de tipo silvestre, por ejemplo mediante el análisis de los anticuerpos obtenidos mediante cromatografía de afinidad frente a TXAS de tipo silvestre.

En otra alternativa, los agentes de unión distintos de anticuerpos se pueden usar para el propósito de la invención. Estos pueden ser, por ejemplo, aptámeros que son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos o de oligopéptidos con la capacidad de reconocer virtualmente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Tales ligandos pueden ser aislados mediante Evolución Sistemática de Ligandos mediante Enriquecimiento Exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias al azar, como se describe en Tuerk C. y Gold L., 1990. La biblioteca de secuencia aleatoria puede obtenerse mediante síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una secuencia única. Posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena SD, 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en una región variable de anticuerpo conformacionalmente restringido mostrada por una proteína de plataforma, tal como la E. coli tiorredoxina A que se seleccionan a partir de bibliotecas combinatorias por dos métodos híbridos (Colas et al., 1996).

Las sondas, cebadores, aptámeros o anticuerpos de la invención pueden marcarse con una molécula o sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o cualquier otro marcador conocido en la técnica. Los marcadores son conocidos en la técnica que generalmente proporcionan (directa o indirectamente) una señal.

El término "marcado", con respecto a la sonda, cebadores, aptámeros o anticuerpos de la invención, se pretende que abarque el marcaje directo de la sonda, cebadores, aptámeros o anticuerpos de la invención mediante acoplamiento (es decir, uniendo físicamente) una sustancia detectable a la sonda, cebadores, aptámeros o anticuerpos de la invención, así como el marcaje indirecto de la sonda, cebadores, aptámeros o anticuerpos de la invención mediante reactividad con otro reactivo que está marcado directamente. Otros ejemplos de sustancias detectables incluyen, pero no se limitan a agentes radiactivos o un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de

fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o indocianina (Cy5)). Los ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente y el marcaje terminal de una sonda de ADN con biotina de manera que puede detectarse con estreptavidina marcada fluorescentemente. Un anticuerpo o aptámero de la invención puede marcarse con una molécula radiactiva mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo moléculas radiactivas incluyen, pero no se limitan a átomos radioactivos para estudios gammagráficos tales como ¹¹²³, ¹¹²⁴, ¹¹¹¹, ^{Re186}, ^{RE188}.

Kits de la invención:

De acuerdo con otro aspecto de la invención, la mutación TBXAS1 se detecta poniendo en contacto el ADN del sujeto con una sonda de ácido nucleico, que está opcionalmente marcada.

Los cebadores también pueden ser útiles para amplificar o secuenciar la porción del gen TBXAS1 que contiene las posiciones mutadas de interés.

Tales sondas o cebadores son ácidos nucleicos que son capaces de hibridarse específicamente con una porción de la secuencia del gen TBXAS1 que contiene las posiciones mutadas de interés. Eso significa que son secuencias que se hibridan con la porción de secuencia de ácido nucleico de TBXAS1 mutada con las que están relacionadas en condiciones de alta rigurosidad.

La presente divulgación proporciona además kits adecuados para determinar al menos una de las mutaciones del gen TBXAS1.

Los kits pueden incluir los siguientes componentes:

- (i) una sonda, generalmente de ADN y que puede estar pre-marcada. En otra alternativa, la sonda puede estar sin marcar y los ingredientes para el marcaje pueden incluirse en el kit en recipientes separados; y
- (ii) reactivos de hibridación: el kit puede contener también otros reactivos adecuadamente envasados y materiales necesarios para el protocolo de hibridación particular, entre ellos matrices de fase sólida, si procede, y patrones.

En otra realización, los kits pueden incluir:

- (i) cebadores de determinación o amplificación de la secuencia: los cebadores de secuenciación pueden marcarse previamente o pueden contener un resto de purificación por afinidad o de unión; y
- (ii) reactivos de determinación o amplificación de la secuencia: el kit puede contener también otros reactivos y materiales necesarios para el protocolo de amplificación de secuenciación particular, adecuadamente envasados. En una realización preferida, el kit comprende un panel de cebadores de secuenciación o de amplificación, cuyas secuencias corresponden a secuencias adyacentes a al menos una de las posiciones polimórficas, así como un medio para detectar la presencia de cada secuencia polimórfica.

En una realización particular, se proporciona un kit que comprende un par de cebadores de nucleótidos específicos para la amplificación de todo o parte del gen TBXAS1 que comprende al menos una de las mutaciones identificadas en la presente memoria, especialmente las posiciones 1463, 248, 1444 y 1238.

En otra alternativa, el kit de la invención puede comprender un compuesto marcado o agente capaz de detectar el polipéptido mutado de la invención (por ejemplo, un anticuerpo o aptámeros como se describió anteriormente que se une al polipéptido). Por ejemplo, el kit puede comprender (1) un primer anticuerpo (por ejemplo, unido a un soporte sólido) que se une a un polipéptido que comprende una mutación de la invención; y, opcionalmente, (2) un segundo anticuerpo, diferente que se une a o bien el polipéptido o el primer anticuerpo y se conjuga con un agente detectable.

El kit también puede comprender, por ejemplo, un agente tampón, un conservante, o un agente estabilizante de proteínas. El kit también puede comprender componentes necesarios para detectar el agente detectable (por ejemplo, una enzima o un sustrato). El kit también puede contener una muestra de control o una serie de muestras de control que pueden ensayarse y compararse con la muestra de ensayo contenida. Cada componente del kit está generalmente encerrado dentro de un envase individual y todos los diversos recipientes están dentro de un solo envase junto con las instrucciones para observar si el sujeto ensayado padece o está en riesgo de desarrollar una enfermedad relacionada con la densidad mineral ósea.

Métodos terapéuticos de la invención:

En un objeto adicional, la invención se refiere al uso, métodos y composiciones farmacéuticas para tratar o prevenir las enfermedades relacionadas con la densidad mineral ósea.

En una realización particular de la divulgación, la enfermedad relacionada con la densidad mineral ósea se asocia con aumento de la densidad mineral ósea. Ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan al síndrome de displasia hematodiarisaria de Ghosal (GHDD).

5 Así, la divulgación se refiere además a un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada con un aumento en la densidad mineral ósea, que comprende la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo un polinucleótido TBXAS1, es decir, una secuencia de ácido nucleico que codifica un TXAS de tipo silvestre, de modo que TXAS se expresa in vivo por las células del sujeto que han sido transfectadas con dicho polinucleótido. En consecuencia, dicho método conduce a una sobreexpresión de TXAS de tipo silvestre que compensa expresión de
10 TXAS mutado defectuoso. El polinucleótido administrado no contiene ninguna mutación seleccionada del grupo que consiste en 1463T>C, 248T>C, 1444G>T y 1238G>A.

La divulgación también se refiere al uso de un polinucleótido TBXAS1 para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de una enfermedad asociada con un aumento de la densidad mineral ósea.
15 Preferiblemente, dicho polinucleótido TBXAS1 se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Preferiblemente, la secuencia de polinucleótidos TBXAS1 acuerdo con la invención se asocia con los elementos que permiten la regulación de su expresión, tales como una secuencia promotora.

20 Un ácido nucleico de este tipo puede estar en la forma de un vector. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que segmentos de ADN
25 adicionales se pueden ligar en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) se integran en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora y de ese modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores, vectores de expresión, son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. En general, los vectores de expresión de
30 utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos (vectores). Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), que sirven para funciones equivalentes.

El polinucleótido TBXAS1 se puede introducir en una célula diana por medio de cualquier procedimiento conocido para la administración de ácidos nucleicos al núcleo de las células, ex vivo, en células en cultivo o extraídas de un animal o un paciente, o in vivo.

La introducción ex vivo puede realizarse por cualquier método estándar bien conocido por un experto en la materia, por ejemplo transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE- dextrano,
40 precipitación con fosfato de calcio, o el uso de bombardeo de genes.

El polinucleótido TBXAS1 también puede introducirse ex vivo o in vivo mediante lipofección. En ciertas realizaciones, el uso de liposomas y/o nanopartículas se contempla para la introducción del sistema de direccionamiento de ácido nucleico del donante en las células del hospedador.

45 Las nanocápsulas pueden atrapar generalmente compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debido a la sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultrafinas (de tamaño aproximadamente de 0,1 µm) deberían diseñarse usando polímeros capaces de ser degradados in vivo. Las nanopartículas biodegradables de polialquil-cianoacrilato que cumplen estos requisitos se contemplan para su uso en la presente invención, y tales partículas se pueden preparar fácilmente.

Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilamelares (también denominadas vesículas multilamelares (MLV)). Las MLV generalmente tienen diámetros de 25 nm a 4 µm. La sonicación de MLV da como resultado la formación de pequeñas vesículas unilaminares (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una solución acuosa en el núcleo.

55 Se pueden usar lípidos catiónicos sintéticos diseñados para limitar las dificultades y riesgos encontrados con la transfección mediada por liposomas para preparar liposomas para la transfección in vivo de un gen que codifica un marcador. El uso de lípidos catiónicos puede promover la encapsulación de ácidos nucleicos cargados negativamente, y promover también la fusión con membranas celulares cargadas negativamente (Felgner et al., 1989).

65 En otra alternativa, una de las formas más sencillas y seguras de la administración del polinucleótido TBXAS1 través de las membranas celulares in vivo puede implicar la aplicación directa de una alta concentración polinucleótidos libres o desnudos (generalmente ARNm o ADN). Por "ADN (o ARN) desnudo" se entiende una molécula de ADN

(ARN) que no ha formado previamente complejo con otros restos químicos. La absorción de ADN desnudo por las células animales se puede aumentar mediante la administración de las células simultáneamente con excipientes y el ácido nucleico. Tales excipientes son reactivos que mejoran o aumentan la penetración del ADN a través de membranas celulares y por lo tanto la administración a las células del agente terapéutico. Varios excipientes se han descrito en la técnica, tales como tensioactivos, por ejemplo un agente tensioactivo seleccionado del grupo que consiste en Triton X-100, dodecil sulfato de sodio, Tween 20, y Tween 80; toxinas bacterianas, por ejemplo estreptolisina O, toxina del cólera, y toxina lábil de *E. coli* recombinante modificada y polisacáridos, tales como glucosa, sacarosa, fructosa, o maltosa, por ejemplo, que actúan mediante la interrupción de la presión osmótica en el entorno de la membrana celular. Otros métodos se han descrito para mejorar la administración de polinucleótidos libres, tales como el bloqueo de la inactivación del polinucleótido mediante escisión endonucleolítica o exonucleolítica por ambas nucleasas extra e intracelulares.

En otra alternativa, la divulgación también proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada con un aumento en la densidad mineral ósea, que comprende la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo un TXAS de tipo silvestre.

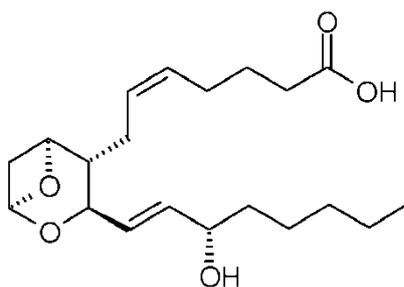
El polipéptido TXAS administrado puede ser una variante del TXAS de tipo silvestre, siempre que el polipéptido mantenga la actividad para convertir las prostaglandinas (PG) H₂ en tromboxano A₂ (TXA₂). En consecuencia; el polipéptido no comprende una mutación seleccionada de entre el grupo que consiste en mutaciones que dan como resultado mutantes de TXAS Leu488Pro, Leu83Pro, Gly482Trp y Arg413Glu.

Conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la materia fácilmente puede producir dichos polipéptidos, por técnicas estándar para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse utilizando el método de fase sólida bien conocido, preferiblemente usando un aparato de síntesis de péptidos disponible comercialmente (tal como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

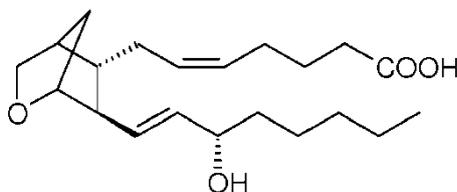
En otra alternativa, dichos polipéptidos se pueden sintetizar mediante técnicas de ADN recombinante como es ahora bien conocido en la técnica. Por ejemplo, estos fragmentos pueden obtenerse como productos de expresión de ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican el (poli)péptido deseado en vectores de expresión y la introducción de dichos vectores en hospedadores eucariotas o procariotas adecuados que expresarán el polipéptido deseado, a partir de los cuales se aislará más tarde usando técnicas bien conocidas.

Dichos polipéptidos se pueden usar en forma aislada (por ejemplo, purificada) o contenidos en un vector, tal como una vesícula de membrana o lipídica (por ejemplo, un liposoma).

En otra alternativa, la divulgación también proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada con un aumento en la densidad mineral ósea, que comprende la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo tromboxano A₂ o un análogo del mismo. El tromboxano A₂ tiene la siguiente estructura de oxanoxetano bicíclico:



El análogo del tromboxano A₂ puede consistir por ejemplo en U46619 (9,11-didesoxi-9 α , 11 α -metanoepoxi PGF_{2 α} ; 9,11-didesoxi-9 α , 11 α -metanoepoxi prostaglandina F_{2 α} (CAS 56985-40-1)) que tiene la siguiente estructura:



La divulgación proporciona además métodos para tratar o prevenir una enfermedad asociada con una disminución de la densidad mineral ósea. Ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a osteoporosis, osteoporosis asociada a aterosclerosis, osteoporosis asociada a pseudoglioma, osteoporosis y síndrome de

hipopigmentación oculocutáneo, osteoporosis debida a disfunción endocrinológica, osteogénesis imperfecta, metástasis ósea y cánceres óseos primitivos como el osteosarcoma.

5 En una realización particular, la invención se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad asociada con la disminución de la densidad mineral ósea, que comprende la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo un inhibidor de la expresión del gen TBXAS1, en el que dicha enfermedad asociada con una disminución de la densidad mineral ósea es la osteogénesis imperfecta.

10 Los inhibidores de la expresión del gen TBXAS1 para su uso en la presente invención pueden basarse en construcciones de oligonucleótidos anti-sentido. Los oligonucleótidos anti-sentido, incluyendo moléculas de ARN anti-sentido y moléculas de ADN anti-sentido, actuarían para bloquear directamente la traducción del ARNm de TBXAS1 mediante la unión al mismo y por lo tanto evitando la traducción de proteínas o aumentando la degradación del ARNm, disminuyendo así el nivel de TXAS, y por lo tanto la actividad, en una célula. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido de al menos aproximadamente 15 bases y complementarios a regiones únicas de la secuencia de transcrito de ARNm que codifica TXAS se pueden sintetizar, por ejemplo, mediante técnicas de fosfodiéster convencionales y administrarse mediante, por ejemplo, inyección intravenosa o infusión. Los métodos para utilizar técnicas antisentido para inhibir específicamente la expresión génica de genes cuya secuencia se conoce son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, véase las Patentes US-6.566.135; US-6.566.131; US-6.365.354; US-6.410.323; US-6.107.091; US-6.046.321 y US-5.981.732).

20 Los ARN inhibidores pequeños (ARNip) también pueden funcionar como inhibidores de la expresión del gen TBXAS1 para su uso en la presente invención. La expresión del gen TBXAS1 puede reducirse poniendo en contacto un sujeto o célula con un ARN pequeño de doble cadena (ARNdc), o un vector o construcción que provoca la producción de un ARN pequeño de doble cadena, de manera que la expresión del gen TBXAS1 se inhibe específicamente (es decir, el ARN de interferencia o ARNi). Los métodos para la selección de un ARNdc o un vector apropiado que codifica un ARNdc son bien conocidos en la técnica para genes cuya secuencia se conoce (por ejemplo, véase Tuschl, T. et al. (1999); Elbashir, S. M. et al. (2001); Hannon, GJ. (2002); McManus, MT. et al. (2002); Brummelkamp, TR. et al. (2002); Patentes US-6.573.099 y US-6.506.559; y las Publicaciones de Patente Internacional Números WO 01/36646, WO 99/32619 y WO 01/68836).

30 Las ribozimas también pueden funcionar como inhibidores de la expresión del gen TBXAS1 para su uso en la presente invención. Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica del ARN. El mecanismo de acción de la ribozima implica la hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima con el ARN diana complementario, seguido de escisión endonucleolítica. Las moléculas de ribozima diseñadas como horquilla o con motivo de cabeza de martillo que catalizan específica y eficientemente la escisión endonucleolítica de las secuencias de ARNm de TBXAS1 son por tanto útiles en el ámbito de la presente invención. Los sitios de corte de ribozima específicos dentro de cualquier ARN diana potencial se identifican inicialmente explorando la molécula diana para determinar los sitios de escisión de la ribozima, los cuales generalmente incluyen las siguientes secuencias, GUA, GUU, y GUC. Una vez identificadas, las secuencias de ARN cortas de entre aproximadamente 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contiene el sitio de escisión, se puede evaluar para características estructurales predichas, tales como estructura secundaria, que pueden hacer que la secuencia de oligonucleótidos sea inadecuada. La idoneidad de las dianas candidatas también puede evaluarse probando su accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios, usando, por ejemplo, ensayos de protección de ribonucleasa.

45 Ambos oligonucleótidos antisentido y ribozimas útiles como inhibidores de la expresión del gen TBXAS1 se pueden preparar por métodos conocidos. Estos incluyen técnicas para la síntesis química, tales como, por ejemplo, por síntesis química fosforamidita en fase sólida. En otra alternativa, moléculas de ARN anti-sentido pueden ser generadas por transcripción in vitro o in vivo de secuencias de ADN que codifican la molécula de ARN. Tales secuencias de ADN se pueden incorporar en una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados tales como los promotores de polimerasa T7 o SP6. Diversas modificaciones a los oligonucleótidos de la invención se pueden introducir como medio de aumentar la estabilidad intracelular y la semivida. Las modificaciones posibles incluyen, pero no se limitan a la adición de secuencias flanqueantes de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos a los extremos 5' y/o 3' de la molécula, o el uso de fosforotioato o 2'-O-metilo en lugar de enlaces fosfodiéster dentro de la cadena principal del oligonucleótido.

50 Los ARNip de oligonucleótidos antisentido y las ribozimas de la invención se pueden administrar in vivo solo o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del ARNip del oligonucleótido antisentido o ácido nucleico de la ribozima a las células y, preferiblemente, las células que expresan el gen TBXAS1. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a células con degradación reducida en relación con el grado de degradación que resultaría en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a, plásmidos, fagémidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes virales o bacterianas que se han manipulado mediante la inserción o incorporación de las secuencias del ARNip del oligonucleótido antisentido o ácido nucleico de la ribozima. Los vectores virales son un tipo preferido de vector e incluyen, pero no se limitan a secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: retrovirus, tales como el virus de la leucemia murina de Moloney, el virus del sarcoma murino de Harvey y el virus del

tumor mamario murino y el virus del sarcoma de Rouse; adenovirus, virus adeno-asociados; virus de tipo SV40; virus de poliovirus; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; herpes virus; virus de la vacuna; virus de la poliomielitis; y virus de ARN tales como un retrovirus. Se pueden emplear fácilmente otros vectores no nombrados pero conocidos en la técnica.

5 Los vectores virales preferidos se basan en virus eucariotas no citopáticos en los cuales los genes no esenciales han sido reemplazados con el gen de interés. Los virus no citopáticos incluyen retrovirus (por ejemplo, lentivirus), cuyo ciclo de vida implica la transcripción inversa del ARN viral genómico en ADN con la integración proviral subsiguiente en ADN celular del huésped. Los retrovirus han sido aprobados para ensayos de terapia génica humana. Los más útiles son aquellos retrovirus que son de replicación deficiente (es decir, capaz de dirigir la síntesis de las proteínas deseadas, pero incapaces de fabricar una partícula infecciosa). Tales vectores de expresión retrovirales alterados genéticamente tienen utilidad general para la transducción de alta eficacia de genes in vivo. Los protocolos estándar para producir retrovirus deficientes en replicación (incluyendo las etapas de incorporación de material genético exógeno en un plásmido, transfección de una célula de empaquetamiento alineada con el plásmido, producción de retrovirus recombinantes por la línea celular de empaquetamiento, recolección de las partículas virales de medios de cultivo de tejidos e infección de las células diana con partículas virales) se proporcionan en Kriegler, 1990 y en Murry, 1991).

20 Los virus preferidos para ciertas aplicaciones son los adenovirus y los virus adeno-asociados, que son virus de ADN bicatenario que ya han sido aprobados para uso humano en terapia génica. El virus adeno-asociado puede diseñarse para ser deficiente en replicación y es capaz de infectar una amplia variedad de tipos de células y especies. Tiene además ventajas tales como, el calor y la estabilidad del disolvente lipídico; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluyendo células hematopoyéticas; y la falta de inhibición de la superinfección permitiendo así múltiples series de transducciones. Supuestamente, el virus adeno-asociado puede integrarse en el ADN celular humano de una manera específica del sitio, minimizando de este modo la posibilidad de mutagénesis por inserción y la variabilidad de la expresión del gen insertado característica de la infección retroviral. Además, las infecciones de virus adeno-asociados de tipo silvestre se han seguido en cultivo de tejidos durante más de 100 pasajes en la ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adeno-asociado es un acontecimiento relativamente estable. El virus adeno-asociado también puede funcionar de manera extracromosómica.

35 Otros vectores incluyen vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos se han descrito ampliamente en la técnica y son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo Sambrook et al., 1989. En los últimos años, los vectores plasmídicos se han utilizado como vacunas de ADN para la administración de genes que codifican antígenos a las células in vivo. Estos son particularmente ventajosos para esto porque no tienen los mismos problemas de seguridad que otros muchos de los vectores virales. Estos plásmidos, sin embargo, que tienen un promotor compatible con la célula hospedadora, pueden expresar un péptido a partir de un gen codificado operativamente dentro del plásmido. Algunos plásmidos usados comúnmente incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40, y pBlueScript. Otros plásmidos son bien conocidos por los expertos normales en la materia. Además, los plásmidos pueden ser diseñados usando enzimas de restricción y reacciones de ligación para eliminar y añadir fragmentos específicos de ADN. Los plásmidos se pueden administrar mediante una variedad de vías parenteral, mucosal y tópica. Por ejemplo, el ADN plasmídico se puede inyectar por vía intramuscular, intradérmica, subcutánea, o por otras vías. También se puede administrar mediante pulverizadores intranasales o gotas, supositorio rectal y por vía oral. También se puede administrar en la epidermis o en una superficie mucosa usando el bombardeo de genes. Los plásmidos se pueden administrar en una solución acuosa, secarse sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de administración de ADN incluyendo, pero sin limitarse a, liposomas, dendrímeros, coqueato y microencapsulación.

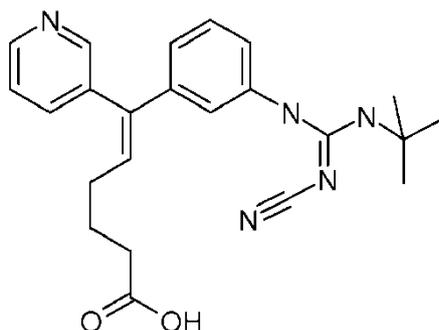
50 En otra alternativa, la invención también proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada con una disminución de la densidad mineral ósea, que comprende la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo un inhibidor de tromboxano, y en la que dicha enfermedad asociada con una disminución de la densidad mineral ósea es la osteogénesis imperfecta.

55 Inhibidores de tromboxano contemplados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, ácido 2-(acetiloxi)benzoico, AA 2414 (seratrodast, (ácido 4-hidroxi-(Z)-(2,4,5-trimetil-3,6-dioxo-1,4-ciclohexadien-1-il)-benecenoheptanoico), AH 2848 ((1[alfa](Z), 2[beta], 5[alfa])-(+)-7-(5-ácido (((1,1'-bifenil)-4-il)metoxi)-2-(4-morfolinil)-3-oxociclo-pentil)-4-heptenoico), BAY u3405 (ramatrobán, ácido 3R-((4-fluorofenil)sulfonil)amino)-1,2,3,4-tetrahidro-9H-carbazol-9-propanoico), BM 13177 (sulotrobán, (ácido 4-(2-((fenilsulfonil)amino)etil)fenoxi)-acético), BM 13505 (daltrobán, (ácido 4-(2-(((4-clorofenil)sulfonil)amino)etil)-bencenoacético), BMS 180291 (ifetroban, (ácido (+)-1S-(1[alfa], 2[alfa], 3[alfa], 4[alfa])-2-((3-(4-(n-pentilamino)carbonil)-2-oxazolilo)-7-oxabicyclo(2.2.1)hept-2-il)metil)benceno propiónico), cinamorfilina ((8R, 8'S)-4,4'-dihidroxi-3,3'-dimetoxi-7-oxo-8,8'-neolignan), CGS 12970 (ácido 3-metil-2-(3-piridil)indol-1-octanoico), CGS 15435, CGS 22652 (ácido 4-(((4-chlorofenil)sulfonil)amino)butil)-3-piridinheptanoico), CV 4151 (ácido (E)-7-fenil-7-(3-piridinil)-6-heptenoico), dazoxiben (ácido 4-(2-(1H-imidazol-1-il)etoxi)benzoico), dazmegrel, DT-TX 30 (ácido (E)-6-(4-2-(4-clorobenceno sulfonilamino)etil)fenil)-6-(3-piridil)-hex-5-enoico), etofibrato (éster etílico del ácido 2-(2-(4-clorofenoxi)-2-metil-1-oxopropoxi)-3-piridincarboxílico), EP 045 ((1[alfa], 2[beta](Z), 3[alfa], 4[alfa])-7-(3-(((fenilamino)carbonil)hidrazono)metil)bicyclo(2.2.1)hept-2-il), EP 092 (7-(1S,

2S, 3S, 4R)-3-(1-(3-(feniltioureidoimino)etil)biciclo(2.2.1)heptano-2-il)-5-heptenoico), F 10171 (1-(((5-(4-clorofenil)-2-furanil)metil)amino)-3-(4-(1-piperazinil)butil)-2,4-imidazolidindiona), FCE 27262 (ácido (E)-(+)-5-(((1-ciclohexil-2-(1H-imidazol-1-il)-3-fenilpropiliden)amino)oxi-pentanoico), FI 2845 (camongrel, ácido 2,3-dihidro-5-(2-(1H-imidazol-1-il)etoxi)inden-1-carboxílico), FK 070 (ácido (5Z)-6-((2S, 4R)-4-((4-clorofenil)sulfonil)amino)-1-(3-piridinilmetil)-2-pirrolidinil)-5-hexenoico monohidratado), furegrelato, GR 32191 (vapiprost, (ácido 1R-(1[alfa](Z), 2[beta], 3[beta], 5[alfa]))-(+)-7-(5-((1,1'-bifenil)-4-ilmetoxi)-3-hidroxi-2-(1-piperidinil)ciclopentil)-4-heptenoico), GR 83783 (ácido (+)-(1[alfa](Z), 2[beta], 5[beta])-6-((2-(hexahidro-1H-azepin-1-il)-5-((4-(4-propil-3 piridinil)fenil)metoxi)ciclopentil)oxi)-4-hexanoico), GR 85305 (ácido (5E)-6-(3-(2-((4-yodofenil)sulfonil)amino)etil)fenil)-6-(3-piridinil)-5-hexenoico), GR 108774 (ácido (5E)-6-(3-(2-((4-yodofenil)sulfonil)amino)-1,1-dimetiletil)fenil)-6-(3-piridinil)-5-hexenoico), IBI P-05006 (2-(6-carboxihexil)-3-n-hexilciclohexilamina), isbogrel (ácido (E)-7-fenil-7-(3-piridinil)-6-heptenoico), ICI 180080 (ácido 5(Z)-7-(2,2-dimetil-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-cis-5-il)heptenoico), ICI 192,605 (ácido (Z)-(2[alfa], 4[alfa] 5[alfa])-6-(2-(2-clorofenil)-4-(2-hidroxifenil)-1,3-dioxan-5-il)-4-hexenoico, KT 2962 (ácido 3-(4-(((4-clorofenil)sulfonil)amino)butil)-6-(1-metiletil)-1-azulenesulfónico, sal monosódica), KY 234 (ácido (E)-11-(2-(5,6-dimetil-1H-bencimidazol-1-il)-6,11-dihidro-dibenzo(b,e)oxepin-2-carboxílico, sal sódica), KW 3635 (E)-11-(2-(5,6-dimetil-1-bencimidazolil)etiliden)-6,11-dihidro-dibenzo(b,e)oxepin-2-carboxilato monohidratado), lintroban (éster etílico de 4-metilbencenosulfonato-N-((fenilmetoxi)carbonil)serina), L 640035 (dibenzo(b,f)tiepin-3-metanol-5,5-dióxido), L 670596 (ácido (-)-6,8-difloro-2,3,4,9-tetrahidro-9-((4-(metilsulfonil)fenil)metil)-1H-carbazol-1- acético), L 636499 (ácido (5,5-dióxido-dibenzo(b, f)tiepin-3-carboxílico), L 655240 (ácido 3-metil-1-((4-clorofenil)metil)-5-fluoro-[alfa],[alfa],-1H-indol-2 propanoico), midazogrel, ON 579 (ácido 4-((2-(((4-clorofenil)sulfonil)amino)etil)tio)-2,6-difluoro-fenoxi)acético), ONO 3708 (ácido (1S)-(1[alfa], 2[beta](Z), 3[alfa](S), 5[alfa]))-7-(3-((ciclopentil hidroxiacetil)amino)-6,6-dimetilbicyclo (3.1.1)hept-2-il)-5-heptenoico), OKY 046 (clorhidrato de ozagrel, ácido (E)-3-(4-(1H-imidazol-1-ilmetil)fenil)-2-propenoico, monoclorhidrato), OKY 1555, OKY 1580, OKY 1581, ácido (E)-2-metil-3-(4-(3-piridinilmetil)fenil)-2-propenoico, sal sódica), ácido S-145 ((+)-(5Z)-7-(3-endo-((fenilsulfonil)amino)bicyclo (2.2.1)hept-2-exo-il)heptenoico), picotamida (4-metoxi-N-N'-bis(3-piridinilmetil)-1,3-bencenodicarboxamida, monohidratado), R 68070 (ridogrel, ácido (E)-5-(((3-piridinil(3-(trifluorometil)fenil)metil)amino)oxi)pentanoico), S-1452 (domitroban, (1R)-(1[alfa]2[alfa] (Z), 3[beta], ácido 4[alfa]))-7-(3-((fenilsulfonil)amino)bicyclo (2.2.1)hept-2-il)-5-heptenoico), SKF 88046 (N7-(3-clorofenil)-N2-((7-(((3-clorofenil)amino)sulfonil)-3,4-dihidro-2(1H)-isoquinolinil)sulfonil)-3,4-dihidro-2,7(1H)-isoquinol disulfonamida), SQ 27427 (ácido ((1S)-(1[alfa], 2[alfa](Z), 3[alfa](1E, 3R), 4[alfa]))-7-(3-(3-ciclohexil-3-hidroxi-1-propenil)-7-oxabicyclo(2.2.1)hept-2-il)-5-heptenoico), SQ 28668 (ácido (1[alfa], 2[alfa](Z), 3[alfa] (1E, 3S, 4R), 4[alfa]))-7-(3-(3-hidroxi-4-fenil-1-pentil)-7-oxabicyclo(2.2.1)hept-2-il)-5-heptenoico), SQ 29548 (ácido ((1S)-(1[alfa], 2[beta] (5Z), 3[beta], 4[alfa]))-7-(3-((2-((fenilamino)-carbonil)hidrazino)metil)-7-oxabicyclo(2.2.1)hept-2-il)-5-heptenoico), SQ 30741 (ácido ((1S)-(1[alfa], 2[alfa](Z), 3[alfa], 4[alfa]))-7-(3-(((1-oxoheptil)amino)acetil)amino)metil)-7-oxabicyclo(2.2.1)hept-2-il)-5-heptenoico), SQ 33961 (ácido (1-exo, exo)-2-((3-(4-(((4-ciclohexilbutil)amino)carbonil)-2-oxazolilo)-7-oxabicyclo(2.2.1)hept-2-il)metil)bencenopropanoico), TER 930180 (ácido 4-(1-(((4-clorofenil)sulfonil)amino)metil)-4-(3-piridinil)butil)bencenopropanoico), UK 34.787, UP 11677 (mipitroban) (ácido [beta],[beta]-dimetil-6-cloro-3-((4-clorofenil)metil)-3H-imidazo(4,5-b)piridin-2-butanoico), Y 20811, YM 158 ((3-((4-terc-butiltiazol-2-il)metoxi)-5'-(3 (4-clorobencenosulfonil)propil-2'-(1-tetrazol-5-ilmetoxi)benzanilida, sal monosódica, monohidratada), Z 335 ((+)-2-(4-(cloro fenilsulfonil aminometil)indan-5-il)acetato de sodio, monohidratado), ZD 1542 (4(Z)6-(2S, 4S, 5R)-2-(1-metil-1-(2-nitro-4-tolilo)etil)-4-(3-piridil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-ácido), ZD 9583 (ácido (4Z)-6-((2S, 4S, 5R)-2-(1-(2-ciano-4-metilfenoxi)-1-metiletil)-4-(3-piridil)-1,3-dioxan-5-il)hex-4-enoico).

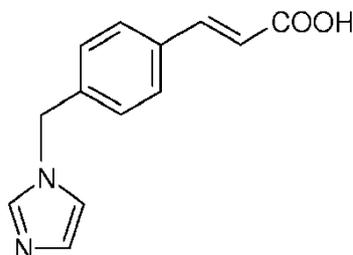
Aunque los compuestos anteriores se denominan colectivamente como "inhibidores de tromboxano", un experto en la materia reconocerá fácilmente si cualquier compuesto particular es específicamente un antagonista del receptor de tromboxano A2, un inhibidor de la tromboxano sintasa o un antagonista del receptor de acción doble del receptor de tromboxano y un inhibidor de la tromboxano sintasa.

Un antagonista del receptor de acción doble del receptor de tromboxano y un inhibidor de la tromboxano sintasa también pueden seleccionarse de entre el grupo que consiste en terbogrel, picotamida y derivados del ácido [omega]-fenil-[omega]-(3-piridil)-alquenoico sustituido con oxazolcarboxamida incluyendo compuestos como los divulgados en los documentos EP 0811621, EP 0816361 y la patente US-5.990.308. Terbogrel es un derivado de piridina de la fórmula



cuya denominación química es (5E)-6-[3-[[[cianoamino][(1,1-dimetiletil) amino]-metilen]amino]fenil]-6-(3-piridinil)-5-hexenoico y el cual se describe por ejemplo en el documento EP 547517.

5 Otro inhibidor de la tromboxano sintasa adecuado es Ozagrel el cual es un derivado de 1-alkuil-imidazol que actúa como un inhibidor selectivo de TXAS con una CI50 de 11 nM. Ozagrel tiene la fórmula siguiente:



10 Inhibidores de tromboxano adecuados también se describen en los documentos WO 01/87343, JP7179425, JP62010072, JP2004043380, US-5.468.757, US-5.550.118, US-5.604.236 y US-5.246.956.

15 Los compuestos de la invención pueden combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

20 En las composiciones farmacéuticas de la presente invención para administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, se pueden administrar en una forma unitaria de administración, como una mezcla con unos soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Formas unitarias de administración apropiadas comprenden las formas por vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones orales o soluciones, formas de administración sublinguales y bucales, aerosoles, implantes, formas de administración subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y rectal.

25 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estos pueden ser, en particular, soluciones salinas estériles isotónicas (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares, o mezclas de tales sales), o composiciones secas especialmente liofilizadas que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o de suero fisiológico, permiten la constitución de soluciones inyectables.

30 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

35 Las soluciones que comprenden compuestos de la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

45 Los compuestos de la invención se pueden formular en una composición en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio, o hidróxidos férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

50 El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse con varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante el uso en las composiciones de agentes

que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear las cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido hacerse primero isotónico con solución salina o glucosa suficiente. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación podría disolverse en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermocclisis o inyectarse en el sitio propuesto de infusión. Alguna variación en la dosificación ocurrirá necesariamente dependiendo de la condición del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual.

Los compuestos de la invención se pueden formular dentro de una mezcla terapéutica para comprender aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis más o menos. Las dosis múltiples también pueden administrarse.

Además de los compuestos de la invención formulados para la administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposómicas; cápsulas de liberación en el tiempo; y cualquier otra forma actualmente en uso.

Métodos de selección:

La divulgación proporciona también métodos para la selección de compuestos candidatos (por ejemplo, polipéptidos, polinucleótidos o moléculas pequeñas u otros fármacos) que pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la densidad mineral ósea.

Más particularmente, la divulgación proporciona métodos para la selección de compuestos que pueden ser útiles para el tratamiento de una enfermedad asociada con un aumento de la densidad mineral ósea que comprende las etapas que consisten en:

- a) proporcionar un compuesto candidato
- b) medir la capacidad de dicho compuesto candidato para mejorar la actividad de TXAS
- c) seleccionar el compuesto candidato que es capaz de mejorar la actividad de TXAS.

En otra alternativa, la divulgación proporciona métodos para la selección de compuestos que pueden ser útiles para el tratamiento de una enfermedad asociada con una disminución de la densidad mineral ósea que comprende las etapas que consisten en:

- a) proporcionar un compuesto candidato
- b) medir la capacidad de dicho compuesto candidato para inhibir la actividad de TXAS
- c) seleccionar el compuesto candidato que es capaz de inhibir la actividad de TXAS.

Los compuestos candidatos identificados de acuerdo con los métodos de la invención pueden ser probados a continuación en un modelo celular. Por ejemplo, los compuestos candidatos pueden probarse para determinar su capacidad para modular la expresión de la osteoprotegerina (OPG) y el ligando del receptor activador de NF- κ B (RANKL) en cultivos de osteoblastos primarios de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo.

Los compuestos candidatos de la presente invención pueden obtenerse usando cualquiera de los numerosos enfoques en los métodos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, incluyendo: bibliotecas biológicas; bibliotecas en fase de solución o en fase sólida paralelas espacialmente direccionables; métodos de bibliotecas

sintéticas que requieren desconvolución; el método de biblioteca “una perla-un compuesto” y métodos de bibliotecas sintéticas que usan la selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de biblioteca biológica se limita a bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a péptidos, oligómeros no peptídicos o bibliotecas de moléculas pequeñas de compuestos.

5

La invención se ilustrará adicionalmente en vista de las siguientes figuras y ejemplos.

Descripción de las figuras

10 **Figura 1:** Pedigrí de las familias y radiografías del esqueleto de los individuos afectados: (a) los individuos afectados de las cuatro familias de este estudio están en negrita (b). El aumento de la densidad ósea en la GHDD se caracteriza por afectación diafisaria, modelado óseo largo anormal e hiperostosis cortical.

15 **Figura 2: TXAS/TXA2 modula la vía de RANKL:** (a) Cascada del ácido araquidónico (AA). El AA se moviliza en tres etapas: a) movilización del AA activada hormonalmente o por estrés a partir del ácido graso ω -6 de la bicapa lipídica de las células por las fosfolipasas (A2 y C); b) conversión de AA en la prostaglandina (PG) H2 por las ciclooxigenasas (COX) 1 y 2; c) isomerización de PGH2 en el lumen del RE a productos finales biológicamente activos denominados prostanoides (es decir PGI2, PGD2, PGE2, PGF2 α y TXA2) por sintasas individuales. TXA3, un ácido eicosapentanoico con actividades antiinflamatorias y antitrombóticas, se produce por la
20 movilización de los ácidos grasos ω -3 de la bicapa lipídica. (b) Estudios de expresión de RANKL y OPG estudios. Los estudios de PCR cuantitativa en tiempo real en osteoblastos mostraron una disminución de RANKL y un aumento de los niveles del ARNm de OPG después de la inhibición de TXAS por Ozagrel. Por el contrario, CTA2, un análogo de TXA2, condujo a un aumento de RANKL y a una disminución de los niveles de ARNm de OPG. (c) Vista esquemática de la acción hipotética de TXA2 en la inducción de la diferenciación/activación de
25 osteoclastos. TXA2 aumenta RANKL y disminuye la expresión de OPG en el hueso, al menos, de una manera autocrina.

30 **Figura 3:** Representación esquemática de la tromboxano sintasa (TXAS) humana. (a) La ubicación de las mutaciones detectadas en las familias con GHDD se indica en rojo y verde. (b) Representación tridimensional con el Swiss-Pdb Viewer de TXAS. Los cuatro restos mutados se encontraban en uno de las siete hojas β (aminoácido 83, en verde), en las proximidades del grupo hemo y de la bolsa enzimática (aminoácidos 413 y 482, en rojo), y en una hélice α (amino ácido 488, en verde). (c) Representación con el Swiss-Pdb Viewer de los volúmenes de van der Waals del aminoácido de la posición 482. La glicina (izquierda) está cambiada por un triptófano en familia 3 (derecha). Obsérvese la modificación del impedimento estérico en la proximidad del sitio catalítico (hemo en azul).
35

Figura 4: Perfil de expresión de TBXAS1: RT-PCR en osteoblastos (OB), osteoclastos (OC), condrocitos, músculo humanos, línea celular linfoblastoide y fibroblastos de piel humanos. ψ = escalera de ADN.

40 **Figura 5:** Los estudios de plaquetas: (a) Perfil de agregación plaquetaria en control (izquierda) y un paciente (derecha). Los colores corresponden a los diferentes estímulos. Un perfil de agregación alterada se observó con la concentración intermedia de ácido araquidónico (AA, verde), mientras que, el uso de U46619, un antagonista del receptor de tromboxano, dio lugar a la agregación de plaquetas normal (azul claro). (b) Estudios de exocitosis de plaquetas bajo diversos estímulos. La expresión de la P-selectina inducida por AA se redujo drásticamente ($p < 0,005$), mientras que la expresión de la P-selectina inducida por TRAP, ADP y U46619 fueron idénticas a las de los controles.
45

Tablas:

50

Tabla 1: Hallazgos clínicos, biológicos y radiológicos en cuatro familias con GHDD.

Paciente	Familia 1		Familia 2		Familia 3		Familia 4	
	II1	II2	II1	II3	II2	II6	II1	II5
Origen geográfico		Argelia	Túnez	Túnez	Túnez		Pakistán	
Consanguinidad		1/16	?		1/32		1/16	
Edad de diagnóstico	34 años	24 años	25 meses	18 meses	16 años	2 años	13 años	5 meses
Sexo	M	M	M	M	F	M	F	F
"Asintomático"	-	+	-	-	+	-	+	-
Terapia con corticosteroides	+	-	-	+	-	+	-	+
Anemia	+	+	++	++	-	+	-	+
Trombocitopenia	+	+	+	+	-	+	-	+
Episodios de trombocitosis	-	-	-	-	-	-	-	+
Leucopenia	-	-	-	-	-	-	-	+
Inflamación biológica	+	-	-	-	-	+	-	+
Displasia diafisaria	+	+	+	+	+	+	+	+
Mutación	c.1463T>C, p.Leu488Pro		c.248T>C, p.Leu83Pro		c.1444G>T, p.Gly482Trp		c.1238G>A, p.Arg413Glu	
* Remisión espontánea								

Tabla 2: Niveles de TXB₂ y PGE₂ en plasma rico en plaquetas de pacientes con GHDD en comparación con el control

Niveles de TXB ₂ (ng/ml)	Antes de la inducción con AA	AA 0,25 mg/ml	AA 0,5 mg/ml
Paciente II1 (Familia 1)	1,9	4,2	5,8
Paciente II2 (Familia 1)	2,27	3,5	4,3
Control	325	450	870
Niveles de PGE ₂ (ng/ml)	Antes de la inducción con AA	AA 0,25 mg/ml	AA 0,5 mg/ml
Paciente II1 (Familia 1)	182,5	342	620
Paciente II2 (Familia 1)	50	580	625
Control	9,8	30,5	52,5
AA: ácido araquidónico			

5 Ejemplos

Ejemplo 1

Material y Métodos:

10 **Individuos afectados:** Se estudiaron 10 individuos afectados pertenecientes a 4 familias consanguíneas. Los criterios de diagnóstico para la inclusión fueron: i) anemia grave que requiere infusiones de sangre y ii) cambios esqueléticos como displasia diafisaria con aumento de la densidad ósea, modelado de hueso largo anormal, hiperostosis cortical y metáfisis y epífisis normales. Las muestras de ADN se obtuvieron después de firmar el consentimiento informado.

15 **Detección de mutaciones:** Se diseñó una serie de 17 cebadores intrónicos para amplificar los 4 exones no codificantes y los 13 exones codificantes del gen TBXAS1. Los productos de amplificación se purificaron y se secuenciaron utilizando el método didesoxi-terminador fluorescente en un secuenciador automático (ABI 3100)

20 **RT-PCR:** Los ARN totales se extrajeron a partir de músculo humano, células de cultivo primario (osteoblastos, condrocitos y fibroblastos) y de la transdiferenciación de células sanguíneas de cordón en osteoclastos utilizando el RNeasy Mini Kit (Qiagen). El ADNc se sintetizó cebando hexámeros al azar en presencia de transcriptasa inversa MuLV utilizando el protocolo del fabricante (GeneAmp RNA PCR Core Kit, Roche). Se llevaron a cabo un total de 30 ciclos de PCR a una temperatura de hibridación de 60 °C para amplificar un fragmento de 772 pb específico de TBXAS1 incluyendo el exón 12 conocido por ser un fragmento de corte y empalme (secuencias de cebadores disponibles a petición).

30 **Estructura tridimensional:** La estructura tridimensional de la tromboxano sintasa humana (isoforma TXS-I) fue modelada por métodos de modelado comparativos y minimización de energía usando el programa Swiss-Model en el modo optimizado (Schwede, T et al., 2003). El grado de identidad entre TXAS y cinco moldes (41,31 %, 40,01 %, 37,52 %, 27,72 % y 33,24 % para 1W0F, 1TQN, 2j0C, 1OG5 y 1BVY respectivamente) nos permitió modelar la estructura de TXAS humano usando las coordenadas de rayos X de estos moldes. Los conjuntos de coordenadas de 2,65 Å (código PDB 1W0F), 2,05 Å (1TQN), 2,80 Å (2j0C), 2,55 Å (1OG5) y 2,03 Å (1BVY) se utilizaron como moldes para el modelo estructural. El plegamiento global era bastante similar al establecido estructuralmente para las proteínas P450, a excepción de dos regiones (aminoácidos 260-277 y 295-330) debido a una falta de información estructural. Los restos 32-534 de la secuencia presentada se utilizaron para construir el modelo. Se utilizó el Swiss-Pdb Viewer 3.7 para visualizar las estructuras y analizar la visión estructural en las mutaciones TXAS.

40 **Niveles de tromboxano y prostaglandina E₂:** Los niveles de novo de TXB₂ y la producción de PGE₂ en plasma rico en plaquetas antes y después de la inducción de AA se determinó directamente en pacientes II1 y II2 de la familia 1 mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) (Cayman ref química 519031.1 y 514010.1, Ann Arbor, MI) y se comparó con el control emparejado en cuanto a sexo y edad. Los datos ELISA fueron analizados utilizando el software Revelation V4.22 (tecnología Dynec).

45 **Pruebas de agregación plaquetaria:** Se realizaron estudios de agregación en las 2 horas siguientes a la extracción de sangre, a 37 °C, mediante el uso de un método fotométrico en un agregómetro de 4 canales (Regulest, Amneville, Francia) (Dupont, A. et al., 2003). Brevemente, se incubó una alícuota de 280 µl de plasma rico en plaquetas durante 3 minutos a 37 °C y luego se agitó a 1100 rpm durante 2 minutos antes de añadir 20 µl de solución salina o después de los agonistas: ácido araquidónico 1,5, 0,75 y 0,375 mmol/l (Helena), ADP 2, 5 y 10 µmol/l (Sigma Aldrich), U46619 1,5 µmol/l (Calbiochem) y colágeno 1 µg/ml (Horm). Las plaquetas se agregan cuando se añade el agonista, lo que conduce a un aumento en la transmisión de la luz, que se registra durante 5 min. La agregación se expresa como el porcentaje de cambio máximo en la transmisión de luz respecto al basal, utilizando plasma pobre en plaquetas como referencia (arbitrariamente 100 %).

55

Análisis de glicoproteínas de plaquetas y activación de plaquetas mediante citometría de flujo: La expresión en superficie de glicoproteínas plaquetarias GPIb (CD42b), GPIIIa (CD61) y P-selectina (CD62P) antes y después de la activación se realizó en plasma rico en plaquetas por citometría de flujo usando un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson) y usando receptores GP plaquetarios (Biocytex) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Hezard, N. et al., 2003). La activación se consiguió usando TRAP (50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, NeoMPS), ácido araquidónico (0,5 mg/ml, Sigma), U46619 (5 μ M, VWR Calbiochem). Los resultados se expresan en porcentaje de la intensidad de fluorescencia media (MFI) en la superficie de las plaquetas de los pacientes en comparación con la MFI en la superficie de un control estudiado en las mismas condiciones. El cambio en la expresión de la P-selectina inducida por los agonistas se expresa en MFI.

Cultivo de osteoblastos y PCR cuantitativa en tiempo real: Se obtuvieron muestras de la sutura craneal humana normal después de firmado el consentimiento informado durante la cirugía de rutina de craneosinostosis. Los osteoblastos se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (con 10 % de suero bovino fetal) como se describe en otro lugar (De Pollack, C. et al., 1996). Se añadió Ozagrel (Cayman Chemical) diariamente a 0,25 μ M (IC50 de 11 nM) en medio de cultivo durante 3 días y se añadió CTA2 (Cayman Chemical) en el día uno en medio de cultivo a dos concentraciones (5 μ M y 15 μ M). Las células se recogieron en el día 3. Se realizó la PCR cuantitativa en tiempo real usando la tecnología Light Cycler (Roche Mannheim) para el ARNm de OPG y RANKL en cada muestra. Los experimentos se llevaron a cabo cinco veces. En cada experimento, las muestras se realizaron por triplicado. Las cantidades de ARNm de OPG y RANKL se normalizaron a la cantidad de ARNm de β -actina. Se utilizó la prueba de Student para la determinación de los valores de p.

Resultados:

El GHDD (OMIM 231095) es un trastorno autosómico recesivo poco frecuente, caracterizada por un trastorno de aumento de la densidad ósea (IBD) con afectación diafisaria predominante y anemia corticosensible arregenerativa (Ghosal et al., 1988). Estudiando dos familias consanguíneas con GHDD de Argelia y Túnez, hemos cartografiado recientemente el gen de la enfermedad en el cromosoma 7q33-q34 (Isidor B. et al., 2007). Aquí, atribuimos la GHDD a mutaciones en el gen de la tromboxano sintasa (TBXAS1) en estas familias y en dos familias adicionales de origen de Túnez y Pakistán (Figura 1).

El trastorno por IBD es causado por un desequilibrio entre la resorción ósea y la formación ósea. Entre los 36 genes de nuestra región de 3,84 Mb, consideramos por primera vez 25 genes por su función y se excluyeron por secuenciación directa. Aunque se piensa que TBXAS1 es responsable de un trastorno de la coagulación leve en humanos (Mestel F. et al 1980; Weiss HJ et al 2002), este gen considerado como un gen candidato debido a su posible implicación en el reclutamiento de osteoclastos (Gruber R. et al., 2002). TBXAS1 (17 exones, 4 no codificantes y 13 exones de codificación) codifica una tromboxano sintasa (TXAS) transmembrana de 60 kDa, considerada como un miembro atípico de la superfamilia del citocromo p450 ya que carece de actividad de monooxigenasa. TXAS es una de las enzimas terminales de la cascada del ácido araquidónico (AA) y convierte las prostaglandinas (PG) H2 en tromboxano A2 (TXA2) en el lumen del retículo endoplásmico. TXA2 pertenece al grupo de los eicosanoides producidos por casi todas las células y que participan en la inflamación, vasoconstricción/vasodilatación, coagulación, dolor y fiebre (Shen RF. et al., 1998). Los eicosanoides son producidos por la conversión de AA (de los ácidos grasos ω -6 de la bicapa lipídica) por ciclooxigenasas (COX 1-2) y la isomerización en productos finales biológicamente activos por sintasas individuales (Shen RF. et al., 1998) (Figura 2a). TXA2 es un potente inductor de la agregación plaquetaria y un constrictor del músculo liso vascular/respiratorio.

La secuenciación directa del gen TBXAS1 detectó mutaciones de sentido erróneo homocigotas distintas en las cuatro familias con GHDD (c.1463T>C, c.248T>C, c.1444G>T and c.1238G>A, Figura 1, Figura 3 y Tabla 1). Las mutaciones implicaron aminoácidos conservados entre las especies y 3/4 estaban localizadas cerca de los restos implicados en el dominio de unión a hemo. Estas se cosegregaron con la enfermedad y no se identificaron en 210 cromosomas de control. El análisis RT-PCR detectó transcripciones de TBXAS1 en osteoblastos (OB), osteoclastos (OC), condrocitos, músculo, líneas celulares linfoblastoides humanos y en menor medida en fibroblastos de piel (Figura 4).

Debido a que TXAS es una proteína de la membrana intrínseca, se requiere un tratamiento con detergente para la purificación y su análisis estructural es difícil de lograr. Por lo tanto, las consecuencias funcionales de las mutaciones fueron investigados mediante modelado de la estructura tridimensional a través de la alineación de la secuencia de TXAS con otros miembros de la familia P450. El modelo obtenido se muestra como una representación mediante Swiss-PDB Viewer (Figura 3a). Los cuatro restos mutados se encuentran en una de las siete hojas β (aminoácido 83), en las proximidades del grupo hemo, en la bolsa enzimática (aminoácidos 413 y 482) y en una hélice α (aminoácido 488).

Debido a que TXA2 juega un papel clave en la agregación plaquetaria ((Shen RF. et al., 1998), se investigó la hemostasia primaria en nuestros pacientes. No se han descrito casos de hemorragia espontánea o excesiva después de la cirugía y la hemostasia primaria en pacientes II2, II3 y II6 (Familias 1, 2 y 3 respectivamente) fue normal (prueba Ivy) (Tabla 1). El paciente II2 de la familia 1 era elegible para el análisis de la agregación plaquetaria, ya que no estaba recibiendo ningún medicamento que pudiera interferir con las pruebas de agregación. Se observó

un perfil de agregación alterado usando concentraciones intermedias de AA (4 %), mientras que los controles emparejados por sexo y edad mostraron valores respectivos de 80 y 90 % (Figura 5a). La agregación inducida por cualquiera de las concentraciones de AA bajas o altas y otros agonistas dio resultados similares en el paciente I12 y en los controles. En particular, la agregación inducida por U46619, un agonista específico del receptor de TXA2 fue normal en el paciente I12 (familia 1). También estudiamos la exocitosis plaquetaria con diferentes estímulos. La expresión de las plaquetas GPIb, GPIIIa y P-selectina antes de la activación estaban dentro de los intervalos normales en cinco pacientes con GHDD (75 - 156 %, datos no mostrados). Por último, se estudió la expresión de la P-selectina antes y después de varios estímulos en tres pacientes con GHDD. La expresión de la P-selectina inducida por AA se redujo drásticamente ($p < 0,005$), mientras que la expresión de la P-selectina inducida por TRAP, ADP y U46619 fue idéntica a la de los controles (Figura 5b).

El ensayo ELISA de TXB2 y PGE2 en plasma rico en plaquetas (PRP) reveló bajos niveles de TXB2 en pacientes antes de la inducción con AA y ninguna variación significativa de los niveles de TXA2 después de la inducción con AA en comparación con el control (100 y 200 veces menos respectivamente). Por el contrario, los niveles de PGE2 en PRP antes de la inducción con AA fueron mayores en pacientes en comparación con el control con una amplia gama de variabilidad (5-18 veces más que el control). Curiosamente, la respuesta a la inducción con AA fue más intensa en PRP de pacientes con GHDD que en el control (Tabla 2).

Con el fin de dilucidar el mecanismo de la IBD en la GHDD, se investigó el papel de TXAS y TXA2 en la expresión de RANKL, el ligando del receptor activador de NF- κ B y la osteoprotegerina (OPG) en osteoblastos (OB) cultivados primarios derivados de suturas humanas normales. La adición de Ozagrel, un inhibidor específico de TXAS, a los medios de cultivo disminuyó drásticamente la expresión de RANKL, pero aumentó la expresión de OPG, en comparación con los valores de control (-78 %, $p < 0,005$ y + 50 %, $p < 0,005$, respectivamente). La adición de CTA2, un análogo estable de TXA2, tenía un efecto opuesto con un aumento de RANKL (+ 94 %, $p < 0,005$ y + 471 %, $p < 0,03$ a 5 μ M y 15 μ M respectivamente) y una disminución de la expresión de OPG (-40 %, $p < 0,005$ y -53 %, $p < 0,005$ a 5 μ M y 15 μ M respectivamente) (Figura 2b).

A continuación, se presenta la identificación de mutaciones TBXAS1 en un trastorno humano que combina anomalías óseas y hematológicas. Las cuatro mutaciones de sentido erróneo afectaban a aminoácidos que son cruciales para la actividad enzimática. Se ha demostrado que un cambio de la arginina en la posición 413 (p.Arg413Lys), que también afectaba a la familia 3 (p.Arg413Glu), era responsable de una disminución de la actividad TXAS (1 %) con una disminución del contenido de hemo de la enzima (30 %) (Hsu PY. et al., 2000). La mutación p.Gln482Trp (familia 4) cambiaba un aminoácido alifático con un bajo impedimento estérico por un ácido aromático con alto impedimento estérico en la proximidad del sitio catalítico. Dicha modificación del impedimento estérico puede modificar la interacción del complejo enzima/sustrato (es decir TXAS y PGH2) (Figura 3b). Por último, los cambios de leucina por prolina cambios en las posiciones 83 (hoja β) y 488 (hélice α) puede introducir una espiral en la estructura cuaternaria de TXAS.

Aunque los pacientes con GHDD no tienen problemas de hemorragia, los estudios in vitro revelaron una falta de agregación plaquetaria después de la inducción con AA presumiblemente debido a una disminución de la actividad de la enzima TXAS y a un defecto en la producción de TXA2, confirmando que TXA2 es un factor clave de la agregación plaquetaria. Sin embargo, la ausencia de trastorno hemorrágico en nuestros pacientes sugiere un mecanismo redundante para la agregación plaquetaria. De modo similar, la invalidación de TBXAS1 en el ratón no conduce a un trastorno hemorrágico espontáneo, una característica adscrita a la agregación plaquetaria independiente de TXA2 inducida por la trombina y el colágeno (Yu IS. et al., 2004).

Aunque se observan altos niveles de TXA2 en la hipertensión arterial (Shen RF. et al., 1998), la presión sanguínea de los pacientes de este estudio era normal (Tabla 1).

La anemia corticosensible arregenerativa y la inflamación son otras características observadas en los pacientes con GHDD. Estas características podrían estar relacionadas con los niveles elevados de PGE2. De hecho, PGE2 se ha implicado en diversas funciones celulares incluyendo la inflamación (Davies P. et al., 1984) y en estudios in vitro se ha demostrado su capacidad para suprimir el crecimiento de células progenitoras eritroides tardías (Taniguchi S. et al., 1989). Sin embargo, la anemia y la inflamación no se observan sistemáticamente en todos los pacientes y son bastante variables en gravedad. Esta variabilidad podría estar relacionada con la producción interindividual variable de PGE2.

Debido a que la IBD es una característica importante en la GHDD, se puede plantear la hipótesis de que TXAS/TXA2 también juega un papel clave en una función hasta ahora desconocida, concretamente la remodelación ósea. Los eicosanoides tienen importantes papeles fisiológicos/patológicos en el metabolismo esquelético (Pilbeam CC. et al., 2002). Entre ellos, se sabe que la PGE2 estimula la resorción ósea y en particular mejora la masa ósea cortical, lo que sugiere un mecanismo complejo de remodelación ósea inducida por PGE2 dependiente de los receptores EP2 y EP4 (Raisz LG. et al., 2003). Además, la infusión de PGE2 a largo plazo en humanos es responsable de una hiperostosis dependiente de la dosis (Jorgensen HR. et al., 1988).

Un análogo estable de TXA2 (CTA2) también está involucrado en el reclutamiento y la maduración de los osteoclastos en cultivos de médula ósea a través de la vía de RANKL osteoblástica (Gruber R. et al., 2002). Nuestros datos muestran que i) CTA2 aumentaba los niveles de RANKL y disminuía los niveles de OPG de una manera dosis-respuesta, y ii) la inhibición de TXAS por Ozagrel produjo el efecto opuesto (Figura 2b). El hallazgo de una relación directa entre la expresión de RANKL/OPG y la actividad TXAS respalda la idea de que TXA2 controla la inducción de la diferenciación/activación de osteoclastos de una manera autocrina en los osteoblastos (Figura 2c). Además del efecto de TXAS/TXA2 en la remodelación ósea, la producción variable interindividual de PGE2 puede también tener en cuenta la variabilidad de las manifestaciones óseas en la GHDD.

La mayoría de los genes que causan IBD están involucrados en la función/diferenciación de los osteoclastos y osteoblastos. Curiosamente, varios de estos genes son considerados como genes candidatos en la variación de la densidad mineral ósea (Ralston SH. et al., 2006). Además, el estrógeno y la progesterona reducen la expresión del receptor de tromboxano, mientras que se cree que una cantidad excesiva de ácido graso omega-6 en la alimentación conduce a la osteoporosis (Watkins BA. et al., 2001). Por lo tanto, la tromboxano sintasa desempeña un papel en la patogénesis de la variación de la densidad mineral ósea y la osteoporosis. En conclusión, la identificación de mutaciones en TBXAS1 en la GHDD demuestra una función hasta ahora desconocida de TXAS/TXA2 en la remodelación ósea, con un gran impacto en la variación de la masa ósea máxima.

Ejemplo 2

En este ejemplo se prueban varios inhibidores de tromboxano para determinar su capacidad para tratar enfermedades asociadas con una disminución de la densidad mineral ósea, en varios modelos y en pacientes humanos.

Inhibidores de tromboxano

- Ozagrel es un inhibidor de la tromboxano sintasa (Cayman Chemical). Se administra por vía oral a adultos en una dosis de 800 mg/día.
- Picotamida es un antagonista de acción doble del receptor de tromboxano e inhibidor de la tromboxano sintasa (Plactidil®, de Novartis). Se administra por vía oral a adultos, dos veces al día, en una dosis de 600 mg.
- Seratrodast es un antagonista del receptor de tromboxano (Takeda, Abott). Se administra por vía oral a adultos en una dosis de 80 mg/día.

Enfermedades asociadas con una disminución de la densidad mineral ósea

1) Modelo *in vitro*

Los cultivos primarios de osteoblastos humanos se cultivan en presencia o ausencia de los inhibidores de tromboxano.

Se miden las siguientes variables:

- los niveles de TCB2 se ensayan por ELISA;
- los niveles de RANKL/OPG se ensayan mediante PCR cuantitativa;
- niveles de PAL;
- crecimiento celular de los osteoblastos.

2) Modelo animal: ratas ovariectomizadas

Este modelo animal se utiliza frecuentemente para modelizar la causa más frecuente de la osteoporosis en mujeres, la osteoporosis post-menopausia.

Ratas hembras, con edades entre un mínimo de 6 meses (6 por grupo), se ovariectomizan y se someten a diferentes tratamientos: grupo no tratado, grupo de control tratado con raloxifeno (Evista®) y bisfosfonatos, un tratamiento de referencia para la osteoporosis, grupo tratado con ozagrel, grupo tratado con picotamida, grupo tratado con seratrodast. Estas se comparan con un grupo de ratas no ovariectomizadas para las siguientes variables:

- Densitometría ósea (BD)
 - o densitometría ósea medida mediante tomografía computarizada cuantitativa (QCT). Esta prueba mide la BD volumétrica (expresada en gramos de hidroxapatita por cm³) y la geometría del hueso (diámetro, espesor cortical, superficie de la sección cortical trabecular);
 - o densitometría de tipo DXA (absorciometría dual de rayos X). Esta prueba mide la BD superficial (expresada en g por cm²).

- Histología trabecular.
- Proliferación de osteoblastos (en cultivos primarios).
- Función de los osteoblastos (en cultivos primarios).
- Incorporación de calcio (en cultivos primarios).

5

3) Estudio clínico

Una cohorte de pacientes del Centro de referencia de enfermedades óseas ("Centre de Reference Maladie Osseuse") de Cochin/Lariboisière, París, Francia se asigna al azar a grupos de tratamiento (placebo, tratamiento de referencia Evista® y bifosfonatos, ozagrel, picotamida o seratrodist).

10

La eficacia del tratamiento se evalúa por densitometría de tipo DXA.

En conjunto, estos estudios demuestran que los inhibidores de la tromboxano sintasa pueden utilizarse con éxito para el tratamiento de una enfermedad asociada con una disminución de la densidad ósea.

15

REFERENCIAS:

A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

20

Antonarakis et al., Diagnosis of genetic disorders at the DNA level, *N. Engl. J. Med.* 1989, 320:153-163

Arden NK, Spector TD. Genetic influences on muscle strength, lean body mass, and bone mineral density: a twin study. *J Bone Miner Res.* 1997 Dec;12(12):2076-81.

25

Barbas CF, Bain JD, Hoekstra DM, Lerner RA. (1992), Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. *PNAS USA*, 89, 4457-4461.

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science.* 2002 Apr 19;296(5567):550-3.

30

Colas P, Cohen B, Jessen T, Grishina I, McCoy J, Brent R. (1996) Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, 380, 548-50.

Cooper et al. (1991) Diagnosis of genetic disease using recombinant DNA, 3rd edition, *Hum. Genet*, 87:519-560

35

Davies P, Bailey PJ, Goldenberg MM, Ford-Hutchinson AW. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. *Annu Rev Immunol.* 1984;2:335-57.

De Pollack, C. Renier, D. Hott, M. & Marie, P.J. Increased bone formation and osteoblastic cell phenotype in premature cranial suture ossification (craniosynostosis). *J. Bone. Miner. Res.* 11:401-407 (1996).

40

Dupont, A. et al. An intronic polymorphism in the PAR-1 gene is associated with platelet receptor density and the response to SFLLRN. *Blood.* 101, 1833-1840 (2003).

45

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001 May 24;411 (6836):494-8.

Ghosal SP, Mukherjee AK, Mukherjee D, Ghosh AK. Diaphyseal dysplasia associated with anemia. *J Pediatr.* 1988 Jul;113(1 Pt 1):49-57.

50

Grompe M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids (1993) *Nat. Genet.* 5(2):111-7

Gruber R, Karreth F, Fischer MB, Watzek G. Platelet-released supernatants stimulate formation of osteoclast-like cells through a prostaglandin/RANKL-dependent mechanism. *Bone.* 2002 May;30(5):726-32.

55

Guéguen R, Jouanny P, Guillemin F, Kuntz C, Pourel J, Siest G. Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families. *J Bone Miner Res.* 1995 Dec;10(12):2017-22.

Hannon GJ. RNA interference. *Nature.* 2002 Jul 11;418(6894):244-51.

60

Harlow E. et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (1988).

Hezard, N. et al. Unexpected persistence of platelet hyporeactivity beyond the neonatal period: a flow cytometric study in neonates, infants and older children. *Thromb Haemost.* 90, 116-123 (2003).

65

- Hsu PY, Tsai AL, Wang LH. Identification of thromboxane synthase amino acid residues involved in heme-propionate binding. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Nov 1;383(1):119-27.
- 5 Isidor B, Dagoneau N, Huber C, Genevieve D, Bader-Meunier B, Blanche S, Picard C, De Vernejoul MC, Munnich A, Le Merrer M, Cormier-Daire V. A gene responsible for Ghosal hemato-diaphyseal dysplasia maps to chromosome 7q33-34. *Hum Genet*. 2007 Apr;121 (2):269-73. Epub 2007 Jan 3.
- Jayasena S.D. (1999) Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem*. 45(9):1628-50.
- 10 Jørgensen HR, Svanholm H, Host A. Bone formation induced in an infant by systemic prostaglandin-E2 administration. *Acta Orthop Scand*. 1988 Aug;59(4):464-6.
- Kelly PJ, Sambrook PN, Morrison NA, Nguyen T, Eisman JA. Genetics of osteoporosis. *World Rev Nutr Diet*. 1997;80:126-44.
- 15 Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Shiraki M, Orimo H. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res*. 1996 Mar;11 (3):306-11.
- 20 Kohler and Milstein (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*;256, 495-7.
- Kuklin et al. Detection of single-nucleotide polymorphisms with the WAVE DNA fragment analysis system *Genet. Test* (1997-98), 1 (3):201-6
- 25 McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet*. 2002 Oct;3(10):737-47.
- Mestel F, Oetliker O, Beck E, Felix R, Imbach P, Wagner HP. Severe bleeding associated with defective thromboxane synthetase. *Lancet*. 1980 Jan 19;1 (8160):157.
- 30 Pilbeam, C.C. Harrison, J.R. & Raisz L.G. Chapter 54, Principle of Bone Biology. 2nd edition. Academic Press. 2002.
- 35 Raisz LG, Woodiel FN. Effects of selective prostaglandin EP2 and EP4 receptor agonists on bone resorption and formation in fetal rat organ cultures. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2003 Jul;71(3-4):287-92.
- Ralston SH, de Crombrughe B. Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes Dev*. 2006 Sep 15;20(18):2492-506.
- 40 Rubin LA, Hawker GA, Peltekova VD, Fielding LJ, Ridout R, Cole DE. Determinants of peak bone mass: clinical and genetic analyses in a young female Canadian cohort. *J Bone Miner Res*. 1999 Apr;14(4):633-43.
- Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- 45 Schwede, T. Kopp, J. Guex, N. Peitsch, M.C. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 31, 3381-3385 (2003).
- 50 Shen RF, Tai HH. Thromboxanes: synthase and receptors. *J Biomed Sci*. 1998;5(3):153-72.
- Taniguchi S, Shibuya T, Harada M, Niho Y. Prostaglandin-mediated suppression of in vitro growth of erythroid progenitor cells. *Kidney Int*. 1989 Oct;36(4):712-8.
- 55 Tuerk C. and Gold L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 3;249(4968):505-10.
- Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev*. 1999 Dec 15;13(24):3191-7.
- 60 Waterhouse P, Griffiths AD, Johnson KS, Winter G. (1993) Combinatorial infection and in vivo recombination: a strategy for making large phage antibody repertoires. *Nucleic Acids Research*, 21, 2265-2266.
- 65 Watkins BA, Lippman HE, Le Bouteiller L, Li Y, Seifert MF. Bioactive fatty acids: role in bone biology and bone cell function. *Prog Lipid Res*. 2001 Jan-Mar;40(1-2):125-48.

Weiss HJ, Lages BA. Possible congenital defect in platelet thromboxane synthetase. Lancet. 1977 Apr 2;1(8014):760-1.

5 Yu IS, Lin SR, Huang CC, Tseng HY, Huang PH, Shi GY, Wu HL, Tang CL, Chu PH, Wang LH, Wu KK, Lin SW. TXAS-deleted mice exhibit normal thrombopoiesis, defective hemostasis, and resistance to arachidonate-induced death. Blood. 2004 Jul 1;104(1):135-42. Epub 2004 Mar 9.

LISTADO DE SECUENCIAS:

10 <110> INSERM
<120> Métodos para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades relacionadas con la densidad mineral ósea
<130> BIO07572 MUNNICH
15 <160> 2
<170> PatentIn versión 3.3
20 <210> 1
<211> 1605
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
25 <400> 1

ES 2 655 209 T3

atgatggaag ccttgggggtt tctaaaattg gaagtgaatg gccccatggt gacggtggcc 60
ctgtcagtgg ctctcttggc cctcctgaaa tggactcca catcagcatt ctcaagactg 120
gagaagttag gcctcagaca tcccaagcct tctcctttca ttggaaactt gacatttttc 180
cgccaggggtt tttgggaaag ccaaatggag ctcaaaaagc tgtatggacc tctgtgtggg 240
tactatcttg gtcgtcggat gtttattggt atttctgagc cagacatgat caagcaggtg 300
ttggttgaga acttcagtaa ctttaccaac agaatggcgt cgggtttgga gttcaagtcg 360
gtagccgaca gcgttctggt ttacgtgac aaaagatggg aagaggtcag aggtgccctg 420
atgtctgctt tcagtcctga aaagctgaac gagatggttc ccctcatcag ccaagcctgc 480
gaccttctcc tggctcattt aaaacgctat gcggaatctg gggacgcatt tgacatccag 540
aggtgctact gcaattacac cacagatgtg gttgccagcg tcgcctttgg caccgccgtg 600
gactcctggc aggccctga ggatcccctt gtgaaacact gcaagcgttt cttcgaattc 660
tgcaccccca gacctatcct ggttttactc ttatcatttc catccataat ggtcccactg 720
gcccggattt tgccaataa gaaccgagac gaactgaatg gcttttttaa caaactcatt 780
aggaatgtga ttgccttgcg ggaccagcaa gctgccgaag agaggcggag agacttcctc 840
caaatggctc tggatgcccg acattctgca agtcccattg gcgtgcaaga ctttgacatc 900
gtcagagacg ttttctcctc tactgggtgc aagccgaacc cttcccggca acaccagccc 960
agccctatgg ccaggcctt gactgtggat gagattgtgg gccaggcctt catcttctc 1020
atcgtggct atgaaatcat caccaacaca ctttcttttg ccacctacct actggccacc 1080
aaccctgact gccaagagaa gcttctgaga gaggtagacg tttttaagga gaaacacatg 1140
gcccctgagt tctgcagcct cgaggaaggc ctgccctatc tggacatggt gattgcagag 1200
acgctgagga tgtaccgcc agctttcaga ttcacacggg aggcagctca ggactgcgag 1260
gtgctggggc agcgcacccc cgcaggcgt gtgctagaga tggcctggg tgccctgcac 1320
catgaccctg agcactggcc aagcccggag accttcaacc ctgaaaggtt cacggctgag 1380
gcccggcagc agcaccggcc cttcacgtac ctgcccttcg gggccggccc acggagctgc 1440
ctcgggggtc gtctagggct gcttgaggtc aagttgacac tgctccacgt gctgcacaag 1500
ttccggttcc aagcctgccc tgagaccag gtaccgctgc agctagaatc caaatctgcc 1560
ctaggtccaa aaaatggtgt ctatatcaag atcgtatccc gctga 1605

5 <210> 2
<211> 534
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 2

ES 2 655 209 T3

Met Met Glu Ala Leu Gly Phe Leu Lys Leu Glu Val Asn Gly Pro Met
 1 5 10 15

Val Thr Val Ala Leu Ser Val Ala Leu Leu Ala Leu Leu Lys Trp Tyr
 20 25 30

Ser Thr Ser Ala Phe Ser Arg Leu Glu Lys Leu Gly Leu Arg His Pro
 35 40 45

Lys Pro Ser Pro Phe Ile Gly Asn Leu Thr Phe Phe Arg Gln Gly Phe
 50 55 60

Trp Glu Ser Gln Met Glu Leu Arg Lys Leu Tyr Gly Pro Leu Cys Gly
 65 70 75 80

Tyr Tyr Leu Gly Arg Arg Met Phe Ile Val Ile Ser Glu Pro Asp Met
 85 90 95

Ile Lys Gln Val Leu Val Glu Asn Phe Ser Asn Phe Thr Asn Arg Met
 100 105 110

Ala Ser Gly Leu Glu Phe Lys Ser Val Ala Asp Ser Val Leu Phe Leu
 115 120 125

Arg Asp Lys Arg Trp Glu Glu Val Arg Gly Ala Leu Met Ser Ala Phe
 130 135 140

Ser Pro Glu Lys Leu Asn Glu Met Val Pro Leu Ile Ser Gln Ala Cys
 145 150 155 160

Asp Leu Leu Leu Ala His Leu Lys Arg Tyr Ala Glu Ser Gly Asp Ala

ES 2 655 209 T3

	165	170	175
Phe Asp Ile Gln Arg Cys Tyr Cys Asn Tyr Thr Thr Asp Val Val Ala	180	185	190
Ser Val Ala Phe Gly Thr Pro Val Asp Ser Trp Gln Ala Pro Glu Asp	195	200	205
Pro Phe Val Lys His Cys Lys Arg Phe Phe Glu Phe Cys Ile Pro Arg	210	215	220
Pro Ile Leu Val Leu Leu Leu Ser Phe Pro Ser Ile Met Val Pro Leu	225	230	235
Ala Arg Ile Leu Pro Asn Lys Asn Arg Asp Glu Leu Asn Gly Phe Phe	245	250	255
Asn Lys Leu Ile Arg Asn Val Ile Ala Leu Arg Asp Gln Gln Ala Ala	260	265	270
Glu Glu Arg Arg Arg Asp Phe Leu Gln Met Val Leu Asp Ala Arg His	275	280	285
Ser Ala Ser Pro Met Gly Val Gln Asp Phe Asp Ile Val Arg Asp Val	290	295	300
Phe Ser Ser Thr Gly Cys Lys Pro Asn Pro Ser Arg Gln His Gln Pro	305	310	315
Ser Pro Met Ala Arg Pro Leu Thr Val Asp Glu Ile Val Gly Gln Ala	325	330	335
Phe Ile Phe Leu Ile Ala Gly Tyr Glu Ile Ile Thr Asn Thr Leu Ser	340	345	350
Phe Ala Thr Tyr Leu Leu Ala Thr Asn Pro Asp Cys Gln Glu Lys Leu	355	360	365
Leu Arg Glu Val Asp Val Phe Lys Glu Lys His Met Ala Pro Glu Phe	370	375	380
Cys Ser Leu Glu Glu Gly Leu Pro Tyr Leu Asp Met Val Ile Ala Glu	385	390	395
Thr Leu Arg Met Tyr Pro Pro Ala Phe Arg Phe Thr Arg Glu Ala Ala	405	410	415

ES 2 655 209 T3

Gln Asp Cys Glu Val Leu Gly Gln Arg Ile Pro Ala Gly Ala Val Leu
 420 425 430

Glu Met Ala Val Gly Ala Leu His His Asp Pro Glu His Trp Pro Ser
 435 440 445

Pro Glu Thr Phe Asn Pro Glu Arg Phe Thr Ala Glu Ala Arg Gln Gln
 450 455 460

His Arg Pro Phe Thr Tyr Leu Pro Phe Gly Ala Gly Pro Arg Ser Cys
 465 470 475 480

Leu Gly Val Arg Leu Gly Leu Leu Glu Val Lys Leu Thr Leu Leu His
 485 490 495

Val Leu His Lys Phe Arg Phe Gln Ala Cys Pro Glu Thr Gln Val Pro
 500 505 510

Leu Gln Leu Glu Ser Lys Ser Ala Leu Gly Pro Lys Asn Gly Val Tyr
 515 520 525

Ile Lys Ile Val Ser Arg
 530

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para diagnosticar o predecir un síndrome de displasia hematodifisaria de Ghosal en un sujeto, método que comprende detectar una mutación en el gen TBXAS1 seleccionada del grupo que consiste en mutaciones que tienen como resultado los mutantes Leu488Pro, Leu83Pro, Gly482Trp y Arg413Glu de la tromboxano sintasa (TBXAS1), en el que la presencia de dicha mutación es indicativa de un síndrome de displasia hematodifisaria de Ghosal, en el que dicho método comprende la etapa de detectar una mutación de TBXAS1 en una muestra de ácido nucleico obtenida de dicho sujeto.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la mutación se selecciona del grupo que consiste en 1463T>C, 248T>C, 1444G>T y 1238G>A.
- 15 3. Un inhibidor de la expresión del gen TBXAS1 o un inhibidor de tromboxano para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con una disminución de la densidad mineral ósea, en el que dicha enfermedad asociada con una disminución de la densidad mineral ósea es la osteogénesis imperfecta.

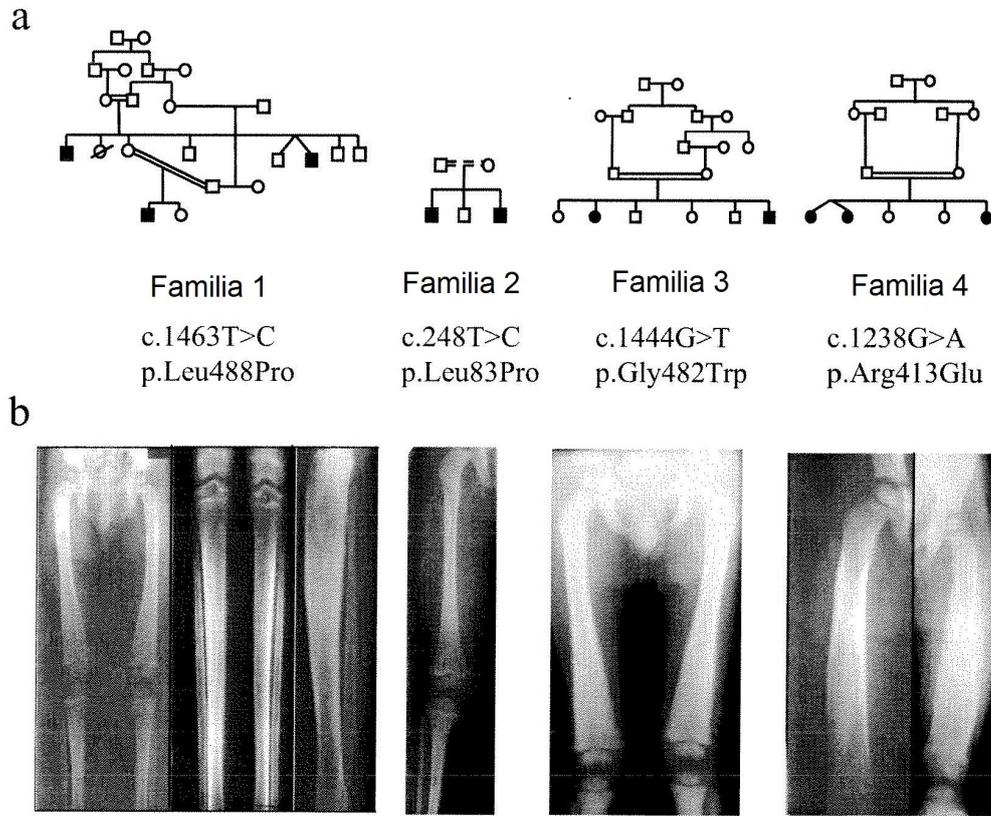


Figura 1

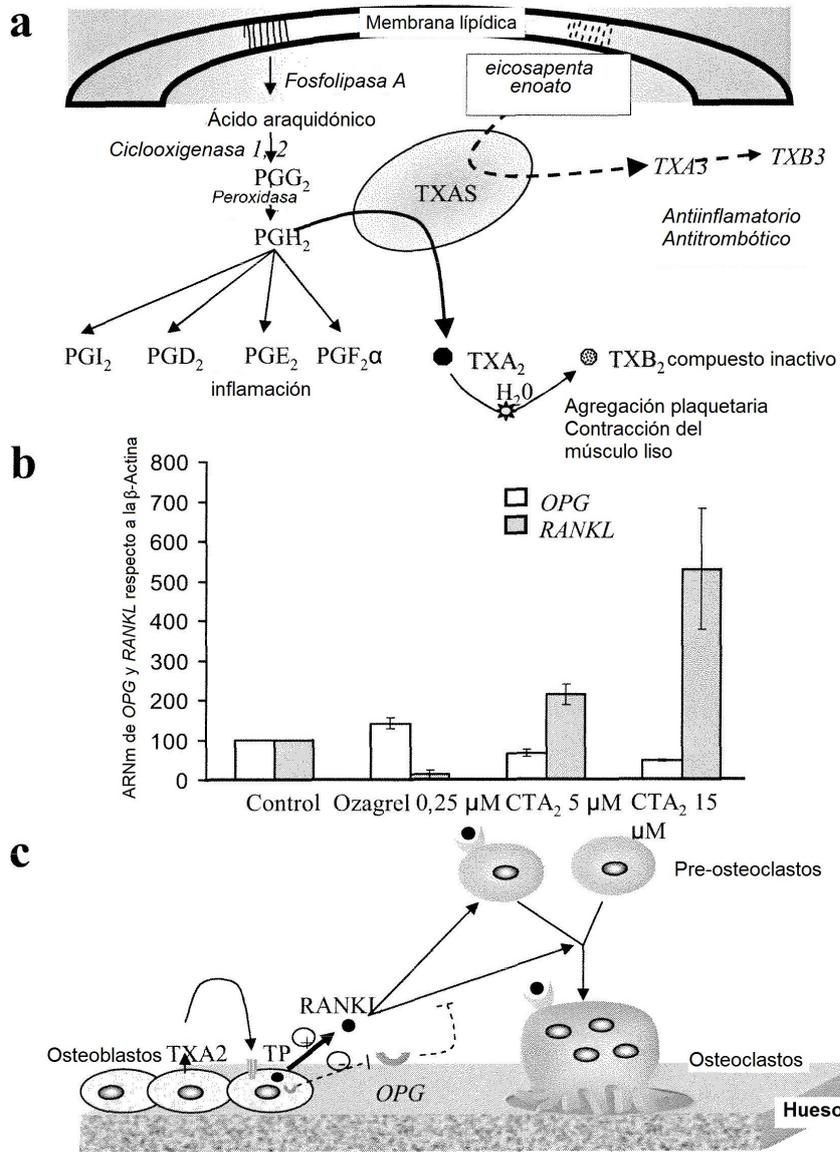


Figura 2

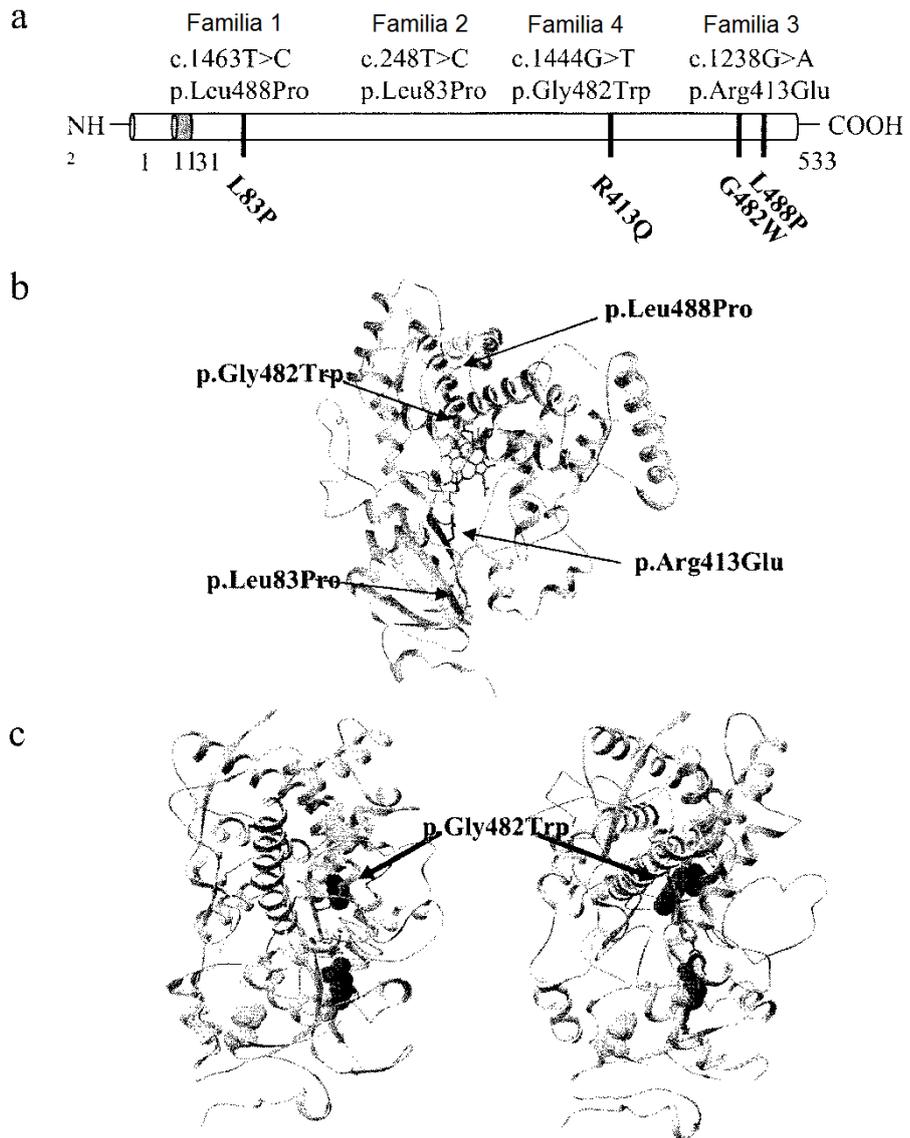


Figura 3

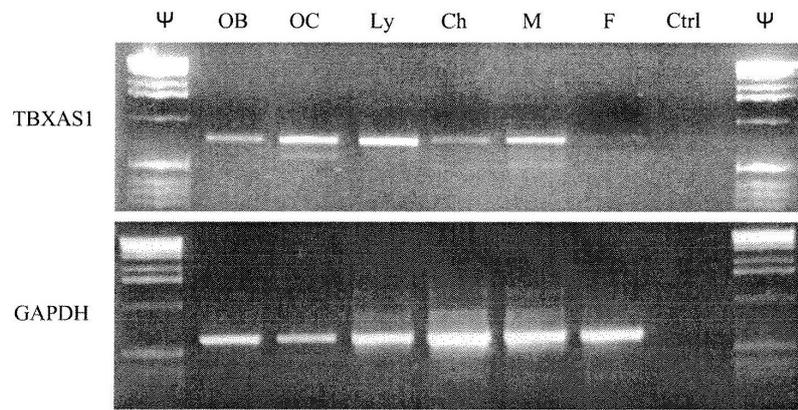


Figura 4

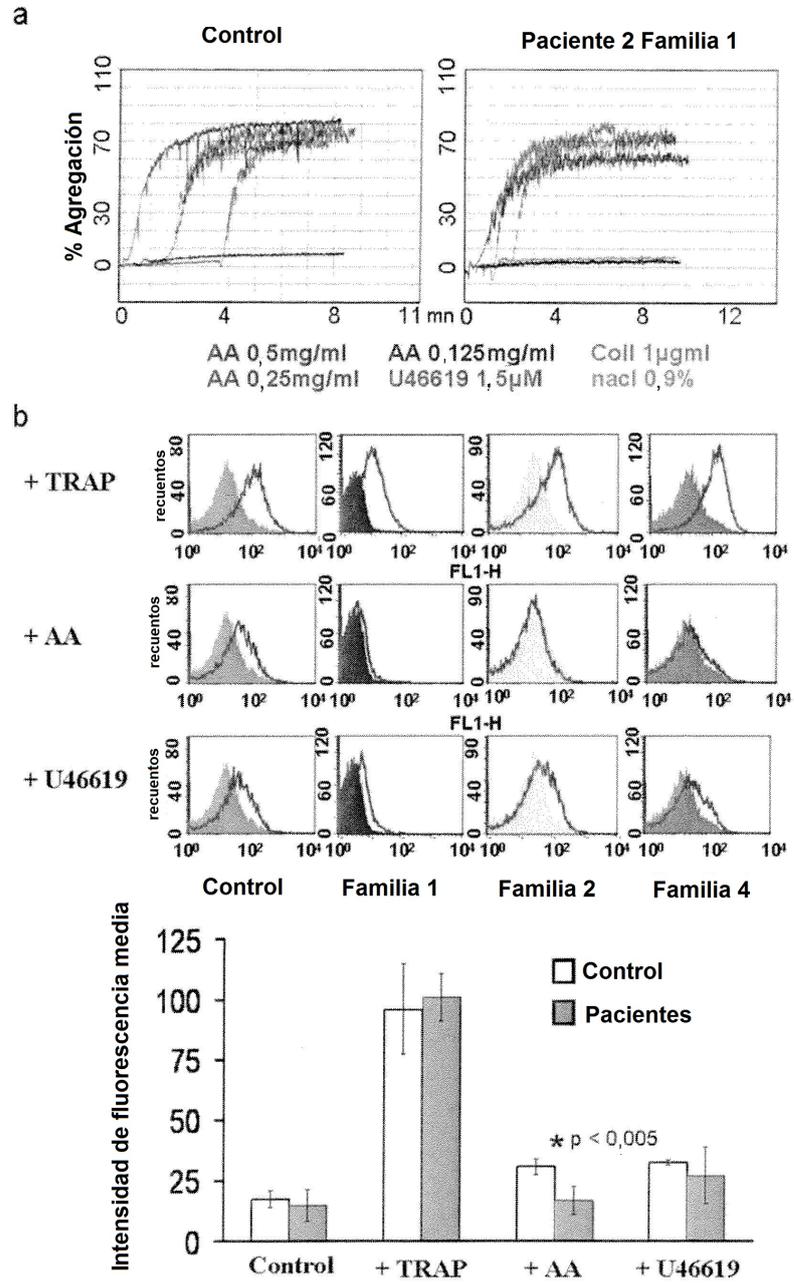


Figura 5